

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MURILO LAMIM BELLO

**DERIVADOS SINTÉTICOS DA CHALCONA INIBIDORES DO CRESCIMENTO DE
Leishmania braziliensis: MODELAGEM MOLECULAR PARA O ESTUDO DA
RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE (SAR) E AVALIAÇÃO TEÓRICA DO PERFIL
FÍSICO-QUÍMICO E TOXICOLÓGICO (*IN SILICO*)**

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Prof^a. Dr^a. Luiza Rosaria Sousa Dias

Rio de Janeiro
2010

MURILO LAMIM BELLO

**DERIVADOS SINTÉTICOS DA CHALCONA INIBIDORES DO CRESCIMENTO DE
Leishmania braziliensis: MODELAGEM MOLECULAR PARA O ESTUDO DA
RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE (SAR) E AVALIAÇÃO TEÓRICA DO PERFIL
FÍSICO-QUÍMICO E TOXICOLÓGICO (*IN SILICO*)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Prof^a. Dr^a. Luiza Rosaria Sousa Dias

Rio de Janeiro
2010

Ficha Catalográfica

Bello, Murilo Lamim.

Derivados sintéticos da chalcona inibidores do crescimento de *Leishmania braziliensis*: Modelagem molecular para o estudo da relação estrutura atividade (SAR) e avaliação teórica do perfil físico-químico e toxicológico (*in silico*) / Murilo Lamim Bello. -- 2010.

XX, 88f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Prof^a. Dr^a. Luiza Rosaria Sousa Dias

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Chalcona. 3. Modelagem molecular. 4. Leishmanicida. 5. SAR. 6. *In silico*. 7. Regra de Lipinski. – Teses. I. Rodrigues, Carlos Rangel (Orient.) e Dias, Luiza Rosaria Sousa (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. III. Título.

MURILO LAMIM BELLO

**DERIVADOS SINTÉTICOS DA CHALCONA INIBIDORES DO CRESCIMENTO DE
Leishmania braziliensis: MODELAGEM MOLECULAR PARA O ESTUDO DA
RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE (SAR) E AVALIAÇÃO TEÓRICA DO PERFIL
FÍSICO-QUÍMICO E TOXICOLÓGICO (*IN SILICO*)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em _____ de _____ de 2010

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues - Orientador
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Luiza Rosaria Sousa Dias - Orientadora
Faculdade de Farmácia - UFF

Prof^a. Dr^a. Gisela Maria Dellamora Ortiz
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Magaly Girão Albuquerque
Instituto de Química - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Alice Maria Rolim Bernardino
Instituto de Química - UFF

Rio de Janeiro

2010

Esta obra é dedicada aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr. Carlos Rangel Rodrigues e Dr^a. Luiza Rosaria Sousa Dias, por toda a atenção, tempo e esforços dedicados para a realização deste trabalho.

Aos professores da banca de acompanhamento, Dr^a. Gisela Maria Dellamora Ortiz e Dr^a. Monique Araújo de Brito, pelo cuidado e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores da banca de avaliação por gentilmente aceitarem o convite para participarem da etapa final deste trabalho.

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

Ao CNPq e à FAPERJ, pelo apoio financeiro que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos alunos do Laboratório ModMolQSAR-3D da Faculdade de Farmácia da UFRJ pelo apoio.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e à própria UFRJ.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação que sempre estão dispostos a auxiliar e ajudar.

A todos aqueles que de certa forma contribuíram para a construção deste trabalho.

Aos meus pais, João Carlos Araújo Bello e Lúcia Soares Lamim Bello, pelo apoio, paciência e compreensão.

“Eu estava sentado à mesa a escrever o meu compêndio, mas o trabalho não rendia; os meus pensamentos estavam noutra sítio. Virei a cadeira para a lareira e comecei a dormir. Outra vez começaram os átomos às cambalhotas em frente dos meus olhos. Desta vez os grupos mais pequenos mantinham-se modestamente à distância. A minha visão mental, aguçada por repetidas visões desta espécie, podia distinguir agora estruturas maiores com variadas conformações; longas filas, por vezes alinhadas e muito juntas; todas torcendo-se e voltando-se em movimentos serpenteantes. Mas olha! O que é aquilo? Uma das serpentes tinha filado a própria cauda e a forma que fazia rodopiava trocistamente diante dos meus olhos. Como se se tivesse produzido um relâmpago, acordei... passei o resto da noite a verificar as consequências da hipótese. Aprendamos a sonhar, senhores, pois então talvez nos apercebamos da verdade.”

Friedrich August Kekulé von Stradonitz, 1865

RESUMO

BELLO, Murilo Lamim. **Derivados sintéticos da chalcona inibidores do crescimento de *Leishmania braziliensis*: Modelagem molecular para o estudo da relação estrutura-atividade (SAR) e avaliação teórica do perfil físico-químico e toxicológico (*in silico*)**. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

A leishmaniose é uma doença infecciosa negligenciada causada por diferentes espécies do parasita *Leishmania* e é um dos maiores problemas de saúde pública de países em desenvolvimento. Apesar do progresso em conhecimentos fundamentais sobre o parasita *Leishmania*, a atual terapia contra a leishmaniose ainda é insatisfatória, devido à eficácia limitada, o tratamento prolongado, o custo elevado e aos efeitos adversos indesejáveis. Assim, a pesquisa por novos compostos protótipos de fármacos antileishmaniose permanece como um assunto de importância atual. O objetivo deste trabalho foi estudar a relação estrutura atividade (SAR) e o perfil físico-químico e toxicológico *in silico* de uma série de dezenove derivados da 1,3-difenil-2-propen-1-ona (chalcona), utilizando ensaios experimentais e metodologias de simulação computacional. Os resultados da avaliação biológica demonstraram que quatorze derivados da chalcona avaliados, apresentaram atividade antileishmania contra a forma promastigota de *Leishmania braziliensis*. Cinco destes derivados (**15g**, **15h**, **15i**, **15j**, **15k**) apresentaram as melhores atividades. Dentre estes, os derivados **15h** ($IC_{50} = 2,70 \mu M$), **15i** ($IC_{50} = 3,94 \mu M$) e **15j** ($IC_{50} = 4,62 \mu M$) foram mais ativos do que a pentamidina ($IC_{50} = 6,0 \mu M$), fármaco utilizado como controle neste estudo. Estes estudos indicaram que substituintes metóxila nas duas posições *orto* do anel fenila A estão vinculados com

melhores atividades antileishmania. No programa Osiris, os compostos com melhores atividades antileishmania apresentaram valores de *druglikeness* e *drugscore* superiores aos fármacos utilizados como controle (pentamidina e anfotericina B). O derivado **15i** não violou nenhum dos parâmetros da regra-dos-cinco de Lipinski (lipofilicidade, peso molecular, números de grupos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio), apresentou perfis toxicológicos *in vitro* com células VERO ($CC_{50} = 215, 57 \mu\text{M}$) e *in silico* favoráveis. O derivado **15i** demonstrou ser o protótipo de fármaco mais promissor da série estudada.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, Chalcona, Modelagem molecular.

ABSTRACT

BELLO, Murilo Lamim. **Derivados sintéticos da chalcona inibidores do crescimento de *Leishmania braziliensis*: Modelagem molecular para o estudo da relação estrutura-atividade (SAR) e avaliação teórica do perfil físico-químico e toxicológico (*in silico*)**. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

Leishmaniasis is a neglected infectious disease caused by different species of parasites of the genus *Leishmania* spp. and is one of the largest problems of public health of countries in development. In spite of the progress in fundamental knowledge on the *Leishmania* parasite, current leishmaniasis therapy is still unsatisfactory, due to limited effectiveness, long treatment, high cost and undesirable adverse effects. Thus, the research of novel lead compounds for leishmaniasis treatment remains a current subject. Our purpose was to determine antileishmanial activity, structure-activity relationship (SAR), and *in silico* physical-chemistry and toxicological profile of a series of nineteen 1,3-diphenyl-2-propen-1-one (chalcone) derivatives using experimental assays and computer simulation methods. Results of biological evaluation showed that fourteen chalcone derivatives presented some antileishmanial activity against the promastigote form of *Leishmania braziliensis*. Five of these derivatives (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** and **15k**) presented the highest antileishmanial activities. Among these, **15h** ($IC_{50} = 2.70 \mu M$), **15i** ($IC_{50} = 3.94 \mu M$) and **15j** ($IC_{50} = 4.62 \mu M$) were more active than pentamidine ($IC_{50} = 6.0 \mu M$), a drug used as a positive control in these study. Our studies indicated that methoxy substituents at di-*orto* phenyl ring **A** position are related with higher antileishmanial activity. With the Osiris[®] program, compounds with higher antileishmanial activity

presented better druglikeness and drugscore values than the drugs pentamidine and amphotericin B, which are currently used in therapy and were evaluated in this work. Derivative **15i** fulfilled Lipinski's rule of five (lipophilicity, molecular weight, number of hydrogen bond acceptor and donor groups), and presented favorable *in vitro*, with VERO cells ($CC_{50} = 215.57 \mu\text{M}$), and *in silico* toxicological profiles. Thus, derivative **15i** was shown to be an important drug candidate compound.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, Chalcone, Molecular modeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Distribuição Mundial de Leishmaniose Cutânea | 21 |
| Figura 2 | Distribuição Mundial de Leishmaniose Visceral | 22 |
| Figura 3 | Diagrama de energia para o <i>n</i> -butano mostrando o mínimo global e os mínimos locais de seus confôrmeros | 35 |
| Figura 4 | Representação de uma molécula em mecânica molecular | 37 |
| Figura 5 | Potencial eletrostático da molécula de benzeno e piridina | 43 |
| Figura 6 | Benzeno visualizado sem aplicação da superfície de densidade eletrônica e com superfície de densidade eletrônica | 44 |
| Figura 7 | Superfície de densidade eletrônica total do benzeno | 45 |
| Figura 8 | Superfície de van der Waals do benzeno | 46 |
| Figura 9 | Osiris [®] Property Explore: Gráfico de Validação | 48 |
| Figura 10 | Distribuição de <i>druglikeness</i> . Fármacos comerciais versus substâncias químicas do catálogo Fluka | 49 |
| Figura 11 | A superfície de van der Waals corresponde ao contorno da superfície das esferas de van der Waals dos átomos | 51 |
| Figura 12 | Estrutural geral dos derivados da chalcona (15a-s) | 54 |
| Figura 13 | Interface gráfica do programa Spartan [®] | 57 |
| Figura 14 | Fluxograma da metodologia computacional utilizada no estudo da relação estrutura-atividade (SAR) | 58 |
| Figura 15 | Interface gráfica do programa Osiris [®] Property Explorer | 60 |
| Figura 16 | Alinhamento e sobreposição das conformações de menor energia de cada derivado da chalcona | 64 |
| Figura 17 | Alinhamento e sobreposição das conformações mais estáveis dos derivados metoxilados da chalcona 15b e 15g | 65 |
| Figura 18 | Alinhamento e sobreposição das conformações mais estáveis dos derivados metoxilados da chalcona 15c e 15h | 66 |
| Figura 19 | Alinhamento e sobreposição das conformações mais estáveis dos derivados metoxilados da chalcona 15d e 15j | 67 |
| Figura 20 | Alinhamento e sobreposição das conformações mais estáveis dos derivados metoxilados da chalcona 15h e 15s | 68 |
| Figura 21 | Mapa de potencial eletrostático molecular dos derivados da chalcona (15a-s) | 72 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 22 | Mapa de densidade HOMO dos derivados da chalcona (15a-s) | 73 |
| Figura 23 | Mapa de densidade LUMO dos derivados da chalcona (15a-s) | 75 |
| Figura 24 | Perfis Toxicológicos Teóricos dos derivados da chalcona com atividade mais significativa (15g, 15h, 15i, 15j e 15k) | 76 |
| Figura 25 | <i>Druglikeness</i> dos derivados da chalcona (15g, 15h, 15i, 15j e 15k) comparados com os fármacos comerciais | 77 |
| Figura 26 | <i>Drugscore</i> dos derivados ativos 15g, 15h, 15i, 15j e 15k da chalcona comparados com os fármacos comerciais | 78 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Atividade antileishmania contra cepas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> (IC ₅₀) e toxicidade celular (CC ₅₀) dos derivados da chalcona (15a-s) | 62 |
| Tabela 2 | Comparação dos parâmetros teóricos (Volume, Área CPK, E _{HOMO} , E _{LUMO} e momento Dipolo) dos derivados da chalcona (15a-s) | 71 |
| Tabela 3 | Valores de cLogP (lipofilicidade), HBA (aceptores de ligação de hidrogênio), HBD (doadores de ligação de hidrogênio) e PM (peso molecular) e dos derivados da chalcona (15a-s) | 79 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|------------------------|--|
| ADMET | Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicologia |
| AIDS | Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (<i>Acquired immune Deficiency Syndrome</i>) |
| AM1 | Modelo Austin 1 (<i>Austin Model 1</i>) |
| AMBER | Modelo Assistido de Construção e Refinamento de Energia (<i>Assisted Model Building and Energy Refinement</i>) |
| CC₅₀ | Menor Concentração Capaz de Citotóxica de 50% |
| cLogP | Logaritmo do Coeficiente de Partição Calculado (teórico) |
| CNDO | Negligência Completa da Sobreposição Diferencial (<i>Complete Neglect of Differential Overlap</i>) |
| CPK | Corey-Pauling-Koton |
| Da | Dalton |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>) |
| eV | elétron Volt |
| HBA | Aceptor de ligação de hidrogênio (<i>Hydrogen bonding acceptor</i>) |
| HBD | Doador de ligação de hidrogênio (<i>Hydrogen bonding donor</i>) |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>) |
| HOMO | Orbital Molecular Ocupado de Mais Alta Energia (<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>) |
| IC₅₀ | Menor Concentração Capaz de Inibir 50% da Viabilidade Celular |
| INDO | Negligência Intermediária da Sobreposição Diferencial (<i>Intermediate Neglect of Differential Overlap</i>) |
| LogS | Solubilidade |
| LUMO | Orbital Molecular Desocupado de Mais Baixa Energia (<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>) |
| MEP | Potencial Eletrostático Molecular (<i>Molecular Electrostatic Potential</i>) |
| MINDO/3 | Negligência Intermediária Modificada da Sobreposição Diferencial, versão 3 |
| MM1 | Campo de Força Mecânica Molecular 1 |
| MM2 | Campo de Força Mecânica Molecular 2 |

| | |
|----------------|---|
| MMFF | Campo de Força Molecular da Merck (<i>Merck Molecular Force Field</i>) |
| MNDO | Negligência Modificada da Sobreposição Diferencial (<i>Modified Neglect of Differential Overlap</i>) |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| P&D | Pesquisa e Desenvolvimento |
| PM | Peso Molecular |
| PM3 | Método Paramétrico 3 (<i>Parametric Method 3</i>) |
| PM5 | Método Paramétrico 5 (<i>Parametric Method 5</i>) |
| PSA | Área de Superfície polar (<i>Polar Surface Area</i>) |
| QSAR | Relação quantitativa estrutura-atividade (<i>Quantitative Structure Activity Relationship</i>) |
| RM1 | Modelo Recife 1 (<i>Recife Model 1</i>) |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RNA | Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>) |
| RTECS | Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas (<i>Registry of Toxic Effects of Chemical Substances</i>) |
| SAR | Relação estrutura-atividade (<i>Structure Activity Relationship</i>) |
| SEP | Superfície de Energia Potencial |
| STO-3G | Orbitais Tipo Slater simulado por 3 Gaussianos (<i>Slater-Type-Orbitals simulated by 3 Gaussians</i>) - Base quântica |
| ua | Unidade atômica |
| UFRJ | Universidade Federal do Rio de Janeiro |
| UFSC | Universidade Federal de Santa Catarina |
| WDI | Índice de Fármacos Mundial (<i>World Drugs Index</i>) |

MARCAS E PROPRIEDADES

Há marcas comerciais e suas respectivas propriedades citadas no texto do trabalho. Abaixo estão os nomes das marcas que foram utilizadas no trabalho, entretanto, a ausência de algum nome caracteriza apenas uma falha não intencional pela qual nos desculpamos antecipadamente. As seguintes marcas comerciais são propriedades de seus respectivos detentores:

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluka[®] | Marca registrada de Fluka Chemie AG |
| Glucantime[®] | Marca registrada de Sanofi-Aventis, Inc. |
| Osiris[®] | Marca registrada de Actelion Pharmaceuticals, Ltd |
| Pentostam[®] | Marca registrada de GlaxoSmithKline, Inc. |
| Spartan[®] | Marca registrada de Wavefunction, Inc |
| Windows[®] | Marca registrada de Microsoft Corporation |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 DOENÇAS PARASITÁRIAS | 19 |
| 1.2 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS | 20 |
| 1.2.1 Leishmanioses | 21 |
| 1.2.1.1 Fármacos para o tratamento da leishmaniose | 23 |
| 1.2.1.2 Chalconas com atividade antileishmania | 30 |
| 1.3 MODELAGEM MOLECULAR | 33 |
| 1.3.1 Métodos de modelagem molecular: Mecânica molecular e quântica | 34 |
| 1.3.1.1 Mecânica molecular | 36 |
| 1.3.1.2 Mecânica quântica - Métodos <i>ab initio</i> | 39 |
| 1.3.1.3 Métodos semi-empíricos | 41 |
| 1.3.1.4 Representação dos resultados e aplicações | 42 |
| 1.4 ESTUDO TEÓRICO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DE TOXICIDADE <i>IN SILICO</i> | 45 |
| 1.4.1 Regra de Lipinski | 49 |
| | |
| 2 JUSTIFICATIVA | 52 |
| | |
| 3 OBJETIVOS | 54 |
| 3.1 OBJETIVOS GERAIS | 54 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 54 |
| | |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 56 |
| 4.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS DA CHALCONA | 56 |
| 4.2 METODOLOGIA DO ENSAIO BIOLÓGICO | 56 |
| 4.3 METODOLOGIA COMPUTACIONAL | 56 |
| 4.3.1 Estudo da relação estrutura-atividade | 56 |
| 4.3.2 Estudo <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas e de toxicidade | 59 |
| | |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 61 |
| 5.1 ANÁLISE DOS DADOS DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS DERIVADOS DA CHALCONA | 61 |

| | |
|---|----|
| 5.2 PROPRIEDADES ELETRÔNICAS | 70 |
| 5.2.1 Cálculos de energia de HOMO (E_{HOMO}), energia de LUMO(E_{LUMO}) e momento de dipolo dos derivados da chalcona | 70 |
| 5.2.2 Mapas de potencial eletrostático molecular | 71 |
| 5.2.3 Mapas de densidade HOMO e LUMO | 72 |
| 5.2.3.1 Mapas de densidade HOMO | 72 |
| 5.2.3.2 Mapas de densidade LUMO | 74 |
| 5.3 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS TOXICOLÓGICAS <i>IN SILICO</i> | 75 |
| 5.3.1 Regra de Lipinski | 78 |
| | |
| 6 CONCLUSÃO | 80 |
| | |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 82 |
| | |
| ANEXOS | 89 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS PARASITÁRIAS

Protozoários são organismos unicelulares com um ciclo de vida complexo, mostrando estados morfológicos distintos durante seu desenvolvimento em hospedeiros vertebrados e invertebrados (SOUZA *et al.*, 2004). Podem causar doenças graves, que representam a maior causa de morbidade e mortalidade em muitas áreas endêmicas (SOUZA *et al.*, 2004; FEASEY *et al.*, 2009). Entre os protozoários membros da família *Trypanosomatidae*, estão algumas espécies causadoras de doenças em humanos como a tripanossomíase africana (doença do sono), doença de Chagas e leishmaniose, com enorme impacto na saúde global (MALLARI *et al.*, 2008; FEASEY *et al.*, 2009; GIAROLLA *et al.*, 2010). Essas doenças constituem um grande problema de saúde pública que atualmente ameaça principalmente populações de países em desenvolvimento (SOUZA *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2009).

As doenças tropicais causadas por protozoários causam grande impacto para a humanidade, com altas taxas de mortalidade e perdas econômicas dos países envolvidos (FEASEY *et al.*, 2009; GIAROLLA *et al.*, 2010). Todos os anos, os agentes etiológicos dessas doenças infectam milhões de pessoas e provocam uma alta taxa de morte (REGUERA, TEKWANI, BALAÑA-FOUCE, 2005; FEASEY *et al.*, 2009). Estas doenças tropicais interferem no desenvolvimento dos países atingidos de várias formas, como mortalidade prematura, custos médicos elevados e redução da produtividade, contribuindo para o agravamento de problemas sociais já existentes em países em desenvolvimento (FEASEY *et al.*, 2009). Os fatores que contribuem para o aumento da incidência de doenças tropicais incluem o aparecimento de parasitas resistentes aos fármacos, bem como vetores com resistência aos inseticidas e populações endêmicas crescentes em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento devido ao processo migratório (REGUERA, TEKWANI, BALAÑA-FOUCE, 2005). As doenças tropicais podem atuar como infecção oportunista em pacientes imunodeprimidos e aumentam a taxa de mortalidade por AIDS (REGUERA, TEKWANI, BALAÑA-FOUCE, 2005; FEASEY *et al.*, 2009).

1.2 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais são conhecidas como doenças negligenciadas pois acarretam graves problemas de saúde pública em países em desenvolvimento, afetando mais de 1 bilhão de pessoas e causando a morte de cerca de 500 mil pessoas a cada ano (CAVALLI & BOLOGNESI, 2009). Ainda assim, menos de 1% dos mais de 1300 novos medicamentos desenvolvidos nos últimos 25 anos foram destinados ao tratamento e combate dessas doenças. Este desequilíbrio evidencia a crise em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) de medicamentos para as doenças negligenciadas (TROUILLER *et al.*, 2002; BHATTACHARYA, SALEM, WERBOVETZ, 2002; FEASEY *et al.*, 2009).

Os países em desenvolvimento representam 80% da população mundial e respondem por apenas 20% do mercado de medicamentos. Para essas pessoas, o desequilíbrio entre suas necessidades e a disponibilidade de medicamentos é fatal. A doença do sono, por exemplo, apresenta 50 mil novos casos a cada ano e ameaça outros 60 milhões no sub-Saara africano (MALLARI *et al.* 2008). Apesar desses fatos, até pouco tempo atrás, os pacientes tinham como única alternativa de cura um tratamento com medicamentos à base de arsênico que, além de doloroso, mata uma a cada 20 pessoas que se submetem a esse tratamento. A tuberculose, considerada uma doença negligenciada, mata pelo menos 2 milhões de pessoas todos os anos (SANTOS *et al.* 2009). Mesmo assim, o último tratamento inovador foi desenvolvido há mais de 30 anos.

As doenças globais, como câncer, doenças cardiovasculares, doenças mentais e distúrbios neurológicos representam a maior concentração de P&D da indústria farmacêutica (TROUILLER *et al.*, 2002). Essas doenças atingem indiscriminadamente todas as pessoas em qualquer parte do mundo. Entretanto, os novos fármacos lançados para combater essas doenças encontram um mercado promissor nos países desenvolvidos (TROUILLER *et al.*, 2002).

Dentro das doenças negligenciadas existem as extremamente negligenciadas, como doença do sono, doença de Chagas e as leishmanioses que afetam exclusivamente as populações dos países em desenvolvimento (GIAROLLA *et al.*, 2010). Como a maioria desses pacientes tem baixo poder aquisitivo, eles não podem pagar o tratamento e, portanto, não representam um mercado atrativo e a maioria fica excluída do escopo dos esforços de P&D da indústria farmacêutica e,

A Figura 2 indica a distribuição mundial de Leishmaniose visceral. As regiões destacadas em vermelho são as áreas afetadas por essa forma de manifestação clínica da leishmaniose. Novamente as áreas afetadas são principalmente de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento que se localizam na África, Índia, Oriente médio, América Central e América do Sul. O Brasil tem grande parte de sua população sob risco de adquirir essa forma de manifestação clínica.

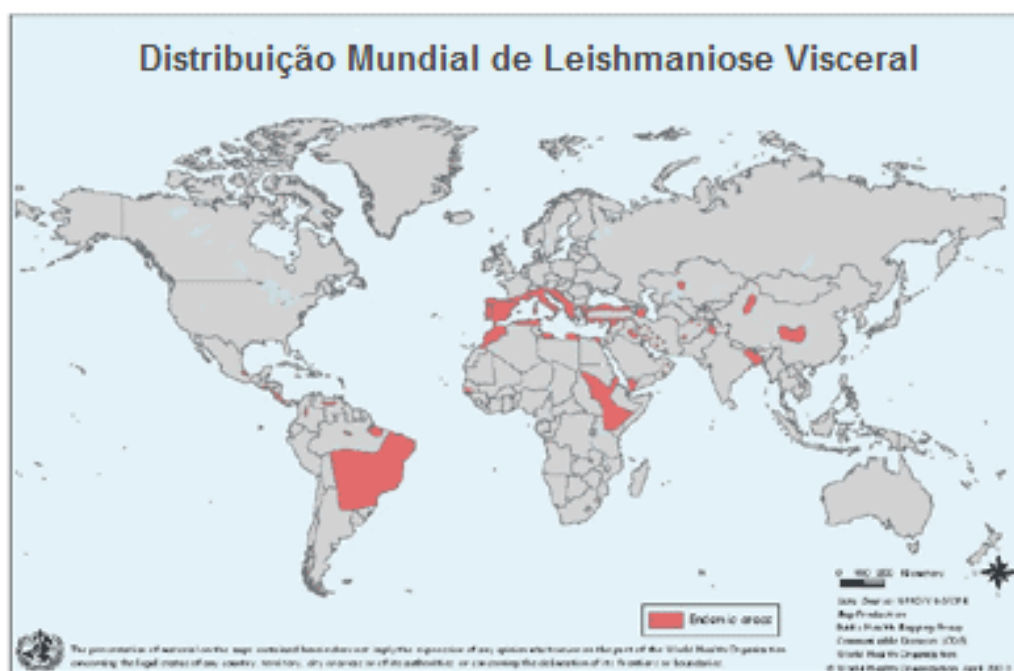


Figura 2 - Distribuição Mundial de Leishmaniose Visceral. As regiões destacadas em vermelho são as áreas afetadas por essa forma de manifestação clínica da leishmaniose

(Adaptado de http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps).

Apesar do progresso em conhecimentos fundamentais sobre o parasita *Leishmania*, a atual terapia contra as leishmanioses ainda é insatisfatória, devido à limitada eficácia, ao tratamento prolongado, alto custo e efeitos secundários indesejáveis (CHEN *et al.*, 2001; CROFT & COOMBS, 2003; SINGH & SIVAKUMAR, 2004; RICHARD & WERBOVETZ, 2010).

A transmissão do parasita ocorre pela picada das fêmeas infectadas de insetos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (VENDRAMETTO *et al.*, 2010). Existem cerca de 20 espécies e sub-espécies do parasita que são responsáveis pelas diferentes manifestações clínicas da doença, que vão desde uma úlcera na pele que cicatriza por si só até uma doença grave, como a Leishmaniose visceral (GIAROLLA *et al.*, 2010; VENDRAMETTO *et al.*, 2010).

O ciclo de vida do parasita compreende: a forma promastigota flagelada que se encontra na fêmea do inseto flebotomíneo, vetor do parasita; e a forma amastigota, presente nos hospedeiros mamíferos (SOUZA *et al.*, 2009; VENDRAMETTO *et al.*, 2010). As formas amastigotas são parasitas intracelulares obrigatórios de macrófagos, e raramente são encontradas em outros tipos de células (LEOPOLDO *et al.*, 2006). No macrófago, as formas amastigotas são encontradas no fagolisossomo onde se multiplicam e crescem (SOUZA *et al.*, 2009).

O surgimento de cepas dos parasitas resistentes aos medicamentos atualmente empregados no tratamento, especialmente em pacientes HIV-Leishmania co-infectados, também tem agravado o problema de saúde pública (SINGH & SIVAKUMAR, 2004; FEASEY *et al.*; 2009). Assim, há uma necessidade urgente para o desenvolvimento de novos, eficientes e seguros fármacos para o tratamento das Leishmanioses.

1.2.1.1 Fármacos para o tratamento das leishmanioses

Estudos demonstraram que 1393 novos fármacos receberam autorização para comercialização entre 1975 e 1999 (TROUILLER *et al.*, 2002). A distribuição quantitativa desses fármacos é desigual para as diferentes classes terapêuticas, concentrando-se sobre as necessidades dos países de renda elevada (TROUILLER *et al.*, 2002). Assim, existe uma grande deficiência de fármacos eficientes para o tratamento de doenças parasitárias que ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como as leishmanioses (BHATTACHARYA, SALEM, WERBOVETZ, 2002; RICHARD & WERBOVETZ, 2010).

Há, aproximadamente, vinte e cinco compostos com efeitos antileishmania, mas apenas alguns são classificados como fármacos leishmanicidas utilizados em humanos e a maioria destes é administrada na forma parenteral (SINGH & SIVAKUMAR, 2004).

Os fármacos utilizados na quimioterapia atual contra as leishmanioses são tóxicos e causam muitos efeitos colaterais, como cardiotoxicidade e pancreatite (CROFT & COOMBS, 2003; SINGH & SIVAKUMAR, 2004; SOUZA *et al.*, 2009). O tratamento de primeira escolha emprega compostos de antimônio pentavalente, Sb(V), como antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) **(1)** e estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) **(2)**. Esses fármacos existem apenas na forma parenteral e geralmente

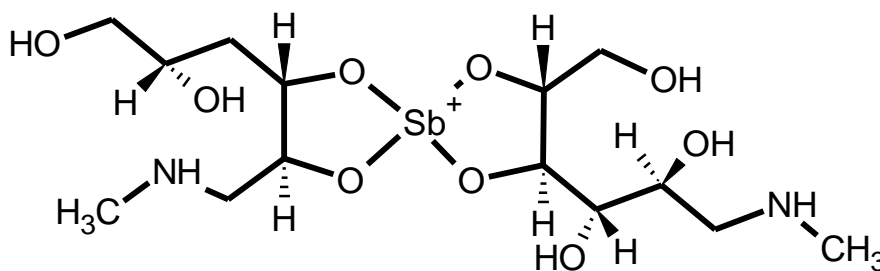
são usados sob supervisão médica durante vinte e oito dias (SOUZA *et al.*, 2009). O tratamento de segunda escolha emprega compostos como anfotericina B **(3)** e pentamidina **(4)** (CROFT & COOMBS, 2003; SINGH & SIVAKUMAR, 2004; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; SOUZA *et al.*, 2009).

A variação na resposta clínica aos antimoniais pentavalentes em leishmanioses cutânea e visceral foi um problema persistente durante os últimos 50 anos (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006). Fármacos antimoniais pentavalentes têm sido usados para o tratamento de leishmanioses cutânea e visceral há mais de seis décadas com pouca evidência de resistência. O surgimento de espécies de *Leishmania* resistentes a antimoniais pentavalentes começou a ocorrer nos últimos 15 anos, tornando-se um grande problema clínico (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006).

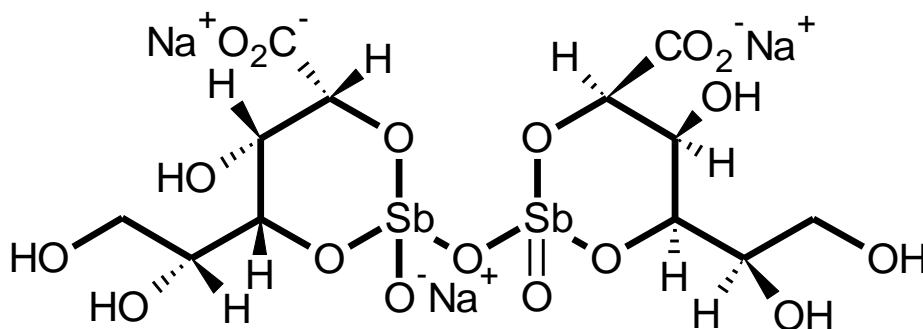
O mecanismo de ação desses fármacos passou por muitos anos sem ser conhecido e é aceito que os antimoniais pentavalentes são pró-fármacos, que necessitam sofrer redução à forma trivalente para, então, exercerem seu efeito. Sabe-se que eles inibem a biossíntese de macromoléculas nas formas amastigotas do parasita por interferirem na glicólise e na β -oxidação dos ácidos graxos, além de apresentarem ação sobre o metabolismo da tripanotona (BERMAN *et al.*, 1987).

O grande problema dessa terapia é a resistência adquirida. Acredita-se que alguns mecanismos moleculares de resistência estejam relacionados à diminuição da taxa de redução da forma pentavalente à forma trivalente do fármaco, como a alteração da expressão da aquaglicoporina-1 (GOURBAL *et al.*, 2004), responsável pelo transporte do fármaco na forma trivalente para o interior do parasita, e um aumento dos níveis de tripanotona. Outro problema é a toxicidade dos fármacos, com efeitos colaterais severos e, em alguns casos, podem causar pancreatite aguda, problemas cardíacos como arritmias, além de oferecer risco de vida para pacientes com idade abaixo de dois anos e acima de 45 anos que apresentem sinais avançados da doença, desnutrição e complicações por leishmaniose visceral (SEAMAN *et al.*, 1996; MURRAY *et al.*, 2005).

Os antimoniais pentavalentes estão disponíveis nas formas de antimoniato de meglumina **(1)** e estibogluconato de sódio **(2)** (FRÉZARD *et al.*, 2008), que podem ser administrados por via intravenosa ou via intramuscular com igual eficácia (MURRAY *et al.*, 2005; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006).

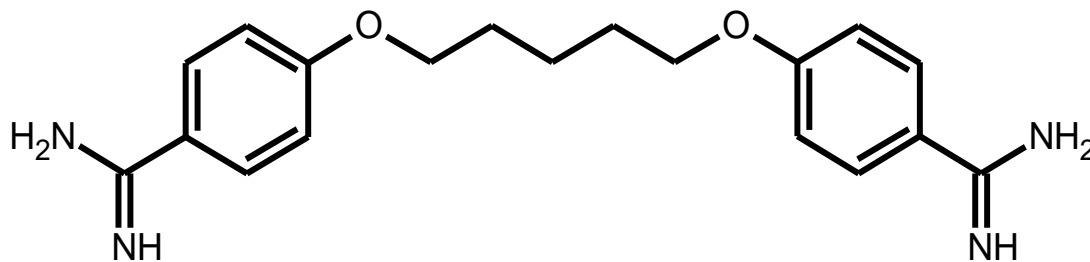


Antimoniato de meglumina (Glucantime®) (1)



Estibogluconato de sódio (Pentostam®) (2)

A anfotericina B (**3**) é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica, descoberto em 1956, a partir de uma bactéria do gênero *Streptomyces* (SINGH & SIVAKUMAR, 2004). Esta é outra opção no tratamento da leishmaniose visceral, principalmente em pacientes que apresentaram resistência aos antimoniais. Este antibiótico macrolídeo vem sendo usado contra leishmaniose há mais de quatro décadas (BRAJTBURG & BOLARD, 1996; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006). Acredita-se que a anfotericina B possa interagir com o esterol da membrana celular e causar mudanças na permeabilidade, provocando disfunção celular e consequente destruição e morte celular. É possível que fungos e *Leishmania* spp. sejam mais susceptíveis à anfotericina B do que as células dos hospedeiros mamíferos (BRAJTBURG & BOLARD, 1996). O maior potencial da anfotericina B em causar danos em células de fungos e parasitas do que em células de mamíferos está provavelmente relacionado ao tipo de esterol incorporado em suas membranas. O ergosterol é encontrado em células de fungos e parasitas, enquanto que o colesterol é encontrado nas células dos mamíferos (BRAJTBURG & BOLARD, 1996). Seu mecanismo de ação se baseia na afinidade em se unir aos esteróis, principalmente ao ergosterol (esterol encontrado em fungos e parasitas) inibindo seletivamente a síntese da membrana do parasita, formando poros aquosos na membrana celular

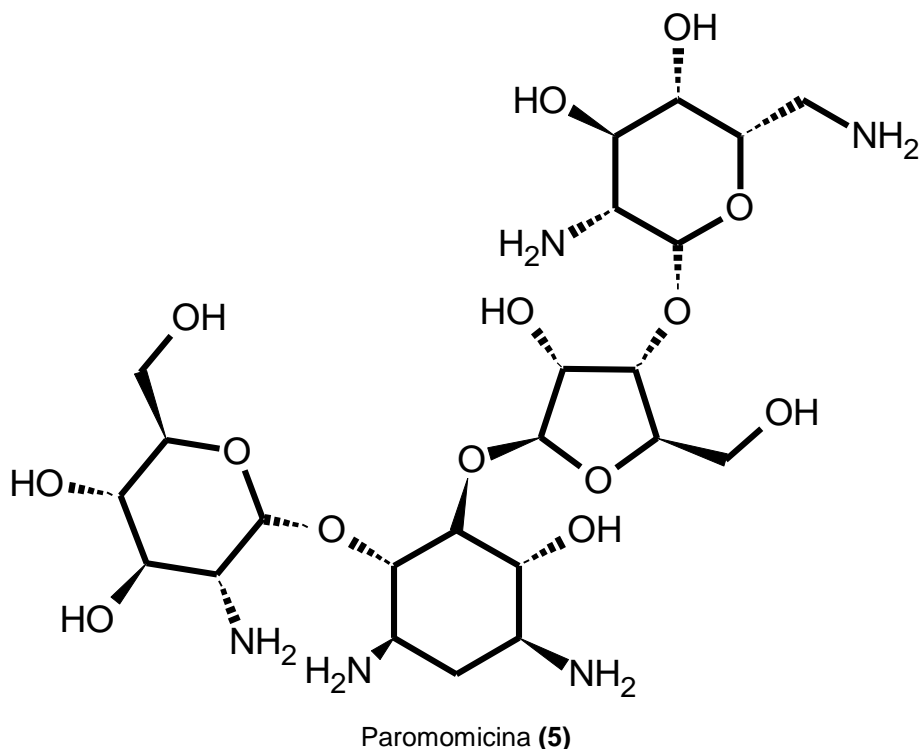


Pentamidina (4)

A paromomicina (Aminosidina) (5) é um antibiótico aminoglicosídeo produzido por *Streptomyces* spp., pouco usado para o tratamento de leishmaniose visceral, e não é surpresa que existam poucos casos relatados de resistência a esse medicamento para esta forma da doença. Entretanto, foi utilizada extensivamente para o tratamento de leishmaniose cutânea, sendo relatados inúmeros casos de resistência (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006). Foi desenvolvido como antibacteriano na década de 1960, apesar de conhecida sua ação leishmanicida. Os casos de resistência aos aminoglicosídeos em bactérias são bem conhecidos e isso se aplica, principalmente, ao tratamento da leishmaniose cutânea, em que pode acarretar alguns casos de resistência, motivo pelo qual não é usado como fármaco de primeira escolha no tratamento dessa doença (MAAROUF *et al.*, 1997; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006).

Nas bactérias, os aminoglicosídeos inibem a síntese de proteínas por meio de ligação ao rRNA (RNA ribossômico) na subunidade 30S do ribossomo. Não há descrição similar sobre o mecanismo de ação da paromomicina em *Leishmania* spp.

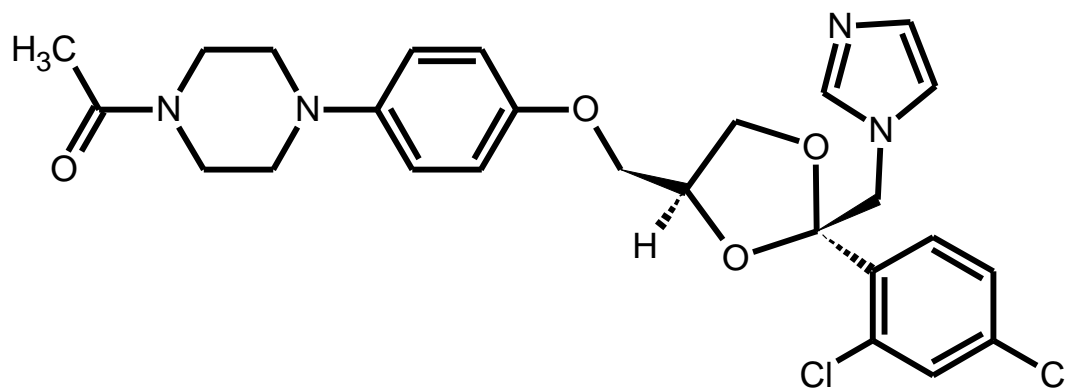
A disfunção do ribossomo mitocondrial e despolarização da membrana mitocondrial são os mecanismos de ação sugeridos para a paromomicina em *Leishmania* spp (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006). Seu mecanismo de ação baseia-se na alteração da síntese de proteínas, além de interferir na atividade mitocondrial e dificultar a captação de precursores de macromoléculas pelo parasita, prejudicando assim, o seu crescimento. O aumento da proporção de lipídios polares na membrana provoca uma diminuição da fluidez que altera a permeabilidade da membrana (MAAROUF *et al.*, 1997).



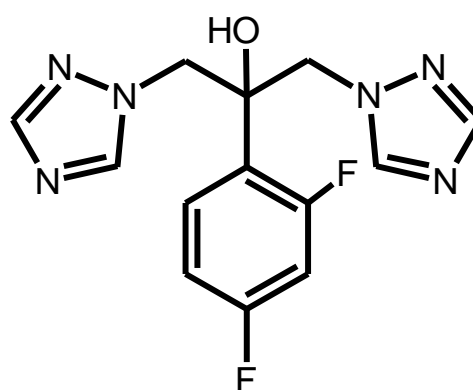
Os azóis, como cetoconazol (6), fluconazol (7) e itraconazol (8) são outra classe de fármacos utilizada no tratamento de infecções fúngicas, que também é utilizada no tratamento das leishmanioses e apresenta como vantagem, em relação a outros fármacos leishmanicidas, o mecanismo de ação já conhecido (CROFT & COOMBS, 2003; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006).

A rota biossintética do ergosterol, o principal esterol nos fungos, e também na *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, é um alvo para os principais fármacos antifúngicos. O fato dos azóis inibirem a enzima do citocromo P450 esterol 14 α -demetilase gerou grande interesse em utilizá-los como fármacos leishmanicidas (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006). Os azóis apresentam a característica de causar danos na rota biossintética do ergosterol e, com isso, impedir a formação da membrana celular do parasita, além de outras funções metabólicas que acarretam na morte do parasita (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006).

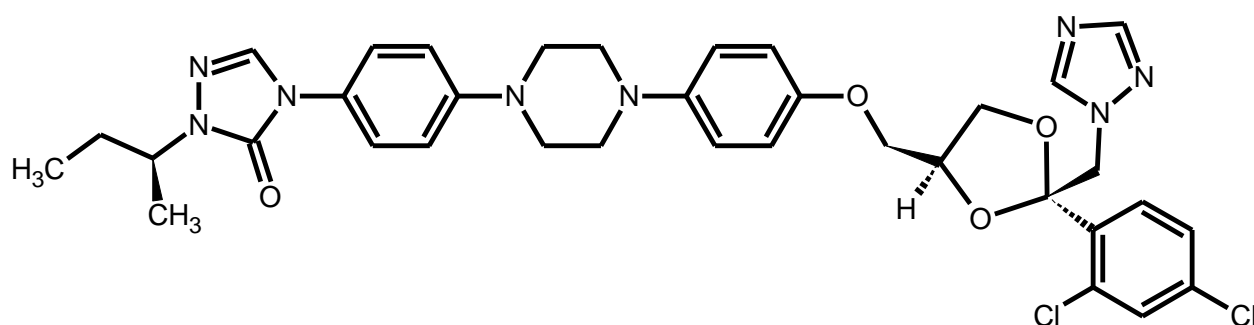
A resistência a essa classe de fármacos ainda não foi muito estudada em *Leishmania*, porém já foi verificada em *Trypanosoma cruzi*. Em fungos, existem casos de resistência no meio clínico e acredita-se que aconteça devido ao aumento no efluxo do fármaco mediado por transportadores (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006).



Cetoconazol (6)



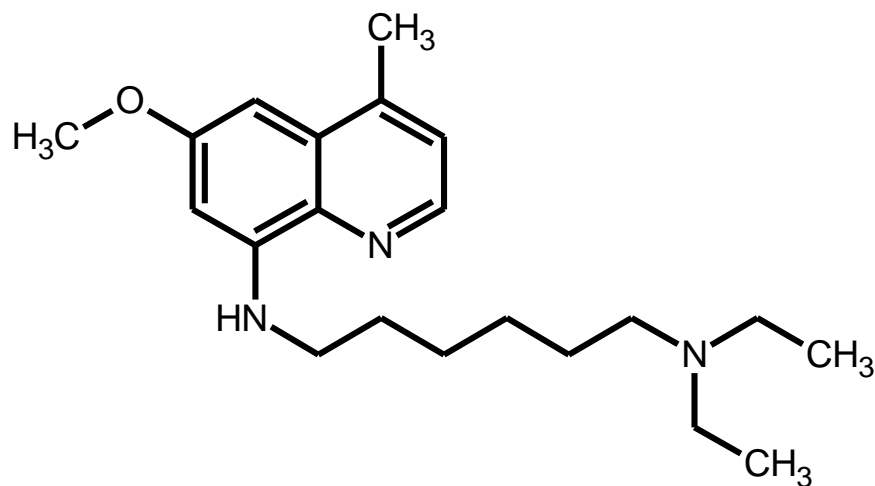
Fluconazol (7)



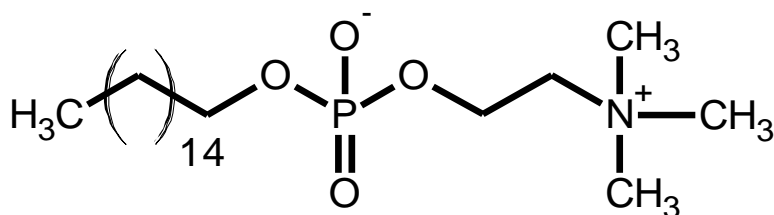
Itraconazol (8)

Diferentes fármacos como a sitamaquina (9) e a miltefosina (10) estão sendo testados para o tratamento das leishmanioses. A miltefosina (hexadecilfosfocolina), originalmente desenvolvido como um fármaco antineoplásico, foi usado na Índia, Colômbia e Alemanha para o tratamento de leishmanioses cutânea e visceral. Os principais efeitos colaterais já foram noticiados, incluindo náusea, vômitos e teratogenicidade (CROFT & COOMBS, 2003; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2009) e atualmente, encontra-se em

fase de ensaios clínicos em outros países, como Brasil e Guatemala (SOUZA *et al.*, 2009).



Sitamaquina (9)



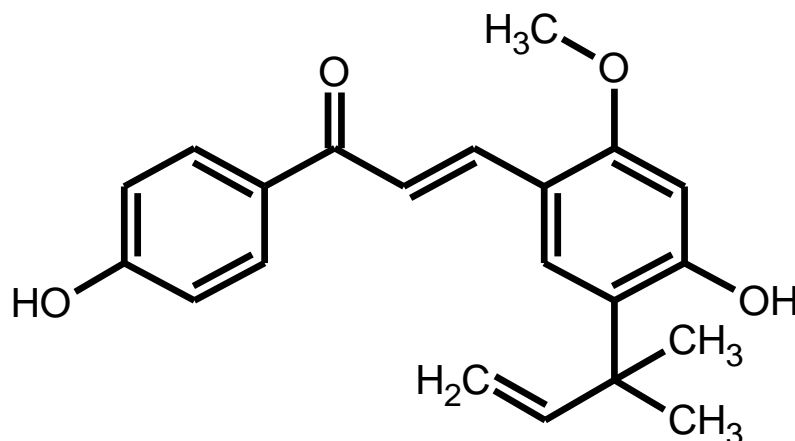
Miltefosina (10)

1.2.1.2 Chalconas com atividade antileishmania

Os flavonóides (**11**) representam uma classe de substâncias de origem natural, que apresenta como estrutura base a 1,3-diarilpropano, podendo assumir diferentes arranjos cíclicos e acíclicos, conforme a variação do nível de oxidação (CABRERA *et al.*, 2007; ÁVILA *et al.*, 2008). Os flavonóides são metabólitos secundários presentes em muitas plantas e que são componentes da dieta humana.

As chalconas (**12**) são intermediários na biossíntese de flavonóides, sendo facilmente encontradas em plantas rasteiras e arbóreas (CHIARADIA *et al.*, 2008). As chalconas são flavonóides de cadeia aberta, onde os dois anéis aromáticos são unidos por um sistema ceto- α,β -insaturado, sendo 1,3-difenil-2-propen-1-ona a estrutura básica (ÁVILA *et al.*, 2008). O equilíbrio entre a os isômeros de cadeia

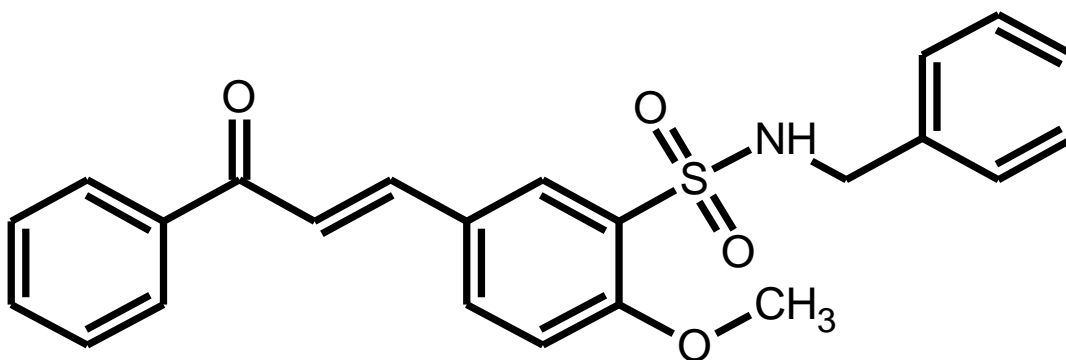
proliferação de linfócitos e produção de citocinas (ZHAI *et al.*, 1995; BOECK *et al.*, 2006).



(2E)-3-[4-(hidroxi-2-metóxi-5-(2-metilbut-3-en-2-il)fenil]-1-(4-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona
Licochalcona A (**13**) (CHEN *et al.*, 1993)

Recentemente, uma série de derivados 4-metóxicalcona-3-sulfonamida foi relatada com atividade leishmanicida (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2008). Esses derivados da chalcona possuem como principal grupo substituinte a sulfonamida e o derivado **14** apresentou atividade antileishmania significativa (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2008).

Andrighetti-Fröhner e colaboradores (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2008) utilizaram a modelagem molecular como ferramenta para os estudos estereoelétrônicos desses derivados, fundamentais para a avaliação da relação estrutura-atividade. Esta série de derivados foi sintetizada e avaliada pelo grupo do Dr. Ricardo José Nunes, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), contra a forma promastigota do parasita *Leishmania braziliensis* (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2009). Esse estudo demonstrou a importância do núcleo estrutural da chalcona como grupo farmacofórico.



Derivado 4-metóxicalcona-3-sulfonamida mais ativo ($IC_{50} = 3,5 \mu M$) (**14**)

1.3 MODELAGEM MOLECULAR

Por décadas, os métodos empregados na descoberta de substâncias protótipos permaneceram sem muitas transformações, isto é, basicamente as substâncias bioativas eram originadas de produtos naturais ou por síntese. Entretanto, novos compostos protótipos foram obtidos devido aos avanços na tecnologia e compreensão dos processos bioquímicos (KUBINYI, 1995).

Modificações estruturais em moléculas descobertas casualmente, seguidas de avaliação farmacológica, por tentativa e erro, foram por muito tempo estratégias empregadas com o objetivo de obter substâncias com melhor perfil de atividade, isto é, maior potência, maior seletividade, melhor biodisponibilidade, maior tempo de meia-vida, menor toxicidade e menos efeitos colaterais (KUBINYI, 1995; GERSHELL & ATKINS, 2003).

Atualmente, entretanto, a preocupação por parte dos pesquisadores em buscar novos compostos bioativos transforma drasticamente o paradigma da descoberta de novos fármacos. Novas técnicas e estratégias estão sendo utilizadas, como química combinatorial, cristalografia de proteínas, técnicas multidimensionais de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Relação Estrutura Atividade Quantitativa (QSAR) e QSAR-3D e outras inúmeras técnicas de modelagem molecular e planejamento assistido por simulação computacional, constituindo-se em ferramentas úteis para o planejamento de novos fármacos (KUBINYI, 1995; KARELSON & LOBANOV, 1996; LENGAUER & RAREY, 1996; RODRIGUES, 2001; GERSHELL & ATKINS, 2003; JORDAN & ROUGHLEY, 2009).

A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares. Estas ferramentas podem ser aplicadas em estratégias de modelagem direta e indireta de novos fármacos. Na primeira aproximação, faz-se o ajuste do fármaco a uma estrutura de receptor conhecida, por exemplo, por meio de dados de difração de raios-X ou RMN. Na segunda, faz-se a análise comparativa das estruturas de compostos ativos e inativos, utilizando-se o conceito de complementaridade para o desenvolvimento de um modelo topográfico hipotético do sítio receptor, denominado modelo farmacofórico (COHEN *et al.*, 1990; BARREIRO *et al.*, 1997; RODRIGUES, 2001; CARVALHO *et al.*, 2003).

1.3.1 Métodos de modelagem molecular: Mecânica molecular e quântica

A posição absoluta dos átomos numa molécula, e da própria molécula como um todo, não é fixa no espaço e a localização de substituintes conectados a ligações simples pode variar ao longo do tempo. Assim, cada molécula contendo uma ou mais ligações simples existe em diferentes conformações. A composição quantitativa e qualitativa desta variedade está permanentemente alterando-se, onde as conformações de menor energia (mais estáveis) são encontradas em maior proporção. A transformação de uma conformação para outra está primariamente relacionada às mudanças nos ângulos de torção de ligações simples (LEACH, 2001; RODRIGUES, 2001; HÖLTJE *et al.*, 2003).

As mudanças na conformação molecular podem ser consideradas como movimentos sobre uma superfície multidimensional que descreve a relação entre a energia potencial e a geometria da molécula. Cada ponto sobre a superfície de energia potencial representa a energia potencial de uma única conformação. Conformações estáveis de uma molécula correspondem a mínimos locais sobre esta superfície de energia, onde a conformação de menor energia corresponde ao mínimo global (Figura 3) (LEACH, 2001; HÖLTJE *et al.*, 2003).

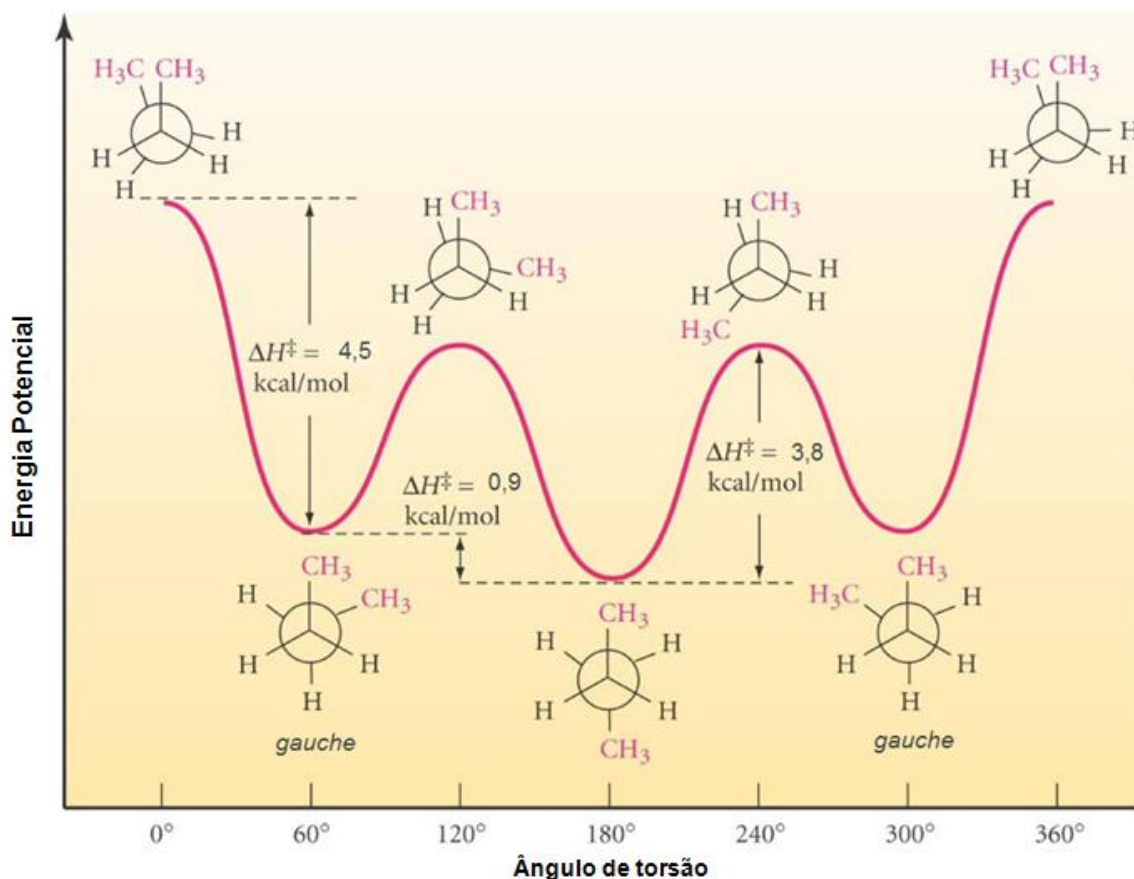


Figura 3 - Diagrama de energia potencial para o *n*-butano em função da rotação da ligação C₃-C₄ mostrando o mínimo global ($\theta=180^\circ$) e os mínimos locais ($\theta=60^\circ$ e $\theta=300^\circ$) de seus confôrmeros (Adaptado de HEHRE, 2003).

Independentemente do método de minimização de energia usado, não há como garantir que o mínimo encontrado seja o mínimo absoluto (mínimo global) da superfície de energia potencial (SEP). Normalmente, muitos mínimos locais estão presentes e é comum que a aplicação de algum algoritmo de minimização de energia acabe conduzindo a um deles, dependendo da proximidade da geometria inicial do sistema. Em princípio, o mínimo absoluto só pode ser encontrado por análise conformacional sistemática do sistema molecular (LEACH, 2001; HÖLTJE *et al.*, 2003).

A análise conformacional sistemática consiste em varrer cada ângulo de torção da estrutura independentemente, conhecida como pesquisa de grade, mas a aplicação deste procedimento é limitada. O número de conformações a serem analisadas equivale a $(360^\circ/\theta)^n$, onde θ é o incremento em graus usado no processo de varredura do ângulo de torção e n é o número de ligações avaliadas. Quanto menor for o incremento θ , maior será a quantidade de conformações geradas, mas,

na prática, apenas algumas conformações são importantes. O valor ótimo de incremento para a pesquisa conformacional sistemática é normalmente de 30 graus. Isso significa que em uma rotação completa de 360° , 12 conformações serão obtidas. Entretanto, o número de ligações rotáveis avaliadas (n) pode aumentar o número de conformações à enésima potência (HÖLTJE *et al.*, 2003).

A atividade biológica de uma molécula é dependente, em geral, de uma única conformação dentre todas as conformações de baixa energia. A pesquisa pela conformação bioativa é um dos objetivos principais em química medicinal. Somente a conformação bioativa pode ligar-se em um ambiente macromolecular específico no sítio ativo do receptor da proteína (HÖLTJE *et al.*, 2003).

A simulação computacional usa modelos numéricos para explorar as estruturas e propriedades de moléculas individuais (SHRIVER *et al.*, 2008). Os métodos usados vão desde os métodos rigorosos e, portanto, computacionalmente mais demorados, conhecidos como métodos *ab initio*, baseados na solução numérica da equação de Schrödinger do sistema, até os mais rápidos, como os métodos semi-empíricos e mecânica molecular (SHRIVER *et al.*, 2008).

1.3.1.1 Mecânica molecular

Um estudo de modelagem molecular pode ser iniciado gerando a estrutura molecular no computador, definindo as posições dos átomos no espaço a partir de um conjunto de coordenadas cartesianas. Uma construção adequada e confiável da geometria inicial determina a qualidade de toda a investigação subsequente. Normalmente, utiliza-se o método computacional de mecânica molecular para otimização da geometria das estruturas moleculares geradas, a fim de se encontrar o estado de energia mínima individual (HÖLTJE *et al.*, 2003).

Diferentemente da abordagem utilizada pela mecânica quântica, os elétrons e o núcleo dos átomos não são explicitamente incluídos nos cálculos. A mecânica molecular considera a composição atômica da molécula como uma coleção de massas interagindo entre si por forças harmônicas. Como resultado desta simplificação, a mecânica molecular é um método computacional relativamente rápido, que pode ser empregado no cálculo de estruturas moleculares pequenas e até de sistemas oligomoleculares (LEACH, 2001; HÖLTJE *et al.*, 2003).

Na mecânica molecular, os átomos são considerados como esferas de diferentes tamanhos (tipos de átomos) unidos por molas de comprimento variável (ligações) (Figura 4). A energia total da molécula (E_{tot}) é minimizada com relação às coordenadas atômicas, considerando os seguintes termos de energia: comprimento de ligação (E_s), ângulo de ligação (E_b), ângulo de torção (E_t), van der Waals (E_{vdw}) e eletrostática (E_{elec}), segundo a Equação 1 (LEACH, 2001; HÖLTJE *et al.*, 2003).

$$E_{tot} = E_s + E_b + E_t + E_{vdw} + E_{elec} + \dots$$

Equação 1

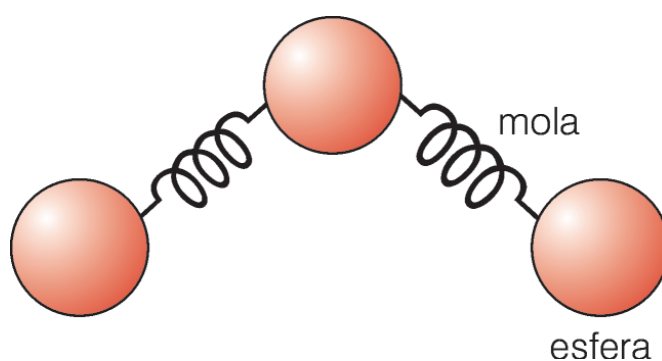


Figura 4 - Representação de uma molécula em mecânica molecular. As esferas representam átomos e as molas representam as ligações entre eles (Adaptado de RODRIGUES, 2001).

A mecânica molecular realiza cálculos da energia estérica total da molécula em termos de desvio do estado fundamental “não tensionado”, do comprimento de ligação, dos ângulos de ligação e de torção e das interações não ligantes. A coleção destes valores de referência, juntamente com as constantes de força e a equação de energia é conhecida como campo de força (*force field*) (HÖLTJE *et al.*, 2003).

A idéia básica da mecânica molecular é que as ligações possuem comprimentos de ligação e ângulos de ligação “naturais”. Os valores no equilíbrio dos ângulos de ligação e dos comprimentos de ligação e as constantes de força correspondentes utilizadas nas funções de energia potencial são definidos no campo de força e formam os parâmetros do campo de força. Cada desvio dos valores padrões resultará num incremento da energia total da molécula. Assim a energia total é uma medida da tensão intramolecular relativa, correlacionada a uma molécula hipotética com geometria ideal (HÖLTJE *et al.*, 2003).

O objetivo de um bom campo de força é descrever, tanto quanto possível, diferentes classes de moléculas com razoável precisão. A confiabilidade nos

cálculos de mecânica molecular é dependente de funções de energia potencial e da qualidade dos parâmetros incorporados a estas funções. Assim, é fácil compreender porque cálculos de alta qualidade não podem ser realizados se parâmetros geométricos importantes são negligenciados. Para evitar esta situação, um campo de força adequado a uma investigação em particular deve ser cuidadosamente selecionado (HÖLTJE *et al.*, 2003).

Com estes princípios em mente, podem-se examinar alguns dos campos de força comumente presentes em programas de modelagem computacional. Dentre estes, *Dreiding* é um campo de força parametrizado para estudar moléculas formadas por átomos comuns na química medicinal como H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br e I, que, em termos de expressão padrão, seria descrito pela Equação 1 (HINCHLIFFE, 2006).

Em sua revisão de 1976, Norman Allinger essencialmente definiu o que chamamos de campo de força MM1 (*Molecular Mechanics Force Field 1*), que considera apenas os parâmetros para hidrocarbonetos, ignorando o termo de Coulomb (energia eletrostática) e usando um potencial de Lennard-Jones (energia de van der Waals) de exponencial seis. Essa abordagem encontrava problemas com os hidrocarbonetos cíclicos tensionados como, por exemplo, o ciclobutano (HINCHLIFFE, 2006).

Em 1977, Allinger introduziu o campo de força MM2 (*Molecular Mechanics Force Field 2*), que aprimorou os termos do campo de força para hidrocarbonetos. O campo MM2 difere do MM1, basicamente, no termo do ângulo de diedro (HINCHLIFFE, 2006).

O campo de força AMBER (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) é parametrizado para simulação de aminoácidos e proteínas. Os ângulos e comprimentos de ligações utilizados em sua parametrização foram obtidos experimentalmente de dados de micro-ondas, difração de nêutrons e estudos de química quântica acurados. Os parâmetros foram então refinados com estudos de mecânica molecular sobre sistemas moleculares como tetrahidrofurano, deoxiadenosina, dimetilfosfato entre outros (HINCHLIFFE, 2006).

O campo de força MMFF (*Merck Molecular Force Field*) foi desenvolvido dentro da empresa farmacêutica Merck com o objetivo de direcioná-lo para estudos de sistemas orgânicos e biopolímeros. A parametrização do MMFF94 foi baseada em dados experimentais e em cálculos quânticos acurados realizados em

computadores. Este campo de força é capaz de gerar informações quantitativas sobre conformações e geometrias moleculares (HEHRE, 2003; HALGREN, 1996).

1.3.1.2 Mecânica quântica - Métodos *ab initio*

No final do século XVII, Isaac Newton formulou as leis do movimento de objetos macroscópicos, chamadas de mecânica clássica (ANDREI *et al.*, 2003). No início do século passado, os cientistas perceberam que a mecânica clássica não descrevia adequadamente o comportamento de partículas muito pequenas, como os elétrons e os núcleos dos átomos e moléculas (ANDREI *et al.*, 2003). O comportamento de tais partículas é descrito por um conjunto de leis chamadas de mecânica quântica (ANDREI *et al.*, 2003).

O método *ab initio* é a principal abordagem para resolver a equação de Schrödinger para moléculas poliatômicas de muitos elétrons (SHRIVER *et al.*, 2008). *Ab initio* significa, estritamente, início ou princípios fundamentais, implicando que os cálculos que utilizam esta abordagem requerem como parâmetros constantes físicas fundamentais. Esta abordagem é intrinsecamente mais rebuscada do que o procedimento semi-empírico, contudo exige maior tempo computacional (SHRIVER *et al.*, 2008). O tipo mais comum de cálculo *ab initio* é baseado no método de Hartree-Fock, no qual uma aproximação primária é aplicada às repulsões elétron-elétron, sem desprezar ou aproximar qualquer dos termos ou integrais empregados no operador Hamiltoniano (SHRIVER *et al.*, 2008).

Uma alternativa ao método *ab initio* é a Teoria Funcional da Densidade (*Density Functional Theory* - DFT), onde a energia total é expressa em termos da densidade eletrônica total, $\rho = |\psi|^2$, em vez da função de onda ψ . A vantagem da abordagem DFT é o menor custo computacional, exigindo menos tempo de computador, e, em alguns casos, particularmente para complexos de metal, tem uma melhor concordância com os resultados experimentais do que os obtidos por outros procedimentos (SHRIVER *et al.*, 2008).

Esses métodos utilizam conjuntos de bases quânticas (*basis set*) nos cálculos. Uma base quântica mínima conteria exatamente o número de funções necessárias para acomodar todos os orbitais preenchidos de um átomo, mas, na prática, uma base quântica mínima inclui todos os orbitais atômicos em uma camada. Por exemplo, uma única função do tipo 1s seria necessária para os átomos

de hidrogênio e de hélio, mas para os elementos do lítio ao neônio, seriam utilizadas funções $1s$, $2s$ e $2p$. As bases quânticas STO-3G, STO-4G, entre outras (em geral STO-nG) são todas bases quânticas mínimas (LEACH, 2001).

As bases quânticas mínimas são conhecidas por apresentarem diversas deficiências. Um problema em particular ocorre com compostos contendo átomos do final do período da tabela periódica, como por exemplo, o oxigênio ou o flúor. Estes átomos são descritos utilizando-se o mesmo número de funções de base usado para os átomos do início do período da tabela periódica, apesar de possuírem mais elétrons. O simples aumento do número de funções de base não necessariamente solucionaria o problema ou aprimoraria o modelo. A solução mais comum deste problema é a introdução de uma base quântica com funções de polarização, que possuem um número quântico angular mais elevado, correspondendo ao uso do orbital p para o átomo de hidrogênio e do orbital d para os demais elementos (LEACH, 2001).

O uso de bases quânticas contendo funções de polarização é indicado por um asterisco (*). Assim, 6-31G* refere-se a base quântica 6-31G com funções de polarização para átomos pesados (isto é, não hidrogênio). Dois asteriscos (e.g., 6-31G**) indicam a aplicação de funções de polarização (isto é, orbital p) para os átomos de hidrogênio e hélio. A base quântica 6-31G** é particularmente útil onde ocorrem ligações de hidrogênio (LEACH, 2001).

Estas bases quânticas são suficientes para a maioria dos cálculos. Entretanto, para alguns cálculos de nível mais elevado, deve-se considerar a utilização de uma base quântica que efetivamente habilite o limite a ser alcançado. Por outro lado, o custo computacional inerente a estas bases quânticas deve ser avaliado, de modo a ter-se uma relação custo/benefício favorável (LEACH, 2001).

Devido ao elevado custo computacional dos métodos *ab initio* mais sofisticados, um recurso comumente empregado é o de se aperfeiçoar a geometria com um conjunto de bases mais simples e, então, executar o cálculo em um único ponto (*Single Point Calculation*), como um método mais completo sobre a geometria resultante (LEACH, 2001).

1.3.1.3 Métodos semi-empíricos

A maior parte do tempo necessário para efetuar um cálculo *ab initio* utilizando o método Hartree-Fock é, invariavelmente, despendida na computação das integrais. Nos métodos semi-empíricos, as integrais que ocorrem na solução formal da equação de Schrödinger são igualadas a parâmetros que são escolhidos para que os resultados produzam uma melhor concordância com quantidades experimentais tais como entalpias de formação (SHRIVER *et al.*, 2008). O modo mais simples de reduzir o esforço computacional seria ignorar ou aproximar algumas destas integrais. Os métodos semi-empíricos realizam este processo, pois apenas consideram os elétrons da camada de valência em seus cálculos. A razão desta aproximação é que são os elétrons da camada de valência que se encontram envolvidos numa ligação química e outros fenômenos que se deseja investigar (LEACH, 2001).

Os cálculos por métodos semi-empíricos são feitos da mesma maneira geral que os cálculos Hartree-Fock, mas dentro deste contexto algumas informações, tais como integrais representando a interação entre dois elétrons, são aproximadas por dados empíricos ou simplesmente ignoradas (SHRIVER *et al.*, 2008). Para compensar o efeito destas aproximações, parâmetros representando outras integrais são ajustados de forma a produzir a melhor concordância com os dados experimentais (SHRIVER *et al.*, 2008). Os cálculos semi-empíricos têm tido sucesso na química orgânica, mas também têm sido desenvolvidos para a descrição da química inorgânica (SHRIVER *et al.*, 2008).

O primeiro método a utilizar essa aproximação foi o CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap* ou Negligência Completa da Sobreposição Diferencial), onde orbitais atômicos são considerados esfericamente simétricos na avaliação das integrais de repulsão eletrônica. A direcionalidade dos orbitais *p* era considerada apenas nas integrais de ressonância de um elétron. O estágio seguinte foi o método INDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap* ou Negligência Intermediária da Sobreposição Diferencial), que incluía as integrais de repulsão de um centro entre orbitais atômicos do mesmo átomo. O método NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap* ou Negligência da Sobreposição Diferencial Diatômica) foi o primeiro a incluir a direcionalidade dos orbitais atômicos durante o cálculo das integrais de repulsão (LEACH, 2001).

Com o objetivo de tornar mais acessíveis os cálculos semi-empíricos de orbitais moleculares foi desenvolvido o método MNDO (*Modified Neglect of Differential Overlap* ou Negligência Modificada da Sobreposição Diferencial) a partir da aproximação NDDO, onde está presente o efeito da direcionalidade dos termos de repulsão elétron-elétron. Os métodos AM1 (*Austin Model 1* ou Modelo Austin 1) e PM3 (*Parametric Method 3* ou Método Paramétrico 3) foram desenvolvidos para a obtenção de aproximações mais precisas. Ambos os métodos incorporam aproximações muito semelhantes, mas diferem nas suas parametrizações (DEWAR *et al.*, 1985). O aprimoramento da parametrização resultou no modelo PM5 (*Parametric Method 5* ou Método Paramétrico 5), que possui cerca de 40% de redução nos erros médios comparados aos outros métodos semi-empíricos (ROCHA *et al.*, 2006).

Recentemente, o método AM1 foi objeto de uma re-parametrização para os átomos de H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br e I, resultando no método RM1 (*Recife Model 1*). Para entalpia de formação, momento de dipolo, potencial de ionização e distância interatômica, os erros médios foram menores do que os gerados pelos métodos AM1, PM3 e PM5 nas 1736 moléculas estudadas. Apenas o ângulo de ligação calculado por RM1 obteve resultados com erro médio levemente maior do que o obtido por AM1, mas, ainda, inferior ao erro médio nos valores obtidos por PM3 e PM5 (ROCHA *et al.*, 2006).

1.3.1.4 Representação dos resultados e aplicações

Técnicas gráficas são usadas para apresentar uma variedade de resultados computacionais como uma ajuda na interpretação e ao desenvolvimento no modo de visualização das propriedades moleculares (SHRIVER *et al.*, 2008). A simulação das características eletrônicas geradas pelos cálculos quanto-mecânicos pode ser visualizada por determinadas ferramentas que auxiliam na interpretação dos dados. Entre esses estão o mapa de potencial eletrostático molecular, mapas de densidade HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital* ou Orbital Molecular de mais Alta Energia Ocupado) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* ou Orbital Molecular de mais Baixa Energia Desocupado).

O mapa de potencial eletrostático molecular é uma abordagem importante com o intuito de compreender a contribuição eletrostática em determinadas

subunidades ou em átomos específicos do composto analisado, visto que os parâmetros eletrônicos são um dos principais fatores que governam a interação fármaco-receptor.

O potencial eletrostático (ϵ_p) é definido como a energia de interação de uma molécula com um átomo de prova com carga unitária positiva (Figura 5). O potencial eletrostático representa um balanço entre as interações de repulsão, envolvendo os núcleos dos átomos carregados positivamente, e as interações de atração, envolvendo os elétrons carregados negativamente (HEHRE, 2003). As regiões de uma molécula em que o potencial eletrostático é negativo delineiam os locais que sofrem ataque eletrofílico, por exemplo, como pode ser observado acima e abaixo do plano do anel da molécula do benzeno e na região em que se localiza o átomo de nitrogênio na molécula da piridina (Figura 5). Apesar da semelhança entre as moléculas de benzeno e piridina, a superfície de potencial eletrostático revela que esta similaridade não é aplicável frente a um ataque eletrofílico.

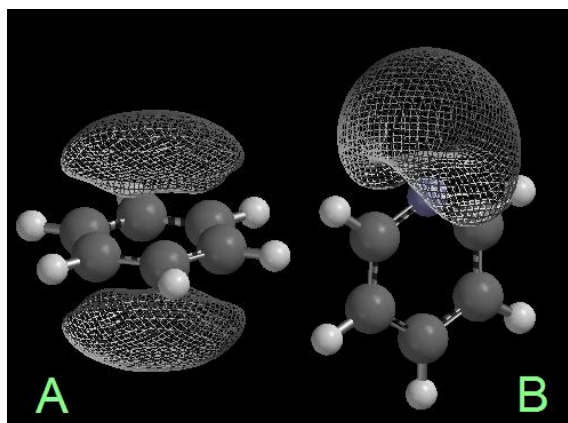


Figura 5 - Potencial eletrostático das molécula de benzeno (A) e piridina (B).

A superfície de potencial eletrostático não leva em consideração a energia de redistribuição eletrônica (a energia de “polarização”). Isto conduz a falhas no modelo, o que é solucionado considerando-se explicitamente a energia de polarização na equação de obtenção do potencial eletrostático. O potencial de polarização fornece a energia originada pela reorganização eletrônica da molécula como resultado da interação do átomo de prova com carga positiva com a molécula (HEHRE, 2003). Um terceiro descritor, o potencial de ionização local, indica a facilidade relativa com que um elétron pode ser removido (ionização) de qualquer ponto na molécula.

Estes descritores podem ser expressos como funções de coordenadas tridimensionais (x,y,z). Um modo de visualizá-los numa tela de vídeo ou página de papel bidimensional é definir um valor de superfície constante também conhecido por superfície de densidade eletrônica constante ou *isosuperfície* (Equação 2) (HEHRE, 2003).

$$f(x, y, z) = C \quad \text{Equação 2}$$

Na equação 2, o valor da constante (C) pode ser escolhido para refletir uma propriedade física específica, por exemplo, o “tamanho” de uma molécula no caso da superfície de densidade eletrônica. Assim, uma superfície de densidade eletrônica com $C = 0,1 \text{ eV/ua}^3$ fornece praticamente a mesma informação obtida com o desenho bidimensional da molécula (Figura 6).

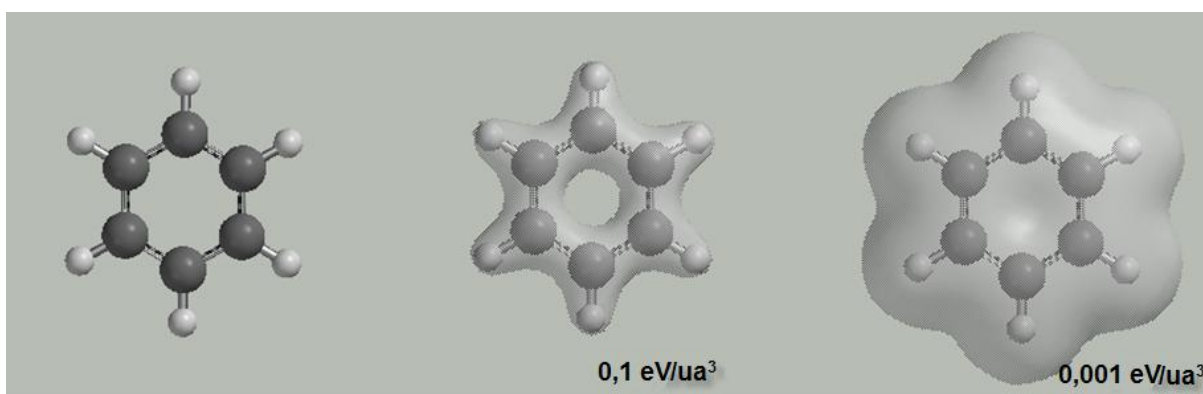


Figura 6 - Molécula do benzeno visualizada sem aplicação da superfície de densidade eletrônica (esquerda); com superfície de densidade eletrônica e valor *isosuperfície* (C) de $0,1 \text{ eV/ua}^3$ (centro) e $0,001 \text{ eV/ua}^3$ (direita).

Uma informação (propriedade) pode ser adicionada a qualquer *isosuperfície* utilizando-se cores para representar valores da propriedade. Cores num extremo do espectro visível representam valores menores da propriedade e cores no outro extremo, valores maiores da propriedade mapeada sobre a superfície (HEHRE, 2003). Por exemplo, o valor do potencial eletrostático mapeado sobre uma superfície de densidade eletrônica constante pode ser empregado para distinguir regiões ricas e deficientes em elétrons, mostrada em cores diferentes. Em geral, no caso do mapa de potencial eletrostático, iniciando pela cor vermelha (alta densidade eletrônica) e passando por várias nuances até o azul (baixa densidade eletrônica). Assim, cores

próximas ao vermelho indicam altos valores de potencial negativo, enquanto cores próximas do azul representam altos valores de potencial positivo (cores laranja, amarela e verde representam valores de potencial intermediário) (Figura 7).

O mapa de potencial eletrostático nos fornece o potencial em regiões de uma superfície particular, comumente uma superfície de densidade eletrônica correspondente ao tamanho da molécula. A construção do mapa de potencial eletrostático envolve: a) a construção da superfície de densidade eletrônica da molécula; b) a construção da superfície de potencial eletrostático; c) a aplicação de cores à superfície obtida para designar valores de potencial (Figura 7).

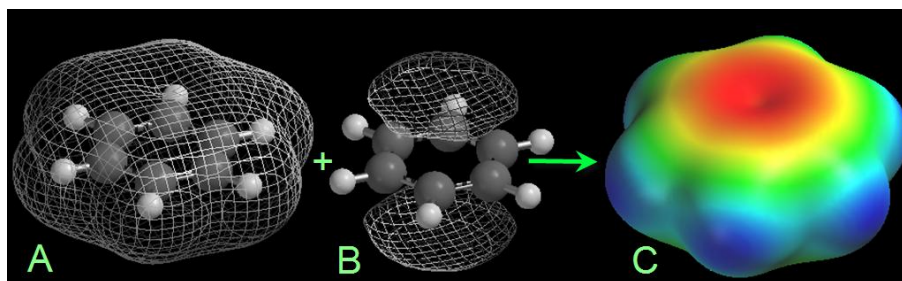


Figura 7 - Superfície de densidade eletrônica total do benzeno (A); superfície de potencial eletrostático do benzeno (B) e mapa de potencial eletrostático do benzeno (C).

Os mapas de densidade eletrônica HOMO e LUMO, codificados sobre uma superfície de van der Waals (Figura 8), são descritores quanto-mecânicos muito utilizados (KARELSON & LOBANOV, 1996; BUYUKUSLU *et al.*, 2010). De acordo com a teoria dos orbitais moleculares, a formação de um estado de transição é devida à interação dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) das espécies reagentes (ANSLYN & DOUGHERTY, 2004). HOMO, o orbital mais externo contendo elétrons, tende a doar esses elétrons. LUMO é o orbital mais interno capaz de aceitar elétrons (BUYUKUSLU *et al.*, 2010).

A energia de HOMO está diretamente relacionada ao potencial de ionização e caracteriza a susceptibilidade da molécula em doar elétrons conforme ocorre em um ataque nucleofílico. A energia do LUMO está diretamente relacionada com a afinidade por elétrons e caracteriza a susceptibilidade da estrutura em sofrer um ataque nucleofílico. A diferença entre as energias HOMO e LUMO (HOMO-LUMO) é um importante indicador de estabilidade da molécula e é conhecida como energia *gap* (BUYUKUSLU *et al.*, 2010). Em geral, a reatividade química aumenta quando a

energia LUMO diminui e energia HOMO aumenta (ANSLYN & DOUGHERTY, 2004; BUYUKUSLU *et al.*, 2010).

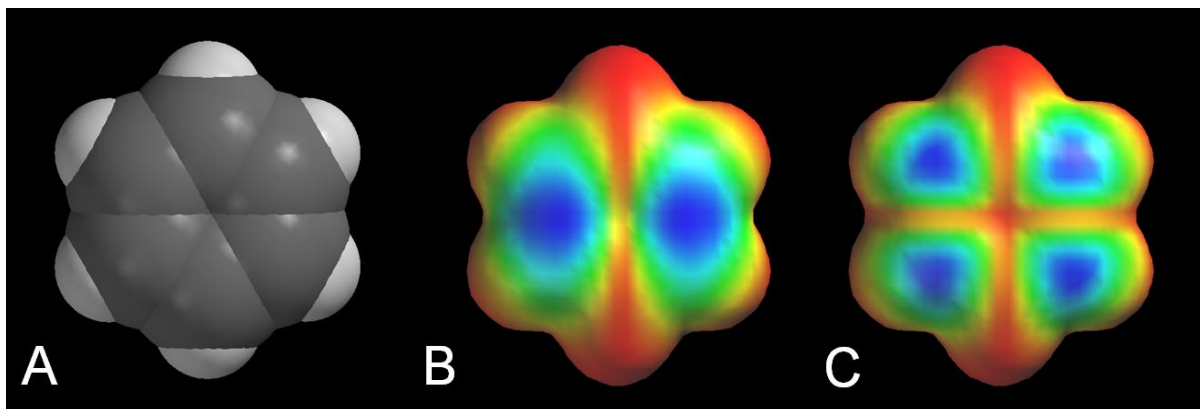


Figura 8 - Superfície de van der Waals do benzeno (A); mapa de HOMO do benzeno (B) e mapa de LUMO do benzeno (C).

1.4 ESTUDO TEÓRICO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DE TOXICIDADE *IN SILICO* (ADMET - Absorção, Distribuição, Metabolização, Eliminação e Toxicidade)

O estudo inicial das propriedades físico-químicas teóricas *in silico* de compostos candidatos a fármacos é uma abordagem atualmente muito utilizada para prever dados relacionados ao ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicologia), também chamada de ADME/Tox, cujo objetivo é limitar o gasto desnecessário em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos futuros, economizando tempo e investimento (HODGSON, 2001; LIPINSKI *et al.*, 2001; VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003; LIPINSKI, 2004; RAWLINS, 2004; KHAN & SYLTE, 2007).

A confiabilidade nestes modelos teóricos é dependente de informações (banco de dados) que estão sendo gradualmente liberadas pelas indústrias farmacêuticas. Estes modelos também são submetidos a testes de validação, em que o objetivo é determinar o grau de confiança nos mesmos (STOUCH *et al.*, 2003; TETKO, 2008).

Os dados físico-químicos teóricos relacionados ao comportamento farmacocinético teórico dos compostos estudados são, geralmente, obtidos *in silico* por meio de programas como Osiris[®] Property Explorer (Actelion Pharmaceuticals).

Podem ser obtidos dados relacionados ao risco de toxicidade (mutagênico, tumorigênico, irritante e efeitos no sistema reprodutor), *druglikeness* (semelhança com fármacos) e *drugscore* (índice de aproximação para se tornar um potencial candidato a fármaco). Este último combina valores obtidos de *druglikeness*, cLogP (lipofilicidade), logS (solubilidade), peso molecular e riscos de toxicidade em um único valor de modo a avaliar se o composto tem potencial para se tornar um fármaco (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

Os resultados obtidos (Figura 9) apresentaram um bom grau de confiabilidade. Observa-se, por exemplo, que nos valores obtidos para o risco mutagênico, apenas 14% das substâncias químicas tóxicas avaliadas foram erroneamente atribuídas como de risco baixo, enquanto 86% tiveram atribuição entre alto e médio risco e, portanto, de acordo com os dados experimentais.

O processo de validação utilizou apenas fármacos disponíveis comercialmente, com apenas 12% de resultados discrepantes distribuídos por alto e médio risco; enquanto a maioria dos fármacos foi corretamente identificada (88%) como não possuindo efeitos tóxicos (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

O algoritmo de avaliação de semelhança a fármacos (*druglikeness*) foi desenvolvido internamente na Actelion Pharmaceuticals Ltd. A lista de fragmentos foi criada a partir de um banco de dados de 3300 fármacos comerciais (fragmentos *druglike*) assim como 15000 substâncias químicas comercialmente disponíveis no catálogo Fluka[®] (fragmentos não semelhantes a fármacos) formando uma lista completa com todos os fragmentos disponíveis. A geração dos fragmentos ocorre a partir da quebra das ligações simples. O valor de *druglikeness* é, então, calculado de acordo com valores dos fragmentos que estão presentes na molécula em estudo (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

Todos os fragmentos com uma frequência global foram agrupados a fim de se remover aqueles altamente redundantes. Para os demais fragmentos, o potencial de *druglikeness* foi determinado como o logaritmo do quociente da frequência nos fármacos comerciais versus as substâncias químicas do catálogo Fluka (Figura 10). Neste gráfico 80% dos fármacos apresentam um valor de *druglikeness* positivo, enquanto que as substâncias químicas do catálogo da Fluka apresentaram um valor negativo (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/druglikeness>).

Os dados assim obtidos com o programa Osiris® Property Explorer podem ser utilizados como parâmetros na avaliação físico-química e toxicológica com boa confiabilidade (COSTA *et al*, 2006).

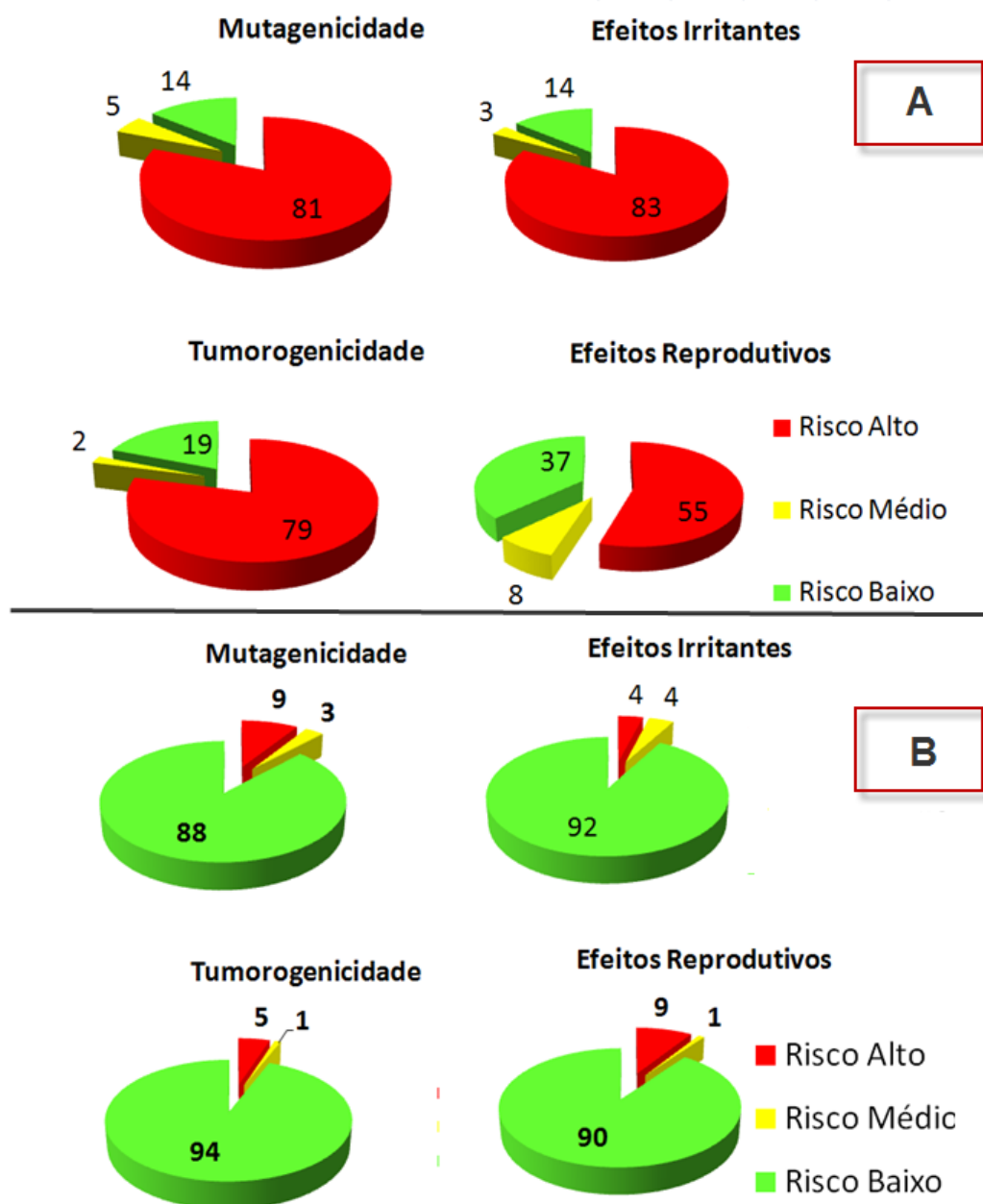


Figura 9 - Osiris® Property Explore: Gráfico de Validação. Resultado percentual da validação com substâncias químicas com efeitos tóxicos (A) e utilizando-se fármacos em comercialização (B) (Adaptado de <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

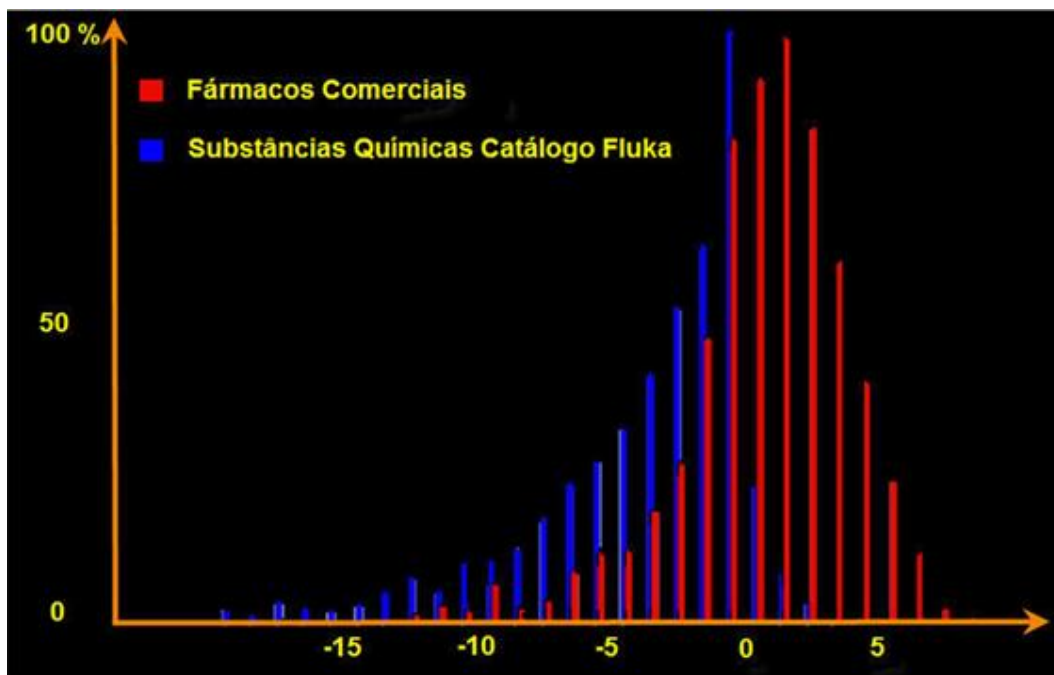


Figura 10 - Distribuição de *druglikeness*. Fármacos comerciais (em vermelho) versus substâncias químicas do catálogo Fluka (em azul) (Adaptado de <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

1.4.1 Regra de Lipinski

A alta biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral é, frequentemente, uma consideração importante no desenvolvimento de moléculas bioativas como agentes terapêuticos. Assim, associou-se que um candidato a fármaco deve atender a quatro parâmetros globalmente associados com a biodisponibilidade: o peso molecular, o cLog P (lipofilicidade), o número de doadores de ligação de hidrogênio e o número de receptores de ligação de hidrogênio. Essa condição ficou conhecida como Regra dos cinco, porque para cada um dos quatro parâmetros os valores encontrados eram próximos a cinco ou eram múltiplos de cinco (LIPINSKI, 2004).

A Regra dos cinco de Lipinski utilizou um conjunto de substâncias extraído do WDI (*World Drugs Index* – Índice de Fármacos Mundial), um banco de dados computadorizado contendo mais de 50.000 substâncias. Esta regra (LIPINSKI, 2004) estabelece que uma absorção ou permeação reduzida será mais comum quando:

- ✓ Há mais de 5 doadores de ligação de hidrogênio (expresso pela soma de *OH* e *NH* na molécula);

- ✓ O peso molecular é maior que 500;
- ✓ O cLogP (lipofilicidade) é maior que 5;
- ✓ Há mais de 10 aceptores de ligação de hidrogênio (expresso pela soma de átomos de N e O);

Fármacos derivados de produtos naturais, possuidores de estruturas macromoleculares, são exceções à Regra dos cinco, pois outros mecanismos estão envolvidos na absorção destes. Uma possível explicação para estas substâncias que violam a Regra dos cinco seria que membros destas classes terapêuticas apresentam características estruturais que permitem ao fármaco atuar como substrato para transportadores biológicos (HOPKINS & GROOM, 2002; LIPINSKI, 2004).

Uma extensão à Regra dos cinco foi obtida após o estudo de uma série de compostos que foram ensaiados em ratos. Nesse trabalho, compostos com o número de ligações rotáveis menor que dez e área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 \AA^2 (ou a soma do número de aceptores mais doadores de ligação de hidrogênio menor que 12) apresentaram uma maior probabilidade de boa biodisponibilidade oral. Também foi observado que uma reduzida área de superfície polar (PSA) correlaciona melhor com o aumento da velocidade de permeação do que a lipofilicidade (cLogP), e um aumento no número de ligações rotáveis possui um efeito deletério na velocidade de permeação (VEBER *et al.*, 2002; KELLER, PICHOTA, YIN, 2006).

Diversas superfícies podem ser calculadas para uma molécula (Figura 11). Dentre elas, temos a área de superfície polar (PSA - *Polar Surface Area*), definida como a soma das áreas de superfície de van der Waals dos átomos polares (oxigênio e nitrogênio). Uma superfície polar menor que 90 \AA^2 é referenciada como o limite aproximado para que a molécula ultrapasse a barreira hemato-encefálica (WERMUTH, 2003).

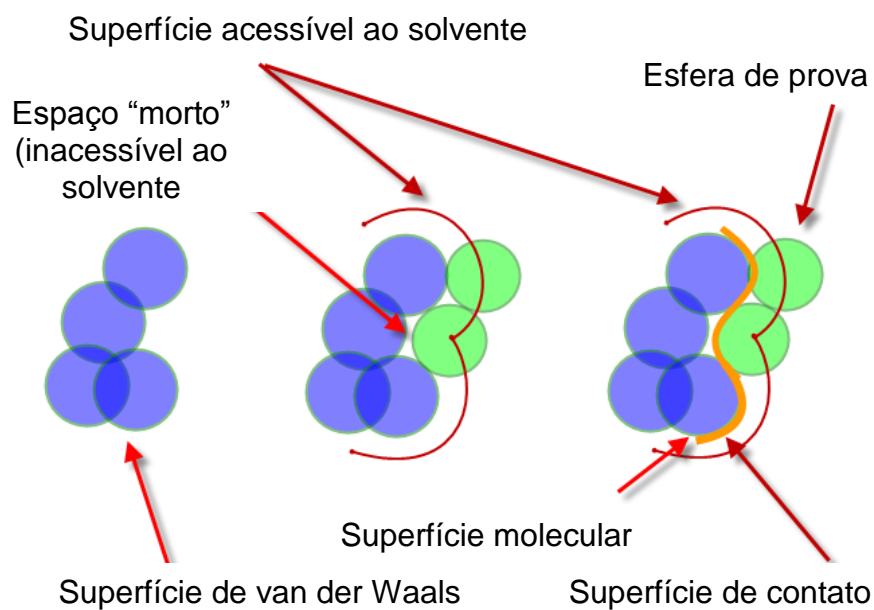


Figura 11 - A superfície de van der Waals corresponde ao contorno da superfície das esferas de van der Waals dos átomos. A superfície molecular é gerada rolando-se uma esfera de prova (geralmente de raio 1.4 Å, representando a molécula de água) sobre a superfície de van der Waals. O centro da esfera de prova traça a superfície acessível ao solvente (Adaptado de LEACH, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

As doenças tropicais negligenciadas são um dos maiores problemas de saúde pública em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, levando ao óbito cerca de 14 milhões de pessoas a cada ano.

A leishmaniose faz parte desse grupo de doenças, representando uma grande parcela dos problemas de saúde pública mundial, atingindo atualmente 350 milhões de pessoas ao redor do mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a leishmaniose é uma doença tropical descontrolada com altas taxas de morbidade e mortalidade na África, Ásia e América.

Ainda assim, menos de 1% dos mais de 1300 novos medicamentos desenvolvidos nos últimos 25 anos foram destinados ao tratamento de doenças listadas como negligenciadas. Este dado contrasta com o investimento das indústrias farmacêuticas em pesquisa de medicamentos para as chamadas doenças globais, evidenciando um desequilíbrio no destino dos recursos para o setor, o que enfatiza uma crise em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) de medicamentos para o tratamento de doenças que afetam grande parte da população mundial com menor poder aquisitivo.

Apesar de progressos importantes e dos conhecimentos fundamentais sobre o parasita *Leishmania*, a atual terapia para leishmaniose ainda é insatisfatória, devido a fatores, como: limitada eficácia, efeitos adversos indesejáveis, longo prazo e alto custo do tratamento.

O desenvolvimento de resistência aos medicamentos pelos agentes patogênicos, especialmente em pacientes HIV-*Leishmania* co-infectados, também tem agravado o problema. Assim, há uma necessidade urgente para o desenvolvimento de novos fármacos, com reconhecida eficiência e segurança para utilização no tratamento da leishmaniose.

Na busca de novos compostos com potencial atividade leishmanicida, que possam ser considerados protótipos a fármacos para o tratamento da leishmaniose, uma nova série de derivados da chalcona foi sintetizada sem o grupo funcional sulfonamida e seu perfil de atividade antileishmania foi avaliado, com o intuito de compará-la com o composto protótipo **14** da série de derivados 4-metóxicalcona-3-sulfonamida estudados por Andrighetti-Fröhner e colaboradores (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2008).

Acredita-se que este trabalho possa gerar informações estruturais e eletrônicas importantes sobre as chalconas e grupos funcionais inseridos a essa molécula, para o desenvolvimento de futuros novos protótipos a fármacos leishmanicidas, os quais poderão apresentar um melhor perfil de atividade em menor tempo de tratamento e menos efeitos adversos em relação às terapias existentes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo principal deste trabalho foi o estudo da relação estrutura-atividade (*structure activity relationship* - SAR) e do perfil toxicológico *in silico*, utilizando metodologias de simulação computacional, de novos compostos derivados da chalcona (Figura 12) modificados estruturalmente em relação às posições R¹, R², R³, R⁴, R⁵, X, Y, W e Z (**15a-s**) que demonstraram atividade leishmanicida.

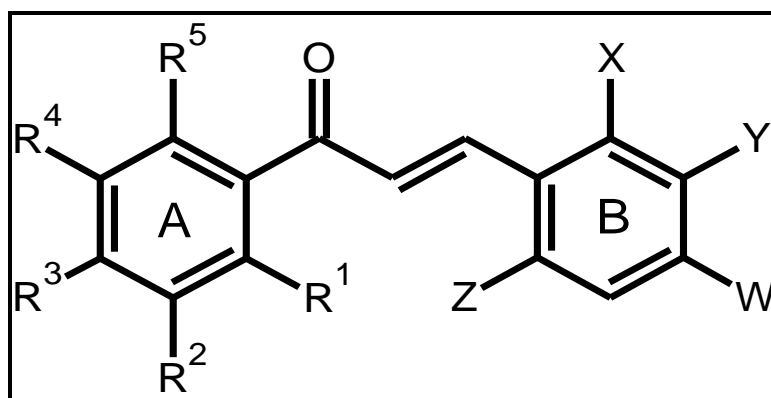


Figura 12 – Estrutura geral dos derivados da chalcona (**15a-s**)

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter parâmetros estruturais e estereoelétrônicos, tais como, determinação da conformação de menor energia, mapas de potencial eletrostático molecular, coeficientes e energias de HOMO e LUMO, momento de dipolo que possam ser correlacionados com a atividade leishmanicida da série de derivados da chalcona (**15a-s**).

Avaliar a importância dos grupos substituintes e o efeito no perfil de atividade leishmanicida da série de derivados da chalcona (**15a-s**) em comparação ao derivado 4-metóxicalcona-3-benzilsulfonamida (**14**) estudado por Andrighetti-Fröhner e colaboradores (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2008).

Realizar predição teórica do perfil toxicológico dos derivados (**15a-s**), analisando parâmetros de toxicidade (mutagenicidade, tumorigenicidade e efeitos irritantes) e propriedades físico-químicas baseadas na Regra dos cinco de Lipinski

como peso molecular, lipofilicidade e grupos doadores e receptores de ligação de hidrogênio, que são importantes na seleção de novos compostos bioativos candidatos a fármacos.

Avaliar os parâmetros *drugscore* e *druglikeness*, visando à indicação dos compostos da série de derivados da chalcona (**15a-s**) com características mais favoráveis a protótipos de fármaco.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS DA CHALCONA

A nova série de derivados da chalcona (**15a-s**) foi sintetizada pela equipe do Dr. Ricardo José Nunes do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os antibióticos de uso clínico pentamidina e anfotericina B foram utilizados em condições idênticas das utilizadas com os derivados da chalcona (**15a-s**), como controles positivos ao longo deste estudo, visto que as formas promastigotas dos parasitas são sensíveis a estes dois fármacos.

4.2 METODOLOGIA DO ENSAIO BIOLÓGICO

Os testes de atividade biológica dos derivados da chalcona (**15a-s**) foram realizados com a forma promastigota de *Leishmania braziliensis* e os testes de citotoxicidade foram feitos com células VERO. Estes estudos foram realizados pela equipe do Dr. Mário Steindel do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

A avaliação da atividade biológica dos derivados da chalcona (**15a-s**) permitiu determinar a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento do parasita (IC_{50}) e a citotoxicidade foi avaliada como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular (CC_{50}).

4.3 METODOLOGIA COMPUTACIONAL

4.3.1 Estudo da relação estrutura-atividade

Para o estudo da relação estrutura-atividade (SAR), utilizou-se técnicas de modelagem molecular com o intuito de obter parâmetros estruturais e estereoeletrônicos, tais como, mapas de potencial eletrostático molecular, densidades e energias de HOMO e LUMO, lipofilicidade (cLogP), momento de dipolo e outras propriedades físico-químicas que possam estar relacionados com a atividade biológica dos compostos analisados.

As estruturas dos compostos foram desenhadas e otimizadas, usando o campo de força MMFF94 (mecânica molecular), disponível no programa Spartan'08[®] (Wavefunction Inc., em ambiente Windows[®]) disponibilizados no Laboratório ModMolQSAR-3D da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A Figura 13 ilustra a interface gráfica do programa Spartan'08[®].

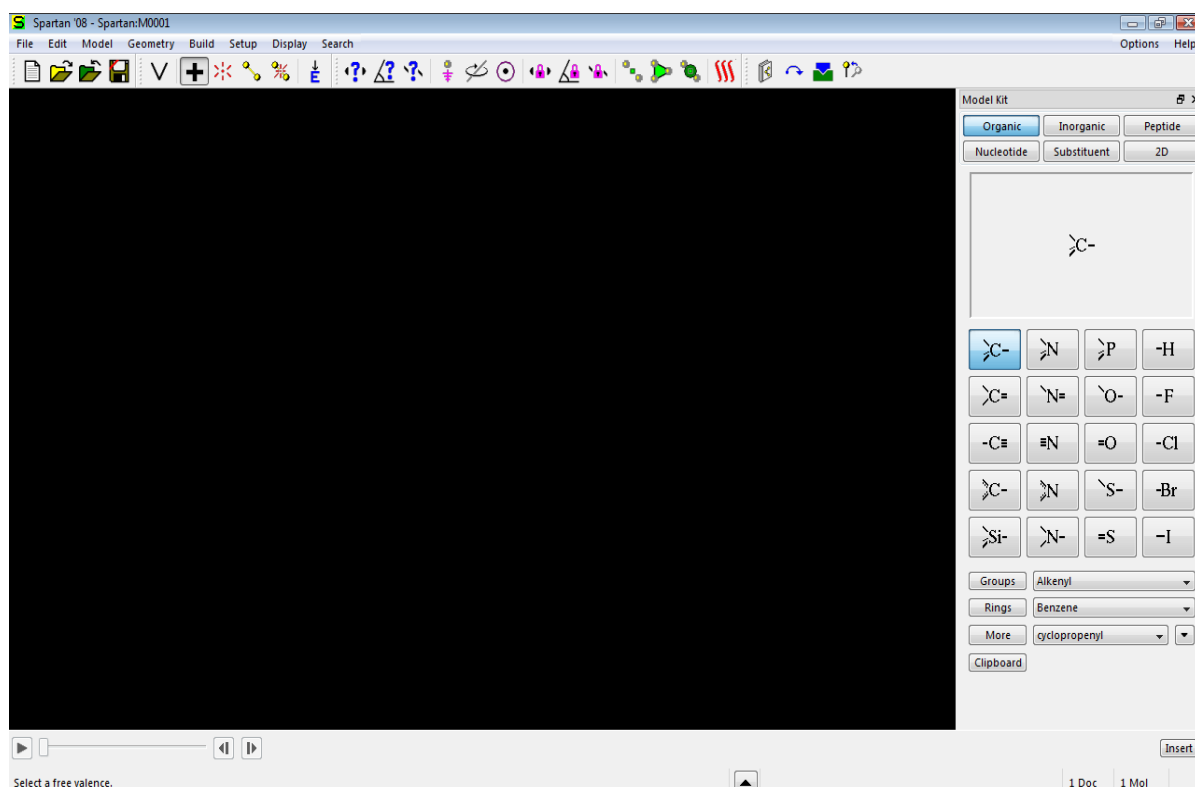


Figura 13 - Interface gráfica do programa Spartan'08[®], demonstrando a tela de visualização das estruturas, a janela de construção dos compostos (direita) e as ferramentas de manuseio das estruturas (acima).

Todas as estruturas foram calculadas, simulando no vácuo, na forma neutra e sem qualquer restrição geométrica. A análise conformacional foi efetuada usando o campo de força MMFF94 (Mecânica Molecular). O equilíbrio geométrico e o refinamento das estruturas foram efetuados usando o método semi-empírico RM1. O confômero de menor energia foi submetido ao cálculo de ponto único (*single point calculation*) usando o método DFT-B3LYP (Mecânica Quântica), com a base 6-31G*. A seguir, foram obtidos os valores de momento de dipolo, mapa de potencial eletrostático molecular (MEP), mapa de densidade eletrônica HOMO, mapa de densidade eletrônica LUMO, distribuição dos orbitais HOMO e LUMO e lipofilicidade. Os valores de lipofilicidade (cLogP) foram obtidos pelo modelo de Crippen,

disponível no pacote do Spartan'08[®]. O fluxograma apresentado na Figura 14 ilustra a metodologia aplicada nesse estudo.

Os dados físico-químicos e toxicológicos *in silico* foram obtidos utilizando-se o programa Osiris[®] Property Explorer da Actelion Pharmaceuticals Ltda.

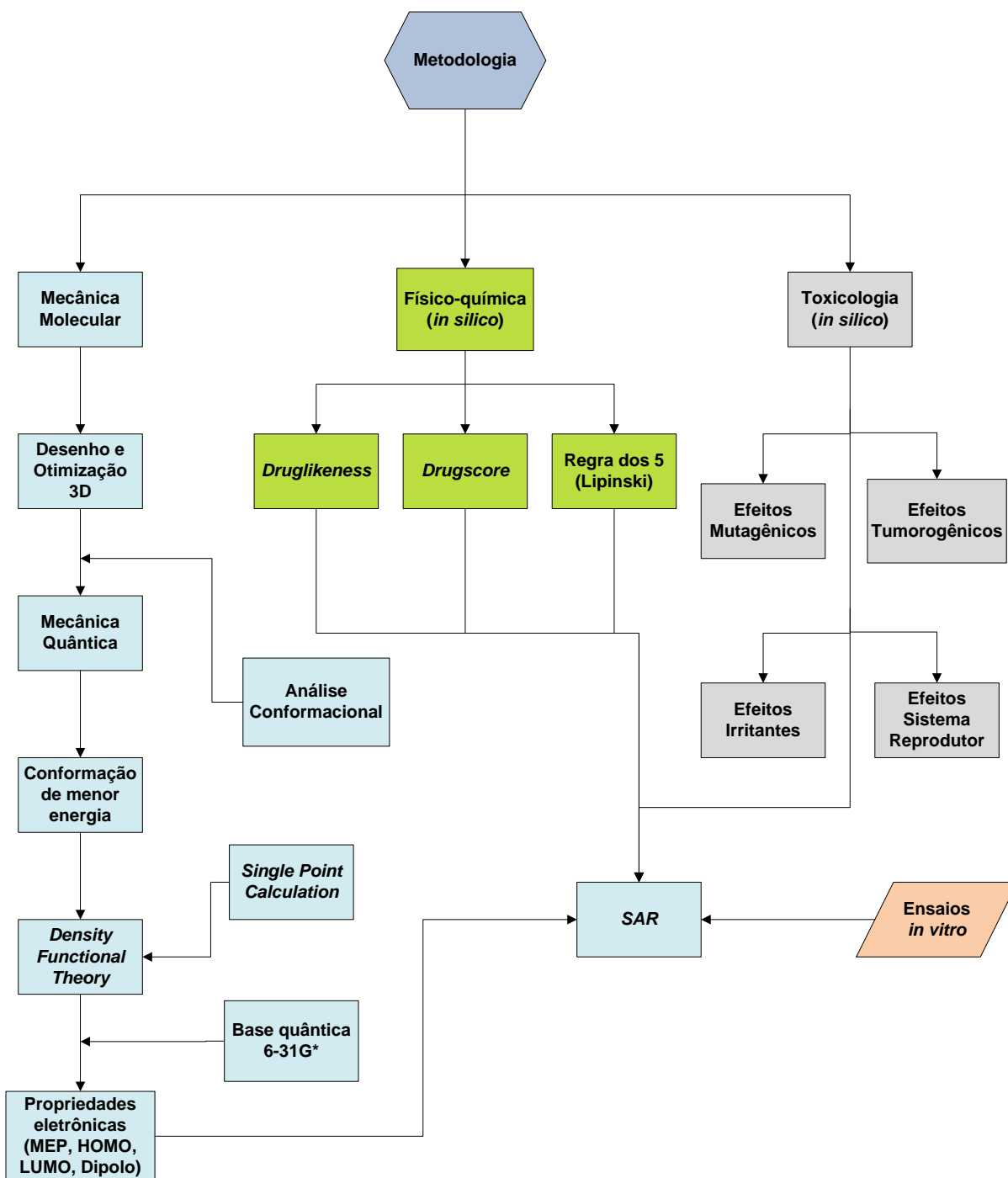


Figura 14 - Fluxograma da metodologia computacional utilizada no estudo da relação estrutura-atividade (SAR).

4.3.2 Estudo *in silico* das propriedades físico-químicas e de toxicidade

O estudo físico-químico teórico *in silico* é uma abordagem atualmente muito utilizada no estudo inicial das propriedades farmacocinéticas, cujo objetivo é limitar o gasto desnecessário em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos futuros, economizando tempo e investimento. A confiabilidade nestes modelos teóricos é dependente de informações (banco de dados) que estão sendo gradualmente liberados pelas indústrias farmacêuticas. Estes modelos também são submetidos a testes de validação, em que o objetivo é determinar o grau de confiança nos mesmos.

Os dados físico-químicos teóricos relacionados ao comportamento farmacocinético teórico dos compostos estudados foram obtidos *in silico* através do programa Osiris[®] Property Explorer da Actelion Pharmaceuticals. Foram obtidos dados relacionados ao risco de toxicidade (mutagênico, tumorigênico, irritante e efeitos no sistema reprodutor), *druglikeness* (semelhança com fármacos) e *drugscore* (índice de aproximação para se tornar um potencial candidato a fármaco). Este último combina os valores obtidos de *druglikeness*, cLogP (lipofilicidade), logS (solubilidade), peso molecular e riscos de toxicidade em um único valor de modo a avaliar se o composto tem potencial para se tornar um fármaco (Figura 15).

O risco de toxicidade é baseado no banco de dados de um conjunto de substâncias químicas que possuem comprovadamente efeito tóxico (*Registry of Toxic Effects of Chemical Substances* - RTECS) e validado com um banco de dados contendo um conjunto de fármacos comercialmente disponíveis e largamente usado no mercado. Os resultados obtidos apresentaram um bom grau de confiabilidade. No processo de validação utilizou-se apenas fármacos disponíveis comercialmente com apenas 12% de resultados discrepantes distribuídos por alto e médio risco; enquanto a maioria dos fármacos foi corretamente identificada (88%) como não possuindo efeitos tóxicos. O algoritmo de avaliação de semelhança a fármacos (*druglikeness*) é calculado partindo-se de uma lista de fragmentos, criada a partir de um banco de dados de 3300 fármacos comerciais (fragmentos *druglike*) assim como 15000 substâncias químicas comercialmente disponíveis no catálogo Fluka[®] (fragmentos não-*druglike*).

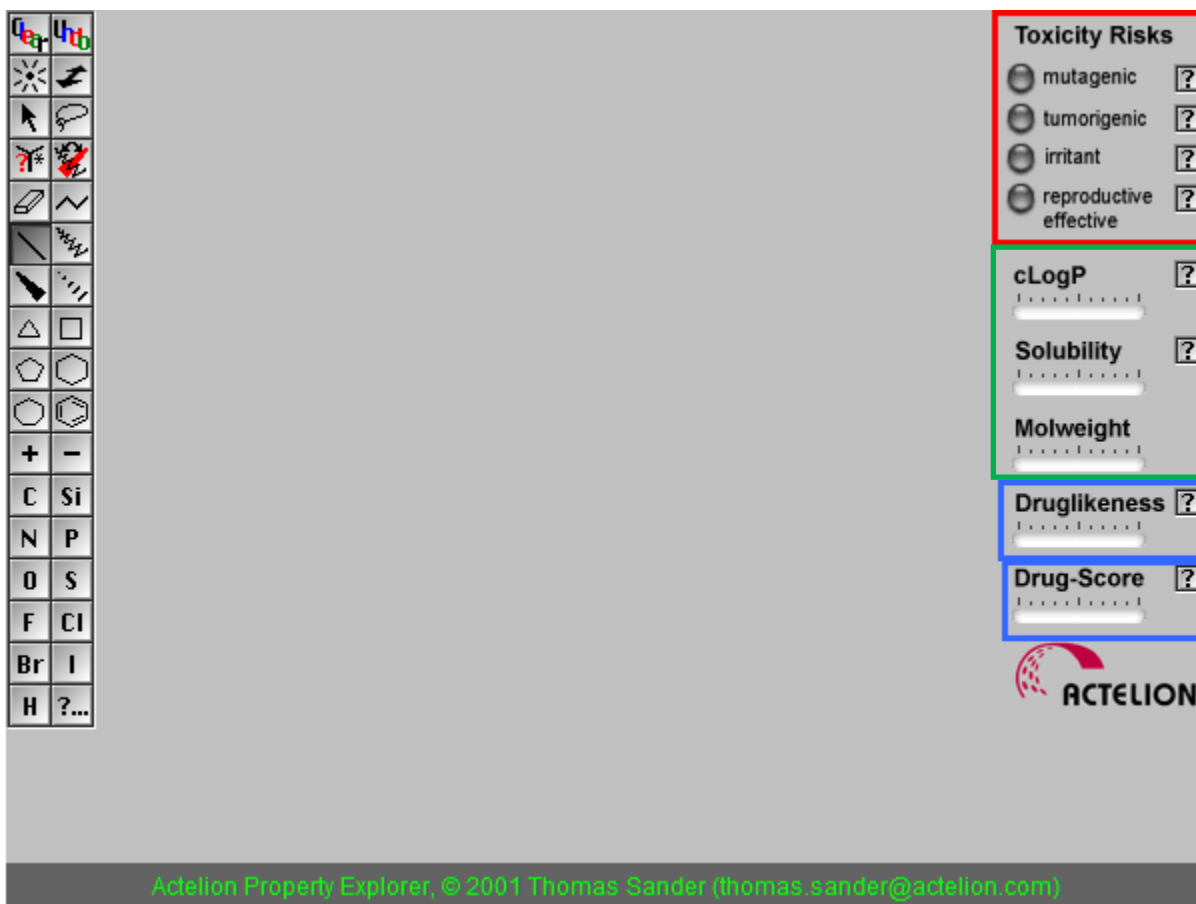


Figura 15 - Interface gráfica do programa Osiris[®] Property Explorer com os respectivos perfis toxicológicos (em vermelho), propriedades físico-químicas (em verde), *Druglikeness* e *DrugScore* (em azul).

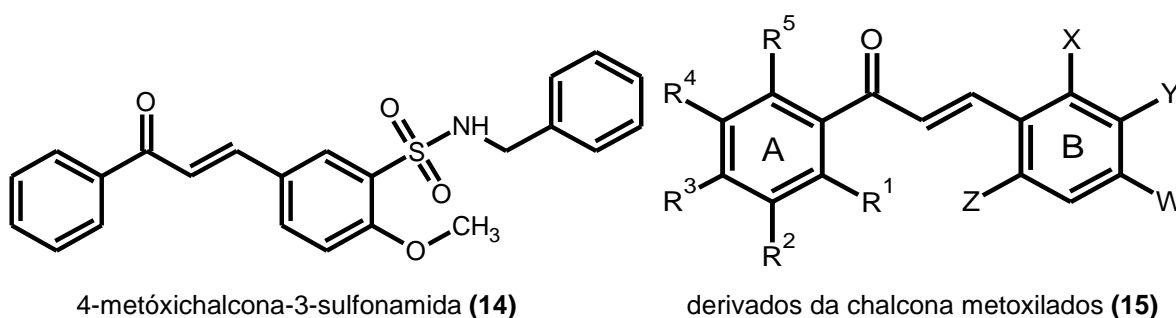
As substâncias foram avaliadas quanto aos parâmetros globalmente associados com a solubilidade e permeabilidade: o peso molecular, o cLogP (lipofilicidade), o número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD) e o número de receptores de ligação de hidrogênio (HBA), conforme a Regra dos cinco (LIPINSKI, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DOS DADOS DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS DERIVADOS DA CHALCONA

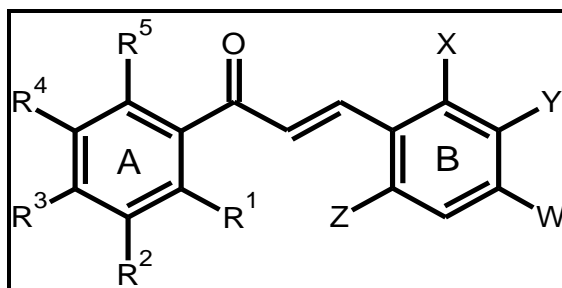
Uma série de derivados da chalcona (**15a-s**) foi modificada estruturalmente em relação aos derivados dos 4-metóxicalcona-3-sulfonamida estudados por Andrighetti-Fröhner e colaboradores com o intuito de observar o efeito no perfil de atividade leishmanicida (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2008). Estes compostos foram sintetizados pela equipe do Dr. Ricardo José Nunes e avaliados quanto à atividade leishmanicida pela equipe do Dr. Mário Steindel, ambos da UFSC.

Esta série de derivados (**15a-s**) possui substituintes metoxila em diferentes posições do anel **A** (R^1 - R^5) e substituintes diversos no anel **B** (**X**, **Y**, **W** e **Z**) da chalcona, conferindo diferentes características estereoelétricas (Tabela 1). Uma das modificações estruturais foi a inserção de ao menos um substituinte *orto* (R^1 e/ou R^5) no anel aromático **A** (ligado diretamente à função carbonila). Isso impõe uma rigidez estrutural e, portanto, diminui o grau de liberdade conformacional do anel fenila.



Esta série totaliza 19 compostos (**15a-s**), dos quais cinco derivados (**15a-e**) são tri-substituídos pelo grupo metoxila nas posições *orto* (R^5), *meta* (R^2) e *para* (R^3) do anel **A**, 13 derivados (**15f-r**) são tri-substituídos pelo grupo metoxila nas posições *di-orto* (R^1 e R^5) e *para* (R^3) do anel **A** e um derivado (**15s**) é substituído pelo grupo metoxila nas posições *orto* (R^1) e *para* (R^3) e pelo grupo hidroxila na posição *orto* (R^5) no anel **A**.

Tabela 1 - Atividade antileishmania contra cepas promastigotas de *L. braziliensis* (IC₅₀, µM), toxicidade celular (CC₅₀, µM) e índice de seletividade (SI = CC₅₀/IC₅₀) dos derivados da chalcona (15a-s).



| | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | R ⁵ | X | Y | W | Z | IC ₅₀ | CC ₅₀ | SI |
|----------------|------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|----|------------------|------------------|--------|
| 15a | H | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | H | H | 12,88 | 391,61 | 30,40 |
| 15b | H | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | Cl | H | 29,69 | 278,61 | 9,38 |
| 15c | H | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | Cl | H | H | 15,42 | 381,67 | 24,75 |
| 15d | H | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | Cl | Cl | H | 147,86 | 905 | 6,12 |
| 15e | H | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | 14,01 | 295,36 | 21,08 |
| 15f | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | OCH ₃ | H | Nd | Nd | Nd |
| 15g | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | Cl | H | 8,22 | 147,11 | 17,89 |
| 15h | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | Cl | H | H | 2,70 | 9,25 | 3,42 |
| 15i | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | Cl | H | H | H | 3,94 | 215,57 | 54,71 |
| 15j | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | Cl | Cl | H | 4,62 | 109,27 | 23,65 |
| 15k | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | Cl | H | H | Cl | 7,44 | 134,52 | 18,08 |
| 15l | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | NO ₂ | H | H | 20,06 | 83,86 | 4,18 |
| 15m | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | NO ₂ | H | H | H | 29,77 | 3350,22 | 112,53 |
| 15n | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | NO ₂ | H | 11,75 | 123,90 | 10,54 |
| 15o | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | 2-C ₁₀ H ₈ * | | | Nd | Nd | Nd | |
| 15p | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | 1-C ₁₀ H ₈ * | | | Nd | Nd | Nd | |
| 15q | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | Y-OCH ₂ O-W** | | H | Nd | >1000 | Nd |
| 15r | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | N(CH ₃) ₂ | H | Nd | Nd | Nd |
| 15s | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OH | H | Cl | H | H | 194,14 | 340,88 | 1,75 |
| Pentamidina | | | | | | | | | | 6,0 | - | |
| Anfotericina B | | | | | | | | | | 0,30 | - | |

Nd = Não determinado, por não apresentar atividade significativa na concentração de 100 µM.

* = Anel aromático **B** trocado pelo grupo funcional naftila.

** = Grupo funcional metilenodióxi como substituinte nas posições Y e W do anel aromático **B**.

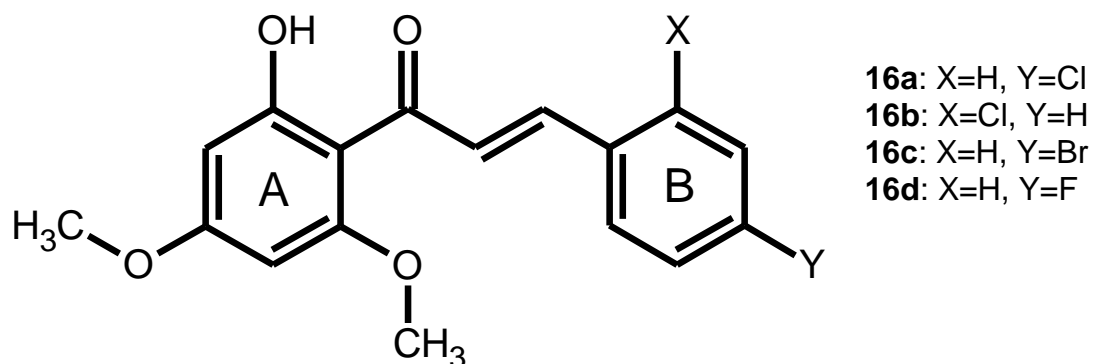
- = Não realizado.

Esta série de derivados (15a-s) foi avaliada quanto ao seu perfil de atividade antileishmania contra cepas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (Tabela 1). Os derivados 15a-e apresentam três substituintes metoxila no anel aromático **A**, tendo como característica estrutural importante apenas uma mono-substituição na posição *orto*, ao contrário da maioria dos derivados que são di-*orto* substituídos. Observa-se

nesse grupo de derivados (**15a-e**) que a substituição no anel **B** por um átomo de cloro na posição *para* (**15b**) ou *meta* (**15c**) do anel **B** ou por um grupo metoxila na posição *meta* (**15e**) não altera significativamente o perfil de atividade em relação ao derivado não substituído (**15a**). Entretanto, a inserção de dois átomos de cloro (nas posições *meta* e *para*, **15d**) reduziu cerca de 12 vezes a atividade. Os derivados que também possuem três grupos metoxila, mas que são di-*orto* substituídos, apresentaram melhor perfil de atividade (**15g-n**). Cinco destes derivados (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k**) apresentaram valores de IC_{50} menores do que $10\mu M$. Dentre estes, os derivados **15h** ($IC_{50} = 2,70\ \mu M$), **15i** ($IC_{50} = 3,94\ \mu M$) e **15j** ($IC_{50} = 4,62\ \mu M$) foram mais ativos do que a pentamidina ($IC_{50} = 6,0\ \mu M$), fármaco de referência utilizado como um dos controles neste estudo.

Os derivados **15b**, **15c**, **15g**, **15h**, **15i** e **15j**, que possuem o átomo de Cl como substituinte no anel fenila **B**, apresentaram atividade contra *Leishmania braziliensis* e isso sugere que as propriedades químicas deste halogênio são importantes, visto que os halogênios são lipofílicos e podem facilitar a permeação dos derivados através da membrana celular até o sítio de ação.

Boeck e colaboradores (2006) estudaram uma série de derivados da chalcona (**16**) com diferentes substituintes nos anéis **A** e **B**. Entre esses derivados, os compostos **16a**, **16b**, **16c** e **16d** apresentaram significativa atividade contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* (BOECK *et al.*, 2006). Esses compostos possuem semelhança estrutural com o derivado **15s** estudado neste trabalho. O composto **15s** ($IC_{50} = 194,14\ \mu M$), avaliado contra *Leishmania braziliensis*, apresenta os mesmos substituintes e nas mesmas posições do anel **A** que os compostos **16a** ($IC_{50} = >100\ \mu M$), **16b** ($IC_{50} = 5,1\ \mu M$), **16c** ($IC_{50} = 59,8\ \mu M$) e **16d** ($IC_{50} = 0,8\ \mu M$), e todos apresentam átomos de halogênios no anel **B**, mas em posições diferentes (BOECK *et al.*, 2006). O derivado **15s** possui o átomo de cloro na posição *meta* do anel **B**, enquanto o composto **16a** apresenta o átomo de cloro em *para* e **16b** em *orto*. O átomo de cloro em *orto* no composto **16b** aumentou significativamente a atividade leishmanicida quando comparado aos compostos **16a** e **15s**. Os compostos **16c** e **16d** apresentam na posição *para* do anel **B** os átomos de bromo e flúor, respectivamente. O composto **16d** demonstrou o melhor perfil antileishmania da série **16**, indicando a importância dos halogênios e suas propriedades, como lipofilicidade e eletronegatividade, além de substituintes nas posições *orto* no anel **A**.



Derivados (**16**) da chalcona com atividade leishmanicida estudados por Boeck e colaboradores (2006)

A Figura 16 demonstra o alinhamento e sobreposição das conformações de menor energia de cada derivado da chalcona estudado (**15a-s**). O equilíbrio de geometria foi simulado no vácuo, sendo os mínimos globais das conformações encontradas influenciados apenas pelas características e propriedades químicas de seus substituintes. Os mínimos globais encontrados para cada uma das estruturas dos derivados nessas condições de avaliação, podem ser outros em diferentes ambientes, como no cristal da substância pura ou em solução aquosa.

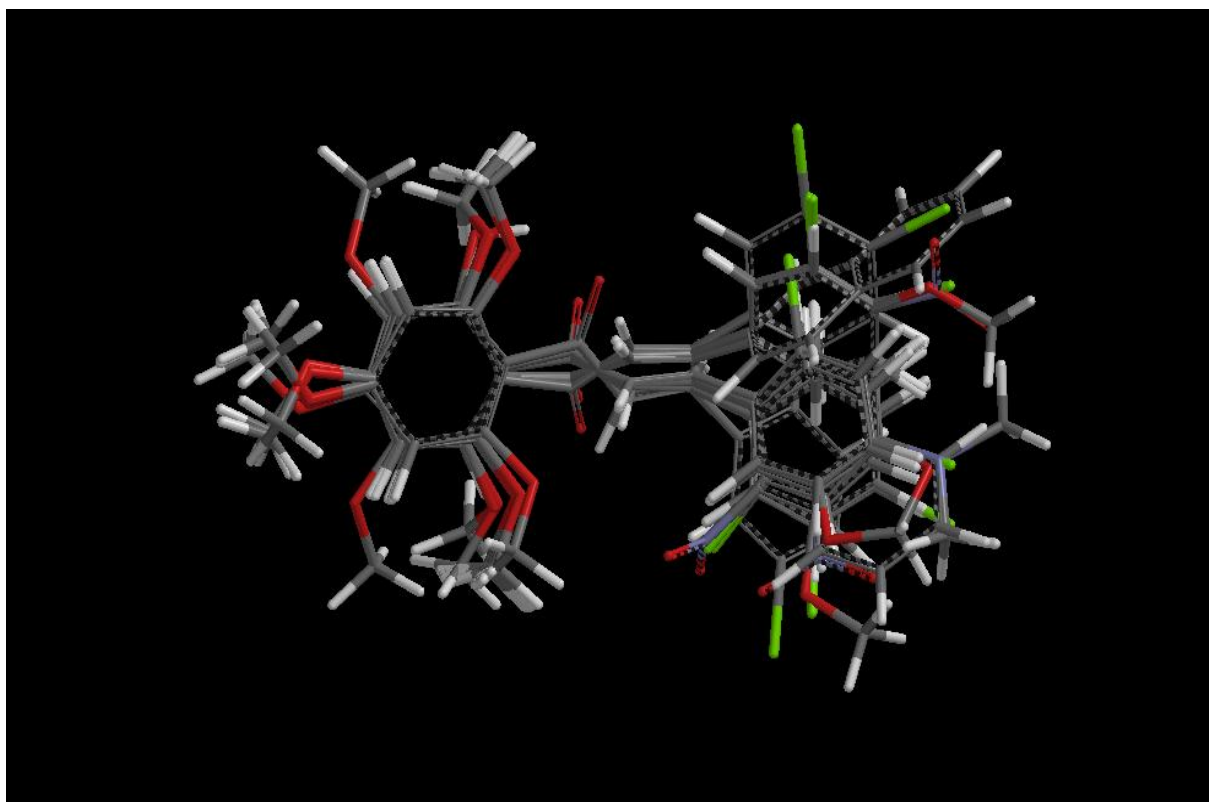


Figura 16 – Alinhamento e Sobreposição das conformações de menor energia de todos os derivados da chalcona (**15a-s**).

Os halogênios podem contribuir positivamente para a atividade antileishmania como discutido anteriormente e a posição que o grupo metoxila ocupa no anel aromático **A** tem interferência para a atividade. A comparação entre os derivados mono (**15b**) e di-*orto* (**15g**) metoxilado no anel **A** e com o átomo de Cl na posição *para* do anel **B** revela que ambos apresentaram um perfil leishmanicida. No derivado **15b** o grupo metoxila está nas posições *orto* (R^5), *meta* (R^2) e *para* (R^3) no derivado **15g**, nas posições di-*orto* (R^1 e R^5) e *para* (R^3) (Figura 17). A mudança do substituinte metoxila da posição *meta* (R^2) para a posição *orto* (R^1) provocou um aumento de 3,6 vezes na atividade (**15g**, $IC_{50} = 8,22\mu M$) quando comparado com o derivado **15b** ($IC_{50} = 29,69\mu M$). A troca de posições do grupo metóxi do anel aromático **A** gerou uma diferença conformacional na estrutura entre ambos os derivados, inferindo-se que o confôrmero do derivado **15g** seja mais favorável para interagir com o sítio ativo.

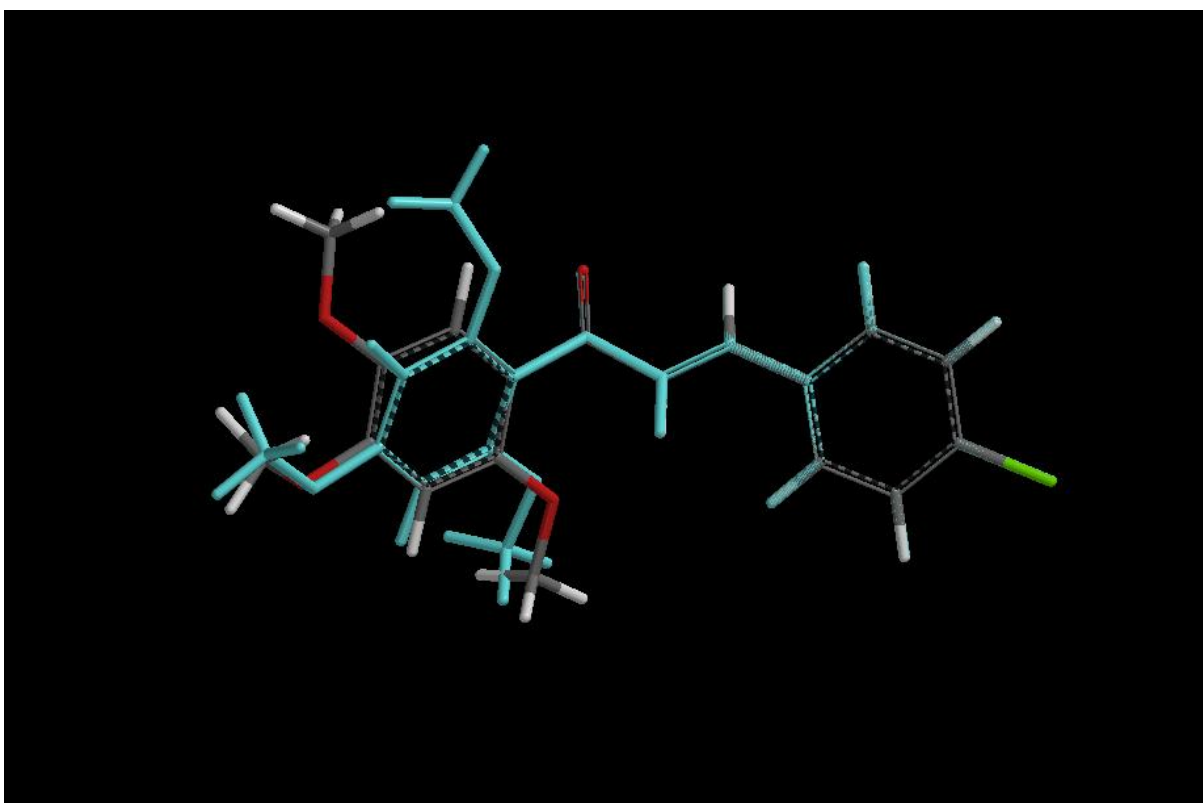


Figura 17 – Alinhamento e Sobreposição das conformações mais estáveis dos derivados metoxilados **15b** ($IC_{50} = 29,69\mu M$) e **15g** ($IC_{50} = 8,22\mu M$) (verde). No derivado **15b**, o grupo metoxila está nas posições *orto* (R^5), *meta* (R^2) e *para* (R^3) e no derivado **15g**, as posições di-*orto* (R^1 e R^5) e *para* (R^3).

A mesma análise foi feita para os derivados mono (**15c**) e di-*orto* (**15h**) metoxilados no anel **A** e com o átomo de Cl na posição *meta* do anel **B**, onde ambos apresentaram atividade leishmanicida, porém o derivado **15h** ($IC_{50} = 2,70 \mu M$) foi 7 vezes mais ativo do que **15c** ($IC_{50} = 15,42 \mu M$). Essa diferença na atividade dos derivados pode ser atribuída à mudança de posição do substituinte metoxila no anel aromático **A**, migrando da posição *meta* (R^2), no derivado **15c**, para a posição *orto* (R^1), no derivado **15h**. Isto sugere que a presença de dois substituintes *orto* impõe uma maior rigidez estrutural, e dessa maneira, leva à uma conformação que pode ter uma melhor interação com o receptor (Figura 18).

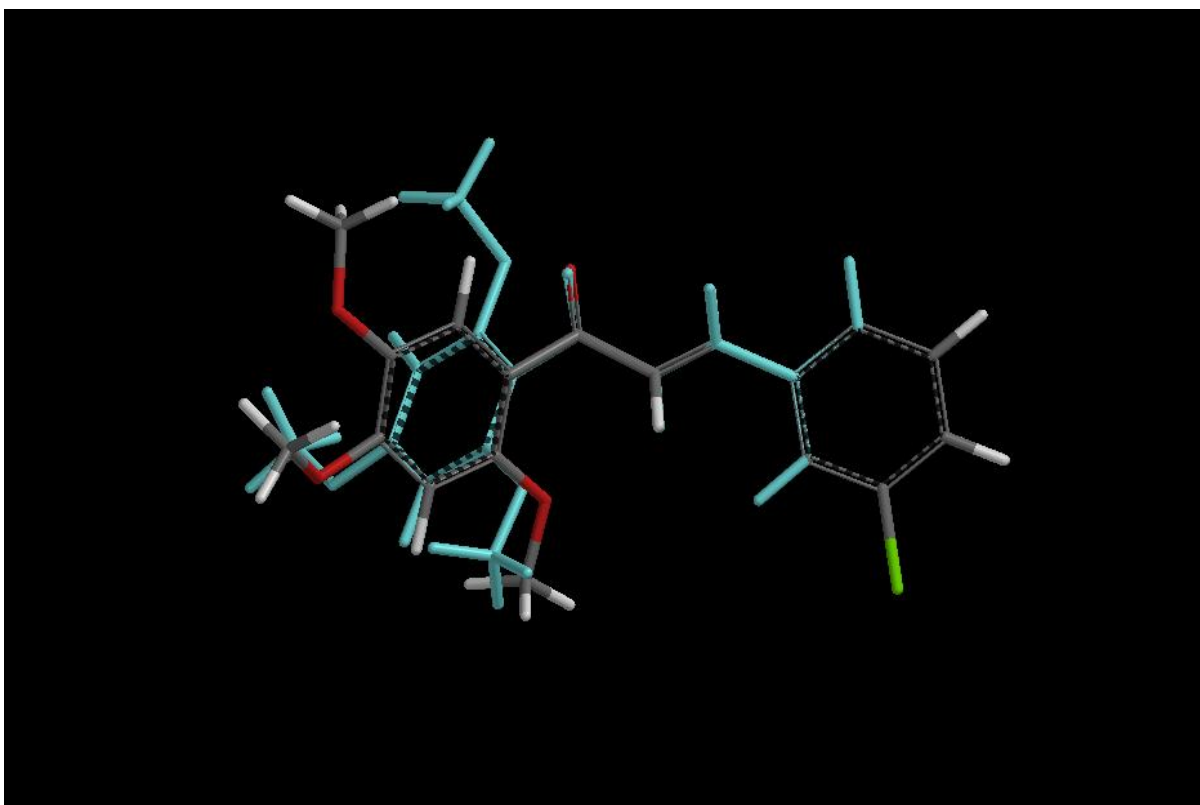


Figura 18 - Alinhamento e Sobreposição das conformações mais estáveis dos derivados metoxilados **15c** ($IC_{50} = 15,42 \mu M$) e **15h** ($IC_{50} = 2,70 \mu M$) (verde). No derivado **15c**, o grupo metoxila está nas posições *orto* (R^5), *meta* (R^2) e *para* (R^3) e no derivado **15h**, nas posições di-*orto* (R^1 e R^5) e *para* (R^3).

Os derivados **15d** e **15j** são dissustituídos por átomos de Cl nas posições *meta* e *para* do anel **B**. Assim como os dois pares de compostos discutidos anteriormente, a diferença entre esses dois derivados é a posição dos substituintes metoxila no anel aromático **A**. No derivado **15d**, os substituintes metoxila estão nas posições *orto* (R^5), *meta* (R^2) e *para* (R^3) e no derivado **15j**, nas posições di-*orto* (R^1 ,

R^5) e *para* (R^3) (Figura 19). Com a mudança do substituinte metoxila da posição *meta* (R^2) para a posição *orto* (R^1), o derivado **15j** ($IC_{50} = 4,62 \mu M$) foi cerca de 32 vezes mais ativo do que o derivado **15d** ($IC_{50} = 147,86 \mu M$). A troca de posição do grupo metoxila para *orto* impõe uma maior rigidez estrutural impondo características estéricas diferentes, o que pode ter conferido um melhor encaixe estereoeletrônico do derivado **15j** com o alvo celular.

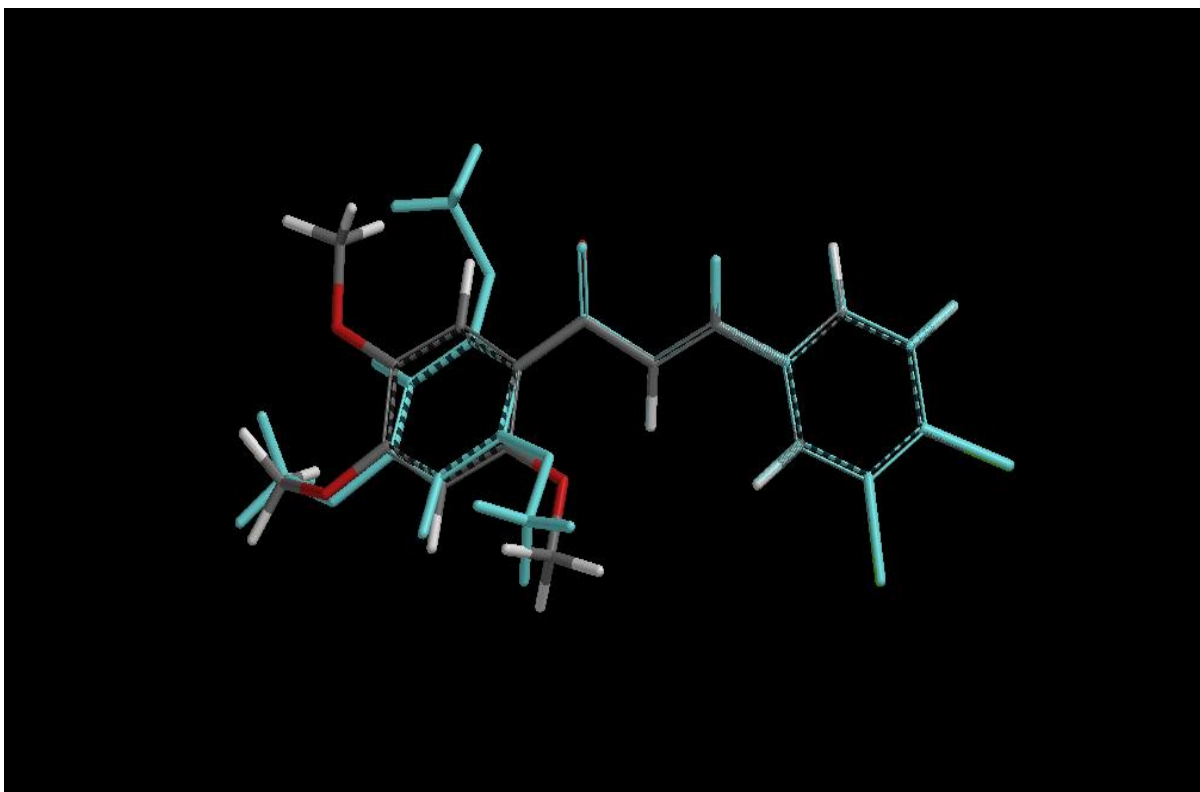


Figura 19 – Alinhamento e Sobreposição das conformações mais estáveis dos derivados metoxilados **15d** ($IC_{50} = 147,86 \mu M$) e **15j** ($IC_{50} = 4,62 \mu M$) (verde). No derivado **15d**, o grupo metoxila está nas posições *orto* (R^5), *meta* (R^2) e *para* (R^3) e no derivado **15j**, nas posições *orto* (R^1 e R^5) e *para* (R^3).

O grupo nitro, com forte caráter retirador de elétrons por efeito indutivo e de ressonância, manteve a atividade antileishmania característica dos derivados di-*orto* metoxilados **15l**, **15m** e **15n**. A substituição do anel fenila **B** pelos anéis 2-naftila e 1-naftila (**15o** e **15p**) e metileno-dióxi-fenila (**15q**) aboliu a atividade. O derivado **15r** também teve sua atividade leishmanicida anulada com a substituição na posição *para* do anel fenila **B** por uma amina secundária. A substituição do grupamento metoxila ($-OCH_3$) por hidroxila ($-OH$) no anel **A**, reduziu a atividade antileishmania (**15s**, $-OH$ em R^5) (Tabela 1). Observa-se no derivado **15s** a presença de uma

ligação de hidrogênio intramolecular, de distância 1,76 Å, entre o hidrogênio da hidroxila e o oxigênio da carbonila (Figura 20).

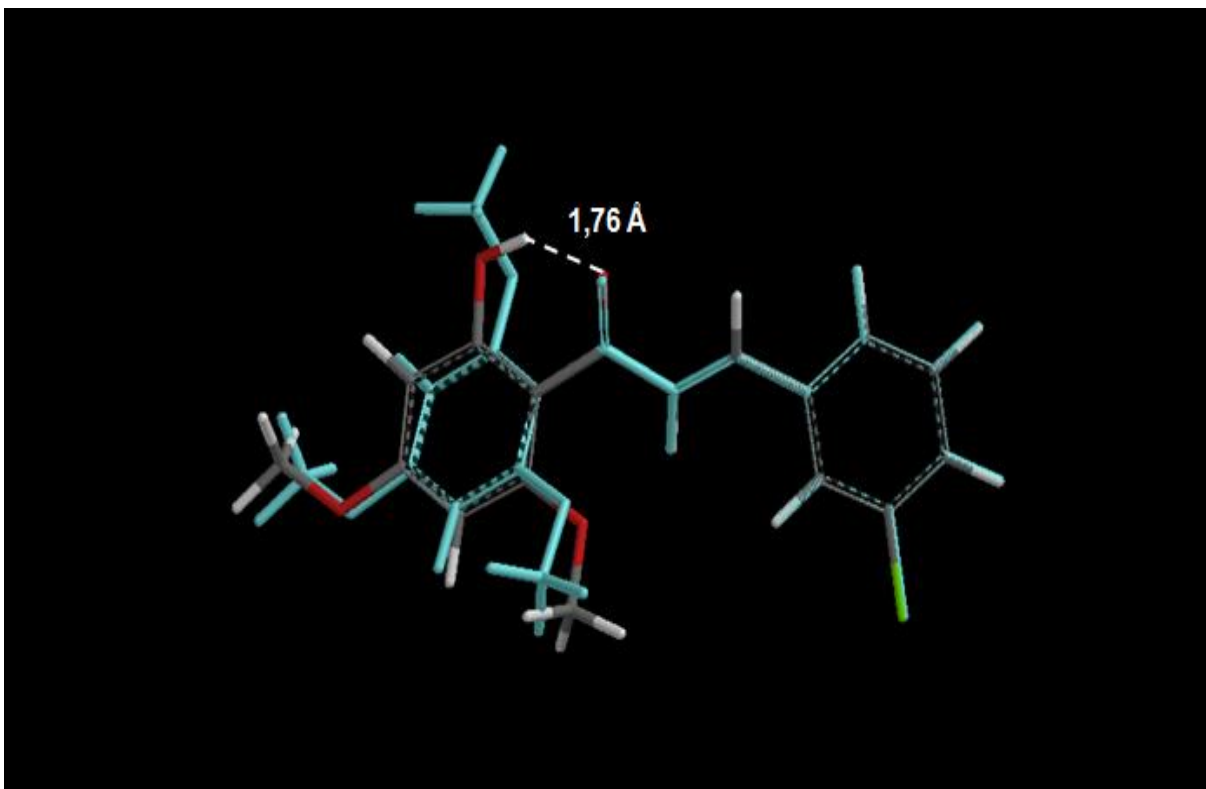
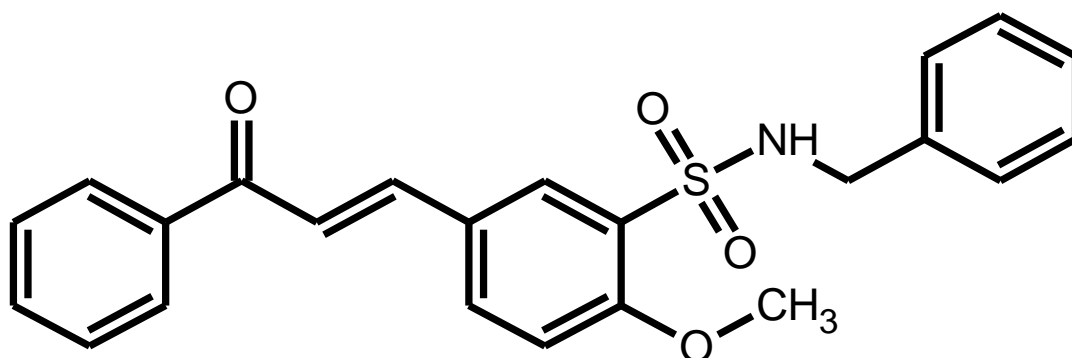


Figura 20 - Alinhamento e Sobreposição das conformações mais estáveis do derivado metoxilado **15h** ($IC_{50} = 2,70 \mu M$) (verde) e **15s** ($IC_{50} = 194,14 \mu M$). No derivado **15h**, o grupo metoxila está nas posições *orto* (R^1 e R^5) e *para* (R^3) e no derivado **15s**, a diferença é a hidroxila em *orto*.

A análise dos resultados de citotoxicidade revelou que o derivado **15i** ($IC_{50} = 3,94 \mu M$) parece ser o mais promissor da série, pois demonstrou menor citotoxicidade ($CC_{50} = 215,57 \mu M$) do que os derivados **15h** ($CC_{50} = 9,25 \mu M$) e **15j** ($CC_{50} = 109,17 \mu M$).

A comparação do composto 4-metóxicalcona-3-benzilsulfonamida (**14**), que apresenta significativa atividade antileishmania ($IC_{50} = 3,5 \mu M$) (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2008), com o derivado **15i** ($IC_{50} = 3,94 \mu M$) demonstra que os derivados possuem atividades semelhantes mesmo tendo grupos funcionais diferentes. O derivado **15i** possui substituintes metoxila no anel aromático **A**. O composto 4-metóxicalcona-3-benzilsulfonamida (**14**) não possui substituintes no anel **A**, sendo o grupo sulfonamida ligado ao anel **B**. Observa-se, assim, que substituintes ligados aos anéis **A** e **B** da chalcona parecem influenciar e ser importantes para a atividade antileishmania. A inserção de grupos com

características lipofílicas, aparentemente, aumenta a atividade contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*. Andrighetti-Fröhner e colaboradores (2008) demonstraram a importância do grupo benzila ligado à sulfonamida do composto **14**, principalmente devido à inserção de um grupo metileno (-CH₂-) espaçador entre o grupo amina e o anel fenila que, possivelmente, permite interações hidrofóbicas com o sítio receptor. O caráter lipofílico do grupo benzila do composto **14** e do átomo de cloro no derivado **15i**, acompanhado de uma atividade leishmanicida significativa desses compostos, sugere a lipofilicidade como uma propriedade importante para a atividade contra a forma promastigota, observada comparando ambos os compostos. Ainda assim, o núcleo estrutural da chalcona permanece como principal grupo farmacofórico, pois apesar de importante, o grupo sulfonamida não é essencial para a atividade antileishmania. Isso é observado na significativa atividade do derivado **15i** que é substituído por metoxila no anel **A** e cloro no anel **B**.



Derivado 4-metóxicalcona-3-sulfonamida mais ativo (IC₅₀ = 3,5 µM) (**14**)

A elucidação do mecanismo de ação pelo qual a atividade antileishmania da chalcona ocorre será importante na investigação de um fármaco com este núcleo estrutural. Devido à semelhança estrutural, pela presença de grupos substituintes nos anéis **A** e **B**, entre a série de derivados da chalcona estudada nesse trabalho (**15a-s**) e a licochalcona A, informações sobre o mecanismo de ação da licochalcona A serão relevantes também para o entendimento do mecanismo de ação da série de derivados da chalcona (**15a-s**).

Zhai e colaboradores (1995) estudaram a atividade antileishmania da licochalcona A (**13**) na forma promastigota da *Leishmania major* e *L. donovani* e observaram que a licochalcona A altera a estrutura e a função da mitocôndria da

forma promastigota do parasita *Leishmania*. Chen e colaboradores. (2001) investigaram alvos específicos da licochalcona A na mitocôndria de formas promastigotas da *Leishmania* e indicaram que a enzima fumarato redutase do parasita pode ser um alvo específico para a ação das chalconas. Apesar desses estudos, o mecanismo completo para a atividade da chalcona ainda não está elucidado.

5.2 PROPRIEDADES ELETRÔNICAS

5.2.1 Cálculos de energia de HOMO (E_{homo}), energia de LUMO (E_{lumo}), momento de dipolo e cLogP dos derivados da chalcona

Realizou-se um estudo dos principais parâmetros teóricos para os derivados metóxi da chalcona que pudessem ser correlacionados com a atividade biológica. Calculou-se as energias de HOMO e LUMO (E_{homo} e E_{lumo}), cLogP e momento de dipolo de todos os derivados.

Os dados obtidos para as energias de HOMO, LUMO e momento de dipolo, não forneceram, aparentemente, nenhuma correlação entre esses parâmetros e a atividade leishmanicida observada para esses derivados (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação dos parâmetros teóricos (Volume, Área CPK, E_{homo} , E_{lumo} e momento de dipolo) dos derivados da chalcona (**15a-s**).

| | Volume (Å ³) | Área CPK (Å ²) | E_{homo} (eV) | E_{lumo} (eV) | Dipolo (debye) | IC ₅₀ |
|------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|----------------|------------------|
| 15a | 317,3 | 339,9 | -5,43 | -1,61 | 2,64 | 12,88 |
| 15b | 330,8 | 355,2 | -5,51 | -1,78 | 2,96 | 29,69 |
| 15c | 330,8 | 355,2 | -5,50 | -1,80 | 2,10 | 15,42 |
| 15d | 344,5 | 370,2 | -5,56 | -1,93 | 3,07 | 147,86 |
| 15e | 344,4 | 369,6 | -5,39 | -1,57 | 3,27 | 14,01 |
| 15f | 344,7 | 371,1 | -5,68 | -1,41 | 1,85 | Nd |
| 15g | 331,1 | 356,8 | -5,91 | -1,75 | 3,61 | 8,22 |
| 15h | 331,0 | 356,7 | -5,91 | -1,78 | 2,23 | 2,70 |
| 15i | 331,1 | 355,6 | -5,87 | -1,54 | 2,49 | 3,94 |
| 15j | 344,7 | 371,8 | -5,98 | -1,92 | 3,59 | 4,62 |
| 15k | 344,6 | 370,1 | -5,90 | -1,60 | 3,28 | 7,44 |
| 15l | 339,5 | 367,4 | -6,01 | -2,54 | 3,66 | 20,06 |
| 15m | 339,6 | 368,6 | -5,90 | -2,16 | 2,62 | 29,77 |
| 15n | 339,6 | 367,8 | -6,09 | -2,70 | 6,76 | 11,75 |
| 15o | 367,2 | 386,0 | -5,62 | -1,50 | 3,63 | Nd |
| 15p | 368,5 | 387,9 | -5,63 | -1,71 | 2,87 | Nd |
| 15q | 341,8 | 365,2 | -5,53 | -1,50 | 2,96 | Nd |
| 15r | 367,1 | 393,2 | -5,11 | -1,25 | 3,52 | Nd |
| 15s | 309,8 | 331,4 | -5,91 | -2,00 | 1,98 | 194,14 |

5.2.2 Mapas de potencial eletrostático molecular

Os mapas de potencial eletrostático molecular dos derivados metoxilados **15a-s** da chalcona (Figura 21) mostram que a densidade eletrônica está concentrada sobre o grupo carbonila. Há também uma densidade intermediária de nuvem eletrônica sobre os dois anéis fenila (**A** e **B**) da estrutura base da chalcona dos derivados. A presença dos substituintes metoxila em di-*orto* no anel **A** aumenta a densidade eletrônica próximo ao grupo carbonila, e pode ser uma característica eletrônica importante para aumentar o seu perfil de interação com o receptor.

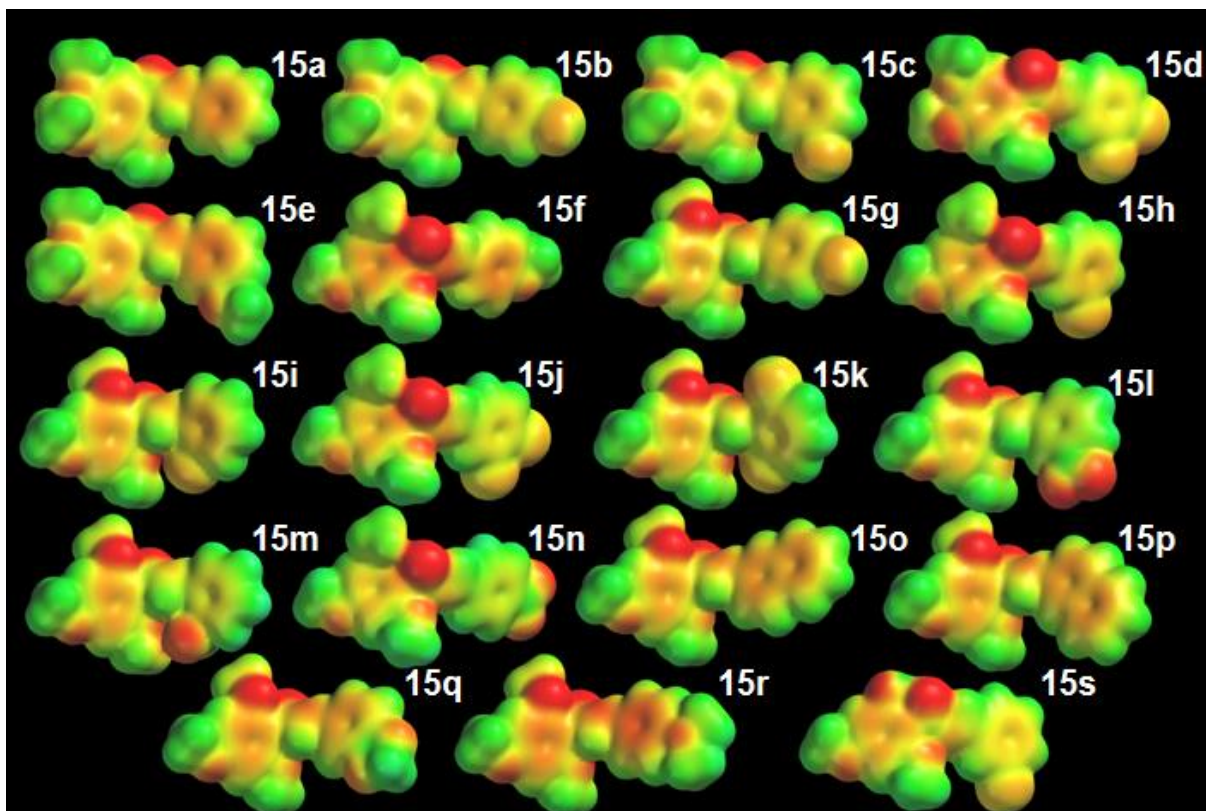


Figura 21 - Mapa de potencial eletrostático molecular dos derivados da chalcona (**15a-s**) sobre uma isosuperfície de 0.002 eV/ua^3 .

5.2.3 Mapas de densidade HOMO e LUMO

5.2.3.1 Mapas de densidade HOMO

O mapa de densidade eletrônica HOMO codificado sobre uma superfície de van der Waals, variando de vermelho (baixa densidade de HOMO) à azul (alta densidade de HOMO), dos derivados da chalcona (**15a-s**) pode ser observado na Figura 22.

Na análise da densidade eletrônica HOMO observa-se que todos os derivados da chalcona estudados (**15a-s**) apresentam a maior concentração de densidade eletrônica HOMO localizada sobre o anel fenila **A** ou em **B**, sendo a densidade mais localizada sobre os anéis **A** ou **B** de acordo com as características dos grupos substituintes. Entretanto, nos derivados que apresentaram as melhores atividades (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k**) a densidade eletrônica HOMO está localizada sobre o anel fenila **A**, ligado diretamente à função carbonila. Nos derivados **15o**,

15p, **15q** e **15r** que não apresentaram atividade leishmanicida, a densidade eletrônica HOMO está localizada sobre o anel fenila **B**, distante da função carbonila.

O derivado 4-metóxicalcona-3-benzilsulfonamida ($IC_{50} = 3,5 \mu M$) (**14**) (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2008) apresenta a densidade HOMO sobre a função carbonila da chalcona. O derivado **15i** ($IC_{50} = 3,94 \mu M$) tem a densidade HOMO sobre a função carbonila e anel fenila **A**. A função carbonila parece ter importante contribuição eletrônica para a atividade leishmanicida de ambos os derivados de chalcona estudados.

O mapa de HOMO mostra que a densidade dos derivados **15h** ($IC_{50} = 2,70 \mu M$) e **15i** ($IC_{50} = 3,94 \mu M$) está localizada sobre as mesmas subunidades de ambos os compostos, sendo a pequena diferença de atividade antileishmania devida, possivelmente, ao efeito *orto* do átomo de Cl do composto **15i**.

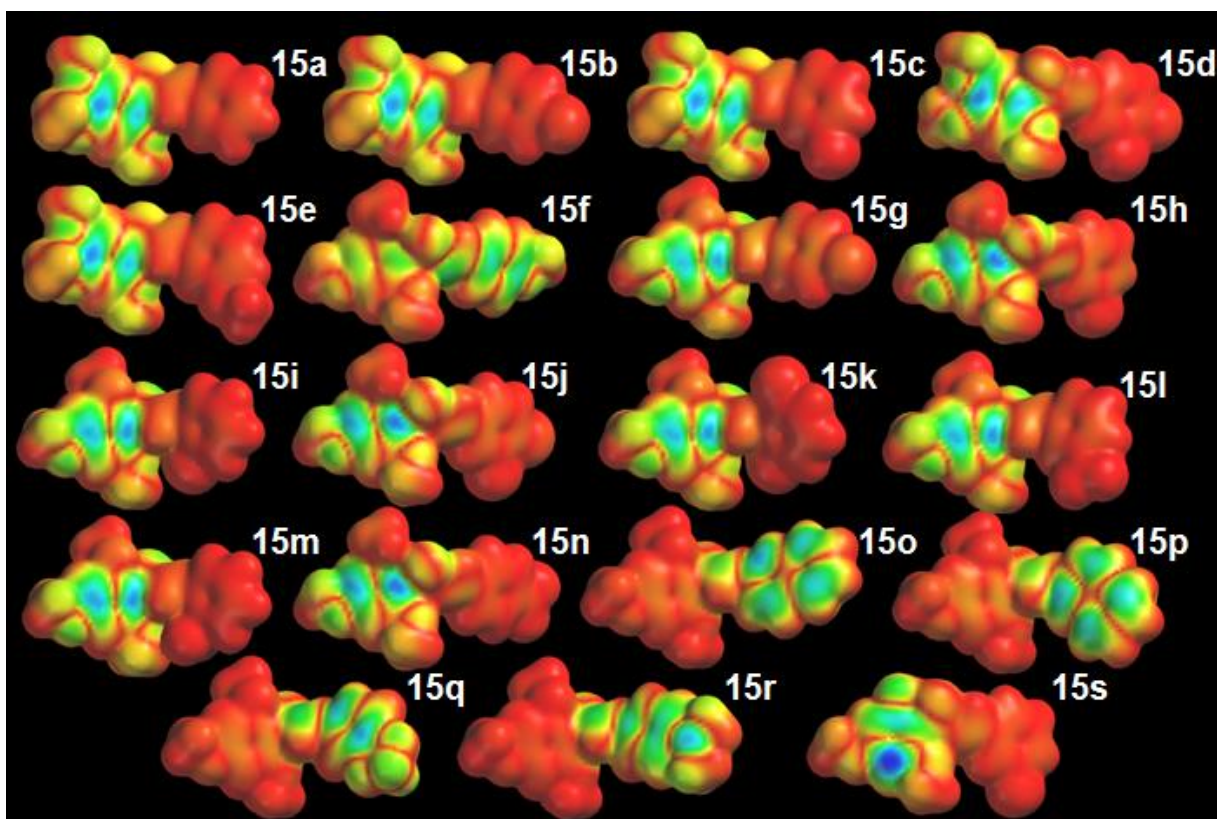


Figura 22 - Mapa de densidade HOMO dos derivados **15a-s** da chalcona codificado sobre uma isosuperfície de $0,002 \text{ eV/ua}^3$.

5.2.3.2 Mapas de densidade LUMO

A avaliação da densidade eletrônica de LUMO, codificada sobre uma *isosuperfície* de $0,002 \text{ eV/ua}^3$, revelou diferentes intensidades de LUMO (cor azul) localizada sobre a região do carbono da carbonila dos derivados **15a-s** (Figura 23). As regiões em azul caracterizam baixos valores de densidade eletrônica (baixa densidade eletrônica de LUMO) e em vermelho sinalizam áreas onde os orbitais LUMO não estão totalmente desocupados de elétrons (densidade eletrônica de LUMO).

Nos derivados que possuem o grupo nitro ($-\text{NO}_2$) como substituinte no anel **B**, **15l** ($Y = -\text{NO}_2$), **15m** ($X = -\text{NO}_2$) e **15n** ($W = -\text{NO}_2$), a densidade eletrônica LUMO que normalmente é baixa sobre o átomo de carbono da carbonila nos outros derivados, se tornou dispersa sobre o anel aromático **A** e átomo de carbono da carbonila, devido à influência do caráter retirador de elétrons desse grupo funcional. Esta observação indica que a baixa densidade eletrônica LUMO sobre o carbono da carbonila dos derivados mais ativos, pode não ser o principal determinante para a interação entre a molécula e o sítio receptor, já que os derivados **15l**, **15m** e **15n** apresentaram alguma atividade leishmanicida.

Os derivados **15o**, **15p** e **15q** não apresentaram atividade leishmanicida. Aparentemente, a presença de grupos volumosos pode causar rigidez estrutural no anel **B** e pode influenciar negativamente a característica desses derivados.

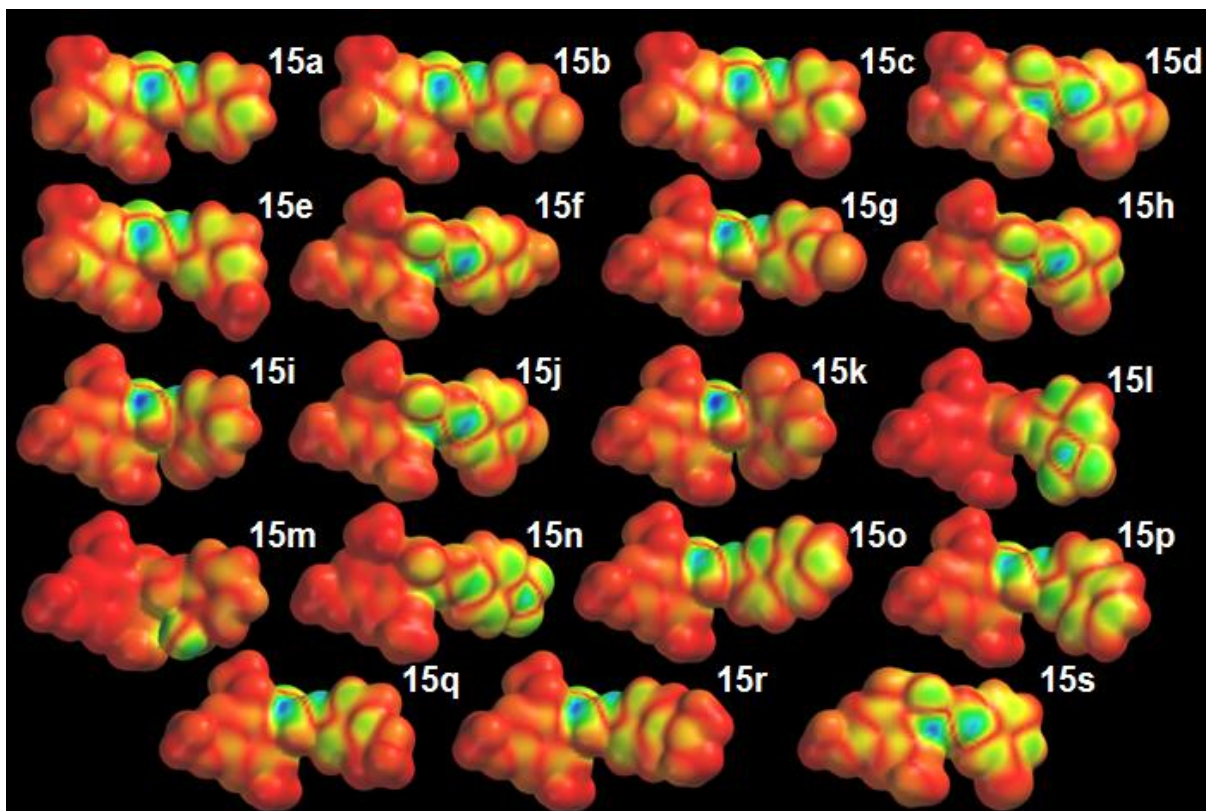


Figura 23 - Mapa de densidade LUMO dos derivados **15a-s** da chalcona codificado sobre uma *isosuperfície* de $0,002 \text{ eV/ua}^3$.

5.3 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS *IN SILICO*

A avaliação toxicológica teórica (*in silico*) dos derivados da chalcona que demonstraram os melhores perfis de atividade leishmanicida (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k**) foi efetuada utilizando-se o programa Osiris® Property Explorer. Os resultados obtidos da análise mostram que os riscos toxicológicos, teóricos, para estes derivados são baixos, quanto aos parâmetros de irritação, tumorigênico, efeito reprodutivo e mutagênico, sendo comparáveis aos fármacos pentamidina e anfotericina B, comercialmente disponíveis e em uso atualmente. O derivado **15g** foi o único que apresentou um risco toxicológico teórico médio para o parâmetro mutagenicidade (Figura 24).

Os baixos efeitos adversos atribuídos aos derivados, em especial quanto aos quatro parâmetros avaliados, não eliminam a possibilidade de apresentarem efeitos toxicológicos desfavoráveis, mas indicam a probabilidade de um bom desempenho no aspecto avaliado. A avaliação toxicológica *in silico* não exclui a necessidade de

realização de testes toxicológicos tradicionais, entretanto orienta sobre quais substâncias em estudo é válido prosseguir com análises toxicológicas experimentais.

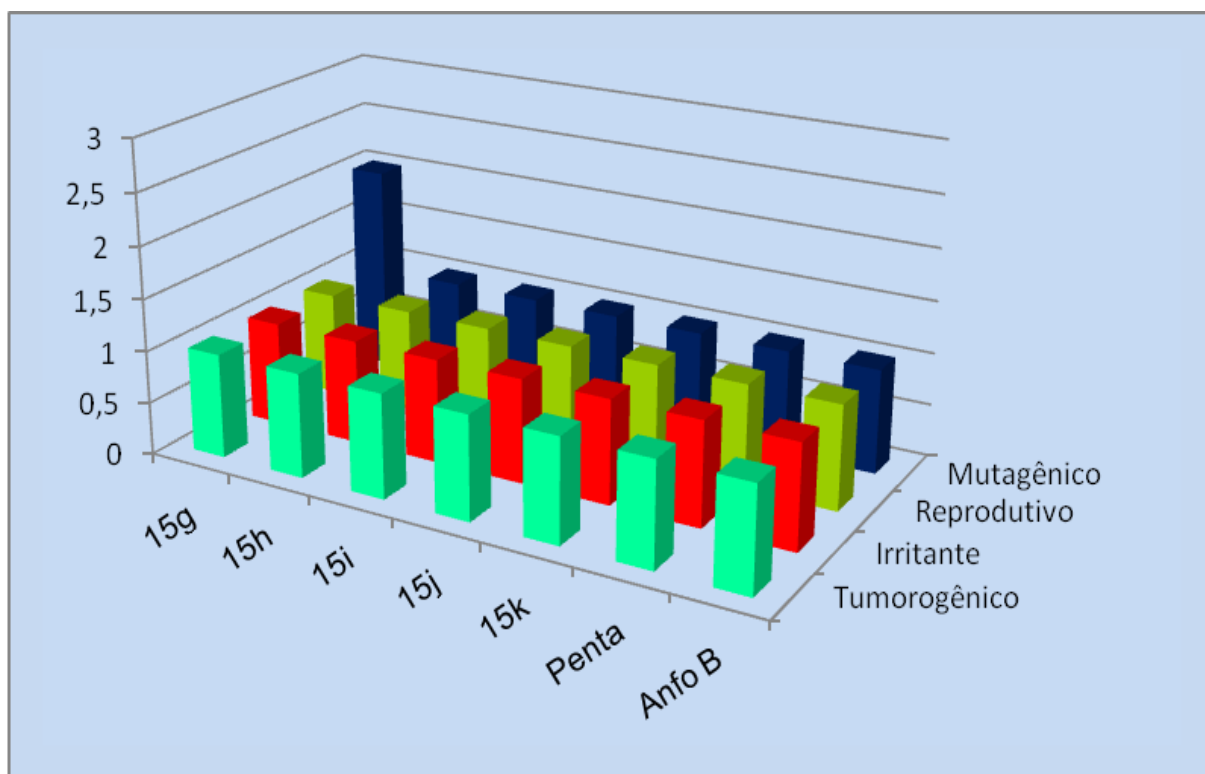


Figura 24 - Perfis Toxicológicos Teóricos dos derivados da chalcona com atividade mais significativa (15g, 15h, 15i, 15j e 15k) obtidos com o programa Osiris® Property Explorer.

Os testes toxicológicos *in vitro* com células VERO dos derivados da chalcona (Tabela 1) demonstraram que as doses que inibiram 50% do crescimento dessas células eram muito maiores do que aquelas que inibiram 50% do crescimento de *Leishmania braziliensis*, indicando boa seletividade para inibição do parasita.

O derivado **15i**, um dos mais potentes da série, inibiu o crescimento de 50% de *Leishmania braziliensis* na concentração de 3,94 μM e promoveu a inibição do crescimento de 50% de células VERO na concentração de 215,57 μM (Tabela 1). Na avaliação do risco toxicológico *in silico*, este derivado também apresentou baixa toxicidade para os parâmetros avaliados (Figura 24), indicando ser este um promissor derivado de chalcona.

A avaliação de *druglikeness* revela a capacidade de um determinado composto apresentar características estruturais similares à maioria dos fármacos disponíveis no mercado, permitindo teoricamente apontar compostos semelhantes aos fármacos.

Os derivados da chalcona que apresentaram as atividades leishmanicidas mais significativas (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k**), tiveram seus valores de *druglikeness* avaliados. Os valores de *druglikeness* computados e atribuídos pelo programa Osiris[®] aos derivados **15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k** foram comparados com os valores da pentamidina e anfotericina B comercialmente disponíveis no mercado (Figura 25). Os valores teóricos de *druglikeness* desses derivados foram superiores aos fármacos pentamidina e anfotericina B, utilizados como controles positivos nas análises e que estão atualmente no mercado farmacêutico.

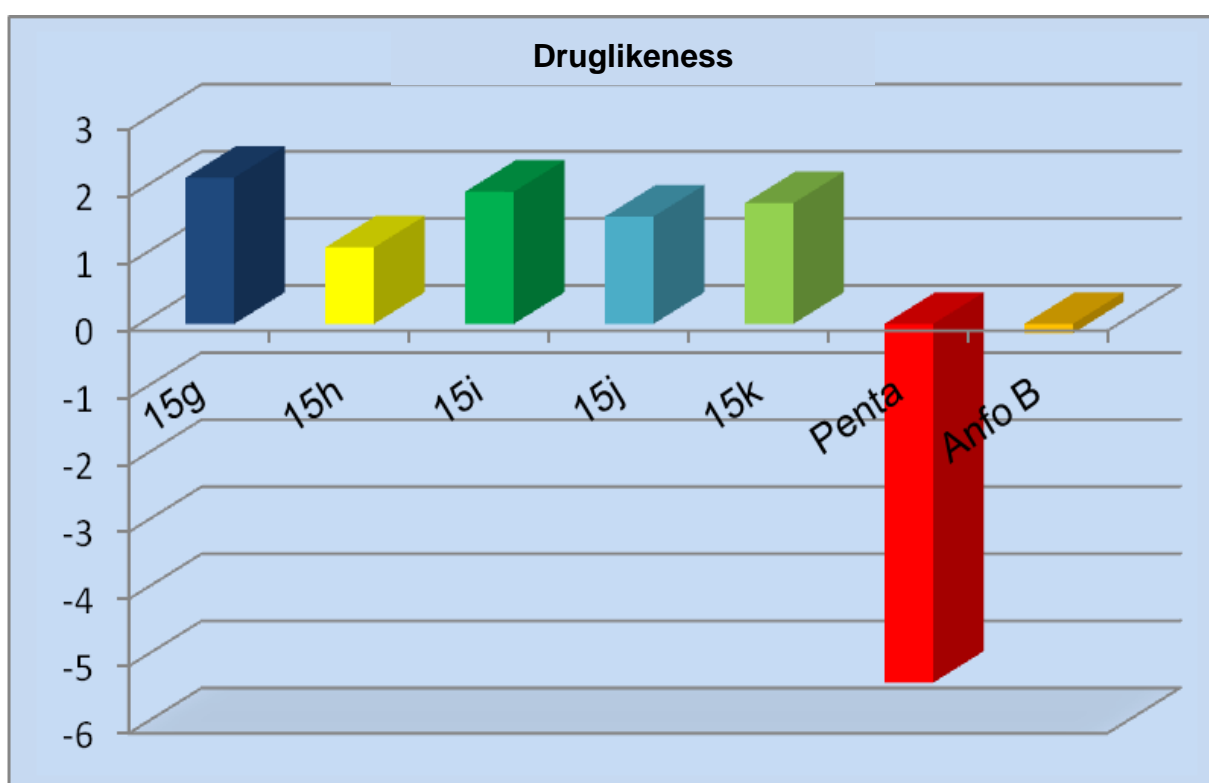


Figura 25 - *Druglikeness* dos derivados da chalcona (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k**) comparados com os fármacos comerciais pentamidina e anfotericina B.

O estudo de *drugscore*, isto é, a soma de todas as características avaliadas para o candidato a fármaco (cLogP, solubilidade, toxicologia teórica, *druglikeness* e peso molecular) pelo sistema Osiris[®], fornece um parâmetro que permite avaliar o quanto uma determinada substância poderá ser habilitada como um futuro fármaco. Segundo os critérios estabelecidos, quanto mais próximo de 1 (um), maior é a probabilidade teórica de sucesso. Os derivados da chalcona (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k**) apresentaram valores de *drugscore* melhores do que aqueles mostrados pelos fármacos em comercialização pentamidina e anfotericina B (Figura 26).

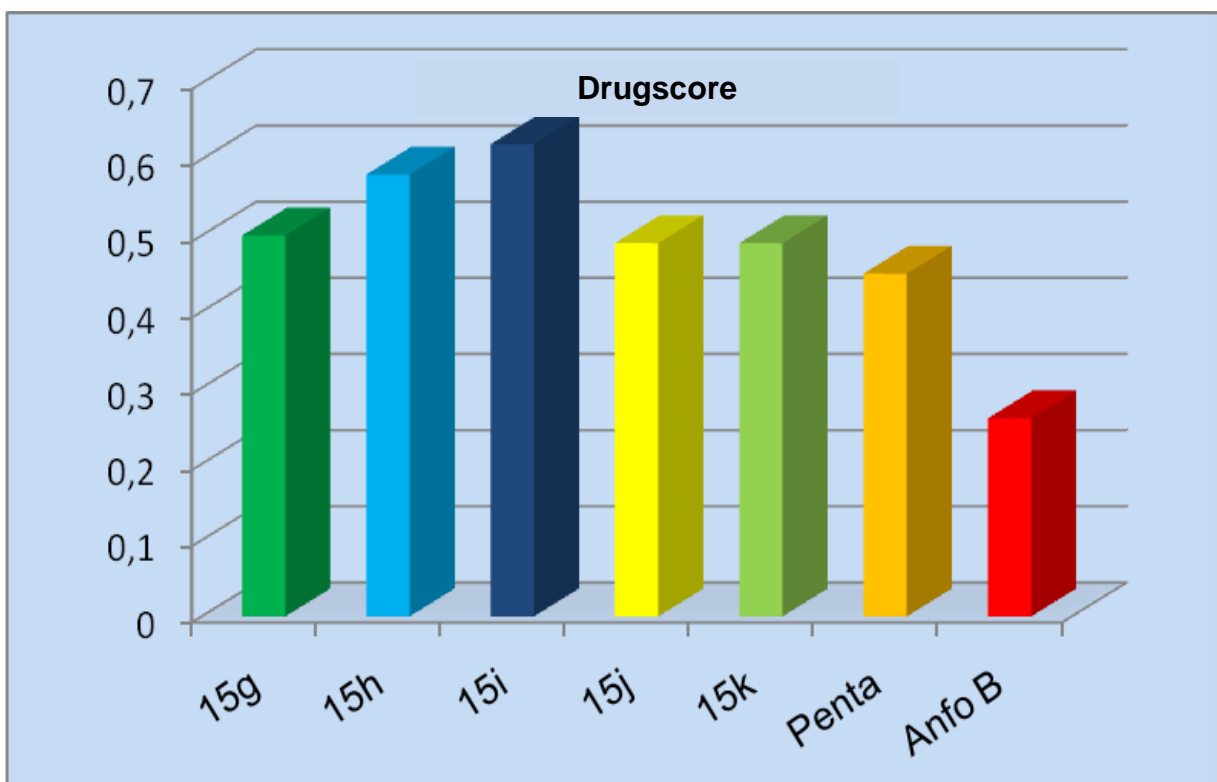


Figura 26 - *Drugscore* dos derivados ativos **15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k** da chalcona comparados com os fármacos comerciais pentamidina e anfotericina B atualmente em uso.

5.3.1 Regra de Lipinski

Um fármaco para ter boa absorção oral deve satisfazer, teoricamente, a Regra dos Cinco de Lipinski (LIPINSKI, 2004). Neste sentido, os derivados da chalcona avaliados que apresentaram atividade antileishmania mais significativa contra *Leishmania braziliensis* (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k**) atendem à Regra dos Cinco de Lipinski (Tabela 3).

Podemos observar que para os derivados **15h** e **15i**, que apresentaram significativa atividade leishmanicida e valores de *drugscore* (protótipo de fármaco) mais elevados, interessante os valores de lipofilicidade e peso molecular são os mesmos, 3,93 e 332,78 Da, respectivamente (Tabela 3). Ambos os derivados possuem o átomo de Cl como substituinte no anel aromático **B**, porém em diferentes posições (Tabela 1).

Tabela 3 - Valores de cLogP (lipofilicidade), HBA (aceptores de ligação de hidrogênio), HBD (doadores de ligação de hidrogênio), PM (peso molecular) dos derivados da chalcona (**15a-s**).

| | cLogP | HBA | HBD | PM (Da) |
|------------|-------|-----|-----|---------|
| 15a | 3,37 | 4,0 | 0,0 | 298.3 |
| 15b | 3,93 | 4,0 | 0,0 | 332.7 |
| 15c | 3,93 | 4,0 | 0,0 | 332.7 |
| 15d | 4,49 | 4,0 | 0,0 | 367.2 |
| 15e | 3,25 | 5,0 | 0,0 | 328.3 |
| 15f | 3,25 | 5,0 | 0,0 | 328.3 |
| 15g | 3,93 | 4,0 | 0,0 | 332.7 |
| 15h | 3,93 | 4,0 | 0,0 | 332.7 |
| 15i | 3,93 | 4,0 | 0,0 | 332.7 |
| 15j | 4,49 | 4,0 | 0,0 | 367.2 |
| 15k | 4,49 | 4,0 | 0,0 | 367.2 |
| 15l | 3,41 | 7,0 | 0,0 | 343.3 |
| 15m | 3,41 | 7,0 | 0,0 | 343.3 |
| 15n | 3,41 | 7,0 | 0,0 | 343.3 |
| 15o | 4,37 | 4,0 | 0,0 | 348.3 |
| 15p | 4,37 | 4,0 | 0,0 | 348.3 |
| 15q | 3,15 | 6,0 | 0,0 | 342.3 |
| 15r | 3,66 | 5,0 | 0,0 | 341.4 |
| 15s | 3,67 | 4,0 | 1,0 | 318.7 |

O baixo perfil toxicológico *in silico* (Figura 24), perfil satisfatório para uma boa biodisponibilidade e valores mais elevados do que os fármacos pentamidina e anfotericina B nas avaliações teóricas *druglikeness* e *drugscore* (Figuras 25 e 26), corroboram para apresentar o derivado **15i** ($IC_{50} = 3,94 \mu M$ e $CC_{50} = 215,57 \mu M$) como o mais promissor candidato a fármaco da série de derivados metoxilados da chalcona avaliada contra *Leishmania braziliensis*.

6 CONCLUSÕES

A atividade leishmanicida, contra *Leishmania braziliensis*, da série de derivados metoxilados da chalcona avaliada (**15a-s**) em comparação ao composto 4-metóxicalcona-3-benzilsulfonamida (**14**), anteriormente estudado, demonstra que diferentes substituintes no anel **A** e no anel **B** influenciam a atividade leishmanicida. Observa-se com estudo da nova série que o grupo sulfonamida não é essencial para a atividade leishmanicida.

No anel **A** a presença do grupamento metoxila (-OCH₃) parece ser importante para a atividade, pois a substituição pelo grupo hidroxila (-OH) resultou na redução da atividade (derivado **15s**). Os grupos metoxila inseridos nas posições di-*orto* (**R**¹ e **R**⁵) e *para* (**R**³) favoreceram a atividade, pois os derivados que foram mais ativos possuem o grupo metoxila nestas posições (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k**). A mudança de posição de um dos substituintes metoxila no anel **A**, da posição *orto* (**R**¹) para a posição *meta* (**R**²), resultou na redução da atividade contra *Leishmania braziliensis* (**15a-e**).

No anel **B** a presença do átomo de Cl favoreceu a atividade leishmanicida, como evidenciado com os derivados que demonstraram os melhores perfis de atividade da série (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k**).

Os derivados que apresentaram as melhores atividades leishmanicidas (**15g**, **15h**, **15i**, **15j** e **15k**) possuem a densidade eletrônica de HOMO sobre o anel **A**, ligado à função carbonila e os derivados sem atividade apresentaram a densidade sobre o anel **B**, mais distante da função carbonila (**15o**, **15p**, **15q** e **15r**) (Figura 21), cuja contribuição eletrônica aparentemente desempenha importante papel.

Dentre os derivados da série estudada (**15a-s**), o derivado **15i** demonstrou ser o candidato protótipo a fármaco mais promissor, pois apresentou resultados significativos em todas as análises estruturais empregadas. Esse derivado inibiu 50% do crescimento de *Leishmania braziliensis* com a concentração de 3,94 µM, apresentou perfil toxicológico favorável tanto *in silico* como *in vitro* com células VERO (CC₅₀ = 215,57 µM), além de índices físico-químicos teóricos de *druglikeness* e *drugscore* superiores aos fármacos pentamidina e anfotericina B. O derivado **15i** também apresentou uma maior probabilidade de boa biodisponibilidade oral, pois não violou nenhum dos parâmetros da regra dos cinco de Lipinski. Assim, o derivado

metoxilado da chalcona **15i** é um composto leishmanicida protótipo candidato a estudos posteriores.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J. **Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular**. *Manole*: 2003.

ANDRIGUETTI-FRÖHNER, C. R.; DE OLIVEIRA, K. N.; GASPAR-SILVA, D.; PACHECO, L. K.; JOUSSEF, A. C.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C. M. O.; DE SOUZA, A. M. T.; MAGALHAES, U. O.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; NUNES, R. J.; CASTRO, H. C. **Synthesis, Biological Evaluation and SAR of Sulfonamide 4-methoxychalcone Derivatives with Potential Antileishmanial Activity**. *Eur. J. Med. Chem.*: v. 20, 1-9, 2008.

ANSLYN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. **Modern Physical Organic Chemistry**. *University Science Books*: 2004.

ÁVILA, H. P.; SMÂNIA, E. F. A.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA JÚNIOR, A. **Structure-activity Relationship of Antibacterial Chalcones**. *Bioorg. Med. Chem.*: v. 16, 9790-9794, 2008.

BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANT'ANNA, M. R.; ALENCASTRO, R. B. **Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal**. *Quím. Nova*: v. 20 (3), 300-310, 1997.

BERMAN, J. D.; HANSON, W. L.; LOVELACE, J. K.; WAITS, V. B.; JACKSON, J. E.; CHAPMAN, W. L.; KLEIN, R. S. **Activity of Purine Analogs Against *Leishmania donovani* In Vivo**. *Antimicrob. Agents Chemother.*: v. 31, 111-113, 1987.

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

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. **Synthesis of Chalcone Analogues with Increased**. *Bioorg. Med. Chem.*: v. 14, 1538-1545, 2006.

BRAJTBURG, J.; BOLARD, J. **Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin**. *B. J. Clin. Microbiol.*: v. 9, 512-531, 1996.

BUYUKUSLU, H.; AKDOGAN, M.; YILDIRIM, G.; PARLAK, C. **Ab initio Hartree-Fock and Density Functional Theory Study on Characterization of 3-(5-methylthiazol-2-ylidiazonyl)-2-phenyl-1H-indole**. *Spectrochimica Acta Part A*: v. 75, 1362-1369, 2010.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; DE CERÁIN, A. L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. **Synthetic Chalcones, Flavanones, and Flavones as Antitumoral Agents: Biological**

Evaluation and Structure-activity Relationships. *Bioorg. Med. Chem.:* v. 15, 3356-3367, 2007.

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. D. C. **Introdução a Modelagem Molecular de Fármacos no Curso Experimental de Química Farmacêutica.** *Quím. Nova.:* v. 26, 428-438, 2003.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. **Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*.** *J. Med. Chem.:* v. 52, 7339-7359, 2009.

CESARIN-SOBRINHO, D.; NETTO-FERREIRA, J. C.; BRAZ-FILHO, R. **Efeito da Substituição por Átomos de Flúor no Equilíbrio Conformacional de Chalcona.** *Quim. Nova:* v. 24, 604-611, 2001.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. **Licochalcone A, a Novel Antiparasitic Agent with Potent Activity Against Human Pathogenic Protozoan Species of *Leishmania*.** *Antimicrob. Agents Chemother.:* v. 37, 2550-2556, 1993.

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

CHIARADIA, L. D.; DOS SANTOS, R.; VITOR, C. E.; VIEIRA, A. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Synthesis and Pharmacological Activity of Chalcones Derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 Cells Stimulated by LPS: Quantitative Structure-activity Relationships.** *Bio. Med. Chem.:* v. 16, 658-667, 2008.

COHEN, N. C.; BLANEY, J. M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D. C. **Molecular Modeling Software and Methods for Medicinal Chemistry.** *J. Med. Chem.:* v. 33 (3), 883-894, 1990.

COSTA, M. S.; BOECHAT, N.; RANGEL, E. A.; SILVA, F. C.; SOUZA, A. M. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; JUNIOR, I. N.; LOURENÇO, M. C. S.; WARDELL, S. M. S. V.; FERREIRA, V. F. **Synthesis, Tuberculosis Inhibitory Activity, and SAR Study of N-Substituted-phenyl-1,2,3-Triazole Derivatives.** *Bio. Med. Chem.:* v. 14, 8644-8653, 2006.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. **Leishmaniasis: Current Chemotherapy and Recent Advances in the Search for Novel Drugs.** *Trends Parasitol.:* v. 19, 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. **Drug Resistance in Leishmaniasis.** *Clin. Microbiol. Rev.:* v. 19, 111-126, 2006.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBSCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. **AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model.** *J. Am. Chem. Soc.:* v. 107, 3902-3909, 1985.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. **Neglected Tropical Diseases**. *Brit. Med. Bull.*: v. 93, 179-200, 2009.

FRÉZARD, F.; MARTINS, P. S.; BARBOSA, M. C. M.; PIMENTA, A. M. C.; FERREIRA, W. A.; MELO, J. E.; MANGRUM, J. B.; DEMICHELI, C. **New Insights into the Chemical Structure and Composition of the Pentavalent Antimonial Drugs, Meglumine Antimonate and Sodium Stibogluconate**. *J. Inorg. Biochem.*: v. 102, 656-665, 2008.

GERSHELL, L. J.; ATKINS, J. H. **A Brief History of Novel Drug Discovery Technologies**. *Nat. Rev. Drug Disc.*: v. 2, 321-327, 2003.

GIAROLLA, J.; RANDO, D. J.; PASQUALOTO, K. F. M.; ZAIM, M. H.; FERREIRA, E. I. **Molecular Modeling as a Promising Tool to Study Dendrimer Prodrugs Delivery**. *J. Mol. Struct.*: v. 939, 133-139, 2010.

GO, M. L.; LIU, M.; WILAIRAT, P.; ROSENTHAL, P. J.; SALIBA, K. J.; KIRK, K. **Antiplasmodial Chalcones Inhibit Sorbitol-Induced Hemolysis of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes**. *Antimicrob. Agents Chemother.*: v. 48, 3241-3245, 2004.

GOURBAL, B.; SONUC, N.; BHATTACHARJEE, H.; LEGARE, D.; SUNDAR, S.; OUELLETTE, M.; ROSEN, B. P.; MUKHOPADHYAY, R. **Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin**. *J. Biol. Chem.*: v. 279, 31010-31017, 2004.

HALGREN, T. A. **Merck Molecular Force Field I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94**. *J. Comp. Chem.*: v. 17, 490-519, 1996.

HEHRE, W. J. **A Guide to Molecular Mechanisms and Quantum Chemical Calculations**. *Wavefunction inc.*: 2003.

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

HODGSON, J. **ADMET: Turning Chemicals into Drugs**. *Nat. Pub. Group.*: v. 19, 722-726, 2001.

HÖLTJE, H. D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G., **Molecular Modeling: Basic Principles and Applications**. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co*: 2^a ed., 2003.

HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R. **The Druggable Genome**. *Nat. Pub. Group.*: v. 1, 727-730, 2002.

HSIEH, H. K.; LEE, T. H.; WANG, J. P.; WANG, J. J.; LIN, C. N. **Synthesis and Anti-inflammatory Effect of Chalcones and Related Compounds**. *Pharm. Res.*: v. 15, 39-46, 1998.

KARELSON, V.; LOBANOV, V. **Quantum-chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies**. *Chem. Rev.*: v. 96, 1027-1043, 1996.

KELLER, T. H.; PICHOTA, A.; YIN, Z. **A Practical View of Druggability.** *Curr. Opin. in Struct. Biol.*: v. 10, 357-361, 2006.

KHAN, M. T.; SYLTE, I. **Predictive QSAR Modeling For the Successful Predictions of the ADMET Properties of Candidate Drug Molecules.** *Curr. Opin. in Struct. Biol.*: v. 4, 141-149, 2007.

KUBINYI, H. **Strategies and Recent Technologies in Drug Discovery.** *Pharmazie.* v. 50, 647-662, 1995.

JORDAN, A. M.; ROUGHLEY, S. D. **Drug Discovery Chemistry: A Primer for the Non-specialist.** *Drug Disc. Today.*: v. 14, 731-744, 2009.

LEACH, A. **Molecular Modelling: Principles and Applications.** *Pearson Education Limited.* 2^a ed., 2001.

LENGAUER, T.; RAREY, M. **Computacional Methods For Biomolecular Docking.** *Curr. Opin. in Struct. Biol.*: v. 6 (3), 402-405, 1996.

LEOPOLDO, P. T.; MACHADO, P. R.; ALMEIDA, R. P.; SCHRIEFER, A.; GIUDICE, A.; DE JESUS, A. R.; HO, J. L.; GUIMARÃES, L. H.; BACELLAR, O.; CARVAIHO, E. M. **Differential Effects of Antigens from *L. braziliensis* Isolates from Disseminated and Cutaneous Leishmaniasis on In Vitro Cytokine Production.** *BMC Infect. Dis.*: v. 75, 1-6, 2006.

LIPINSKI, C. A. **Lead and Drug-Like Compounds: The Rule-of-Five Revolution.** *Drug Disc. Tod.: Techno.*: v. 1, 337-341, 2004.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENY, P. J. **Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings.** *Adv. Drug. Rev.*: v. 48, 3-26, 2001.

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

MAAROUF, M.; KOUCHKOVSKY, Y.; BROWN, S.; PETIT, P. X.; ROBERT-GERO, M. **In Vivo Interference of Paromomycin with Mitochondrial Activity of *Leishmania*.** *Exp. Cell. Res.*: v. 232, 339-348, 1997.

MALLARI, J. P.; SHELAT, A.; KOSINSKI, A.; CAFFREY, C. R.; CONNELLY, M.; ZHU, F.; MCKERROW, J. H.; GUY, K. **Discovery of Trypanocidal Thiosemicarbazone Inhibitors of Rhodesain and TbcatB.** *Bioorg. Med. Chem Lett.*: v. 18, 2883-2885, 2008.

MENG, C. Q.; ZHENG, X. S.; NI, L.; ZHIHONG, Y.; SIMPSON, J. E.; WORSENCROFT, K. J.; HOTEMA, M. R.; WEINGARTEN, D.; SKUDLAREK, J. W.; GILMORE, J. M.; HOONG, L. K.; HILL, R. R.; MARINO, E. M.; SUEN, K. L.;

KUNSCH, C.; WASSERMAN, M. A.; SIKORSKI, J. A. **Discovery of Novel Heteroaryl-substituted Chalcones as Inhibitors of TNF- α -induced VCAM-1 Expression.** *Bioorg. Med. Chem.*: v. 14, 1513-1517, 2004.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES C. R.; SARAVIA, N. G. **Advances in Leishmaniasis.** *Lancet.*: v. 366, 1561-1577, 2005.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. **Antibacterial Chalcones: Bioisosteric Replacement of the 4'-hydroxy group.** *Bioorg. Med. Chem.*: v. 12, 3047-3054, 2004.

ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. **Molecular Properties Prediction: OSIRIS Property Explorer.** Disponível em: <<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>>. Acessado em: Fevereiro 2009.

PÉREZ-VICTORIA, J. M.; CORTÉS-SELVA, F.; PARODI-TALICE, A.; BAVCHVAROV, B. I.; PÉREZ-VICTORIA, F. J.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, F.; MAITREJEAN, M.; COSTI, M. P.; BARRON, D.; DI PIETRO, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. **Combination of Suboptimal Doses of Inhibitors Targeting Different Domains of LtrMDR1 Efficiently Overcomes Resistance of *Leishmania* spp. to Miltefosine by Inhibiting Drug Efflux.** *Biojournal.*: v. 50, 3102-3110, 2006.

PIÑERO, J.; TEMPORAL, R. M.; SILVA-GONÇALVES, A. J.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; OLIVA, A.; PERERA, A.; LEON, L. L.; VALLADARES, B. **New Administration Model of *Trans*-Chalcone Biodegradable Polymers for the Treatment of Experimental Leishmaniasis.** *Acta Trop.*: v. 98, 59-65, 2006.

RAWLINS, M. D. **Cutting the Cost of Drug Development?** *Nat. Pub. Group.*: v. 3, 360-364, 2004.

REGUERA, R. M.; TEKWANI, B. L.; BALAÑA-FOUCE, R. **Polyamine Transport in Parasites: A Potential Target for New Antiparasitic Drug Development.** *Comp. Biochem. Physiol.*: part C 140, 151-164, 2005.

RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. **New Antileishmanial Candidates and Lead Compounds.** *Curr. Opin. Chem. Biol.*: v. 14, 1-9, 2010.

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

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

SALEM, M. M.; WERBOVETZ, K. A. **Isoflavonoids and Other Compounds from *Psoralea argyrea* with Antiprotozoal Activities.** *J. Nat. Prod.* v. 69, 43-49, 2006.

SANTOS, J. L.; YAMASAKI, P. R.; CHIN, C. M.; TAKASHI, C. H.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F. **Synthesis and *in vitro* Anti *Mycobacterium tuberculosis* activity of a Series of Phthalimide Derivatives.** *Bioorg. Med. Chem.*: v. 17, 3795-3799, 2009.

SEAMAN, J.; MERCER, A. J.; SONDRUP, H. E.; HERWALDT, B. L. **Epidemic Visceral Leishmaniasis in Southern Sudan: Treatment of Severely Debilitated Patients under Wartime Conditions and with Limited Resources.** *Ann. Intern. Med.*: v. 124, 664-672, 1996.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W.; OVERTON, T. L.; ROURKE, J. P.; WELLER, M. T.; ARMSTRONG, F. A. **Química Inorgânica.** *Bookman*: 4ª ed., 2008.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. **Challenges and New Discoveries in the Treatment of Leishmaniasis.** *J. Infect. Chemother.*: v. 10, 307-315, 2004.

SOUZA, E. M.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; WILSON, W. D.; HU, Q.; BOYKIN, D. W.; BATISTA, M. M.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; SOEIRO, M. N. C. **Phenyl Substitution of Furamide Markedly Potentiates Its Anti-parasitic Activity Against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*.** *Bioch. Pharm.*: v. 68, 593-600, 2004.

SOUZA, A. M. T.; CASTRO, H. C.; BRITO, M. A.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; MAGALHÃES, U.; OLIVEIRA, K. N.; GASPARG-SILVA, D.; PACHECO, L. K.; JOUSSEF, A. C.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, D. O.; ALBUQUERQUE, M. G.; RODRIGUES, C. R.; NUNES, R. J. ***Leishmania amazonensis* Growth Inhibitors: Biological and Theoretical Features of Sulfonamide 4-Methoxichalcone Derivatives.** *Curr. Microbiol.*: v. 59, 374-379, 2009.

STOUCH, T. R.; KENYON, J. R.; JOHNSON, S. R.; CHEN, X. Q.; DOWEYKO, A.; LI, Y. ***In Silico* ADME/Tox: Why Models Fail.** *J. Comp. Aid. Mol. Des.*: v. 17, 83-92, 2003.

TETKO, I. V. **Internet in Drug Design and Discovery.** *The Open Appl. Inform. J.*: v. 2, 18-21, 2008.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. **Drug Development for Neglected Diseases: A Deficient Market and a Public-Health Policy Failure.** *Lancet.*: v. 359, 2188-2194, 2002.

UCHIUMI, F.; HATANO, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T.; TANUMA, S. I. **Transcriptional Suppression of the HIV Promoter by Natural Compounds.** *Antivir. Res.*: v. 58, 89-98, 2003.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET ***In Silico* Modelling: Towards Prediction Paradise?** *Nat. Pub. Group.*: v. 2, 192-204, 2003.

VEBER, D. F.; JOHNSON, R.S.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. **Molecular Properties that influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates.** *J. Med. Chem.*: v. 45, 2615-2623, 2002.

VENDRAMETTO, M. C.; DOS SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. **Evaluation of Antileishmanial Activity of Eupomatenoid-5, a Compound Isolated from Leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*.** *Parasitol. Int.*: 1-5, 2010.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry.** Elsevier Academic Press: 2^a ed., 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Essential leishmaniasis maps: Distribution of Old World and New World cutaneous leishmaniasis.** www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps, acessado em setembro de 2009.

WU, J. H.; WANG, X. H.; YI, Y. H.; LEE, K. H. **Anti-AIDS Agents 54. A Potent Anti-HIV Chalcone and Flavonoids from Genus *Desmos*.** *Bioorg. Med. Chem.*: v. 13, 1813-1815, 2003.

ZHAI, L.; BLOM, J.; CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, A. **The Antileishmanial Agent Licochalcone A Interferes with the Function of Parasite Mitochondria.** *Antimicrob. Agents Chemother.*: v. 39, 2742-2748, 1995.

ANEXOS