

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PLANEJAMENTO *IN SILICO* E SÍNTESE DE DERIVADOS DE  $\alpha$  E  $\beta$  AMIRINAS  
COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

CARLOS KLINGER RODRIGUES SERRÃO

MANAUS – AM

2021

CARLOS KLINGER RODRIGUES SERRÃO

PLANEJAMENTO *IN SILICO* E SÍNTESE DE DERIVADOS DE  $\alpha$  E  $\beta$  AMIRINAS  
COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Guilhaon-Simplicio

MANAUS – AM

2021

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Serrão, Carlos Klinger Rodrigues  
S489p Planejamento in silico e síntese de derivados de a e b amirinas com  
atividade antileishmania / Carlos Klinger Rodrigues Serrão .2021  
148 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Fernanda Guilhon-Simplicio  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. triterpenos. 2. a e b amirinas. 3. leishmaniose. 4. docking  
molecular. 5. semissíntese. I. Guilhon-Simplicio, Fernanda. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

**“Planejamento in silico e síntese de derivados de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas com atividade antileishmania”**

**DISCENTE: CARLOS KLINGER RODRIGUES SERRÃO**

**PARECER:**

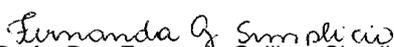
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 03/05/2021.



Profa. Dra. Ariane Mendonça Kluczkovski  
Coordenadora do PPGCF

**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:**

  
Profa. Dra. Fernanda Guilhon Simplicio  
Orientadora e Presidente da Banca (UFAM)

  
Prof. Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido  
Membro (USP)

  
Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen  
Membro (UEA)

*“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”*

*(Dalai Lama)*

*“O bater de asas de uma borboleta pode causar um tufão do outro lado do mundo”*

*(A teoria do caos)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que conspirou sobre o todo o universo ao meu favor para realizar este sonho, me deu energia e força nos dias difíceis e me protegeu das coisas que foram invisíveis para mim.

À minha família, que me apoiou em todos os momentos, obrigado pelo amor e carinho. Em especial a minha mãe pela paciência e bondade incomparável, a senhora é o elo que une todos da nossa família, nossa âncora, nossa rainha.

À minha orientadora, professora Fernanda. A verdade é que eu não tive só a melhor orientadora que alguém pode ter, eu tive também uma segunda mãe. Obrigado pela orientação, pela confiança, e acima de tudo pela paciência, pelos conselhos e pela amizade. Nem metade disso teria sido feito sem o seu incentivo e carinho.

Aos meus amigos do laboratório: Tallita, obrigado por toda a ajuda que você me deu, mas obrigado de verdade pela companhia e amizade, nós festejamos e sofremos juntos. Natalie, obrigado pela ajuda em tudo também e pela paciência em ensinar, obrigado pela amizade. Aryane, obrigado pela contribuição incrível nesse trabalho, nós rimos muito juntos e você não imagina o quanto isso foi importante no meu coração. Agradeço a todos pelo carinho, amizade e ajuda: Rebeca, Rhanna, professora Ana e todas as outras pessoas que estiveram ou estavam nessa grande família que é o FITOPHAR.

Ao professor Emerson, pelo incentivo e auxílio nesse trabalho. Obrigado por disponibilizar o seu laboratório para que eu pudesse finalizar os últimos experimentos.

Ao técnico da Central Analítica do INPA, Magno. Gratidão pelas análises no RMN e MS e pela ajuda e paciência com as interpretações dos espectros.

Aos meus amigos da UFAM: Verônica, Rodrigo, Carol, Ingrid, Juliana, Lívia, Douglas, Marcos, Mariana, Lorena, Janaína, Tallita, Rebeca, Natalie, Aryane e todas as outras pessoas que estiveram comigo, lutando pelos seus objetivos e pelos seus sonhos dentro da Universidade, seja no mestrado, doutorado ou na graduação. Vocês todos são exemplos para mim e tenho muito orgulho de tê-los como amigos.

À CAPES pelo auxílio financeiro indispensável nesse trabalho, a toda equipe do PPGCF que me permitiu a oportunidade única de chegar até aqui e à UFAM, o qual tem me acolhido desde a graduação e continua sendo o meu segundo lar.

## RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas causadas por diferentes parasitas do gênero *Leishmania*. Estas doenças são endêmicas em 98 países e afetam de 12 a 15 milhões de pessoas no mundo anualmente. Os tratamentos atuais apresentam muitos efeitos colaterais, tempo de utilização prolongado e muitas vezes falha terapêutica. Devido a este panorama, existe a necessidade de buscar substâncias com potencial antileishmania. Uma abordagem moderna de descoberta de fármacos consiste na utilização de métodos computacionais como o docking molecular, que permite selecionar moléculas com maior probabilidade de se obter resultados experimentais positivos. Triperpenos pentacíclicos têm sido relatados como moléculas potenciais antileishmania. Apesar disso, os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas têm sido pouco investigados. Nesse estudo foi realizado um planejamento racional e desenho de derivados utilizando como esqueleto base os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas. Todas as modificações foram em torno do C-3 que está funcionalizado com um álcool. A primeira série de derivados consistem em sulfonamidas de cadeia *n*-alquílica e sulfonamidas arílicas orto e para substituídas. A segunda série de derivados consistem em heterociclos de 5 membros, fundidos ao esqueleto principal. As estruturas desenhadas foram convertidas em formato 3D e otimizadas. Foi utilizada a enzima CYP51 de *Leishmania infantum* (PDB: 3L4D) e o programa GOLD para realização do docking molecular. Foram selecionados seis derivados da série de sulfonamidas alquílicas (3/4, 5/6 e 9/10), oito derivados da série de sulfonamidas arílicas (21/22, 29/30, 41/42 e 45/46) e oito derivados da série de heterociclos (55/56, 59/60, 61/62 e 63/64), que apresentaram melhor perfil de interações químicas e energia livre de ligação. Os derivados apresentados em pares correspondem aos isômeros  $\alpha$  e  $\beta$ . Para síntese dos derivados foram utilizados os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas extraídos e purificados da resina de *Protium* sp. Para a síntese da série de sulfonamidas arílicas foi utilizado o intermediário 3-amino  $\alpha$  e  $\beta$  amirina que foi tratado com diferentes cloretos de sulfonila para obtenção dos derivados 29/30 (4-acetamidobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina), 41/42 (4-nitrobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina), 45/46 (4-clorobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina) com rendimentos que variaram entre 45 – 71 %. Todos os derivados sulfonamidas obtidos são inéditos na literatura. Para a série de heterociclos foi utilizado o intermediário 2-bromo-3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina, que foi condensado com diferentes nucléofílos. Foi obtido o derivado 63/64 (derivado aminotiazol  $\alpha$  e  $\beta$  amirina), com rendimento de 99%, um exemplo de modificação molecular já reportado em outros triterpenos, porém é a primeira vez inserido em  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas. O presente estudo utilizou metodologias computacionais aliadas a métodos de planejamento racional, visando a seleção e semissíntese de moléculas com atividade biológica antileishmania. As moléculas sintetizadas nesse trabalho serão encaminhadas para avaliação biológica para confirmação do seu potencial como fármacos.

**Palavras-chave:** Triterpenos,  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, leishmaniose, docking molecular, semissíntese, sulfonamidas, heterociclos.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of neglected tropical diseases caused by different parasites of the *Leishmania* genus. This disease is endemic in 98 countries and affects 12 to 15 million people worldwide annually. Current treatments show many side effects, prolonged use time and often therapeutic failure. Due to this scenario, there is a need to seek substances with antileishmania potential. A modern approach to drug discovery consists of using computational methods such as molecular docking, which allows the selection of molecules most likely to obtain positive experimental results. Pentacyclic triterpenes have been reported as potential antileishmania molecules. Despite this, the  $\alpha$  and  $\beta$  amyrin triterpenes have been poorly investigated. In this study, rational planning and design of derivatives were carried out using base skeleton the triterpenes  $\alpha$  and  $\beta$  amyrins. All the modifications were around the C-3 which is functionalized with an alcohol. The first series of derivatives consist of *n*-alkyl chain sulfonamides and ortho- and para- substituted aryl sulfonamides. The second series of derivatives consist of 5-membered heterocycles, fused to the main skeleton. The designed structures were converted into a 3D format and optimized. The CYP51 *Leishmania infantum* enzyme (PDB: 3L4D) and the GOLD program were used to perform molecular docking. Six derivatives from the series of alkyl sulfonamides (3/4, 5/6 and 9/10), eight derivatives from the series of aryl sulfonamides (21/22, 29/30, 41/42 and 45/46) and eight derivatives were selected of the series of heterocycles (55/56, 59/60, 61/62 and 63/64), which presented a better profile of chemical interactions and free energy binding. The derivatives presented in pairs correspond to the isomers  $\alpha$  and  $\beta$ . For the synthesis of derivatives, the triterpenes  $\alpha$  and  $\beta$  amyrins were extracted and purified from the resin of *Protium* sp. For the synthesis of the aryl sulfonamide series, the intermediate 3-amino  $\alpha$  and  $\beta$  amirine was used, which was treated with different sulfonyl chlorides to obtain derivatives 29/30 (4 / acetamidobenzene sulfonamide from  $\alpha$  and  $\beta$  amirine), 41/42 ( $\alpha$  and  $\beta$  amirine 4-nitrobenzene sulfonamide), 45/46 ( $\alpha$  and  $\beta$  amirine 4-chlorobenzene sulfonamide) with yields that varied from 45 to 71%. All sulfonamide derivatives obtained are unprecedented in the literature. For the series of heterocycles, the intermediate 2-bromo-3-oxo  $\alpha$  and  $\beta$  amirine was used, which was condensed with different nucleophiles. The derivative 63/64 (aminothiazole derivative  $\alpha$  and  $\beta$  amirine) was obtained, with 99% yield, an example of molecular modification already reported in other triterpenes, however it is the first time inserted in  $\alpha$  and  $\beta$  amirines. The present study contributed to the application of computational methodologies combined with methods of rational design, aiming at the semisynthesis of molecules with biological activity antileishmania. The molecules synthesized in this work will be sent for biological evaluation to confirm their potential as drugs.

**Keywords:** Triterpenes,  $\alpha$  and  $\beta$  amyrins, leishmaniasis, molecular docking, semisynthesis, sulfonamides, heterocycles.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i> spp. no hospedeiro humano/animal doméstico.....	22
<b>Figura 2</b> - Formas clínicas da leishmaniose em humanos .....	24
<b>Figura 3</b> - Estrutura química dos principais fármacos utilizados para tratamento das leishmanioses.....	27
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática do redocking .....	32
<b>Figura 5</b> - Rota de síntese de esteróis em plantas, fungos, parasitas e vertebrados.....	34
<b>Figura 6</b> - Estratégias de biososterismo e homologação em fármacos.....	36
<b>Figura 7</b> - Tipos de interações eletrostáticas de empilhamento em anéis.....	37
<b>Figura 8</b> - Diagrama de Craig .....	38
<b>Figura 9</b> - Estrutura dos triterpenos com atividade antileishmania .....	41
<b>Figura 10</b> - Triterpenos $\alpha$ (à esquerda) e $\beta$ (à direita) amirinas.....	42
<b>Figura 11</b> - Derivados $\alpha$ e $\beta$ amirinas com atividade antimicrobiana e antinociceptiva	43
<b>Figura 12</b> - Derivados $\alpha$ e $\beta$ amirinas com atividade antineoplásica.....	44
<b>Figura 13</b> - Derivados $\alpha$ e $\beta$ amirinas com atividade antihiperlipidêmica.....	45
<b>Figura 14</b> - Delineamento experimental das atividades .....	47
<b>Figura 15</b> - Planejamento dos derivados sulfonamídicos .....	49
<b>Figura 16</b> - Planejamento dos derivados heterocíclicos .....	50
<b>Figura 17</b> - Exemplo de análise por clusterização.....	52
<b>Figura 18</b> - Síntese do derivado 3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (1a/1b).....	54
<b>Figura 19</b> - Síntese do derivado 3-amino $\alpha$ e $\beta$ amirina (2a/2b).....	55
<b>Figura 20</b> - Síntese do derivado 4-nitrobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (3a/3b)	56
<b>Figura 21</b> - Síntese do derivado 4-clorobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (4a/4b)	56
<b>Figura 22</b> - Síntese do derivado 4-acetamidobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (5a/5b).....	57
<b>Figura 23</b> - Síntese do derivado 4-aminobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (6a/6b) .....	57
<b>Figura 24</b> - Síntese do derivado 2-bromo-3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (7a/7b).....	58
<b>Figura 25</b> - Síntese do derivado aminotiazol $\alpha$ e $\beta$ amirina (8a/8b) .....	58
<b>Figura 26</b> - Síntese do derivado hidrazina-1-carboxiamida $\alpha$ e $\beta$ amirina (9a/9b).....	59
<b>Figura 27</b> - Área do sítio catalítico da enzima 3L4D .....	61
<b>Figura 28</b> - Pose de fluconazol obtida após o redocking.....	62
<b>Figura 29</b> - Interação dos derivados 3 e 4 no sítio ativo da enzima CYP51.....	63
<b>Figura 30</b> - Interação dos derivados 5 e 6 no sítio ativo da enzima CYP51.....	64
<b>Figura 31</b> - Interação dos derivados 9 e 10 no sítio ativo da enzima CYP51.....	64
<b>Figura 32</b> - Comparação entre os derivados 4, 10, 14 e 18 da série de sulfonamidas...	65
<b>Figura 33</b> - Interação dos derivados 21 e 22 no sítio ativo da enzima CYP51.....	66
<b>Figura 34</b> - Interação dos derivados 29 e 30 no sítio ativo da enzima CYP51.....	67
<b>Figura 35</b> - Interação dos derivados 41 e 42 no sítio ativo da enzima .....	67
<b>Figura 36</b> - Interação dos derivados 45 e 46 no sítio ativo da enzima CYP51.....	68
<b>Figura 37</b> - Comparação entre os derivados 29/30 versus 31/32 e derivados 41/42 e 43/44 .....	69

<b>Figura 38</b> - Comparação entre os derivados 45/46 versus 47/48 da série de sulfonamidas.....	69
<b>Figura 39</b> - Interação dos derivados 55 e 56 no sítio ativo da enzima CYP51.....	70
<b>Figura 40</b> - Interação dos derivados 59 e 60 no sítio ativo da enzima CYP51.....	71
<b>Figura 41</b> - Interação dos derivados 61 e 62 no sítio ativo da enzima CYP51.....	71
<b>Figura 42</b> - Interação dos derivados 63 e 64 no sítio ativo da enzima CYP51.....	72
<b>Figura 43</b> - Comparação entre os derivados 55/56 versus 57/58 da série de heterociclos .....	73
<b>Figura 44</b> - Comparação entre os derivados 59/60, 61/62 e 63/64 da série de heterociclos.....	73
<b>Figura 45</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de $\alpha$ e $\beta$ amirinas (5,2 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) com ampliações .....	76
<b>Figura 46</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 de $\alpha$ e $\beta$ amirinas (5,2 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 75 MHz).....	77
<b>Figura 47</b> - Mecanismo de reação para formação do composto 1a/1b.....	79
<b>Figura 48</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (1a/1b) (5,8 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) com ampliações.....	81
<b>Figura 49</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 de 3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 1a/1b) (5,8 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 75 MHz) .....	82
<b>Figura 50</b> - Mecanismo de reação para formação do composto (2a/2b) .....	84
<b>Figura 51</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 3-amino $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 2a/2b) (6,6 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) com ampliações.....	86
<b>Figura 52</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 de 3-amino $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 2a/2b) (6,6 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 75 MHz) com ampliações .....	87
<b>Figura 53</b> - Mecanismo de reação para formação das sulfonamidas 3a/3b, 4a/4b e 5a/5b .....	88
<b>Figura 54</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 4-nitrobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 3a/3b) (10,1 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 500 MHz) com ampliações .....	91
<b>Figura 55</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 de 4-nitrobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 3a/3b) (10,1 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 75 MHz).....	92
<b>Figura 56</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 4-clorobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 4a/4b) (5,3 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) com ampliações .....	94
<b>Figura 57</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 de 4-clorobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 4a/4b) (5,3 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 75 MHz).....	95
<b>Figura 58</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 4-acetamido benzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 5a/5b) (5,3 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) com ampliações .....	99
<b>Figura 59</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 de 4-clorobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 5a/5b) (5,3 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 75 MHz).....	100
<b>Figura 60</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 4-amino benzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 6a/6b) (2,0 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) .....	103
<b>Figura 61</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 de 4-aminobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 6a/6b) (2,0 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 75 MHz).....	104
<b>Figura 62</b> - Mecanismo da reação para formação do composto 7a/7b.....	105
<b>Figura 63</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 2-bromo-3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 7a/7b) (5,7 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) com ampliações .....	108

<b>Figura 64</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 de 2-bromo-3-oxo α e β amirina (composto 7a/7b) (5,7 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 75 MHz) .....	109
<b>Figura 65</b> - Mecanismo da reação para formação do composto 8a/8b .....	110
<b>Figura 66</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do derivado aminotiazol α e β amirina (composto 8a/8b) (5,7 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) com ampliações .....	112
<b>Figura 67</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 do derivado aminotiazol α e β amirina (composto 8a/8b) (5,7 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 75 MHz) .....	113
<b>Figura 68</b> - Rota de síntese dos derivados heterociclos amino-oxazol e amino-imidazol .....	114
<b>Figura 69</b> - Produtos formados pela reação com o solvente morfolina .....	115
<b>Figura 70</b> - Mecanismo da reação para formação do composto 9a/9b .....	116
<b>Figura 71</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do derivado hidrazina-1-carboxiamida α e β amirina (composto 9a/9b) (5,2 mg; CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) .....	118
<b>Figura 72</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135 de hidrazina-1-carboxiamida α e β amirina (composto 9a/9b) (5,2 mg CDCl <sub>3</sub> ; 75 MHz) .....	119

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Validação da função de pontuação para enzima 14 $\alpha$ -demetilase (PDB: 3L4D) .....	61
<b>Tabela 2</b> - Deslocamentos do RMN $^{13}\text{C}$ de $\alpha$ e $\beta$ amirinas em comparação com os sinais encontrados na literatura.....	78
<b>Tabela 3</b> - Deslocamentos do RMN $^{13}\text{C}$ de 3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 1a/1b) em comparação com os sinais de $\alpha$ e $\beta$ amirinas.....	80
<b>Tabela 4</b> - Deslocamentos do RMN $^{13}\text{C}$ de 3-amino $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 2a/2b) em comparação com os sinais de 3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirinas (composto 1a/1b) .....	85
<b>Tabela 5</b> - Deslocamentos do RMN $^{13}\text{C}$ de 4-nitrobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 3a/3b) em comparação com os sinais de 3-amino $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 2a/2b).....	90
<b>Tabela 6</b> - Deslocamentos do RMN $^{13}\text{C}$ de 4-clorobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 4a/4b) em comparação com os sinais de 3-amino $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 2a/2b).....	96
<b>Tabela 7</b> - Deslocamentos do RMN $^{13}\text{C}$ de 4-acetamido benzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 5a/5b) em comparação com os sinais de 3-amino $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 2a/2b).....	98
<b>Tabela 8</b> - Deslocamentos do RMN $^{13}\text{C}$ de 2-bromo-3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 7a/7b) em comparação com os sinais de 3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 1a/1b).....	107
<b>Tabela 9</b> - Deslocamentos do RMN $^{13}\text{C}$ do derivado aminotiazol $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 8a/8b) em comparação com os sinais de 2-bromo-3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 7a/7b).....	111
<b>Tabela 10</b> - Deslocamentos do RMN $^{13}\text{C}$ de hidrazina-1-carboxiamida $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 9a/9b) em comparação com os sinais de 3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (composto 1a/1b).....	117

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Metodologias de rastreamento virtual baseado na estrutura do ligante .....	29
<b>Quadro 2</b> - Funções de pontuação utilizadas pelo programa GOLD .....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$(\text{NH}_2)_2\text{CS}$	Tiouréia
Å	Ångström
AcOEt	Acetato de etila
AcONa	Acetato de sódio
AcONH <sub>4</sub>	Acetato de amônia
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CADD	Desenvolvimento de fármacos auxiliado por computador
CCD	Cromatografia em camada delgada
CH <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O.HCl	Cloreto de semicarbazida
ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>2</sub> Cl	Cloreto de 4-clorobenzeno sulfonila
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
eq	Equivalente
ERK1/2	Cinases reguladas por sinais extracelulares 1/2
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
EtOH	Etanol
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato de ferro II
GA	Algoritmo genético
GOLD	<i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HTS	Triagem Biológica Automatizada em Alta Escala
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LBVS	Triagem virtual baseada na estrutura do ligante
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MeOH	Metanol
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio anidro
NaCNBH <sub>3</sub>	Cianoborohidreto de sódio
NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>2</sub> Cl	Cloreto de 4-nitrobenzeno sulfonila

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PDB	Protein Data Bank
PCC	Clorocromato de piridínio
ppm	Partes por milhão
py	Piridina
QSAR	Relações Quantitativas de Estrutura-Atividade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio Médio Quadrático
RNA	Ácido ribonucleico
Sb <sup>3+</sup>	Antimônio trivalente
Sb <sup>5+</sup>	Antimônio pentavalente
SBVS	Triagem virtual baseada na estrutura do receptor
SiO <sub>2</sub>	Sílica gel
t. a.	Temperatura ambiente
TCD4 Th1	Linfócito TCD4 “helper” 1
UV	Ultravioleta
VS	<i>Screening</i> Virtual
δ	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
<b>2.1 Aspectos gerais das leishmanioses</b> .....	20
2.1.1 Classificação das Manifestações Clínicas .....	23
2.1.2 Tratamento Farmacológico .....	24
<b>2.2 Planejamento Racional de Fármacos</b> .....	27
2.2.1 Triagem Virtual Baseada no Ligante – LBVS .....	29
2.2.2 Triagem Virtual Baseada no Receptor – SBVS .....	29
<b>2.3 Planejamento Racional e Modificação Molecular</b> .....	35
<b>2.4 Produtos Naturais</b> .....	38
2.4.1 Triterpenos como agentes antileishmania .....	39
2.4.2 Triterpenos $\alpha$ e $\beta$ amirinas .....	41
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	46
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	46
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	46
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	47
<b>4.1 Delineamento experimental</b> .....	47
<b>4.2 Planejamento racional dos derivados triterpênicos</b> .....	47
4.2.1 Planejamento dos derivados sulfonamídicos .....	47
4.2.2 Planejamento dos derivados heterocíclicos .....	49
<b>4.3 Obtenção e otimização das estruturas dos derivados</b> .....	50
<b>4.4 Seleção e preparação do alvo biológico</b> .....	51
<b>4.5 Redocking</b> .....	51
<b>4.6 Docking dos derivados triterpênicos</b> .....	52
<b>4.7 Análise da energia livre de ligação</b> .....	52
<b>4.8 Seleção dos derivados</b> .....	53
<b>4.9 Obtenção dos derivados por semissíntese</b> .....	53
4.9.1 Reagentes e Equipamentos .....	53
4.9.2 Obtenção dos triterpenos $\alpha$ e $\beta$ amirinas .....	54
4.9.3 Síntese de 3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina ( <b>1a/1b</b> ) .....	54
4.9.4 Síntese de 3-amino $\alpha$ e $\beta$ amirina ( <b>2a/2b</b> ) .....	55
4.9.5 Síntese de 4-nitrobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina ( <b>3a/3b</b> ) .....	55

4.9.6 Síntese de 4-clorobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (4a/4b).....	56
4.9.7 Síntese de 4-acetamidobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (5a/5b).....	56
4.9.8 Síntese de 4-aminobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (6a/6b).....	57
4.9.9 Síntese de 2-bromo-3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (7a/7b).....	57
4.9.10 Síntese do derivado aminotiazol $\alpha$ e $\beta$ amirina (8a/8b).....	58
4.9.11 Síntese do derivado hidrazina-1-carboxiamida $\alpha$ e $\beta$ amirina (9a/9b) .....	59
4.9.12 Análises para confirmação estrutural.....	59
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1 Análises in silico .....</b>	<b>60</b>
<b>5.2 Semissíntese dos derivados triterpênicos .....</b>	<b>74</b>
<b>5.3 Síntese do intermediário 3-oxo <math>\alpha</math> e <math>\beta</math> amirina (1a/1b) .....</b>	<b>78</b>
<b>5.4 Síntese do intermediário 3-amino <math>\alpha</math> e <math>\beta</math> amirinas (2a/2b) .....</b>	<b>83</b>
<b>5.5 Síntese dos derivados sulfonamidas arílicas (3a/3b), (4a/4b) e (5a/5b).....</b>	<b>88</b>
5.5.1 Síntese do derivado 4-nitrobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (3a/3b) .....	88
5.5.2 Síntese do derivado 4-clorobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (4a/4b).....	93
5.5.3 Síntese do derivado 4-acetamidobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (5a/5b)	96
<b>5.6 Síntese do derivado 4-aminobenzeno sulfonamida de <math>\alpha</math> e <math>\beta</math> amirina (6a/6b) .</b>	<b>101</b>
<b>5.7 Derivados triterpênicos sulfonamidas de cadeia alquílica.....</b>	<b>102</b>
<b>5.8 Síntese do intermediário 2-bromo-3-oxo <math>\alpha</math> e <math>\beta</math> amirina (7a/7b) .....</b>	<b>105</b>
<b>5.9 Síntese do derivado heterociclo aminotiazol <math>\alpha</math> e <math>\beta</math> amirina (8a/8b) .....</b>	<b>110</b>
<b>5.10. Tentativa de síntese dos derivados heterociclos amino-oxazol e amino-</b>	
<b>imidazol .....</b>	<b>114</b>
<b>5.11 Síntese do intermediário hidrazina-1-carboxiamida <math>\alpha</math> e <math>\beta</math> amirina (9a/9b) ...</b>	<b>116</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>120</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>133</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>135</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>136</b>
<b>APÊNDICE D .....</b>	<b>138</b>
<b>APÊNDICE E.....</b>	<b>139</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo diversificado de doenças transmissíveis que prevalecem em regiões tropicais e subtropicais, afetando 149 países e mais de um bilhão de pessoas, e custam às economias em desenvolvimento bilhões de dólares todos os anos. As populações que vivem na pobreza, sem saneamento adequado e em contato próximo com vetores infecciosos, animais domésticos e gado são as mais afetadas. DTNs carecem de financiamento e inovação adequados para prevenção e tratamento (MACKEY et al., 2014, WHO, 2017).

As leishmanioses acompanham a humanidade desde tempos remotos. Os dados mais antigos datam de 2050-1050 a.C, onde foi encontrado DNA mitocondrial de *L. donovani* em múmias no Antigo Egito. Na Idade Média, o filósofo persa Avicena trouxe descrições morfológicas de lesões e tratamentos da leishmaniose. Na Idade Moderna, durante a colonização das Américas, exploradores espanhóis relataram lesões características em agricultores de plantações de coca nos Andes Peruanos. Somente no início do século 20 ocorreu a identificação morfológica dos parasitas em organismos infectados, descoberta atribuída aos cientistas William Boog Leishman e Charles Donovan (STEVERDING, 2017).

Apesar da longa história, a leishmaniose ainda está entre as três principais DTNs causadas por protozoários, com altos índices de morbidade e mortalidade. A doença possui grande alcance geográfico, ocorrendo principalmente na população mais humilde e também em animais domésticos como cães e gatos, e os parasitas apresentam grande complexidade epidemiológica e médica (BRUSCHI; GRADONI, 2018).

As leishmanioses fazem parte do grupo das DTNs, causadas por pelo menos 20 espécies do gênero *Leishmania* e transmitidas entre hospedeiros mamíferos por meio de insetos flebotomíneos fêmeas (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). As leishmanioses são classificadas em três formas clínicas: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea, que diferem no padrão e nas manifestações clínicas da infecção (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e estão sob risco de infecção. Estima-se que 50.000 novos casos de leishmaniose visceral e mais de 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea ocorram anualmente (WHO, 2020b).

O tratamento da leishmaniose consiste em agentes quimioterápicos, como os compostos de antimônio pentavalente, pentamidina, miltefosina e anfotericina B (BRASIL, 2017). Todos esses fármacos apresentam limitações como alta toxicidade, muitos efeitos adversos, custo e duração do tratamento e ainda a frequente ineficácia terapêutica devido resistência (PONTE-SUCRE et al., 2017). Dessa forma é importante continuar a busca por novos quimioterápicos eficazes e tratamentos menos tóxicos.

Uma abordagem moderna na descoberta de novos agentes para tratamento de DTN's é a utilização de métodos experimentais associados a métodos computacionais. A integração dessas estratégias permite a identificação de novas drogas, otimização do tempo e redução com custos desnecessários em compostos não promissores (FERREIRA et al., 2015). A triagem virtual baseada na estrutura do receptor (SBVS) é uma abordagem que permite explorar um conjunto grande de estruturas químicas frente a um alvo específico, auxiliando no trabalho de identificação, seleção e otimização de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2012).

Os produtos naturais têm sido uma fonte valiosa para a pesquisa de medicamentos e são de grande importância no desenvolvimento de drogas. As estratégias computacionais podem auxiliar na identificação de compostos naturais promissores (BARNES; KUMAR; DAVIS, 2016). Os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas são produtos naturais bastante distribuídos em espécies vegetais, estando entre os constituintes majoritários dos gêneros *Protium* sp. (RÜDIGER; VEIGA-JUNIOR, 2013) e *Byrsonima* sp. (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). A semissíntese é uma excelente estratégia para melhor aproveitamento dessas moléculas. A incorporação de grupamentos farmacofóricos é uma maneira interessante de se obter derivados com potencial biológico.

Nesse contexto, de forma a obter moléculas semissintéticas antileishmania a partir de triterpenos naturais provenientes da biodiversidade amazônica, foi realizado um planejamento racional *in silico* objetivando moléculas inéditas contra *Leishmania* spp. As moléculas desenhadas foram selecionadas por SBVS utilizando a enzima CYP51 para identificação de *hits* que foram sintetizados e serão testados *in vitro* para atividade leishmanicida.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, afetando principalmente a África, Ásia e América Latina. Está associada a expansão de áreas urbanas e periurbanas para zonas rurais e florestais, moradia precária, domesticação de animais, desnutrição, sistema imunológico fraco e falta de recursos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 98 países e territórios foram endêmicos para leishmaniose em 2018, o que inclui 68 países que são endêmicos para leishmaniose visceral e cutânea, 9 países que são endêmicos somente para leishmaniose visceral e 21 países que são endêmicos somente para forma cutânea (WHO, 2020a).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar no continente asiático, é fatal se não tratada. A maioria dos casos ocorre no Brasil, África Oriental e na Índia. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo anualmente, com apenas 25 a 45% dos casos relatados à OMS. É uma das principais doenças parasitárias com potencial de surto e mortalidade. A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum. Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Estima-se que ocorram anualmente entre 600.000 a 1 milhão de novos casos em todo o mundo (WHO, 2020b).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde, o Brasil faz parte dos países endêmicos nas Américas em leishmaniose. Em 2019, foi o país com maior número de casos reportados com cerca de 15.484 notificações da doença na forma cutânea e mucocutânea, representando 37% dos casos nas Américas. O Brasil também reporta a maior parte dos casos de LV, cerca de 97% (2.529) do total de casos no continente americano. Além disso, entre os 5 países com maior número de casos de LV em 2019 (Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul), o Brasil é o país com a maior taxa de letalidade (7,7%), seguido pelo Sudão do Sul (5%) e Etiópia (2,5%) (OPAS, 2020).

Os agentes etiológicos causadores da doença são protozoários do gênero *Leishmania*, que coevoluíram com vetores denominados mosquitos flebotomíneos (família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*). Dentre as diferentes espécies de flebotomíneos, os mosquitos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* (flebotomíneos do Velho Mundo) e *Lutzomyia* (flebotomíneos do Novo Mundo), conhecidos popularmente como “sandfly” ou “mosquitos palha”, são responsáveis pela transmissão da doença (AKHOUNDI et al., 2016). Somente as fêmeas realizam o repasto sanguíneo, geralmente

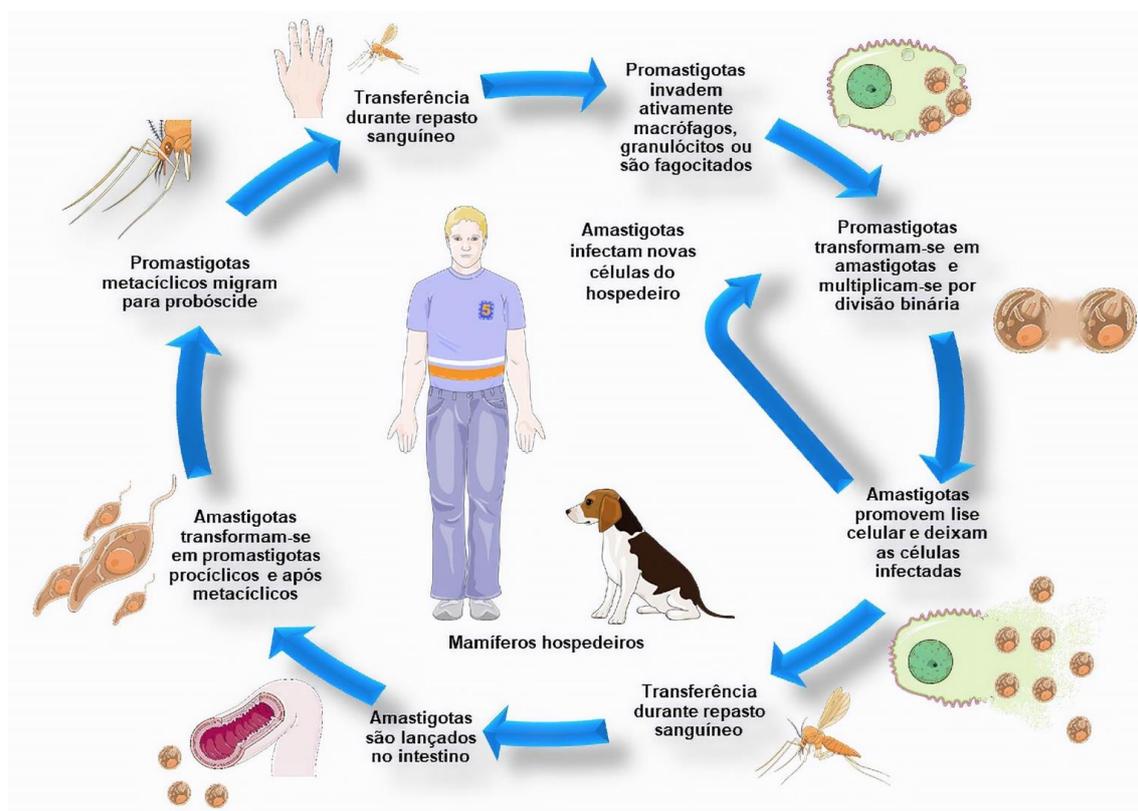
durante a noite, preferindo animais silvestres como mamíferos roedores (Novo Mundo) ou répteis (Velho Mundo) que são considerados reservatórios naturais, e os humanos (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Os parasitas do gênero *Leishmania* pertencem a família dos tripanossomatídeos cinetoplastídeos, que são eucariotos que apresentam um único flagelo e de modo ímpar uma massa conspícua de DNA, o cinetoplasto, que fica dentro de uma grande mitocôndria (SIMPSON; STEVENS; LUKEŠ, 2006). Os parasitas que causam doenças em humanos são agrupados em dois subgêneros: *Leishmania*, de ocorrência no Novo e Velho Mundo, e que se desenvolvem no intestino anterior e médio dos flebotomíneos, e *Viannia*, de ocorrência somente no Novo Mundo, que se desenvolvem no intestino anterior, médio e posterior (MARTÍNEZ, F. VARGAS; TORRES-GUERRERO, E.; ARENAS, R.; QUINTANILLA C., 2011).

A transmissão do parasita a partir do vetor para o hospedeiro ocorre durante o repasto sanguíneo (**Figura 1**). A fêmea infectada abriga os parasitas amadurecidos na forma de promastigotas flagelados, os quais anteriormente passaram por etapa de desenvolvimento no intestino do flebotomíneo, onde as formas amastigotas tornaram-se promastigotas pró-cíclicos e finalmente promastigotas metacíclicos (flagelados). Ao picar um animal saudável, o vetor inocula os promastigotas de *Leishmania* por regurgitação (VERA-IZAGUIRRE et al., 2006).

O parasita inoculado no tegumento do hospedeiro é fagocitado por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos ou monócitos circulantes. Dentro das células ocorre a formação de um fagolisossoma, onde os promastigotas se diferenciam em amastigotas, formas infectantes esféricas sem flagelos que são intracelulares obrigatórios. Os amastigotas proliferam por fissão binária, chegando a romper as células hospedeiras, infectando células vizinhas em seguida. A infecção pode ser subclínica, quando é observada apenas por intradermoreação de Montenegro, ou autolimitada após incubação de 20 a 90 dias, caracterizando a infecção cutânea localizada (VERA-IZAGUIRRE et al., 2006).

**Figura 1** - Ciclo de vida do parasita *Leishmania* spp. no hospedeiro humano/animal doméstico



O papel do sistema imune é de fundamental importância para a progressão da doença ou a sua cura. Para estabelecer a infecção os parasitas necessitam do recrutamento de macrófagos e neutrófilos para o local, e uma vez dentro das células, diversas estratégias são usadas para modular a resposta do sistema imune do hospedeiro, afetando a imunidade inata e adaptativa para promover a sua sobrevivência (ROSSI; FASEL, 2017).

Os macrófagos são os alvos biológicos onde a infecção duradoura é estabelecida, e são células de defesa que possuem um sistema produtor rigorosamente regulado de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e de nitrogênio (ERN's), visando matar qualquer patógeno invasor sem danificar a célula hospedeira. No entanto, as formas amastigotas são capazes de explorar diferentes estratégias para evitar a sua eliminação, como revestimento de lipofosfoliglicano que protege contra as ERO's e ERN's, secreção ou indução da produção de arginina, que reduz a produção de óxido nítrico e fornece substrato para síntese de nutrientes e ação de metaloproteases, que interferem na via de sinalização de macrófagos (GAUR et al., 2007; KIMA, 2007; ROSSI; FASEL, 2017).

A resposta imune adaptativa para *Leishmania* pode gerar tanto uma resposta protetora quanto prejudicial ao hospedeiro. Os linfócitos T CD4+ Th1, caracterizados

pela produção IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , induzem a resistência ao mesmo tempo que são associados ao estado hiperinflamatório, que leva a infecção metastática (SILVEIRA et al., 2009). Os linfócitos T CD8+ possuem também papel duplo, sendo responsáveis pela proteção e cura da doença, provavelmente devido a produção de IFN- $\gamma$  e, por outro lado, promovem a progressão da doença com destruição tecidual e disseminação da infecção, associada a produção de IL-10 (BOURREAU et al., 2007).

### 2.1.1 Classificação das Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas das leishmanioses dependem da complexa interação entre os fatores de virulência das diferentes espécies de parasitas e a resposta do sistema imune do hospedeiro. O resultado dessa interação gera desde lesões na pele localizadas até o envolvimento do sistema reticuloendotelial (SACHDEVA; SHARMA, 2016). Dessa forma, as leishmanioses podem ser classificadas em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LM) e leishmaniose visceral (LV).

A LC é a forma mais comum da doença, e manifesta-se inicialmente como uma pápula isolada no local da picada do vetor, que progride em semanas a meses para úlcera de formato ovalado ou arredondando, com base eritematosa, infiltrado grosseiro, bordas bem delimitadas e de consistência firme. Dependendo da espécie, a ferida pode ter apresentações diferentes: *L. mexicana* apresenta-se como uma lesão pequena e única; *L. braziliensis* gera lesão ulcerativa extensa (**Figura 2.A**); e a *L. major* causa múltiplas lesões autolimitantes (**Figura 2.B**) (BRUSCHI; GRADONI, 2018).

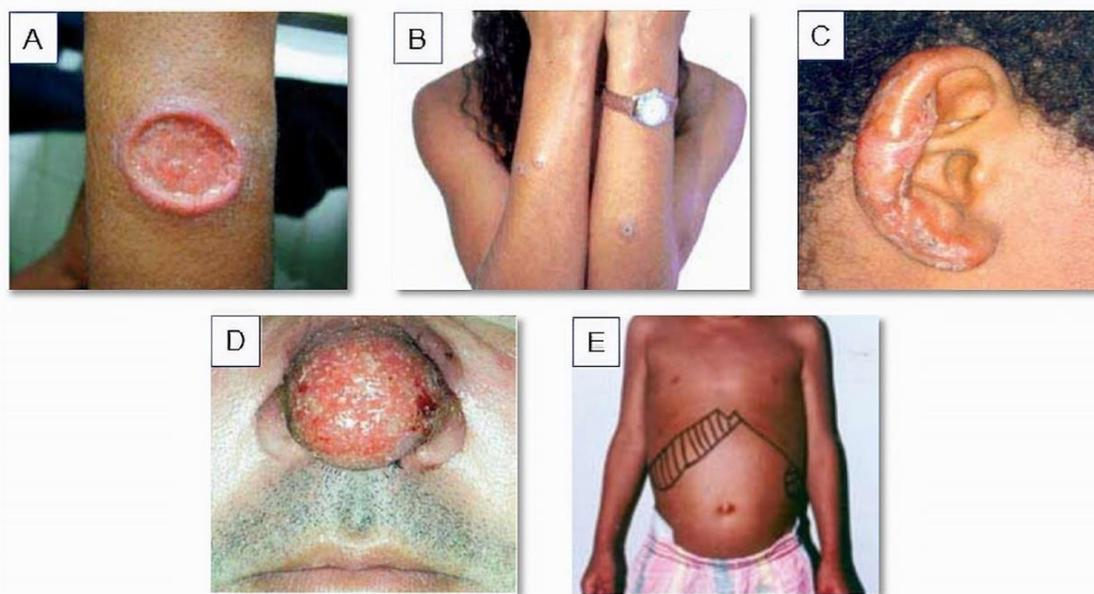
Nas diferentes Regiões do Brasil, as feridas recebem nomes populares como “úlceras de Bauru” ou “ferida brava”. A LC difusa é uma forma diferenciada, caracterizada pela falta de resposta do sistema imune aos antígenos do parasita. Isso permite a disseminação para outras regiões da pele, membranas mucosas, atingindo áreas expostas como orelhas, bochechas e toda a extensão da pele (**Figura 2.C**). Ocorre nas Américas e a principal espécie responsável pela infecção é a *L. amazonensis* (VERA-IZAGUIRRE et al., 2006).

A LM é uma forma severa causada pela disseminação dos parasitas para a mucosa facial. É mais frequente nas espécies do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* (menos comum) e pode advir da infecção de *L. amazonensis* (subgênero *Leishmania*). Os parasitas atacam a região da nasofaringe ou cavidade bucal, degenerando lentamente a cartilagem e tecidos moles, causando destruição e desfiguração

do septo nasal, lábios e laringe (**Figura 2.D**). Em algumas regiões da América Latina, as lesões crônicas mucocutâneas são conhecidas como “espundia”, termo referente a algo como “semelhante a esponja” (REITHINGER, et al. 2007).

A LV é a forma mais grave, afeta órgãos do sistema reticulo-endotelial como baço, fígado e medula óssea, podendo ser fatal. Tem período de incubação de 2 a 6 meses, manifestando-se por febre, sudorese noturna, fraqueza, perda de peso, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (**Figura 2.E**). A doença é causada no Velho Mundo pelas espécies *L. infantum* e *L. donovani* e no Novo Mundo por *L. chagasi* e *L. amazonensis*. Na Ásia é conhecida como *kala-azar* ou febre negra (GRIENSVEN; DIRO, 2019).

**Figura 2** - Formas clínicas da leishmaniose em humanos



(A) Forma cutânea única ulcerada; (B) Forma cutânea com múltiplas lesões; (C) Forma cutânea difusa; (D) Forma mucocutânea; (E) Forma visceral. Fonte: BRASIL, 2010; BRASIL, 2017.

### 2.1.2 Tratamento Farmacológico

As opções de tratamento para leishmaniose são limitadas e dependem de fármacos antigos e que apresentam muitos efeitos adversos, ou ainda medicamentos reposicionados. Ainda nos dias atuais, o único tratamento eficaz com resultados satisfatórios para todas as formas clínicas de leishmaniose é alcançado com os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ), disponíveis no mercado internacional na forma de estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) ou antimoniato de N-metil meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) (MURRAY et al., 2005). O mecanismo de ação dos antimoniais não está esclarecido, porém é sustentado por dois modelos.

O primeiro modelo sugere que o  $Sb^{5+}$  comporta-se como um pró-fármaco, sofrendo redução biológica para forma  $Sb^{3+}$  (trivalente) que é muito mais tóxico, e inibe a enzima tripanotiona redutase e/ou proteína dedos de zinco, causando susceptibilidade ao estresse oxidativo e apoptose do parasita (HALDAR, 2011). O segundo modelo sugere que o  $Sb^{5+}$  agiria de forma intrínseca, ou seja, sem a necessidade da ativação. O  $Sb^{5+}$  parece agir inibindo a DNA topoisomerase 1, impedindo o desenrolamento e clivagem do DNA (WALKER; SARAVIA, 2004) e também formando complexos com ribonucleosídeos que interferem na via de recuperação de purinas (DEMICHELI et al., 2002). Ainda existe uma terceira vertente que apresenta os antimoniais como ativadores do sistema imunológico do hospedeiro, induzindo uma resposta imune eficaz (HALDAR; SEN; ROY, 2011).

O tratamento com antimoniais pode ser feito via intralesional subcutânea (SC) para LC, via intramuscular (IM) ou via endovenosa (EV) para LC ou LV. A duração do tratamento é prolongada, realizada no ambulatório e dessa forma requerendo um profissional capacitado. Além disso a aplicação IM ou SC é por vezes dolorosa, e podem ocorrer inúmeros efeitos adversos, que variam desde anormalidades clínicas como náuseas, anorexia, irritação, dor local, cefaleia, mialgia, artralgia até alterações bioquímicas como aumento das transaminases hepáticas, ureia, creatinina e alterações no eletrocardiograma (BRASIL, 2017; BRASIL, 2019).

A pentamidina pertence à classe das diamidinas e seu efeito está relacionado às funções amidinas que formam duas regiões dicatiônicas aromáticas associadas por espaçador (**Figura 3**) (BAKUNOVA et al., 2009). As diamidinas são usadas desde 1939 para tratamento de *Leishmania* sp. (BERMAN, 1988). O mecanismo de ação ainda continua desconhecido, mas evidências mostram que os pares amidínicos se ligam aos ácidos nucleicos através de resíduos fosfato, gerando um complexo da droga com o DNA, que causa desintegração do cinetoplasto (BEAN; WAREHAM, 2017). Relata-se também que o fármaco age como inibidor de enzimas importantes no metabolismo de poliaminas essenciais para o parasita (MUXEL et al., 2018).

O medicamento é apresentado na forma de isetionato de pentamidina. É utilizado para tratar as formas de LC como droga de segunda escolha, sendo administrada por via IM ou EV. Assim como os antimoniais, a administração da pentamidina necessita de um local e um profissional capacitado, com duração de tratamento de 10 dias ou mais, dependendo do tipo de leishmania e da resposta do paciente. Seus efeitos adversos mais

frequentes são dor local, inchaço, abscesso estéril (se aplicação IM), náuseas, cefaleia, hipotensão, arritmias cardíacas, e também relata-se hiperglicemia ou hipoglicemia devido efeito tóxico agudo sobre as células beta pancreáticas (BRASIL, 2017).

A anfotericina B é um fármaco macrolídeo poliênico normalmente utilizado como antifúngico, mas que apresenta atividade antileishmania e é utilizado como agente de segunda escolha para LC e LV. O fármaco possui duas regiões distintas (**Figura 3**): um polieno que é hidrofóbico e age ligando-se ao ergosterol (componente lipídico comum da parede celular de fungos e tripanossomatídeos), e outra região chamada poliol, que é hidrofílica e forma dímeros entre si, causando poros iônicos e consequente lise celular (SHIRZADI, 2019).

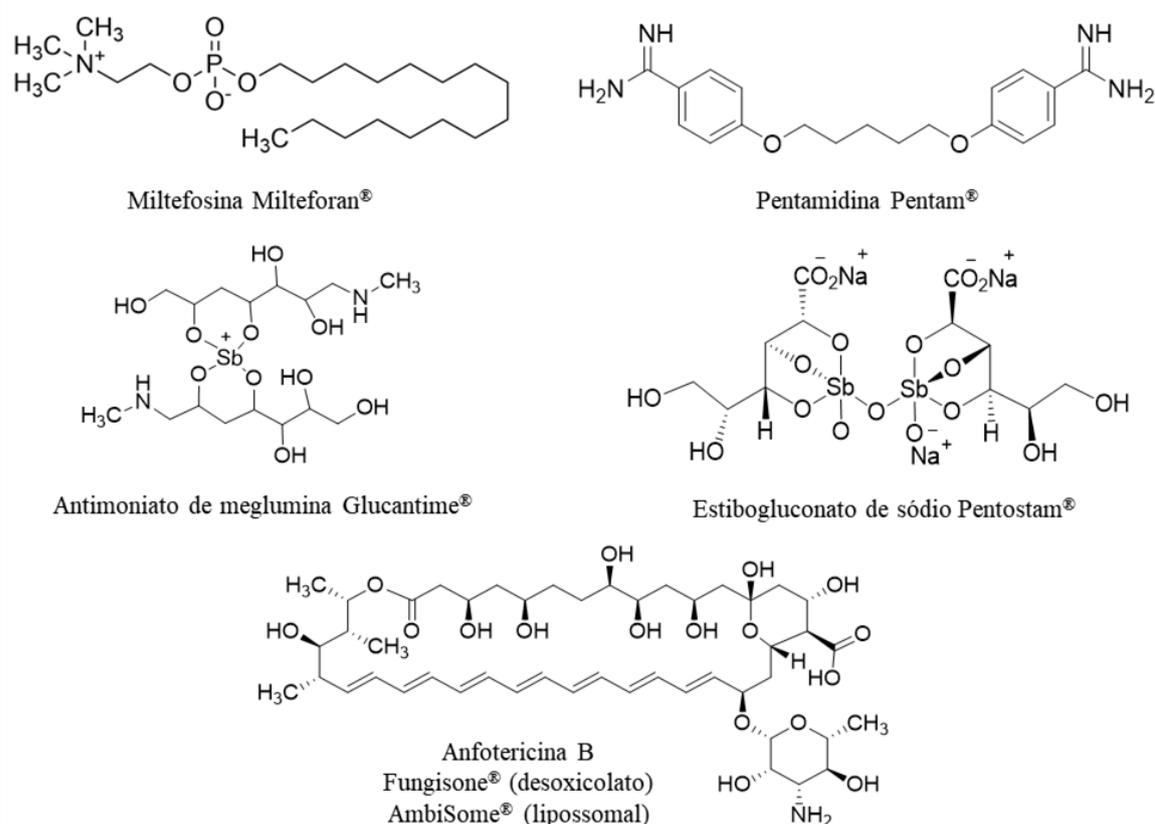
No Brasil a anfotericina B é disponível nas formas desoxicolato (Fungisone<sup>®</sup>) e lipossomal (AmbiSome<sup>®</sup>). É utilizada somente no hospital, por via EV 1 mg/kg/dia, aplicada em períodos variáveis conforme tolerância, até atingir a dose total de 1 a 1,5 g para LC ou 2,5 a 3 g para LM. Para LV é utilizado a dose de 3-4 mg/kg/dia em infusão EV durante 5-7 dias. É um fármaco com muitos efeitos adversos, podendo causar desde cefaleia, tremores, flebite, cianose e hipotensão até comprometimento da função renal, anemia e distúrbios comportamentais (BRASIL, 2017).

A miltefosina foi o primeiro fármaco disponível para uso oral. Foi originalmente desenvolvida como antineoplásico, derivado de uma série de moléculas fosfolipídicas planejadas a partir do fator de agregação plaquetária (CROFT; ENGEL, 2006) e posteriormente, em estudos realizados na Índia, descobriu-se eficácia para leishmaniose (BHATTACHARYA; SUR; KARBWANG, 2006). O mecanismo de ação é desconhecido, mas sugere-se que atue na alteração de vias de sinalização mediada por lipídeos e imunomodulação, causando apoptose (BASTOS et al., 2016).

A miltefosina foi incorporada ao Sistema Único de Saúde (SUS), por meio da Portaria nº 56 de 31 de outubro de 2018 para tratamento oral da LC (BRASIL, 2018a). Este fármaco possui a vantagem de que logo após o diagnóstico o paciente pode levar para casa e utilizá-lo. No entanto a duração do tratamento é de pelo menos 28 dias, e os estudos clínicos mostram taxa de cura, em seis meses, variando entre 58,6% e 87,5%. Os efeitos adversos são considerados brandos, restringindo-se ao trato gastrointestinal como náuseas, dor abdominal e diarreia, porém apresenta como problemática o potencial teratogênico, devendo ser utilizado com muita cautela em mulheres em idade fértil (BRASIL, 2018b).

Alguns fármacos utilizados em doenças distintas surgem como alternativas terapêuticas, mas que ainda estão sob investigação clínica. Estudos vêm testando a utilização da paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, para o tratamento tópico de LC, sob forma de cremes, pomadas, géis (SÁ, 2020). A pentoxifilina, um vasodilatador periférico é utilizado no Brasil como adjuvante (imunomodulador) na terapia com antimoniato de meglumina, aumentando a taxa de cura e reduzindo tempo de tratamento (BRASIL, 2017). Outros fármacos utilizados de forma alternativa são a rifampicina, isoniazida, cetoconazol, itraconazol, azitromicina, alopurinol dentre outros (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

**Figura 3** - Estrutura química dos principais fármacos utilizados para tratamento das leishmanioses



## 2.2 Planejamento Racional de Fármacos

Durante muito tempo, os remédios utilizados para o tratamento de doenças consistiam em produtos de origem animal, vegetal ou mineral, provenientes do conhecimento empírico humano ou descobertos de maneira aleatória por tentativa-e-erro, ou ainda ao acaso (PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018).

Em 1897, com a descoberta do ácido acetilsalicílico (Aspirina<sup>®</sup>) que foi sintetizado com base na salicina, uma substância extraída de *Salix alba*, iniciou-se a era dos fármacos sintéticos (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006). Durante essa época, os estudos para descobrimento de fármacos foram conduzidos por hipóteses químicas/biológicas, tendo como limitações a síntese das moléculas e a avaliação de suas propriedades biológicas. A limitação dos testes biológicos era o fator mais impactante, desperdiçando muitas vezes tempo e custos, algumas vezes em moléculas que acabavam não sendo promissoras (KUBINYI, 2007).

A partir de 1960, houve um grande avanço no planejamento racional de fármacos, com o início dos estudos QSAR (sigla em inglês para *Quantitative Structure-Activity Relationships* - Relações Quantitativas de Estrutura-Atividade). Com o surgimento dos modelos QSAR, conceitos da físico-química orgânica foram utilizados para descrever de forma quantitativa a atividade biológica de uma molécula, a partir da sua estrutura química (FUJITA; WINKLER, 2016). A estratégia QSAR contribuiu para o avanço do planejamento de fármacos, e é considerado por alguns autores um dos primeiros exemplos de planejamento de fármacos com o auxílio do computador (KUBINYI, 2007).

Segundo a IUPAC, CADD (*Computer-Aided Drug Design*) é definido como um conjunto de técnicas utilizadas para descobrir, projetar e otimizar compostos biologicamente ativos para uso como fármacos (IUPAC, 2019). Em última análise, CADD busca rastrear virtualmente *hits* (candidatos a fármacos ativos), *leads* (candidatos bioativos promissores à avaliação adicional) ou otimizar *leads* conhecidos transformando moléculas biologicamente ativas em fármacos aceitáveis do ponto de vista físico-químico, farmacológico e farmacocinético (CERQUEIRA et al., 2015).

Entre os métodos em CADD, a triagem virtual (VS – do inglês *Virtual Screening*) foi rapidamente incorporada por indústrias farmacêuticas. O objetivo é selecionar virtualmente um conjunto de moléculas com propriedades desejáveis visando uma proteína específica e eliminar compostos com propriedades indesejáveis (inativas, reativas, tóxicas, que apresentam farmacocinética ruim) (CERQUEIRA et al., 2015).

Em VS, a estrutura tridimensional do alvo biológico pode ser conhecida ou não, sendo que este fato determinará qual protocolo será mais adequado na triagem (KLEBE, 2006). Dessa forma, VS pode ser realizado com base na estrutura química do ligante (LBVS – *Ligand-Based Virtual Screening*) ou com base na estrutura do alvo biológico (SBVS – *Structure-Based Virtual Screening*).

### 2.2.1 Triagem Virtual Baseada no Ligante – LBVS

Em LBVS, busca-se identificar compostos que apresentem características comuns, partindo do pressuposto que moléculas semelhantes terão efeitos comuns no mesmo alvo (CERQUEIRA et al., 2015), ou seja, compostos com alta similaridade às moléculas de referência irão se comportar de maneira semelhante ou atuar através do mesmo mecanismo com efeito similar (GIMENO et al., 2019). Os métodos baseados em ligantes representam os compostos através de um conjunto de descritores que apresentam as características moleculares sob forma numérica (BANEGAS-LUNA, 2018). No **Quadro 1** são apresentadas resumidamente as diferentes metodologias utilizadas em LBVS.

**Quadro 1** - Metodologias de rastreamento virtual baseado na estrutura do ligante

Impressões digitais moleculares ( <i>fingerprints</i> )	As impressões digitais moleculares são códigos atribuídos a uma molécula, onde o tipo mais comum é a codificação por sequência binária ( <i>bits</i> ), no qual cada <i>bit</i> se refere a uma característica da molécula.
Similaridade por formato 3D ( <i>molecular shape</i> )	As moléculas estudadas são comparadas por sobreposição a compostos ativos pela similaridade da forma 3D, considerando a posição relativa dos átomos, em termos de ocupação de volume ou por superfície molecular.
Similaridade de potencial eletrostático	Comparação do mapa de potencial eletrostático <sup>1</sup> de um ligante de referência com as moléculas pesquisadas afim de serem selecionadas moléculas com distribuição eletrostática semelhante.
Ligantes baseados em farmacóforos	São obtidos farmacóforos <sup>2</sup> a partir de um conjunto de moléculas biologicamente ativas a um alvo comum. O farmacóforo é utilizado para pesquisar compostos que tem a mesma distribuição de atributos.

Fonte: GIMENO et al., 2019

### 2.2.2 Triagem Virtual Baseada no Receptor – SBVS

Com os avanços na área da genômica e proteômica, em conjunto com a evolução das técnicas de cristalografia de raios-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), foi possível a obtenção de inúmeros alvos moleculares com a estrutura tridimensional elucidada. O conhecimento da estrutura do alvo macromolecular permite a sua utilização para o planejamento de fármacos por meio de SBVS (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). O *Protein Data Bank* (PDB) é uma base de dados *online* de livre acesso

<sup>1</sup> Os mapas de potencial eletrostático ilustram a distribuição eletrônica de cargas das moléculas tridimensionalmente.

<sup>2</sup> Conjunto de atributos estereoquímicos e eletrônicos necessários para garantir as interações supramoleculares ideais com um alvo biológico específico para desencadear (ou bloquear) sua resposta biológica (IUPAC).

que fornece as estruturas tridimensionais de diversos alvos biológicos cristalizados (ROSE et al., 2017).

A principal estratégia utilizada em SBVS é a Ancoragem Molecular (*Molecular Docking* ou apenas docking) que envolve o encaixe de uma molécula (referenciada como “ligante”) dentro de um local apropriado do alvo biológico (frequentemente chamado “receptor”) (CERQUEIRA et al., 2015). A orientação preferida da molécula em relação ao receptor pode ser usada para prever a energia de associação ou a afinidade de ligação entre o receptor e o ligante e ser útil para descoberta de novos agonistas ou antagonistas (WESTBROOK; BURLEY, 2019). O receptor geralmente é uma proteína, que pode ser uma enzima, uma proteína de membrana ou canal iônico, ou ainda pode ser uma molécula de DNA ou RNA, e por isso o conhecimento prévio da fisiopatologia da doença e rotas bioquímicas envolvidas são fundamentais para realização do docking.

Atualmente existem diversos programas disponíveis para realização do docking. Todos utilizam dois algoritmos essenciais: o algoritmo de busca e a função de pontuação. O algoritmo de busca gera várias soluções denominadas “pose”, que é uma orientação e conformação específica de encaixe do ligante na cavidade do receptor. O termo “orientação” refere-se à posição no sítio que agrupa uma ou mais “poses”, ou seja, um grupo de soluções equivalentes. O termo “conformação” é empregado para descrever a estrutura tridimensional adotada pelo ligante (sem considerar a estrutura do receptor) (MENG et al, 2011).

O algoritmo genético (AG) é um tipo de algoritmo de busca muito utilizado para busca dessas “poses” em programas de docking. Trata-se de um método que simula a teoria da evolução e seleção natural de Darwin para procurar a solução ideal. Ele inicia a partir de uma amostra aleatória denominada população, onde cada indivíduo dessa população é representado por sequências de dígitos binários denominados cromossomos. Com a ajuda da função de pontuação ele seleciona as poses com maior aptidão, e realiza operações de seleção, cruzamento e mutação das poses, para produzir nova população, que evolui mantendo somente as melhores soluções. O processo se repete até que seja obtida a pose com maior aptidão (VERDONK, 2003).

A formação e estabilidade de um complexo ligante-proteína são determinadas por um equilíbrio sutil de interações eletrostáticas (ligações de hidrogênio, contatos iônicos) e contatos hidrofóbicos contabilizadas por variações de entalpia ( $\Delta H$ ) bem como fenômenos de solvatação / dessolvatação e mudanças de liberdade conformacional,

contabilizados pela entropia ( $\Delta S$ ) (BRAVO, 2009). Essas contribuições levam a uma variação da energia livre ( $\Delta G$ ) que caracteriza a afinidade de ligação entre o ligante e o alvo, e é expressa pela seguinte equação:

$$\Delta G = \Delta H - \Delta S$$

É nesse contexto que entra a função de pontuação, responsável pela aproximação de  $\Delta G$  e avaliação da afinidade de ligação. Uma estimativa confiável de afinidade de ligação é essencial, pois a função de pontuação atua em várias etapas do docking: orienta o algoritmo de busca na previsão das poses do ligante; distingue as poses corretas das alternativas sugeridas pelo algoritmo; e classifica as poses após a afinidade de ligação ser estimada (YOUSUF et al., 2017). Os valores mais altos de pontuação são normalmente atribuídos aos indivíduos mais aptos, ou seja, as poses mais ajustadas, que correspondem a um mínimo global energético (CASTILHO, 2011).

Entre os programas de docking, o programa GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) tem demonstrado excelente desempenho para previsão de poses corretas com precisão de 90% (WANG, 2016) e bons resultados para triagem virtual (MENG et al., 2011); (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017). O GOLD é um programa disponibilizado para pós-graduação pela CAPES através da plataforma de Bases de Dados de Estruturas Cristalinas – BDEC, utiliza como algoritmo de busca o AG e possui quatro funções de pontuação: GoldScore, ChemScore, ChemPLP (*Piecewise Linear Potencial*) e ASP (*Astex Statistical Potential*) (VERDONK et al., 2003). No **Quadro 2** são descritas sucintamente as funções de pontuação do GOLD.

**Quadro 2** - Funções de pontuação utilizadas pelo programa GOLD

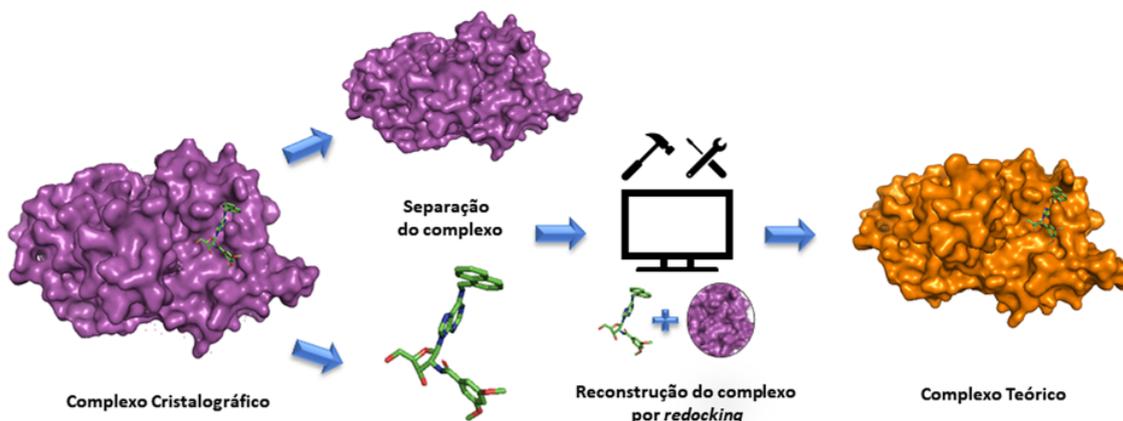
GoldScore	Função baseada em campo de força, semelhante a mecânica molecular, leva em consideração fatores como energia de ligação de hidrogênio, energia de interações hidrofóbicas, interação com metais e tensão de torção do ligante, incentivando principalmente contatos hidrofóbicos.
ChemScore	Função empírica treinada por regressão linear, com base em dados de afinidade determinados experimentalmente, mensurados de 82 complexos proteína-ligantes. Considera termos de contato para estimar contribuições lipofílicas, interação com metais, ligações de hidrogênio, ligações rotativas e penalidades de choque e torções internas.
ChemPLP	Função empírica que utiliza termos para ligações de hidrogênio da função ChemScore e inúmeros potenciais lineares para modelar interações de van der Waals e termos repulsivos. Realiza cálculos mais rápidos que a função ChemScore e GoldScore.
ASP	Função de potencial estatístico (ou função baseada em conhecimento) que analisa dados estruturais disponíveis em um bando de dados de complexos proteína-ligantes. A função analisa a frequência de interação entre átomos de ligantes e proteínas e a ocorrência dessas interações entre pares de átomos é usada como medida de contribuição energética.

Fonte: BRAVO, 2009; SAPUNDZHI, 2016; LI, 2014.

Com a possibilidade de se escolher a função de pontuação a ser utilizada no docking, é necessário avaliar cada uma das funções disponíveis, afim de se validar a metodologia do docking e selecionar qual função se adequa ao modelo a ser utilizado. Como cada uma das funções considera diferentes termos para estimar a afinidade de ligação, é necessário um modo alternativo para que as mesmas sejam comparadas. Para contornar esse problema, é utilizado a metodologia de redocking (OLANDA, 2016).

O redocking é um método comum em SBVS, no qual um complexo cristalográfico formado por alvo e ligante (obtido experimentalmente) é separado, e através dos cálculos do programa de docking o complexo é reconstruído, sendo chamado então de complexo teórico. A conformação do ligante original é então sobreposta à conformação do ligante do complexo teórico, para avaliar se a reconstrução do complexo foi realizada com sucesso (**Figura 4**).

**Figura 4** - Representação esquemática do redocking



O ligante original é comparado ao ligante teórico pelo desvio médio quadrático (RMSD) que é a distância média entre os átomos calculada após a sobreposição das moléculas (KUFAREVA; ABAGYAN, 2012). O valor de RMSD até 2,0 Å representa uma boa sobreposição e diferença energética pequena, portanto, boa reprodução da conformação do ligante original (NARANJO-MONTOYA et al., 2015). Além disso, com o parâmetro de RMSD é possível comparar as diferentes funções de pontuação, sendo a que apresentar menor valor de RMSD deverá ser escolhida como a mais adequada.

O GOLD utiliza uma área restrita para busca das poses no alvo que consiste em uma esfera, da qual o operador do programa precisa definir o raio em angstroms (Å).

Idealmente, essa esfera precisa conter toda a cavidade correspondente ao sítio ativo, não sendo muito pequena de forma a restringir os resultados, e nem muito grande para não gerar resultados falso-positivos. Dessa forma, outra variável que pode ser analisada durante a validação é o raio da esfera considerado.

Outro parâmetro importante que pode ser avaliado é a presença de moléculas de água no sítio de ligação do receptor. Uma molécula de água preservada no docking pode modificar significativamente a topologia do sítio de ligação em termos de impedimento, polaridade e potencial de ligação de hidrogênio (AMADASI et al., 2008). Os alvos cristalizados em geral apresentam várias moléculas de água, no entanto, somente algumas estão envolvidas ativamente na interação com o ligante, devendo ser consultados dados da literatura para verificar a necessidade da inclusão delas. Dessa forma, com todos os parâmetros do docking devidamente validados, a metodologia pode ser empregada para a seleção dos *hits*.

### 2.2.3 Planejamento de fármacos por SBVS para *Leishmania* sp.

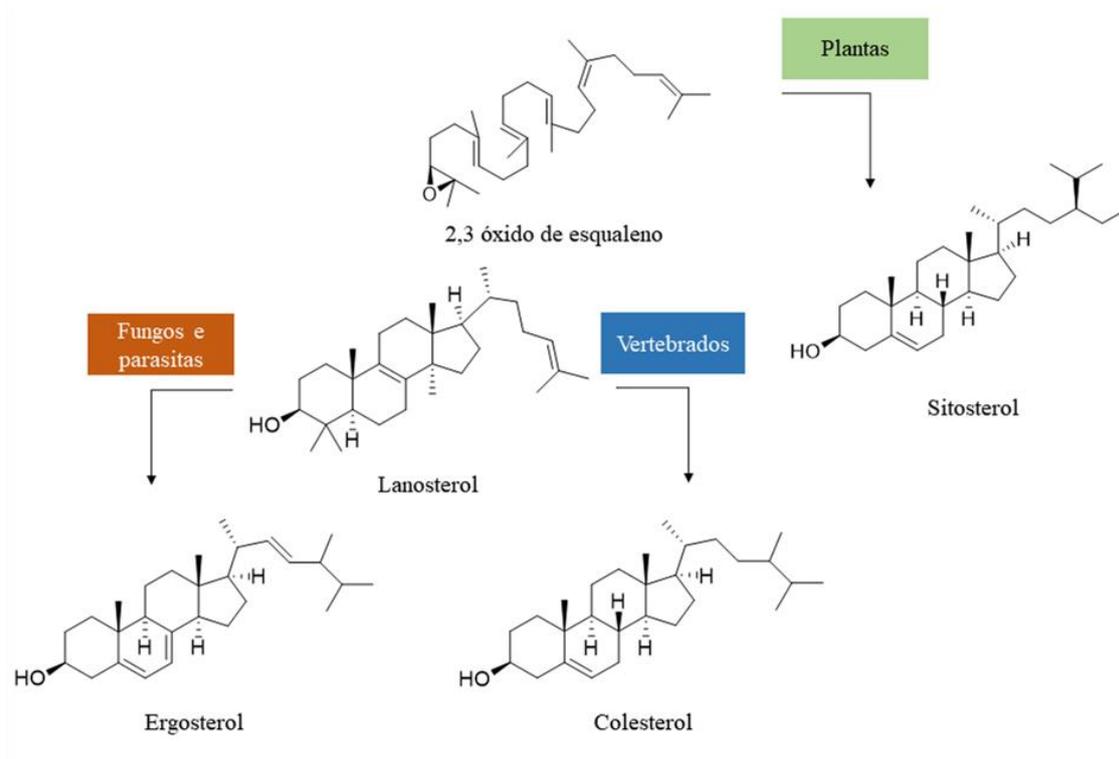
A busca por novos fármacos para tratamento das leishmanioses é uma necessidade urgente, dado o limitado arsenal farmacológico para o tratamento da doença, além dos efeitos adversos, restrições terapêuticas e resistência dos fármacos disponíveis. Adicionalmente, o incentivo à pesquisa científica nas universidades é de suma importância para as pessoas afetadas por esta doença, visto que a indústria farmacêutica pouco se interessa por doenças infecciosas de países em desenvolvimento.

Uma estratégia útil para o desenvolvimento de novos compostos ativos para *Leishmania*, depende da investigação de vias bioquímicas importantes para o parasita, que não são compartilhadas com humanos, e conhecimento de quais enzimas, receptores ou metabólitos estão envolvidos nesse processo (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2012). Vias bioquímicas que se destacam são: a via de biossíntese de esteróis de membrana, biossíntese de ácidos graxos, via glicolítica, via de salvação de purinas, a biossíntese de glicosilfosfatidilinositol, a biossíntese de folatos, o sistema glioxalase, a via da tripanotiona e a via da hipusina (JAIN; JAIN, 2018).

Os esteróis são constituintes indispensáveis nas células eucarióticas, pois mantêm a fluidez e a permeabilidade da membrana, e modulam a atividade de proteínas e canais iônicos ligados a ela, e são precursores de moléculas importantes de crescimento e desenvolvimento. Sua biossíntese inicia com a condensação da acetilcoenzima A (Acetil-

CoA) e prossegue com a formação de vários intermediários, ao qual os organismos possuem em comum o esqualeno, que na presença de oxigênio transforma-se em 2,3-óxido de esqualeno. Em plantas e algas, o 2,3-óxido de esqualeno é convertido posteriormente ao fitoesterol. Em fungos, protozoários e vertebrados, o 2,3-óxido de esqualeno será ciclizado até formação do lanosterol e este por sua vez transformando em ergosterol (fungos e protozoários) e colesterol (humanos), conforme **Figura 5** (CHOI; PODUST; ROUSH, 2014).

**Figura 5** - Rota de síntese de esteróis em plantas, fungos, parasitas e vertebrados



A enzima 14  $\alpha$ -esterol demetilase (CYP51) é uma mono-oxigenase membro da superfamília citocromo P450, e transforma o lanosterol em ergosterol em fungos e cinetoplastídeos como *Leishmania* spp. Os antifúngicos azólicos são inibidores da enzima CYP51 que revolucionaram o tratamento em infecções fúngicas tópicas e sistêmicas (HEERES; MEERPOEL; LEWI, 2010). Os antifúngicos poliênicos como a anfotericina B ligam-se seletivamente ao ergosterol na membrana de células fúngicas, formando poros e levando ao rompimento da membrana (SHIRZADI, 2019). Dessa forma, antifúngicos azólicos e poliênicos são aproveitados para o tratamento das leishmanioses (BRASIL, 2010; BRASIL, 2017).

A enzima CYP51 também está presente em humanos, sendo responsável pela obtenção do colesterol, levantando a questão óbvia de por que os inibidores azólicos de CYP51 não são tão tóxicos em mamíferos. Isso se deve ao fato de que os azólicos possuem uma concentração inibitória alta para CYP51 humana comparado a CYP51 de fungos e protozoários, além de que o conteúdo da enzima P450 nesses micro-organismos é dramaticamente menor que em mamíferos. Além disso a homeostase em humanos envolve muito mais do que apenas a síntese endógena de colesterol, que também pode ser regulada pela dieta e absorção/excreção (MAJUMDER, 2008).

A essencialidade da CYP51 para leishmania foi demonstrada através de estudos de silenciamento de genes e abordagens farmacológicas, em que a perda ou inibição de CYP51 causa a inibição do crescimento dos parasitas (MCCALL et al., 2015). Dessa forma, a CYP51 é um alvo validado para o planejamento de novos agentes leishmanicidas. Até o presente momento, somente a estrutura da CYP51 da espécie *L. infantum* foi cristalizada, sob o código de 3L4D, disponível no PDB.

Diante do exposto, diversas estratégias podem ser utilizadas no planejamento de fármacos auxiliado por computador, sendo que a utilização desses métodos de forma sinérgica é muito mais útil no planejamento racional de fármacos. Nesse estudo foi utilizada estratégia de SBVS por docking molecular afim de se selecionar *hits* para avaliação experimental.

### **2.3 Planejamento Racional e Modificação Molecular**

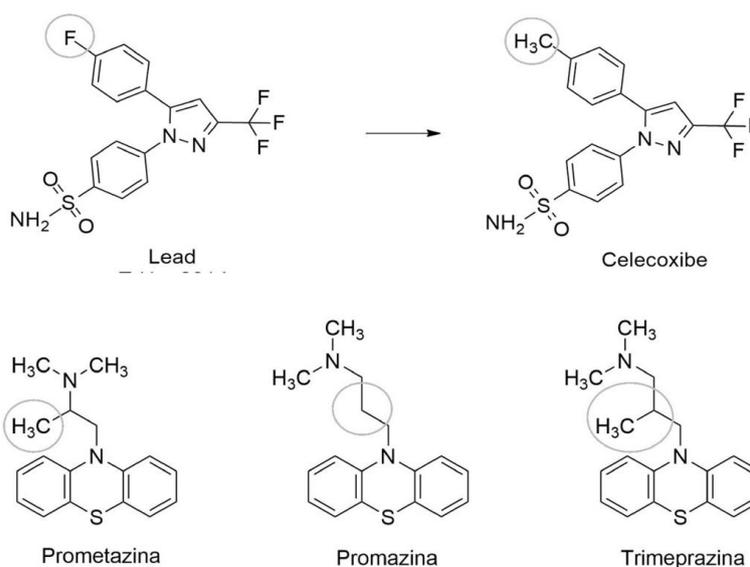
Diversas estratégias clássicas de modificação molecular dentro da Química Medicinal têm sido utilizadas para o desenho de análogos e exploração de estruturas químicas a partir de compostos *leads*. Dentre as mais promissoras podemos citar o bioisosterismo, homologação química e inserção de anéis aromáticos.

O isosterismo é baseado na substituição de um átomo ou grupo de átomos que apresentam mesmo número de elétrons na camada de valência - princípio de Langmuir e Erlenmeyer. No início da década de 50, Friedman e Thornber, reconhecendo a utilidade do isosterismo na projeção de moléculas bioativas, introduziram o termo bioisosterismo, onde um bioisótero seria uma subunidade, grupos ou moléculas que apresentam propriedades eletrônicas, físico-químicas e biológicas semelhantes (LIMA; BARREIRO, 2005).

Alfred Burger (1970) classificou e subdividiu o bioisosterismo em dois tipos: clássico e não clássico. O bioisosterismo clássico segue o princípio de Langmuir e Erlenmeyer. O bioisosterismo não clássico compreende alterações entre grupos funcionais que não atendem as regras eletrônicas, porém, produzem atividade biológica similar (BARREIRO e FRAGA, 2008) (**Figura 6**).

A estratégia denominada homologia é o processo no qual derivados de moléculas diferem por uma unidade constante, geralmente um grupo metil. O alongamento da cadeia lateral com unidades de átomos de carbono saturado produz alteração da lipofilicidade (logP) e modificação no padrão estérico complementar ao receptor biológico, podendo melhorar, abolir ou modificar a atividade (SILVERMAN e HOLLADAY, 2014) (**Figura 6**).

**Figura 6** - Estratégias de bioisosterismo e homologia em fármacos

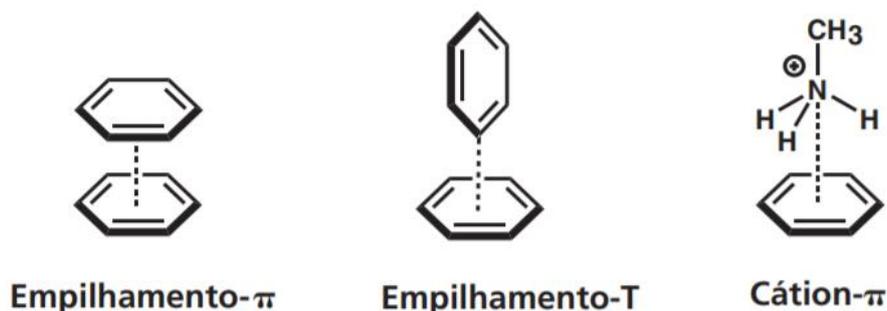


Na parte superior, bioisosterismo clássico no fármaco celecoxibe, no qual o átomo de flúor foi substituído pelo grupo metil (círculos cinza). Na parte inferior, homologia de grupos metil indicados pelos círculos.

Anéis aromáticos e heteroaromáticos estão presentes na grande maioria dos fármacos e podem participar no reconhecimento de um ligante pelo seu receptor por meio de interações eletrostáticas de empilhamento. As interações de empilhamento, são decorrentes da aproximação paralela (empilhamento- $\pi$  ou  $\pi$ -stacked) ou ortogonal (empilhamento-T ou  $\pi$ -T) de dois sistemas aromáticos que apresentam densidades eletrônicas opostas (**Figura 7**). Interações cátion- $\pi$  são resultado da aproximação espacial

de um sistema aromático rico em elétrons e uma espécie catiônica, normalmente resultante da ionização de uma amina (BARREIRO e FRAGA, 2008).

**Figura 7** - Tipos de interações eletrostáticas de empilhamento em anéis



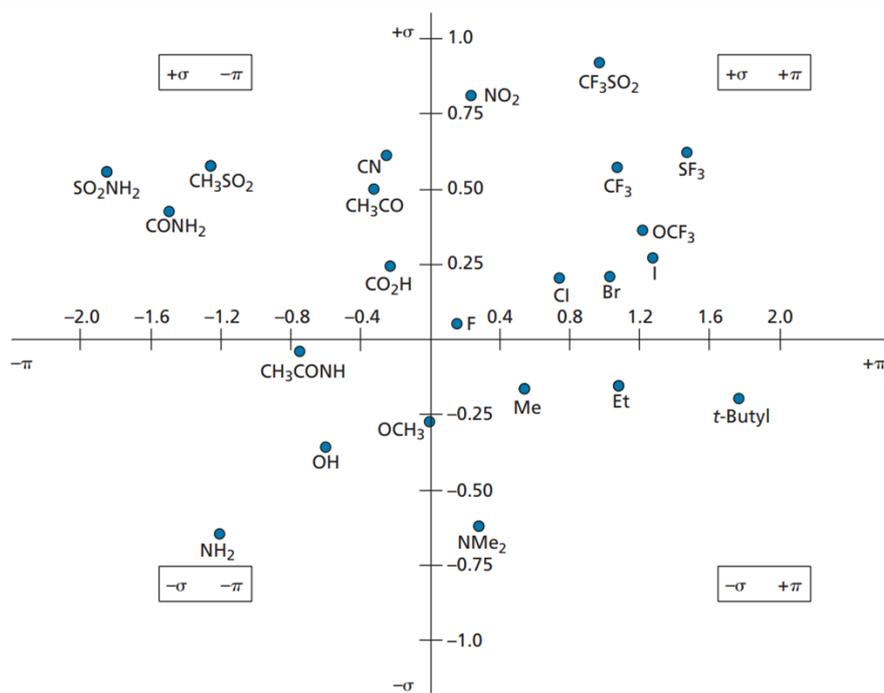
Fonte: BARREIRO e FRAGA, 2008

No entanto os anéis aromáticos não substituídos são alvos metabolicamente vulneráveis principalmente às reações de oxidação. Nesse sentido, a substituição por grupos fortemente retiradores de elétrons ( $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{SO}_3^-$ ) pode auxiliar no bloqueio de reações metabólicas indesejáveis (PEREIRA, 2007). A variação de grupos substituintes retiradores e doadores de elétrons no anel aromático faz-se necessário para melhor compreensão das influências eletrônicas e estéricas, uma vez que podem afetar os estados de ionização e polaridade das moléculas e a aproximação e interação com o sítio de ligação, respectivamente (PATRICK, 2013).

Para facilitar a escolha dos substituintes, o cientista Paul Craig sugeriu uma abordagem racional de monossustituição, capaz de avaliar a influência da lipofilicidade e das propriedades eletrônicas de determinada molécula, em sua atividade biológica. Em seus estudos, Craig propôs um diagrama cartesiano bidimensional de correlação entre a constante de Hansch ( $\pi$ ), um parâmetro de lipofilicidade, e a constante de Hammett ( $\sigma$ ), uma constante de parâmetro eletrônico relacionada à disposição dos elétrons em torno do substituinte inserido (PATRICK, 2013).

No diagrama de Craig (**Figura 8**), valores positivos de  $\pi$  indicam que o substituinte é mais hidrofóbico que o hidrogênio, e valores negativos mostram que ele é menos hidrofóbico. Valores positivos de  $\sigma$  apontam que o substituinte é retirador de elétrons, valores negativos de  $\sigma$  é doador de elétrons. Assim é possível investigar substituintes distintos e avaliar qual propriedade contribui mais para a atividade biológica.

**Figura 8** - Diagrama de Craig



Fonte: PATRICK, 2013

Adicionalmente, é possível observar quais grupamentos poderiam ser intercambiáveis, considerando valores de  $\pi$  e  $\sigma$  similares. Por exemplo, os substituintes etil (Et), bromo (Br), trifluorometil (CF<sub>3</sub>) e trifluorosulfonil (CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>) que estão alinhados aproximadamente em uma linha vertical, teoricamente podem ser intercambiáveis uma vez que a atividade biológica seja afetada por  $\pi$  (hidrofobicidade). De maneira similar, grupos que estejam em uma mesma linha horizontal como carboxila (CO<sub>2</sub>H), cloro (Cl), bromo (Br) e iodo (I) são identificados como isoeletrônicos pois possuem valor de  $\sigma$  similar.

## 2.4 Produtos Naturais

Os produtos naturais (PN) acompanham a história da medicina humana desde muito tempo, sendo utilizados para tratamento de ampla gama de doenças (SNEADER, 2005). O progresso científico no último século permitiu o isolamento e a elucidação estrutural dos principais bioativos de plantas, fungos, bactérias e organismos marinhos, e vários PN estão agora disponíveis em forma pura como substâncias ativas de medicamentos (DECORTE, 2016).

Os PN são conhecidos por serem abundantes, biologicamente validados e possuírem estruturas diversificadas e privilegiadas (BARNES; KUMAR; DAVIS, 2016).

Por meio da evolução, os organismos reuniram um conjunto notável de moléculas estruturalmente complexas (DECORTE, 2016). O aproveitamento de PN como fontes para moléculas bioativas é uma estratégia importante em programas modernos de descobertas de fármacos (MORRISON; HERGENROTHER, 2014).

Nesse contexto, um conceito contemporâneo tem sido desenvolvido para geração de novos fármacos: a semissíntese, que é um tipo de síntese química que usa como material de partida compostos isolados de fontes naturais (material vegetal, culturas de microrganismos ou seres marinhos). Diferentemente da síntese total, em semissíntese se utiliza moléculas pequenas e simples para uma combinação gradual (GREEN, 2012).

A utilização da estratégia de semissíntese permite aos pesquisadores adicionarem diversidade à complexidade dos núcleos dos PN (BARNES; KUMAR; DAVIS, 2016; MORRISON; HERGENROTHER, 2014), com geração de moléculas com propriedades físico-químicas, farmacológicas e toxicológicas melhoradas (CHEN et al., 2015) ou ainda com propriedades distintas do PN original (DECORTE, 2016).

#### 2.4.1 Triterpenos como agentes antileishmania

Os triterpenos são um grupo grande de PN derivados do esqualeno ou relacionados com precursores acíclicos de 30 carbonos (CONNOLLY; HILL, 2002). Mais de 20.000 triterpenos são conhecidos, muitos de ocorrência em sua forma livre ou associados a glicosídeos (saponinas) e outras combinações (SHENG; SUN, 2011). Destacam-se os triterpenos tetracíclicos (protostanos, cicloartanos, damaranos e eufanos) e triterpenos pentacíclicos (ursanos, gamarenos, lupanos, oleananos e hopanos), termos que se referem ao tipo de esqueleto de carbono (XU; FAZIO; MATSUDA, 2004). Os triterpenos pentacíclicos são de grande interesse como PN candidatos a utilização em semissíntese, particularmente no desenvolvimento de *hits* para tratamento das leishmanioses, como exposto a seguir.

O triterpeno lupeol (**Figura 9.1**) foi reportado sendo eficaz contra vários tipos de protozoários patogênicos entre os quais os parasitas que causam a leishmaniose (SIDDIQUE; SALEEM, 2011). O lupeol foi avaliado *in vivo* e *in vitro* contra *L. donovani*, tendo eficácia terapêutica comparável à anfotericina B, e, no entanto, sem apresentar a toxicidade do fármaco padrão (KAUR; CHAUHAN; KAUR, 2019). Ésteres semissintéticos de lupeol foram preparados utilizando as posições C-3 e C-30, os quais

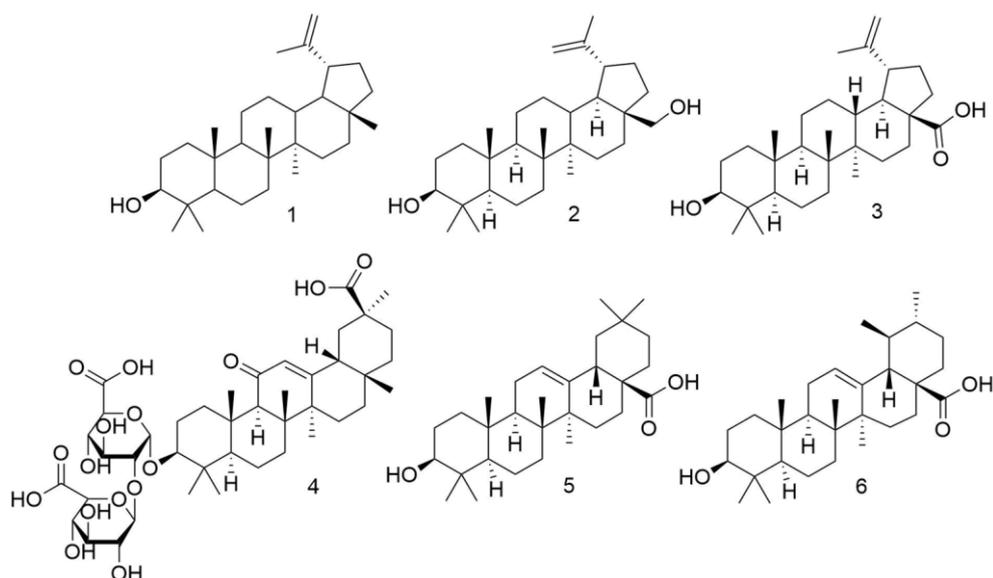
apresentaram bons resultados em testes *in vitro* contra *L. amazonensis* (MACHADO et al., 2018).

Derivados heterocíclicos do triterpeno betulina (**Figura 9.2**) apresentaram aumento da atividade contra *L. donovani* (ALAKURTTI et al., 2010). Derivados ésteres e oxidação na posição C-3 do ácido betulínico (**Figura 9.3**), exibiram atividade contra *L. amazonensis* (DOMÍNGUEZ-CARMONA et al., 2010). Uma série de derivados betulínicos imidazólicos foram sintetizados e testados contra *L. infantum* com resultados positivos, ausência de toxicidade para macrófagos e efeito sinérgico com o fármaco miltefosina (SOUSA et al., 2014).

O ácido glicirrízico (**Figura 9.4**) é um triterpeno reportado com atividade leishmanicida, que foi atribuída a depleção dos níveis de ergosterol nos parasitas (DINESH et al., 2017) e modulação da resposta inflamatória (BHATTACHARJEE et al., 2015). A co-administração de ácido glicirrízico com estibogluconato de sódio teve efeito sinérgico no tratamento de leishmaniose visceral resistente a antimoniais. Modificações moleculares realizadas no ácido glicirrízico tem sido propostas (HOEVER et al., 2005; ROOHBAKHSH; IRANSHAHY; IRANSHAHI, 2016), no entanto, a avaliação em modelos para atividade antileishmania não foram publicados.

O ácido oleanólico (**Figura 9.5**) apresenta atividade leishmanicida *in vitro* contra *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* e baixa toxicidade para macrófagos murinos (MELO et al., 2016). Em outro estudo, o ácido oleanólico apresentou também atividade contra *L. infantum* e boa seletividade (SIFAQUI et al., 2017). O ácido ursólico (**Figura 9.6**) apresentou atividade *in vitro* e *in vivo*, com resultado comparável ao controle miltefosina (YAMAMOTO et al., 2015). Por semissíntese, derivados ésteres na posição C-3 e amidas substituídas na posição C-28 foram preparados e testados, destacando que acetilação em C-3 foi importante para atividade contra *L. amazonensis* e cadeia lateral bis-(3-aminopropil) piperazina em C-28 contra *L. infantum* (GNOATTO et al., 2008).

**Figura 9** - Estrutura dos triterpenos com atividade antileishmania



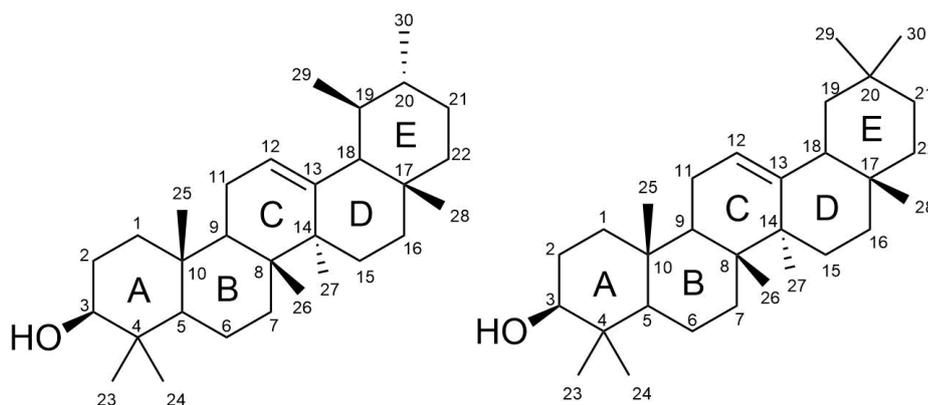
Lupeol (1), betulina (2), ácido betulínico (3), ácido glicirrízico (4), ácido oleanólico (5) ácido ursólico (6)

Como demonstrado, o esqueleto dos triterpenos pentacíclicos é promissor para utilização em semissíntese de fármacos no tratamento da leishmaniose. Estudos *in silico* sugerem que o mecanismo envolvido seja a inibição da enzima CYP51, em vista da similaridade com o lanosterol, substrato natural da enzima (WARFIELD; SETZER; OGUNGBE, 2014). Em geral, as modificações realizadas na posição C-3, principalmente para obtenção de derivados ésteres, proporcionaram um aumento da atividade leishmanicida em relação aos compostos de partida.

#### 2.4.2 Triterpenos $\alpha$ e $\beta$ amirinas

Os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas são isômeros com esqueleto carbônico ( $C_{30}H_{50}O$ ) do tipo ursano e oleanano respectivamente (SHENG; SUN, 2011). Ambos possuem uma hidroxila ligada ao carbono 3 no anel A, e diferenciam-se pelo posicionamento de um substituinte metil no anel E que está no carbono 19 em  $\alpha$  amirina e no carbono 20 em  $\beta$  amirina, conforme **Figura 10**. Essas moléculas são onipresentes no reino vegetal, sendo comumente encontradas nas partes constituintes de plantas medicinais ou oleoresinas produzidas pelo metabolismo secundário (XU; FAZIO; MATSUDA, 2004).

**Figura 10** - Triterpenos  $\alpha$  (à esquerda) e  $\beta$  (à direita) amirinas



Na Amazônia Brasileira, os representantes do gênero *Protium spp.* possuem os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas como constituintes majoritários. Particularmente, a oleoresina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* conhecida como “breu-branco”, é considerada uma excelente fonte de obtenção (FERREIRA et al., 2020). A oleoresina aromática do breu-branco é utilizada pela população local como remédio para dores de cabeça e enxaquecas através da inalação da fumaça produzida pela queima do produto, tratamento tópico para inflamações, contusões entre outros males e para fins místicos, espirituais ou religiosos (SILVA et al., 2017).

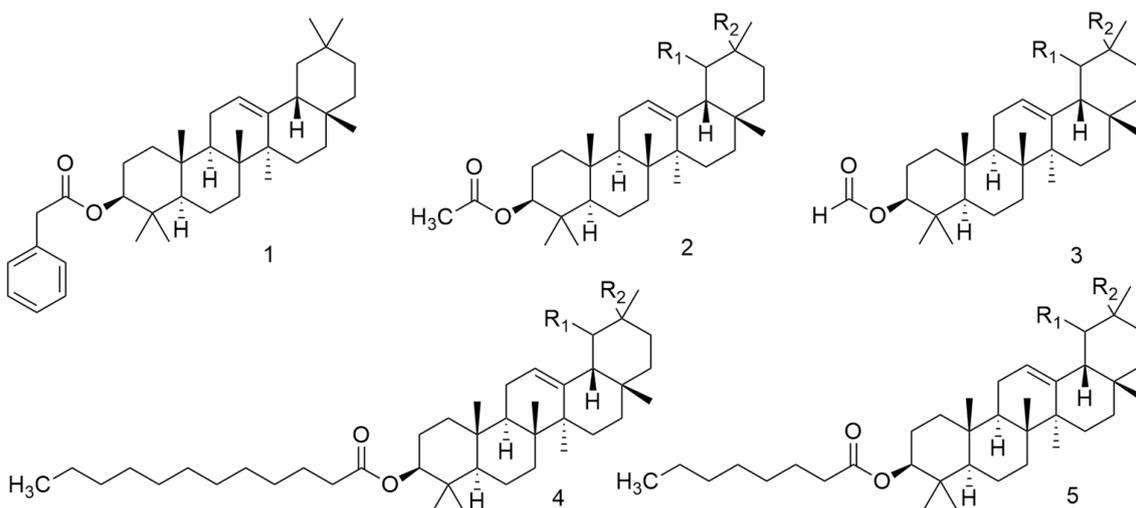
Em uma revisão bibliográfica publicada recentemente por Nogueira (2019), demonstra-se que os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas isolados de *Protium heptaphyllum* têm sido estudados extensivamente, no qual apresentam diferentes propriedades farmacológicas entre elas atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, ansiolítica, antidepressiva, anticonvulsivante, gastroprotetora, hepatoprotetora, anti-hiperglicêmica, hipolipidêmica e redutora de ganho de peso, sendo portanto importantes como *hits*.

Os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas são moléculas interessantes para aplicação em semissíntese pois estão disponíveis em grande quantidade na oleoresina do gênero *Protium spp.* de ocorrência na região amazônica (RUDIGER; VEIGA-JUNIOR, 2013), e a partir desse material podem ser obtidos em mistura facilmente por recristalização (FERREIRA et al, 2020). Do ponto de vista da química medicinal, as estruturas desses triterpenos apresentam duas características estruturais importantes para utilização em

semissíntese: um álcool secundário ligado ao carbono 3 (C-3) e um carbono alílico<sup>3</sup> em C-11.

Utilizando os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, ésteres em C-3 de cadeia de lateral hidrofóbica foram preparados e testados para atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* (DÍAZ-RUIZ et al., 2012). O derivado fenilacetato de  $\alpha$ - amirina mostrou ter efeito bacteriostático significativo (**Figura 11.1**). Ésteres com cadeias de ácidos graxos foram testados em diferentes espécies de bactérias, sendo que o derivado dodecanoato (**Figura 11.4**) obteve melhor resultado contra *Pseudomonas syringae* (MALLAVADHANI et al., 2004).

**Figura 11** - Derivados  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas com atividade antimicrobiana e antinociceptiva



Derivados fenilacetato (1), acetato (2), formiato (3) dodecanoato (4) octanoato (5). R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub> para  $\alpha$ - amirina, e R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H para  $\beta$ - amirina.

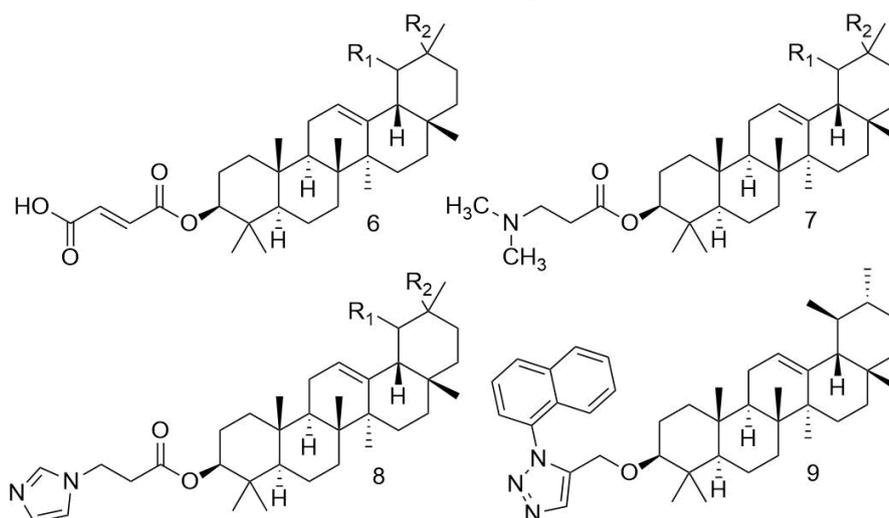
Derivados ésteres em C-3 de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas com cadeias laterais hidrofóbicas e anéis fenil substituídos e derivados oxidados em C-3 e C-11 foram testados para atividade antifúngica, onde os derivados acetato (**Figura 11.2**) e formiato (**Figura 11.3**) exibiram resultado positivo contra várias espécies de *Candida* (JOHANN et al., 2007). A mesma série de derivados foi testado por Soldi et al (2008) para atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. O derivado octanoato (**Figura 11.5**) apresentou resultado promissor *in vivo*

<sup>3</sup> Carbono de hibridização sp<sup>3</sup> adjacente a um carbono vinílico sp<sup>2</sup>

com efeito de antinocicepção na fase inflamatória de dor induzida por formalina e eficaz em prevenir nocicepção causada por ácido acético, quando administrado por via oral.

Derivados ésteres em C-3 de ácidos carboxílicos foram testados para atividade antineoplásica (BARROS et al., 2011). O derivado maleinato (**Figura 12.6**) apresentou importante atividade citotóxica contra células de leucemia promielocítica HLA-60 (IC<sub>50</sub> de 1,8 a 3 µM) e sem toxicidade em células mononucleares normais. Derivados aminoacetilados foram testados em células neoplásicas (VICTOR et al., 2017) sendo que os ésteres dietilaminoacetil e imidazolacetil (**Figura 12.7** e **Figura 12.8**) exibiram atividade contra células HLA-60. Li et al. (2016) prepararam o derivado triazolil-naftil (**Figura 12.9**) de β amirina que foi testado contra células de carcinoma nasofaríngeo HK-1, inibindo o crescimento de uma maneira dose e tempo dependentes (IC<sub>50</sub> de 4,2 µM em 24 horas e 32,5 µM em 48 horas).

**Figura 12** - Derivados α e β amirinas com atividade antineoplásica

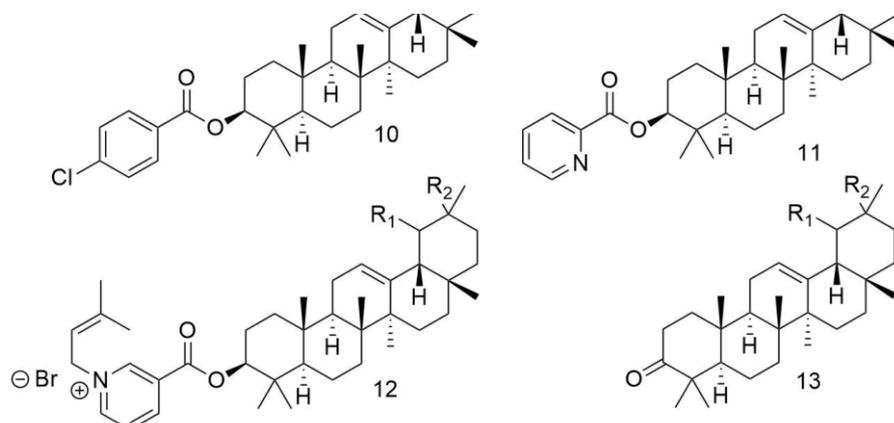


Derivados maleinato (6), dietilaminoacetil (7), imidazolacetil (8) e triazolil-naftil (9). R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub> para α- amirina, e R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H para β- amirina.

Diferentes derivados de α amirina foram avaliados para atividade anti-hiperglicêmica *in vivo* (NARENDER et al., 2009) (**Figura 13**). Os derivados ésteres 4-clorobenzoato e nicotinato apresentaram eficácia semelhante ao controle positivo metformina. Narender et al (2013) propuseram novos derivados nicotinatos com diferentes cadeias laterais hidrofóbicas, sendo que o composto *N*-prenil nicotinato apresentou alta atividade de inibição *in vitro* da α-glicosidase de leveduras (IC<sub>50</sub> 5 µM).

Ferreira et al. (2017), mostraram que os derivados  $\alpha$  e  $\beta$  amirenona, apresentaram potente inibição da  $\alpha$ -glicosidase de levedura ( $IC_{50}$  0,392  $\mu$ g/mL ou 96,59% de inibição).

**Figura 13** - Derivados  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas com atividade antihiperlicêmica



Derivados 4-clorobenzoato (10), nicotinato (11), *N*-prenil nicotinato (12) e amirenona (13). R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub> para  $\alpha$ - amirina, e R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H para  $\beta$ - amirina.

Ésteres e derivados oxidados de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas foram testados contra o parasita tripanossomatídeo *Trypanossoma cruzi* em ensaio *in vitro*. O derivado maleinato (descrito anteriormente na **Figura 12.6**) apresentou melhor atividade contra as formas tripomastigotas ( $IC_{50}$  25,2  $\mu$ M) e amastigotas ( $IC_{50}$  3,2  $\mu$ M), no entanto com índice de seletividade baixo (6,7) devido alta toxicidade para eritrócitos humanos (51,1% de hemólise) e células renais de macaco ( $IC_{50}$  16,2  $\mu$ M) (BOSSOLANI et al., 2017).

Conforme descrito, apesar da literatura apresentar derivados semissintéticos testados em diferentes modelos inclusive para tripanossomatídeos, até o presente momento não foram publicados estudos que tragam derivados triterpênicos de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas planejados e testados para atividade leishmanicida.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Obter derivados semissintéticos dos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas com atividade antileishmania a partir de planejamento racional e baseado na estrutura do alvo.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

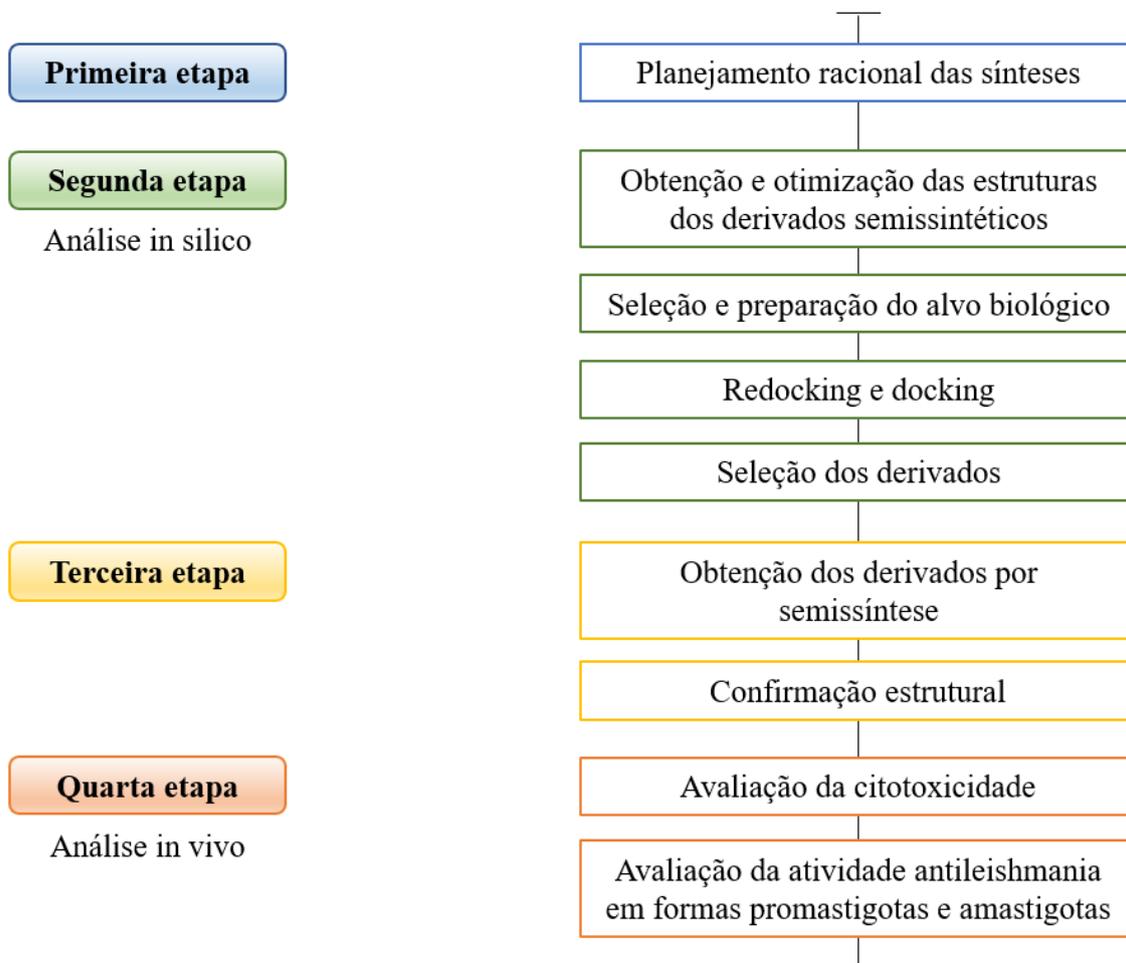
- Planejar derivados triterpênicos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas com base na relação-estrutura atividade de moléculas ativas contra *Leishmania* spp;
- Selecionar os derivados triterpênicos por triagem virtual baseada no receptor, utilizando estruturas cristalizadas de enzimas-chave de *Leishmania* spp;
- Sintetizar, purificar e caracterizar os derivados selecionados.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Delineamento experimental

O desenvolvimento das atividades deste trabalho é resumido na **Figura 14**:

**Figura 14** - Delineamento experimental das atividades



### 4.2 Planejamento racional dos derivados triterpênicos

Os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas foram utilizados como moléculas de partida dos derivados semissintéticos. Através de extensa revisão da literatura, foram planejadas duas séries de derivados utilizando o álcool em C-3 para inserção das modificações.

#### 4.2.1 Planejamento dos derivados sulfonamídicos

As sulfonamidas são caracterizadas pela presença de grupos  $R-SO_2NR'R''$ , no qual a variação dos grupos  $R'$  e  $R''$  produz compostos com propriedades físicas, químicas

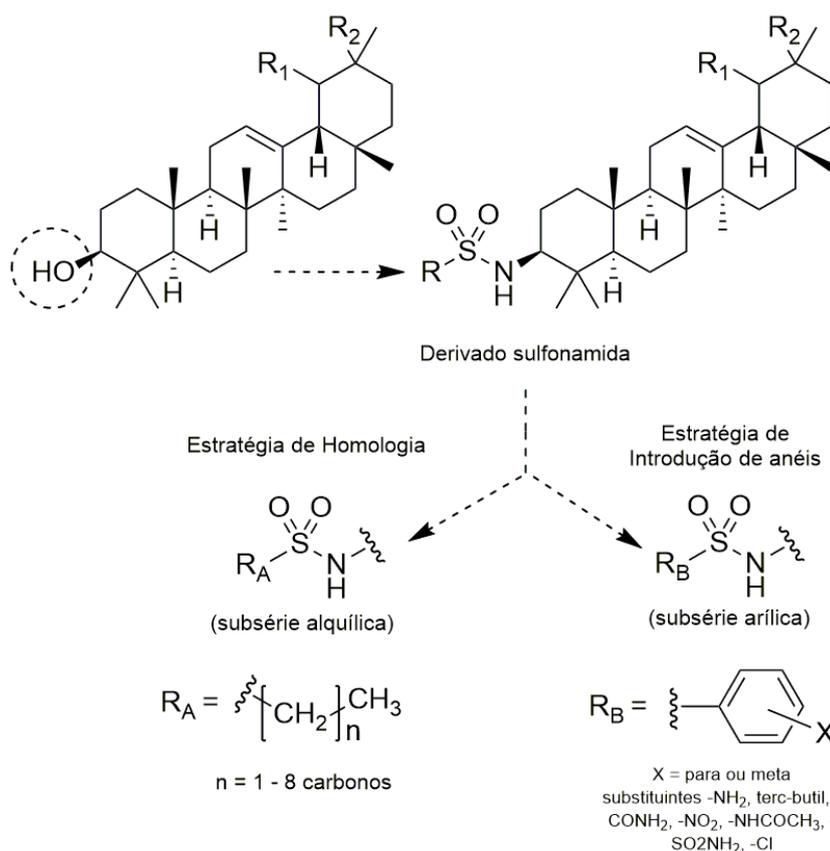
e farmacológicas diferentes. De forma geral, essas moléculas constituem uma importante classe de fármacos, sendo inclusive os primeiros antimicrobianos a serem utilizados (CAPASSO; SUPURAN, 2015). Este grupo funcional está associado a uma infinidade de outras atividades biológicas que estão sendo constantemente atualizadas, e isso se deve provavelmente as características particulares das porções  $-SO_2NH-$  (e suas variações) que podem participar de interações com íons metálicos, resíduos de aminoácidos, DNA ou porções de RNA que constituem alvos biológicos. Além disso, as sulfonamidas são geralmente estáveis, fáceis de preparar e biodisponíveis (SUPURAN, 2017).

A função sulfonamida tem sido reportada como farmacóforo em moléculas leishmanicidas (BORGES et al., 2014; CARDOSO et al., 2018; KATINAS et al., 2017). Além disso, a função sulfonamida é um sítio adicional para ligações de hidrogênio garantindo mais interações com o receptor biológico e também consiste em um grupo funcional com maior estabilidade à hidrólise química do que a função éster, dessa forma sendo menos susceptível às reações de biotransformação (KALGUTKAR; JONES; SAWANT, 2010). Diante do exposto, decidiu-se inserir a função sulfonamida em C-3, sendo, portanto, que a primeira série de derivados consistiu em triterpenos sulfonamídicos com variações na cadeia lateral.

A primeira subsérie de sulfonamidas (alquílica) foi inspirada na estratégia de homologia para investigação de propriedades estéricas e de lipofilicidade, com aumento de até 8 unidades metilênicas ( $-CH_2-$ ) na cadeia lateral. A segunda subsérie (arílica) guiada pela estratégia de introdução de anéis, onde os substituintes foram selecionados utilizando o diagrama de Craig (anteriormente descrito na **Figura 8**, seção 2.3 deste trabalho). Foram selecionados grupos de forma a abranger todas as possibilidades de cada quadrante, ou seja, grupos doadores de elétrons pouco hidrofóbicos ( $-NH_2$ ,  $-NHCOCH_3$ ) e hidrofóbicos (terc-butil) e grupos retiradores de elétrons pouco hidrofóbicos ( $-CONH_2$ ,  $SO_2NH_2$ ) e hidrofóbicos ( $-Cl$ ,  $-NO_2$ ).

A proposta de inserção de sulfonamidas em triterpenos, além de ser inédita em  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, também nunca foi antes reportada nos demais triterpenos conhecidos. Na **Figura 15** estão apresentadas o resumo das estratégias aplicadas no planejamento dos derivados sulfonamídicos e no **APÊNDICE A** estão ilustrados todos os derivados em detalhes.

**Figura 15** - Planejamento dos derivados sulfonamídicos



#### 4.2.2 Planejamento dos derivados heterocíclicos

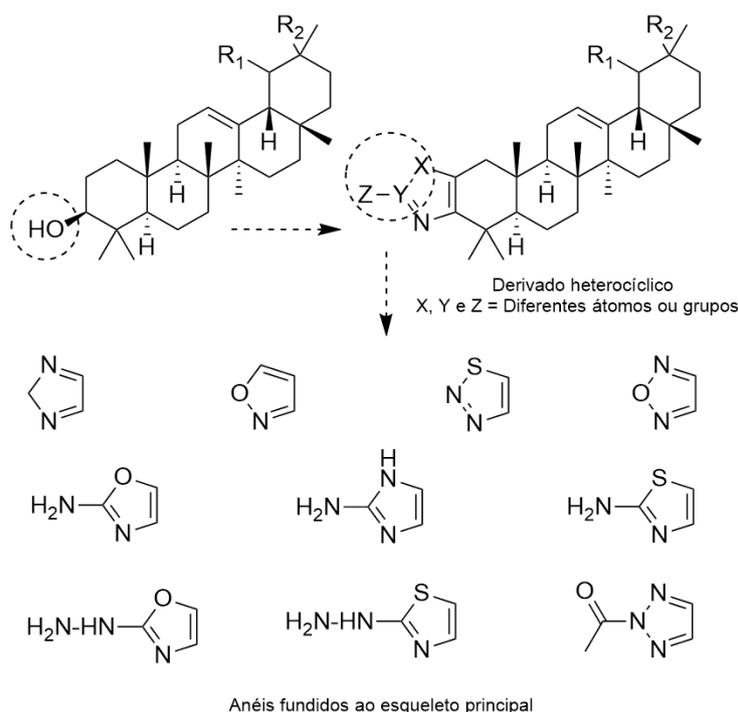
Os anéis heterocíclicos estão presentes em muitos fármacos e apresentam vantagens em relação aos sistemas carbocíclicos, entre as quais maior estabilidade e maior resistência a degradação metabólica (KVASNICA et al., 2015). Alguns trabalhos relatam que a utilização da estratégia de fusão de anéis em triterpenos resultou em análogos com atividade antileishmania (ALAKURTTI et al., 2010; HAAVIKKO et al., 2014). Baseado nessa estratégia, a segunda série de derivados trata-se de triterpenos fundidos a anéis heterocíclicos de 5 membros com ou sem substituições.

Foram adicionados anéis como imidazol e triazol, em vista desses heterociclos serem reconhecidamente farmacóforos em inibidores da enzima CYP51 (HEERES; MEERPOEL; LEWI, 2010). Adicionalmente, alguns dos derivados heterocíclicos possuem funções nitrogenadas como substituintes (-NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>). O caráter básico pode contribuir para ação antileishmania uma vez que podem protonar no interior ácido

do macrófago infectado e ter sua eliminação dificultada (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994).

Já existem alguns trabalhos que mostram a obtenção de derivados heterocíclicos em triterpenos, porém existem poucos trabalhos que apresentam o direcionamento para atividade antileishmania. Na **Figura 16** estão apresentadas o resumo das estratégias aplicadas no planejamento dos derivados heterocíclicos e no **APÊNDICE A** estão ilustrados todos os derivados em detalhes.

**Figura 16** - Planejamento dos derivados heterocíclicos



### 4.3 Obtenção e otimização das estruturas dos derivados

Os derivados planejados tiveram suas estruturas bidimensionais desenhadas no programa ChemDraw Professional v. 16.0. Em seguida as estruturas foram copiadas e coladas no programa Chem3D Ultra v. 16.0. para obter as estruturas tridimensionais que foram salvas em formato *.mol*. As estruturas foram abertas no programa Mercury CSD v. 4.0 para busca conformacional utilizando a ferramenta CSD Conformer Generator. Foram gerados 200 conformêros para cada molécula, no qual foi selecionado somente o conformêro mais provável que foi salvo em formato *.mol2*. Cada conformêro teve sua estrutura otimizada utilizando o campo de força molecular da Merck - MMFF94, usando novamente o programa Chem3D Ultra. Os arquivos finais dos derivados foram todos salvos em formato *.mol2*.

#### 4.4 Seleção e preparação do alvo biológico

Foi realizada busca no PDB utilizando as palavras-chave “CYP51” e “leishmania” e somente um resultado retornou, correspondendo a enzima CYP51 de *L. infantum* complexada com o fármaco fluconazol, com resolução de 2,75 Å, sob código 3L4D (HARGROVE et al., 2011). Foi feito o *download* da enzima 3L4D no formato *.pdb*, sendo então processada no programa GOLD v. 5.7 (The Cambridge Crystallographic Data Centre®).

Átomos de hidrogênio foram adicionados e moléculas de água foram retiradas, uma vez que os responsáveis pela cristalização da enzima não apontam estas como importantes. Além disso, pela inspeção visual não foram encontradas águas presentes no sítio ativo da enzima. Também foram removidos um artefato de cristalização identificado como um polietilenoglicol e o ligante original fluconazol cristalizado em cada subunidade.

Considerando que a enzima possui 4 subunidades semelhantes, foi selecionado somente a subunidade A para a pesquisa, e as demais foram removidas afim de se reduzir o volume de dados carregados e manter otimizado o desempenho do programa. Para definição do sítio ligação foi utilizado como referência a localização da molécula de fluconazol da subunidade A, o qual foi definido a partir desta o raio de 9 Å. Pela inspeção visual, este raio foi considerado suficiente para realização do docking.

#### 4.5 Redocking

A molécula de fluconazol foi utilizada para o redocking e para escolha da função de pontuação a ser utilizada. Os parâmetros do GA foram mantidos em modo automático com eficiência de busca de 100%, sendo realizadas 15 corridas para cada uma das 4 funções (ChemPLP, GoldScore, ChemScore e ASP). As funções foram avaliadas segundo a média do RMSD por análise de clusterização.

A clusterização divide as corridas em grupos, onde as mais semelhantes farão parte de um mesmo grupo (cluster). Para organização dos grupos foi estabelecida a proximidade de até 2 Å. O grupo com mais corridas teve o RMSD calculado a média e desvio padrão. A função que apresentou média do RMSD menor que 2 Å ou mais próxima de 0 foi selecionada para realização do docking nos derivados.

Na **Figura 17** é observado um exemplo de tabela obtida após 15 corridas. Neste caso existem 3 grupos com conformações próximas entre si e com distância de até 2 Å,

logo foi selecionado o grupo com maior número de corridas para o cálculo do RMSD, pois esta conformação se repetiu mais vezes e, portanto, deve ser a mais correta.

**Figura 17** - Exemplo de análise por clusterização

```

Clustering method           : complete linkage
Structure ids in cluster table : rank nos.
Ordering of clusters and their members : by rank (order if from rms_analysis)

Distance | Clusters
0.05 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
0.09 | 1 | 2 | 3 | 4 5 | 6 | 7 | 8 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
0.14 | 1 | 2 | 3 6 | 4 5 | 7 | 8 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
0.14 | 1 | 2 | 3 6 | 4 5 | 7 | 8 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 15 |
0.15 | 1 | 2 4 5 | 3 6 | 7 | 8 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 15 |
0.25 | 1 | 2 3 4 5 6 | 7 | 8 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 15 |
0.32 | 1 | 2 3 4 5 6 7 | 8 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 15 |
0.82 | 1 | 2 3 4 5 6 7 10 | 8 9 | 11 | 12 | 13 | 14 15 |
0.99 | 1 | 2 3 4 5 6 7 10 | 8 9 12 | 11 | 13 | 14 15 |
1.19 | 1 | 2 3 4 5 6 7 10 13 | 8 9 12 | 11 | 14 15 |
1.69 | 1 | 2 3 4 5 6 7 10 13 14 15 | 8 9 12 | 11 |
2.43 | 1 | 2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 13 14 15 | 11 | <- files (d= 2.00 Å)
3.99 | 1 11 | 2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 13 14 15 |
5.51 | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 |

```

Em azul é destacado a linha de grupos com distância de até 2.00 Å. Em vermelho os grupos.

#### 4.6 Docking dos derivados triterpênicos

Com a estrutura tridimensional de cada derivado modelada e otimizada e a enzima preparada e validada, pode então ser realizado o docking dos derivados. Os parâmetros utilizados na validação do alvo biológico (raio, função de pontuação, número de corridas, etc.) foram exatamente os mesmos utilizados do redocking. As poses obtidas dos derivados foram analisadas por clusterização de maneira semelhante ao item 4.5, no entanto restringiu-se para 1 Å - 1,5 Å o grau de proximidade de cada conformação. No grupo mais frequente, a pose com maior pontuação foi escolhida e foi salva juntamente com a enzima para ser analisada quanto as interações químicas.

#### 4.7 Análise da energia livre de ligação

Após o docking, os complexos enzima-ligante dos derivados (formato *.pdb*) foram analisados quanto a energia livre de ligação. Foi utilizado o programa Autodock Tools v. 1.5.6 para salvar os arquivos separados enzima e ligante no formato *.pdbqt*. Em seguida, foi utilizado o programa Autodock Vina v. 1.1.2 para avaliar a energia livre entre a enzima e o derivado. Os arquivos foram salvos individualmente em pastas juntamente com o aplicativo e o arquivo de configuração, e foi utilizado o seguinte código no prompt de

comando: *vina --score\_only --config config.txt --log (nome do arquivo de saída).log*. Os resultados foram expressos em kcal/mol.

#### 4.8 Seleção dos derivados

Os derivados selecionados para síntese foram escolhidos utilizando como critério as interações químicas com o receptor biológico. Para análise das interações e criação das figuras foi utilizado o programa Discovery Studio Visualizer v. 19.1 e Pymol v. 2.0. Foram consideradas como mais importantes as interações de hidrogênio e interações metal-ligante, seguidas de interações de empilhamento (empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T,  $\pi$ -cátion) e interações hidrofóbicas. Também foram contabilizados contatos desfavoráveis. Adicionalmente, foram observadas também as energias de ligação obtidas em kcal/mol as quais, quanto menor o valor, maior afinidade de ligação. Os derivados com maior número de interações químicas específicas e menor valor de energia de ligação foram selecionados para síntese. O fluconazol foi usado como controle positivo.

#### 4.9 Obtenção dos derivados por semissíntese

##### 4.9.1 Reagentes e Equipamentos

Todas as reações sensíveis ao ar e/ou água foram realizadas sob atmosfera inerte de nitrogênio utilizando um balão inflável acoplado a uma seringa que foi injetada no recipiente com a síntese. Os solventes utilizados foram destilados e secos em peneira molecular 3 Å (Sigma-Aldrich) por pelo menos 24 horas. A peneira molecular utilizada foi primeiramente ativada em mufla à 300 °C durante 2 horas. O solvente tetraidrofurano (THF) em específico foi destilado sob sulfato de ferro II (100 mL : 0,6 g de FeSO<sub>4</sub> dissolvido em água destilada) e seco em peneira molecular.

As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) com placas de sílica gel (SiO<sub>2</sub>) com revelador UV<sub>254</sub> obtidas comercialmente. Para a revelação das placas foi utilizada lâmpada UV<sub>254</sub> ou solução aquosa de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 50%). Os produtos foram purificados em cromatografia em coluna, utilizando coluna de vidro, sílica gel 60 (230 – 400 mesh; Macherey-Nagel) e como eluente uma mistura de solventes adequados. Em cada experimento estão descritos os sistemas de eluição utilizados. Os reagentes restantes foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia.

#### 4.9.2 Obtenção dos triterpenos $\alpha$ e $\beta$ amirinas

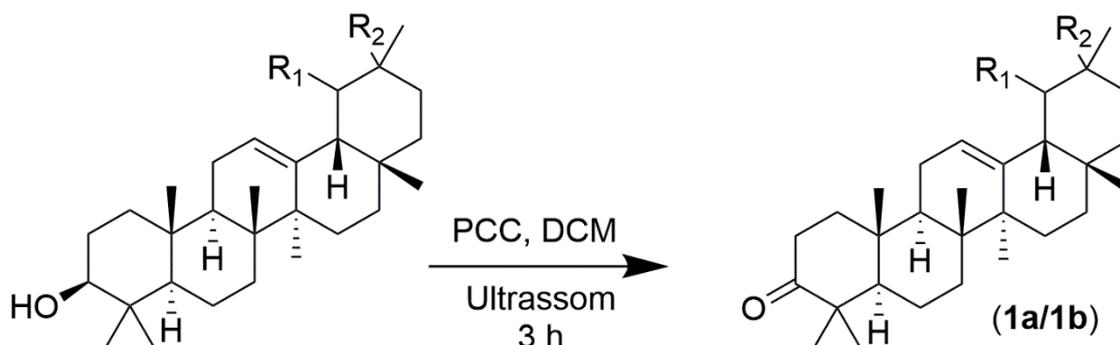
A resina triturada de breu-branco (*Protium* sp.) foi disponibilizada pelo Laboratório de Fitoquímica e Semissíntese - FITOPHAR, o qual foi adquirida anteriormente em uma feira tradicional em Coari, Amazonas, Brasil. Para extração de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas a partir da resina, foi usada metodologia de extração direta descrita por Ferreira et al (2020) com modificações. Pesou-se 20 g de resina triturada e submeteu-se a coluna cromatográfica de sílica gel (2 cm de diâmetro, 20 cm de altura).

Para eluição da coluna foi utilizado 200 mL de fase móvel com hexano e acetato de etila (AcOEt) na proporção de 95:5 v/v, e depois 800 mL na proporção 9:1 v/v. Foram obtidas 18 frações coletadas em frascos Erlenmeyer. Após a remoção do solvente sob pressão reduzida, as frações foram agrupadas por similaridade de acordo com a CCD. Foi realizado recristalização das amostras consideradas mais puras pela CCD, que foram centrifugadas em tubos de vidro contendo acetona gelada por pelo menos 3 vezes.

#### 4.9.3 Síntese de 3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (**1a/1b**)

A uma solução de 5,81 g (13,61 mmol) de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas em 150 mL de diclorometano seco, foram adicionados 4,40 g (20,41 mmol; 1,5 eq) de clorocromato de piridínio (PCC) (**Figura 18**). A reação foi mantida em banho de ultrassom durante 3 horas até o término da reação acompanhado por CCD (hexano/AcOEt 95:5, revelador  $H_2SO_4$ ). O solvente foi eliminado em rotaevaporador e o produto foi filtrado em coluna cromatográfica ( $SiO_2$ , sistema hexano/acetato de etila 95:5) sendo as frações coletadas com orientação de luz UV. A massa transparente obtida foi cristalizada com metanol.

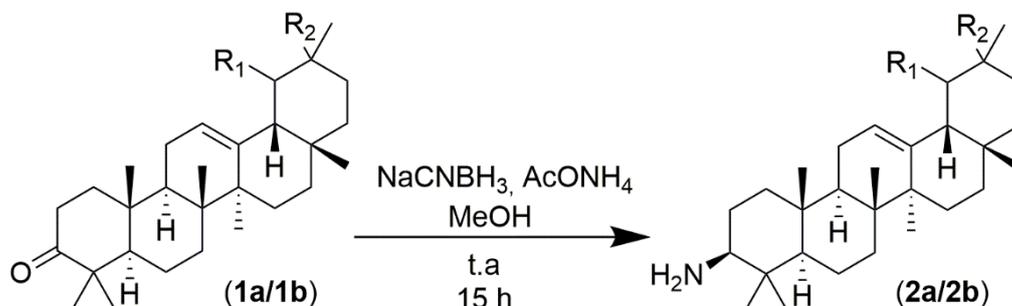
**Figura 18** - Síntese do derivado 3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (1a/1b)



#### 4.9.4 Síntese de 3-amino $\alpha$ e $\beta$ amirina (**2a/2b**)

A uma solução de 1,01 g (2,37 mmol) do composto **1a/1b** em 40 mL de metanol seco foram adicionados 1,89 g (24,51 mmol; 10 eq) de acetato de amônia e 0,220 g (3,5 mmol; 1,5 eq) de cianoborohidreto de sódio (**Figura 19**). A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente durante 15 horas até o término determinado por CCD (hexano/AcOEt 8:2 com 1% trietilamina). Adicionou-se 100 mL de água destilada, o pH foi corrigido para 10 com hidróxido de sódio 1 M, extraiu-se com diclorometano (4 x 50 mL), a fase orgânica obtida foi lavada com água (1 x 100 mL) e seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . O produto foi purificado em coluna cromatográfica ( $\text{SiO}_2$ , sistema hexano/AcOEt 9:1 com 1% trietilamina, revelador  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) sendo as frações coletadas com orientação de luz UV.

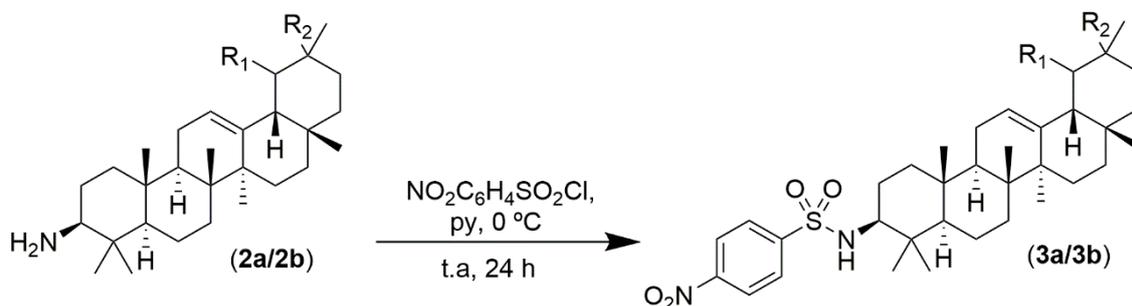
**Figura 19** - Síntese do derivado 3-amino  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (2a/2b)



#### 4.9.5 Síntese de 4-nitrobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (**3a/3b**)

Foi utilizado 0,051 g (0,119 mmol) do composto **2a/2b** em 10 mL de piridina seca. Esta solução foi resfriada próximo de 0 °C em banho de gelo, e, sob agitação, foram adicionados 0,050 g (0,226 mmol; 1,9 eq) de cloreto de 4-nitrobenzenosulfonila (**Figura 20**). A reação foi mantida em temperatura ambiente e monitorada até 24 horas por CCD (hexano/AcOEt 8:2 com 1% trietilamina). O solvente foi eliminado em capela de exaustão e secador elétrico. O produto foi purificado em coluna cromatográfica ( $\text{SiO}_2$ , sistema hexano/AcOEt 9:1 com 1% trietilamina, revelador  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

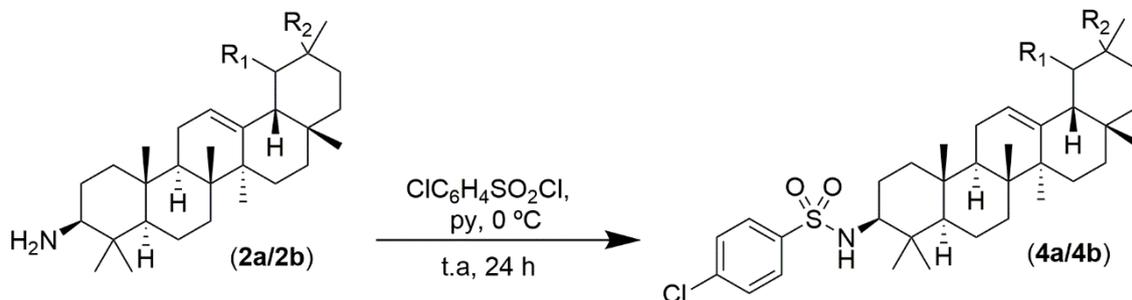
**Figura 20** - Síntese do derivado 4-nitrobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (3a/3b)



#### 4.9.6 Síntese de 4-clorobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (4a/4b)

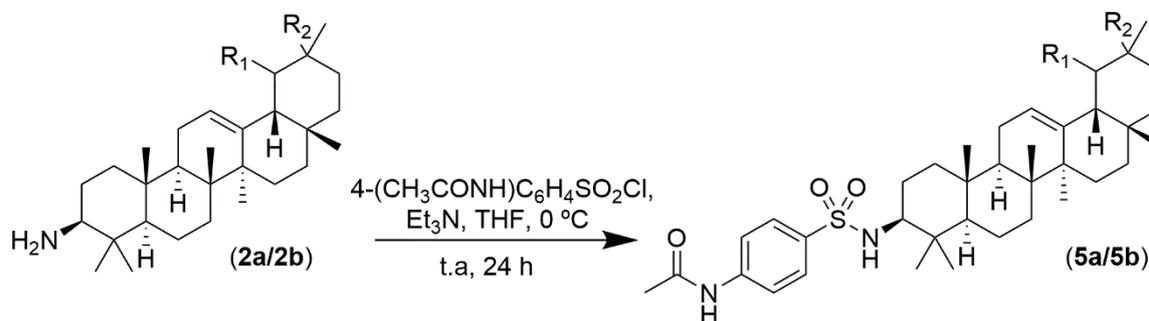
Foi utilizado 0,075 g (0,176 mmol) do composto **2a/2b** em 10 mL de piridina seca. Esta solução foi resfriada próximo de 0 °C em banho de gelo, e, sob agitação, foram adicionados 0,072 g (0,341 mmol; 1,9 eq) de cloreto de 4-clorobenzenosulfonila (**Figura 21**). A reação foi mantida em temperatura ambiente e monitorada até 24 horas por CCD (hexano/AcOEt 8:2 com 1% trietilamina). O solvente foi eliminado em capela de exaustão e secador elétrico. O produto foi purificado em coluna cromatográfica (SiO<sub>2</sub>, sistema hexano/AcOEt 9:1 com 1% de trietilamina, revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

**Figura 21** - Síntese do derivado 4-clorobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (4a/4b)



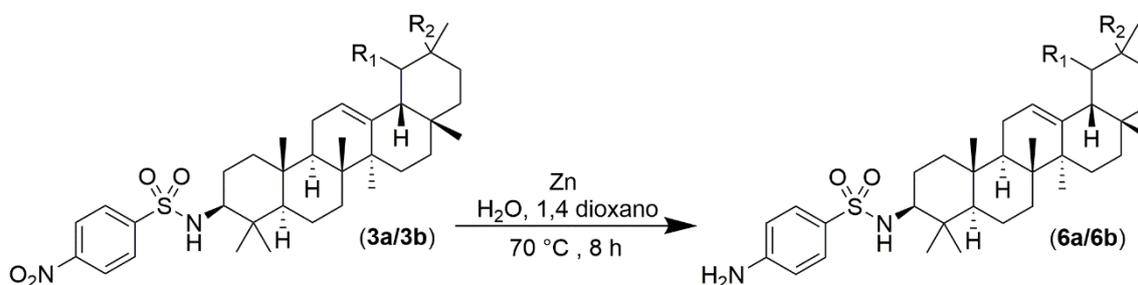
#### 4.9.7 Síntese de 4-acetamidobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (5a/5b)

Foi utilizado 0,072 g (0,169 mmol) do composto **2a/2b** em 10 mL de THF seco. Esta solução foi resfriada próximo de 0 °C em banho de gelo, e, sob agitação, foram adicionados 0,075 g (0,320 mmol; 1,9 eq) de cloreto de 4-acetamidobenzenosulfonila e 10 gotas de trietilamina (**Figura 22**). A reação foi mantida em temperatura ambiente e monitorada até 24 horas por CCD (hexano/AcOEt 7:3 com 1% trietilamina). O solvente foi eliminado em capela de exaustão e secador elétrico. O produto foi purificado em coluna cromatográfica (SiO<sub>2</sub>, sistema hexano/AcOEt 6:4 com 1% de trietilamina).

**Figura 22** - Síntese do derivado 4-acetamidobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (5a/5b)

#### 4.9.8 Síntese de 4-aminobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (6a/6b)

Foi preparado solução de 0,039 g (0,063 mmol) do composto **3a/3b** em 11,5 mL de 1,4 dioxano e 3,75 mL de água destilada e mantido sob agitação até clarear. Foi adicionado 0,012 g (0,183 mmol; 3 eq) de zinco metálico (**Figura 23**). A reação foi mantida sob agitação em temperatura de 70 °C durante 8 horas até o término determinado por CCD (hexano/AcOEt 7:3 com 1% trietilamina). Foi adicionado 20 mL de água destilada, em seguida a mistura reacional foi filtrada e extraída com AcOEt (2 x 10 mL) e a fase orgânica foi seca sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O produto foi purificado em coluna cromatográfica (SiO<sub>2</sub>, sistema hexano/AcOEt 7:3 com 1% de trietilamina, revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

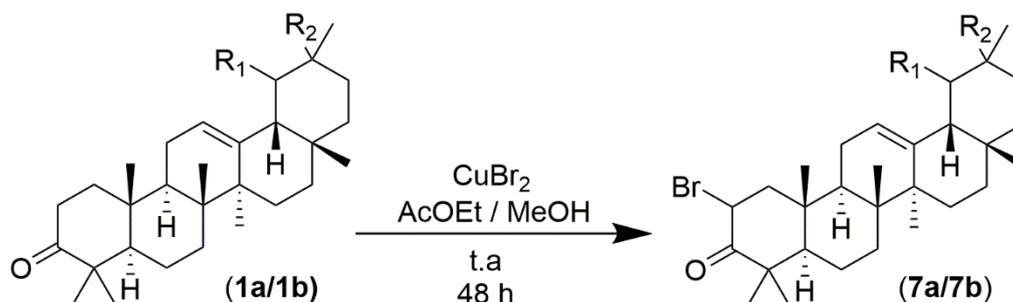
**Figura 23** – Síntese do derivado 4-aminobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (6a/6b)

#### 4.9.9 Síntese de 2-bromo-3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (7a/7b)

A uma solução de 0,700 g (1,64 mmol) do composto **1a/1b** em 49 mL de acetato de etila e 24,5 mL de metanol seco foram adicionados 0,735 g (3,29 mmol; 2 eq) de brometo de cobre II (**Figura 24**). A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente durante 48 horas até o término determinado por CCD (hexano/AcOEt 95:5 com 1% trietilamina, revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A mistura reacional foi filtrada e em seguida adicionou-se 70 mL de solução saturada de tiosulfato de sódio e 140 mL de água destilada. Extraíu-se com acetato de etila (4 x 50 mL), a fase orgânica obtida foi lavada

com água (2 x 70 mL) e seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Após eliminar o solvente o sólido resultante foi purificado em coluna cromatográfica ( $\text{SiO}_2$ , sistema benzina/éter etílico 99:1) sendo as frações coletadas com orientação de luz UV.

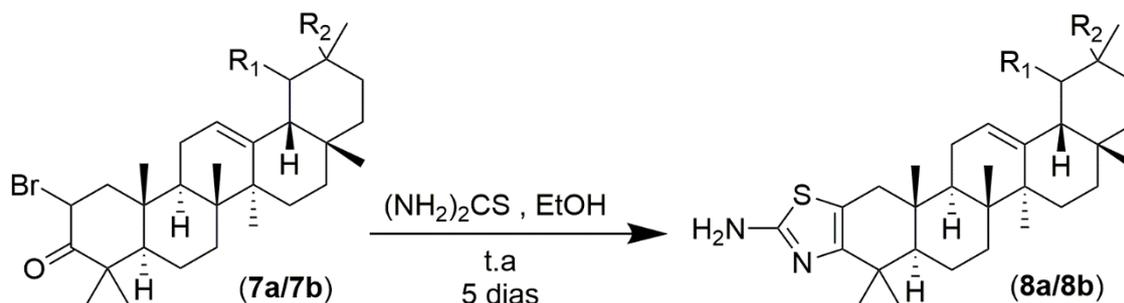
**Figura 24** - Síntese do derivado 2-bromo-3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (7a/7b)



#### 4.9.10 Síntese do derivado aminotiazol $\alpha$ e $\beta$ amirina (8a/8b)

A uma solução de 0,051 g (0,101 mmol) do composto **7a/7b** em 10 mL de etanol seco foram adicionados 0,075 g (0,985 mmol; 10 eq) de tiouréia (**Figura 25**). A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente durante 5 dias até o término determinado por CCD (hexano/AcOEt 8:2 com 1% trietilamina). Foi adicionado 15 mL de água destilada, o produto foi extraído com acetato de etila (3 x 10 mL) e a fase orgânica seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Após eliminar o solvente o produto foi purificado em coluna cromatográfica ( $\text{SiO}_2$ , sistema hexano/AcOEt 9:1 com 1% de trietilamina, revelador  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

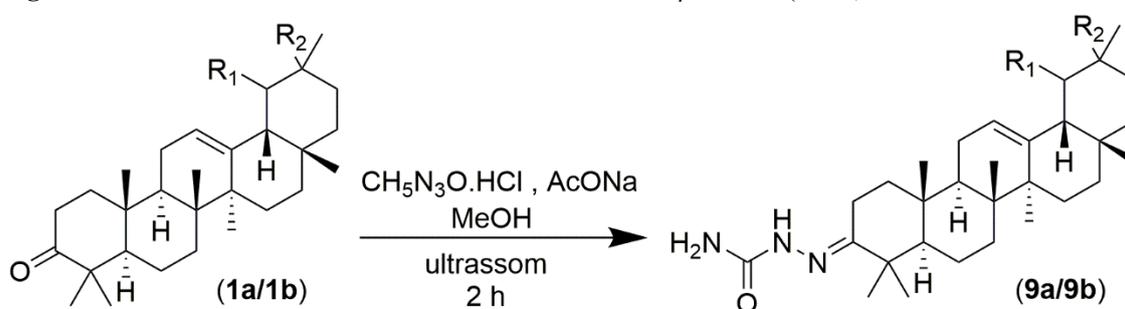
**Figura 25** - Síntese do derivado aminotiazol  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (8a/8b)



#### 4.9.11 Síntese do derivado hidrazina-1-carboxiamida $\alpha$ e $\beta$ amirina (**9a/9b**)

A uma solução de 0,200 g (0,471 mmol) do composto **1a/1b** em 30 mL de etanol seco foram adicionados 0,263 g (2,35 mmol; 5 eq) de tiouréia e 0,193 g (2,35 mmol; 5 eq) de acetato de sódio (**Figura 26**). A reação foi feita e mantida em atmosfera de nitrogênio e em banho de ultrassom, durante 2 horas. O término da reação foi determinado por CCD (hexano/AcOEt 7:3 com 1% trietilamina). Foi adicionado 20 mL de água destilada, o produto foi extraído com acetato de etila (3 x 20 mL) e a fase orgânica seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Após eliminar o solvente o produto foi purificado em coluna cromatográfica ( $\text{SiO}_2$ , sistema hexano/AcOEt 9:1 com 1% de trietilamina, revelador  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

**Figura 26** - Síntese do derivado hidrazina-1-carboxiamida  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (9a/9b)



#### 4.9.12 Análises para confirmação estrutural

Para confirmação estrutural foram utilizados equipamentos da Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais do INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Os espectros de massa foram registrados em espectrômetro Bruker Daltonics, modelo Amazon Speed, operando sob fonte APCI em modo positivo ou negativo. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 foram determinados no aparelho Bruker Biospin AG, modelo Fourier 300 UltraShield, que opera na frequência de 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) medidas em Hertz (Hz). Para todas as amostras foi utilizado o solvente  $\text{CDCl}_3$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

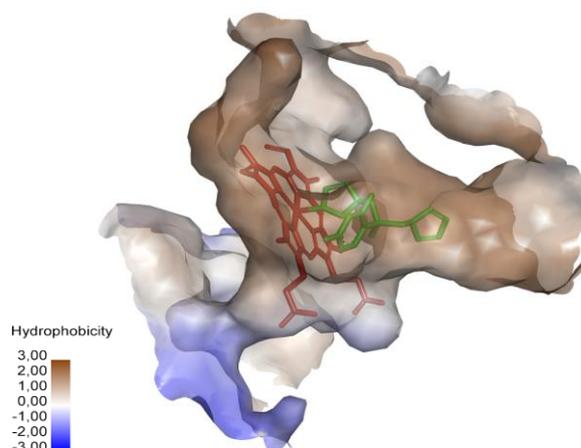
### 5.1 Análises in silico

Neste trabalho, optou-se por utilizar o estudo *in silico* com o intuito de selecionar moléculas com atividade antileishmania, utilizando modificações estruturais direcionadas para o aumento da probabilidade de obtenção de moléculas com potencial biológico. Dessa forma, foram planejados 34 derivados dos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirina, que são isômeros dificilmente separáveis por métodos convencionais, sendo usados como mistura nas reações de síntese. Por outro lado, os isômeros foram analisados de maneira isolada nos estudos in silico e, portanto, foram analisadas 68 moléculas protótipo por meio do docking molecular.

Durante a geração das estruturas 3D é comum ocorrerem distorções com erros nos cálculos dos comprimentos e ângulos das ligações que são corrigidos com a minimização da energia por meio da aplicação de um campo de força, nesse caso o MMFF94 (SANT'ANNA, 2009). Neste estudo, porém, mesmo após essa etapa, algumas estruturas apareciam com ligações quebradas e seus átomos espalhados após o docking.

É provável que o confôrmero gerado pelo programa Chem3D não fosse o mais adequado e, portanto, a minimização da energia não foi suficiente. Para contornar esse problema foi realizada etapa adicional onde as estruturas 3D passaram por uma busca conformacional utilizando o programa Mercury, que produziu 200 confôrmeros para cada estrutura e o confôrmero mais estável teve então sua energia otimizada. Somente dessa maneira foi possível obter as estruturas íntegras após o docking molecular. As 68 moléculas são apresentadas em forma 2D no **APÊNDICE A**.

Para o docking molecular foi utilizada a enzima CYP51 de *L. infantum* (3L4D). Segundo a equipe responsável por sua cristalização, os aminoácidos que compõem a enzima possuem grande homologia se comparados às sequências genéticas de outras espécies (95% para *L. braziliensis*, 96% para *L. major*, 97% para *L. mexicana* e *L. amazonensis*) e apenas 26% de homologia se comparada a CYP51 humana (HARGROVE et al., 2011). Por meio de inspeção visual, o sítio ativo foi evidenciado como um canal composto majoritariamente por aminoácidos de cadeia lateral hidrofóbica, que dá acesso ao grupo heme que é onde ocorre a atividade catalítica. Na **Figura 27** é representada a área da enzima no qual o docking molecular foi realizado.

**Figura 27** - Área do sítio catalítico da enzima 3L4D

Áreas em marrom são mais hidrofóbicas e áreas em azul são mais hidrofílicas. No interior da cavidade o grupo heme está em vermelho e o inibidor fluconazol em verde.

Para validação da metodologia de docking foi realizado o redocking utilizando a estrutura do inibidor o qual a enzima foi cristalizada, nesse caso o fluconazol. A validação também permitiu escolher qual a melhor função de pontuação a ser empregada no trabalho. A análise das funções de pontuação mostrou que a função ChemScore apresentou melhor resultado (**Tabela 1**), onde em um *cluster* de 7 poses apresentou RMSD de  $1,3 \text{ \AA} \pm 0,4$ , sendo escolhida para o docking.

**Tabela 1** - Validação da função de pontuação para enzima 14  $\alpha$ -demetilase (PDB: 3L4D)

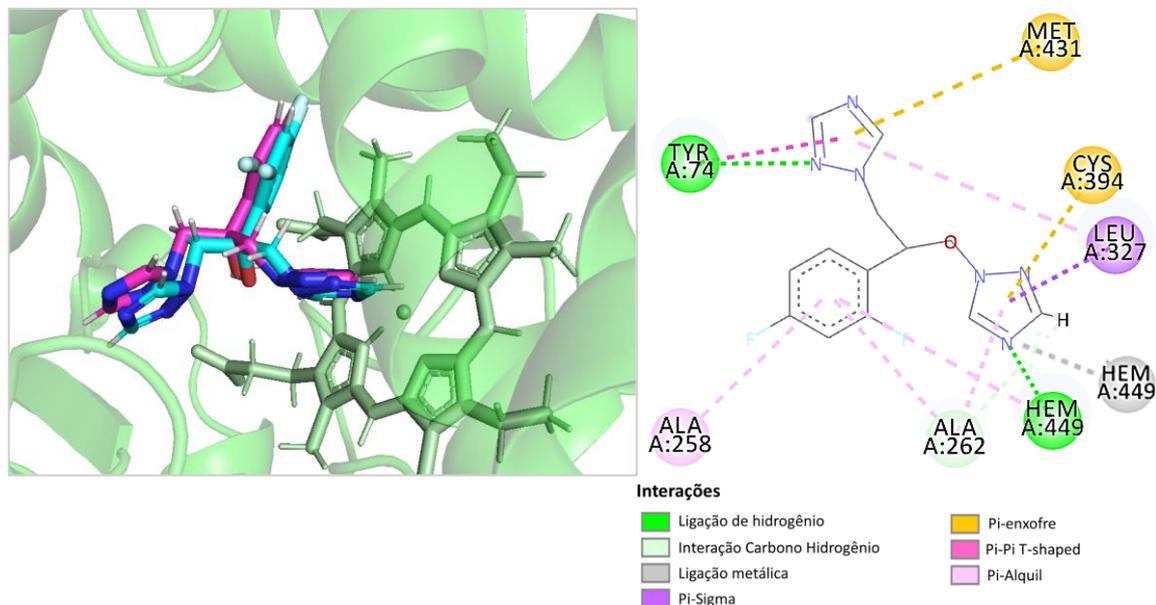
Função de Pontuação	Número de <i>clusters</i>	Poses no <i>cluster</i> principal	RMSD médio das poses $\pm$ desvio padrão ( $\text{\AA}$ )
ChemPLP	3	7	$5,4 \pm 0,1$
GoldScore	5	9	$5,1 \pm 0,1$
ChemScore	4	7	$1,3 \pm 0,4$
ASP	3	13	$5,4 \pm 0,1$

Número total de poses: 15

Por meio da inspeção visual, foram analisadas as poses geradas pela função ChemScore. Observa-se que a metodologia utilizada conseguiu reproduzir a conformação do ligante original, fato este comprovado por sobreposição da melhor pose obtida com RMSD de  $0,9 \text{ \AA}$  (**Figura 28**, à direita). As interações também estão em concordância com o original, onde a principal interação ocorre com a molécula de fluconazol realizando uma interação metal-ligante entre o anel triazol com o ferro do grupo heme da enzima (**Figura 28**, à esquerda). Além disso, a conformação é estabilizada por interações de hidrogênio com os nitrogênios do grupo heme e em Tyr 102, interações  $\pi$ -enxofre em Met

459 e Cys 422, interação  $\pi$ -sigma em Leu 355,  $\pi$ - $\pi$  em Tyr 102 e interações hidrofóbicas (Ala 290 e Ala 286). Essa interação apresentou energia de ligação de -6,5358 kcal/mol.

**Figura 28** - Pose de fluconazol obtida após o redocking



À esquerda a pose original de fluconazol (em azul) sobreposta a pose encontrada após o docking (em rosa). À direita as interações observadas no fluconazol após o redocking.

Para avaliar os resultados do docking e selecionar os derivados a serem sintetizados, foram observadas as interações químicas que a molécula realizou com o receptor biológico. As interações entre uma molécula ativa e o receptor biológico são cruciais no bloqueio ou ativação da atividade enzimática e a interpretação a nível molecular destas constitui fator-chave para projeção de drogas superiores e efetivas (SALEH et al, 2016). Sabe-se que a interação com o grupo heme na enzima CYP51, especificamente a coordenação com o ferro, é importante para o bloqueio de sua atividade. Portanto, essa é uma característica desejável para os derivados selecionados.

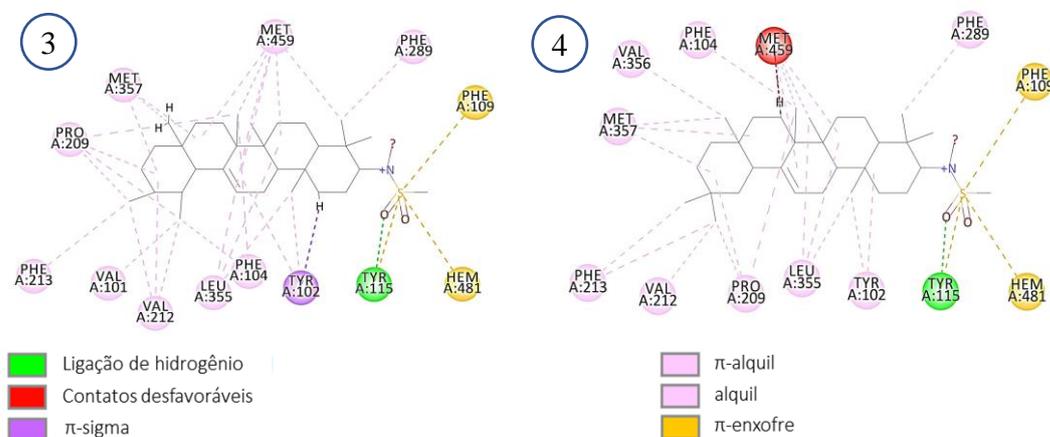
A ligação de hidrogênio é um recurso presente em vários sistemas biológicos: é essencial na determinação da estrutura de proteínas e ácidos nucleicos, é um importante determinante de especificidade em catálise enzimática e transferência de informação biológica, taxa da reação enzimáticas, etc. (FERSHT et al., 1985). Essas interações ocorrem entre átomos aceptores e doadores de elétrons e tem grande impacto na estabilização de complexos enzima-ligante, sendo, portanto, interações específicas. Por isso, as interações de hidrogênio juntamente com as interações metálicas foram priorizadas para escolha dos derivados.

Além das interações moleculares, foram considerados os valores de energia de ligação em kcal/mol que representam a afinidade de ligação dos derivados com a enzima CYP51. A energia livre de ligação quantifica a eficiência de formação do complexo enzima-ligante, onde a taxa de dissociação diminui com o aumento do valor da energia de ligação, ou seja, quanto mais negativo o valor em kcal/mol maior a estabilidade do complexo (YOUSUF et al., 2017). Infelizmente o programa GOLD não gera essa classificação dada em kcal/mol e por isso o programa Autodock Vina foi utilizado para gerar esses valores dos complexos.

No **APÊNDICE B** são apresentados os resultados dos dockings da série de derivados sulfonamida com cadeias laterais alquílicas. Nota-se que somente o derivado 14 realizou interação metal-ligante com o grupo heme e uma ligação de hidrogênio também com o grupo heme. No entanto, essa molécula apresentou afinidade de ligação de -5,5803 kcal/mol, ou seja, menor que o controle positivo, e seu isômero, o derivado 13, não realizou nenhuma interação. Logo estes foram descartados, e procedeu-se a seleção a partir dos derivados que realizaram ligações de hidrogênio, seguidas de energia de ligação superior ao controle e que fizeram interações adicionais semelhantes ao fluconazol como  $\pi$ -enxofre,  $\pi$ - $\pi$  e  $\pi$ -sigma.

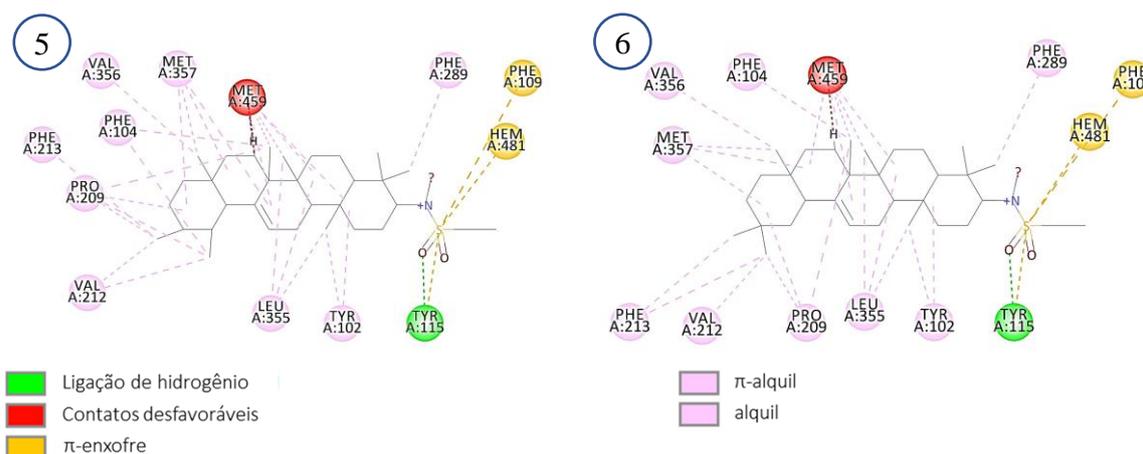
Os derivados 3 e 4 realizaram uma ligação de hidrogênio em Tyr 115, interações  $\pi$ -enxofre em Phe 109, Tyr 115 e com o grupo heme. O derivado 3 fez ligação adicional  $\pi$ -sigma em Tyr 102. Os derivados 3 e 4 tiveram energia de ligação -6,9605 e -8,0953 kcal/mol, respectivamente. Esses derivados são sulfonamidas que possuem um grupo metil como cadeia lateral e estão ilustrados na **Figura 29**.

**Figura 29** - Interação dos derivados 3 e 4 no sítio ativo da enzima CYP51



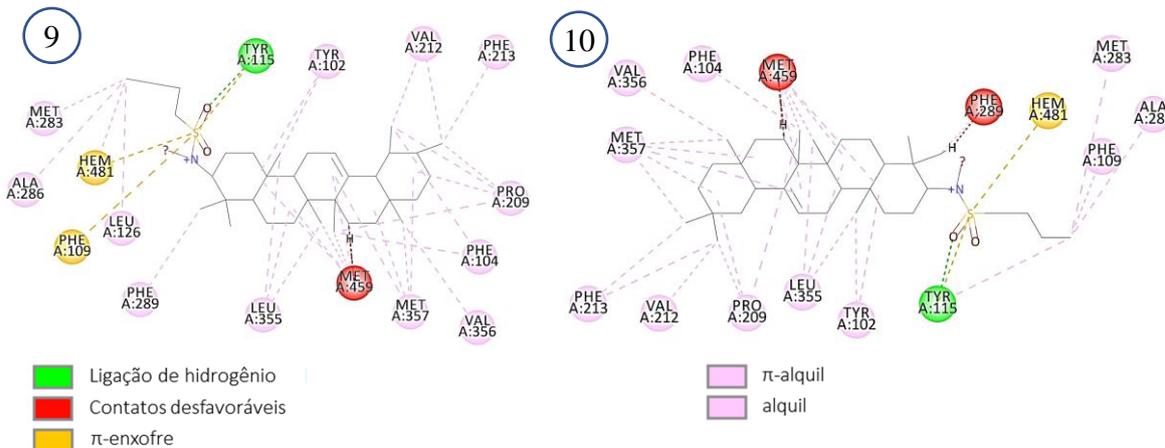
Os derivados 5 e 61 realizaram uma ligação de hidrogênio em Tyr 115, interações  $\pi$ -enxofre em Phe 109, Tyr 115 e com o grupo heme tiveram valor de energia de ligação de -8,7928 e -8,3782 kcal/mol, respectivamente. Os derivados mencionados apresentam um grupo etil como cadeia lateral e são ilustrados na **Figura 30**.

**Figura 30** - Interação dos derivados 5 e 6 no sítio ativo da enzima CYP51



Os derivados 9 e 10 realizaram uma ligação de hidrogênio em Tyr 115, interações  $\pi$ -enxofre em Tyr 115 e com o grupo heme, e o derivado 9 também realizou este tipo de interação em Phe 109. As energias de ligação dos derivados 9 e 10 foram -7,6956 e -8,2781 kcal/mol, respectivamente. Essas moléculas apresentam um grupo butil como cadeia lateral e são ilustrados na **Figura 31**.

**Figura 31** - Interação dos derivados 9 e 10 no sítio ativo da enzima CYP51

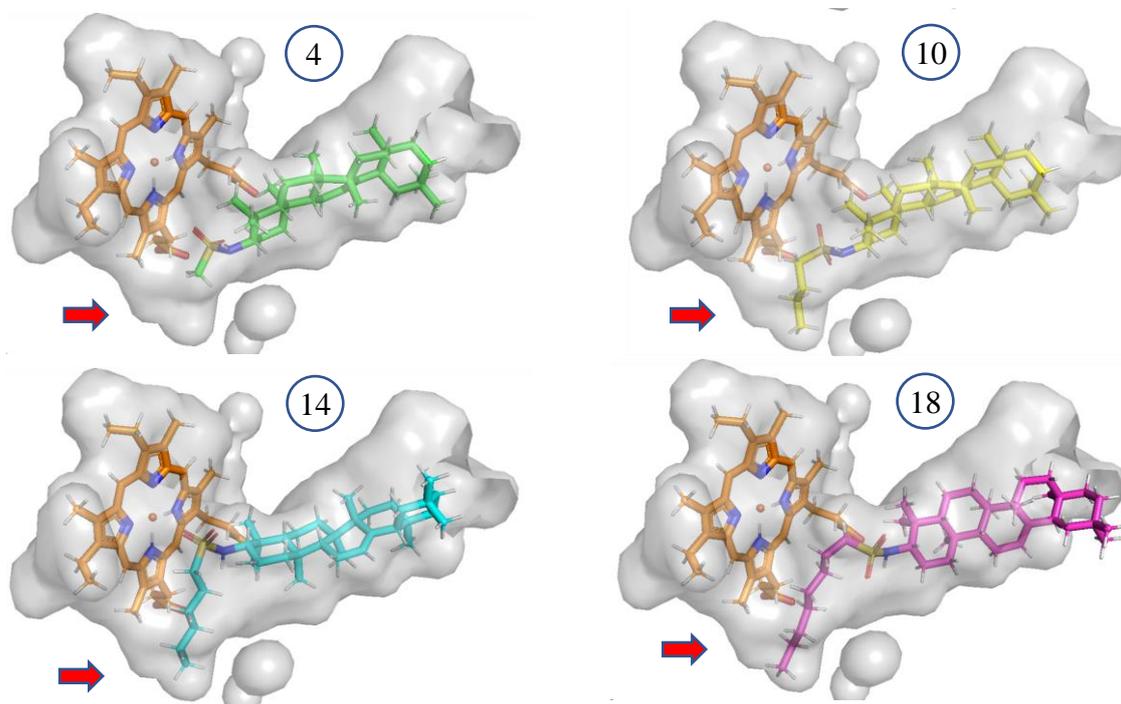


Na série de derivados alquílicos percebe-se que o número de carbonos afeta a interação com o sítio catalítico da enzima e sua afinidade de ligação. Os derivados

selecionados como melhores apresentam um (metil), dois (etil) e quatro (butil) carbonos na cadeia lateral. Com o aumento da cadeia, percebe-se que as moléculas tendem a reduzir as interações. Em termos de farmacodinâmica, conforme o comprimento da cadeia aumenta, a molécula pode se encaixar em um bolso de ligações hidrofóbicas com interações crescentes até que o tamanho do substituinte exceda o tamanho do bolso de ligação (SILVERMAN, 2014).

Na **Figura 32** são demonstrados os derivados 4, 10, 14 e 18, todos beta isômeros. Nota-se que existe um bolso (seta em vermelho) no sítio catalítico da enzima e a cadeia lateral dos derivados consegue preencher essa cavidade à medida que a cadeia se alonga. No entanto, no derivado 14 (cadeia hexil) ocorre uma redução da energia de ligação (-5,5803 kcal/mol), provavelmente pelo ajuste na cavidade estar sendo prejudicado. Já no derivado 18 de cadeia mais longa (octil), a energia de ligação aumenta (-9,6573), porém ao custo de que o grupo funcional sulfonamida fica distante do grupo heme, impossibilitando as interações com o mesmo.

**Figura 32** - Comparação entre os derivados 4, 10, 14 e 18 da série de sulfonamidas



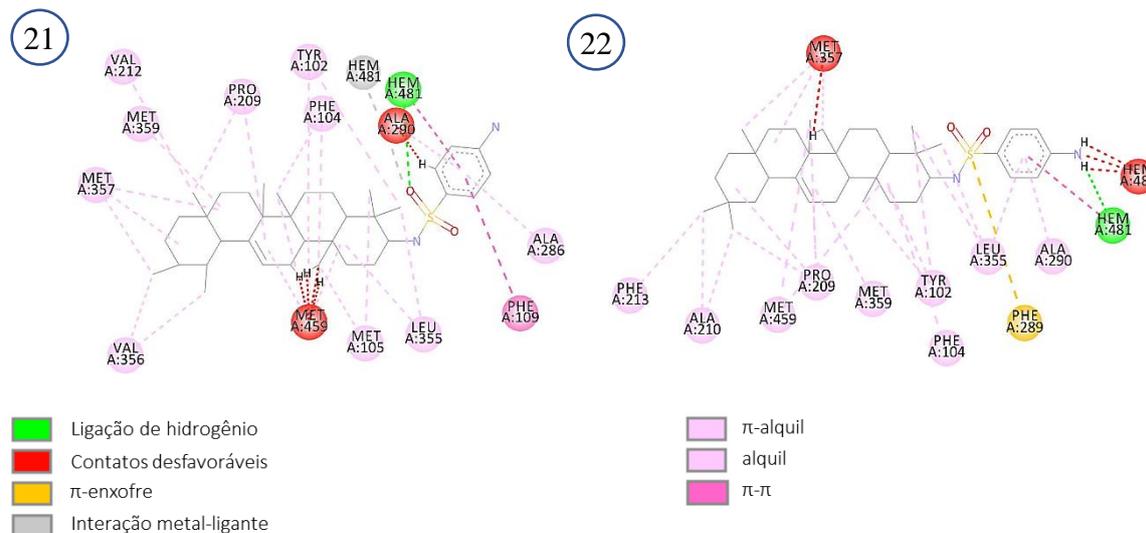
O grupo heme está em laranja, as setas vermelhas destacam o bolso lateral.

No **APÊNDICE C** são apresentados os resultados dos dockings da série de derivados sulfonamida com grupos aril substituídos, que foram bastante variados. Para

facilitar a seleção das moléculas, foi observado primeiramente a presença de interação metal-ligante com o grupo heme, em seguida foi confirmado se a energia de ligação dos complexos era superior ou semelhante ao controle positivo fluconazol. Em seguida, foi verificado o número de ligações de hidrogênio e interações adicionais. Na escolha de um derivado, também foi observado conjuntamente o seu isômero equivalente, para verificar se o mesmo cumpria também os requisitos de interação e energia de ligação.

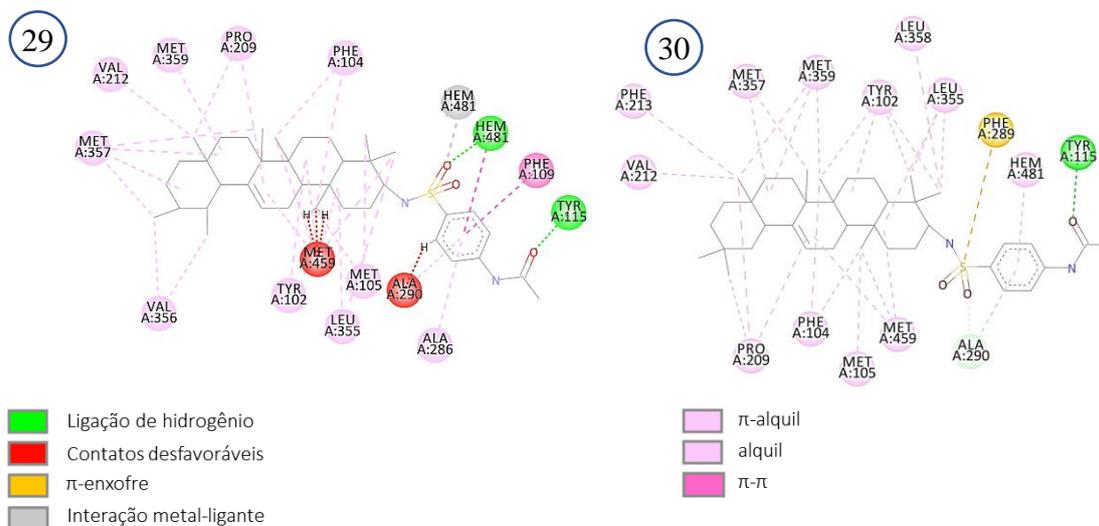
O derivado 21 realizou interação metal-ligante, duas interações de hidrogênio e uma interação  $\pi$ - $\pi$  com o grupo heme, além de uma interação  $\pi$ - $\pi$  em Phe 109. Este derivado teve energia de ligação de -6,5975 kcal/mol. O seu isômero beta, derivado 22, não realizou interação metálica, no entanto apresentou ligação de hidrogênio com o grupo heme, interação  $\pi$ -enxofre em Phe 289 e  $\pi$ - $\pi$  com o grupo heme e energia de ligação de -8,8415 kcal/mol. Esses derivados são sulfonamidas arílicas orto-substituídas com o grupo -NH<sub>2</sub> (**Figura 33**).

**Figura 33** - Interação dos derivados 21 e 22 no sítio ativo da enzima CYP51



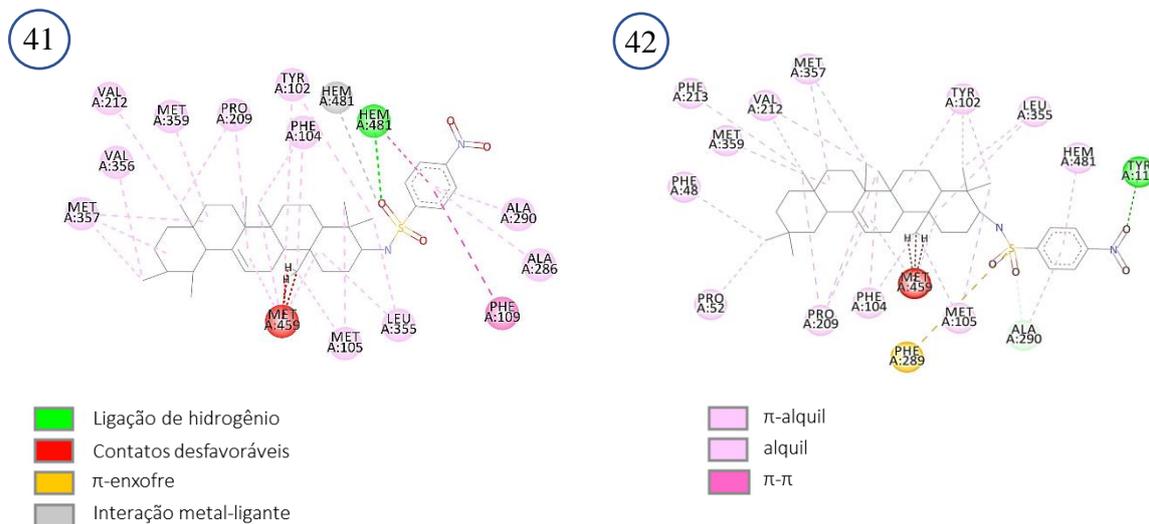
O derivado 29 realizou interação metal-ligante, duas interações de hidrogênio e uma interação  $\pi$ - $\pi$  com o grupo heme, além de interação de hidrogênio em Tyr 115 e  $\pi$ - $\pi$  em Phe 109. Este derivado teve energia de ligação de -6,5667 kcal/mol. O seu isômero beta, derivado 30, não realizou interação metal-ligante, no entanto apresentou ligação de hidrogênio em Tyr 115, interação  $\pi$ -enxofre em Phe 289 e energia de ligação de -9,7141 kcal/mol. Esses derivados são sulfonamidas arílicas orto-substituídas com o grupo -NHCOCH<sub>3</sub> (**Figura 34**).

**Figura 34** - Interação dos derivados 29 e 30 no sítio ativo da enzima CYP51



O derivado 41 realizou interação metal-ligante, duas interações de hidrogênio e uma interação  $\pi$ - $\pi$  com o grupo heme, além de interação  $\pi$ - $\pi$  em Phe 109. Este derivado teve energia de ligação de -6,7374 kcal/mol. O seu isômero beta, derivado 42, não realizou interação metal-ligante, no entanto apresentou ligação de hidrogênio em Tyr 115, interação  $\pi$ -enxofre em Phe 289 e energia de ligação de -10,2193 kcal/mol. Esses derivados são sulfonamidas arílicas orto-substituídas com o grupo -NO<sub>2</sub> (**Figura 35**).

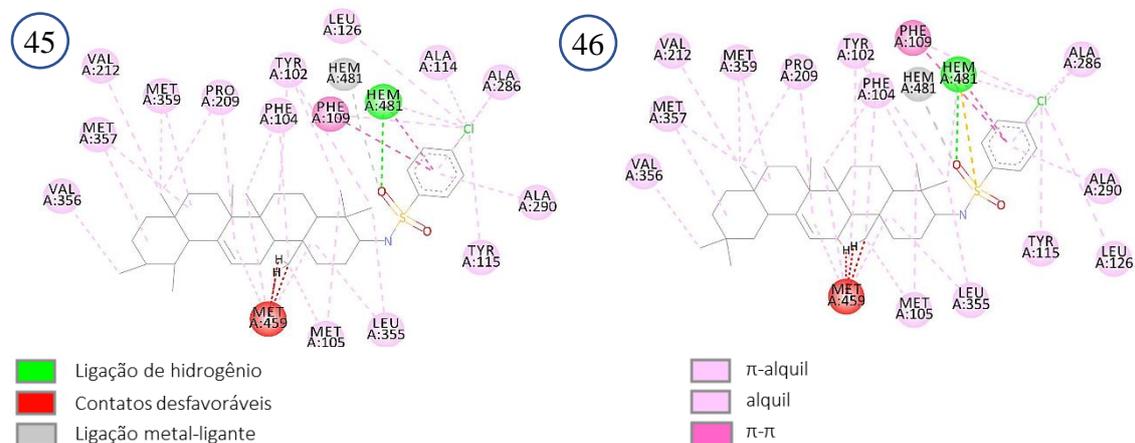
**Figura 35** - Interação dos derivados 41 e 42 no sítio ativo da enzima



O derivado 45 realizou metal-ligante, duas ligações de hidrogênio e interação  $\pi$ - $\pi$  com o grupo heme, interação  $\pi$ - $\pi$  em Phe 109. A sua energia de ligação foi de -7,552 kcal/mol. O isômero beta, derivado 46, realizou interação metal-ligante, duas interações de hidrogênio, interação  $\pi$ - $\pi$  e interação  $\pi$ -enxofre com o grupo heme, além de interação

$\pi$ - $\pi$  em Phe 109. Este derivado teve energia de ligação de -7,0014 kcal/mol. Esses derivados são sulfonamidas arílicas orto-substituídas com o átomo de -Cl (**Figura 36**).

**Figura 36** - Interação dos derivados 45 e 46 no sítio ativo da enzima CYP51

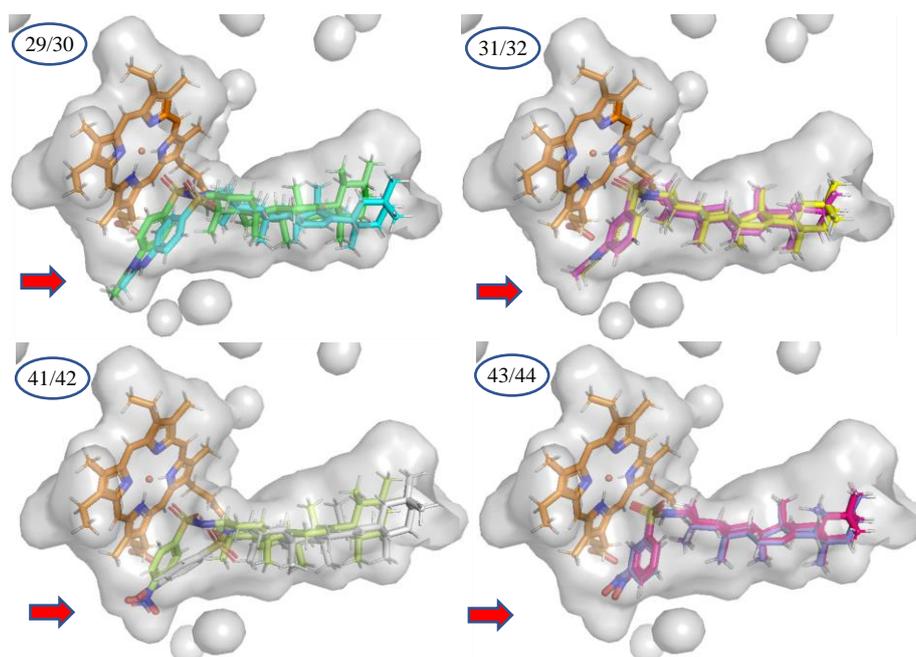


Na série de derivados arílicos percebeu-se que todos os selecionados apresentam um grupo orientado na posição orto em relação ao anel aromático. Além disso, são grupos classificados como pouco hidrofóbicos segundo o diagrama de Craig, sendo que os derivados 21/22 e 29/30 possuem grupos doadores de elétrons e os derivados 41/42 e 45/46 possuem grupos retiradores de elétrons.

Ao se comparar o par de derivados para-substituídos (29/30 e 41/42) em relação aos derivados meta-substituídos (31/32 e 43/44), observa-se que a diferença de posição do substituinte afetou em poucos graus a orientação do grupo funcional sulfonamida (exceto em 42), e o anel aromático substituído em todos os casos ficou acomodado no bolso lateral ao grupo heme. Em geral, os resultados foram bastante diversos em relação às ligações químicas, e isso a princípio dificultou a seleção (**Figura 37**).

De fato, a principal diferença entre os derivados orto-substituídos para os meta-substituídos é a energia de ligação dos complexos, que pode ser devido ao maior número de colisões desfavoráveis que ocorrem nessas moléculas (ver **APÊNDICE C**). As colisões ou contatos desfavoráveis prejudicam a estabilidade do complexo uma vez que esses tipos de ligações indicam uma força de repulsão entre duas moléculas e um átomo (DHORAJIWALA; HALDER; SAMANT, 2019).

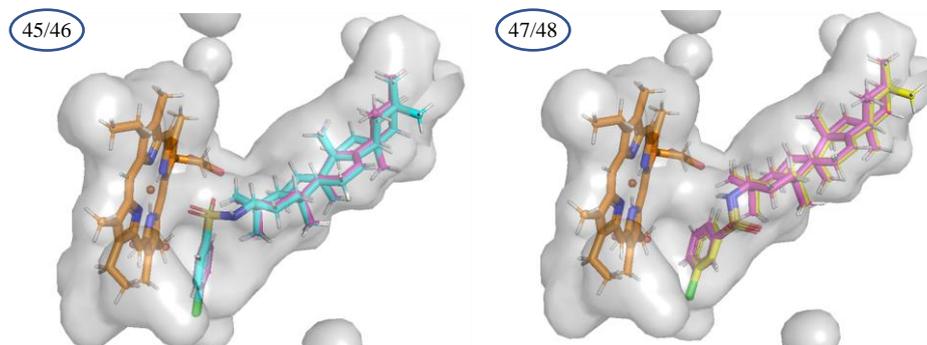
**Figura 37** - Comparação entre os derivados 29/30 versus 31/32 e derivados 41/42 e 43/44



O grupo heme está em laranja, as setas vermelhas destacam o bolso lateral. os isômeros alfa e beta estão sobrepostos.

Já nos derivados 45 e 46 a diferença da posição do substituinte -Cl parece afetar a orientação do grupo sulfonamida e, conseqüentemente, as interações químicas (**Figura 38**). Em contrapartida, os derivados meta-substituídos 47 e 48 possuem energia de ligação superior (-9,4624 e -9,7160 kcal/mol). Mesmo assim, os derivados 45 e 46 apresentam energia de ligação superior ao fluconazol, juntamente com um conjunto de interações importantes, e por isso foram escolhidos.

**Figura 38** - Comparação entre os derivados 45/46 versus 47/48 da série de sulfonamidas



O grupo heme está em laranja, os isômeros alfa e beta estão sobrepostos.

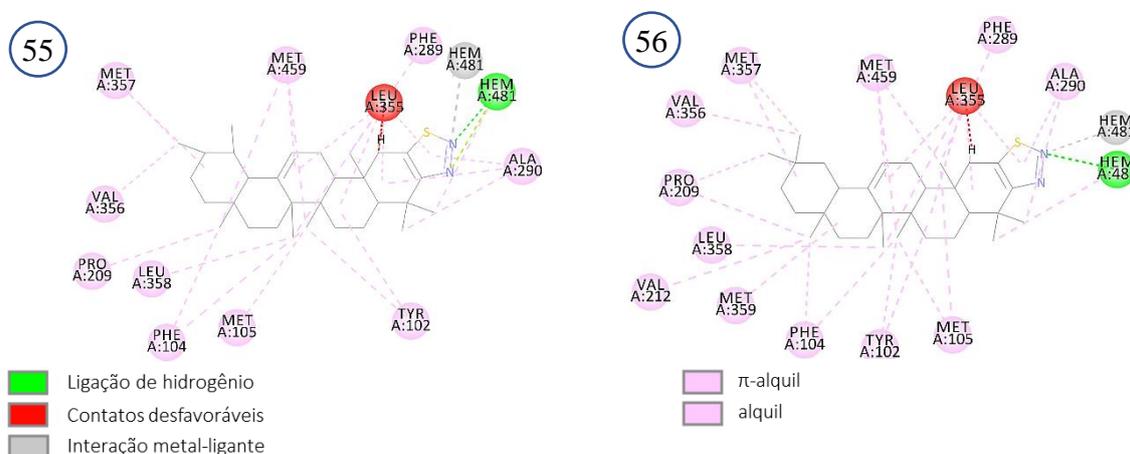
A princípio, somente os derivados 29/30, 41/42 e 45/46 da série de sulfonamidas arílicas foram selecionados. Entretanto, ao realizar a síntese para obtenção das moléculas

41 e 42 que possuem um grupo  $-NO_2$ , onde pela redução deste grupo pode-se obter os derivados 21 e 22. Esses derivados são substituídos com o grupo  $-NH_2$  e também obtiveram um resultado bom em relação as interações e energia de ligação como foi exposto anteriormente. Porém, ressalta-se que os derivados meta-substituídos com esse mesmo grupo  $-NH_2$  (23 e 24) tiveram resultado superior no docking, e somente por facilidade de síntese os derivados 21 e 22 foram incluídos.

No **APÊNDICE D** são apresentados os resultados dos dockings da série de derivados heterocíclicos. Nesse conjunto, os resultados também foram bastante variados. Foram observados primeiramente a presença da ligação metal-ligante com o grupo heme, em seguida foi confirmado se a energia de ligação dos complexos era superior ou semelhante ao fluconazol. No entanto a maioria das moléculas não realizou interação metálica, então foram verificadas as ligações de hidrogênio diretamente com o grupo heme, além das interações adicionais e juntamente com a energia de ligação. Novamente, os isômeros foram observados em conjunto no sentido de verificar se ambos cumprem os requisitos de interação e energia de ligação e se valem a pena serem sintetizados.

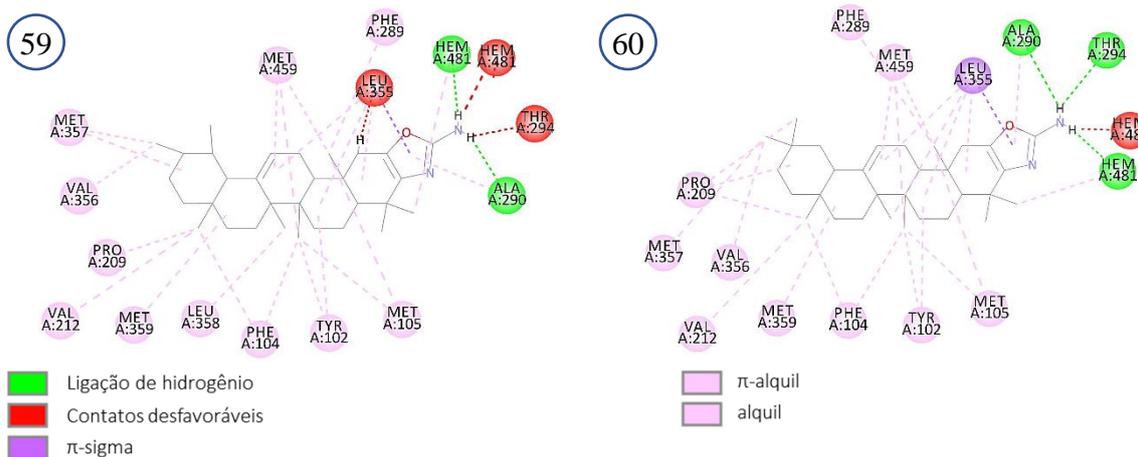
O derivado 55 realizou interação metal-ligante e interação de hidrogênio com o grupo heme. Este derivado teve energia de ligação de  $-4,1160$  kcal/mol, energia inferior do controle fluconazol. No entanto, o seu isômero beta, derivado 56, realizou interação metal-ligante e duas ligações de hidrogênio com o grupo heme e energia de ligação de  $-8,8988$  kcal/mol. Como o derivado 56 foi o único que realizou interação metal-ligante, essa mistura foi selecionada para síntese. Esses derivados possuem um anel tiadiazol como heterociclo (**Figura 39**).

**Figura 39** - Interação dos derivados 55 e 56 no sítio ativo da enzima CYP51



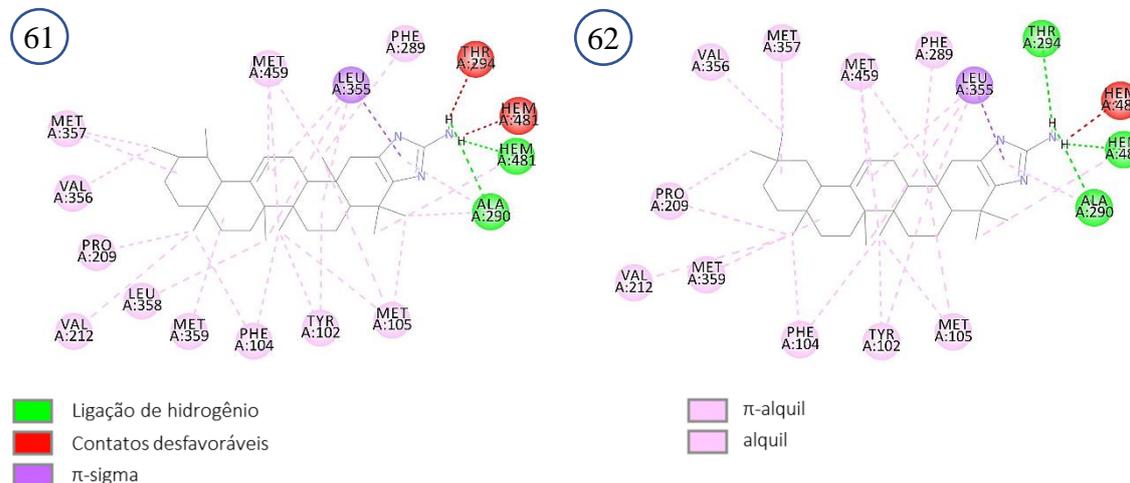
O derivado 59 realizou ligação de hidrogênio com o grupo heme e em Ala 290, interação  $\pi$ -sigma em Ala 355 e obteve energia de ligação de -7,8579 kcal/mol. O isômero beta, derivado 60, realizou ligação de hidrogênio com o grupo heme, Ala 290 e em Thr 294, interação  $\pi$ -sigma em Leu 355 e teve energia de ligação de -9,4338 kcal/mol. Esses derivados possuem um anel amino-oxazol como heterociclo (**Figura 40**).

**Figura 40** - Interação dos derivados 59 e 60 no sítio ativo da enzima CYP51



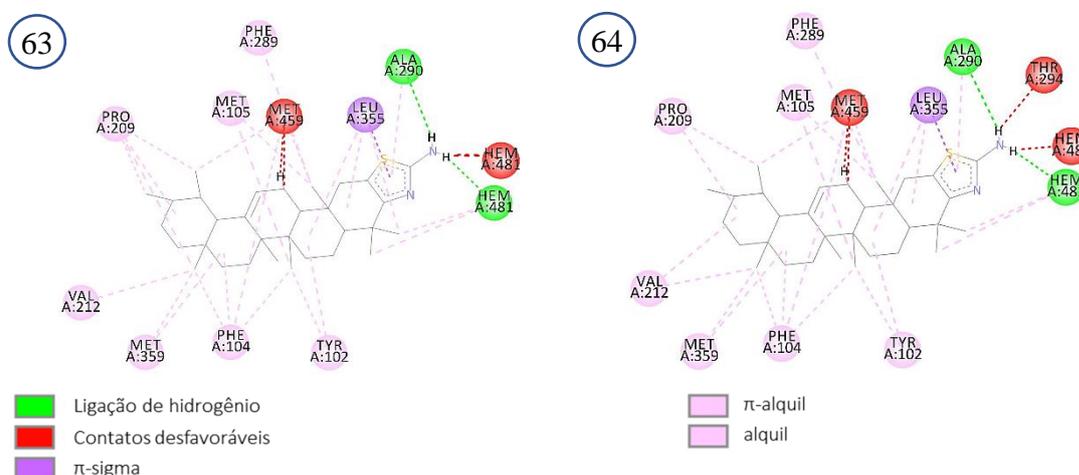
O derivado 61 realizou ligação de hidrogênio com o grupo heme em Ala 290, interação  $\pi$ -sigma em Leu 355 e obteve energia de ligação de -7,3531 kcal/mol. O isômero beta, derivado 62, realizou ligação de hidrogênio no grupo heme, Ala 290 e em Thr 294, interação  $\pi$ -sigma em Leu 355 e obteve energia de ligação de -8,9893 kcal/mol. Esses derivados possuem um anel amino-imidazol como heterociclo (**Figura 41**).

**Figura 41** - Interação dos derivados 61 e 62 no sítio ativo da enzima CYP51



Além dessas moléculas, foram adicionados tardiamente os derivados 63 e 64. O derivado 63 realizou ligação de hidrogênio com o grupo heme e em Ala 290, interação  $\pi$ -sigma em Leu 355 e apresentou energia de ligação de -6,0093 kcal/mol. O derivado 64 apresentou as mesmas interações, porém com energia de ligação de -5,9318 kcal/mol. Essas moléculas não tiveram os melhores resultados em relação a energia de ligação se comparadas às demais, no entanto, devido aos problemas com as sínteses que serão detalhados posteriormente, os derivados 63 e 64 foram adicionados ao estudo, visto que o material para obtenção destes estava disponível no laboratório. Esses derivados possuem um anel aminotiazol como heterociclo (**Figura 42**).

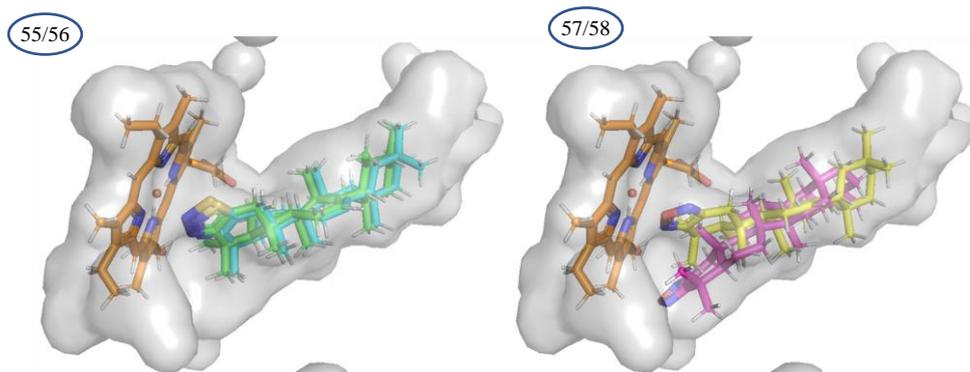
**Figura 42** - Interação dos derivados 63 e 64 no sítio ativo da enzima CYP51



As moléculas que não foram selecionadas (49 – 54) apresentam dois heteroátomos compondo o heterociclo funcional. Os derivados selecionados 55 e 56 diferenciam-se destas por conter três heteroátomos na estrutura (anel tiadiazol) e isso parece contribuir para interação com o grupo heme, especialmente com a interação metal-ligante com o ferro, no qual apenas estes derivados realizaram.

Outra comparação que pode ser feita é em relação aos derivados 57 e 58, também heterociclos com três heteroátomos mas que não foram selecionados pela baixa energia de ligação e interações. Nessas moléculas o anel oxadiazol diferencia-se por um átomo de oxigênio em relação ao anel tiadiazol. Na **Figura 43** pode-se observar que os isômeros 55 e 56 tem a conformação bem próxima quando sobrepostos, que também é em alguns graus semelhante ao derivado 58 (à direita em amarelo).

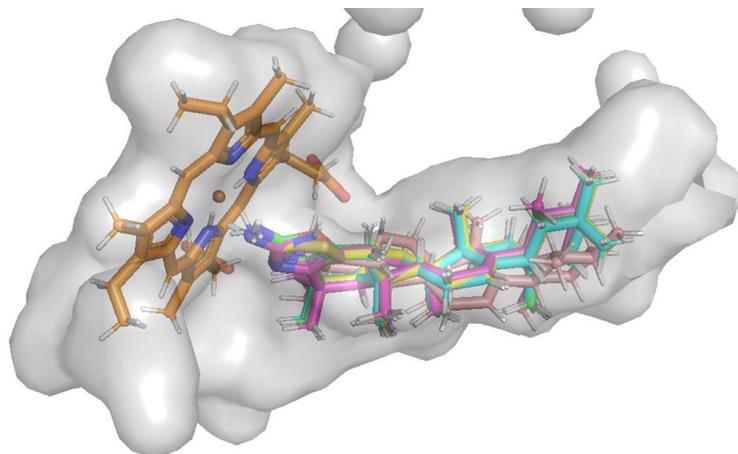
**Figura 43** - Comparação entre os derivados 55/56 versus 57/58 da série de heterociclos



O grupo heme está em laranja, os isômeros alfa e beta estão sobrepostos.

Os derivados 59/60, 61/62 e 63/64 possuem como padrão a presença de um grupo  $-NH_2$  como substituinte lateral no anel heterociclo. Esse substituinte favoreceu de maneira geral a interação desses derivados no sítio catalítico da enzima. Na **Figura 44** é demonstrado que todos os derivados se sobrepõem de maneira muito próxima e isso explica os tipos de interações bastante semelhantes.

**Figura 44** - Comparação entre os derivados 59/60, 61/62 e 63/64 da série de heterociclos



O grupo heme está em laranja, os diferentes derivados estão sobrepostos.

Dessa maneira, foram selecionados seis derivados da série de sulfonamidas alquílicas (3/4, 5/6 e 9/10), oito derivados da série de sulfonamidas arílicas (21/22, 29/30, 41/42 e 45/46) e oito derivados da série de heterociclos (55/56, 59/60, 61/62 e 63/64). Ressalta-se que as análises de docking foram realizadas para os isômeros separados, correspondentes aos esqueletos base de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, porém as sínteses foram feitas com a mistura dos isômeros.

A principal dificuldade durante o screening virtual é estabelecer uma relação correta a fim de serem selecionadas as melhores poses dos ligantes dentro do receptor biológico. A seleção da melhor solução não é uma tarefa trivial e nem sempre a pose com melhor pontuação pela função de pontuação do docking é realmente a melhor opção e por isso é altamente recomendável que critérios estruturais adicionais sejam analisados (RAMÍREZ; CABALLERO, 2018).

Neste trabalho, em alguns momentos a escolha dos “melhores” derivados ou *hits*, a serem incluídos para síntese e avaliação biológica pareceu ser bastante complexa, por isso foram necessários a inclusão de diversos mecanismos (análise por clusterização, observação das interações químicas, energia livre de ligação para previsão de afinidade) afim de se estabelecer uma boa escolha dos *hits*. Contudo, somente com a avaliação biológica é possível fundamentar esses argumentos e verificar se as ferramentas utilizadas para escolha das moléculas foram eficazes.

## 5.2 Semissíntese dos derivados triterpênicos

Foram utilizados os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, extraídos da resina de *Protium* sp., como material de partida para a síntese de todos os derivados. Foi utilizado 20 gramas de resina no processo de extração direta, obtendo-se 5,81 g (29%) de rendimento após purificação do material. Esse resultado corrobora com Neto (2018) e Ferreira et al (2020), os quais também utilizaram mesmo método de extração. Para comparação com os espectros das moléculas posteriores foi utilizado uma amostra padrão da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas de *Byrsonima* sp. disponível no laboratório FITOPHAR.

No espectro de APCI-MS de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, ocorreu um íon aduto  $m/z$  427 [M+H], valor consistente com a fórmula  $C_{30}H_{50}O$  [M+H]<sup>+</sup> referente aos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas protonados. Com a perda de 18 unidades, aparece o íon principal de  $m/z$  409 [M+H] referente a perda de água [M+H – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (APÊNDICE E). Esse íon principal ocorre devido a fonte APCI utilizar temperaturas elevadas, onde ocorre fragmentação na fonte, favorecendo a perda de água que corresponde a presença da hidroxila em C-3 nessas moléculas (RHOORRI-FRIH et al., 2009).

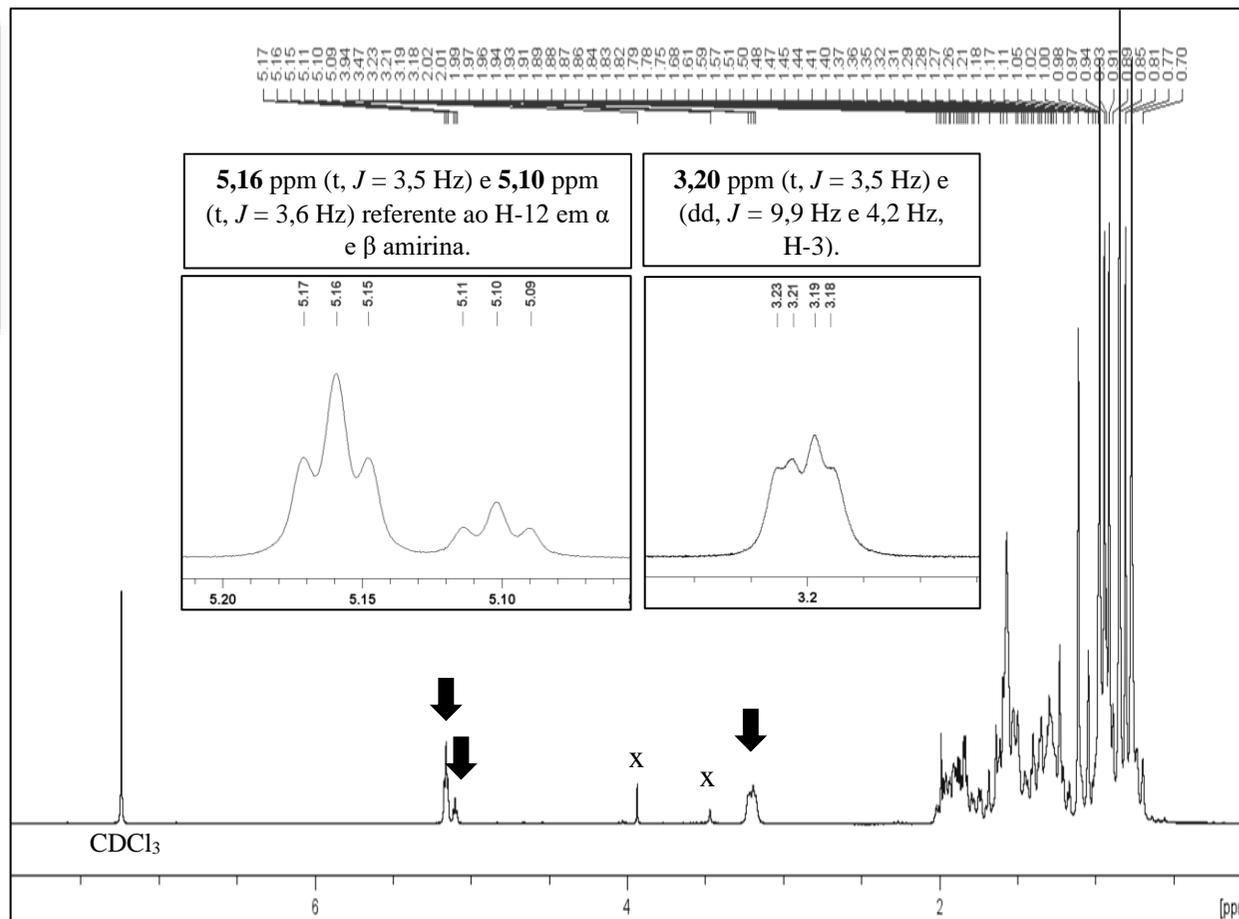
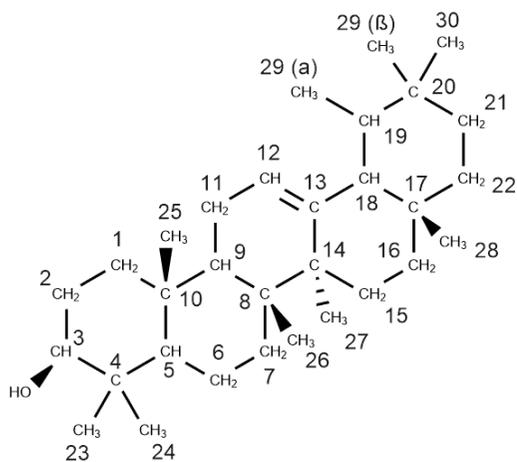
No espectro de RMN <sup>1</sup>H de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, observa-se uma ampla faixa de deslocamento químico (0,7 – 2,02 ppm), característico do esqueleto triterpênico (Figura 45). Distingue-se um tripleto em 5,16 ppm (t,  $J = 3,5$  Hz) e 5,10 ppm (t,  $J = 3,6$  Hz) correspondentes ao H-12 vinílico em  $\alpha$  e  $\beta$  amirina, respectivamente. Ocorre também um

duplo dubleto em 3,20 ppm (dd,  $J = 9,9$  Hz e 4,2 Hz) consonante com o H-3 carbinólico, evidenciando a hidroxila ligada no mesmo carbono. Esses deslocamentos corroboram com a literatura consultada (DEMELO et al., 2019; FERREIRA et al., 2020; VÀZQUEZ; PALAZON; NAVARRO-OCAÑA, 2012).

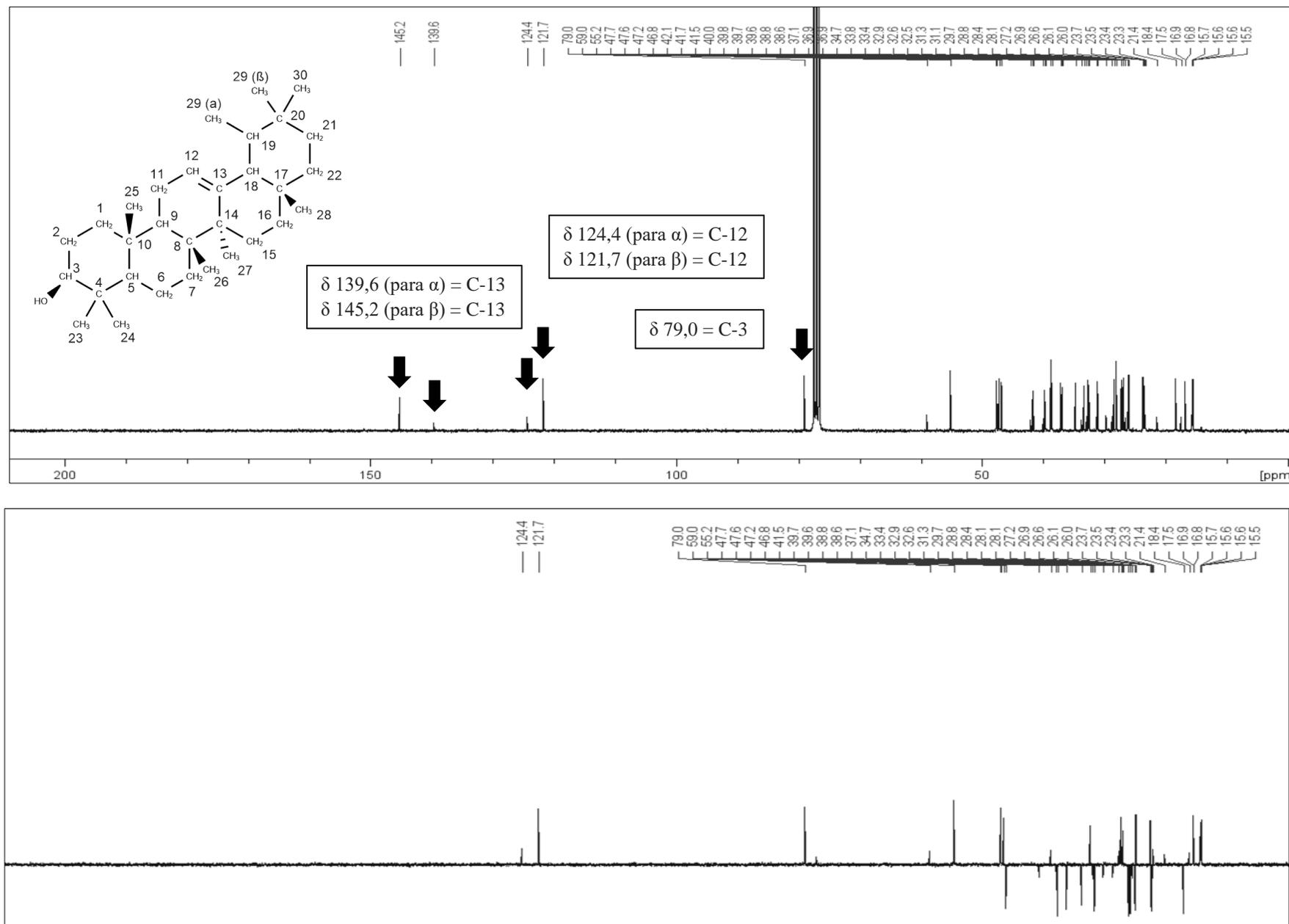
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas aparecem 53 sinais de deslocamento químico ( $\delta$ ). Cada isômero de amirina possui 30 carbonos então seria esperado pelo menos 60 sinais do  $\alpha$  e  $\beta$  isômero, no entanto alguns se sobrepõe e um mesmo sinal acaba sendo referenciado ao mesmo carbono. Todos os 53 sinais encontrados foram correlacionados e tabelados para cada carbono (**Tabela 2**). Consolidando o que foi observado no RMN  $^1\text{H}$ , ocorrem os sinais em  $\delta$  139,6 (para  $\alpha$ ) e  $\delta$  145,2 (para  $\beta$ ) referentes ao C-13 e  $\delta$  124,4 (para  $\alpha$ ) e  $\delta$  121,7 (para  $\beta$ ) referentes ao C-12, ambos carbonos vinílicos. Além disso, aparece um sinal em  $\delta$  79,0 referente ao C-3 carbinólico (**Figura 46**). Essas observações estão de acordo com a literatura.

**Figura 45** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas (5,2 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz) com ampliações

( $\delta = \text{ppm}$ )  $\delta$ : 5,16 (t,  $J = 3,5$  Hz, H-12 de  $\beta$ -amirina); 5,10 (t,  $J = 3,6$  Hz, H-12 de  $\alpha$ -amirina); 3,20 (dd,  $J = 9,9$  Hz e 4,2 Hz, H-3); 1,75 - 2,02 (m,  $-\text{CH}-\text{CH}=\text{}$ , H-11 e H-18); 1,41 - 1,68 (m,  $-\text{CH}-$ , 2H de  $\beta$ -amirina, 4H de  $\alpha$ -amirina), 1,17 - 1,40 (m,  $-\text{CH}_2-$ , 18H de  $\beta$ -amirina, 17H de  $\alpha$ -amirina); 0,7 - 1,11 (m,  $-\text{CH}_3$ , 24H de  $\beta$ -amirina, 23H de  $\alpha$ -amirina).



X = Impurezas presentes no solvente  $\text{CDCl}_3$

**Figura 46** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas (5,2 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)

**Tabela 2** - Deslocamentos do RMN  $^{13}\text{C}$  de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas em comparação com os sinais encontrados na literatura

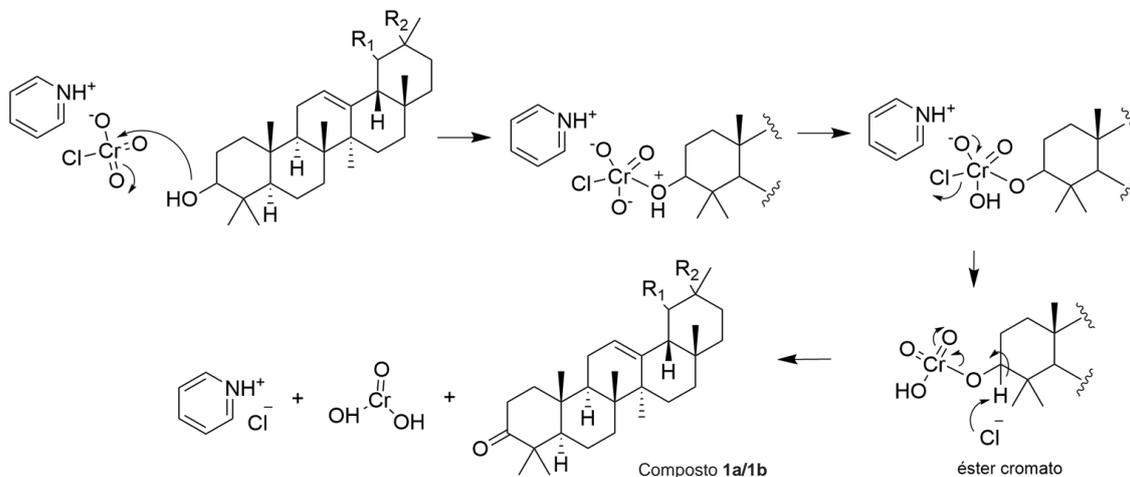
Amostra $\alpha$ e $\beta$ amirinas			Vázquez et al (2012)		
C	$\alpha$	$\beta$	C	$\alpha$	$\beta$
1	38,8	38,6	1	38,7	38,7
2	27,2	27,2	2	28,7	27,2
3	79,0	79,0	3	79,6	79,3
4	39,7	39,7	4	38,7	38,5
5	55,2	55,2	5	55,1	55,1
6	18,4	18,4	6	18,4	18,6
7	32,9	32,6	7	32,2	32,4
8	40,0	40,0	8	40,7	39,8
9	47,7	47,6	9	47,7	47,6
10	36,9	36,9	10	36,6	36,9
11	23,4	23,5	11	23,3	23,6
12	124,4	121,7	12	124,4	121,7
13	139,6	145,2	13	139,5	145,2
14	42,2	41,7	14	42,0	41,7
15	29,7	26,1	15	27,2	26,2
16	26,6	26,9	16	26,6	26,1
17	33,8	32,5	17	33,7	32,6
18	59,0	47,2	18	59,0	47,2
19	39,6	46,8	19	39,6	46,8
20	39,6	31,1	20	39,6	31,0
21	31,3	34,7	21	31,2	34,7
22	41,5	37,1	22	41,5	37,1
23	28,1	28,4	23	28,1	28,0
24	15,6	15,5	24	15,6	15,4
25	15,7	15,6	25	15,6	15,4
26	16,9	16,8	26	16,8	16,8
27	23,7	26,0	27	23,2	25,9
28	28,1	28,8	28	28,1	28,4
29	17,5	33,4	29	17,4	33,8
30	21,4	23,3	30	21,4	23,7

### 5.3 Síntese do intermediário 3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (1a/1b)

O composto **1a/1b** foi sintetizado como intermediário para obtenção de ambas as séries de derivados (sulfonamidas e heterociclos). Nessa reação foi utilizado o reagente clorocromato de piridínio (PCC) para oxidação da hidroxila em C-3 dos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, afim de se obter a cetona correspondente. Esta reação inicia com a coordenação da hidroxila ao átomo de cromo (VI) do reagente PCC, formando a ligação Cr-O. Em segundo lugar, o próton da hidroxila é transferido para um dos oxigênios ligados ao cromo, possivelmente por um intermediário do sal piridínio. O íon cloreto é então deslocado e é formado a espécie éster cromato. A carbonila é formada quando uma base

(representada por  $\text{Cl}^-$ ) remove o próton do carbono adjacente ao oxigênio, resultando na oxidação a cetona e redução do Cr (VI) a Cr (IV) (ASHENHURST, 2020) (**Figura 47**).

**Figura 47** - Mecanismo de reação para formação do composto **1a/1b**



Utilizando 5,81 g de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina obteve-se 5,46 g (95% de rendimento) do composto **1a/1b** que se apresentou inicialmente como uma massa incolor que após secagem torna-se um sólido branco e amorfo, com  $R_f$  0,43 (Hex:AcOEt 95:5) e massa molar esperada de 424,39 ( $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ ). Na análise do espectro de APCI-MS modo positivo, observa-se um íon aduto de  $m/z$  425  $[\text{M}+\text{H}]$ , valor consistente com a fórmula  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  referente ao composto protonado e o íon de  $m/z$  407  $[\text{M}+\text{H}]$  referente a perda de água  $[\text{M}+\text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$  (**APÊNDICE E**).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  de composto **1a/1b**, observa-se os sinais característicos do esqueleto ursano e oleanano, semelhantes aos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas em 5,18 ppm (t,  $J = 3,4$  Hz, H-12 para  $\beta$ -amirina), 5,13 ppm (t,  $J = 3,5$  Hz, H-12 para  $\alpha$ -amirina) e 0,8 - 2,02 ppm (m). Nota-se o desaparecimento do sinal em 3,20 ppm atribuído ao H-3 e a ocorrência dos novos sinais em 2,52 ppm (ddd,  $J = 15,93$  Hz; 10,90 Hz; 7,26 Hz) e 2,35 ppm (m) atribuídos aos hidrogênios H-2 de posição axial ( $\text{H}_a$ ) e equatorial ( $\text{H}_b$ ), que sofrem efeito de desblindagem conferido pela carbonila em C-3 (**Figura 48**).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , foram detectados 56 sinais, indicando a presença dos dois isômeros triterpênicos, os quais foram tabelados de acordo com a literatura (BANKEU et al., 2019; TRIGUEIRO et al., 2020) e em comparação com a amostra padrão de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas (**Tabela 3**). Na análise do espectro, observa-se um sinal em  $\delta$  218,0, que não aparece no espectro DEPT 135 visto se tratar de um carbono quaternário, o qual foi atribuído ao C-3 carbonílico (**Figura 49**). Essa observação juntamente com a

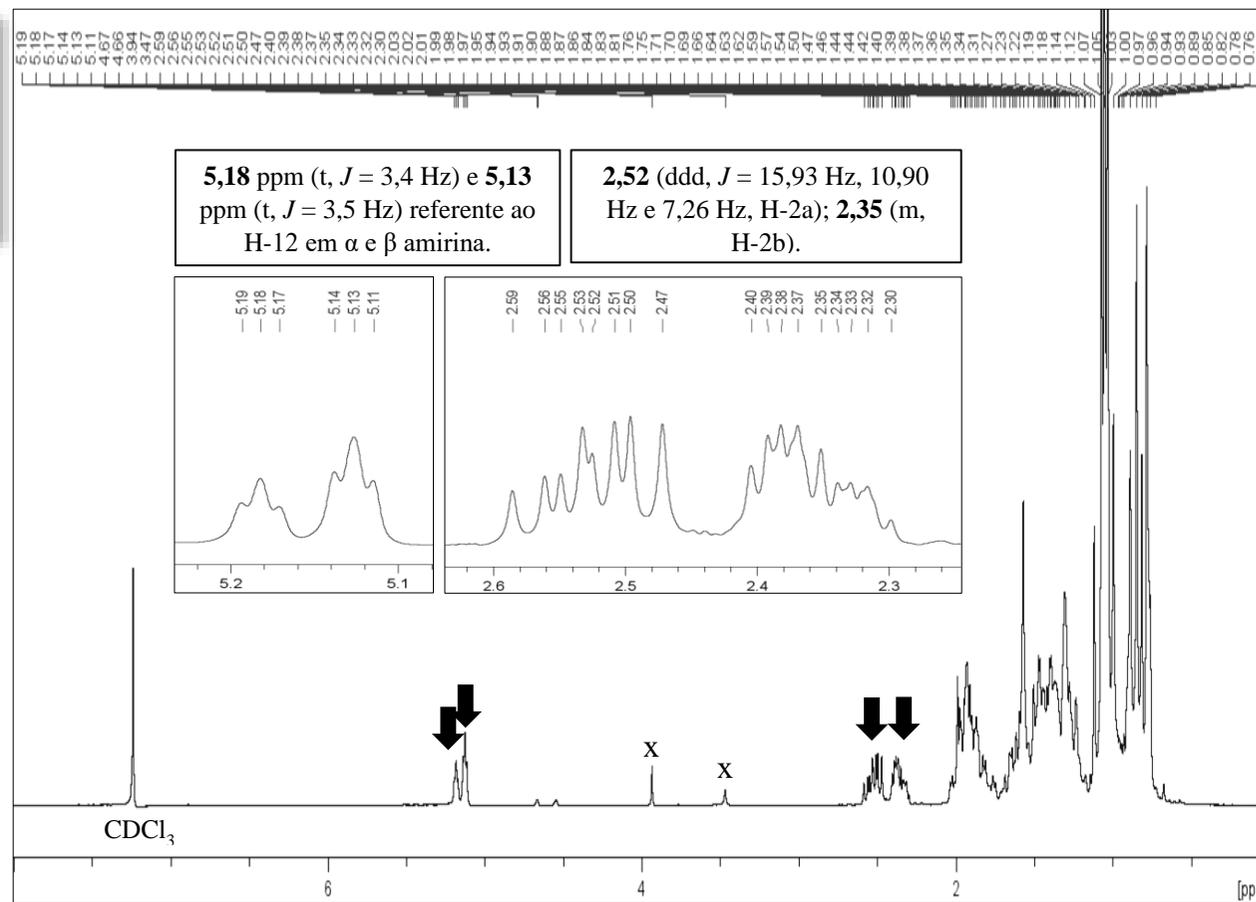
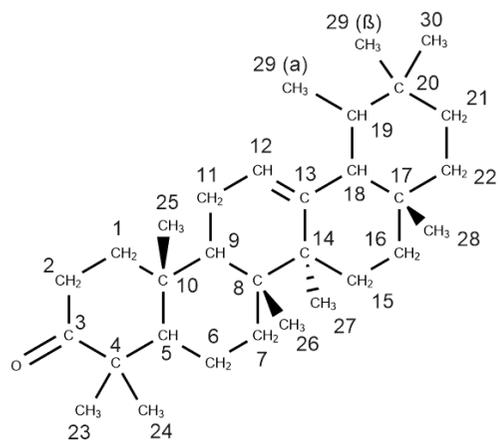
ausência do sinal em  $\delta$  79,0 e as análises anteriores do RMN  $^1\text{H}$ , confirmam a reação de oxidação em C-3.

**Tabela 3** - Deslocamentos do RMN  $^{13}\text{C}$  de 3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 1a/1b) em comparação com os sinais de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas

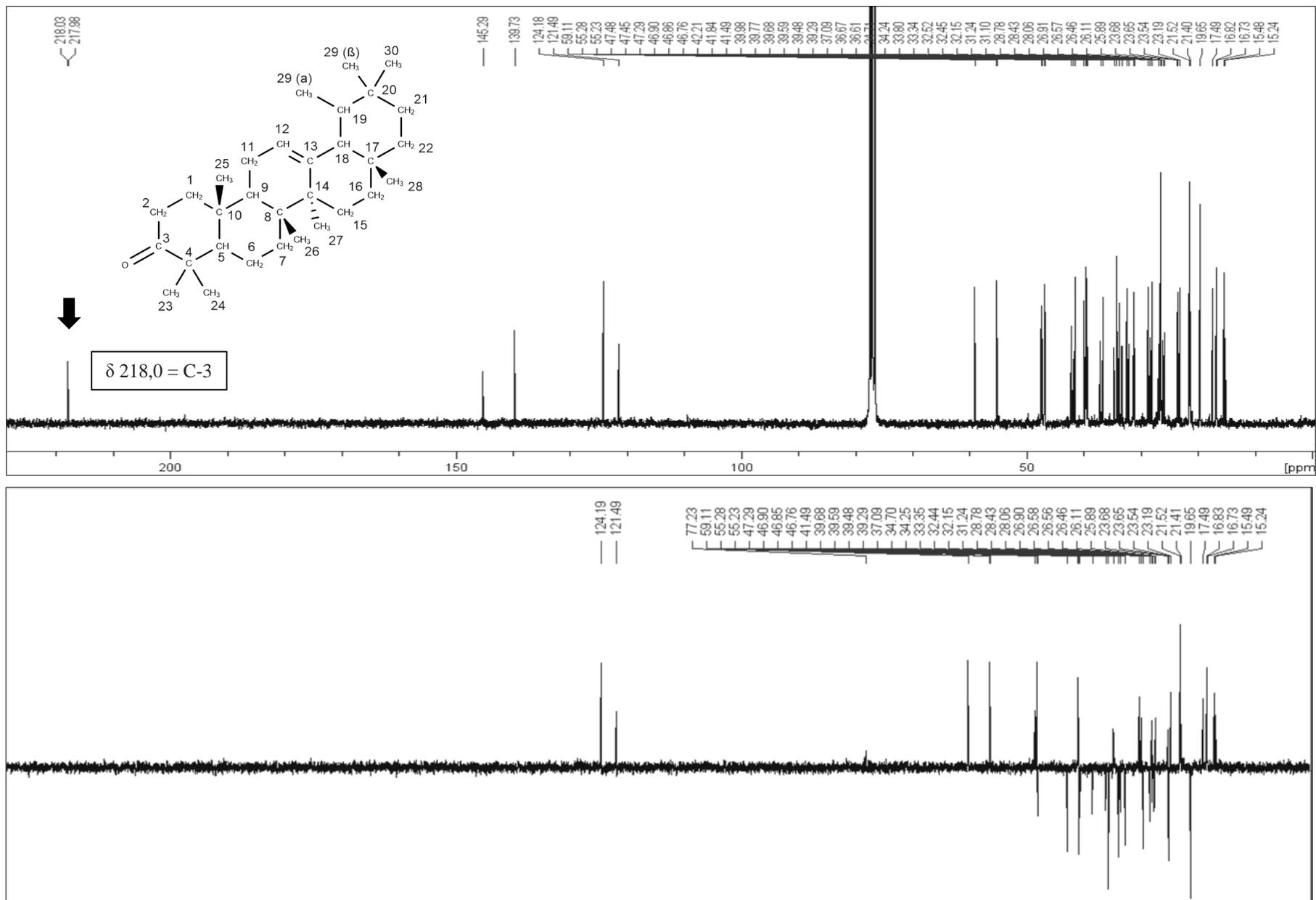
Amostra $\alpha$ e $\beta$ amirinas			Composto 1a/1b		
C	$\alpha$	$\beta$	C	$\alpha$	B
<b>1</b>	38,8	38,6	<b>1</b>	39,5	39,3
<b>2</b>	27,2	27,2	<b>2</b>	34,24	34,2
<b>3</b>	79,0	79,0	<b>3</b>	218,0	218,0
<b>4</b>	39,7	39,7	<b>4</b>	47,5	47,5
<b>5</b>	55,2	55,2	<b>5</b>	55,2	55,3
<b>6</b>	18,4	18,4	<b>6</b>	19,6	19,6
<b>7</b>	32,9	32,6	<b>7</b>	32,4	32,2
<b>8</b>	40,0	40,0	<b>8</b>	39,8	40,00
<b>9</b>	47,7	47,6	<b>9</b>	46,9	46,9
<b>10</b>	36,9	36,9	<b>10</b>	36,7	36,6
<b>11</b>	23,4	23,5	<b>11</b>	23,5	23,6
<b>12</b>	124,4	121,7	<b>12</b>	124,2	121,5
<b>13</b>	139,6	145,2	<b>13</b>	139,7	145,3
<b>14</b>	42,2	41,7	<b>14</b>	42,2	41,8
<b>15</b>	29,7	26,1	<b>15</b>	28,1	26,1
<b>16</b>	26,6	26,9	<b>16</b>	26,9	26,9
<b>17</b>	33,8	32,5	<b>17</b>	33,8	32,5
<b>18</b>	59,0	47,2	<b>18</b>	59,1	47,3
<b>19</b>	39,6	46,8	<b>19</b>	39,7	46,8
<b>20</b>	39,6	31,1	<b>20</b>	39,6	31,1
<b>21</b>	31,3	34,7	<b>21</b>	31,2	34,7
<b>22</b>	41,5	37,1	<b>22</b>	41,5	37,1
<b>23</b>	28,1	28,4	<b>23</b>	28,4	26,5
<b>24</b>	15,6	15,5	<b>24</b>	25,9	21,5
<b>25</b>	15,7	15,6	<b>25</b>	15,5	15,2
<b>26</b>	16,9	16,8	<b>26</b>	16,8	16,7
<b>27</b>	23,7	26,0	<b>27</b>	26,6	23,7
<b>28</b>	28,1	28,8	<b>28</b>	28,8	28,8
<b>29</b>	17,5	33,4	<b>29</b>	17,5	33,3
<b>30</b>	21,4	23,3	<b>30</b>	21,4	23,2

**Figura 48** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 3-oxo α e β amirina (1a/1b) (5,8 mg; CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz) com ampliações

( $\delta = \text{ppm}$ )  $\delta$ : 5,18 (t,  $J = 3,4$  Hz, H-12 de  $\beta$ -amirina); 5,13 (t,  $J = 3,5$  Hz, H-12 de  $\alpha$ -amirina); 2,52 (ddd,  $J = 15,93$  Hz, 10,90 Hz e 7,26 Hz, H-2a); 2,35 (m, H-2b); 0,7 - 2,02 (m, perfil característico dos esqueletos ursano e oleanano).



**Figura 49** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de 3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 1a/1b) (5,8 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)



#### 5.4 Síntese do intermediário 3-amino $\alpha$ e $\beta$ amirinas (2a/2b)

O composto **2a/2b** trata-se do intermediário amina que é necessário para a síntese da série de sulfonamidas. Inicialmente, foi testada metodologia de conversão do grupo carbonila do composto **1a/1b** em oxima, utilizando hidroxilamina (SAHYOUN; ARRAULT; SCHENEIDER, 2019). O composto obtido então foi submetido a reação de redução da oxima em amina utilizando  $\text{LiAlH}_4$  em THF (KIM; LIVINGHOUSE, 2005) para dessa forma obter-se o composto **2a/2b**, no entanto após várias tentativas a reação não ocorreu. Em vista disso, e somado ao fato de que essa rota sintética possui mais intermediários, essa reação foi abandonada e decidiu-se utilizar a reação de conversão direta da carbonila em C-3 para amina por reação de aminação redutiva.

A reação de aminação redutiva é baseada na redução de uma imina ou íon imínio, obtido a partir de aminas e compostos carbonílicos, necessitando assim de um agente redutor para promover a redução. A reação de Borch, utilizando cianoborohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) como agente redutor, é um método bastante utilizado para realizar aminação redutiva de aldeídos e cetonas (SILVA, 2007).

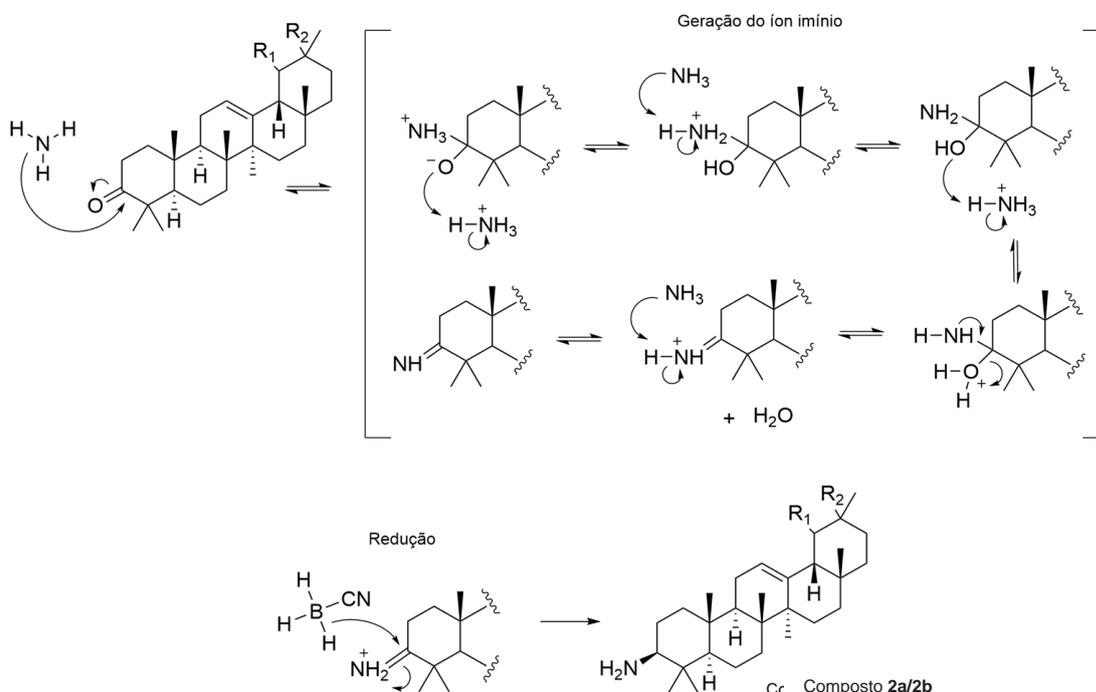
O mecanismo dessa reação é exemplificado na **Figura 50**, onde a amina (para esta reação foi utilizado acetato de amônia como fonte de nitrogênio) condensa com o grupo carbonila para formar um intermediário íon imínio. A manutenção da faixa de pH entre 6-7 é crucial para que o íon imínio seja formado e capturado na etapa posterior, pelo  $\text{BH}_3\text{CN}^-$ . Caso contrário, em pH 4-5 a reação de redução do grupo carbonila para hidroxila é favorecida. A redução do íon imínio gera a amina correspondente (BORCH; BERNSTEIN; DURST, 1970).

A princípio, a reação de aminação redutiva também pareceu não ser eficiente para obtenção com composto **1a/1b**. Durante os testes, ao realizar as placas de CCD para acompanhar a reação, era possível observar a formação de um produto que tinha o mesmo  $R_f$  de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina e que após isolamento dessa substância, essa hipótese foi confirmada. Como dito anteriormente, nessa reação pode haver a conversão do grupo carbonila para o grupo hidroxila, ao invés do grupo amina que era esperado, dificultando a identificação do composto **2a/2b**.

Além disso, foi possível observar uma mancha na origem do spot, na placa de CCD, que mesmo após utilizar sistemas mais polares não eluiu com a fase móvel e foi confundida de forma equivocada com as reagentes utilizados. Cui et al (2015) e Spivak

et al (2020), os quais realizaram esta mesma reação nos triterpenos ácido betulínico, ursólico e oleanólico, não relataram este comportamento no derivado obtido.

**Figura 50** - Mecanismo de reação para formação do composto (2a/2b)



Foi identificado que provavelmente devido ao caráter básico da amina gerada, o composto estaria interagindo com os grupos ácidos da fase estacionária, a sílica gel. Os grupos silanóis ligam-se a aminas orgânicas por interação ácido-base e prejudicam a separação dos produtos. Uma forma de superar essa problemática é adicionando uma base no sistema de eluição, que funciona como uma amina concorrente que neutraliza os grupos silanóis (TELEDYNE ISCO, 2010).

Utilizando 1% de trietilamina para a fase móvel da CCD, foi possível então observar a eluição de 3 manchas bastante próximas entre si, que foram separadas em coluna cromatográfica utilizando novamente a trietilamina no sistema de eluição da coluna. A mancha com  $R_f$  0,15 (Hex:AcOEt 8:2 + 1% trietilamina) apresentou-se como uma massa incolor com rendimento de 0,620 g (61%) que, após purificação e análises, foi identificado como o composto **2a/2b**. As outras substâncias foram formadas em menor quantidade e não foram identificadas.

O composto **2a/2b** tem como massa molar esperada 425,40 ( $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{N}$ ), e apresentou no APCI-MS modo positivo um íon de  $m/z$  426  $[\text{M}+\text{H}]$  consistente com a fórmula molecular do composto protonado, e o um íon de  $m/z$  409  $[\text{M}+\text{H}]$  referente a

perda de água  $[M+H - H_2O]^+$  (APÊNDICE E). No espectro de RMN  $^1H$ , observa-se os sinais característicos do esqueleto ursano e oleanano em 5,16 ppm (t,  $J = 3,5$  Hz, H-12 para  $\beta$ -amirina), 5,10 ppm (t,  $J = 3,5$  Hz, H-12 para  $\alpha$ -amirina) e 0,8 - 2,02 ppm (m). Nota-se o desaparecimento dos multipletos em 2,52 ppm e 2,35 ppm dos H-2 do composto **1a/1b** e o aparecimento de um duplo dubleto em 2,37 ppm (dd,  $J = 11,3$  Hz; 4,4 Hz) atribuído ao H-3 do carbono ligado ao grupo amina (**Figura 51**).

No espectro de RMN  $^{13}C$  do composto **2a/2b** aparecem 58 sinais de deslocamento químico que foram tabelados e correlacionados ao composto de partida **1a/1b** (**Tabela 4**). Na análise do espectro, observa-se o desaparecimento do sinal em  $\delta$  218,0 do C-3 carbonílico do composto **1a/1b** e o aparecimento do sinal  $\delta$  59,8 atribuído ao C-3 ligado ao grupo amina que, juntamente com as análises anteriores confirmou a redução da cetona em amina (**Figura 52**).

**Tabela 4** - Deslocamentos do RMN  $^{13}C$  de 3-amino  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 2a/2b) em comparação com os sinais de 3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas (composto 1a/1b)

Composto 1a/1b			Composto 2a/2b		
C	$\alpha$	$\beta$	C	$\alpha$	$\beta$
<b>1</b>	39,5	39,3	<b>1</b>	39,4	39,2
<b>2</b>	34,24	34,2	<b>2</b>	27,6	27,6
<b>3</b>	218,0	218,0	<b>3</b>	59,8	59,8
<b>4</b>	47,5	47,5	<b>4</b>	38,0	37,8
<b>5</b>	55,2	55,3	<b>5</b>	55,8	55,8
<b>6</b>	19,6	19,6	<b>6</b>	18,7	18,7
<b>7</b>	32,4	32,2	<b>7</b>	33,0	32,7
<b>8</b>	39,8	40,00	<b>8</b>	40,0	40,0
<b>9</b>	46,9	46,9	<b>9</b>	47,8	47,7
<b>10</b>	36,7	36,6	<b>10</b>	37,1	37,1
<b>11</b>	23,5	23,6	<b>11</b>	23,3	23,5
<b>12</b>	124,2	121,5	<b>12</b>	124,5	121,8
<b>13</b>	139,7	145,3	<b>13</b>	139,6	145,2
<b>14</b>	42,2	41,8	<b>14</b>	42,1	41,7
<b>15</b>	28,1	26,1	<b>15</b>	29,7	26,1
<b>16</b>	26,9	26,9	<b>16</b>	26,6	26,9
<b>17</b>	33,8	32,5	<b>17</b>	33,8	32,5
<b>18</b>	59,1	47,3	<b>18</b>	59,1	47,2
<b>19</b>	39,7	46,8	<b>19</b>	39,7	46,8
<b>20</b>	39,6	31,1	<b>20</b>	39,6	31,1
<b>21</b>	31,2	34,7	<b>21</b>	31,3	34,7
<b>22</b>	41,5	37,1	<b>22</b>	41,5	37,1
<b>23</b>	28,4	26,5	<b>23</b>	28,4	28,5
<b>24</b>	25,9	21,5	<b>24</b>	15,8	15,8
<b>25</b>	15,5	15,2	<b>25</b>	15,6	15,4
<b>26</b>	16,8	16,7	<b>26</b>	16,9	16,8
<b>27</b>	26,6	23,7	<b>27</b>	23,7	26,0
<b>28</b>	28,8	28,8	<b>28</b>	28,1	28,8
<b>29</b>	17,5	33,3	<b>29</b>	17,5	33,3
<b>30</b>	21,4	23,2	<b>30</b>	21,4	23,3

**Figura 51** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 3-amino  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 2a/2b) (6,6 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz) com ampliações

( $\delta = \text{ppm}$ )  $\delta$ : 5,16 (t,  $J = 3,5$  Hz, H-12 de  $\beta$ -amirina); 5,10 (t,  $J = 3,5$  Hz, H-12 de  $\alpha$ -amirina); 2,37 ppm (dd,  $J = 11,3$  Hz; 4,4 Hz, H-3), 0,7 - 2,02 (m, perfil característico dos esqueletos ursano e oleanano).

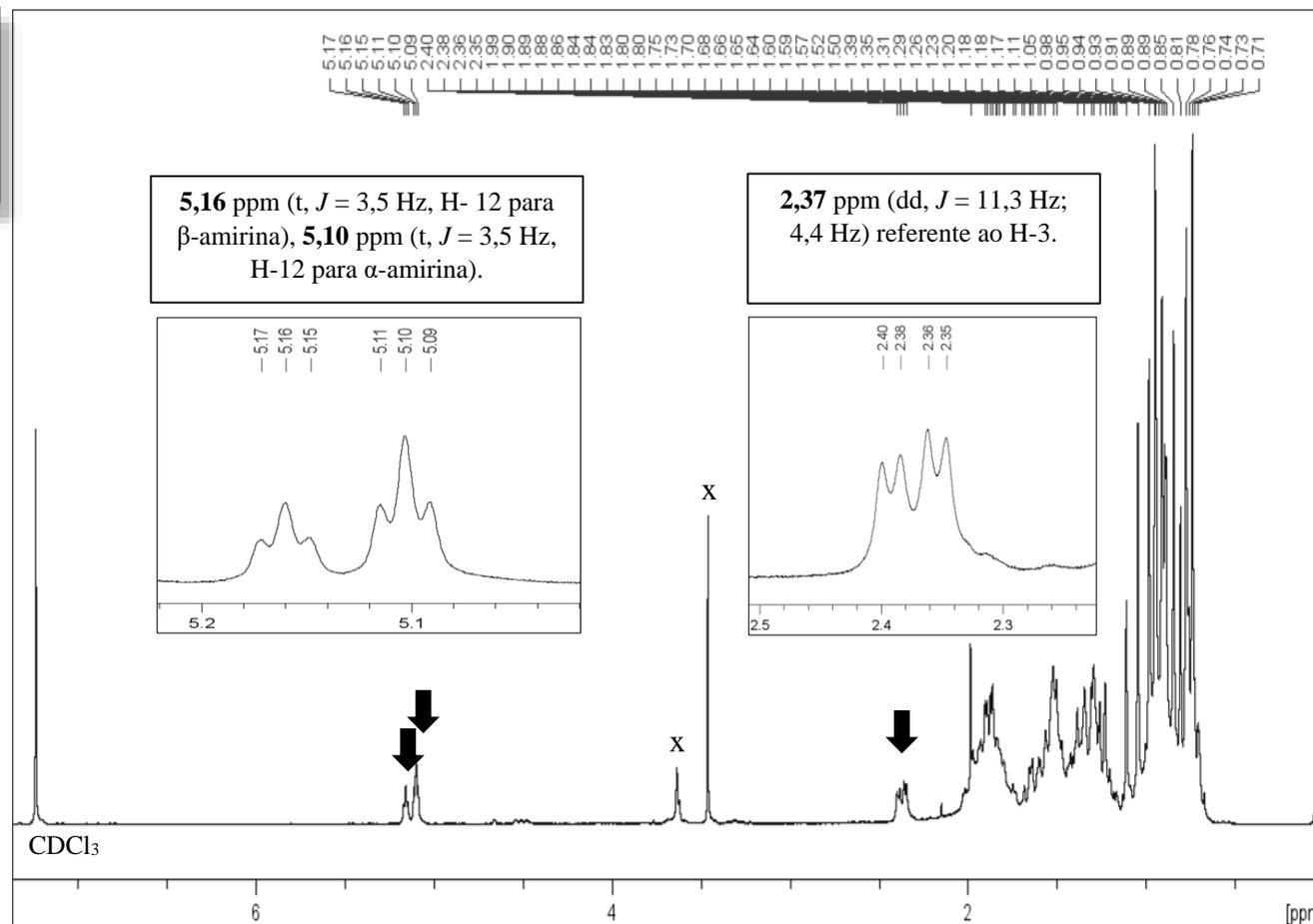
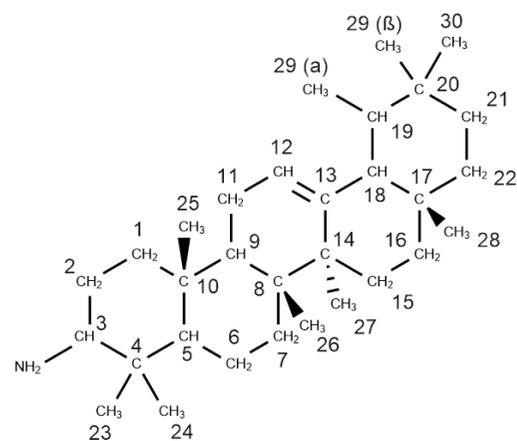
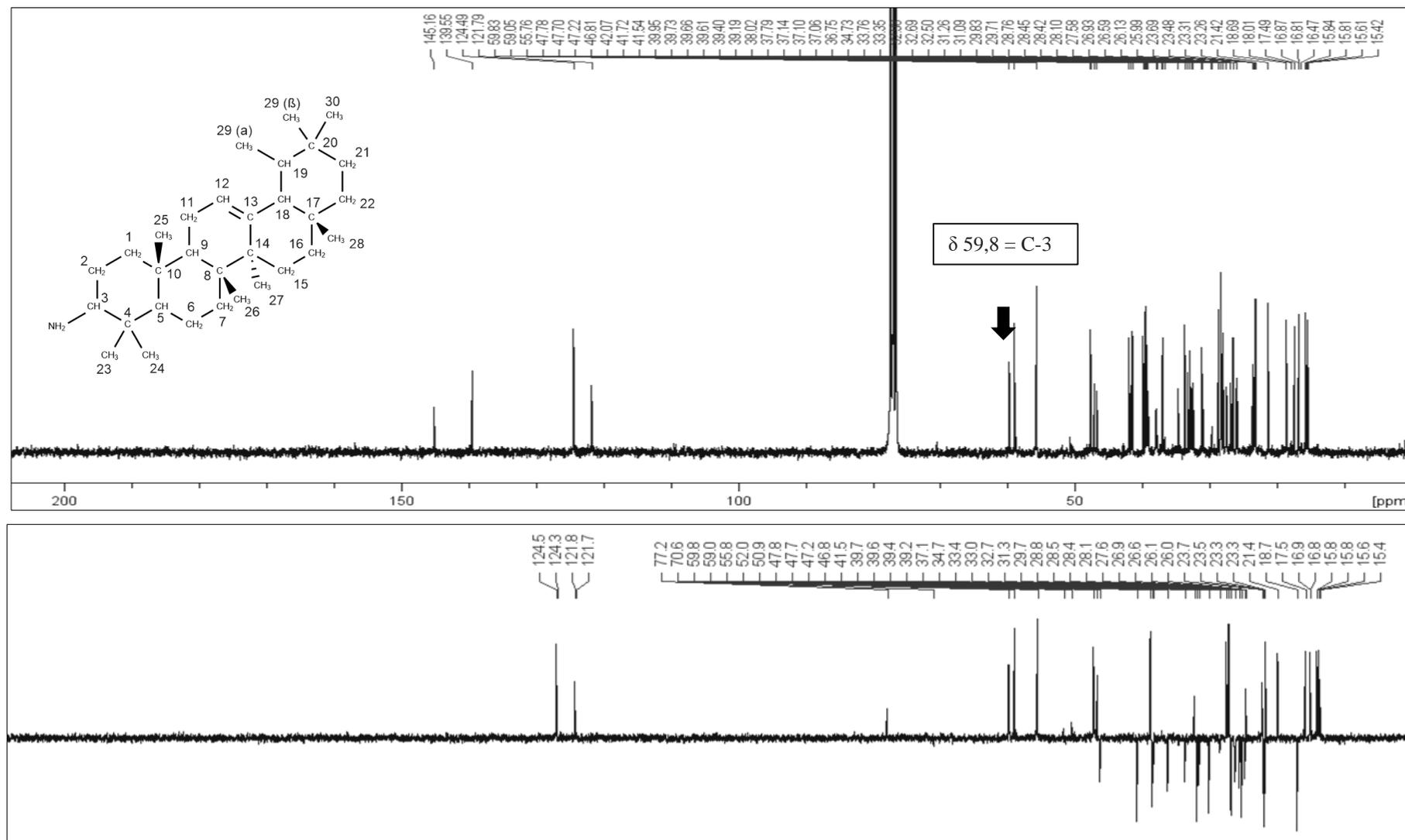


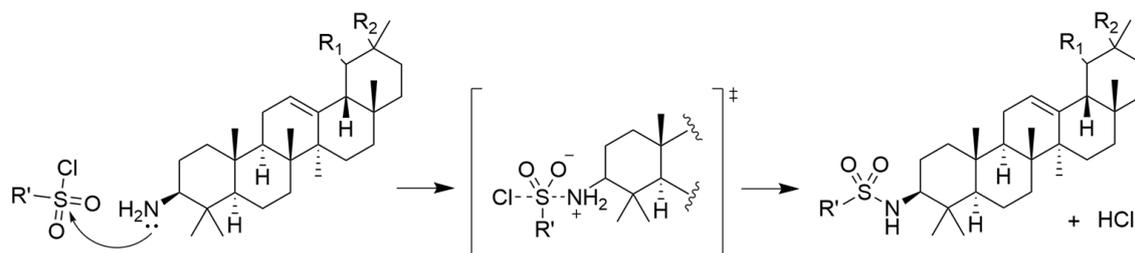
Figura 52 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de 3-amino  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 2a/2b) (6,6 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz) com ampliações



### 5.5 Síntese dos derivados sulfonamidas arílicas (3a/3b), (4a/4b) e (5a/5b)

Utilizando o composto **2a/2b** como material de partida, os derivados sulfonamidas **3a/3b**, **4a/4b** e **5a/5b** foram sintetizados. O método sintético mais comum para obtenção de sulfonamidas é através da condensação de um cloreto de sulfonila adequado com uma amina (KOLACZEK et al., 2014). O mecanismo comum de formação desses compostos é ilustrado na **Figura 53** e trata-se de um tipo de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) chamada de sulfonilação. Essa reação ocorre por meio do ataque nucleofílico da amina sobre o átomo de enxofre eletrofílico do cloreto de sulfonila, passando então por um estado de transição trigonal bipiramidal e havendo então a liberação do grupo abandonador (-Cl). Neste caso, apesar de ser uma  $S_N2$ , não ocorre inversão da configuração pois o estereocentro é o nucléofilo, havendo então retenção da configuração. Devido a formação de HCl nessa reação, é geralmente utilizada uma base como catalisador (piridina) para neutralização do mesmo (DAS; QUADRI; FAROOQUI, 2018).

**Figura 53** - Mecanismo de reação para formação das sulfonamidas 3a/3b, 4a/4b e 5a/5b



#### 5.5.1 Síntese do derivado 4-nitrobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (**3a/3b**)

O composto **3a/3b** corresponde aos isômeros de código 41 e 42 selecionados no docking molecular. O composto **3a/3b** apresentou-se na forma de cristais amarelados, rendimento de 0,052 g (71%),  $R_f$  de 0,65 (Hex:AcOEt 8:2 + 1% trietilamina). A massa esperada para este composto era de 610,38 ( $C_{36}H_{54}N_2O_4S$ ). Essa substância foi ionizada utilizando a fonte APCI no modo negativo. Na análise do MS observou-se um íon de  $m/z$  609 [M-H] consistente com a fórmula molecular do composto desprotonado. Além desse íon, também se observou um íon de  $m/z$  598 ao qual foi atribuído contaminação do composto **4a/4b** que será discutido posteriormente (**APÊNDICE E**).

As análises de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  do composto **3a/3b** apresentadas aqui foram realizadas na Central Analítica da UFAM, em um equipamento que opera em 500 MHz,

diferentemente das demais que foram todas realizadas no INPA. No espectro do RMN  $^1\text{H}$  do composto **3a/3b**, observa-se os sinais característicos do esqueleto ursano e oleanano em 5,13 ppm (t,  $J = 3,5$  Hz, H-12 para  $\beta$ -amirina), 5,07 ppm (t,  $J = 3,5$  Hz, H-12 para  $\alpha$ -amirina) e 0,8 - 2,02 ppm (m). Nota-se o aparecimento de um dubleto em 8,33 ppm (d,  $J = 8,8$  Hz) atribuído ao H-3' e H-5' aromáticos e outro dubleto em 8,04 ppm (d,  $J = 8,8$  Hz) atribuído ao H-2' e H-6' aromáticos. Ocorre também um dubleto em 4,40 ppm (d,  $J = 9,9$  Hz) atribuído ao -NH e um multiplete em 2,92 ppm atribuído ao H-3 (**Figura 54**).

Os sinais do RMN  $^{13}\text{C}$  foram correlacionados e tabelados para cada carbono comparando-se com os RMN anteriores. Foi possível correlacionar a maior parte dos sinais analisados, porém alguns foram atribuídos a possíveis contaminantes da síntese ou degradação do produto. Dessa maneira, identificaram-se primeiramente os carbonos que não teriam seus deslocamentos modificados que seriam os carbonos do esqueleto triterpênico, exceto C-3, utilizando os dados do espectro RMN  $^{13}\text{C}$  do composto de origem **2a/2b** (**Tabela 5**) Em seguida identificaram-se os sinais correspondentes a região do substituinte sulfonamida arílica.

O sinal de  $\delta$  63,0 foi atribuído ao C-3 do esqueleto triterpênico ligado ao grupo sulfonamida, que antes era de  $\delta$  59,0 no composto **2a/2b**. O sinal de  $\delta$  128,3 foi atribuído aos carbonos C-2' e C-6' e o sinal de  $\delta$  124,3 foi atribuído aos carbonos C-3' e C-5', ambos sinais que ocorrem em campo positivo no DEPT 135, coincidindo com -CH aromáticos. O sinal de  $\delta$  147,3 foi atribuído ao C-1' e o sinal de  $\delta$  149,9 foi atribuído ao C-4' que está ligado ao grupo -NO<sub>2</sub>, ambos sinais que não aparecem no DEPT 135, coincidindo com carbonos quaternários aromáticos. As análises realizadas confirmam a reação de sulfonilação para obtenção do composto **3** (**Figura 55**).

**Tabela 5** - Deslocamentos do RMN  $^{13}\text{C}$  de 4-nitrobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 3a/3b) em comparação com os sinais de 3-amino  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 2a/2b)

Composto 2a/2b			Composto 3a/3b		
C	$\alpha$	$\beta$	C	$\alpha$	$\beta$
1	39,4	39,2	1	39,4	39,2
2	27,6	27,6	2	28,1	29,0
3	59,8	59,8	3	63,0	63,0
4	38,0	37,8	4	38,1	38,1
5	55,8	55,8	5	56,2	56,2
6	18,7	18,7	6	18,3	18,3
7	33,0	32,7	7	32,8	32,5
8	40,0	40,0	8	39,9	39,9
9	47,8	47,7	9	47,7	47,6
10	37,1	37,1	10	36,7	36,6
11	23,3	23,5	11	23,4	23,3
12	124,5	121,8	12	124,1	121,5
13	139,6	145,2	13	139,7	145,3
14	42,1	41,7	14	42,1	41,5
15	29,7	26,1	15	29,5	26,1
16	26,6	26,9	16	26,6	26,9
17	33,8	32,5	17	33,7	34,4
18	59,1	47,2	18	59,0	47,2
19	39,7	46,8	19	39,7	46,8
20	39,6	31,1	20	39,6	31,1
21	31,3	34,7	21	31,2	34,7
22	41,5	37,1	22	41,7	37,1
23	28,4	28,5	23	28,3	28,4
24	15,8	15,8	24	16,8	16,8
25	15,6	15,4	25	15,5	15,4
26	16,9	16,8	26	16,8	16,4
27	23,7	26,0	27	25,9	23,7
28	28,1	28,8	28	28,7	28,7
29	17,5	33,3	29	17,5	33,3
30	21,4	23,3	30	21,4	23,2
1'	-	-	1'	147,3	147,3
2'	-	-	2'	128,3	128,3
3'	-	-	3'	124,3	124,3
4'	-	-	4'	149,9	149,9
5'	-	-	5'	124,3	124,3
6'	-	-	6'	128,3	128,3

**Figura 54** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 4-nitrobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 3a/3b) (10,1 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) com ampliações

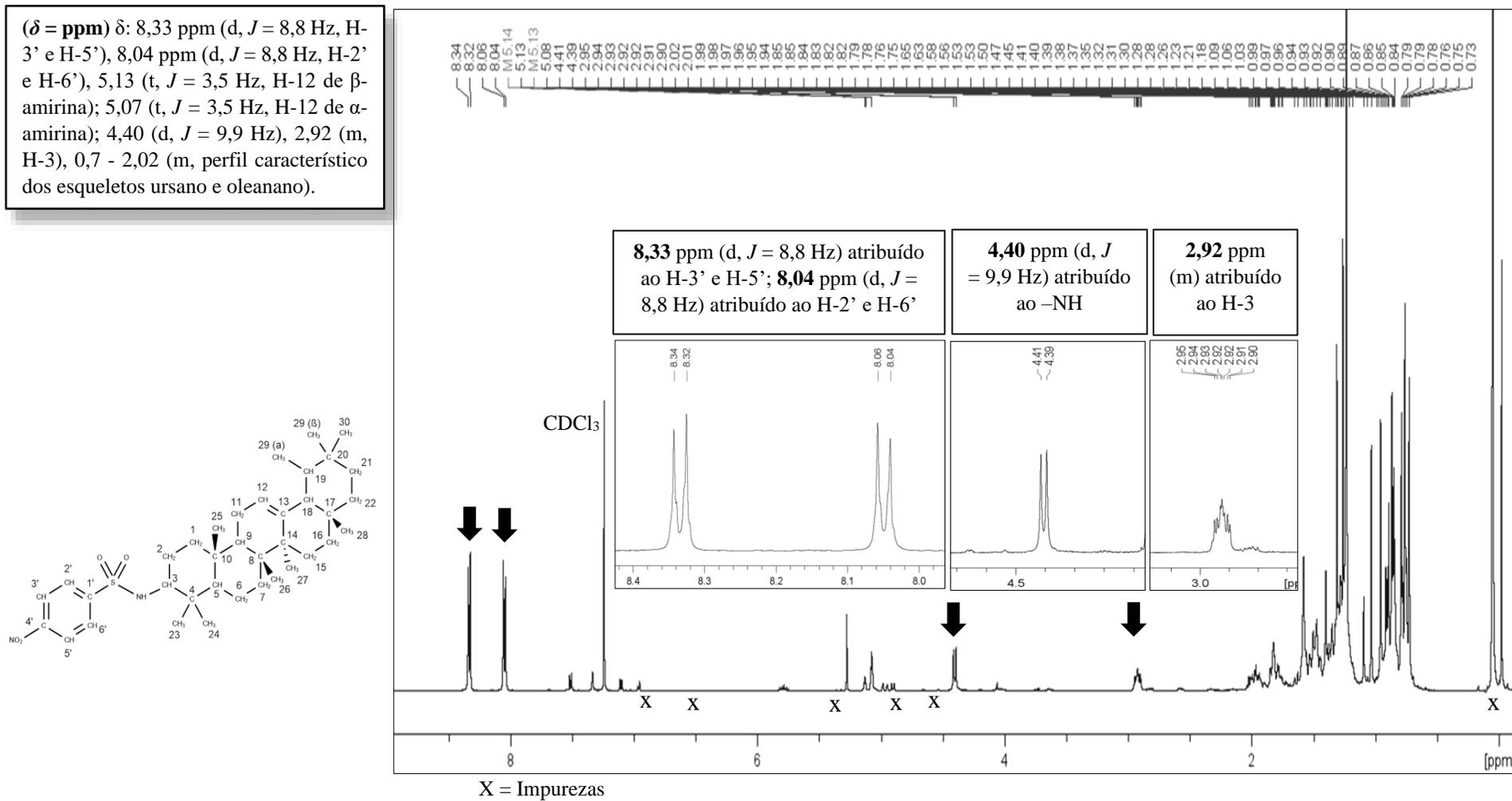
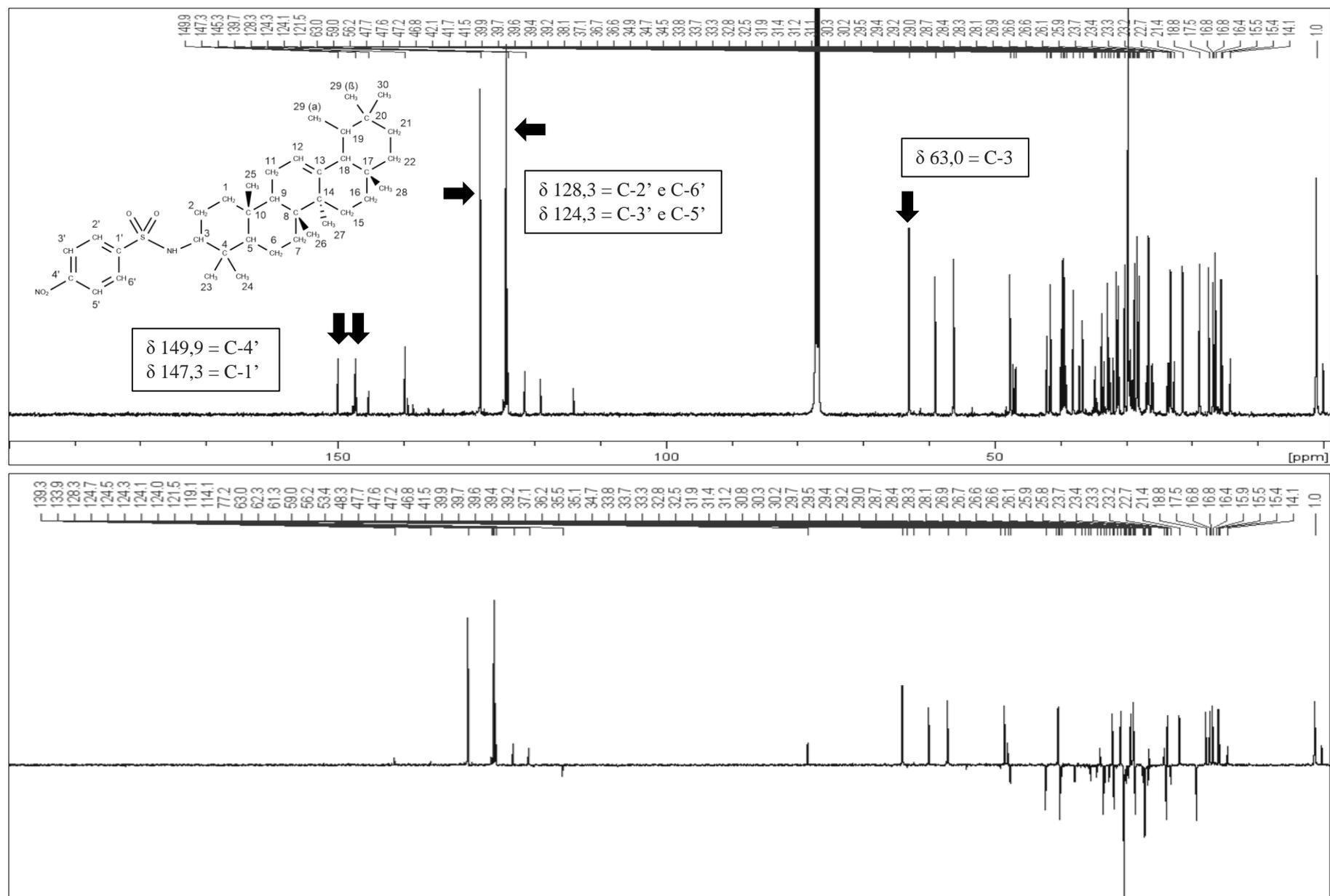


Figura 55 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de 4-nitrobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 3a/3b) (10,1 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)



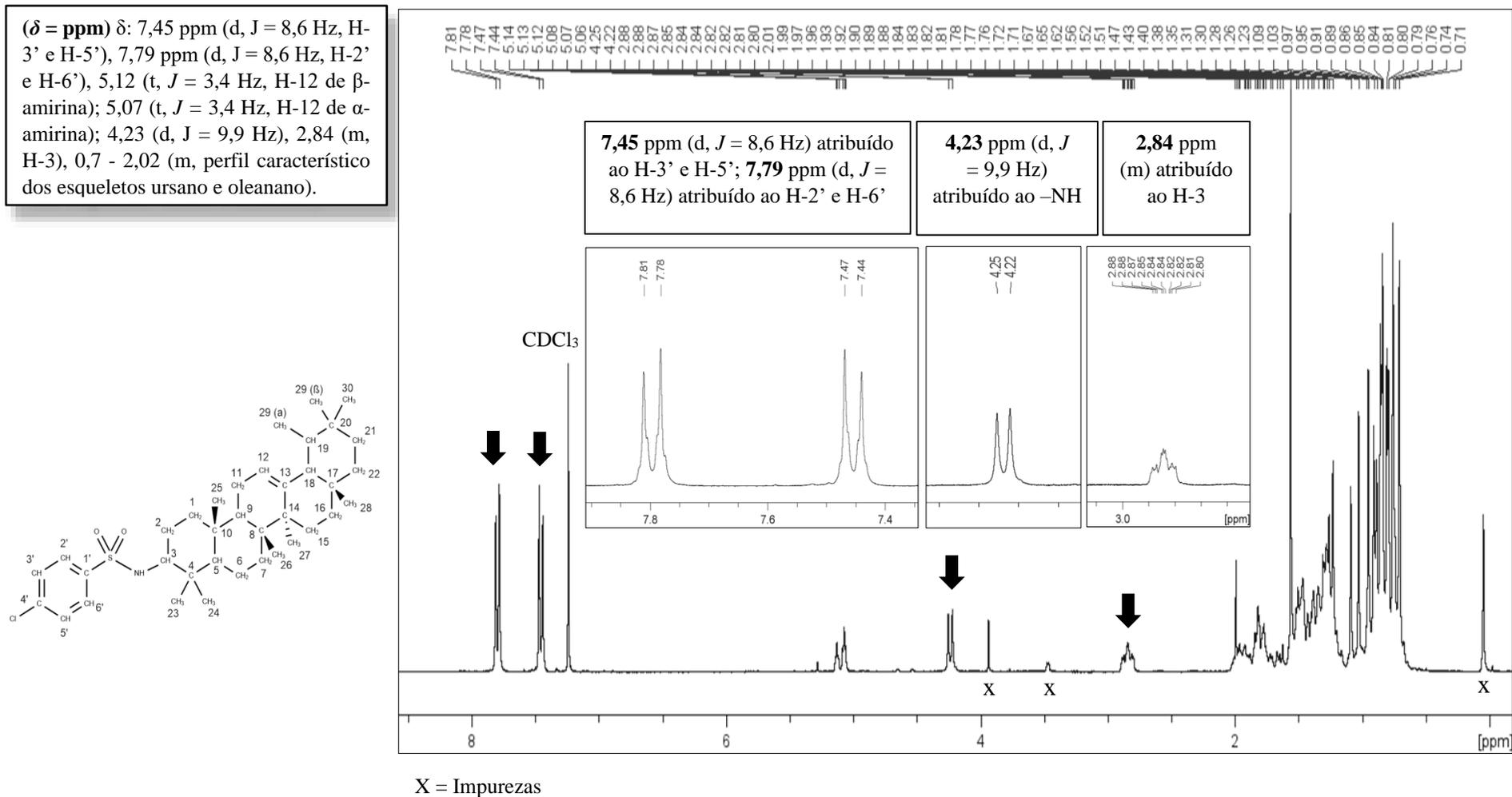
### 5.5.2 Síntese do derivado 4-clorobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (**4a/4b**)

O composto **4a/4b** corresponde aos isômeros de código 45 e 46 selecionados no docking molecular. O composto **4a/4b** apresentou-se na forma de cristais brancos, rendimento de 0,047 g (45%), Rf de 0,58 (Hex: AcOEt 8:2 + 1% trietilamina). A massa esperada para este composto era de 599,36 ( $C_{36}H_{54}N_2O_4S$ ). Essa substância foi ionizada utilizando a fonte APCI no modo negativo e na análise do MS observou-se um íon de  $m/z$  598 [M-H], consistente com a fórmula molecular do composto desprotonado.

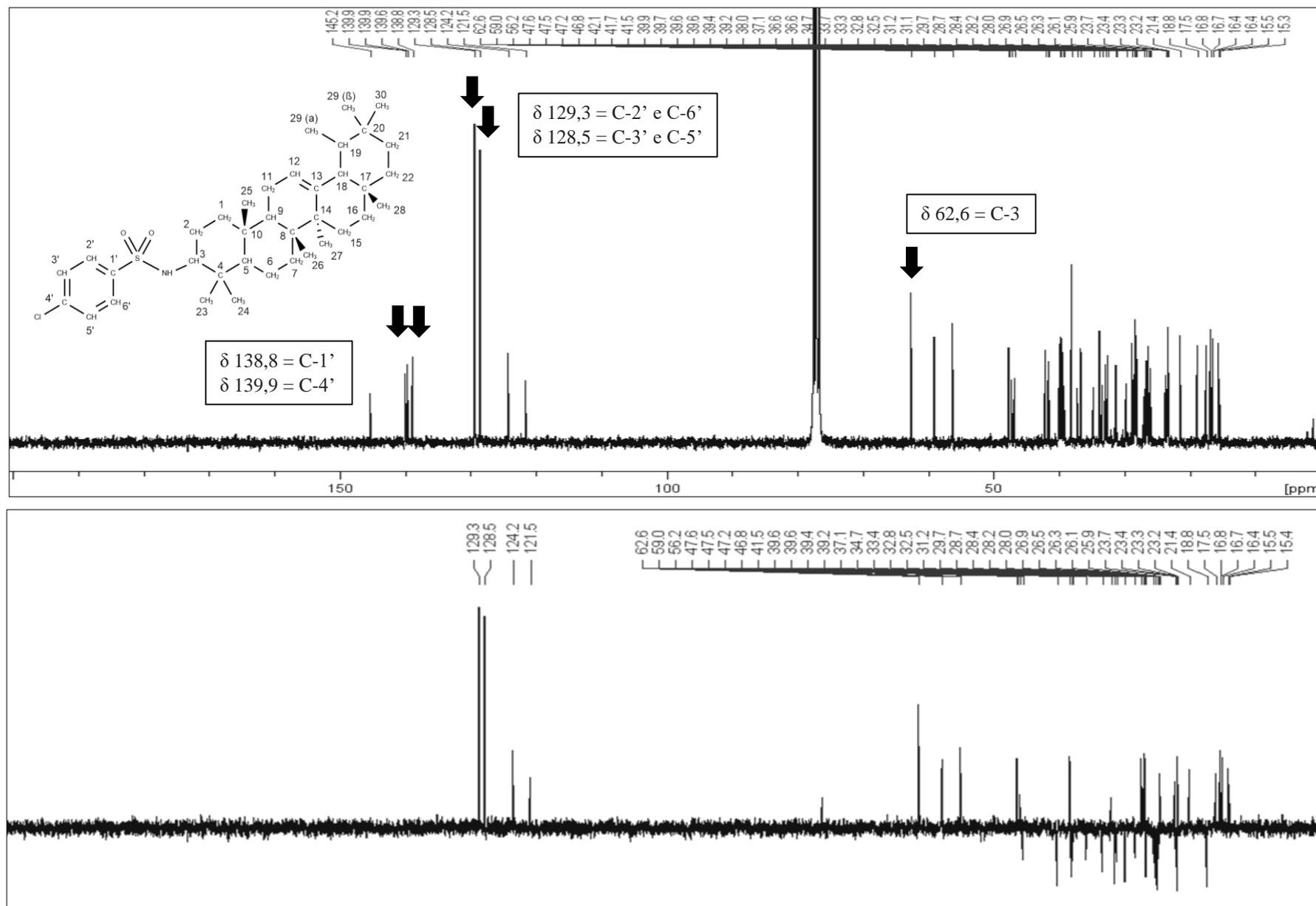
No espectro do RMN  $^1H$ , observa-se os sinais característicos do esqueleto ursano e oleanano em 5,12 ppm (t,  $J = 3,4$  Hz, H-12 para  $\beta$ -amirina), 5,07 ppm (t,  $J = 3,4$  Hz, H-12 para  $\alpha$ -amirina) e 0,8 - 2,02 ppm (m). Nota-se o aparecimento de um dubleto em 7,45 (d,  $J = 8,6$  Hz) ao H-3' e H-5' aromáticos e outro dubleto em 7,79 ppm (d,  $J = 8,6$  Hz) atribuído ao H-2' e H-6' aromáticos. Ocorre também um dubleto em 4,23 ppm (d,  $J = 9,9$  Hz) atribuído ao -NH e um multipletto em 2,84 ppm atribuído ao H-3 (**Figura 56**).

No espectro de RMN  $^{13}C$  do composto **4a/4b** aparecem 59 sinais que foram correlacionados e tabelados comparando-se com o composto de partida **2a/2b** (**Tabela 6**). Na análise do espectro, observa-se sinal de  $\delta$  62,6 atribuído ao C-3 do esqueleto triterpênico ligado ao grupo sulfonamida. O sinal de  $\delta$  129,3 foi atribuído aos carbonos C-2' e C-6' e o sinal de  $\delta$  128,5 foi atribuído aos carbonos C-3' e C-5', ambos sinais que ocorrem em campo positivo no DEPT, coincidindo com -CH aromáticos. O sinal de  $\delta$  138,8 foi atribuído ao C-1' e o sinal de  $\delta$  139,9 foi atribuído ao C-4' que está ligado ao átomo -Cl, ambos sinais que não aparecem no DEPT 135, coincidindo com carbonos quaternários aromáticos (**Figura 57**). Com base em todas as análises foi possível confirmar a reação de sulfonilação para obtenção do composto **4a/4b**.

**Figura 56** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 4-clorobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 4a/4b) (5,3 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz) com ampliações



**Figura 57** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de 4-clorobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 4a/4b) (5,3 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)



**Tabela 6** - Deslocamentos do RMN  $^{13}\text{C}$  de 4-clorobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 4a/4b) em comparação com os sinais de 3-amino  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 2a/2b)

Composto 2a/2b			Composto 4a/4b		
C	$\alpha$	$\beta$	C	$\alpha$	$\beta$
1	39,4	39,2	1	39,4	39,2
2	27,6	27,6	2	28,0	26,3
3	59,8	59,8	3	62,6	62,6
4	38,0	37,8	4	38,0	38,0
5	55,8	55,8	5	56,2	56,2
6	18,7	18,7	6	18,8	18,8
7	33,0	32,7	7	32,8	32,5
8	40,0	40,0	8	39,9	39,7
9	47,8	47,7	9	47,6	47,5
10	37,1	37,1	10	36,6	36,6
11	23,3	23,5	11	23,3	23,4
12	124,5	121,8	12	124,2	121,5
13	139,6	145,2	13	139,6	145,2
14	42,1	41,7	14	42,1	41,5
15	29,7	26,1	15	29,7	26,1
16	26,6	26,9	16	26,5	26,9
17	33,8	32,5	17	33,7	33,7
18	59,1	47,2	18	59,0	47,2
19	39,7	46,8	19	39,6	46,8
20	39,6	31,1	20	39,6	31,1
21	31,3	34,7	21	31,2	34,7
22	41,5	37,1	22	41,7	37,1
23	28,4	28,5	23	28,4	28,7
24	15,8	15,8	24	16,4	16,4
25	15,6	15,4	25	15,5	15,3
26	16,9	16,8	26	16,8	16,7
27	23,7	26,0	27	25,9	23,2
28	28,1	28,8	28	28,2	28,2
29	17,5	33,3	29	17,5	33,3
30	21,4	23,3	30	21,4	23,7
1'	-	-	1'	138,8	138,8
2'	-	-	2'	129,3	129,3
3'	-	-	3'	128,5	128,5
4'	-	-	4'	139,9	139,9
5'	-	-	5'	128,5	128,5
6'	-	-	6'	129,3	129,3

### 5.5.3 Síntese do derivado 4-acetamidobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (**5a/5b**)

O composto **5a/5b** corresponde aos isômeros de código 29 e 30 selecionados no docking molecular. Embora os derivados sulfonamidas tenham sido sintetizados utilizando piridina como meio reacional (YOUN; KO; JANG, 2017), essa metodologia não foi adequada para síntese do composto **5a/5b**, uma vez que foi verificado pela CCD que não houve formação do produto. Pensou-se que isso poderia estar ocorrendo devido o cloreto de sulfonila utilizado não estar sendo devidamente solubilizado no meio reacional. Então, foi trocado o solvente por diclorometano e algumas gotas de piridina, uma vez que a piridina também tem o papel de catalisador dessa reação.

Novamente, não foi possível observar a formação do produto, então foram realizados novos testes. A piridina atua como catalisador da reação de sulfonilação pela neutralização do HCl que é formado. Apesar da piridina ser uma amina, este reagente não compete com a amina utilizada para a reação (3-amino  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas / composto **2a/2b**), visto que a piridina é uma amina aromática e os pares de elétrons conjugados prejudicam-na quanto a nucleofilicidade. A trietilamina, sendo uma amina terciária, também pode ser utilizada como catalisador nessa reação uma vez que ela não consumiria o cloreto de sulfonila pois não possui um hidrogênio necessário na etapa de desprotonação, conduzindo a um produto não estável (KURKIN et al., 2003).

Dessa forma, foram conduzidos testes utilizando como meio reacional diclorometano, tetraidrofurano (THF) ou metanol (um solvente apolar, um polar aprótico e um polar prótico) e como catalisador algumas gotas de trietilamina. Foi verificado por acompanhamento das CCD que em todos os sistemas houve a formação do produto, sendo que a reação no solvente THF houve a formação de um produto principal visivelmente em maior quantidade do que as demais, com poucos subprodutos. Assim, esta metodologia foi considerada mais adequada para o preparo do composto **5a/5b**.

O composto **5a/5b** apresentou-se como cristais brancos com rendimento de 0,070 g (66%), Rf de 0,2 (Hex:AcOEt 7:3 + 1% trietilamina). A massa esperada para este composto era de 622,42 (C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S). Essa substância foi ionizada utilizando a fonte APCI no modo negativo e na análise do APCI-MS observou-se um íon de  $m/z$  621 [M-H], consistente com a fórmula molecular do composto desprotonado.

No espectro do RMN <sup>1</sup>H observa-se os sinais característicos do esqueleto ursano e oleanano em 5,12 ppm (t,  $J = 3,3$  Hz, H-12 para  $\beta$ -amirina), 5,06 ppm (t,  $J = 3,3$  Hz, H-12 para  $\alpha$ -amirina). Nota-se o aparecimento de um dubleto em 7,63 (d,  $J = 8,7$  Hz) ao H-3' e H-5' aromáticos e outro dubleto em 7,79 ppm (d,  $J = 8,8$  Hz) atribuído ao H-2' e H-6' aromáticos. Ocorre também um dubleto em 4,20 ppm (d,  $J = 9,8$ ) correspondente ao -NH, um multiplete em 2,81 ppm atribuído ao H-3 e um singlete em 2,20 ppm atribuído aos hidrogênios em -CH<sub>3</sub>' por efeito de desblindagem da carbonila adjacente (**Figura 58**).

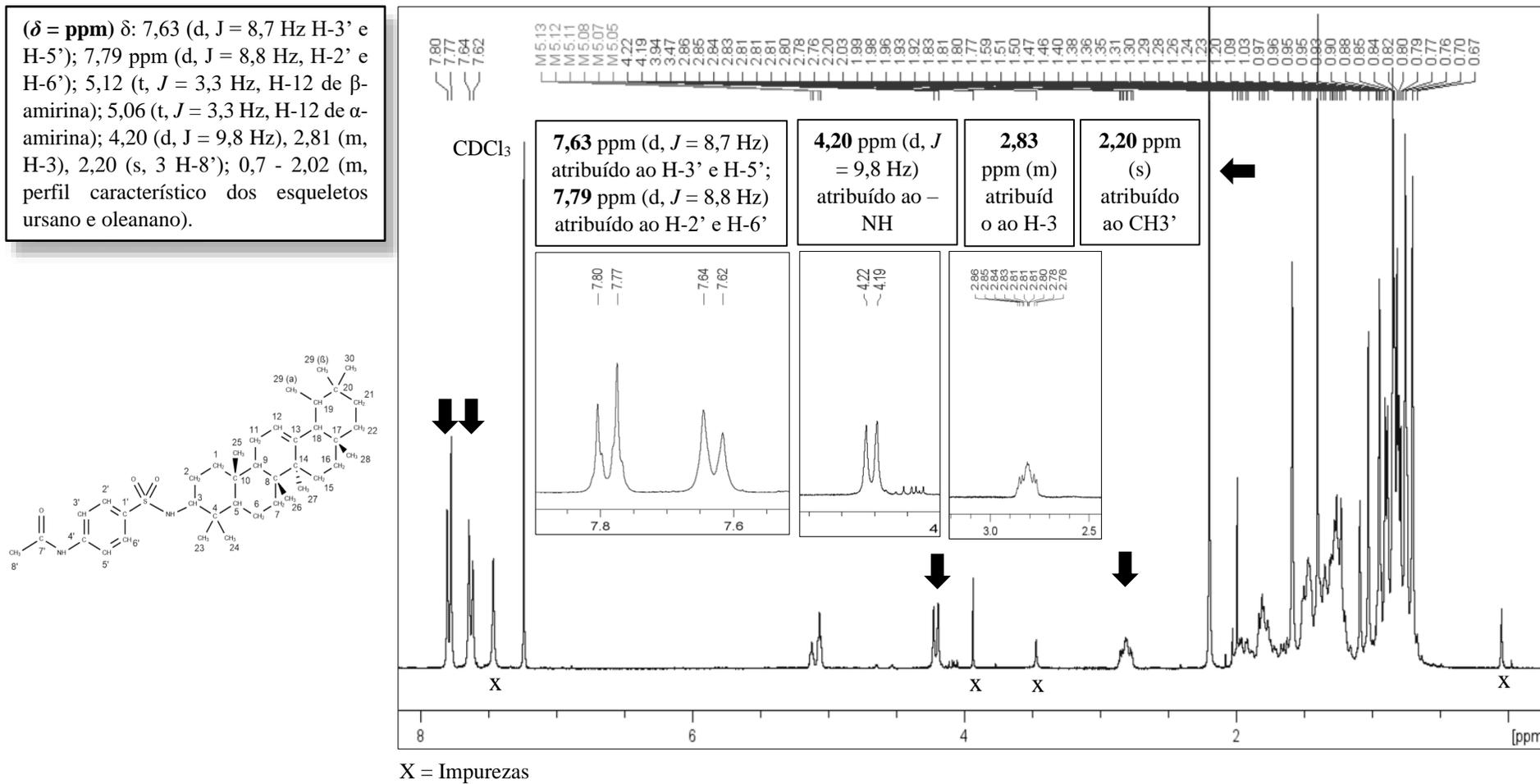
No espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto **5a/5b** aparecem 63 sinais que foram tabelados e correlacionados com o composto de partida **2a/2b** (**Tabela 7**). Na análise do espectro, observa-se o sinal de  $\delta$  62,4 atribuído ao C-3 ligado ao grupo sulfonamida. O sinal de  $\delta$  128,3 foi atribuído aos carbonos C-2' e C-6' e o sinal de  $\delta$  119,1 foi atribuído aos carbonos C-3' e C-5', ambos sinais que ocorrem em campo positivo no DEPT 135,

coincidindo com -CH aromáticos. O sinal de  $\delta$  136,1 foi atribuído ao C-1', o sinal de  $\delta$  141,6 foi atribuído ao C-4' que está ligado ao grupo -NHCOCH<sub>3</sub> e o sinal de  $\delta$  168,6 foi atribuído ao C-7' carbonílico, sinais que não aparecem no DEPT 135, coincidindo com carbonos quaternários (**Figura 59**). Um sinal de  $\delta$  24,8 foi correlacionado ao C-8'. Dessa forma, foi possível confirmar a reação de sulfonilação para obtenção do composto **5a/5b**.

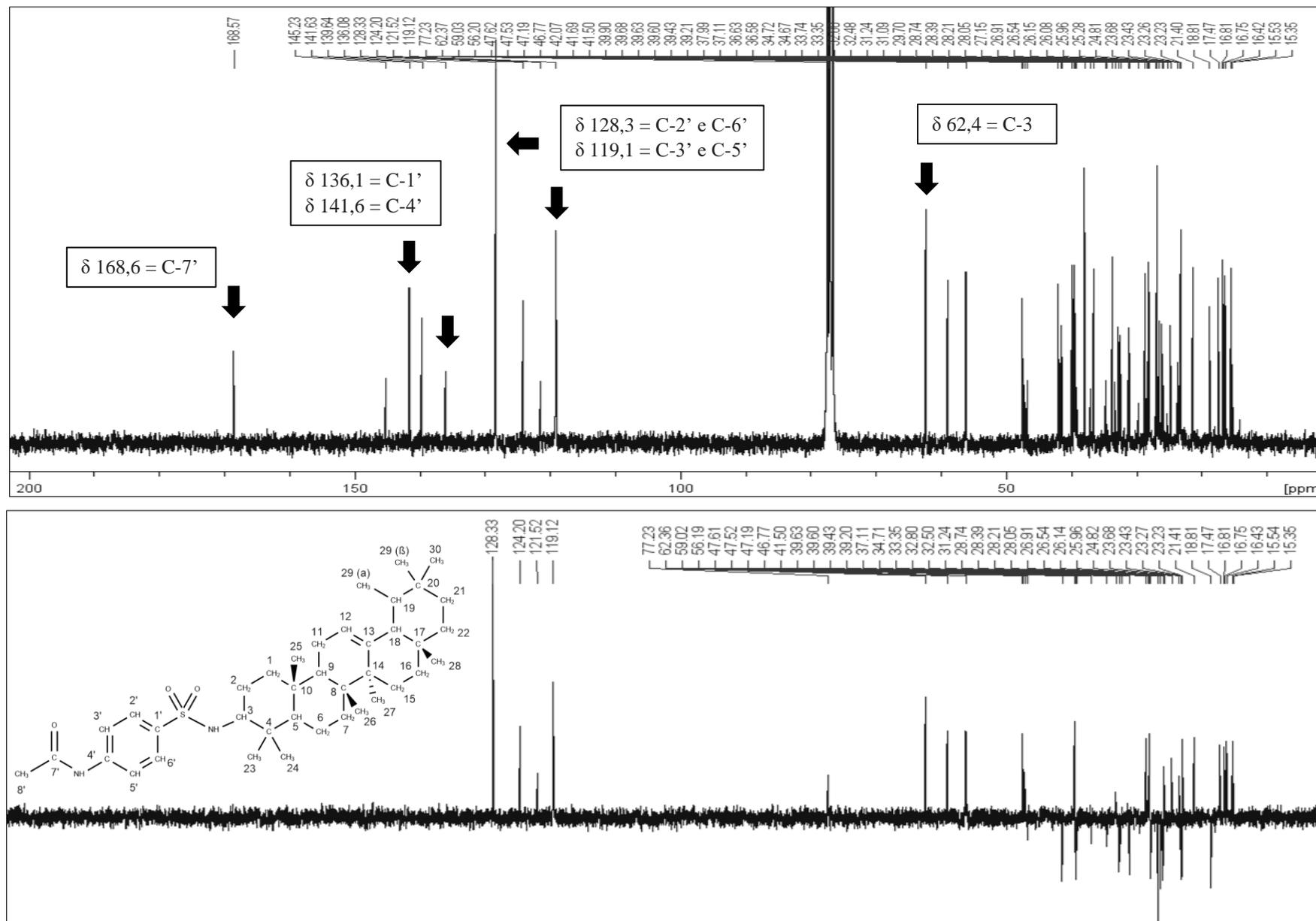
**Tabela 7** - Deslocamentos do RMN <sup>13</sup>C de 4-acetamido benzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 5a/5b) em comparação com os sinais de 3-amino  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 2a/2b)

C	Composto 2a/2b		C	Composto 5a/5b	
	$\alpha$	$\beta$		$\alpha$	$\beta$
1	39,4	39,2	1	39,4	39,2
2	27,6	27,6	2	28,1	26,1
3	59,8	59,8	3	62,4	62,4
4	38,0	37,8	4	38,0	38,0
5	55,8	55,8	5	56,2	56,2
6	18,7	18,7	6	18,8	18,8
7	33,0	32,7	7	32,8	32,5
8	40,0	40,0	8	39,9	39,7
9	47,8	47,7	9	47,6	47,5
10	37,1	37,1	10	36,6	36,6
11	23,3	23,5	11	23,3	23,4
12	124,5	121,8	12	124,2	121,5
13	139,6	145,2	13	139,6	145,2
14	42,1	41,7	14	42,1	41,7
15	29,7	26,1	15	29,7	26,1
16	26,6	26,9	16	26,5	26,9
17	33,8	32,5	17	33,7	33,7
18	59,1	47,2	18	59,0	47,2
19	39,7	46,8	19	39,6	46,8
20	39,6	31,1	20	39,6	31,1
21	31,3	34,7	21	31,2	34,7
22	41,5	37,1	22	41,5	37,1
23	28,4	28,5	23	28,4	28,7
24	15,8	15,8	24	16,8	16,7
25	15,6	15,4	25	15,5	15,3
26	16,9	16,8	26	16,4	16,4
27	23,7	26,0	27	26,0	23,7
28	28,1	28,8	28	28,2	28,2
29	17,5	33,3	29	17,5	33,3
30	21,4	23,3	30	21,4	23,2
1'	-	-	1'	136,1	136,1
2'	-	-	2'	128,3	128,3
3'	-	-	3'	119,1	119,1
4'	-	-	4'	141,6	141,6
5'	-	-	5'	119,1	119,1
6'	-	-	6'	128,3	128,3
7'	-	-	7'	168,6	168,6
8'	-	-	8'	24,8	24,8

**Figura 58** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 4-acetamido benzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 5a/5b) (5,3 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz) com ampliações



**Figura 59** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de 4-clorobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 5a/5b) (5,3 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)



## 5.6 Síntese do derivado 4-aminobenzeno sulfonamida de $\alpha$ e $\beta$ amirina (6a/6b)

O composto **3a/3b** sintetizado anteriormente foi utilizado para síntese do composto **4a/4b**, que corresponde aos isômeros 21 e 22 selecionados no docking molecular. A reação consiste na redução do grupo nitro aromático do composto **3a/3b** para o grupo amina aromático presente no composto **6a/6b**. Existem muitos métodos reportados na literatura para este tipo de redução incluindo hidrogenação catalítica, redução utilizando metais e redução eletrolítica. No entanto, relata-se que muitos métodos apresentam desvantagens como tempo prolongado de reação, formação de subprodutos e utilização de meio ácido/básico que pode gerar incompatibilidade com grupos sensíveis.

Observando que o composto **3a/3b** trata-se de uma sulfonamida e que, apesar da estabilidade, poderia ser hidrolisado em meio ácido ou alcalino, buscou-se um método que evitasse essas condições e que permitisse um meio reacional o qual composto de partida fosse solúvel. Kumar e Rai (2012) apresentam um método eficiente de redução de compostos nitro aromáticos utilizando zinco metálico em solução aquosa com diferentes éteres. Para o experimento realizado aqui foi utilizado o éter 1,4 dioxano.

A reação foi acompanhada por CCD e verificou-se o consumo completo do substrato de partida e o aparecimento de uma mancha amarela com Rf 0,22 (Hex + AcOEt 8:2 + 1% trietilamina). No entanto após realizar a coluna cromatográfica, as frações coletadas continham quantidades ínfimas de material. E após verificar as CCD das frações a maior parte delas continha uma mistura complexa de substâncias. Uma das frações contendo 1,9 mg de substância aparentemente pura, e que admitiu-se ser o composto **6a/6b** foi enviada para as análises de identificação.

A massa esperada para o composto **6a/6b** era de 580,41 ( $C_{36}H_{56}N_2O_2S$ ). Essa substância foi ionizada utilizando a fonte APCI no modo negativo da mesma maneira que as sulfonamidas anteriores, e na análise do APCI-MS observou-se dois íons principais de  $m/z$  473 [M-H] e 489 [M-H]. Foram também identificados íons de menor intensidade, no entanto nenhum deles foi compatível com a massa esperada (**APÊNDICE E**).

Na análise do espectro de RMN  $^1H$  não foi possível identificar os sinais característicos do esqueleto triterpênico, os quais são 5,12 ppm e 5,06 ppm (t, H-12 dos diferentes isômeros) que ocorreram nos derivados anteriores, provavelmente devido a quantidade da amostra ser reduzida (2 mg). Foram identificados multipletos na região de campo baixo entre 7,49 ppm - 8,46 ppm referentes a região aromática da molécula, no

entanto não possível correlacionar de maneira precisa os deslocamentos atribuídos ao grupo substituinte (**Figura 60**).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  todos os sinais apresentaram baixa intensidade, o que novamente dificultou a identificação e correlação. Entretanto, destaca-se um sinal em  $\delta$  167,7 que provavelmente se deve a um carbono carbonílico. No entanto, não era esperado o aparecimento de um sinal desse tipo para esse composto. Os sinais característicos dos carbonos vinílicos C-12 e C-13 do esqueleto triterpênico das amirinas  $\delta$  139,6 (para  $\alpha$ ),  $\delta$  145,2 (para  $\beta$ ),  $\delta$  124,4 (para  $\alpha$ ) e  $\delta$  121,7 (para  $\beta$ ) não foram identificados (**Figura 61**).

Infelizmente, não possível identificar o composto **6a/6b** através das análises utilizadas. Ressalta-se que durante os testes de síntese houve a formação de um produto característico com o consumo aparentemente completo do material de partida. No entanto, é provável que o composto possa ter degradado durante a purificação na coluna cromatográfica, uma vez que as frações coletadas tiveram um perfil complexo de substâncias identificadas nas placas de CCD. Certamente, a reação será repetida e o produto será purificado para novamente ser analisado.

### 5.7 Derivados triterpênicos sulfonamidas de cadeia alquílica

Os derivados sulfonamidas da série alquílica não foram sintetizados devido aos atrasos quanto a chegada dos reagentes cloretos de sulfonila alquílicos. No entanto, como este trabalho faz parte de um projeto maior de investigação de derivados triterpênicos, estes derivados que não foram apresentados neste texto serão sintetizados posteriormente.

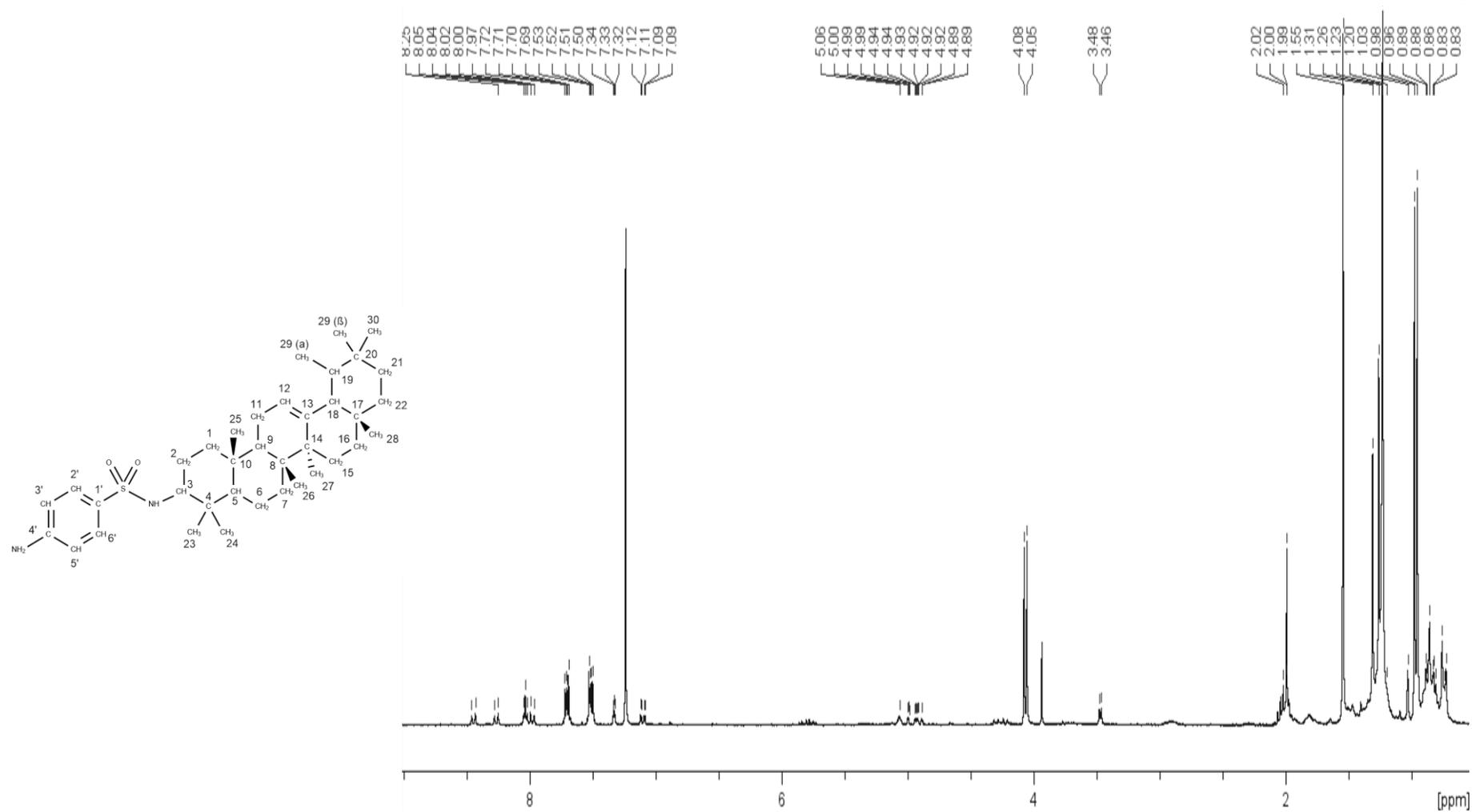
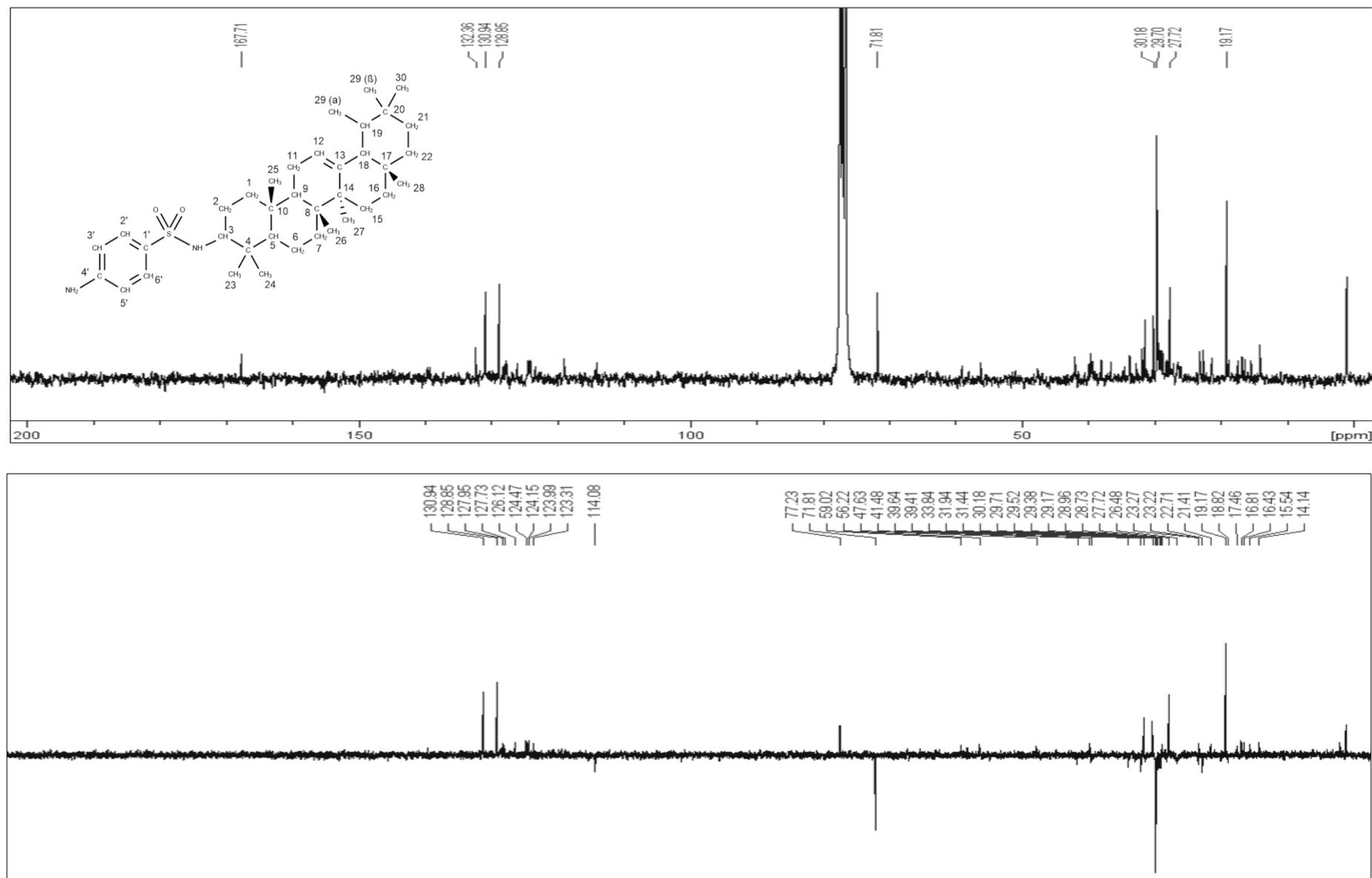
**Figura 60** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 4-amino benzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 6a/6b) (2,0 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz)

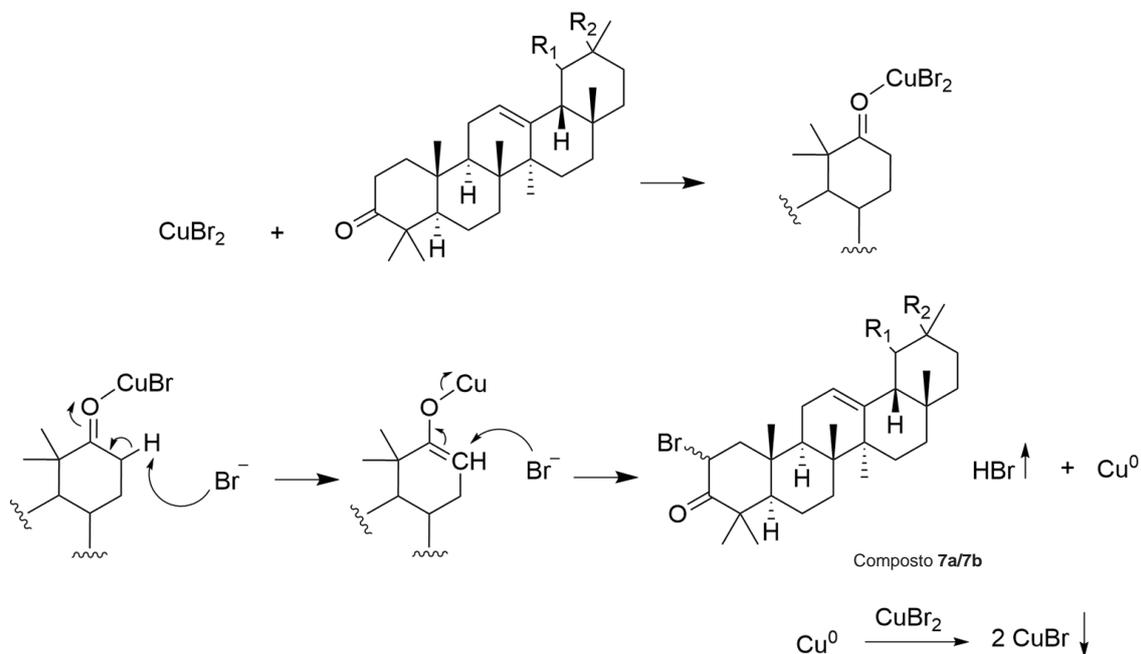
Figura 61 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de 4-aminobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 6a/6b) (2,0 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)



### 5.8 Síntese do intermediário 2-bromo-3-oxo $\alpha$ e $\beta$ amirina (7a/7b)

O composto **7a/7b** trata-se do intermediário necessário para a síntese da série de heterociclos, exceto para os derivados de código 55 e 56. O composto **7a/7b** foi sintetizado a partir do composto **1a/1b**, em uma reação de bromação do carbono adjacente a carbonila em C-3, por mecanismo de oxirredução (KING; OSTRUM, 1964; SHARLEY et al., 2016). O produto obtido para esta reação é uma  $\alpha$ -halo-cetona, um intermediário bastante utilizado para síntese de heterociclos (ERIAN; SHERIF; GABER, 2003). Nesse caso, foi utilizado o reagente brometo de cobre II ( $\text{CuBr}_2$ ) para obter-se a  $\alpha$ -bromo-cetona correspondente ao composto **7a/7b** (Figura 62).

Figura 62 - Mecanismo da reação para formação do composto 7a/7b



Obs.: A seta  $\uparrow$  indica que o  $\text{HBr}$  é volátil e  $\downarrow$  indica que  $\text{CuBr}$  precipita.

Nessa reação, um novo estereocentro é adicionado na molécula em C-2, de maneira que o produto final é uma mistura de novos isômeros. Contudo, este produto trata-se de um intermediário que através da ciclização para obtenção dos heterociclos finais, a aromatização de cada isômero levará ao mesmo sistema plano aromático.

Após as etapas de purificação, o composto **7a/7b** apresentou-se como cristais brancos com  $R_f$  de 0,4 (Hex:AcOEt 95:5). No entanto, algumas frações obtidas estavam amareladas e identificou-se pelas placas de CCD que essas amostras, além da mancha com  $R_f$  de 0,4, continham uma segunda substância identificada com  $R_f$  de 0,23 no mesmo sistema citado. As frações amareladas foram reunidas e novamente foi realizado a coluna

cromatográfica para purificação das mesmas. No entanto, observou-se que a mancha de Rf 0,23 continuava aparecendo nas frações, mesmo nas amostras que já tinham sido identificadas como puras.

Inicialmente, pensou-se que o sistema de eluição não estava sendo suficiente para separação das substâncias e dessa forma foram testados inúmeros sistemas para tentar otimizar a separação. No entanto, mesmo com sistemas com ótima separação a impureza continuava presente com o produto principal e além disso outras manchas foram identificadas com o passar do tempo nas amostras e por isso pensou-se que a amostra estivesse degradando na coluna cromatográfica. Finalmente, após alguns testes verificou-se que na verdade o produto é sensível ao ar atmosférico, provavelmente ao oxigênio.

Dessa maneira, após a separação na coluna, as frações com o produto de Rf 0,4 foram reunidas e secas em banho-maria sob jato de gás nitrogênio, até eliminação do solvente. Utilizando algumas gotas de metanol foi possível recristalizar o material e obter cristais brancos que imediatamente foram armazenados em frascos para as análises de identificação estrutural. O rendimento aproximado dessa síntese foi de 0,40 g (48,30%), no entanto, ressalta-se que houveram perdas durante os inúmeros procedimentos para purificação e certamente o rendimento é subestimado.

A massa esperada para o composto **7a/7b** era de 502,28 (C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>BrO). Essa substância foi ionizada utilizando a fonte APCI no modo negativo. Na análise do APCI-MS observou-se um íon de  $m/z$  501 [M-H] consistente com a fórmula molecular do composto desprotonado. Outro íon de  $m/z$  503 [M-H] também ocorre, devido à presença dos isótopos <sup>81</sup>Br e <sup>79</sup>Br na sua abundância natural característica.

No espectro do RMN <sup>1</sup>H, observa-se os sinais característicos do esqueleto triterpênico em 0,8 - 2,02 ppm (m). É possível observar uma região de multipletos entre 5,04 ppm e 5,18 ppm. Nessa região é provável que haja a sobreposição dos sinais relacionados aos dois tripletos referentes ao H-12 vinílico 5,17 ppm (de β-amirina) e 5,13 ppm (de α-amirina) que ocorrem no composto de partida **1a/1b**, juntamente com um duplo dubleto em 5,06 ppm ( $J = 13,52$  Hz e 6,16) que foi atribuído ao H-2 (acoplado ao H-1a e H-1e) que teve esse deslocamento devido a desblindagem conferida pelo átomo de Br e pela carbonila adjacente. Além disso, observa-se um multipletos em 2,55 ppm que foi atribuído aos H-1 (**Figura 63**).

No espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto **7a/7b** aparecem 85 sinais, sugerindo a presença de moléculas a mais correspondentes aos isômeros gerados pela reação de

bromação. Os principais sinais foram correlacionados e tabelados para cada carbono comparando-se com o composto de partida **1a/1b** (**Tabela 8**). Na análise do espectro, observa-se os sinais de  $\delta$  207,0 e  $\delta$  209,31 atribuídos ao C-3 carbonílico dos isômeros. O sinal de  $\delta$  52,5, ao qual ocorre em campo positivo no DEPT 135, foi atribuído ao carbono C-2 que está ligado ao Br e os sinais de  $\delta$  53,8 (para  $\alpha$ -amirina) e  $\delta$  52,6 (para  $\beta$ -amirina), que ocorre em campo negativo no DEPT 135, foram atribuídos ao C-1 adjacente (**Figura 64**). Com base em todas as análises, foi possível confirmar a reação de bromação para obtenção do composto **7a/7b**.

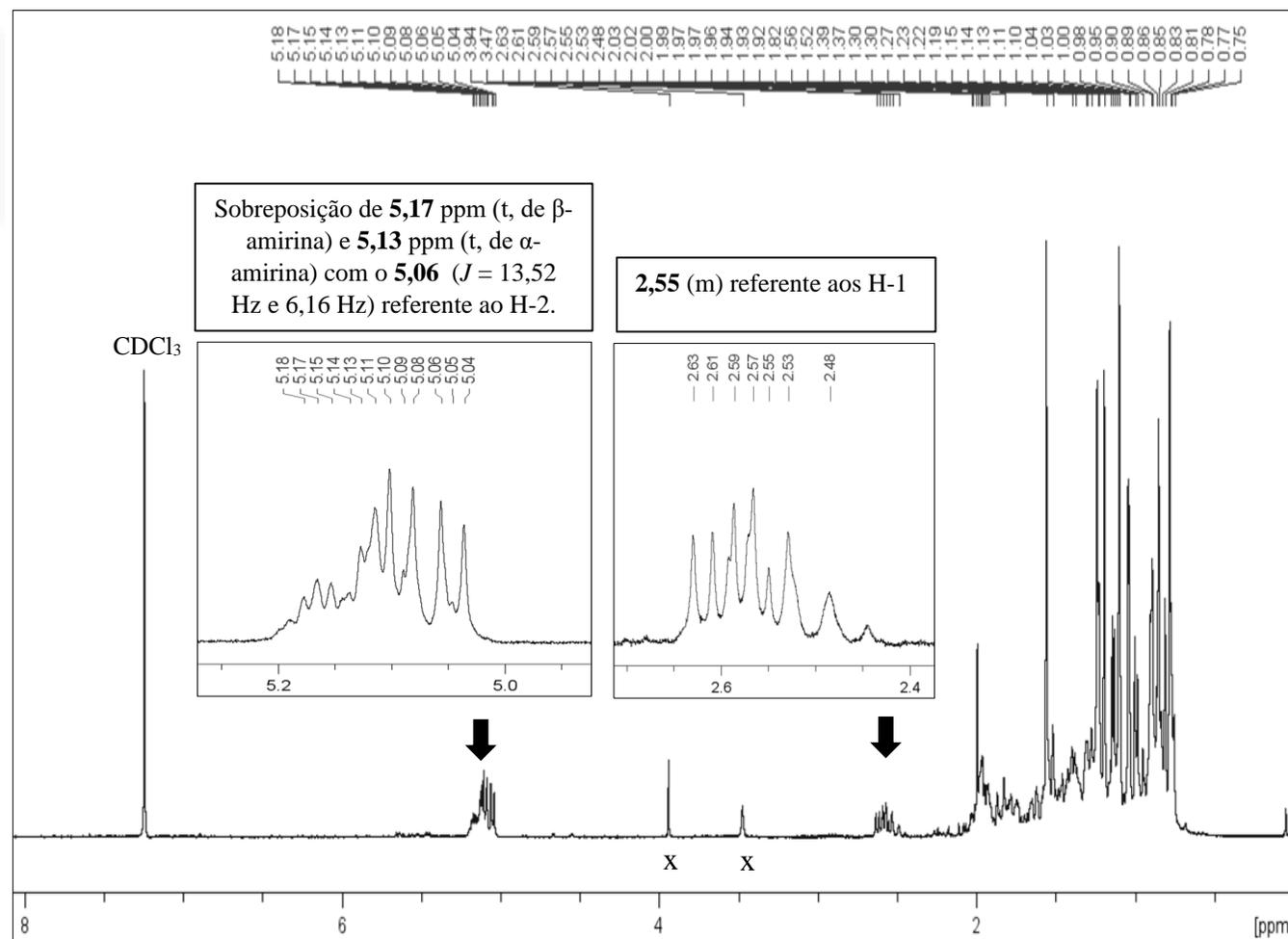
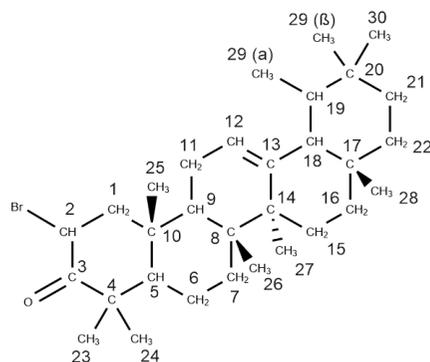
**Tabela 8** - Deslocamentos do RMN  $^{13}\text{C}$  de 2-bromo-3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto **7a/7b**) em comparação com os sinais de 3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto **1a/1b**)

Composto <b>1a/1b</b>			Composto <b>7a/7b</b>		
C	$\alpha$	$\beta$	C	$\alpha$	$\beta$
<b>1</b>	39,5	39,3	<b>1</b>	53,8	52,6
<b>2</b>	34,2	34,2	<b>2</b>	52,5	52,5
<b>3</b>	218,0	218,0	<b>3</b>	207,0	209,3
<b>4</b>	47,5	47,5	<b>4</b>	47,6	49,4
<b>5</b>	55,2	55,3	<b>5</b>	56,6	56,6
<b>6</b>	19,6	19,6	<b>6</b>	19,9	19,3
<b>7</b>	32,4	32,2	<b>7</b>	32,47	32,18
<b>8</b>	39,8	40,0	<b>8</b>	39,7	39,9
<b>9</b>	46,9	46,9	<b>9</b>	47,0	46,7
<b>10</b>	36,7	36,6	<b>10</b>	*	*
<b>11</b>	23,5	23,6	<b>11</b>	23,65	23,51
<b>12</b>	124,2	121,5	<b>12</b>	124,0	121,3
<b>13</b>	139,7	145,3	<b>13</b>	139,7	145,5
<b>14</b>	42,2	41,8	<b>14</b>	41,4	41,8
<b>15</b>	28,1	26,1	<b>15</b>	28,0	26,8
<b>16</b>	26,9	26,9	<b>16</b>	26,5	26,5
<b>17</b>	33,8	32,5	<b>17</b>	33,8	31,5
<b>18</b>	59,1	47,3	<b>18</b>	59,0	47,2
<b>19</b>	39,7	46,8	<b>19</b>	39,6	42,7
<b>20</b>	39,6	31,1	<b>20</b>	39,5	31,1
<b>21</b>	31,2	34,7	<b>21</b>	31,2	34,7
<b>22</b>	41,5	37,1	<b>22</b>	41,4	37,0
<b>23</b>	28,4	26,5	<b>23</b>	28,7	28,4
<b>24</b>	25,9	21,5	<b>24</b>	25,9	22,0
<b>25</b>	15,5	15,2	<b>25</b>	15,6	15,4
<b>26</b>	16,8	16,7	<b>26</b>	16,9	16,3
<b>27</b>	26,6	23,7	<b>27</b>	23,2	26,4
<b>28</b>	28,8	28,8	<b>28</b>	28,8	28,8
<b>29</b>	17,5	33,3	<b>29</b>	17,5	33,3
<b>30</b>	21,4	23,2	<b>30</b>	21,4	23,2

\*Não definido

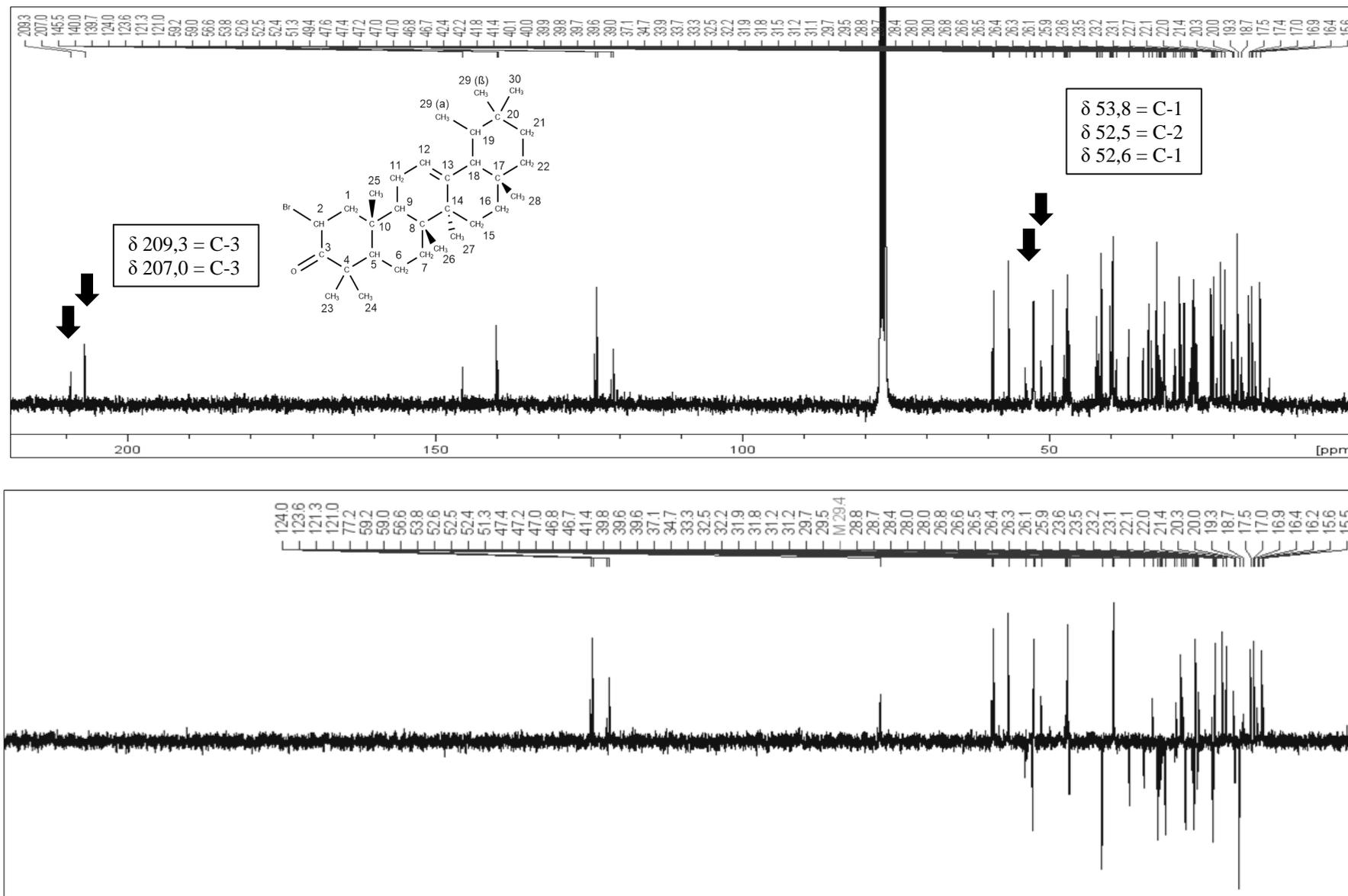
**Figura 63** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-bromo-3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 7a/7b) (5,7 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz) com ampliações

( $\delta = \text{ppm}$ )  $\delta$ : 5,04 – 5,18 (m, H-12 de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina); 5,06 (dd,  $J = 13,52 \text{ Hz}$  e  $6,16 \text{ Hz}$ , H-2); 2,55 (m, 2 H-1), 0,7 – 2,02 (m, perfil característico dos esqueletos ursano e oleanano).



X = Impurezas

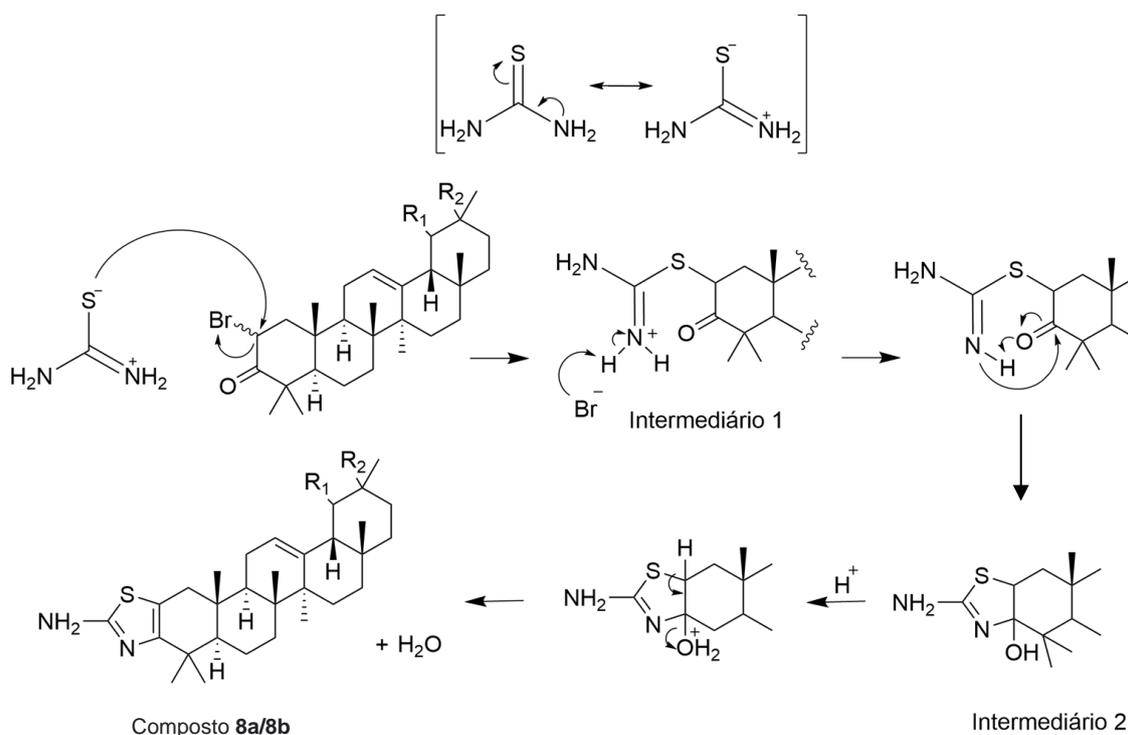
Figura 64 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de 2-bromo-3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 7a/7b) (5,7 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)



### 5.9 Síntese do derivado heterociclo aminotiazol $\alpha$ e $\beta$ amirina (**8a/8b**)

O composto **8a/8b** corresponde aos isômeros 63 e 64, selecionados no docking molecular. Para sua síntese foi utilizado o composto **7a/7b** descrito anteriormente. Essa reação consiste na reação da  $\alpha$ -halo-cetona com um nucleófilo. Nesse caso, a tiouréia realiza ataque nucleofílico sobre o carbono  $\alpha$ -carbonílico da bromo-cetona **7a/7b** fornecendo o intermediário 1. Após essa etapa, ocorre a ciclização pelo ataque nucleofílico intramolecular do par de elétrons do nitrogênio à carbonila, originando o intermediário 2, que é protonado pelo meio reacional e substituição nucleofílica intramolecular seguido por eliminação de água forma o composto **8a/8b** (DASILVA, 2013; SOUZA et al., 2005) (**Figura 65**).

**Figura 65** - Mecanismo da reação para formação do composto **8a/8b**



O composto **8a/8b** apresentou-se na forma de cristais brancos, rendimento de 0,047 g (99%), Rf de 0,25 (Hex + AcOEt 7:3 + 1% trietilamina). A massa esperada para este composto era de 480,35 (C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>S). Essa substância foi ionizada utilizando a fonte APCI no modo positivo. Na análise do APCI-MS observou-se um íon de  $m/z$  481[M+H] consistente com a fórmula molecular do composto protonado.

No espectro do RMN <sup>1</sup>H, observa-se os sinais característicos do esqueleto ursano e oleanano em 5,20 ppm (t,  $J = 3,3$  Hz, H-12 para  $\beta$ -amirina), 5,15 ppm (t,  $J = 3,4$  Hz, H-

12 para  $\alpha$ -amirina) e 0,8 - 2,02 ppm (m). Nota-se o aparecimento dos deslocamentos em 2,51 ppm (d,  $J = 15,4$ ) que foi atribuído ao H-1a de  $\alpha$ -amirina e 2,47 (d,  $J = 15,3$ ) atribuído ao H-1a de  $\beta$ -amirina. O deslocamento em 2,16 (t,  $J = 14,6$ ) foi atribuído ao H-1b. Ocorre também um singlete em 4,78 ppm que foi atribuído ao  $-\text{NH}_2$  (**Figura 66**).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **8a/8b** destacam-se o sinal de  $\delta$  164,5, que não aparece no DEPT 135, consistente com o C-1' do anel heterociclo. Os sinais de  $\delta$  151,7 e  $\delta$  116,2, que também não ocorre no DEPT 135, foram atribuídos aos C-2 e C-3 respectivamente (**Figura 67**). Os demais sinais foram tabelados e correlacionados de acordo com os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto de partida **7a/7b** (**Tabela 9**). Dessa forma foi possível confirmar a reação de ciclização para obtenção do composto **8a/8b**.

**Tabela 9** - Deslocamentos do RMN  $^{13}\text{C}$  do derivado aminotiazol  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 8a/8b) em comparação com os sinais de 2-bromo-3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 7a/7b)

Composto 7a/7b			Composto 8a/8b		
C	$\alpha$	$\beta$	C	$\alpha$	$\beta$
1	53,8	52,6	1	39,7	38,7
2	52,5	52,5	2	116,2	116,2
3	207,0	209,3	3	151,7	151,7
4	47,6	49,4	4	38,3	38,2
5	56,6	56,6	5	52,5	52,5
6	19,9	19,3	6	19,6	19,6
7	32,47	32,18	7	32,3	32,0
8	39,7	39,9	8	39,9	40,1
9	47,0	46,7	9	46,2	46,2
10	*	*	10	36,8	36,8
11	23,65	23,51	11	23,4	23,5
12	124,0	121,3	12	124,3	121,6
13	139,7	145,5	13	139,7	145,2
14	41,4	41,8	14	42,3	41,9
15	28,0	26,8	15	29,7	26,1
16	26,5	26,5	16	26,6	26,9
17	33,8	31,5	17	33,8	32,5
18	59,0	47,2	18	59,2	47,3
19	39,6	42,7	19	39,8	46,8
20	39,5	31,1	20	39,6	31,1
21	31,2	34,7	21	31,3	34,7
22	41,4	37,0	22	41,5	37,1
23	28,7	28,4	23	28,5	28,8
24	25,9	22,0	24	25,8	21,4
25	15,6	15,4	25	15,8	15,6
26	16,9	16,3	26	16,7	16,5
27	23,2	26,4	27	23,7	26,1
28	28,8	28,8	28	28,8	28,1
29	17,5	33,3	29	17,5	33,3
30	21,4	23,2	30	22,2	23,2
1'	-	-	1'	164,5	164,5

\*Não definido

**Figura 66** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado aminotiazol  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 8a/8b) (5,7 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz) com ampliações

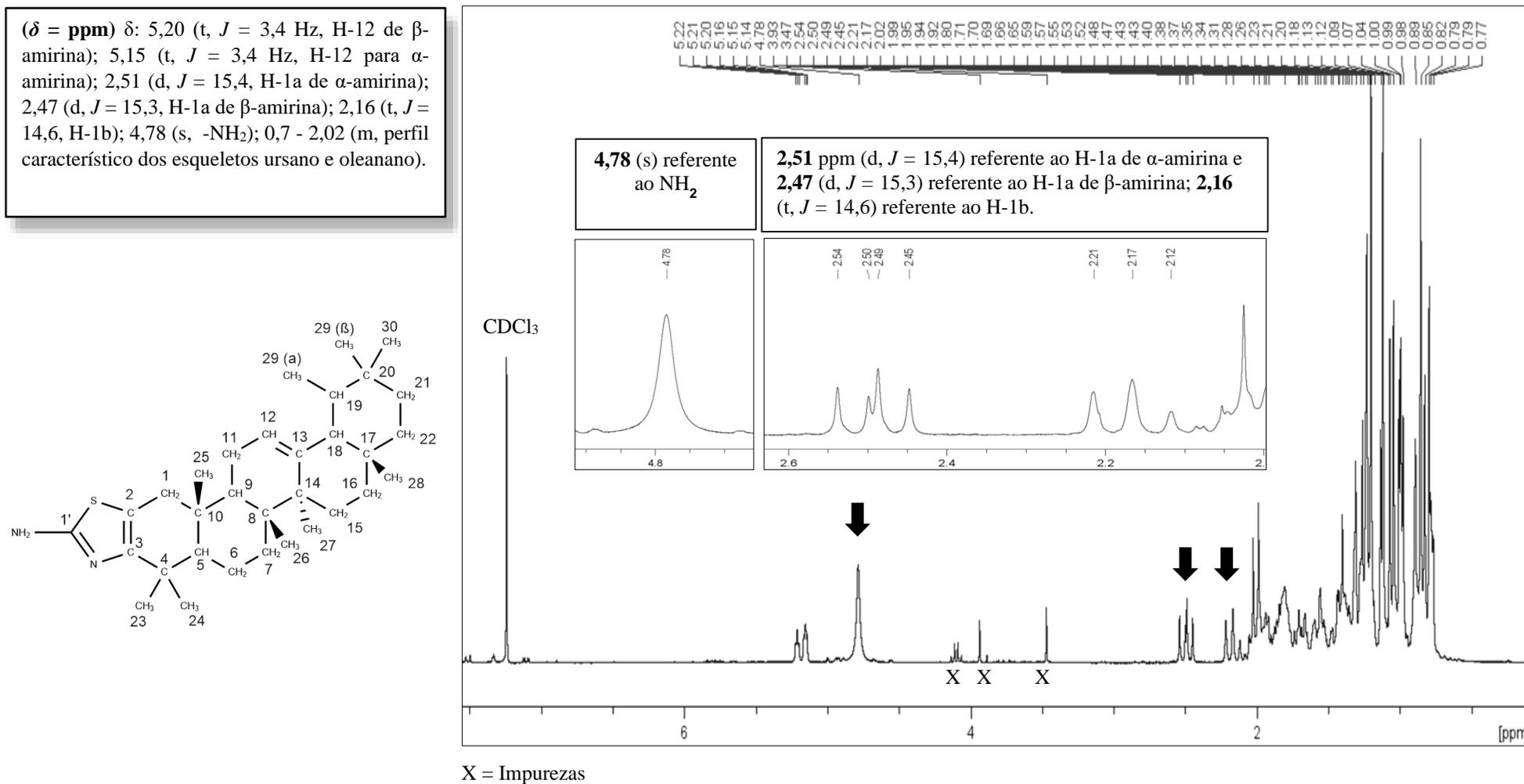
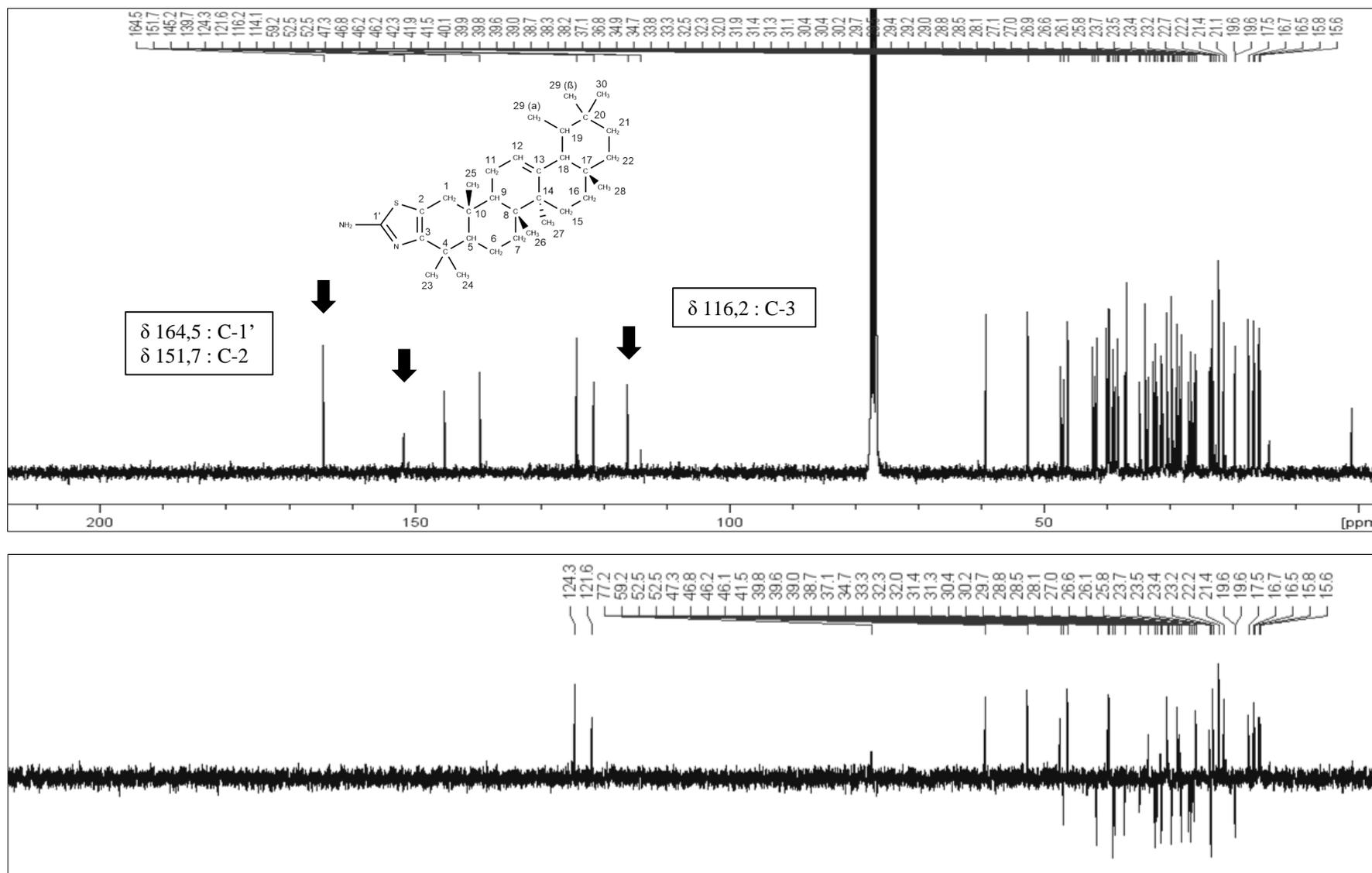


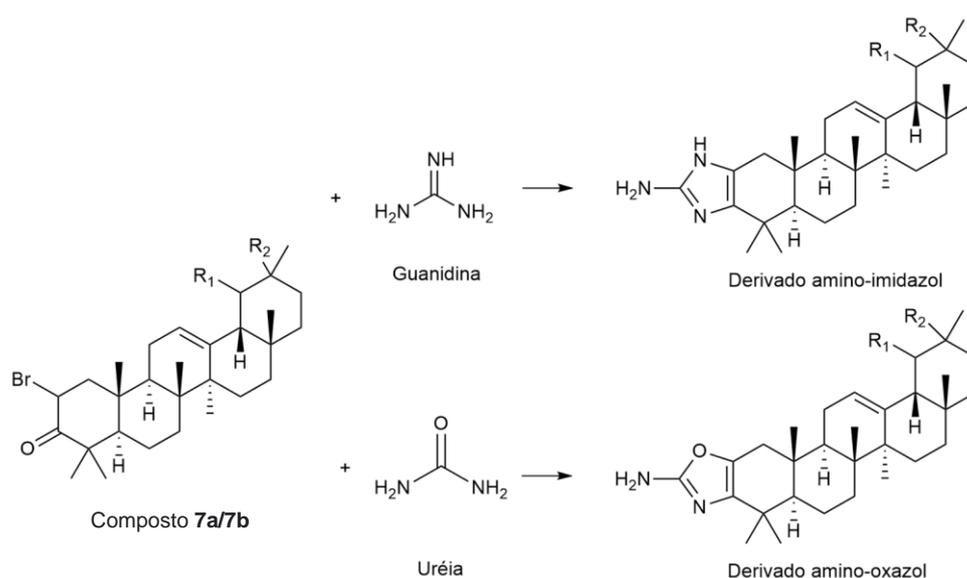
Figura 67 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 do derivado aminotiazol  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 8a/8b) (5,7 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)



### 5.10 Tentativa de síntese dos derivados heterociclos amino-oxazol e amino-imidazol

Os derivados amino-oxazol e amino-imidazol, que foram selecionados no docking molecular possuem o código 59/60 e 61/62, respectivamente (**Figura 68**). Para síntese desses derivados, foi utilizada a mesma metodologia de obtenção do derivado heterociclo aminotiazol (**8a/8b**), descrito anteriormente que consiste na reação de uma  $\alpha$ -halo-cetona (composto **7a/7b**) com um nucléofilo adequado. Para a síntese do derivado amino-oxazol, foi utilizado como nucléofilo uréia e para síntese do derivado amino-imidazol foi utilizado guanidina.

**Figura 68** - Rota de síntese dos derivados heterociclos amino-oxazol e amino-imidazol



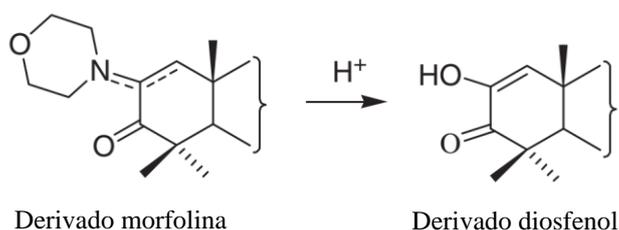
Foram testadas várias condições reacionais para síntese desses compostos. Como mencionado na metodologia, para obtenção do composto **8a/8b** foi utilizado como solvente o etanol em temperatura ambiente. Essas condições não foram suficientes para a reação ocorrer, dessa maneira modificou-se inicialmente o tipo de solvente. Foram testados os solventes morfolina, THF e piridina por pelo menos 5 dias sob agitação magnética. A reação também foi testada sob refluxo por pelo menos 8 horas, utilizando os solventes descritos. No entanto não foi possível observar o consumo do substrato, exceto no solvente morfolina.

Utilizando o solvente morfolina, tanto em temperatura ambiente como sob refluxo, observou-se a mudança de coloração do meio reacional de transparente para vermelho. Ao verificar as placas de CCD das reações tanto para o derivado amino-oxazol

quanto para o derivado amino-imidazol, foi verificada a presença de inúmeras manchas que não seriam separadas facilmente. Percebeu-se que ambas as placas das sínteses diferentes continham as mesmas manchas, então suspeitou-se que a reação estava ocorrendo com o solvente morfolina e não com o nucleófilo.

Urban et al (2012) descreveu metodologia semelhante para obtenção de derivados heterociclos a partir dos triterpenos betulina e ácido betulínico. Os autores relatam os mesmos problemas para obtenção desses anéis heterociclos e utilizaram diferentes sistemas para otimizar as sínteses. Com a utilização do solvente morfolina, o que se observou foi formação de uma mistura inseparável o qual foi atribuída a formação de derivados morfolina não esperados que hidrolisam em diosfenóis (**Figura 69**). Os autores atribuem a dificuldade para essas sínteses devido a baixa solubilidade dos compostos nos solventes orgânicos utilizados, em virtude da presença de uma carboxila em C-28 do esqueleto triterpênico do ácido betulínico. Em contrapartida, esse grupamento não ocorre no esqueleto triterpênico de  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas e da mesma forma, as reações não ocorreram.

**Figura 69** - Produtos formados pela reação com o solvente morfolina



Fonte: Urban et al (2012)

Little e Webber (1994) relatam as tentativas para síntese do composto 2-amino-4-(5) fenil imidazol pela reação de uma  $\alpha$ -bromo-cetona com guanidina. Os autores explicam que através dessa metodologia não foi possível obter o derivado desejado, havendo a formação de uma mistura complexa de difícil separação. Entretanto, ao substituir a guanidina por acetilguanidina, usando como solvente dimetilformamida sob condições brandas, foi possível obter uma reação limpa e a formação de um derivado amino-imidazol acetilado, que após hidrólise ácida foi possível obter o produto desejado inicialmente.

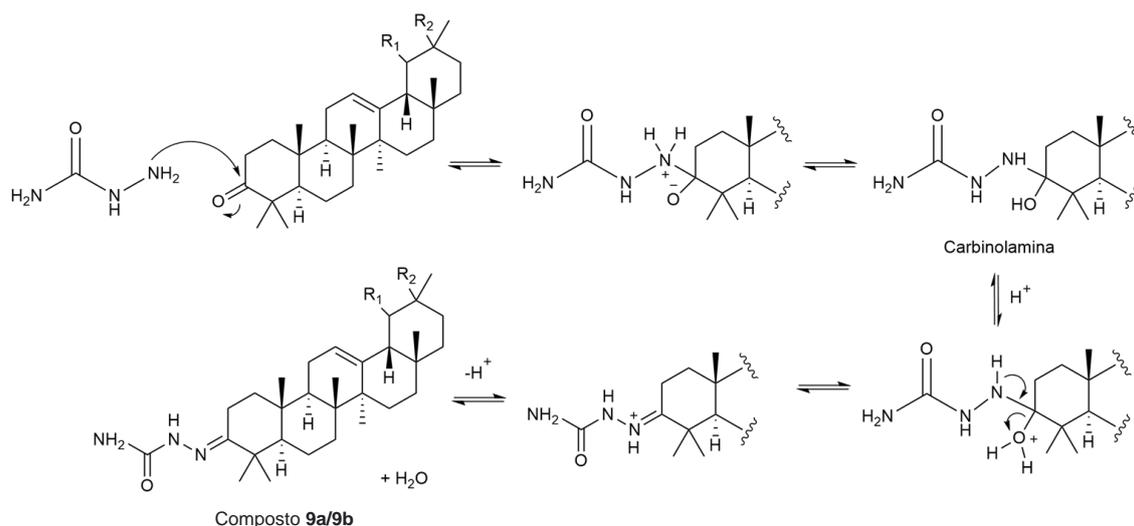
Dessa maneira, pode-se inferir que os nucleófilos utilizados para obtenção dos heterociclos não sejam reativos ou apropriados para obtenção dos compostos desejados

em uma reação direta. Novas metodologias serão testadas afim de se obter os compostos desejados.

### 5.11 Síntese do intermediário hidrazina-1-carboxamida $\alpha$ e $\beta$ amirina (9a/9b)

O composto **9a/9b** trata-se de um intermediário que foi obtido a partir do composto **1a/1b** para posterior síntese dos isômeros de código 55 e 56 selecionados anteriormente no docking molecular. O composto **9a/9b** trata-se de uma semicarbazona, que é obtida pela reação entre compostos carbonílicos e uma semicarbazida. Essa reação ocorre em duas etapas: ataque nucleofílico ao composto carbonílico pela amina da semicarbazida onde há formação de um intermediário carbinolamina e em seguida desidratação para obtenção da semicarbazona (**Figura 70**).

**Figura 70** - Mecanismo da reação para formação do composto 9a/9b



O composto **9a/9b** apresentou-se na forma de cristais amarelados, rendimento de 0,219 g (97%),  $R_f$  de 0,17 (Hex + AcOEt 8:2 + 1% trietilamina). A massa esperada para este composto era de 481,40 ( $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}$ ). Essa substância foi ionizada utilizando a fonte APCI no modo positivo. Na análise do APCI-MS observou-se um íon de  $m/z$  482  $[\text{M}+\text{H}]$  consistente com a fórmula molecular do composto protonado.

No espectro do RMN  $^1\text{H}$  observa-se os sinais característicos do esqueleto ursano e oleanano em 5,17 ppm (t,  $J = 3,3$  Hz, H-12 para  $\beta$ -amirina), 5,11 ppm (t,  $J = 3,4$  Hz, H-12 para  $\alpha$ -amirina) e 0,8 - 2,02 ppm (m). Nota-se o aparecimento dos deslocamentos em 2,35 ppm (m) que foi atribuído ao H-1a e 2,16 (m) atribuído ao H-1b. Ocorre também um

singleto em 5,28 ppm que foi atribuído ao -NH<sub>2</sub> e um singleto em 7,71 atribuído ao -NH-N= (**Figura 71**).

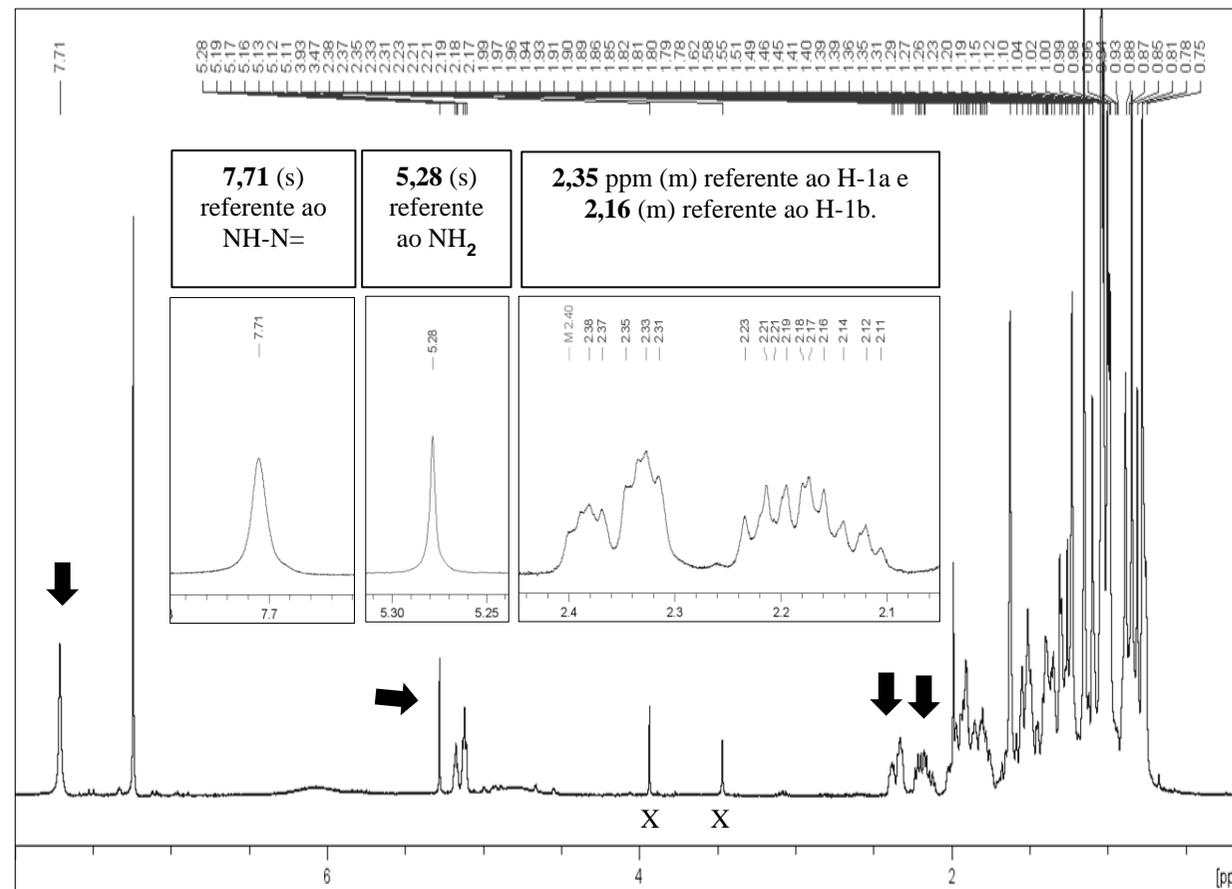
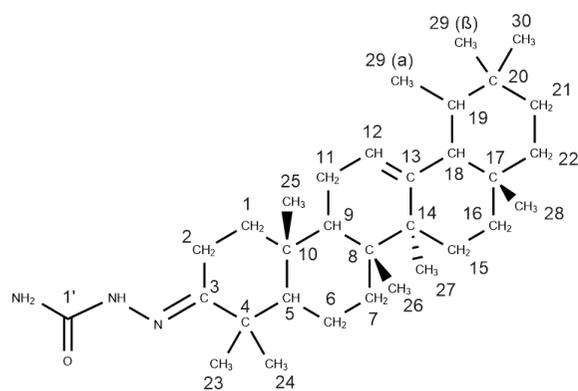
No espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto **9a/9b** ocorrem 60 sinais que foram tabelados e correlacionados com base no RMN <sup>13</sup>C do composto de partida **1a/2b** de (**Tabela 10**). Destacam-se os sinais de δ 159,0 e δ 157,8, que não aparecem no DEPT 135, e foram correlacionados aos C-3 (ligado a grupo semicarbazona) e C-1' carbonílico (pertencente a semicarbazona), respectivamente (**Figura 72**). Com base em todas as análises foi possível confirmar a obtenção do composto **9a/9b**. Futuramente, o composto **9a/9b** será utilizado para reação com o reagente cloreto de tionila para obtenção do derivado heterociclo tiadiazol (códigos 55 e 56 no docking molecular).

**Tabela 10** - Deslocamentos do RMN <sup>13</sup>C de hidrazina-1-carboxiamida α e β amirina (composto 9a/9b) em comparação com os sinais de 3-oxo α e β amirina (composto 1a/1b)

Composto 1a/1b			Composto 9a/9b		
C	α	β	C	α	β
<b>1</b>	39,5	39,3	<b>1</b>	38,2	38,0
<b>2</b>	34,2	34,2	<b>2</b>	29,7	29,7
<b>3</b>	218,0	218,0	<b>3</b>	159,0	159,0
<b>4</b>	47,5	47,5	<b>4</b>	41,2	41,2
<b>5</b>	55,2	55,3	<b>5</b>	55,3	55,3
<b>6</b>	19,6	19,6	<b>6</b>	19,6	19,5
<b>7</b>	32,4	32,2	<b>7</b>	32,6	32,3
<b>8</b>	39,8	40,0	<b>8</b>	39,8	40,0
<b>9</b>	46,9	46,9	<b>9</b>	46,8	46,8
<b>10</b>	36,7	36,6	<b>10</b>	36,7	36,6
<b>11</b>	23,5	23,6	<b>11</b>	23,5	23,6
<b>12</b>	124,2	121,5	<b>12</b>	124,2	121,5
<b>13</b>	139,7	145,3	<b>13</b>	139,7	145,3
<b>14</b>	42,2	41,8	<b>14</b>	42,2	41,8
<b>15</b>	28,1	26,1	<b>15</b>	28,1	26,1
<b>16</b>	26,9	26,9	<b>16</b>	26,5	26,9
<b>17</b>	33,8	32,5	<b>17</b>	33,8	32,5
<b>18</b>	59,1	47,3	<b>18</b>	59,1	47,3
<b>19</b>	39,7	46,8	<b>19</b>	39,7	46,7
<b>20</b>	39,6	31,1	<b>20</b>	39,6	31,1
<b>21</b>	31,2	34,7	<b>21</b>	31,2	34,7
<b>22</b>	41,5	37,1	<b>22</b>	41,5	37,1
<b>23</b>	28,4	26,5	<b>23</b>	28,4	28,6
<b>24</b>	25,9	21,5	<b>24</b>	24,0	21,4
<b>25</b>	15,5	15,2	<b>25</b>	15,1	14,9
<b>26</b>	16,8	16,7	<b>26</b>	16,9	16,8
<b>27</b>	26,6	23,7	<b>27</b>	25,9	23,7
<b>28</b>	28,8	28,8	<b>28</b>	28,8	28,8
<b>29</b>	17,5	33,3	<b>29</b>	17,5	33,3
<b>30</b>	21,4	23,2	<b>30</b>	21,4	23,2
<b>1'</b>	-	-	<b>1'</b>	157,8	157,8

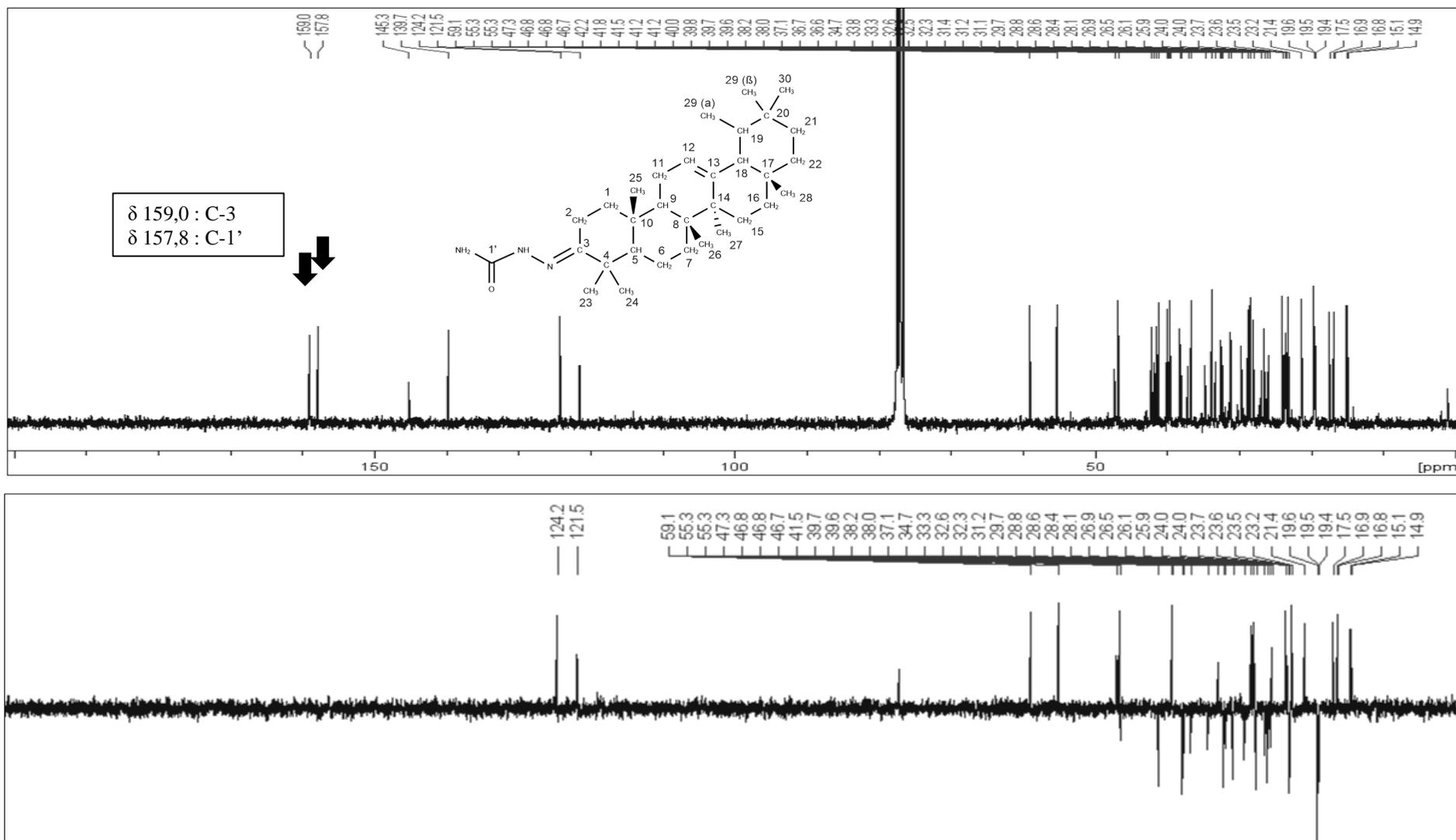
**Figura 71** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado hidrazina-1-carboxiamida  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 9a/9b) (5,2 mg;  $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz)

( $\delta = \text{ppm}$ )  $\delta$ : 7,71 (s, -NH-N=); 5,28 (s, -NH $_2$ ); 5,17 (t,  $J = 3,3$  Hz, H-12 para  $\beta$ -amirina); 5,11 (t,  $J = 3,4$  Hz, H-12 para  $\alpha$ -amirina); 2,35 (m, H-1a); 2,16 (m, H-1b); 0,7 - 2,02 (m, perfil característico dos esqueletos ursano e oleanano).



X = Impurezas

Figura 72 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de hidrazina-1-carboxiamida  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (composto 9a/9b) (5,2 mg  $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)



## 6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, foi realizado um estudo para o planejamento racional de derivados triterpênicos visando atividade antileishmania, utilizando como esqueleto base os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas. As moléculas foram desenhadas com inspiração em diferentes metodologias utilizadas na química medicinal, sendo desenvolvidas duas séries: derivados sulfonamídicos e derivados heterocíclicos.

Foram utilizadas ferramentas computacionais para o desenho, preparo e seleção dos derivados. Foi realizado docking molecular utilizando a enzima CYP51 do metabolismo lipídico de *Leishmania* sp. para a seleção das moléculas com maior probabilidade de possuírem efeito biológico contra o parasita em questão.

Foram selecionados seis derivados da série de sulfonamidas alquílicas (3/4, 5/6 e 9/10), oito derivados da série de sulfonamidas arílicas (21/22, 29/30, 41/42 e 45/46) e oito derivados da série de heterociclos (55/56, 59/60, 61/62 e 63/64) com base nas interações com os aminoácidos do sítio ativo da enzima e energia livre de ligação.

Foram sintetizados os derivados da série de sulfonamidas arílicas 29/30 (composto **5** / 4-acetamidobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina), 41/42 (composto **3** / 4-nitrobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina), 45/46 (composto **4** / 4-clorobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina) com rendimentos que variaram entre 45 – 71 %. Estas modificações moleculares, incluindo os derivados sulfonamídicos da série alquílica, são inéditas na literatura.

Da série de derivados heterocíclicos, somente os derivados 63/64 (composto **8** / derivado aminotiazol  $\alpha$  e  $\beta$  amirina), foram sintetizados com êxito, com rendimento de 99%. As modificações moleculares para essas moléculas assim como os demais derivados propostos nesta série já haviam sido reportados em triterpenos distintos, mas é a primeira vez que foram inseridos nos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas.

Em virtude da pandemia de COVID-19, que interrompeu as atividades na maioria das Instituições de Ensino e Pesquisa do país, novas tentativas para síntese dos derivados selecionados, assim como os testes de atividade antileishmania pretendidos, não puderam ser realizados. Entretanto, como descrito ao longo do texto, as sínteses serão concluídas em momento mais oportuno e, juntamente com as moléculas relatadas neste trabalho, serão encaminhadas para avaliação biológica para confirmação do seu potencial como fármacos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ALAKURTTI, S. et al. Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1573–1582, 2010.
- AMADASI, A. et al. Robust classification of “relevant” water molecules in putative protein binding sites. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 1063–1067, 2008.
- ASHENHURST, J. **Oxidation by PCC (pyridinium chlorochromate)**. Chemistry Libre Texts, 2020. Disponível em [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Organic\\_Chemistry\)/Alcohols/Reactivity\\_of\\_Alcohols/The\\_Oxidation\\_of\\_Alcohols/Oxidation\\_by\\_PCC\\_\(pyridinium\\_chlorochromate\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Alcohols/Reactivity_of_Alcohols/The_Oxidation_of_Alcohols/Oxidation_by_PCC_(pyridinium_chlorochromate)). Acesso em fevereiro de 2021.
- BAKUNOVA, S. M. et al. Structure-activity study of pentamidine analogues as antiprotozoal agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 2016–2035, 2009.
- BANKEU, J. J. K. et al. Synthesis, Urease Inhibition and Molecular Modelling Studies of Novel Derivatives of the Naturally Occurring  $\beta$ -Amyrenone. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 9, n. 1, p. 49–59, 2019.
- BARNES, E. C.; KUMAR, R.; DAVIS, R. A. The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 372–381, 2016.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 2 ed, Artmed. São Paulo, 2008.
- BARROS, F. W. A. et al. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 1268–1276, 2011.
- BASTOS, M. M. E. et al. Quimioterapia Antileishmania: Uma revisão da literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072–2104, 2016.
- BEAN, D. C.; WAREHAM, D. W. Pentamidine: a drug to consider re-purposing in the targeted treatment of multi-drug resistant bacterial infections? **Journal of Laboratory and Precision Medicine**, v. 2, p. 42–49, 2017.
- BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 560–586, 1988.
- BHATTACHARJEE, A. et al. Co-administration of glycyrrhizic acid with the antileishmanial drug sodium antimony gluconate (SAG) cures SAG-resistant visceral

leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 3, p. 268–277, 2015.

BHATTACHARYA, S. K.; SUR, D.; KARBWANG, J. Childhood visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 353–356, 2006.

BORCH, R. F.; BERNSTEIN, M. D.; DURST, H. D. The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. **Journal of the American Chemical Society**, v. 03, n. 1, p. 2897–2903, 1970.

BORGES, J. C. et al. Synthesis and in vitro Evaluation of New Benzenesulfonamides as Antileishmanial Agents. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, n. 5, p. 980–986, 2014.

BOSSOLANI, G. D. P. et al. Anti-trypanosoma activity and synergistic effects of natural and semi-synthetic triterpenes and predominant cell death through autophagy in amastigote forms. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 12, p. 2473–2489, 2017.

BOURREAU, E. et al. IL-10 producing CD8 + T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 8, p. 1034–1041, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 56, de 31 de outubro de 2018**. Brasília, 2018a. Disponível em [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/47986543](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/47986543). Acesso em janeiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. **Miltefosina para tratamento da Leishmaniose Tegumentar - Relatório de Recomendação**. Brasília, 2018b. Disponível em [http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio\\_Miltefosina\\_LeishmanioseTegumentar.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_Miltefosina_LeishmanioseTegumentar.pdf). Acesso em janeiro de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar americana**. 2 ed, Brasília, 2010. Disponível em [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_america.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_america.pdf). Acesso em janeiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar**. 1 ed, Brasília, 2017. Disponível em [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf). Acesso em janeiro de 2021.

BRAVO, J. **Development and Validation of Target-Based Drug Design Tools: Virtual Screening of Monoamine Oxidase Inhibitors**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculté des Sciences, Université de Genève. Genève, p. 200. 2009

BRUSCHI, F.; GRADONI, L. **The leishmaniasis: Old neglected tropical diseases**. 1. ed. Cham, Switzerland: Springer, 2018.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAPASSO, C.; SUPURAN, C. T. Bacterial , fungal and protozoan carbonic anhydrases as drug targets. **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 19, n. 12, p. 1–16, 2015.

CARDOSO, S. et al. Antileishmanial activity of sulphonamide nanoemulsions targeting the  $\beta$  -carbonic anhydrase from Leishmania species Antileishmanial activity of sulphonamide nanoemulsions targeting the  $\beta$  -carbonic. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 850–857, 2018.

CASTILHO, L. N. P. **Docking molecular aplicado ao estudo da formação de complexos entre análogos de resveratrol e derivados de 1,2,3-triazol e a enzima COX-2**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Carlos. São Carlos, p. 143. 2011.

CERQUEIRA, N. M. F. S. A. et al. Receptor-based virtual screening protocol for drug discovery. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 582, p. 56–67, 2015.

CHEN, J. et al. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. **Fitoterapia**, v. 103, p. 231–241, 2015.

CHOI, J. Y.; PODUST, L. M.; ROUSH, W. R. Drug strategies targeting CYP51 in neglected tropical diseases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11242–11271, 2014.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 1, p. 494–513, 2002.

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine - discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1005, n. 1, p. 54–58, 2006.

CUI, H. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis of heterocycle-modified betulinic acid derivatives as antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 240–248, 2015.

DAS, T. C.; QUADRI, S. A.; FAROOQUI, M. Recent advances in synthesis of sulfonamides. **Chemistry & Biology Interface**, v. 8, p. 194–204, 2018.

DASILVA, I. M. **Síntese e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de derivados tiazolidínicos e tiazólicos**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco, p. 192. 2013.

DECORTE, B. L. Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 9295–9304, 2016.

DEMELO, K. M. et al.  $\alpha$  ,  $\beta$  -Amyrin , a pentacyclic triterpenoid from Protium heptaphyllum suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR  $\gamma$  and C / EBP  $\alpha$  in 3T3-L1 cells. v. 109, n. November 2018, p. 1860–1866, 2019.

DEMICHELI, C. et al. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1570, n. 3, p. 192–198, 2002.

- DHORAJIWALA, T. M.; HALDER, S. T.; SAMANT, L. Applied Biotechnology Reports Comparative In Silico Molecular Docking Analysis of L-Threonine-3-Dehydrogenase , a Protein Target Against African Trypanosomiasis Using Selected Phytochemicals. **J Appl Biotechnol Rep**, v. 6, n. 3, p. 101–108, 2019.
- DÍAZ-RUIZ, G. et al. Growth inhibition of streptococcus from the oral cavity by  $\alpha$ -Amyrin esters. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12603–12611, 2012.
- DINESH, N. et al. Glycyrrhizic acid attenuates growth of Leishmania donovani by depleting ergosterol levels. **Experimental Parasitology**, v. 176, p. 21–29, 2017.
- DOMÍNGUEZ-CARMONA, D. B. et al. Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 379–382, 2010.
- ERIAN, A. W.; SHERIF, S. M.; GABER, H. M. The Chemistry of  $\alpha$ -Haloketones and Their Utility in Heterocyclic Synthesis. **Molecules**, v. 8, p. 793–865, 2003.
- FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 2015.
- FERREIRA, R. G. DA S. et al. The selective obtaining of amyryns from Amazonian Protium oleoresins. v. 49, n. 2, p. 482–497, 2020.
- FERREIRA, R. G. S. et al. Physicochemical characterization and biological activities of the triterpenic mixture  $\alpha,\beta$ -amyrenone. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1–9, 2017.
- FERSHT, A. R. et al. Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering. **Nature**, v. 314, n. 21, p. 235–238, 1985.
- FUJITA, T.; WINKLER, D. A. Understanding the Roles of the “two QSARs”. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 2, p. 269–274, 2016.
- GAUR, U. et al. An Effect of Parasite-Encoded Arginase on the Outcome of Murine Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8446–8453, 2007.
- GIMENO, A. et al. The light and dark sides of virtual screening: What is there to know? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, 2019.
- GNOATTO, S. C. B. et al. Synthesis and preliminary evaluation of new ursolic and oleanolic acids derivatives as antileishmanial agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 604–610, 2008.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.
- GREEN, J. **Semi-synthesis**. **Scripps Research**, 2012. Disponível em [https://www.scripps.edu/baran/images/grpmtgpdf/Green\\_Nov\\_12.pdf](https://www.scripps.edu/baran/images/grpmtgpdf/Green_Nov_12.pdf). Acesso em janeiro de 2021.
- GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and

Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 79–99, 2019.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Structure- and ligand-based drug design approaches for neglected tropical diseases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1857–1866, 2012.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M. Aspectos químicos e farmacológicos de Byrsonima (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1032–1041, 2011.

HAAVIKKO, R. et al. Heterocycle-fused lupane triterpenoids inhibit *Leishmania donovani* amastigote. v. 5, p. 445–451, 2014.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1–23, 2011.

HARGROVE, T. Y. et al. Substrate preferences and catalytic parameters determined by structural characteristics of sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) from *Leishmania infantum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 30, p. 26838–26848, 2011.

HEERES, J.; MEERPOEL, L.; LEWI, P. Conazoles. **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 4129–4188, 2010.

HOEVER, G. et al. Antiviral activity of glycyrrhizic acid derivatives against SARS-coronavirus. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1256–1259, 2005.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

JAIN, V.; JAIN, K. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 1, p. 161–170, 2018.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of the amyrin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 148–153, 2007.

KALGUTKAR, A. S.; JONES, R.; SAWANT, A. **Sulfonamide as an Essential Functional Group in Drug Design**. 1. ed. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2010.

KATINAS, J. et al. Sulfonamides as Inhibitors of *Leishmania* – Potential New Treatments for Leishmaniasis. **Anti-Infective Agents**, v. 15, n. 1, p. 57–62, 2017.

KAUR, G.; CHAUHAN, K.; KAUR, S. Lupeol induces immunity and protective efficacy in a murine model against visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 146, n. 11, p. 1440–1450, 2019.

KIM, J. Y.; LIVINGHOUSE, T. Chelating Diamide Based Rate Enhancement of Intramolecular Alkene Hydroaminations Catalyzed by a Neutral Sc ( III ) Complex. **Organic Letters**, v. 7, n. 20, p. 4391–4393, 2005.

KIMA, P. E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–1096, 2007.

KING, L. C.; OSTRUM, G. K. Selective Bromination with Copper(II) Bromide. **Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 1962–1964, 1964.

KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 13/14, p. 580–594, 2006.

KOLACZEK, A. et al. Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives : a brief review. **Chemik**, n. 7, p. 625–628, 2014.

KUBINYI, H. The Changing Landscape in Drug Discovery. In: STROUD, R. M. (Ed.). . **Computational and Structural Approaches to Drug Discovery: Ligand-Protein Interactions**. 1. ed. Weisenheim am Sand, Germany: The Royal Society of Chemistry, 2007. p. 24–46.

KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Methods of protein structure comparison. **Methods in Molecular Biology**, v. 857, p. 231–527, 2012.

KUMAR, P. S.; RAI, K. M. L. Reduction of aromatic nitro compounds to amines using zinc and aqueous chelating ethers: Mild and efficient method for zinc activation. **Chemical Papers**, v. 66, n. 8, p. 772–778, 2012.

KURKIN, A. V et al. Synthesis of nonracemic 9-(1-methoxycarbonylethyl)-1,2,3,4-tetrahydrocarbazole. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 39, n. 11, p. 1466–1477, 2003.

KVASNICA, M. et al. Pentacyclic triterpenoids with nitrogen- and sulfur- containing heterocycles: synthesis and medicinal significanc. **Natural Product Reports**, v. 00, p. 1–28, 2015.

LI, Z. et al. Design and synthesis of triazolyl-naphthyl derivative of B-amyrin and its in vitro anti-cancer and apoptotic activities in human nasopharyngeal carcinoma (HK-1) cell line. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 11, p. 168–174, 2016.

LIMA, L.; BARREIRO, E. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23–49, 2005.

LITTLE, T. L.; WEBBER, S. E. A Simple and Practical Synthesis of 2-Aminoimidazoles. **Journal of Organic Chemistry**, v. 59, p. 7299–7305, 1994.

MACHADO, V. R. et al. Synthesis of lupeol derivatives and their antileishmanial and antitrypanosomal activities. **Natural Product Research**, v. 32, n. 3, p. 275–281, 2018.

MACKEY, T. K. et al. Emerging and reemerging neglected tropical diseases: A review

of key characteristics, Risk factors, And the policy and innovation environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 949–979, 2014.

MAJUMDER, G. K. **Advances in Experimental Medicine and Biology - Drug Targets in Kinetoplastid Parasites**. New York, U.S.A.: Landes Bioscience and Springer Science, 2008.

MALLAVADHANI, U. V. et al. Antimicrobial Activity of Some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-O-Lipophilic Chains. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1576–1579, 2004.

MARTÍNEZ, F. VARGAS; TORRES GUERRERO, E; ARENAS, R; QUINTANILLA CEDILLO, M. R. Filiacion en mexico.pdf. **Medicina Cutánea Ibero-latino-americana**, v. 39, n. 4, p. 163–183, 2011.

MCCALL, L. I. et al. Targeting Ergosterol Biosynthesis in *Leishmania donovani*: Essentiality of Sterol 14 $\alpha$ -demethylase. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–17, 2015.

MELO, T. S. et al. Oleanolic acid (OA) as an antileishmanial agent: Biological evaluation and in silico mechanistic insights. **Parasitology International**, v. 65, n. 3, p. 227–237, 2016.

MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. **Frontiers in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1153–1169, 2007.

MORRISON, K. C.; HERGENROTHER, P. J. Natural products as starting points for the synthesis of complex and diverse compounds. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 1, p. 6–14, 2014.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561–1577, 2005.

MUXEL, S. M. et al. Arginine and polyamines fate in leishmania infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–15, 2018.

NARANJO-MONTOYA, O. A. et al. The correlation between electronic structure and antimalarial activity of Tetrahydropyridines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 255–265, 2015.

NARENDER, T. et al. Synthesis of  $\alpha$ -amyrin derivatives and their in vivo antihyperglycemic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 1215–1222, 2009.

NARENDER, T. et al. Synthesis of novel triterpene and N-allylated/N-alkylated niacin hybrids as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 162–169, 2013.

NETO, S. F. **Desenvolvimento e caracterização físico, química e biológica in vitro de nanopartículas poliméricas contendo  $\alpha$ - $\beta$  amirina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Amazonas. Amazonas, 89 p. 2018.

NOGUEIRA, A. O. et al. Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyryn from *Protium heptaphyllum*: a literature review. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 4–12, 2019.

OLANDA, C. G. Modelagem molecular de novos compostos derivados da ribavirina como candidatos a fármacos para o controle da dengue. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 59. 2016.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas**. n. 9, dezembro de 2020. Disponível em <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>. Acesso em janeiro de 2021.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5 ed, Oxford University Press. Oxford, United Kingdom, 2013.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 171–177, 2007.

PICCIRILLO, E.; DO AMARAL, A. T. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Quimica Nova**, v. 41, n. 6, p. 662–677, 2018.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017.

RAMÍREZ, D.; CABALLERO, J. Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available Structural Data? **Molecules**, v. 23, n. 1038, p. 1–17, 2018.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Annales de Dermatologie et de Venereologie**, v. 7, p. 581–596, 2007.

RHOURRI-FRIH, B. et al. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC – MS . A comparative study between APCI and APPI. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 2008, n. October 2008, p. 71–80, 2009.

ROOHBAKHSH, A.; IRANSHAHY, M.; IRANSHAHI, M. Glycyrrhetic Acid and Its Derivatives: Anti-Cancer and Cancer Chemopreventive Properties, Mechanisms of Action and Structure- Cytotoxic Activity Relationship. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 498–517, 2016.

ROSE, P. W. et al. The RCSB protein data bank: Integrative view of protein, gene and 3D structural information. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 1, p. 271–281, 2017.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites

have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2017.

RÜDIGER, A. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemodiversity of ursane- and oleanane-type triterpenes in amazonian burseraceae oleoresins. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 6, p. 1142–1153, 2013.

SACHDEVA, H.; SHARMA, M. Clinical manifestations of leishmaniasis: A review. **International Journal of Advanced Research in Science, Engineering and Technology**, v. 3, n. 12, p. 3093–3095, 2016.

SÁ, F. A. P. **Desenvolvimento de sistemas de liberação de paromomicina visando o tratamento tópico passivo e iontoforético de lesões decorrentes da leishmaniose tegumentar**. Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília, p. 75. 2020.

SAHYOUN, T.; ARRAULT, A.; SCHENEIDER, R. Amidoximes and Oximes: Synthesis, Structure, and Their Key Role as NO Donors. **Molecules**, v. 24, n. 2470, p. 1–19, 2019.

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

SHARLEY, J. S. et al. a,b-Unsaturated ketones via copper(II) bromide mediated oxidation. **Tetrahedron**, v. 72, p. 2947–2954, 2016.

SHENG, H.; SUN, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: A multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 3, p. 543–593, 2011.

SHIRZADI, M. R. Liposomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 10, p. 11–18, 2019.

SIDDIQUE, H. R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. **Life Sciences**, v. 88, n. 7–8, p. 285–293, 2011.

SIFAQUI, I. et al. Selective activity of oleanolic and maslinic acids on the amastigote form of *Leishmania* spp. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 3, p. 1192–1195, 2017.

SILVA, E. R. et al. Ethnopharmacological Evaluation of Breu Essential Oils from Protium Species Administered by Inhalation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 10, 2017.

SILVA, R. A. **Aminação redutiva de aldeídos e cetonas promovida por zinco em meio aquoso**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco, p. 107. 2007.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L.* (L.) *amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–431, 2009.

SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. **The organic chemistry of drug design and drug action**. 3 ed, Elsevier. San Diego, U.S.A, 2014.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKEŠ, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168–174, 2006.

SNEADER, W. **Drug Discovery: A History**. 1. ed. Glasglow, UK: John Wiley & Sons, 2005.

SOLDI, C. et al. Synthetic derivatives of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 3377–3386, 2008.

SOUSA, M. C. et al. Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: Synergistic effects with miltefosine. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–12, 2014.

SOUZA, M. V. N. DE et al. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 77–84, 2005.

SPIVAK, A. Y. et al. Antimicrobial properties of amine- and guanidine-functionalized derivatives of betulinic, ursolic and oleanolic acids: Synthesis and structure / activity evaluation. **Steroids**, v. 154, n. 108530, 2020.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

SUPURAN, C. T. Special Issue : Sulfonamides. 2017.

TELEDYNE ISCO. **Effective Organic Compound Purification**. 4 ed, Teledyne Isco. U.S.A., 2010.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 1–15, 2017.

TRIGUEIRO, N. D. et al. Estudo fitoquímico das folhas de *Cordia rufescens* A. DC (Cordiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 79524–79535, 2020.

URBAN, M. et al. Cytotoxic heterocyclic triterpenoids derived from betulin and betulinic acid. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3666–3674, 2012.

VÀZQUEZ, L. H.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A. The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities. In: RAO, V. (Ed.). **Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. [s.l.] In Tech, 2012. v. 426p. 487–502.

VERA-IZAGUIRRE, D. S. et al. Leishmaniasis. Revision. **Dermatologia Cosmetica, Medica y Quirurgica**, v. 4, n. 4, p. 252–260, 2006.

VERDONK, M. L. et al. Improved Protein–Ligand Docking Using GOLD. v. 52, p. 609–623, 2003.

VICTOR, M. M. et al. Synthesis and evaluation of cytotoxic effects of amino-ester derivatives of natural  $\alpha,\beta$ -amyrin mixture. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2155–2162, 2017.

VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WALKER, J.; SARAVIA, N. G. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1155–1162, 2004.

WARFIELD, J.; SETZER, W. N.; OGUNGBE, I. V. Interactions of antiparasitic sterols with sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) of human pathogens. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2014.

WESTBROOK, J. D.; BURLEY, S. K. How Structural Biologists and the Protein Data Bank Contributed to Recent FDA New Drug Approvals. **Structure**, v. 27, n. 2, p. 211–217, 2019.

WHO, World Health Organization. **About Neglected Tropical Diseases**, 2017. Disponível em [https://www.who.int/neglected\\_diseases/global-partners-meeting/Approach/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/global-partners-meeting/Approach/en/). Acesso em janeiro de 2021.

WHO, World Health Organization. **Leishmaniasis: Situation and trends**, 2020a. Disponível em <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/leishmaniasis>. Acesso em janeiro de 2021.

WHO, World Health Organization. **Leishmaniasis**, 2020b. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em janeiro de 2021.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 261–291, 2004.

YAMAMOTO, E. S. et al. The effect of ursolic acid on leishmania (*Leishmania*) amazonensis is related to programmed cell death and presents therapeutic potential in experimental cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–19, 2015.

YOUN, S. W.; KO, T. Y.; JANG, Y. H. Homogeneous Catalysis Palladium-Catalyzed Regioselective Synthesis of 3-Arylindoles from N - Ts-Anilines and Styrenes. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 56, p. 1–6, 2017.

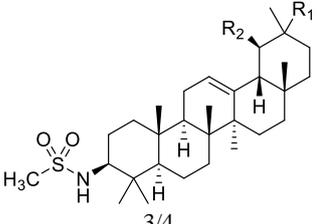
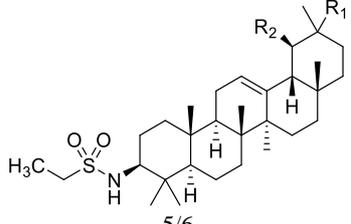
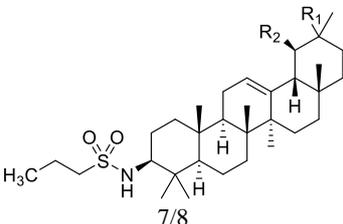
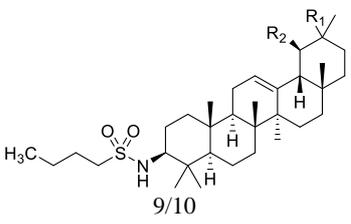
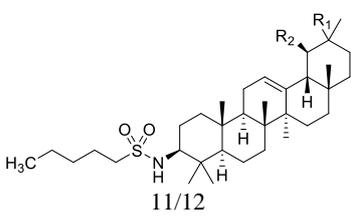
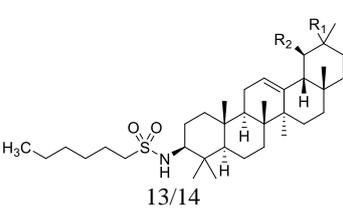
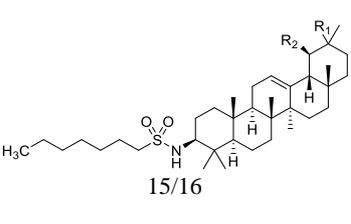
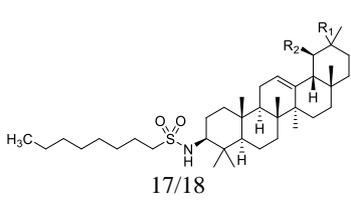
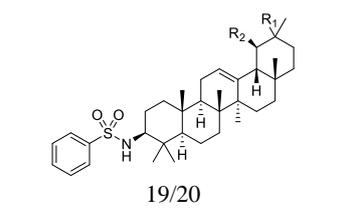
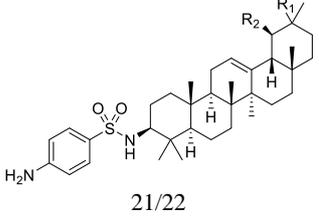
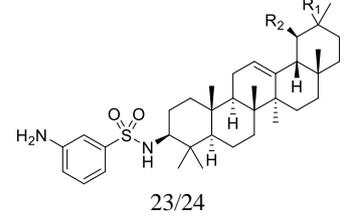
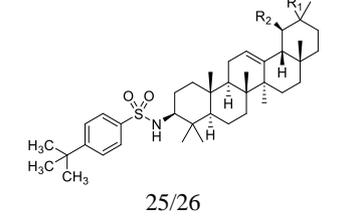
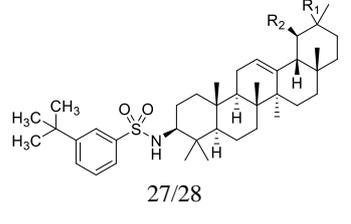
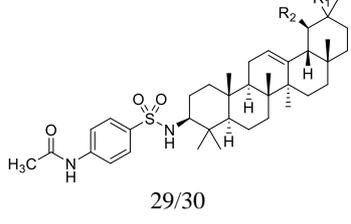
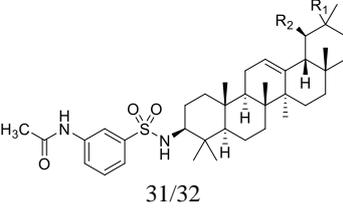
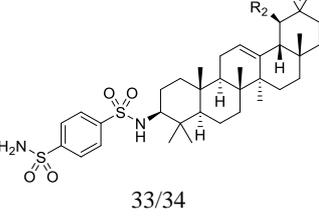
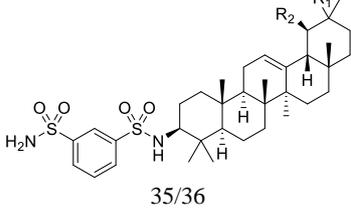
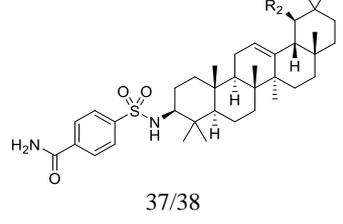
YOUSUF, Z. et al. Structure-based virtual screening and molecular docking for the identification of potential biofilm inhibitors. **Breast Cancer - Targets and Therapy**, v.

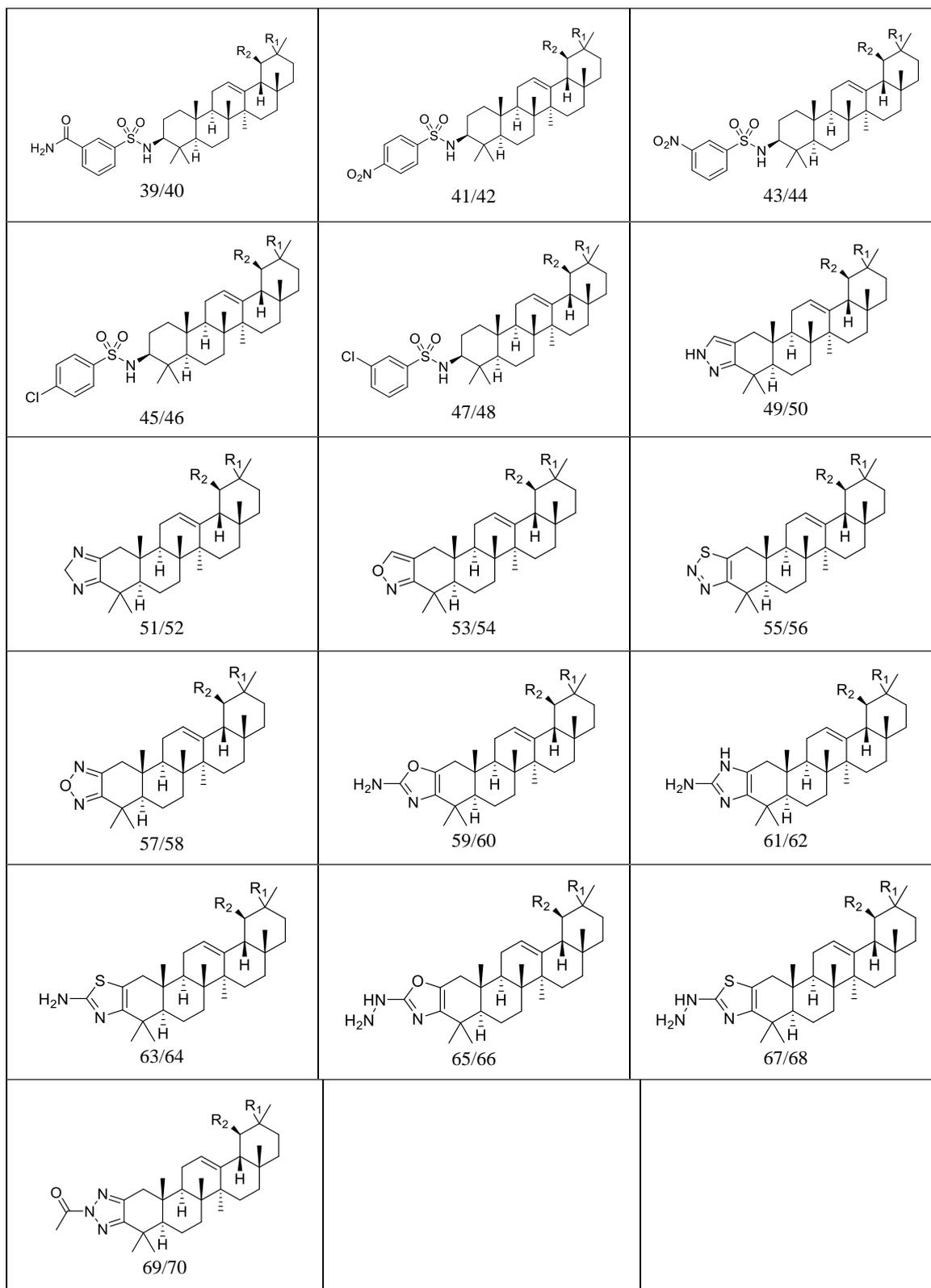
9, p. 447–459, 2017.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 449–70, 1994.

## APÊNDICE A

### Estruturas dos derivados triterpênicos e seus respectivos códigos

 3/4	 5/6	 7/8
 9/10	 11/12	 13/14
 15/16	 17/18	 19/20
 21/22	 23/24	 25/26
 27/28	 29/30	 31/32
 33/34	 35/36	 37/38



R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub> (esqueleto α-amirina); R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H (esqueleto β-amirina)

## APÊNDICE B

### Docking molecular dos derivados triterpênicos – Série Sulfonamidas Alquílicas

Derivado*	Energia (kcal/mol)	Pontuação Chemscore	Ligação-H	$\pi$ -Enxofre	$\pi$ - $\pi$ Stacked/T	Metal	$\pi$ -Cátion	$\pi$ -Sigma	Número de colisões desfavoráveis
<b>3</b>	<b>-6,9605</b>	<b>42,8092</b>	<b>Tyr 115</b>	<b>Hem 481 Phe 109 Tyr 115</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Tyr 102</b>	<b>0</b>
<b>4</b>	<b>-8,0953</b>	<b>44,0774</b>	<b>Tyr 115</b>	<b>Hem 481 Phe 109 Tyr 115</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>5</b>	<b>-8,7928</b>	<b>46,5101</b>	<b>Tyr 115</b>	<b>Hem 481 Phe 109 Tyr 115</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>6</b>	<b>-8,3782</b>	<b>46,0609</b>	<b>Tyr 115</b>	<b>Hem 481 Phe 109 Tyr 115</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
7	-7,9593	49,552	Tyr 115	Hem 481 Tyr 115	0	0	0	0	1
8	-6,9341	48,5168	Tyr 115	Phe 481 Tyr 115	0	0	0	0	1
<b>9</b>	<b>-7,6956</b>	<b>50,7679</b>	<b>Tyr 115</b>	<b>Hem 481 Phe 109 Tyr 115</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>10</b>	<b>-8,2781</b>	<b>50,2935</b>	<b>Tyr 115</b>	<b>Hem 481 Tyr 115</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
11	-6,0069	50,5532	Tyr 115	Phe 109 Tyr 115	0	0	0	Tyr 102	4
12	-8,3953	53,0947	Tyr 115	Hem 481 Tyr 115	0	0	0	0	1
13	-6,7371	51,8446	0	0	0	0	0	0	3
14	-5,5803	50,7089	Hem 481	0	0	Hem 481	0	0	8
15	-8,3166	53,9446	0	0	0	0	0	0	3
16	-5,7839	53,5176	Hem 481	0	0	0	Hem 481	Tyr 102	6
17	-5,9826	53,9689	0	0	0	0	0	0	3
18	-9,6573	54,6914	0	Phe 289	0	0	1	0	9

\*Em negrito estão destacados os derivados selecionados

## APÊNDICE C

## Docking molecular dos derivados triterpênicos – Série Sulfonamidas Arílicas

Derivado*	Energia (kcal/mol)	Pontuação Chemscore	Ligação-H	$\pi$ -Enxofre	$\pi$ - $\pi$ Stacked/T	Metal	$\pi$ -Cátion	$\pi$ -Sigma	Número de colisões desfavoráveis
19	-6,6464	50,8308	2 em Hem 481	0	Hem 481 Phe 109	Hem 481	0	0	12
20	-5,5177	49,0332	2 em Hem 481	0	Hem 481	Hem 481	0	0	7
<b>21</b>	<b>-6,5975</b>	<b>50,2602</b>	<b>2 em Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>Hem 481 Phe 109</b>	<b>Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
<b>22</b>	<b>-8,8415</b>	<b>57,9942</b>	<b>Hem 481</b>	<b>Phe 289</b>	<b>Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
23	-7,5179	50,3774	Hem 481 Ala 286	0	0	Hem 481	0	0	8
24	-6,7237	50,0312	Hem 481 Ala 286	0	Hem 481	Hem 481	0	0	9
25	-7,9621	55,0584	0	Phe 289	0	0	0	0	1
26	-9,1077	53,9863	0	Phe 289	0	0	0	0	1
27	-6,63865	54,9289	0	0	Phe 48	0	0	0	7
28	-2,7063	51,7581	0	0	0	0	0	0	8
<b>29</b>	<b>-6,5667</b>	<b>51,1002</b>	<b>Tyr 115 2 Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>Phe 109 Hem 481</b>	<b>Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
<b>30</b>	<b>-9,7141</b>	<b>51,1694</b>	<b>Tyr 115</b>	<b>Phe 289</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
31	-2,9137	50,0429	Hem 481 Tyr 115	0	Hem 481	Hem 481	0	Tyr 102	11
32	-4,0211	50,7912	Hem 481 Tyr 115	0	Hem 481	0	0	0	10
33	-8,6784	47,2418	Tyr 115	Phe 289	Hem 481	0	0	0	6
34	-7,7639	48,5161	Tyr 115	Phe 289	Hem 481	0	0	0	6
35	-1,1756	45,6146	Hem 481 Tyr 115	0	Hem 481	Hem 481	0	Hem 481	14
36	-4,5695	45,3365	Hem 481 Tyr 115	0	Hem 481	0	0	0	14
37	-6,7787	49,8891	Tyr 115	Phe 289	0	0	0	0	3
38	-6,0631	50,8267	Tyr 115	Phe 289	Phe 109	0	0	0	5
39	-4,4488	48,3465	Hem 481 Tyr 115	0	0	Hem 481	0	0	4
40	-6,1721	49,2992	Hem 481 Tyr 115	0	Hem 481	0	0	0	8
<b>41</b>	<b>-6,7374</b>	<b>49,247</b>	<b>2 em Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>Hem 481 Phe 109</b>	<b>Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8</b>

<b>42</b>	<b>-10,2193</b>	<b>51,2695</b>	<b>Tyr 115</b>	<b>Phe 289</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
43	-3,8831	49,5349	Tyr 115 Hem 481	0	Hem 481	Hem 481	0	0	11
44	-4,6692	49,2943	Tyr 115 2 Hem 481	0	Hem 481	Hem 481	0	0	13
<b>45</b>	<b>-7,552</b>	<b>52,8937</b>	<b>2 em Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>Hem 481 Phe 109</b>	<b>Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8</b>
<b>46</b>	<b>-7,0014</b>	<b>52,2874</b>	<b>2 em Hem 481</b>	<b>Hem 481</b>	<b>Hem 481 Phe 109</b>	<b>Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8</b>
47	-9,4624	49,7982	0	Phe 289	0	0	0	0	6
48	-9,716	49,8101	0	Phe 289	0	0	0	0	6

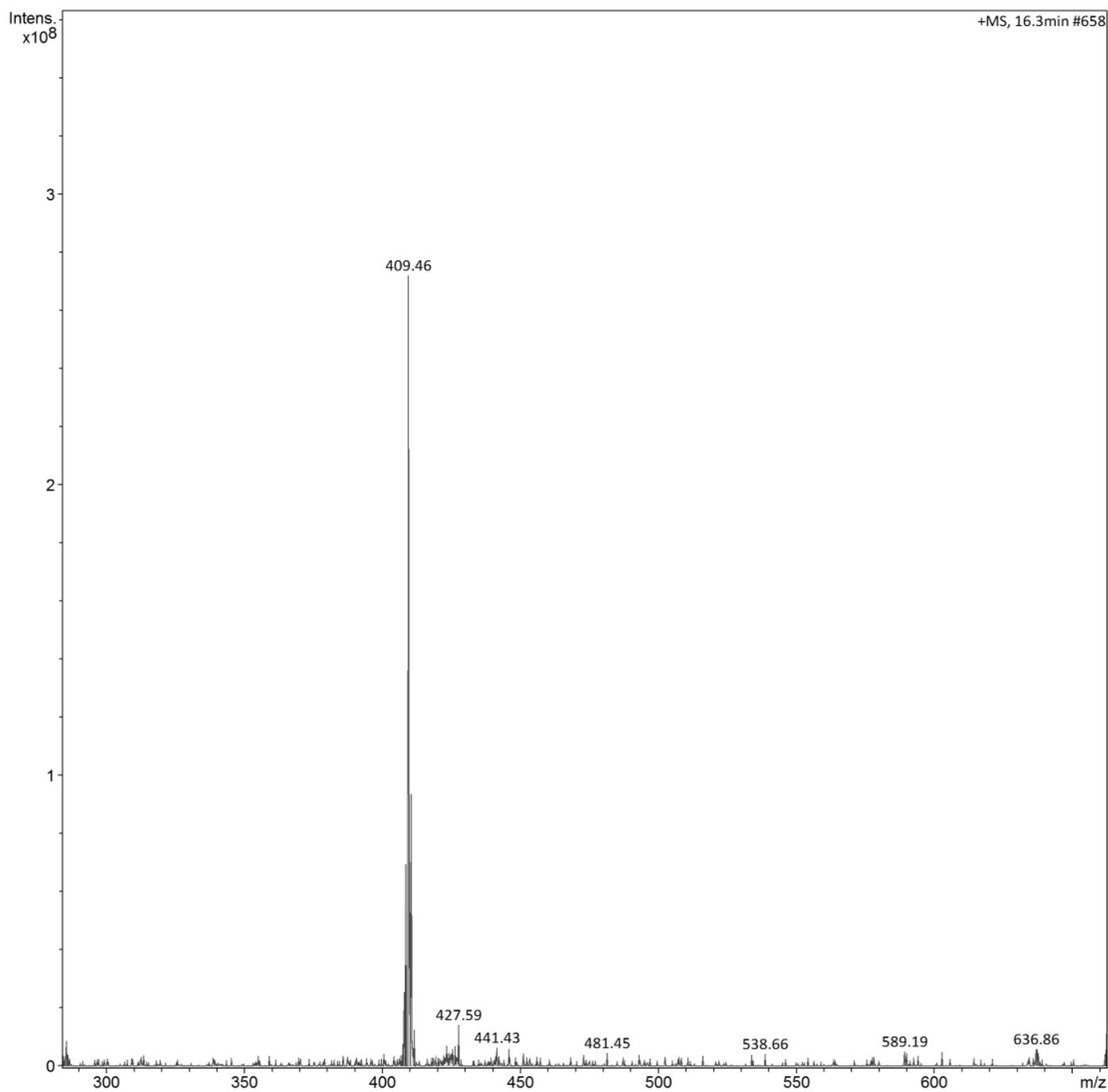
\*Em negrito estão destacados os derivados selecionados

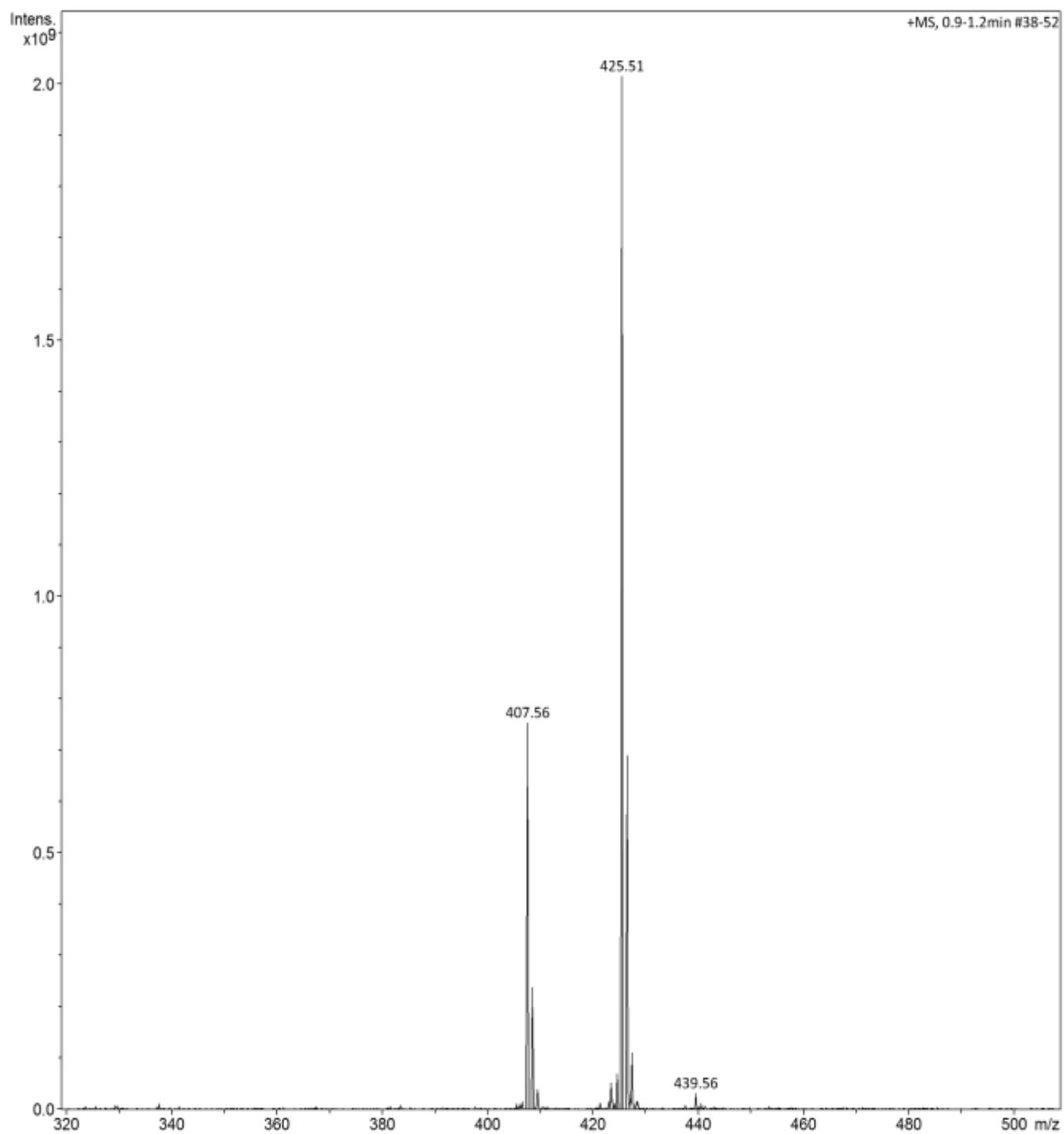
## APÊNDICE D

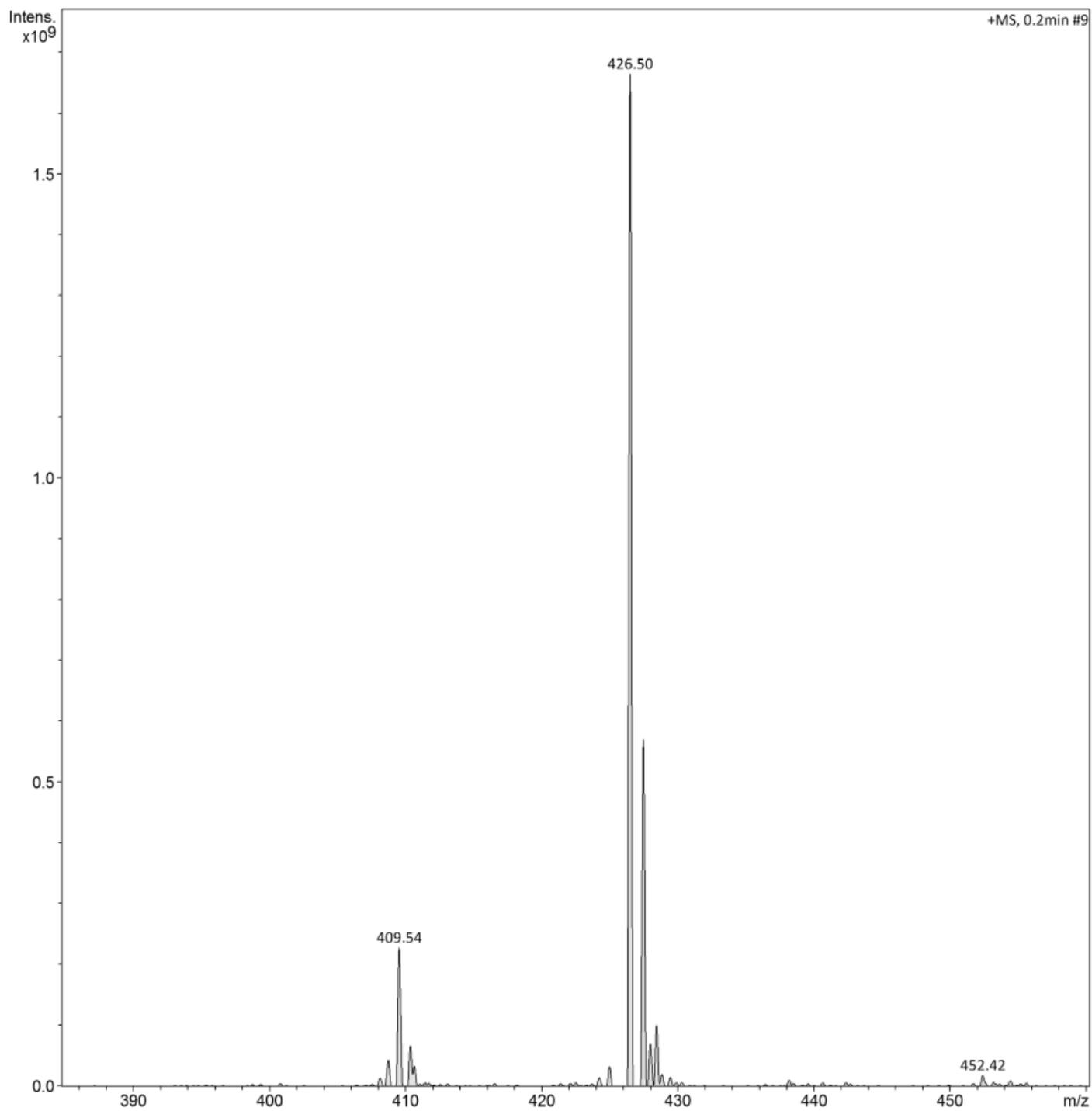
## Docking molecular dos derivados triterpênicos – Série Heterocíclicos

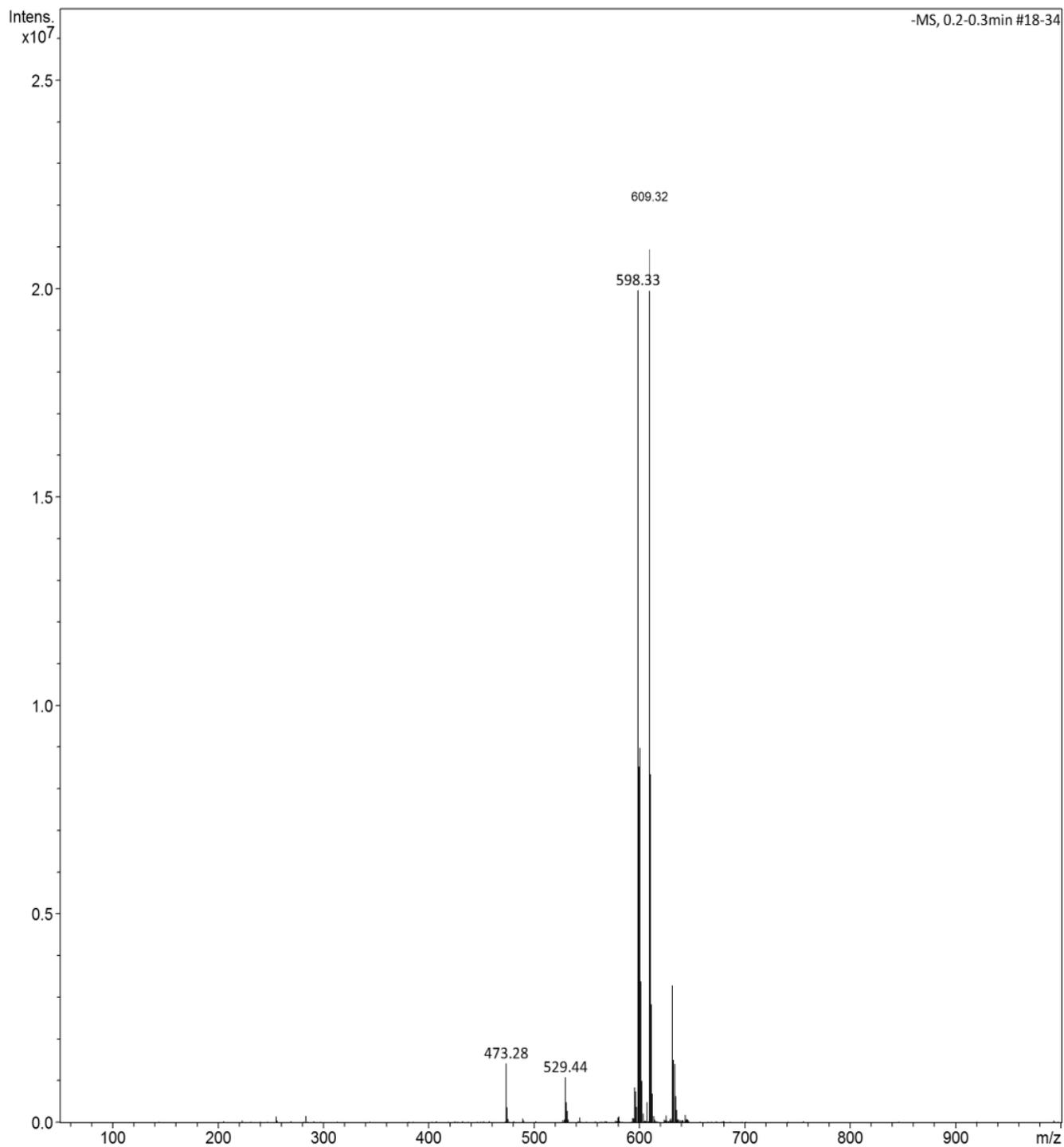
Derivado*	Energia (kcal/mol)	Pontuação Chemscore	Ligação-H	$\pi$ -Enxofre	$\pi$ - $\pi$ Stacked/T	Metal	$\pi$ -Cátion	$\pi$ -Sigma	Número de colisões desfavoráveis
49	-6,4942	50,4831	Ala 290	0	0	0	0	0	1
50	-6,7058	50,7054	Ala 290	0	0	0	0	0	0
51	-2,5678	47,5945	Tyr 115	0	0	0	0	0	11
52	-6,2749	45,1035	Hem 481	0	0	0	0	Hem 481	1
53	-3,5635	56,2476	Hem 481	0	0	0	0	Hem 481	3
54	-5,0629	56,8717	0	0	0	0	0	Hem 481	1
<b>55</b>	<b>-4,116</b>	<b>54,0617</b>	<b>Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
<b>56</b>	<b>-8,8988</b>	<b>54,2062</b>	<b>2 em Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
57	-2,2517	47,6753	Tyr 115	0	Phe 109	0	0	0	14
58	-2,5547	46,4114	Hem 481	0	Hem 481	0	0	Hem 481	1
<b>59</b>	<b>-7,8579</b>	<b>52,429</b>	<b>Hem 481 Ala 290</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Leu 355</b>	<b>3</b>
<b>60</b>	<b>-9,4338</b>	<b>53,4303</b>	<b>Hem 481 Ala 290 Thr 294</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Leu 355</b>	<b>4</b>
<b>61</b>	<b>-7,3531</b>	<b>52,3011</b>	<b>Hem 481 Ala 290</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Leu 355</b>	<b>5</b>
<b>62</b>	<b>-8,9893</b>	<b>53,0973</b>	<b>Hem 481 Ala 290 Thr 294</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Leu 355</b>	<b>4</b>
<b>63</b>	<b>-6,0093</b>	<b>54,4453</b>	<b>Ala 290 Hem 481</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Leu 355</b>	<b>7</b>
<b>64</b>	<b>-5,9318</b>	<b>52,9626</b>	<b>Hem 481 Ala 290</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Leu 355</b>	<b>8</b>
65	0,2327	52,5987	Hem 481	0	0	0	0	0	5
66	-5,9959	53,9253	Hem 481 Thr 294 Ala 290	0	Hem 481	0	0	0	1
67	-1,5228	54,6096	Hem 481 Ala 290	0	Hem 481	0	0	0	8
68	-2,2174	56,3943	Hem 481 Ala 290		2 em Hem 481	0	0	0	5
69	-4,5957	46,0057	Tyr 115	0	0	0	0	0	13
70	-5,4166	43,6324	Tyr 115	Met 105	0	0	0	0	7

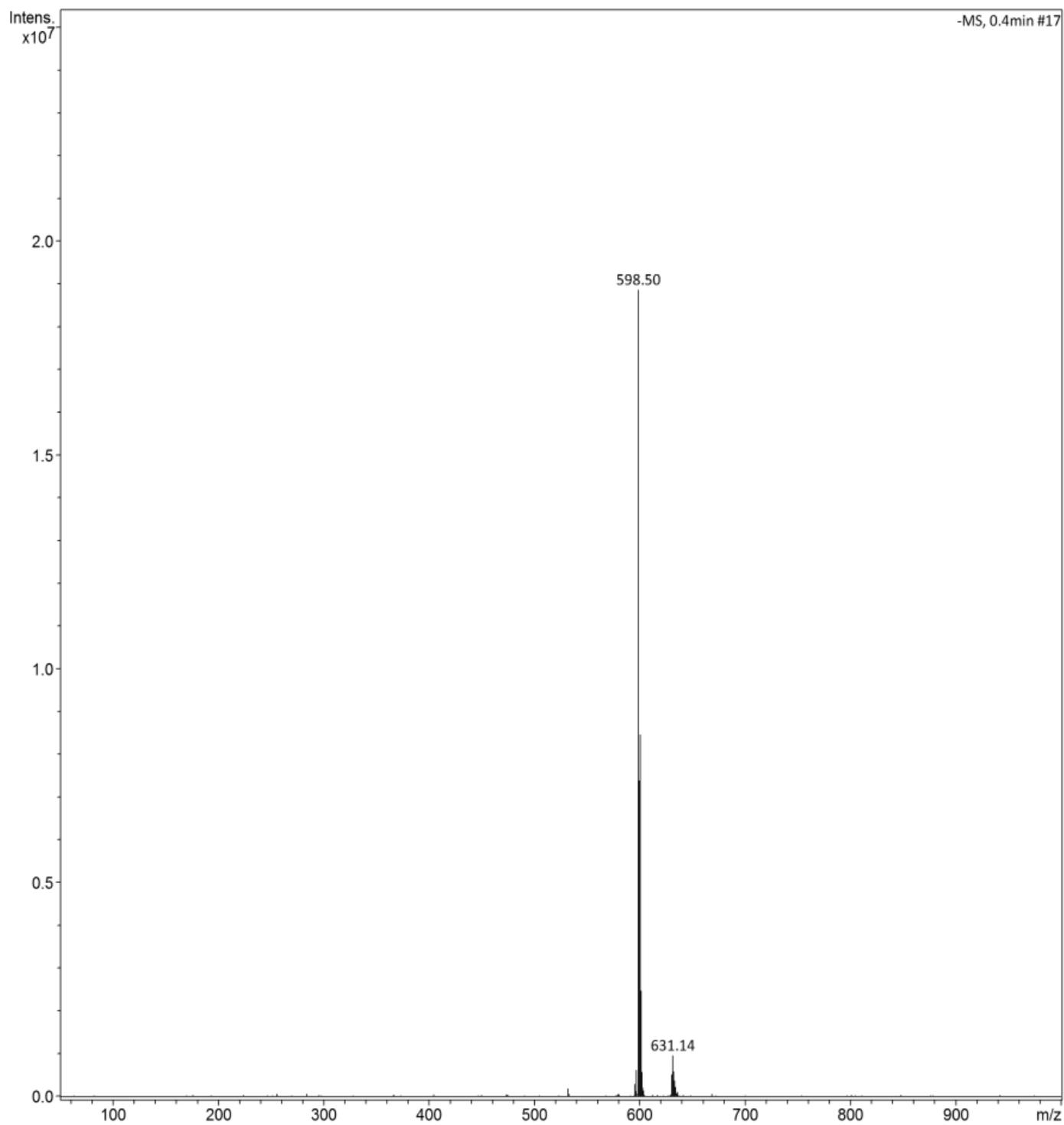
## APÊNDICE E

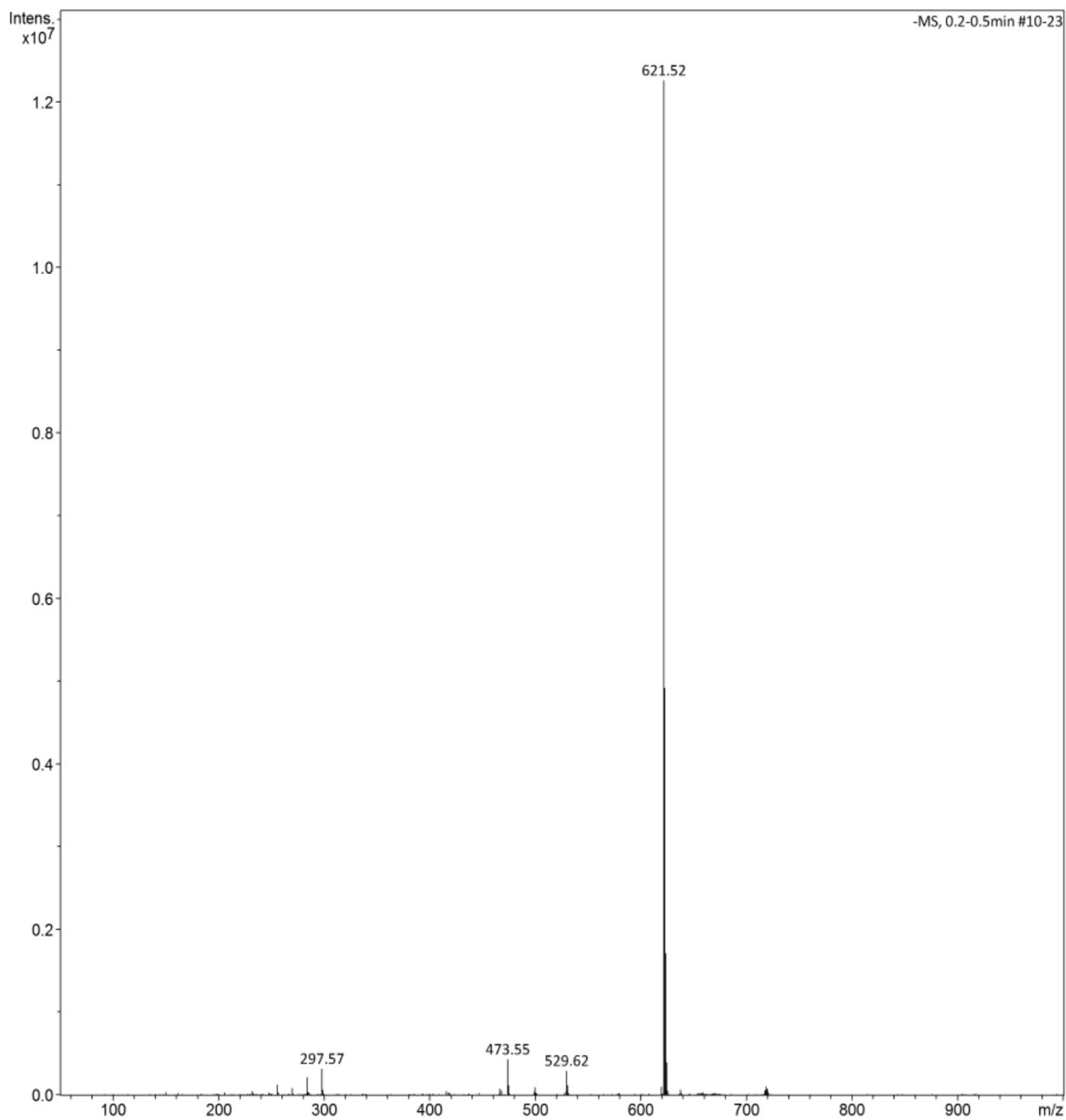
APCI-MS modo positivo de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina

APCI-MS modo positivo de 3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina

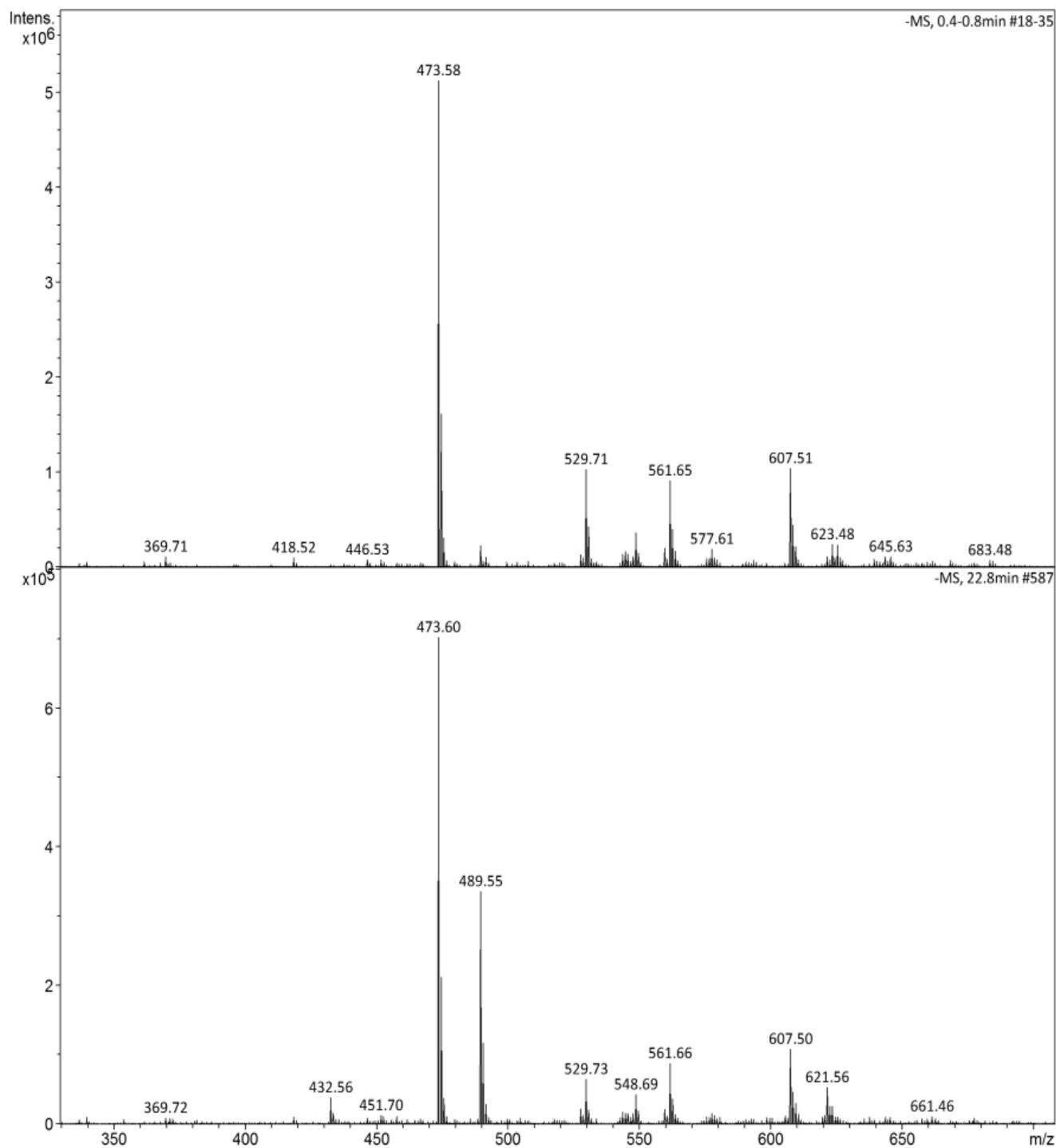
APCI-MS modo positivo de 3-amino  $\alpha$  e  $\beta$  amirina

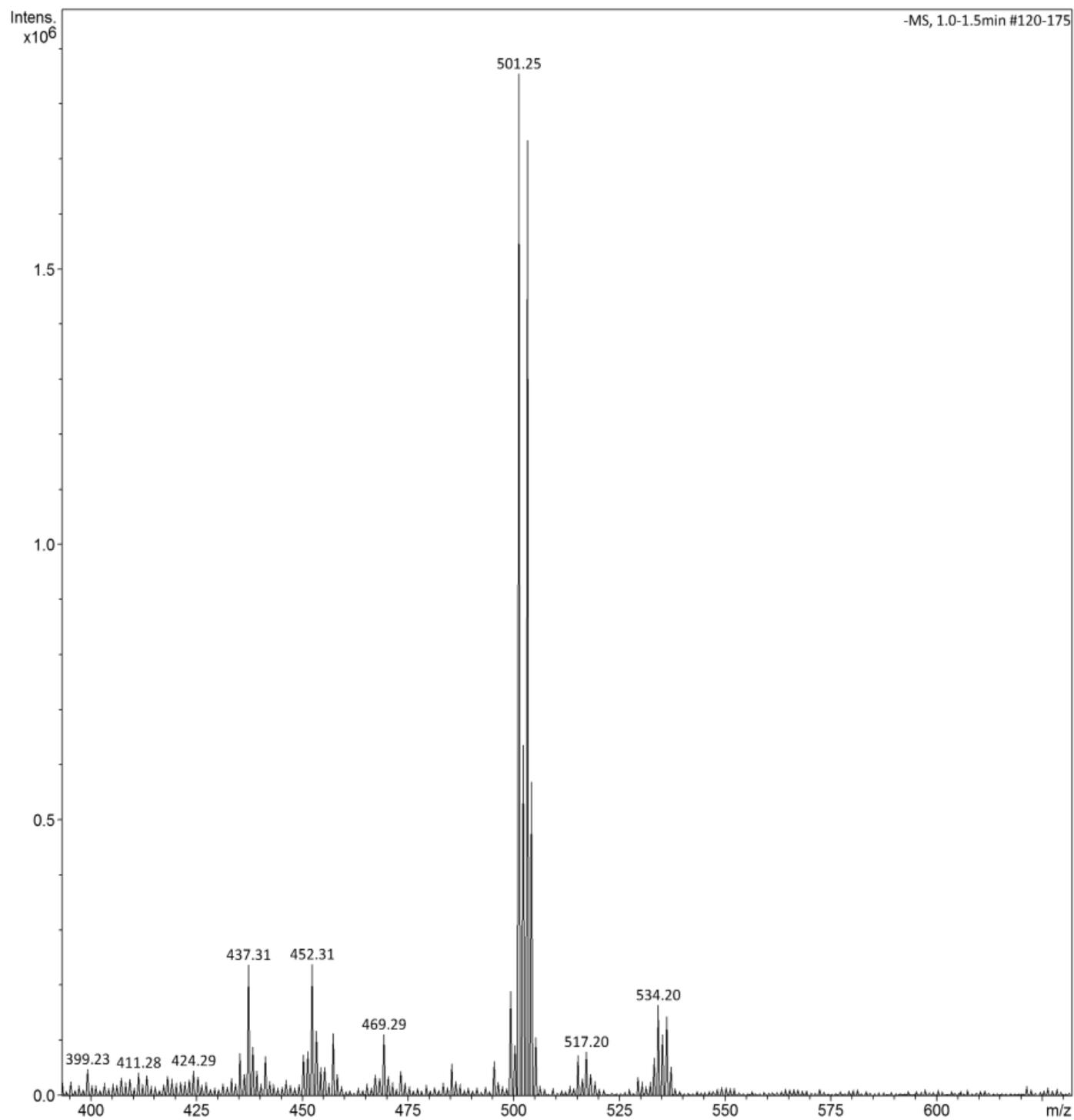
APCI-MS modo negativo de 4-nitrobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina

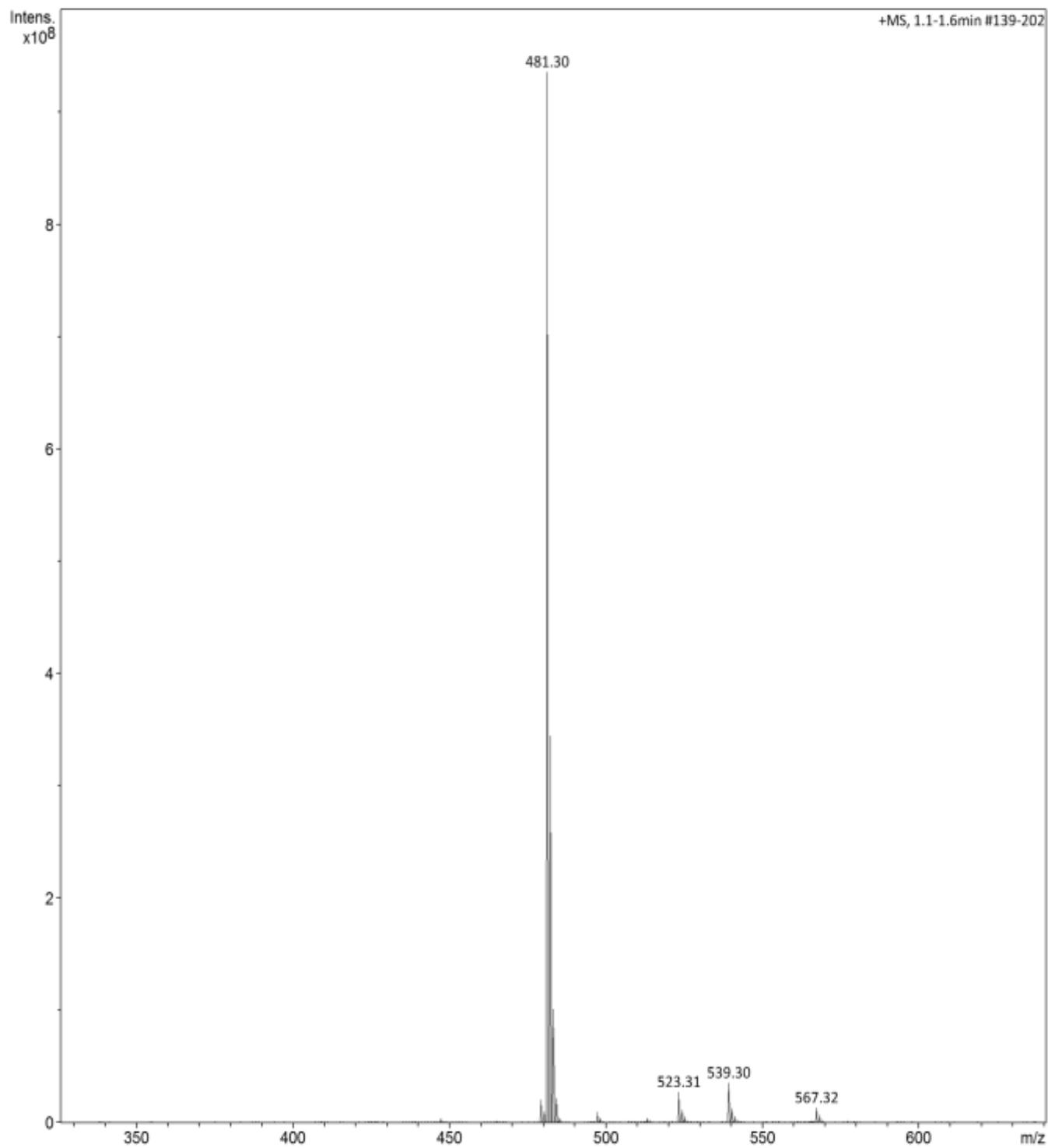
APCI-MS modo negativo de 4-clorobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina

APCI-MS modo negativo de 4-acetamido benzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina

APCI-MS modo negativo de 4-aminobenzeno sulfonamida de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina (com ampliações)



APCI-MS modo negativo de 2-bromo-3-oxo  $\alpha$  e  $\beta$  amirina

APCI-MS modo positivo do derivado aminotiazol  $\alpha$  e  $\beta$  amirina

APCI-MS modo positivo de hidrazina-1-carboxiamida  $\alpha$  e  $\beta$  amirina