

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

BRENDA DE LUCENA COSTA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTILEISHMANIA DE DERIVADOS AMÍNICOS
PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL SATURADO

BRASÍLIA

2018



BRENDA DE LUCENA COSTA

SÍNTESE DE DERIVADOS AMÍNICOS PLANEJADOS A PARTIR DO
CARDANOL SATURADO E AVALIAÇÃO ANTILEISHMANIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

BRASÍLIA

2018

Autorizo a reprodução e divulgação apenas do resumo deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ls	<p>Lucena Costa, Brenda SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTILEISHMANIA DE DERIVADOS AMÍNICOS PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL SATURADO / Brenda Lucena Costa; orientador Luiz Antonio Soares Romeiro. -- Brasília, 2018. 109 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) -- Universidade de Brasília, 2018.</p> <p>1. Síntese e caracterização de intermediários e produtos amínicos finais;. 2. Avaliação da toxicidade dos derivados amínicos em cultivos de formas promastigota de Leishmania amazonensis. 3. Avaliação da citotoxicidade e propriedades hemolíticas dos derivados amínicos;. 4. Avaliação da alteração da membrana de Leishmania amazonensis por Espectroscopia Paramagnética Eletrônica (EPR);. 5. Estabelecimento de relações estrutura-atividade.. I. Soares Romeiro, Luiz Antonio, orient. II. Título.</p>
----	--

BRENDA DE LUCENA COSTA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTILEISHMANIA DE DERIVADOS AMÍNICOS PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL SATURADO. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

Universidade de Brasília – UnB

Prof^a Dr^a. Silvia Ribeiro de Souza

Universidade de Brasília – UnB

Prof^a Dr^a. Cecília Beatriz Fiúza Favali

Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero

Universidade de Brasília – UnB

Brasília

2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor infinito de pai que sempre segura em minhas mãos e conduz o meu caminho, dando-me força, sabedoria e perseverança para lutar pelos sonhos que Ele suscita em meu coração.

À minha Mãe Santíssima, por sempre interceder pelas lutas do meu coração, por colocar-me em seu colo, cuidar e proteger-me como sua filha amada.

Aos meus pais, Marlucia e José Luiz, pelo apoio, amor incondicional, ensinamentos, zelo e colo durante todos esses anos de minha vida. Aos meus irmãos, Brunno e Brenno, pelo companheirismo, incentivo e cuidado. Às minhas sobrinhas, Victória e Ana Beatriz, por trazer mais alegria e docilidade à minha vida.

Ao meu noivo, Edson, pelo amor, cumplicidade, lealdade, compreensão, perdão e paciência cultivados durante esses anos que caminhamos juntos.

Ao meu orientador, professor Dr. Luiz Romeiro, pelos ensinamentos, oportunidades, discussões teóricas e paciência durante essa trajetória.

À equipe do LDT, pela troca de conhecimento e apoio durante essa caminhada. Em especial, à Laís Lemes, pela parceria na realização da síntese química, dos ensaios biológicos e contribuição na dissertação.

À equipe do Laboratório de Biofísica da UFG, em especial ao professor Alonso e Laís Alonso, pela orientação e realização dos ensaios biológicos.

À Cristiane e Emanuely, irmã e sobrinha de Laís Lemes, que me acolheram com tanto carinho em sua casa durante a minha estadia em Goiânia no período inicial da realização dos ensaios biológicos.

À Universidade Católica de Brasília, por ceder o LADETER durante a realização das sínteses químicas dos compostos utilizados neste trabalho.

Ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará pela concessão de espectros RMN de ^1H e RMN de ^{13}C .

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

À banca examinadora por aceitar o convite, e desde já pelas críticas e contribuições no enriquecimento do trabalho.

RESUMO

Costa, Brenda de Lucena. **Síntese e Avaliação Antileishmania de Derivados Amínicos Planejados a Partir do Cardanol Saturado.** Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Núcleo de Medicina Tropical. Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da leishmaniose – doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* – tem demandado esforços globais em função do avanço da doença. Descrevemos neste trabalho os resultados referentes à síntese e caracterização de novos derivados amínicos, protonáveis e *N*-metilcatiônicos, concebidos a partir do cardanol saturado e avaliações *in vitro* quanto à atividade antiproliferativa frente à forma promastigota de *L. amazonensis*; ao potencial hemolítico; e ação sobre a membrana do parasito por ressonância paramagnética eletrônica. Neste sentido, três intermediários e 16 derivados-alvo foram sintetizados em rendimentos que variaram de 65 % a 98 % e caracterizados por ressonância magnética nuclear. A avaliação antiproliferativa frente à forma promastigota de *L. amazonensis* revelou que LDT119Me (**31**, Cl_{50} $6,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$) apresentou melhor perfil de atividade, seguido de LDT246Me (**30**, Cl_{50} $10,1 \pm 2,4 \mu\text{M}$) e LDT136Me (**35**, Cl_{50} $10,3 \pm 0,8 \mu\text{M}$) semelhantes à miltefosina (**6**). No ensaio de hemólise, os derivados catiônicos apresentaram maior potencial hemolítico (HEM_{50} $22,6 \mu\text{M}$ a $297,2 \mu\text{M}$) com LDT247Me (**34**) exibindo menor perfil (4,5 vezes), enquanto LDT246Me (**30**) e LDT136Me (**35**) os maiores (3 vezes) quando comparados à miltefosina (**6**). A análise da ação dos derivados-alvo sobre a membrana do parasito por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica apresentou perfil de atividade não linear - em que os derivados amínicos (LDT118 (**22**) e LDT120 (**23**)) e os catiônicos (LDT246Me (**30**) e LDT136Me (**35**)) induziram maior fluidez à membrana do parasito semelhante à **6**, enquanto LDT10 (**18**) favoreceu à rigidez da membrana.

Palavras chave: leishmaniose, *L. amazonensis*, derivados anfifílicos, LCC, cardanol saturado

ABSTRACT

The development of new therapeutic agents for the treatment of leishmaniasis – an infectious, non-contagious disease caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania* – has required global efforts in the light of the disease's progress beyond endemic countries. We describe the results concerning the synthesis and characterization of novel amines, protonatable and *N*-methylcationic derivatives, designed from saturated cardanol and *in vitro* evaluations of the antiproliferative activity against the promastigote form of *L. amazonensis*; to the hemolytic potential and action on the parasite membrane by electronic paramagnetic resonance. In this sense, three intermediates and 16 target derivatives were synthesized in yields ranging from 65 % to 98 % and characterized by Nuclear Magnetic Resonance. The antiproliferative evaluation against the promastigote form of *L. amazonensis* revealed that LDT119Me (**31**, IC_{50} 6.7 ± 0.5 μ M) had a better activity profile, followed by LDT246Me (**30**, IC_{50} 10.1 ± 2.4 μ M) and LDT136Me (**35**, IC_{50} 10.3 ± 0.8 μ M) similar to miltefosine (**6**). In the hemolysis assay, cationic derivatives had a higher hemolytic potential (HEM_{50} 22.6 μ M to 297.2 μ M) with LDT247Me (**34**) exhibiting a smaller profile (4.5 fold), whereas LDT246Me (**30**) and LDT136Me (**35**) larger ones (3 fold) when compared to **6**. The analysis of the action of the target derivatives on the parasite membrane by electronic paramagnetic resonance spectroscopy showed a non-linear activity profile, in which the amine derivatives (LDT118 (**22**) and LDT120 (**23**)) and the cationic ones (LDT246Me (**30**) e LDT136Me (**35**)) induced greater fluidity to the membrane of the parasite similar to **6**, while LDT10 (**18**) favored the hardness of the membrane.

Keywords: leishmaniasis, *L. amazonensis*, amphiphilic derivatives, LCC, saturated cardanol

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Formas evolutivas da Leishmania	5
FIGURA 2:	Ciclo de transmissão da leishmaniose	6
FIGURA 3:	Quimioterápicos para leishmaniose	9
FIGURA 4:	Fármacos adjuvante e reposicionado no tratamento da leishmaniose	10
FIGURA 5:	Organização estrutural da <i>raft</i>	12
FIGURA 6:	Principais lipídios que constituem a membrana plasmática da Leishmania	13
FIGURA 7:	Organização estrutural da superfície celular da Leishmania	14
FIGURA 8:	Marcador lipídico 5-DAS (11)	15
FIGURA 9:	Representação esquemática dos compostos anfifílicos catiônicos (A), aniônicos (B), anfóteros (C) e não iônicos (D)	16
FIGURA 10:	Representação esquemática da interação entre proteína e os compostos anfifílicos	17
FIGURA 11:	Estrutura química das fosfocolina (6) e (12) e fosfopiperidina (13)	18
FIGURA 12:	Numeração e legendas empregadas nos assinalamentos em RMN de ^1H e de ^{13}C	30
FIGURA 13:	Espectros de EPR do marcador de spin 5-DSA incorporado em membrana de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> sem tratamento (controle negativo); com tratamento com os 20 diferentes compostos e com a miltefosina (6), adotada como um controle positivo	61

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: Metodologia sintética geral para obtenção dos derivados-alvo	27
--	-----------

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Composição química dos LCCs natural e técnico.	20
TABELA 2:	Concentrações utilizadas dos derivados e dos hematócitos na avaliação do potencial hemolítico	45
TABELA 3:	Dados de caracterização dos derivados LDT117 (19), LDT137 (28) e LDT138 (29)	49
TABELA 4:	Dados de caracterização dos derivados amínicos terciários 20-27	50
TABELA 5:	Principais assinalamentos de RMN de ¹ H e de ¹³ C dos derivados LDT246 (20), LDT119 (21), LDT118 (22), LDT120 (23), LDT131 (24), LDT247 (25), LDT136 (26) e LDT134 (27)	51
TABELA 6:	Dados de caracterização dos derivados amônio quaternários 30-36	52
TABELA 7:	Principais assinalamentos de RMN de ¹ H e de ¹³ C dos derivados LDT246Me (30), LDT119Me (31), LDT118Me (32), LDT120Me (33), LDT247Me (34), LDT136Me (35) e LDT134Me (36)	53
TABELA 8:	Cl ₅₀ dos derivados-alvo frente à <i>L. amazonensis</i>	55
TABELA 9:	Concentração dos compostos necessária para causar 50 % de hemólise (HEM ₅₀) após 2 h de incubação na suspensão de eritrócito a 2 % de hematócrito	59
TABELA 10:	Comparação do potencial hemolítico com a alteração de fluidez na membrana de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALH – Aceptor de Ligação de Hidrogênio
- Boc – *tert*-Butilóxicarbonila ou Carbo*tert*-butoxila
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- CDCl₃ – Clorofórmio Deuterado
- CI₅₀ – Concentração Inibitória de 50 %
- CMC – Concentração Micelar Crítica
- 5-DAS – Ácido 5-Doxilesteárico
- DCM – Diclorometano
- DLH – Doador de Ligação de Hidrogênio
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DPPC – 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
- ELISA – Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
- EPR – Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica
- GP – Glicoproteínas
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- HEM₅₀ – Concentração Hemolítica de 50 %
- Hz – Hertz
- IFI – Imunofluorescência Indireta
- IFN- γ – Interferon-gama
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-12 – Interferon Gama
- IS – Índice de Seletividade
- LC – Leishmaniose Cutânea
- LCC – Líquido da Casca da Castanha de Caju
- LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
- LDT – Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas
- LMC – Leishmaniose Mucocutânea
- LPG – Lipofosfoglicanos
- LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral
LVC – Leishmaniose Visceral Canina
MeCN – Acetonitrila
MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NO – Óxido nítrico
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Tampão fosfato alcalino
p.f. – Ponto de Fusão
POPC – 1-Palmitoil-2-oleoil-snglicero-3-fosfocolina
PPG – Proteofosfoglicana
ppm – Parte por milhão
REA – Relação Estrutura-Atividade
R.f. – Fator de Retenção
RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
SDS – Dodecilsulfato de Sódio
SFB – Soro Fetal Bovino
SM – Esfingomielina
 $\text{S}_{\text{N}}2$ – Substituição Nucleofílica Molecular
TEA – Trietilamina
Th1 – Linfócitos T *helper*
THF – Tetraidrofurano
TMS – Tetrametilsilano
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- alfa
UFC – Universidade Federal do Ceará
UFG – Universidade Federal de Goiás
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	2
1.1.	ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	2
1.2.	Dados Epidemiológicos- Distribuição Geográfica	3
1.3	CARACTERIZAÇÃO E CICLO DE VIDA-AGENTES ETIOLÓGICOS	4
1.4	FISIOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE	6
1.4.1.	Respostas imunológicas	6
1.5.	QUIMIOTERAPIA DAS LEISHMANIOSES	8
1.5.1.	Fármacos adjuvantes e reposicionados	18
1.6.	BIOMEMBRANAS	11
1.6.1.	Espectroscopia Paramagnética Eletrônica (EPR)	14
1.6.2.	Derivados anfifílicos faciais	15
1.7.	O LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (LCC)	18
2.	JUSTIFICATIVA	22
3.	OBJETIVOS	24
3.1.	OBJETIVO GERAL	24
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4.	PLANEJAMENTO SINTÉTICO	26
5.	PARTE EXPERIMENTAL	28
5.1.	GENERALIDADES, MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.2.	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	31
5.2.1.	Obtenção do derivado 1-(2-bromoetóxi)-3-pentadecilbenzeno (19, LDT117)	31
5.2.2.	Procedimento Geral para obtenção dos derivados amínicos 20-27	32
5.2.3.	Obtenção do derivado 1-(2-Azidoetóxi)-3-pentadecilbenzeno (29, LDT137)	37
5.2.4.	Obtenção do derivado 2-(3-pentadecilfenóxi)etanamina (28, LDT138)	38

5.2.5.	Procedimento geral para obtenção dos derivados amínicos N-metilados 30-35	39
5.3.	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA <i>in vitro</i>	43
5.3.1.	Ensaio de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> de promastigotas de <i>L. (l.) amazonensis</i>	43
5.3.2.	Análise de fluidez de membrana por EPR (Espectroscopia Paramagnética Eletrônica)	44
5.3.3.	Avaliação do potencial hemolítico	45
5.3.4.	Análise Estatística	46
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1.	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	48
6.1.1.	Obtenção dos derivados LDT117 (19), LDT137 (28) e LDT138 (29)	48
6.1.2.	Obtenção dos derivados amínicos 20-27	49
6.1.3.	Obtenção dos derivados amínicos 30-26	51
6.2.	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA <i>in vitro</i>	54
6.2.1.	Atividade antiproliferativa frente a <i>L. amazonensis</i>	54
6.2.2.	Atividade antiproliferativa dos intermediários não amínicos	55
6.2.3.	Atividade antiproliferativa e REA dos derivados amínicos 20-28	56
6.2.4.	Atividade antiproliferativa e REA dos derivados catiônicos 30-36	57
6.2.5.	Comparação entre os derivados amínicos 20-26 e catiônicos 30-36	58
6.2.6.	Potencial hemolítico	59
6.2.7.	Análise da fluidez da membrana	60
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	63
7.1.	Conclusões	64
7.2.	Perspectivas	65
8.	REFERÊNCIAS	66
9.	ANEXOS	71

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

A leishmaniose é uma doença infecciosa transmitida por vetor, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Apresenta amplo espectro de manifestações clínicas e diversidade epidemiológica, dependendo da região geográfica, da espécie de leishmania envolvida e das características biológicas do hospedeiro, podendo acometer pele, mucosas e vísceras (Ministério da Saúde, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde, as formas clínicas da infecção por *Leishmania* são a leishmaniose visceral (LV), forma mais grave da doença e também conhecida como calazar; Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que manifesta-se como Leishmaniose Cutânea (LC), forma clínica mais comum e que acomete a pele; e Mucocutânea (LMC), que acomete a pele e mucosas (WHO, 2018).

A LTA ocorre com maior frequência que a LV sendo identificada a partir das lesões na pele, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes ao longo da vida. Geralmente, manifesta seus primeiros sintomas a partir de dois a três meses de infecção, podendo ainda variar de duas semanas a dois anos (Ministério da Saúde, 2017). As formas assintomáticas ocorrem em pacientes provenientes de zonas endêmicas, onde há evidência epidemiológica e imunológica da infecção (Ministério da Saúde, 2014). O diagnóstico para LTA é feito a partir da biopsia em tecidos ou fluidos biológicos dos hospedeiros, onde comumente encontra-se o parasito (Romero e Boelaert, 2010). Embora não cause morte na ausência de complicações, a LTA pode causar lesões debilitantes e estigmatizantes, como nos casos clínicos de Leishmaniose Cutânea Difusa (Mendes *et al*, 2016).

Do contrário, a LV é a forma mais agressiva podendo ser fatal em mais de 95% dos casos sem tratamento. Nesta forma de manifestação clínica

observa-se ocorrência irregular de febre, perda ponderal, hepatoesplenomegalia e anemia. O período de incubação varia tanto para o homem – 10 dias a 24 meses, com média entre 2 a 6 meses – quanto para o cão – 3 meses a vários anos com média de 3 a 7 meses (Ministério da Saúde, 2014). Entre as técnicas de diagnóstico para a LV são encontradas a Imunofluorescência Indireta (IFI) e Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), para o diagnóstico de LTA o teste mais utilizado é de intradermoreação de Montenegro. Antes de iniciar o tratamento, recomenda-se a confirmação do diagnóstico, principalmente nos casos em que há evolução clínica fora do habitual e/ou má resposta ao tratamento anterior (Ministério da Saúde, 2014).

Atualmente, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada devido aos investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle, o que contribui para o fato de ser endêmica em países subdesenvolvidos (Ministério da Saúde, 2017).

1.2. Dados Epidemiológicos- Distribuição Geográfica

A LTA constitui problema de saúde pública em 85 países distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos. É considerada pela OMS como uma das seis mais importantes doenças infecciosas – pelo seu alto coeficiente de detecção e a capacidade de produzir deformidades. Cerca de 95 % dos casos de LT ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e a República Árabe Síria (Roque e Jansen, 2014) e quase 90% dos casos mucocutâneos ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2018).

As três principais espécies de *Leishmania* relacionada à LTA são a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, distribuída pelas florestas primárias e

secundárias da Amazônia legal, nordeste (Bahia), sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-oeste (Goiás) e Sul (Paraná); a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, aparentemente limitada à Região Norte (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e estendendo-se pelas Guianas; e a *Leishmania (Viannia) braziliensis* que ocorre desde a América Central até o norte da Argentina, sendo uma das mais importantes com ampla distribuição no Brasil. Dentro do subgênero *Viannia*, existem outras espécies de *Leishmania* recentemente descritas: *L. (V) lainsoni*, identificada nos estados do Pará, Rondônia e Acre; *L. (V) naiffi*, com ocorrência nos estados do Pará e Amazonas; *L. (V) shawi*, com casos humanos encontrados no Pará e Maranhão; e *L. (V.) lindenberg*, identificada no estado do Pará (Ministério da Saúde, 2018).

Por sua vez, a LV é endêmica no subcontinente indiano e no leste da África. Mais de 90 % de novos casos ocorrem em países como Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão. Os programas de eliminação no Sudeste da Ásia obtiveram como resultado o declínio de casos nos três principais países endêmicos: Bangladesh, Índia e Nepal (Roque e Jansen, 2014). A *L. donovani*, responsável pela maioria dos casos de LV da África Oriental e na Ásia, infecta indivíduos em diferentes faixas etárias; enquanto que *L. infantum* é a responsável pela forma visceral na região do Mediterrâneo e na América Latina, também associada à infecção de crianças e indivíduos imunocomprometidos tendo os caninos como reservatório (WHO, 2018; Romero e Boelaert, 2010).

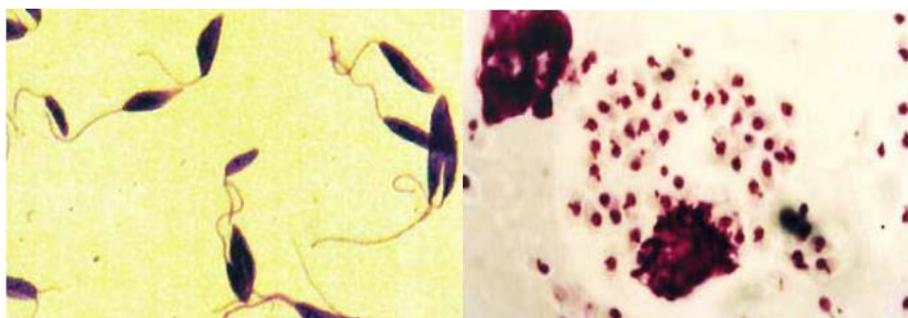
No Brasil, foram notificados 12.690 casos de LTA em 2016, sendo 94 % referentes à forma clínica de LC, enquanto 6 % manifestaram a LMC (PAHO, 2018).

No Distrito Federal, a Secretaria de Estado de Saúde registrou um caso confirmado de LT até março de 2018. Este caso encontra-se em investigação, para definir o local provável de infecção. Observa-se uma redução expressiva dos casos confirmados, em relação ao ano de 2017 com 17 casos confirmados (Ministério da Saúde, 2018).

1.3 CARACTERIZAÇÃO E CICLO DE VIDA-AGENTES ETIOLÓGICOS

As *Leishmanias* – protozoários que pertencem à família *Trypanosomatidae* – apresentam ciclo heteroxênico sendo encontradas em duas formas principais: promastigota, observada no trato gastrointestinal do inseto vetor responsável pela infecção, e amastigota, identificada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, como parasito intracelular obrigatório das células do sistema mononuclear fagocitário (Figura 1).

Figura 1: Formas evolutivas da *Leishmania*. ^A Promastigota. ^B Amastigota em macrófago



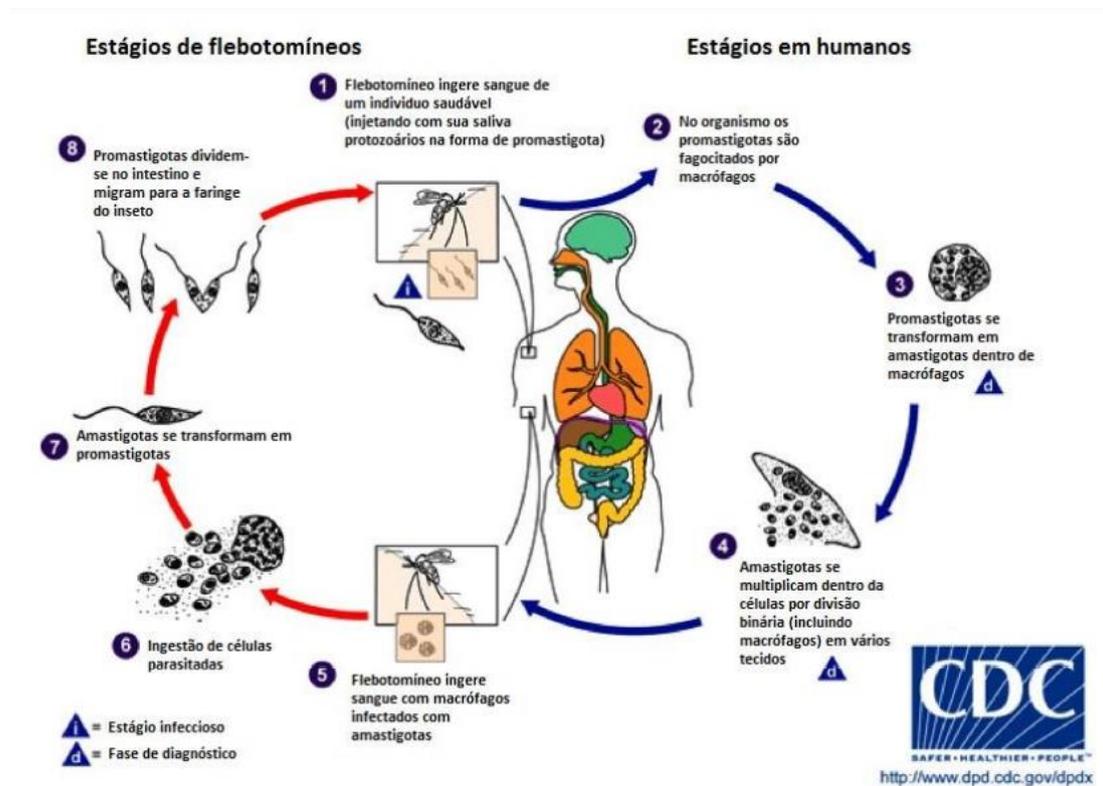
Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. MS, 2017

A infecção do vetor ocorre durante o repasto sanguíneo das fêmeas, que ao sugarem o sangue de mamíferos infectados ingerem os macrófagos parasitados pelas amastigotas da *Leishmania*. Esses macrófagos são rompidos no trato digestório anterior do flebótomo liberando os parasitos que se reproduzem por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em promastigotas. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas e colonizam o esôfago e a faringe do vetor. Ali permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo até se diferenciarem nas formas infectantes – promastigotas metacíclicas. Este ciclo completo do parasito no vetor tem a duração de 72 horas (Figura 2) (Ministério da Saúde, 2014).

O vetor infectado inocula as formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro, por exemplo o homem ou caninos, enquanto se alimenta. Por

fagocitose, os parasitas são internalizados nos macrófagos, local onde ocorre a transformação em amastigota, que se multiplica nas células infectadas até que ocorra a *lise* celular. As formas amastigotas podem se disseminar na corrente sanguínea a fim de infectar novas células e/ou infectar flebotomíneos, dando continuidade ao ciclo (Ministério da Saúde, 2014; CDC, 2018).

Figura 2: Ciclo de transmissão da leishmaniose



Fonte: adaptada de CDC, 2018.

1.4. FISIOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE

1.4.1 Respostas imunológicas

Inicialmente, observa-se a resposta imune inata que é importante frente à *Leishmania*. Componentes do sistema complemento depositam-se sobre a superfície do patógeno, o que determina sua *lise* e/ou sua eliminação por células do sistema fagocítico. A destruição das formas promastigotas juntamente com as partículas antigênicas produzidas poderão ser utilizadas pelas células apresentadoras de antígeno no reconhecimento antigênico, impedindo o desenvolvimento da infecção. Falhas nesse processo – dependentes da intensidade e qualidade da resposta imune e característica de virulência da cepa envolvida – influenciarão a evolução da doença para cura espontânea ou o tipo de manifestação clínica, podendo ser autolimitadas, difusas ou progressivas, com manifestações na forma tegumentar ou visceral (Ministério da Saúde, 2017).

O parasito, ao ser fagocitado, é internalizado no vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), separado do citoplasma celular. As *Leishmanias* desenvolveram mecanismos de defesa capazes de subverter a capacidade microbicida dos macrófagos, sobrevivendo e multiplicando-se no interior dessas células até a ruptura celular, quando são liberadas e podem infectar outros macrófagos. Desta forma, propagam a infecção e liberam partículas antigênicas que serão apresentadas ao sistema imune, gerando a resposta específica (Ministério da Saúde, 2017).

Quando os macrófagos não respondem de forma adequada ao parasito, devido às estratégias de escape da resposta imune realizadas pelas *Leishmanias*, contribuem para a fisiopatogenia atuando como célula hospedeira. Assim, o desenvolvimento da resposta específica, relacionada ao hospedeiro, torna-se importante na patogenia. A ativação de macrófagos por linfócitos T auxiliares 1 (Linfócitos T *helper* – Th1), por meio da liberação do interferon-gama (IFN- γ), leva ao aumento da produção de espécies reativas

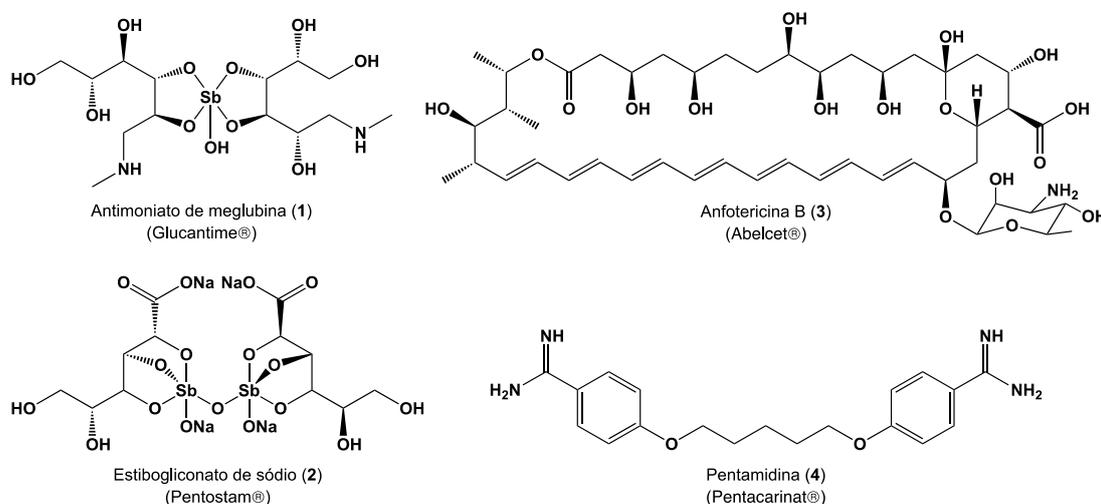
de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), aumentando a atividade microbicida destes e resultando na eliminação dos parasitos. Falha nessa resposta do hospedeiro permite maior desenvolvimento do parasito – polarização da resposta para o tipo Th2 associada à produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e diferenciação em macrófagos M2 sem perfil citotóxico. Desta maneira há agravamento da doença e manifestações clínicas na forma de leishmaniose cutânea difusa (LCD) ou LV, a depender da cepa envolvida (Scott e Novais, 2016).

Portanto, a resposta Th1 – via linfócitos (CD4, CD8), citocinas (IL-12, IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), linfotóxina e algumas quimiocinas produzidas por macrófagos – são importantes para o controle da doença. Esta resposta tem como resultado a ativação de macrófagos, tornando-os capazes de eliminar o parasito, controlando a infecção. Dentro desta perspectiva, há diminuição do número de parasitos, menor exacerbação da resposta imune pelo menor aporte de antígenos, controle do processo inflamatório, aumento da função de fibroblastos com produção de fibrose e tecido de cicatrização. Este tipo de resposta é observada na LC com lesões autolimitadas. Porém, embora a resposta celular seja a mais apropriada, exacerbação Th1 com aumento de CD8+ tem sido associada ao aparecimento das lesões desfigurantes observadas na LMC (Scott e Novais, 2016).

1.5. QUIMIOTERAPIA DAS LEISHMANIOSES

Segundo a OMS, os medicamentos de primeira linha disponíveis para o tratamento da leishmaniose incluem os derivados antimoniais pentavalentes antimoniato de meglumina **(1)** e estibogluconato de sódio **(2)**; enquanto os de segunda linha incluem a anfotericina B **(3)** e a pentamidina **(4)** (Figura **3**).

Figura 3: Quimioterápicos para Leishmaniose



Descobertos há mais de 50 anos, os antimoniais **1** e **2** – eficazes no tratamento da leishmaniose em diversos países incluindo o Brasil – atuam inibindo enzimas relacionadas à via glicolítica e à oxidação de ácidos graxos. Entre as limitações relacionadas ao seu uso são relatadas as toxicidades renal e cardíaca, características farmacocinéticas, como o regime de altas doses, tempo de administração longo e via parenteral, que prejudicam a aderência ao tratamento. Além disso, cepas resistentes aos antimoniais têm sido descritas (Ouellette *et al*, 2004). Por sua vez, a anfotericina B (**3**), alternativa terapêutica importante no controle da leishmaniose, atua na ligação ao ergosterol presente na membrana plasmática da *Leishmania*, levando à formação de poros. Apresenta ainda como vantagem a ação sobre cepas resistentes aos antimoniais pentavalentes; porém possui alta nefrotoxicidade, podendo gerar hipocalemia, e reações adversas relacionadas à sua administração por infusão. Adicionalmente, o tratamento com **3** necessita de internação hospitalar obrigatória devido à administração ser exclusivamente intravenosa (Menezes *et al*, 2015). Com a finalidade de reduzir a nefrotoxicidade, formulações lipossomais e coloidais da anfotericina B foram desenvolvidas resultando no aumento da biodisponibilidade e melhora de propriedades farmacocinéticas; entretanto o alto custo e a instabilidade em

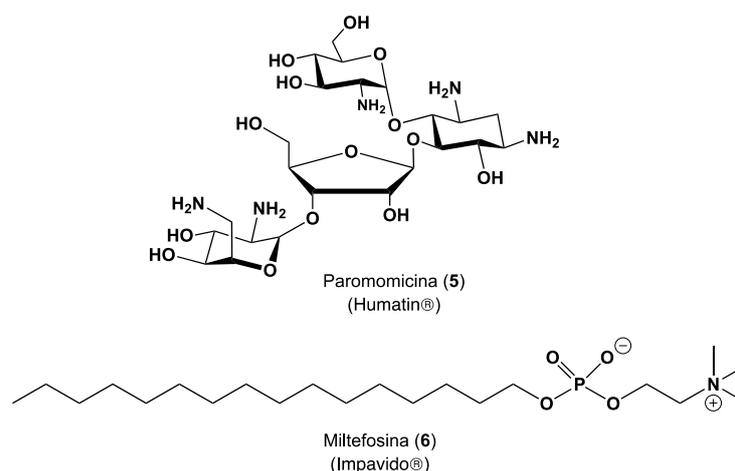
temperaturas mais altas limitam o tratamento em países endêmicos (Ouellette *et al*, 2004).

A pentamidina (4) possui como mecanismo de ação a alteração da estrutura dos cinetoplastos e a síntese de poliaminas. Administrada por via intramuscular, apresenta efeitos adversos como hiperglicemia, dano pancreático, taquicardia e hipotensão, além de elevada toxicidade. Possui baixa eficácia e é contraindicada a pacientes com comorbidade renal, hepática ou cardíaca, diabéticos, gestantes e lactantes (Ouellette *et al*, 2004). Atualmente, seu uso terapêutico é realizado na forma de combinações com outros medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose em alguns protocolos terapêuticos (Menezes *et al*, 2015).

1.5.1. Fármacos Adjuvantes e Reposicionados

Outros agentes terapêuticos, adjuvantes ou reposicionados, têm sido empregados como por exemplo a paromomicina (5) e a miltefosina (6) (Figura 4).

Figura 4: Fármacos adjuvante e reposicionado no tratamento da Leishmaniose



A paromomicina (5), adjuvante ao tratamento da leishmaniose, é um antibiótico aminoglicosídeo isolado de bactérias do gênero *Streptomyces*. Altera a síntese de proteínas, a atividade mitocondrial e a capacidade de

captação de precursores de macromoléculas, dificultando, assim, o crescimento do parasito. Apresenta como vantagem o baixo custo de tratamento; porém, possui a limitação farmacocinética de ser administrado por via parenteral e efeitos adversos como nefrotoxicidade, ototoxicidade, disfunção hepática contribuem para sua restrição como alternativa terapêutica (Bastos *et al*, 2016).

O derivado fosfocolínico Miltefosina (**6**), inicialmente desenvolvido como antineoplásico, foi o primeiro fármaco de administração oral disponível para o tratamento das LV, LC e LMC. Foi aprovado para tratamento da leishmaniose em pacientes que possuem pelo menos 12 anos de idade em países como Índia (2002), Alemanha (2004), Colômbia (2005) e Estados Unidos (2014) (Aichelburg *et al*, 2008; Lull *et al*, 2007), e para tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) no Brasil (Ministério da Agricultura e Pecuária e Ministério da Saúde, 2016). Apesar da vantagem relacionada à via de administração e ser alternativo no tratamento de cepas resistentes, possui limitação de uso em gestantes, em face de potenciais riscos relacionados à teratogênese, e efeitos gastrointestinais graves. Entre os mecanismos de resistência observados está a diminuição na penetração do fármaco no parasito, aumento do efluxo e tolerância à morte celular induzida. A resistência tem sido associada também à meia vida prolongada da miltefosina (Dorlo *et al*, 2012).

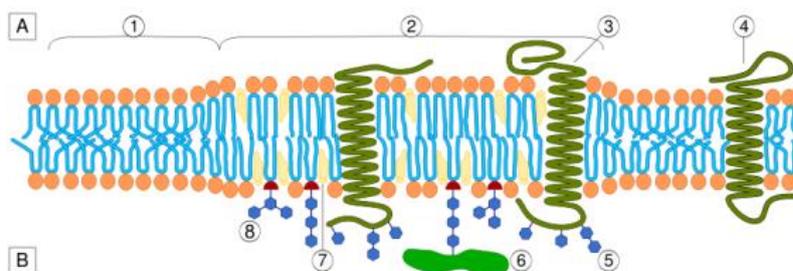
Embora seu mecanismo de ação não seja claro, estudos demonstraram possível atuação multialvo, incluindo a ação sobre o citocromo C-oxidase com diminuição da atividade mitocondrial e na ativação de caspases, com indução à apoptose (Aichelburg *et al*, 2008). Experimentos realizados com espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) demonstraram que **6** altera a dinâmica dos lipídeos e proteínas nas membranas de *Leishmania amazonensis* (Ministério da Agricultura e Pecuária e Ministério da Saúde, 2016), de eritrócitos (Dorlo *et al*, 2012) e da camada lipídica extracelular do estrato córneo (Ponte *et al*, 2012). Esses dados

sugerem que a membrana da *Leishmania* pode constituir importante alvo terapêutico.

1.6. BIOMEMBRANAS

As biomembranas são estruturas fluidas e dinâmicas constituídas de lipídeos, carboidratos – glicoproteínas e glicolipídeos – e proteínas. Estruturalmente, os lipídeos organizam-se em bicamadas (barreira hidrofóbica de permeabilidade), enquanto as proteínas conferem permeabilidade seletiva controlando a entrada e saída de substâncias da célula (Quinn e Wolf, 2009). Adicionalmente, as membranas apresentam domínios lipídicos – *lipid rafts* caracterizados pelo alto grau de cadeias saturadas – que estão envolvidos no tráfego intracelular e processos de endocitose desencadeados por patógenos e parasitas (Keenan e Morre, 1970; van Helvoort e van Meer, 1995) (Figura 5).

Figura 5: Organização estrutural da *raft*



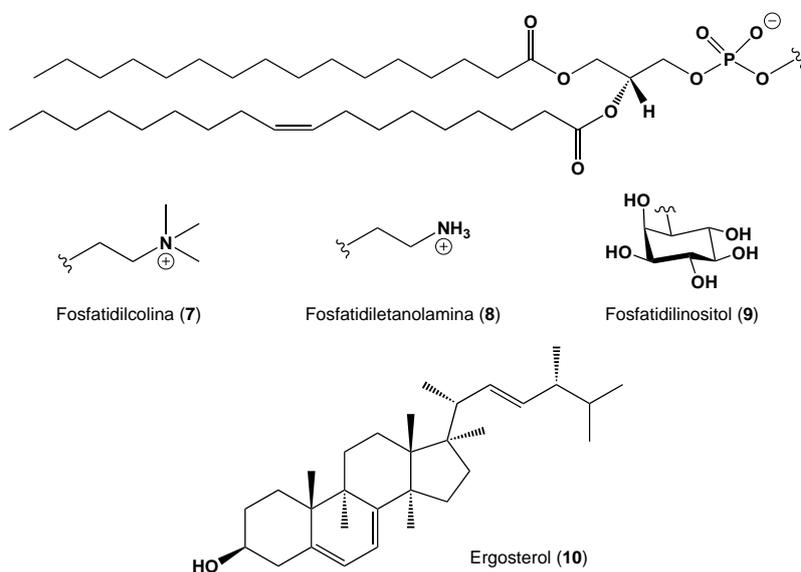
A – meio extracelular; B – meio intracelular; 1 – Região não-raft da membrana; 2 – Região de raft membranar; 3 – Proteína integral da raft; 4 – Proteína integral de região não-raft; 5 – Glicosilações em lipídeos e em proteínas de raft; 6 – Proteína ancorada a GPI; 7 – Colesterol; 8 – Esfingolípido. Fonte: adaptada de (Wikipedia, 2018).

Entre as proteínas periféricas ancoradas aos lipídeos estão as receptoras que retransmitem sinais entre os ambientes interno e externo da célula; proteínas integrais transmembranares que incluem transportadores; canais iônicos; receptores; enzimas de membrana como oxirredutase,

transferase ou hidrolase; domínios estruturais de ancoragem membranar; proteína de adesão celular; e proteínas envolvidas na acumulação e transdução de energia (Almén *et al*, 2009).

Em qualquer organismo parasito, a membrana plasmática representa a principal interface entre este e o hospedeiro. Na *Leishmania* – que divide sua existência entre o ambiente hidrolítico neutro-alcálico do intestino médio dos insetos e o ambiente hidrolítico ácido dos fagolisossomos dos mamíferos – a membrana plasmática envolve toda a célula, incluindo o flagelo. A superfície celular é sustentada por citoesqueleto microtubular extensivo ligado à superfície interna da membrana por meio de matriz regular de proteína associada a microtúbulos (Schneider *et al*, 1992). Os fosfolípidos correspondem a cerca de 70 % dos lípidos totais (Wassef *et al*, 1985) – fosfatidilcolina (7), fosfatidiletanolamina (8), fosfatidilinositol (9) e ergosterol (10) (Figura 6) (Zang e Beverley, 2010) além de glicolípidos (Yoneyama *et al*, 2006).

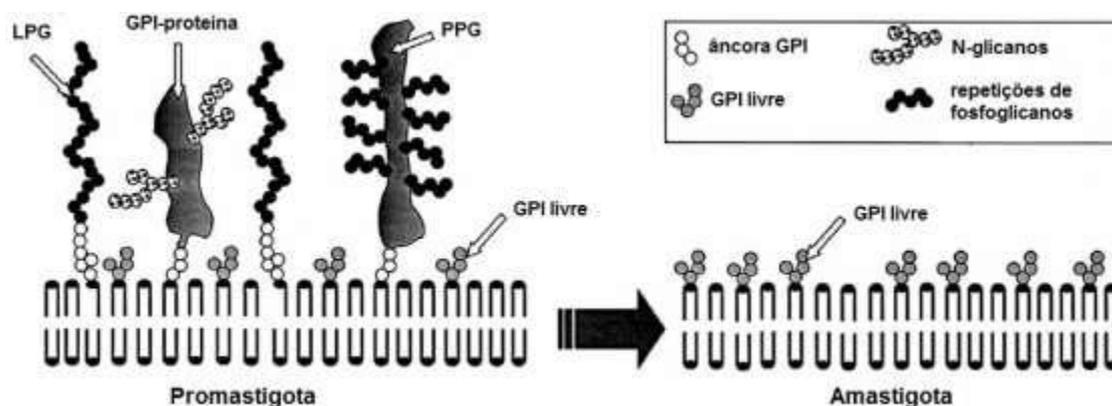
Figura 6: Principais lípidos que constituem a membrana plasmática da *Leishmania*



Adicionalmente, as diferentes formas evolutivas de *Leishmanias* apresentam em sua superfície uma variedade de moléculas – como glicosilfosfatidilinositol (GPI) e glicolípidos livre de GPI – que intermedeiam interações essenciais na relação parasito-hospedeiro relacionadas à

virulência, infecciosidade, sobrevivência e patogênese (Neves *et al*, 2005). Neste sentido, a membrana celular das promastigotas apresenta lipofosfoglicanos (LPGs) de alto peso molecular, mais abundante na superfície celular; glicoproteínas (GP63) e proteofosfoglicanas (PPGs) ancoradas ao GPI; e densa camada de GPIs livres abaixo dessas macromoléculas. Nas amastigotas há diminuição de macromoléculas ancoradas ao GPI e manutenção de GPIs livres (Ilgoutz e McConville, 2001) (Figura 7).

Figura 7: Organização estrutural da superfície celular da *Leishmania*



Fonte: adaptada de Ilgoutz e McConville, 2001.

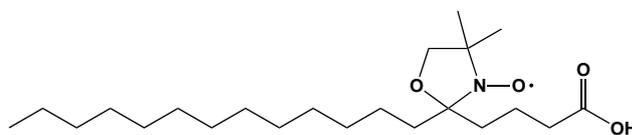
Devido à manutenção da homeostase celular bem como no desenvolvimento e sobrevivência do parasito no hospedeiro, a membrana apresenta-se como alvo para substâncias que possam alterar sua dinâmica. Diferentes técnicas para avaliação da influência de moléculas sobre a dinâmica de domínios lipídicos e fluidez têm sido empregadas; dentre elas podemos destacar a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) com o uso de marcadores de spin derivados de ácidos graxos (Rittig e Bogdan, 2000).

1.6.1. Espectroscopia Paramagnética Eletrônica (EPR)

A espectroscopia EPR permite detectar e caracterizar, sem alterar ou destruir moléculas com elétrons desemparelhados (spin eletrônicos), sendo eficiente para o estudo de diversos sistemas físicos, químicos e biológicos. A técnica baseia-se na absorção ressonante da radiação eletromagnética na região de frequência de micro-ondas por materiais paramagnéticos na presença de campo magnético estático e campo de modulação, quando as moléculas mudam seus estados de energia. Radicais livres e compostos biológicos, como membranas lipídicas e proteínas contendo elementos de transição, são bastantes investigados por EPR em pesquisas biológicas (Swartz *et al*, 1972).

Os sistemas biológicos, que em sua maioria não possuem elétrons desemparelhados, necessitam da incorporação de radical paramagnético (marcador de spin) que age como sonda para a investigação do meio em que se encontram (Lacaz-Vieira e Malnic, 1981). Os marcadores contendo o grupo nitróxido como elemento paramagnético, como o ácido 5-doxil-esteárico (**11**) (5-DAS) (Figura 8), intercalam-se em regiões lipídicas de sistemas de interesse por meio de ligações covalentes a grupos funcionais específicos de proteínas e ácidos nucleicos (Klare e Steinhoff, 2009).

Figura 8: Marcador lipídico 5-DAS (**11**)



Ácido 5-Doxilesteárico (**11**, 5-DAS)

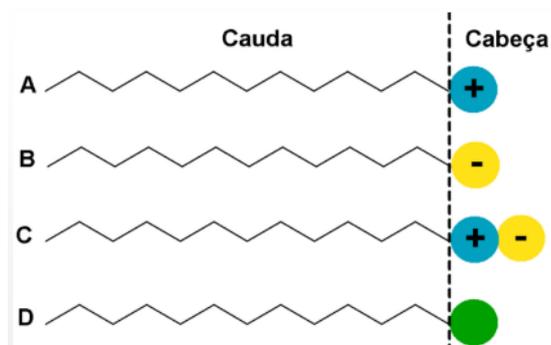
Dessa forma, as proteínas de membrana podem ser analisadas quando estão solubilizadas em tensoativo ou embebidas na bicamada lipídica [33]. Experimentos com os marcadores de spin foram os primeiros a fornecer evidências diretas sobre os tipos de movimentos característicos dos lipídeos constituintes da membrana (Schreier, 1979).

Esta técnica foi explorada por Alonso e colaboradores (2016) que verificaram o aumento no dinamismo de lipídeos e proteínas na membrana citoplasmática da *L. amazonensis* após tratamento com miltefosina (6), ocasionando maior susceptibilidade à *lise* celular em comparação aos macrófagos mais resistentes. Esses resultados reforçam a membrana como alvo interessante para o desenvolvimento de compostos anfifílicos faciais. Estes compostos, também denominados membrana ativos, alteram a permeabilidade da membrana por meio de lesões específicas e diretas, causando o rompimento dos fosfolipídeos membranares com extravasamento do conteúdo intracelular, perda do controle osmótico, e, por fim, *lise* celular (Chin *et al*, 2007).

1.6.2. Derivados anfifílicos faciais

Compostos anfifílicos apresentam em sua molécula uma subunidade polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica). A subunidade apolar, também denominada de cauda, é constituída por uma ou duas cadeias carbônicas; enquanto a subunidade polar, ou cabeça, pode apresentar grupos iônicos (cátions ou ânions), não iônicos ou anfóteros (Figura 9) (Daltin, 2011).

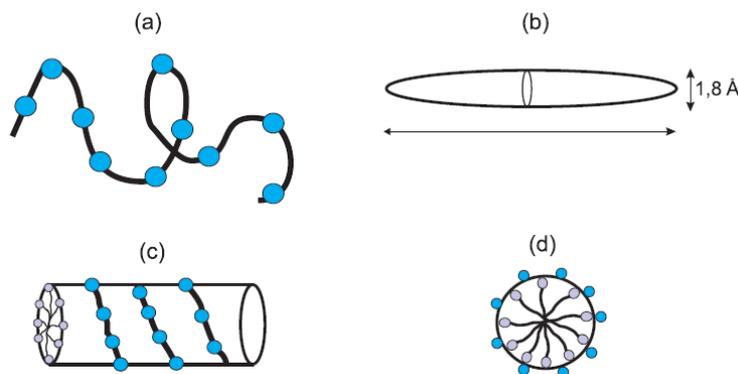
Figura 9: Representação esquemática dos compostos anfifílicos catiônicos (A), aniônicos (B), anfóteros (C) e não iônicos (D). A cauda corresponde à subunidade apolar e a cabeça à subunidade polar



Fonte: adaptada de Daltin, 2007.

A capacidade desses compostos de alterar a permeabilidade da membrana está associada a possíveis mecanismos como a interação com proteína de membrana em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC), atuando como desnaturantes, desenovelando e descaracterizando suas estruturas terciárias (de Oliveira e Dias, 2017). Alguns modelos de interação entre o composto anfifílico e proteínas estão representados na Figura 10.

Figura 10: Representação esquemática da interação entre proteína e os compostos anfifílicos: (a) modelo “colar de pérolas”; (b) elipsóide prolato; (c) e (d) vista lateral e frontal, respectivamente, do modelo “hélice flexível”



Fonte: adaptada de Turro e Lei, 1995.

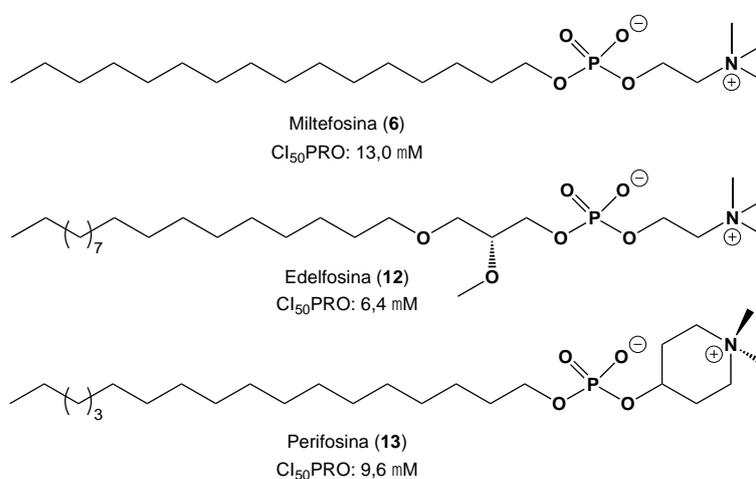
O modelo “colar de pérolas” (a) é caracterizado por estruturas micelares ligadas à cadeia polipeptídica da proteína; enquanto no modelo elipsóide prolato (b) as moléculas de surfactantes agregam-se formando estrutura elipsoidal com o semieixo menor de 18 Å e cadeia polipeptídica envolta no agregado. O modelo “hélice flexível” (c e d) descreve teoricamente o complexo micelar como agregado de surfactantes formando cilindro flexível envolvido pela cadeia polipeptídica em forma helicoidal (de Oliveira e Dias, 2017).

O tipo de composto anfifílico influencia em seu possível mecanismo de ação. A maioria dos compostos anfifílicos catiônicos atuam conforme o modelo de ação “*carpet*”. Este modelo requer a interação do derivado anfifílico

com a face da membrana celular, presumivelmente por interações iônicas e concentração adequada, de modo a retirar partes da membrana formando espécies de 'micelas', fragilizando a membrana e expondo os componentes citoplasmáticos com consequente *lise* celular (Bruce, 2010).

As fosfocolinas miltefosina (**6**), edelfosina (**12**) e o análogo fosfopiperidínico perifosina (**13**) possuem características anfífilas e atuam alterando a fluidez da membrana plasmática (Figura 11).

Figura 11: Estrutura química das fosfocolinas **6** e **12** e fosfopiperidina **13**



A edelfosina (**12**) – éter lipídico contendo a subunidade glicerila entre a cadeia alquílica e o grupo fosfocolina – foi desenvolvido como antitumoral cujo mecanismo envolve a indução da apoptose por interação com as membranas celulares e degradação do DNA (Savage *et al*, 2002). Demonstrou atividade antileishmania frente às espécies *L. donovani*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* com Cl_{50} entre 2,0 μ M a 27,7 μ M para promastigotas e variando de 3,1 μ M a 12,2 μ M para amastigotas axênicas, exceto a *L. major*. Apresentou ainda atividade antileishmania em camundongos e hamsters infectados com *L. major*, *L. panamensis* *L. braziliensis* sem demonstrar efeitos adversos significativos (Gajate e Mollinedo, 2002).

A perifosina (**13**) – análogo alquilfosfopiperidínico utilizado como antitumoral em casos de neuroblastoma, mieloma múltiplo, câncer colorretal metastático e câncer de rim – apresentou atividade antileishmania *in vivo* frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (CI₅₀ 3,59 µM) e *L. donovani* (CI₅₀ 1,98 µM) bem como sobre a forma amastigota de *L. amazonensis* (CI₅₀ 2,2 µM). A atividade antileishmania está associada à diminuição da atividade mitocondrial, dos níveis celular de adenosina trifosfato (ATP), da fosforilação das proteínas quinases serina/treonina nos parasitos e da diminuição do potencial elétrico transmembranar (Varela-M *et al*, 2012).

A similaridade estrutural entre os derivados fosfocolínicos e os lipídeos fenólicos extraídos do líquido da casca da castanha do caju (LCC) levaram à perspectiva do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com características de anfífilos planejados visando atuar como compostos membrana-ativos em *Leishmanias*.

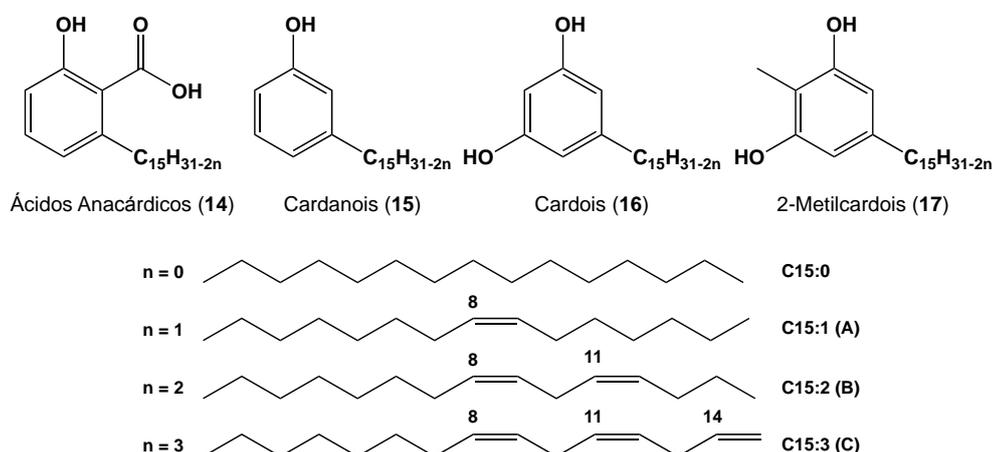
1.7. O LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (LCC)

O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta que se traduz em mais de 20% do número total de espécies identificadas (Lima *et al*, 2013). Dentro deste contexto, o cajueiro (*Anacardium occidentale*) apresenta importante interesse comercial advindo do beneficiamento da castanha do caju (fruto) com geração de biomassas e subprodutos de baixo valor agregado como o líquido da casca de sua castanha (LCC) (Ministério do Meio Ambiente, 2017).

O LCC compreende 25 % do peso da castanha *in natura* e, dependendo da forma de extração, pode ser classificado como natural – cujos constituintes são extraídos da castanha natural – ou LCC técnico, como subproduto industrial. Os diferentes processos para obtenção dos LCCs alteram o percentual das misturas de seus principais componentes. Neste sentido, processos de extração à frio conferem ao LCC natural maior percentual da mistura de ácidos anacárdicos (**14**). Já nos processos à quente

– com temperaturas em torno de 180 °C – **14** é convertida em uma mistura de cardanois (**15**) predominante no LCC industrial ou técnico (Tabela 1) (Mazzetto *et al*, 2009).

Tabela 1: Composição química dos LCCs natural e técnico



Constituinte	LCC Natural	LCC Técnico
Ácidos Anacárdicos	71,70 – 82,00 %	1,09 – 1,75 %
Cardanois	1,60 – 9,20 %	67,82 – 94,60 %
Cardois	13,80 – 20,10 %	3,80 – 18,86 %
2-Metilcardois	1,65 – 3,90 %	1,20 – 4,10 %
Componentes Minoritários	2,20 %	3,05 – 3,98 %
Material Polimérico	----	0,34 – 21,63 %

Fonte: Adaptada de Mazzetto *et al*, 2009.

Quimicamente, os componentes do LCC são derivados fenólicos que possuem cadeia lateral com 15 carbonos – posição *meta* em relação ao fenol – e se diferenciam de acordo com suas insaturações em monoenos (48-49 %), dienos (16-17 %) ou trienos (29-30 %), havendo ainda pequeno percentual de cadeias saturadas (3-5 %) (Voirin *et al*, 2014).

Na perspectiva do uso de compostos naturais que apresentam atividades biológicas, o LCC tem atraído a atenção de pesquisadores por ser um recurso renovável, de baixo custo e versátil para transformações químicas. Na literatura são descritos diversos trabalhos que avaliam tanto os lipídeos fenólicos, quanto os produtos de sua modificação química em relação às

propriedades antioxidantes, antibacteriana, fungicida, antiparasitária, anticarcinogênica, larvicida e anticolinesterásica (Stasiu *et al*, 2014; Matias *et al*, 2017). As características eletrônicas e hidrofóbicas dos derivados do LCC conferem atributos estruturais relevantes ao reconhecimento molecular por diferentes alvos terapêuticos (Carneiro, 2004) como o planejamento de compostos anfifílicos catiônicos a partir do cardanol saturado.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A necessidade de medicamentos de baixo custo bem como os poucos investimentos financeiros disponíveis para doenças negligenciadas parasitárias são os principais responsáveis pela limitação do tratamento da leishmaniose nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Entretanto, os fluxos migratórios têm aumentado o número de casos de forma global e atingido os países desenvolvidos, o que tem levado grupos de pesquisa a buscarem novos compostos com atividade leishmanicida (Roque e Jansen, 2014)

Na perspectiva do uso de fontes renováveis de baixo custo, o LCC técnico tem atraído a atenção de pesquisadores quanto ao uso de seu componente majoritário: a mistura de cardanois (**15**). Desta forma, **15** pode ser hidrogenado ao derivado saturado (**18**), ou 3-pentadecilfenol, cuja cadeia longa linear com 15 átomos de carbono pode mimetizar as subunidades hidrofóbicas da miltefosina (**6**). Adicionalmente, por meio da funcionalização da hidroxila fenólica é possível obter compostos com característica anfifílica explorando reações clássicas de síntese orgânica. Neste sentido, a funcionalização da hidroxila fenólica com substituintes amina e amônio visa inserir a característica anfifílica catiônica em **18**. Por fim, a avaliação frente a formas promastigotas e amastigotas permitirá a validação do planejamento racional destes candidatos a agentes terapêuticos em consonância à necessidade de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar novos derivados amínicos planejados a partir do cardanol saturado e avaliar o perfil de toxicidade em cultivos da forma promastigota de *Leishmania*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese e caracterização de intermediários e produtos amínicos finais;
- Avaliação da toxicidade dos derivados amínicos em cultivos de formas promastigota de *Leishmania amazonensis*;
- Avaliação da citotoxicidade e propriedades hemolíticas dos derivados amínicos;
- Avaliação da alteração da membrana de *Leishmania amazonensis* por EPR; e
- Estabelecimento de relações estrutura-atividade

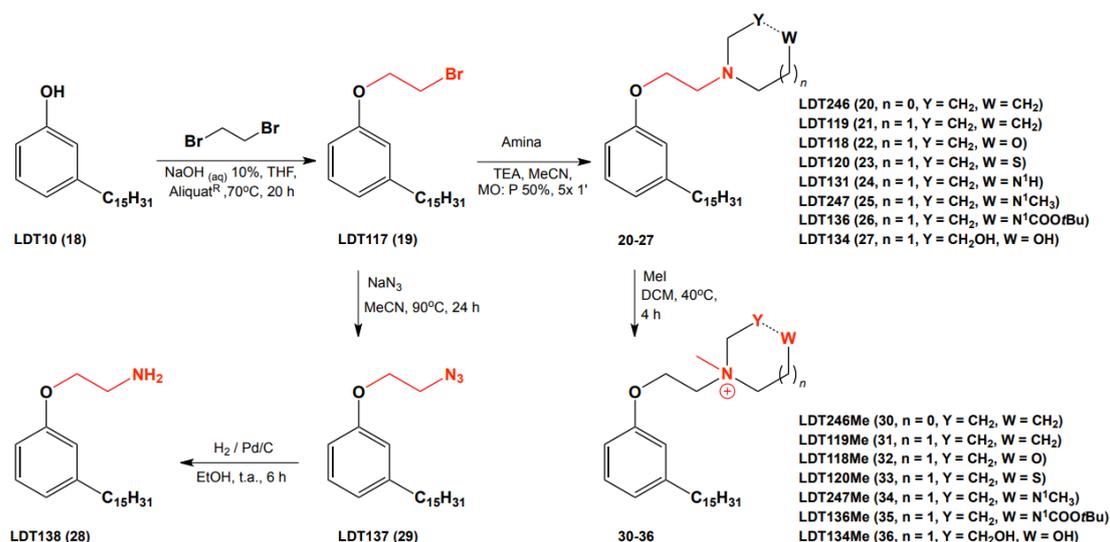
Planejamento Sintético

4. PLANEJAMENTO SINTÉTICO

O planejamento sintético para a obtenção dos derivados-alvo (Esquema 1) compreendeu a exploração de procedimentos clássicos e.g. O-alkilação, substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) e hidrogenação catalítica de acordo com trabalho desenvolvido por Santos [52].

Neste sentido, 3-pentadecilfenol (**18**), adquirido da empresa Sigma-Aldrich, foi submetido à reação com 1,2-dibromoetano para obtenção do intermediário bromado LDT117 (**19**), o qual foi convertido às aminas terciárias **20-27** por reação assistida em forno micro-ondas convencional em acetonitrila. Estas foram submetidas à reação de *N*-metilação com iodeto de metila levando aos respectivos sais *N*-metilamônio 30-36. Para obtenção da amina primária, **19** foi convertido no intermediário azida LDT137 (**29**), o qual foi reduzido à amina-alvo (**28**).

Esquema 1: Metodologia sintética geral para obtenção dos derivados-alvo



Parte Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. GENERALIDADES, MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais em Síntese Orgânica foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas (LADETER) da Universidade Católica de Brasília e no Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LDT) do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília no período de janeiro de 2017 a agosto de 2017.

Os ensaios biológicos - atividade antiproliferativa da *L. amazonensis*, EPR e potencial hemolítico - foram realizados no Laboratório de Biofísica da Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de janeiro a maio de 2018.

Os reagentes e solventes químicos utilizados neste trabalho foram adquiridos das indústrias Sigma-Aldrich® (EUA), Tedia® (EUA) e PanReac (Espanha). Diclorometano (DCM), acetonitrila (MeCN) e trietilamina (TEA) foram previamente tratados com hidreto de cálcio e destilados antes do uso.

As reações – realizadas sob agitação magnética, à temperatura ambiente ou em aquecimento em banho de óleo – foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas (5,0 x 1,5 cm) de sílica Kieselgel 60 F254 suportada em alumínio com espessura de 0,25 mm (SILICYCLE®) visualizadas em lâmpada de UV (254-365 nm), que permitiu o cálculo dos fatores de retenção (Rf). Quando necessário, os produtos foram revelados com solução alcoólica de ninidrina a fim de evidenciar a presença das aminas. Para a purificação dos compostos foi utilizada cromatografia em coluna com fase fixa de gel de sílica G60 (70-230 mesh; 230-400 mesh, SILICYCLE®) bem como por meio do sistema de cromatografia flash em equipamento Isolera Spektra Systems with ACI™ (Biotage®) em cartucho de sílica SNAP 10 g.

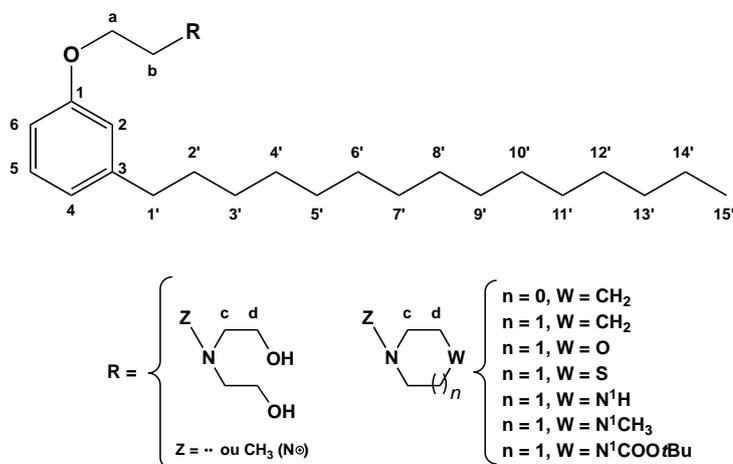
A hidrogenação catalítica foi realizada em aparelho Paar, modelo 3911.

Os solventes foram evaporados à pressão reduzida utilizando evaporador rotatório Tecnal® TE-211, conectado ao sistema de alto-vácuo com pressão variando entre 10 e 0,1 mmHg. Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em aparelho digital de fusão MQAPF302.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H – 300 MHz ou 500 MHz) e carbono-13 (RMN de ^{13}C – 75 MHz ou 125 MHz) foram obtidos em aparelho Bruker Avance DRX300 e DRX500 do Centro Nordestino de Aplicação da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), utilizando CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os valores de deslocamento químico (δ) são referidos em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: simpleto (s); sinal largo (sl); duplete (d); duplo-duplete (dd); tripleto (t); quinteto (qi) e multiplete (m).

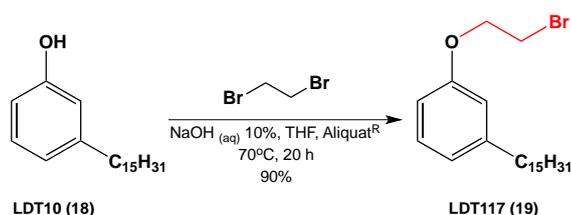
A Figura 12 apresenta as estruturas Markush e numerações padronizadas visando facilitar a análise dos espectros.

Figura 12: Numeração e legendas empregadas nos assinalamentos em RMN de ^1H e de ^{13}C



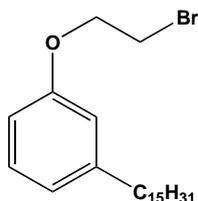
5.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICOS DOS COMPOSTOS

5.2.1. Obtenção do derivado 1-(2-bromoetóxi)-3-pentadecilbenzeno (**19**, LDT117)



A um balão de 125 mL foram adicionados 2,00 g de LDT10 (**18**) (6,57 mmol), solução de hidróxido de sódio 10 % (5,0 mL), 6 gotas de Aliquat® e tetraidrofurano (THF) (3,0 mL). A mistura foi submetida à agitação magnética durante 25 minutos, visando favorecer a formação do íon fenolato, seguida da adição de 4,5 mL de 1,2-dibromoetano (52,54 mmol). A mistura reacional foi submetida a refluxo à 70 °C, sob agitação magnética, por aproximadamente 20 horas. Após este período, foi resfriada em banho de água/gelo e acidificada com de ácido clorídrico a 50 % até atingir pH 1,0. Em seguida a mistura foi extraída com clorofórmio (3 x 20,0 mL) e as frações orgânicas reunidas lavadas com solução salina (20,0 mL) e seca sob sulfato de sódio. O solvente foi evaporado à pressão reduzida e o resíduo purificado em coluna de gel de sílica, eluída com mistura diclorometano-hexano (1:1) fornecendo 1,20 g do derivado LDT117.

1-(2-bromoetóxi)-3-pentadecilbenzeno (**19**, LDT117)



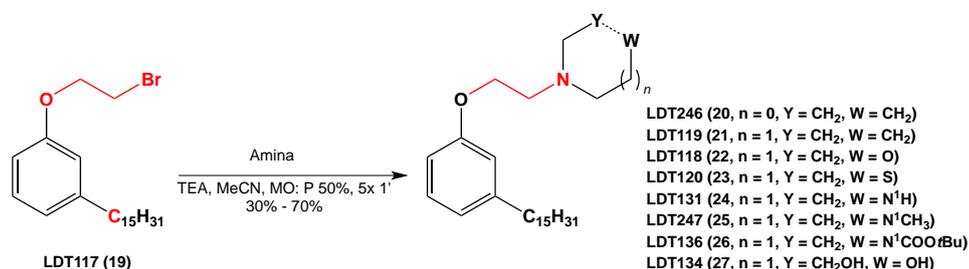
Rendimento: 90 %.
 R_f = 0,8 (CHCl₃:EtOH 10 %).
 Massa molar: 411,459 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₂₃H₃₉BrO;
 p.f.: 34,0-36,0 °C

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,91 (t, *J* = 6,0 Hz, 3H, 15'); 1,28 (sl, 24H, 3'-14'); 1,60 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H, 2'); 2,60 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, 1'); 3,65 (t, *J* = 6,0 Hz,

2H, b); 4,30 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, a); 6,73-6,77 (m, 2H, 2 e 4); 6,83 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 6); 7,20 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, 5).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 14,3 (CH_3 , 15'); 22,9 (CH_2 , 14'); 29,4-29,8 (CH_2 , 3'-12'); 29,9 (CH_2 , b); 31,6 (CH_2 , 2'); 32,2 (CH_2 , 13'); 36,2 (CH_2 , 1'); 68,0 (CH_2 , a); 111,9 (CH, 6); 115,3 (CH, 2); 121,9 (CH, 4); 129,5 (CH, 5); 145,1 (C, 3); 158,3 (C, 1).

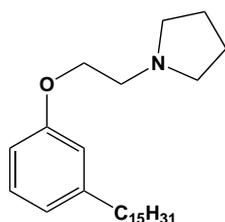
5.2.2. Procedimento Geral para obtenção dos derivados amínicos 20-27



A um tubo reator (Ace pressure tube) foram adicionados 0,35 g de LDT117 (**19**) (0,85 mmol), a respectiva amina (2,04 mmol), trietilamina (2,04 mmol) e acetonitrila (0,3 mL). O sistema reacional foi submetido à radiação micro-ondas em forno doméstico, durante 5 minutos (5 x 1') à potência de 50 %. A mistura foi transferida para coluna cromatográfica de gel de sílica e eluída com mistura clorofórmio-etanol, aumentando o gradiente de etanol de acordo com a polaridade de cada produto, fornecendo os derivados-alvo.

Após purificação e caracterização por métodos espectroscópicos, os derivados-alvo foram transformados nos respectivos cloridratos (sais de amônio) – por meio da geração de ácido clorídrico (HCl) gasoso em aparelho Kipp por gotejamento de ácido sulfúrico concentrado em ácido clorídrico concentrado – em solução das aminas em diclorometano anidro (DCM), visando proteger o nitrogênio da oxidação ao *N*-óxido e favorecer a solubilidade.

1-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)pirrolidina (**20**, LDT246):



Rendimento: 87 %

Óleo amarelo

Rf: 0,4 (CHCl₃:EtOH 15 %);

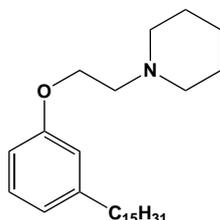
Massa molar de 401,668 g mol⁻¹

Fórmula molecular: C₂₇H₄₇NO

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, 15'); 1,26-1,30 (m, 24H, 3'-14'); 1,60 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H, 2'); 1,83 (sl, 4H, d); 2,57 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, 1'); 2,66 (sl, 4H, c); 2,92 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, b); 4,12 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, a); 6,74 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, 4); 6,76 (s, 1H, 2); 6,77 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, 6); 7,18 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 23,7 (CH₂, d); 29,6-29,9 (CH₂, 3'-12'); 31,6 (CH₂, 2'); 32,1 (CH₂, 13'); 36,2 (CH₂, 1'); 54,9 (CH₂, c); 55,3 (CH₂, b); 66,9 (CH₂, a); 111,6 (CH, 6); 115,1 (CH, 2); 121,2 (CH, 4); 129,3 (CH, 5); 144,8 (C, 3); 159,0 (C, 1).

1-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)piperidina (**21**, LDT119):



Rendimento: 85 %

Óleo amarelo

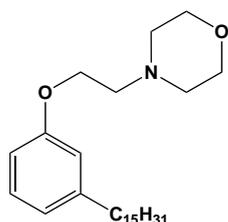
Rf: 0,5 (CHCl₃:EtOH 10 %)

Massa molar: 415,695 g mol⁻¹

Fórmula molecular: C₂₈H₄₉NO

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, 15'); 1,26-1,31 (m, 24H, 3'-14'); 1,46 (sl, 2H, e); 1,62-1,65 (m, 6H, 2' e d); 2,56-2,59 (m, 6H, 1' e c); 2,80 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, b); 4,12 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H, a); 6,73 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 2); 6,75 (s, 1H, 4); 6,77 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, 6); 7,18 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5).

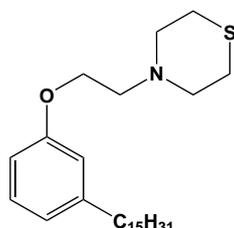
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,2 (CH₃, 15'); 22,7 (CH₂, 14'); 24,2 (CH₂, e); 25,9 (CH₂, d); 29,4-29,6 (CH₂, 3'-12'); 31,4 (CH₂, 2'); 32,0 (CH₂, 13'); 36,1 (CH₂, 1'); 55,1 (CH₂, c); 58,0 (CH₂, b); 65,7 (CH₂, a); 111,5 (CH, 6); 114,9 (CH, 2); 121,0 (CH, 4); 129,1 (CH, 5); 144,6 (C, 3); 158,8 (C, 1).

4-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)morfolina (**22**, LDT118):

Rendimento: 85 %
 Sólido branco
 Rf: 0,6 (CHCl₃:EtOH 10 %)
 Massa molar: 417,668 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₂₇H₄₇NO₂
 p.f.: 35,6-36,4 °C

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, 15'); 1,29-1,31 (m, 24H, 3'-14'); 1,61 (qi, *J* = 6,9 Hz, 2H, 2'); 2,56-2,60 (m, 6H, 1' e c); 2,82 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, b); 3,76 (t, *J* = 4,7 Hz, 4H, d); 4,12 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, a); 6,73 (dd, *J* = 8,2 Hz, *J* = 2,1 Hz, 1H, 2); 6,75 (s, 1H, 4); 6,78 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, 6); 7,19 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5).

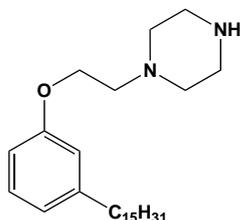
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,2 (CH₃, 15'); 22,7 (CH₂, 14'); 29,4-29,7 (CH₂, 3'-12'); 31,4 (CH₂, 2'); 32,0 (CH₂, 13'); 36,1 (CH₂, 1'); 54,1 (CH₂, c); 57,8 (CH₂, b); 65,6 (CH₂, a); 66,9 (CH₂, d); 111,5 (CH, 6); 114,9 (CH, 2); 121,1 (CH, 4); 129,2 (CH,); 144,7 (C, 3); 158,7 (C, 1).

4-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)tiomorfolina (**23**, LDT120)

Rendimento: 65 %
 Sólido branco
 Rf: 0,6 (CHCl₃:EtOH 5 %);
 Massa molar de 433,733 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₂₇H₄₇NOS;
 p.f.: 43,0-44,7 °C

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H, 15'); 1,27-1,31 (m, 24H, 3'-14'); 1,61 (sl, 2H, 2'); 2,57 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, H1'); 2,72 (sl, 4H, d); 2,87-2,88 (m, 6H, b e c); 4,09-4,10 (m, 2H, a); 6,71-6,74 (m, 2H, 2 e 4); 6,78 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, 6); 7,18 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, H5).

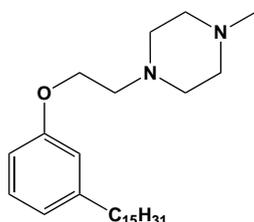
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 28,0 (CH₂, d); 29,5-29,9 (CH₂, 3'-12'); 31,6 (CH₂, 2'); 32,1 (CH₂, 13'); 36,2 (CH₂, 1'); 55,5 (CH₂, c); 58,2 (CH₂, b); 65,7 (CH₂, a); 111,7 (CH, 6); 115,1 (CH, 2); 121,3 (CH, 4); 129,4 (CH, 5); 144,9 (C, 3); 158,8 (C, 1).

4-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)piperazina (**24**, LDT131)

Rendimento: 68 %
 Sólido branco
 Rf: 0,4 (CHCl₃:EtOH 20 %)
 Massa molar: 416,683 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₂₇H₄₈N₂O
 p.f.: 53,8-56,0 °C

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, *J* = 8,8 Hz, 3H, 15'); 1,26 (sl, 24H, 3'-14'); 1,60 (sl, 2H, 2'); 2,56 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 1'); 2,65 (sl, 4H, c); 2,81 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, b); 3,00 (sl, 4H, d); 4,09 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, a); 6,70-6,73 (m, 2H, 2 e 4); 6,77 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, 6); 7,17 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, H5).

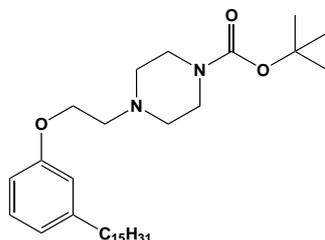
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 29,5-29,9 (CH₂, 3'-12'); 31,5 (CH₂, 2'); 32,1 (CH₂, 13'); 36,2 (CH₂, 1'); 45,6 (CH₂, d); 53,9 (CH₂, c); 57,8 (CH₂, b); 65,9 (CH₂, a); 111,7 (CH, 6); 115,1 (CH, 2); 121,3 (CH, 4); 129,3 (CH, 5); 144,8 (C, 3); 158,9 (C, 1).

1-Metil-4-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)piperazina (**25**, LDT247)

Rendimento: 93 %
 Óleo incolor
 Rf: 0,6 (CHCl₃:EtOH 5 %)
 Massa molar: 430,709 g mol⁻¹
 Fórmula Molecular: C₂₈H₅₀N₂O

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, 15'); 1,25-1,30 (m, 24H, 3'-14'); 1,57 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, 2'); 2,30 (s, 3H, N¹CH₃); 2,40 (sl, 4H, c); 2,56 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, 1'); 2,60 (sl, 4H, d); 2,81 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, b); 4,09 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H, a); 6,71 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 2); 6,74 (s, 1H, 4); 6,76 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, 6); 7,17 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5).

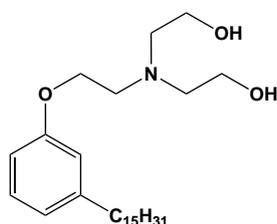
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 29,5-29,9 (CH₂, 3'-12'); 31,6 (CH₂, 2'); 32,1 (CH₂, 13'); 36,2 (CH₂, 1'); 46,2 (CH₃, N¹); 53,7 (CH₂, d); 55,2 (CH₂, c); 57,4 (CH₂, b); 65,9 (CH₂, a); 111,6 (CH, 6); 115,0 (CH, 2); 121,2 (CH, 4); 129,3 (CH, 5); 144,8 (C, 3); 158,9 (C, 1).

4-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)piperazinacarboxilato de *t*-butila (**26**, LDT136)

Rendimento: 85 %
 Sólido branco
 Rf: 0,6 (CHCl₃:EtOH 15 %);
 Massa molar: 516,799 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₃₂H₅₆N₂O₃
 p.f.: 70,7-74,0 °C

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H, 15'); 1,26-1,30 (m, 24H, 3'-14'); 1,47 (s, 9H, *t*-butil); 1,60 (q, *J* = 7,3 Hz, 2H, 2'); 2,55-2,60 (m, 6H, 1' e c); 2,84 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H, b); 3,48 (*J* = 4,8 Hz, 2H, d); 4,12 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, a); 6,73 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, 6); 6,74 (s, 1H, 2); 6,77 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, 6); 7,18 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, 5).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 28,6 (3CH₃, *t*-Butila); 29,6-29,9 (CH₂, 3'-12'); 31,6 (CH₂, 2'); 32,1 (CH₂, 13'); 36,2 (CH₂, 1'); 53,6 (CH₂, c e d); 57,5 (CH₂, b); 65,8 (CH₂, a); 79,9 (C, *Boc*); 111,7 (CH, 6); 115,1 (CH, 2); 121,3 (CH, 4); 129,4 (CH, 5); 144,9 (CH, 3); 154,9 (CO, *Boc*); 158,8 (C, 1).

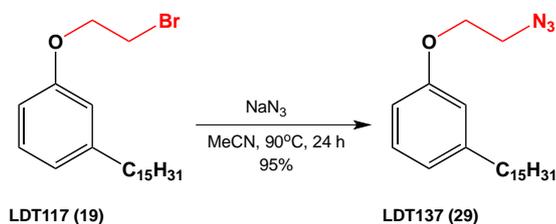
2-(*N*-(2'-hidróxi)etil)-*N*-(2'-(3-pentadecilfenóxi)etil)amino)etanol (**27**, LDT 134)

Rendimento: 98 %
 Sólido branco
 Rf: 0,6 (CHCl₃:EtOH 5 %)
 Massa molar: 435,683 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₂₇H₄₉NO₃
 p.f.: 44,0-45,8 °C

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H, 15'); 1,26-1,31 (m, 24H, 3'-14'); 1,60 (sl, 2H, H2'); 2,56 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, H1'); 2,80 (t, *J* = 4,9 Hz, 4H, b); 2,99 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, c); 3,20 (sl, 2H, OH); 3,65 (t, *J* = 4,9 Hz, 4H, d); 4,05 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, a); 6,72 (d, *J* = 8,6,2 Hz, 1H, 4); 6,73 (s, 1H, 2); 6,79 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, 6); 7,18 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, 5).

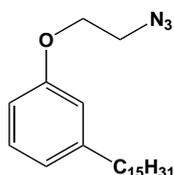
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,3 (CH₃, 15'); 22,8 (CH₂, 14'); 29,5-29,8 (CH₂, 3'-12'); 31,6 (CH₂, 2'); 32,1 (CH₂, 13'); 36,2 (CH₂, 1'); 53,8 (CH₂, b); 57,2 (CH₂, c); 59,9 (CH₂, d); 66,3 (CH₂, a); 111,6 (CH, 6); 115,0 (CH, 2); 121,5 (CH, 4); 129,4 (CH, 5); 145,0 (C, 3); 158,6 (C, 1).

5.2.3 Obtenção do derivado 1-(2-Azidoetóxi)-3-pentadecilbenzeno (**29**, LDT137)



A um balão de 10 mL foram adicionados 1,00 g de LDT117 (**19**) (2,43 mmol), 1,10 g de azida de sódio (16,93 mmol) e acetonitrila (5,0 mL). A reação foi submetida a refluxo em temperatura de 90 °C por 24 horas. Ao final deste tempo, a mistura foi transferida para coluna cromatográfica de gel de sílica e eluída com mistura hexano-diclorometano fornecendo o derivado-alvo.

1-(2-Azidoetóxi)-3-pentadecilbenzeno (**29**, LDT137)

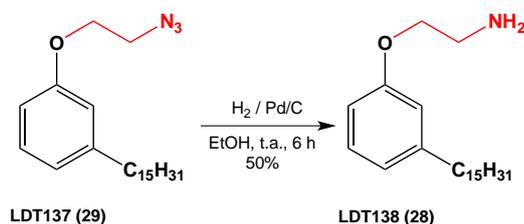


Rendimento: 95 %
 Sólido branco
 Rf: 0,5 (CHCl₃: EtOH 5 %)
 Massa molar: 373,575 g mol⁻¹
 Fórmula Molecular: C₂₃H₃₉N₃
 p.f.: 34,2-36,7 °C

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H, 15'); 1,28-1,32 (m, 24H, 3'-14'); 1,60-1,62 (sl, 2H, 2'); 2,59 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 1'); 3,60 (t, *J* = 4,2 Hz, 2H, b); 4,16 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, a); 6,75 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, 2); 6,77 (s, 1H, 4); 6,82 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, 6); 7,21 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, 5).

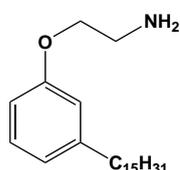
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 29,6-29,9 (CH₂, 3'-12'); 31,6 (CH₂, 2'); 32,2 (CH₂, 13'); 36,2 (CH₂, 1'); 50,5 (CH₂, b); 67,0 (CH₂, a); 111,6 (CH, 6); 115,1 (CH, 2); 121,8 (CH, 4); 129,4 (CH, 5); 145,0 (C, 3); 158,4 (C, 1).

5.2.4. Obtenção do derivado 2-(3-pentadecilfenóxi)etanamina (**28**, LDT138)



A um frasco de hidrogenação catalítica de 250 mL foram adicionados 0,83 g de LDT 137 (2,32 mmol), 0,05 g de carvão paládio e etanol (20,0 mL). O sistema de hidrogenação foi submetido a pressão de 60 psi de hidrogênio em reator Paar à temperatura ambiente por 6 horas. Após esse período a mistura foi filtrada em funil sinterizado e o solvente evaporado à pressão reduzida. O resíduo foi transferido para coluna cromatográfica de gel de sílica, eluída com mistura clorofórmio-etanol, fornecendo o derivado-alvo.

2-(3-pentadecilfenóxi)etanamina (**28**, LDT138)



Rendimento: 50 %

Sólido Branco

Rf: 0,6 (CHCl₃:EtOH 20 %)

Massa molar: 347,578 g mol⁻¹

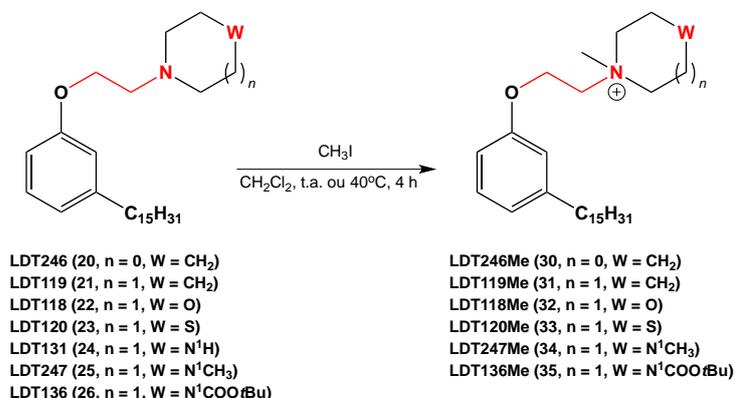
Fórmula molecular: C₂₃H₄₁NO

p.f.: 34,9-37,0 °C

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, 15'); 1,26-1,31 (m, 24H, 3'-14'); 1,61 (qt, *J* = 6,5 Hz, 2H, 2'); 1,90 (sl, NH₂); 2,58 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, 1'); 3,08 (t, *J* = 4,85 Hz, 2H, b); 3,99 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, a); 6,73 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 2); 6,75 (s, 1H, 4); 6,78 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, 6); 7,18 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5).

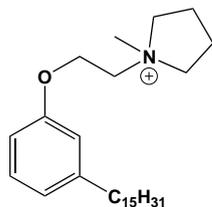
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,1 (CH₃, 15'); 22,7 (CH₂, 14'); 29,4-29,7 (CH₂, 3'-12'); 31,4 (CH₂, 2'); 32,0 (CH₂, 13'); 36,0 (CH₂, 1'); 41,6 (CH₂, b); 69,9 (CH₂, a); 111,5 (CH, 6); 114,9 (CH, 2); 121,1 (CH, 4); 129,2 (CH, 5); 144,8 (C, 3); 158,9 (C, 1).

5.2.5. Procedimento geral de obtenção dos derivados amínicos *N*-metilados 30-35



A um balão de 10 mL foram adicionados 0,10 g (~ 0,024 mmol) da respectiva amina, iodeto de metila (2-3 eqv) e diclorometano anidro (3,0 mL). O sistema reacional permaneceu sob agitação magnética, em refluxo com sistema de aquecimento à 80 °C, acoplado a condensador com resfriamento a -8 °C, por 4 horas. Após este período o solvente foi evaporado à vácuo e o resíduo purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica, eluída com mistura clorofórmio-etanol, fornecendo os respectivos derivado-álvos.

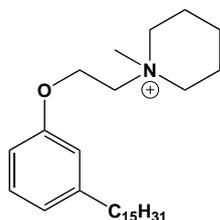
1-Metil-1-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)pirrolidínio (**30**, LDT246Me)



Rendimento: 98 %
 Sólido amarelo
 Rf: 0,4 (CHCl₃:EtOH 20 %)
 Massa molar: 416,702 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₂₈H₅₀NO
 p.f.: 49,6-52,7 °C

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H, 15'); 1,28 (m, 24H, 3'-14'); 1,56 (sl, 2H, 2'); 2,30-2,35 (m, 4H, d); 2,54 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, 1'); 3,39 (s, 3H, NCH₃); 3,88-4,01 (m, 4H, c); 4,25 (sl, 2H, a); 4,44 (sl, 2H, b); 6,71 (s, 1H, 2); 6,72 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, 4); 6,82 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, 6); 7,18 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, 5).

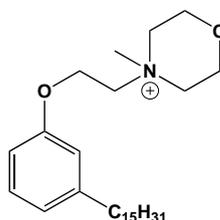
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,2 (CH₃, 15'); 21,8 (CH₂, d); 22,8 (CH₂, 14'); 29,4-29,8 (CH₂, 3'-12'); 31,5 (CH₂, 2'); 32,0 (CH₂, 13'); 36,1 (CH₂, 1'); 49,8 (NCH₃); 62,7 (CH₂, b); 63,0 (CH₂, a); 66,2 (CH₂, c); 111,5 (CH, 6); 114,8 (CH, 2); 122,5 (CH, 4); 129,7 (CH, 5); 145,4 (C, 3); 157,1 (C, 1).

1-Metil-1-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)piperidínio (**31**, LDT119Me)

Rendimento: 98 %
 Sólido amarelo
 Rf: 0,5 (CHCl₃:EtOH 20 %)
 Massa molar: 430,729 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₂₉H₅₂NO
 p.f.: 31,3-32,0 °C

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H, 15'); 1,24-1,29 (m, 24H, 3'-14'); 1,56 (sl, 2H, 2'); 1,83 (sl, 2H, e); 1,99 (s, 4H, d); 2,55 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 1'); 3,48 (s, 3H, NCH₃); 3,79-3,87 (m, 4H, c); 4,26 (sl, 2H, a); 4,46 (sl, 2H, b); 6,71 (s, 1H, 2); 6,72 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, 4); 6,82 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H, 6); 7,19 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, 5).

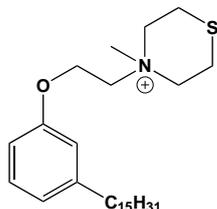
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,2 (CH₃, 15'); 20,4 (CH₂, d); 20,7 (CH₂, e); 22,8 (CH₂, 14'); 29,4-29,8 (CH₂, 3'-12'); 31,5 (CH₂, 2'); 32,0 (CH₂, 13'); 36,1 (CH₂, 1'); 49,8 (NCH₃); 62,0 (CH₂, a e b); 62,7 (CH₂, c); 111,6 (CH, 6); 114,8 (CH, 2); 122,5 (CH, 4); 129,7 (CH, 5); 145,4 (C, 3); 157,1 (C, 1).

4-Metil-4-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)morfolínio (**32**, LDT118Me)

Rendimento: 75 %
 Sólido amarelo
 Rf: 0,4 (CHCl₃:EtOH 20 %)
 Massa molar: 432,702 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₂₈H₅₀NO₂
 p.f.: 69,1-71,6 °C

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H, 15'); 1,24-1,28 (m, 24H, 3'-14'); 1,56 (sl, 2H, 2'); 2,54 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, 1'); 3,66 (s, 3H, NCH₃); 3,83-3,90 (m, 4H, c); 4,12 (m, 4H, d); 4,40 (sl, 2H, a); 4,51 (sl, 2H, b); 6,72 (s, 1H, 2); 6,74 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, 4); 6,82 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, 6); 7,18 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5).

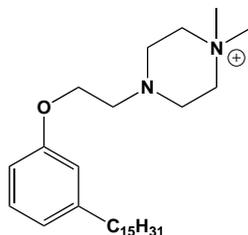
RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,2 (CH₃, 15'); 22,8 (CH₂, 14'); 29,5-29,8 (CH₂, 3'-12'); 31,6 (CH₂, 2'); 32,0 (CH₂, 13'); 36,1 (CH₂, 1'); 49,8 (NCH₃); 60,9 (CH₂, d); 61,4 (CH₂, c); 61,9 (CH₂, b); 63,2 (CH₂, a); 111,6 (CH, 6); 114,9 (CH, 2); 122,6 (CH, 4); 129,7 (CH, 5); 145,4 (C, 3); 157,0 (C, 1).

4-Metil-4-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)tiomorfolínio (**33**, LDT120Me)

Rendimento: 96 %
 Sólido branco
 Rf: 0,5 (CHCl₃:EtOH 20 %)
 Massa molar: 448,767 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₂₈H₅₀NOS
 p.f.: 69,5-70,6 °C

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (t, *J* = 6,0 Hz, 3H, 15'); 1,28 (m, 24H, 3'-14'); 1,57 (sl, 2H, 2'); 2,54 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, 1'); 3,15 (s, 4H, d); 3,69 (s, 3H, NCH₃); 4,04 (sl, 4H, c); 4,35 (sl, 2H, a); 4,50 (sl, 2H, b); 6,72 (s, 1H, 2); 6,75 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 4); 6,82 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, 6); 7,19 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, 5).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,2 (CH₃, 15'); 21,8 (CH₂, d); 22,7 (CH₂, 14'); 29,4-29,7 (CH₂, 3'-12'); 31,5 (CH₂, 2'); 31,9 (CH₂, 13'); 36,0 (CH₂, 1'); 50,4 (NCH₃); 61,8 (CH₂, b); 62,4 (CH₂, a); 62,9 (CH₂, c); 111,5 (CH, 6); 114,9 (CH, 2); 122,5 (CH, 4); 129,6 (CH, 5); 145,3 (C, 3); 156,9 (C, 1).

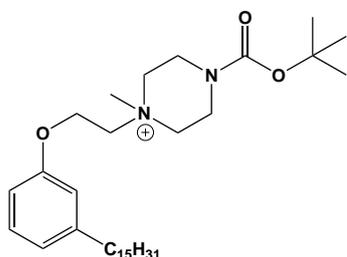
1,1-Dimetil-4-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)piperazínio (**34**, LDT247Me)

Rendimento: 92 %
 Sólido amarelo
 Rf: 0,4 (CHCl₃:EtOH 20 %)
 Massa molar: 445,743 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₃₀H₅₈N₂O
 p.f.: 107,1-108,0 °C

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H, 15'); 1,24 (sl, 24H, 3'-14'); 1,58 (sl, 2H, 2'); 2,55 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 1'); 2,96-3,00 (m, 4H, b e c); 3,56 (s, 6H, N(CH₃)₂); 3,68 (m, 4H, d); 4,07 (sl, 2H, a); 6,69 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, 4); 6,70 (s, 1H, 2); 6,77 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, 6); 7,17 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, 5).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 14,1 (CH₃, 15'); 22,7 (CH₂, 14'); 29,4-29,7 (CH₂, 3'-12'); 31,5 (CH₂, 2'); 31,9 (CH₂, 13'); 36,0 (CH₂, 1'); 47,0 (CH₂, c); 52,3 (N(CH₃)₂); 56,1 (CH₂, b); 62,6 (CH₂, d); 65,9 (CH₂, a); 111,5 (CH, 6); 114,9 (CH, 2); 121,4 (CH, 4); 129,3 (CH, 5); 144,8 (C, 3); 158,4 (C, 1).

4-(*t*-Butóxicarbonil)-1-metil-1-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)piperazínio (35, LDT136Me)

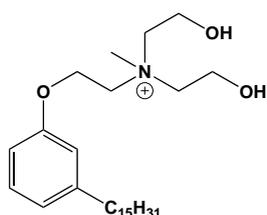


Rendimento: 98 %
 Sólido amarelo
 Rf: 0,4 (CHCl₃:EtOH 20 %)
 Massa molar: 531,833 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₃₃H₅₉N₂O₃
 p.f.: 65,0-66,7 °C

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H, 15'); 1,24-1,29 (m, 24H, 3'-14'); 1,46 (s, 9H, *t*-butil); 1,57 (sl, 2H, 2'); 2,55 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 1'); 3,64 (s, 3H, NCH₃); 3,82 + 3,92-3,94 (sl + m, 8H, c e d); 4,40 (m, 4H, a); 4,52 (sl, 2H, b); 6,72 (s, 1H, 2); 6,74 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, 4); 6,82 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, 6); 7,19 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,2 (CH₃, 15'); 22,8 (CH₂, 14'); 28,4 (3CH₃, *t*-Butila); 29,5-29,8 (CH₂, 3'-12'); 31,6 (CH₂, 2'); 32,0 (CH₂, 13'); 36,1 (CH₂, 1'); 49,2 (NCH₃); 61,4 (CH₂, c e d); 61,9 (CH₂, b); 62,6 (CH₂, a); 82,0 (C, *Boc*); 111,6 (CH, 6); 114,9 (CH, 2); 122,7 (CH, 4); 129,8 (CH, 5); 145,5 (CH, 3); 153,8 (CO, *Boc*); 156,9 (C, 1).

2-Hidróxi-*N*-(2-hidróxi)etil)-*N*-metil-*N*-(2-(3-pentadecilfenóxi)etil)etanamínio (36, LDT134Me)



Rendimento: 74 %
 Sólido branco
 Rf: 0,6 (CHCl₃:EtOH 20 %)
 Massa molar: 450,717 g mol⁻¹
 Fórmula molecular: C₂₆H₄₈NO₃
 p.f.: 30,0 °C

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H, 15'); 1,26 (sl, 24H, 3'-14'); 1,54 (sl, 2H, 2'); 2,51 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 1'); 3,40 (s, 3H, NCH₃); 3,87 (sl, 4H, d); 4,06 (m, 4H, a); 4,40 (sl, 2H, c); 4,51 (sl, 2H, b); 6,74 (s, 1H, 2); 6,75 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, 4 e 6); 7,16 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, 5).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 29,5-29,9 (CH₂, 3'-12'); 31,7 (CH₂, 2'); 32,1 (CH₂, 13'); 36,1 (CH₂, 1'); 51,9 (NCH₃); 56,2

(CH₂, d); 62,3 (CH₂, b); 63,2 (CH₂, a); 65,4 (CH₂, c); 111,9 (CH, 6); 115,3 (CH, 2); 122,4 (CH, 4); 129,7 (CH, 5); 145,3 (C, 3); 157,3 (C, 1).

5.3. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro*

Uma vez sintetizados e caracterizados por RMN, os intermediários e produtos finais foram submetidos a ensaios de atividade antileishmania pelo método MTT e atividade hemolítica. Os que apresentaram melhores resultados foram submetidos à avaliação da modificação da fluidez de membrana pela técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

5.3.1. Ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro* de promastigotas de *L. amazonensis*

O ensaio foi realizado utilizando a cepa de referência da OMS, *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa). O isolado encontra-se estocado, congelado em nitrogênio líquido na forma promastigota procíclica, no Leishbank (Banco de leishmanias do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás – UFG). Os parasitos na forma promastigota foram mantidos a 26 °C em meio de cultura Grace (Sigma-Aldrich), suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). Após o cultivo, os parasitos foram concentrados e a concentração de células foi estimada por meio de contagem realizada em câmara de Neubauer. Os experimentos foram realizados em placa de cultura de 96 poços usando 100 µL de parasitos por amostra na concentração 1×10^7 parasitos/mL e incubação de 24 horas a 26 °C na presença de diferentes concentrações da molécula teste (0 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 20 µg/mL;

50 µg/mL; 100 µg/mL; 400 µg/mL). A miltefosina (**6**) foi utilizada como controle positivo. A viabilidade das células foi determinada por meio da técnica de redução do MTT. As células foram incubadas na presença de MTT (5 mg/mL), por 4 horas. Para solubilizar os cristais de formazan foi adicionado SDS (dodecilsulfato de sódio) a 10% na placa e a leitura da absorbância realizada a 550 nm em um espectrofotômetro de placas (BioTek – Power Wave XS). A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle e a concentração que inibe o crescimento dos parasitos em 50% (CI_{50}) ajustando as respostas das diferentes concentrações das amostras com uma curva sigmoide. Os compostos foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e a miltefosina da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA).

5.3.2. Análise de fluidez de membrana por EPR

Para incorporar o marcador de spin lipídico estearato de 5-doxila (5-DSA, Sigma) nas membranas de promastigotas de *Leishmania amazonensis* um filme da molécula marcada foi preparado no fundo de tubo de ensaio. Uma alíquota de 1 µL de solução estoque de 5-DSA em etanol (4 mg/mL) foi transferida para tubo de vidro, e após a evaporação do solvente, 50 µL da suspensão de parasitos, contendo $1,0 \times 10^8$ células em meio de Grace (Sigma) com ou sem tratamento foi adicionado ao filme da molécula marcada sob agitação suave. Para as medidas de EPR, as amostras foram transferidas para tubos capilares com 1 mm de diâmetro interno que foram selados em chama. Para tratamento das amostras, as promastigotas foram suspensas em 1,6 mL de meio Grace na concentração de $6,25 \times 10^7$ parasitos/mL e nesta acrescidas de 9,6 µL de uma solução do composto dissolvido em etanol na razão de 25 mg/mL. Após 1 h de incubação à temperatura de 26 °C, a amostra foi centrifugada a $18.600 \times g$ por 20 minutos e do sobrenadante foi retirado volume de 1,55 mL. O precipitado foi homogeneizado em volume de 50 µL e feita a marcação de spin como descrito acima.

5.3.3. Avaliação do potencial hemolítico

A coleta sanguínea foi realizada de doador voluntário do laboratório e em seguida o sangue foi lavado e ressuspensão por três vezes em tampão fosfato alcalino (PBS) utilizando-se centrífuga até obter suspensões de eritrócitos a 20 %, 2 %, 0,2 %, 0,05 % e 0,01 %.

As amostras foram diluídas em etanol na concentração de 50 mg/mL; a mitelfosina (**6**), foi solubilizada em PBS a 1,6 mg/mL e, posteriormente, diluída em etanol na concentração de 50 mg/mL

As células foram pipetadas em ependorff com capacidade volumétrica de 1,6 mL e os compostos testados em diluição seriada nas concentrações descritas no quadro abaixo. Como controle positivo foi utilizado água destilada e como controle negativo foi utilizada a mesma quantidade de PBS que as amostras testes. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente (26 ± 2 °C), as placas foram centrifugadas (2700 rpm / 4 °C / 4 min) e o sobrenadante analisado em espectrofotômetro de placa a 540 nm para quantificação da hemoglobina liberada (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações utilizadas dos derivados e dos hematócitos na avaliação do potencial hemolítico

Hematócrito %	20 %	2 %	0,2 %	0,05 %	0,01 %
	800	80	10	5	5
	400	40	5	2,5	2,5
	200	20	2,5	1,25	1,25
Concentração (µg/mL)	100	10	1,25	0,625	0,625
	50	5	0,625	0,3125	0,3125
	25	2,5	0,3125	0,15625	0,15625
	12,5	1,25	0,15625	0,078125	0,078125
	6,25	0,625	0,078125	0,0380625	0,0380625
Controle Negativo	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
Controle Positivo	Água Destilada				

5.3.4. Análise Estatística

Todos os dados estão apresentados como a média \pm D.P. de pelo menos três experimentos independentes. As médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi utilizado para identificar diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias dos diferentes tratamentos.

Resultados e Discussão

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

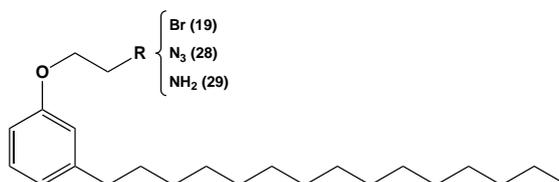
6.1.1. Obtenção dos derivados LDT117 (**19**), LDT137 (**28**) e LDT138 (**29**)

O intermediário LDT117 (**19**) foi obtido em rendimento de 90 % pela reação do fenol **18** com 1,2-dibromoetano na presença de solução de NaOH a 10 %, THF e Aliquat®. O espectro de RMN de ^1H de **19** apresenta dois tripletos em 3,65 ppm (**b**) e 4,30 ppm (**a**) referentes aos grupos metilênicos ligados aos átomos de bromo e oxigênio, respectivamente. Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^{13}C em 29,9 ppm (**b**) e 68,0 ppm (**a**) indicaram tratar-se de carbonos metilênicos (p.70).

O intermediário **19** foi convertido à azida LDT137 (**29**) em rendimento de 95 % explorando a substituição do bromo pela azida em acetonitrila sob refluxo a 90° C por 24 horas. Os grupos metilênicos de **29** foram caracterizados como tripletos em 3,60 ppm (**b**) e 4,16 ppm (**a**) em RMN de ^1H (p.120) e confirmados em 50,5 ppm (**b**) e 67,0 ppm (**a**) em RMN de ^{13}C (p. 123 – 125).

O derivado **29** foi reduzido à amina primária LDT138 (**28**) em hidrogenador Paar em rendimento de 50 %. Dados físico-químicos e de rendimento para os derivados LDT117 (**19**), LDT138 (**28**) e LDT137 (**29**) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados de caracterização dos derivados LDT117 (**19**), LDT137 (**28**) e LDT138 (**29**)



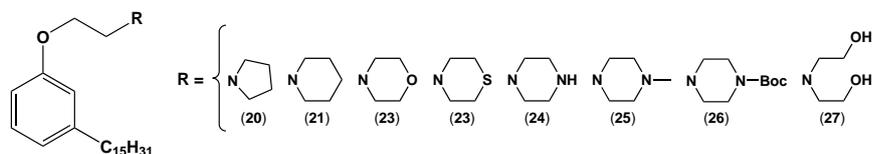
Derivado	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C)	Fator de Retenção	Massa Molar (g mol ⁻¹)
LDT117 (19)	90	34,0-36,0	0,8 ^b	411,459
LDT138 (28)	50%	34,9-37,0	0,6 ^c	347,578
LDT137 (29)	95%	32,2-36,7	0,5 ^a	373,575

a. CHCl₃:EtOH 5 %; b. CHCl₃:EtOH 10 %; c. CHCl₃:EtOH 20 %;

6.1.2. Obtenção dos derivados amínicos **20-27**

As aminas terciárias β-fenoxissubstituídas foram obtidas a partir do intermediário LDT117 (**19**) na presença de TEA e acetonitrila em tubo de pressão ACE sob radiação micro-ondas em forno doméstico à 50 % da potência (~ 450 W) e tempo de 5 minutos (5 x 1') evidenciadas por CCD como único produto com R_f menor que o **19** pela adição das aminas polares.

Os compostos derivados de aminas cíclicas LDT246 (**20**, pirrolidina), LDT119 (**21**, piperidina), LDT118 (**22**, morfolina), LDT120 (**23**, tiomorfolina), LDT131 (**24**, piperazina), LDT247 (**25**, metilpiperazina), LDT136 (**26**, Boc-piperazina) e o derivado acíclico LDT134 (**27**, dietanolamina) foram obtidos como óleos ou sólidos em rendimentos que variaram de 65 % a 98 %. Os dados físico-químicos e rendimentos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados de caracterização dos derivados amínicos terciários **20-27**

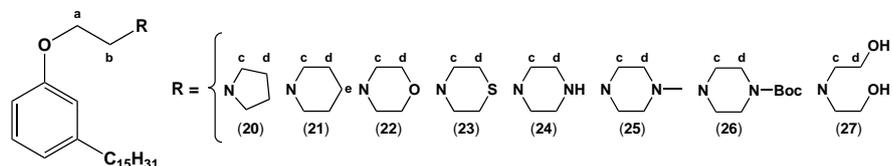
Derivado	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)	Fator de retenção	Massa Molar (g mol ⁻¹)
LDT246 (20)	87	--	0,4 ^c	401,668
LDT119 (21)	85	--	0,5 ^b	415,695
LDT118 (22)	85	35,6-36,4	0,6 ^b	417,668
LDT120 (23)	65	43,0-44,7	0,6 ^a	433,733
LDT131 (24)	68	53,8-56,0	0,4 ^d	416,683
LDT247 (25)	93	--	0,6 ^a	430,709
LDT136 (26)	85	70,7-74,0	0,6 ^c	516,799
LDT134 (27)	98	44,0-45,8	0,6 ^a	435,683

a. CHCl₃:EtOH 5 %; b. CHCl₃:EtOH 10 %; c. CHCl₃:EtOH 15 %; d. CHCl₃:EtOH 20 %;

Os derivados-alvo foram imediatamente transformados em seus respectivos cloridratos, visando evitar a oxidação do nitrogênio a *N*-óxido bem como aumentar a solubilidade para execução dos testes *in vitro* em meio aquoso.

Os derivados **20-27** foram caracterizados por RMN de ¹H e de ¹³C. Os assinalamentos dos grupos metilênicos da subunidade aminoetilenoxila (**a** e **b**) bem como das aminas (**c**, **d** e **e**) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Principais assinalamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C dos derivados LDT246 (**20**), LDT119 (**21**), LDT118 (**22**), LDT120 (**23**), LDT131 (**24**), LDT247 (**25**), LDT136 (**26**) e LDT134 (**27**)



RMN	Derivados	RMN de ^1H / RMN de ^{13}C (ppm, CDCl_3)				
		a	b	c	d	e
^1H	20	4,12	2,92	2,66	1,83	--
^{13}C		66,9	55,3	54,9	23,7	--
^1H	21	4,12	2,80	2,56-2,59	1,62-1,65	1,46
^{13}C		65,7	58,0	55,1	25,9	24,2
^1H	22	4,12	2,82	2,56-2,60	3,76	--
^{13}C		65,6	57,8	54,1	66,9	--
^1H	23	4,09-4,10	2,87-2,88	2,87-2,88	2,72	--
^{13}C		65,7	58,2	55,5	28,0	--
^1H	24	4,09	2,81	2,65	3,00	--
^{13}C		65,9	57,8	53,9	45,6	--
^1H	25	4,09	2,81	2,40	2,60	--
^{13}C		65,9	57,4	55,2	53,7	--
^1H	26	4,12	2,84	2,55-2,60	3,48	--
^{13}C		65,8	57,5	53,6	53,6	--
^1H	27	4,05	2,80	2,99	3,65	--
^{13}C		66,3	53,8	57,2	59,9	--

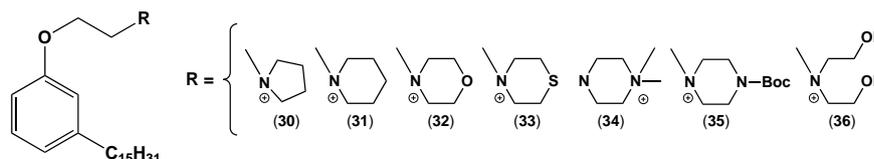
Para o derivado LDT247 (**25**), o grupo N^1 -metila foi assinalado em 2,30 ppm (RMN de ^1H) e 46,2 ppm (RMN de ^{13}C); enquanto o *t*-butilcarbamato (Boc) no derivado LDT136 (**26**) foi caracterizado pelos deslocamentos químicos em 1,47 ppm (RMN de ^1H) e 28,6 ppm e 79,9 ppm (RMN de ^{13}C) para o grupo *t*-butila bem como 154,9 ppm para a carbonila.

6.1.3. Obtenção dos derivados amínicos **30-36**

Os derivados amínicos **20-27** foram submetidos à reação de *N*-metilação com excesso de iodeto de metila (2-3 eqv), à temperatura ambiente ou sob refluxo com diclorometano, visando a obtenção do sal de amônio

quaternário. O excesso de iodeto de metila e o solvente foram evaporados à pressão reduzida levando aos derivados alvos em rendimentos que variaram de 74 % a 98 %. Os dados físico-químicos e rendimentos para **30-36** estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Dados de caracterização dos derivados amônio quaternários **30-36**



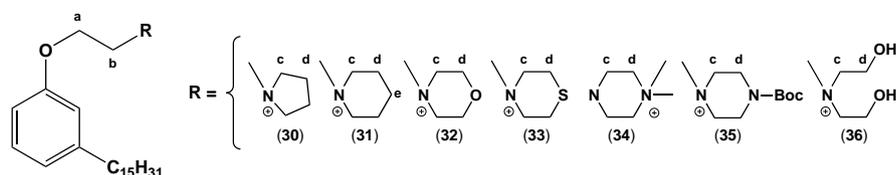
Derivado	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)	Fator de retenção	Massa Molar (g mol ⁻¹)
LDT246Me (30)	98	49,6-52,7	0,4 ^a	416,702
LDT119Me (31)	98	31,3-32,0	0,5 ^a	430,729
LDT118Me (32)	75	69,1-71,6	0,4 ^a	432,702
LDT120Me (33)	96	69,5-70,6	0,5 ^a	448,767
LDT247Me (34)	93	107,1-108,0	0,4 ^a	445,743
LDT136Me (35)	98	65,0-66,7	0,4 ^a	531,833
LDT134Me (36)	74	30,0	0,6 ^a	450,717

a. CHCl₃:EtOH 20 %;

A *N*-metilação das aminas foi evidenciada pela presença de simpletos entre 3,39 ppm a 3,89 ppm em RMN de ¹H (**30**, p.132) corroborados pelos deslocamentos químicos entre 49,2 ppm (**35**, p. 170) a 52,3 ppm (**34**, p. 166) em RMN de ¹³C. De maneira geral, a presença do cátion sobre o nitrogênio levou à desproteção dos metilenos **b** e **c** com alteração dos deslocamentos químicos para campo baixo observados tanto para ¹H quanto para ¹³C; enquanto os metilenos **a** e **d** foram desprotegidos para os núcleos de hidrogênio e protegidos para os núcleos de carbono 13. Vale destacar que a *N*-metilação do derivado metilpiperazínico LDT247 (**25**) ocorreu no nitrogênio 1, ligado aos metilenos **d** e à metila, e não no nitrogênio 4 ligado aos metilenos **b** e **c** como observado no derivado LDT247Me (**34**). A análise dos espectros de RMN 1H permitiu identificar os grupos metila – original e adicionado – em

3,56 ppm (RMN de ^1H) e 52,3 ppm (RMN de ^{13}C) bem como a observação da manutenção dos deslocamentos químicos para os metilenos **a** e **b** quando comparados a **25**. Os metilenos **c** apresentaram desproteção para ^1H e proteção para ^{13}C diferentemente dos metilenos **d** que foram desprotegidos para ambos os núcleos. Os assinalamentos dos grupos metilenos da subunidade aminoetilenoxila (**a** e **b**), as aminas (**c**, **d** e **e**) e o grupo *N*-metila (*N*-Me) estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Principais assinalamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C dos derivados LDT246Me (**30**), LDT119Me (**31**), LDT118Me (**32**), LDT120Me (**33**), LDT247Me (**34**), LDT136Me (**35**) e LDT134Me (**36**)



RMN	Derivados	RMN de ^1H / RMN de ^{13}C (ppm, CDCl_3)					
		a	b	c	d	e	<i>N</i> -Me
^1H	30	4,25	4,44	3,88-4,01	2,30-2,35	--	3,39
^{13}C		63,0	62,7	66,2	21,8	--	49,8
^1H	31	4,26	4,46	3,79-3,87	1,99	1,83	3,48
^{13}C		62,0	62,0	62,7	20,4	20,7	49,8
^1H	32	4,40	4,51	3,83-3,90	4,12	--	3,66
^{13}C		63,2	61,9	61,4	60,9	--	49,8
^1H	33	4,35	4,50	4,04	3,15	--	3,69
^{13}C		62,4	61,8	62,9	21,8	--	50,4
^1H	34	4,07	2,96-3,00	2,96-3,00	3,68	--	3,56
^{13}C		65,9	56,1	47,0	62,6	--	52,3
^1H	35	4,40	4,52	3,92-3,94	3,92-3,94	--	3,64
^{13}C		62,6	61,9	61,4	61,4	--	49,2
^1H	36	4,06	4,51	4,40	3,87	--	3,40
^{13}C		63,2	62,3	65,4	56,2	--	51,9

6.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro*

Uma vez sintetizados e caracterizados por métodos espectroscópicos, os derivados, transformados nos seus respectivos cloridratos, foram submetidos a ensaios biológicos *in vitro* de atividade antiproliferativa das formas promastigotas (CI_{50}), potencial hemolítico e de fluidez da membrana plasmática por EPR realizados no Laboratório de Biofísica da Universidade Federal do Goiás.

6.2.1 Atividade antiproliferativa frente a *L. amazonensis*

A atividade antiproliferativa frente a promastigotas de *L. amazonensis* foi determinada pelo método MTT levando em consideração valor acima da CI_{50} de agentes antileishmanias conhecidos. Este método baseia-se na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais em converter o sal tretazólio (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em composto púrpura insolúvel denominado formazan, que ao ser solubilizado em SDS permite a quantificação do número de células viáveis de forma indireta, por meio da absorbância em 550 nm. A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle negativo e a concentração que inibe o crescimento dos parasitos em 50% (CI_{50}), ajustada às respostas das diferentes concentrações das amostras em curva sigmoide. Os experimentos foram realizados em triplicata, em nove concentrações estabelecidas por diluição seriada, e concentração final igual a 1100 μ M. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. CI_{50} dos derivados-alvo frente à *L. amazonensis*

Derivados	CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CI_{50} (μM)
Intermediários		
LDT10 (18)	50,8 ± 1,9	166,8 ± 6,2
LDT117 (19)	400,0*	>972,2*
LDT137 (29)	400,0*	>1070,7*
Amínicos		
LDT246 (20)	15,6 ± 5,1	38,8 ± 12,7
LDT119 (21)	20,7 ± 7,0	49,8 ± 16,8
LDT118 (22)	172,4 ± 37,1	412,8 ± 88,8
LDT120 (23)	271,0 ± 54,0	624,8 ± 124,5
LDT131 (24)	20,0 ± 0,8	48,0 ± 1,9
LDT247 (25)	19,6 ± 2,8	45,5 ± 6,5
LDT136 (26)	21,3 ± 2,8	41,2 ± 5,4
LDT134 (27)	10,9 ± 1,6	25,0 ± 3,7
LDT138 (28)	5,0 ± 0,4	14,4 ± 1,2
N-Metilamônicos		
LDT246Me (30)	4,2 ± 1,0	10,1 ± 2,4
LDT119Me (31)	2,9 ± 0,2	6,7 ± 0,5
LDT118Me (32)	12,6 ± 3,2	29,1 ± 7,4
LDT120Me (33)	8,0 ± 1,0	17,83 ± 2,2
LDT247Me (34)	27,9 ± 5,6	62,6 ± 12,6
LDT136Me (35)	5,5 ± 1,9	10,3 ± 0,8
LDT134Me (36)	16,0 ± 4,3	35,5 ± 9,5
Miltefosina (6)	5,7 ± 0,9	14,0 ± 2,2

*sem atividade inibitória na concentração máxima do experimento

6.2.2 Atividade antiproliferativa dos intermediários não amínicos

A análise dos resultados frente a *L. amazonensis* revelou que os intermediários neutros haloaquila **19** e azido **29** não apresentaram atividade antiproliferativa significativa. Por sua vez, o também derivado neutro LDT10 (**18**) apresentou melhor perfil de atividade que **19** e **29**; porém 11,9 vezes menor que a da miltefosina (**6**). A atividade antiproliferativa de **18** sugere a participação da hidroxila fenólica – responsável pelo perfil de atividade

biológica dos cardanois – uma vez que a haloalquilação do fenol leva ao composto LDT117 (**19**) com diminuição do perfil.

6.2.3 Atividade antiproliferativa e REA dos derivados amínicos **20-28**

Para as aminas **20-28** – que foram transformadas em cloridratos – os resultados mostraram que as atividades dos derivados acíclicos LDT138 (**28**) e LDT134 (**27**) foram melhores que as aminas cíclicas **20-26**. Neste sentido, **28** foi equipotente a **6**; enquanto **27** exibiu Cl_{50} 1,8 vez menor. Para as aminas heterocíclicas, os derivados pirrolidínico LDT246 (**20**), piperidínico LDT119 (**21**), e piperazínicos (**24-26**) mostraram perfis de atividade semelhantes; enquanto o derivado morfolínico (**22**) e seu bioisótero tiomorfolínico (**23**) apresentaram as menores atividades – 10,6 e 16,1 vezes com relação ao derivado **20**.

Ainda que as diferenças de perfil de atividade sejam pequenas para a maioria dos compostos avaliados, as discussões sobre as relações estrutura-atividade de ensaios fenotípicos busca compreender a influência de atributos na racionalização dos resultados sem conceber alvos macromoleculares.

Estruturalmente, quando comparados entre si, as *N*-adições dos grupos hidroxietila (CH_2CH_2OH) ao derivado **28**, gerando o derivado **27**, diminuiu ligeiramente a atividade sugerindo que grupos doadores (DLH) e aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) são tolerados na estrutura molecular. Considerando os derivados cíclicos, a homologação do derivado **20** ao **21** diminuiu a atividade (1,3 vez) sugerindo que o aumento da liberdade conformacional e contribuição hidrofóbica são tolerados. Quanto aos bioisóteros divalentes, a troca bioisostérica do grupo metileno de **21** pelo oxigênio em **22** levou à diminuição da atividade e apontou para a restrição de grupos ALH ou dipolos negativos naquela região do heterocíclico. Por sua vez a presença do enxofre no bioisótero **23** foi ainda mais deletéria para a atividade. A característica hidrofóbica do **23** pode apresentar interações semelhantes ao derivado **21** pela presença de dipolos transientes e induzidos

apolares; entretanto o átomo de enxofre, presente em **23**, tende a interagir com átomos de enxofre de aminoácidos como cisteína e metionina encontrados nas proteínas de membrana do parasito. Adicionalmente, quando expostos ao meio biológico, há possibilidade de oxidação do enxofre a seus metabólitos oxidados como sulfóxido ou sulfona, o que levaria à presença de dipolo negativo, como o encontrado no derivado **22**, e portanto deletério para a atividade.

Com relação aos derivados piperazínicos – piperazina (**24**), 1-metilpiperazina (**25**) e 1-*boc*piperazina (**26**) – o padrão de substituição no nitrogênio 1 (metil ou *boc*) do anel piperazínico não alterou o perfil de atividade quando comparado ao derivado não substituído **24**. Vale destacar que para **24** e **26** a protonação – tanto na formação do cloridrato quanto pelo pH do meio do ensaio – ocorre no nitrogênio 4; diferente de **25** que ocorre no nitrogênio 1. Esta diferença de sítios de protonação também não parece interferir na equipotência dos compostos.

6.2.4 Atividade antiproliferativa e REA dos derivados catiônicos **30-36**

Quatro das sete aminas catiônicas avaliadas – LDT246Me (**30**), LDT119Me (**31**), LDT120Me (**33**) e LDT136Me (**35**) – apresentaram atividade superior ou similar à miltefosina (**6**); enquanto os derivados acíclico LDT134Me (**36**) e cíclicos LDT118Me (**32**) e LDT247Me (**34**) exibiram perfis de atividade de 2 a 4,5 vezes inferiores ao controle positivo.

Os resultados revelaram que LDT119Me (**31**), homólogo superior do derivado LDT246Me (**30**) pela adição de grupo metileno, foi ligeiramente mais ativo que **30** demonstrando a relevância de contribuições hidrofóbicas. A comparação entre **31** e LDT136Me (**35**), que apresenta grupo *Boc* hidrofílico com grupos ALH e perfil similar a **30**, sugere que os compostos interagem em região de reconhecimento biofórico; ou seja, que reconhece subunidades hidrofóbicas e hidrofílicas. A menor atividade observada para LDT118Me (**32**), que também possui grupo ALH, destaca a diferença no reconhecimento

molecular destes dipolos negativos. Neste sentido, o átomo de oxigênio de **32** está conformacionalmente restrito no ciclo de 6 membros, onde pode realizar interação íon-dipolo com o cátion de nitrogênio. Já em **36**, o melhor ALH – a carbonila do carbamato – está conformacionalmente mais livre, mas com menor possibilidade de interagir com o nitrogênio catiônico pelo impedimento estérico. Para o sulfoderivado LDT120Me (**33**) há possibilidades de contribuições hidrofóbicas – favoráveis como vista em **31** – ou dipolares caso o átomo de enxofre seja oxidado como abordado anteriormente. Por fim, o resultado para o derivado LDT247Me (**34**) indica que a presença do cátion no nitrogênio 1 é deletéria para a atividade.

6.2.5 Comparação entre os derivados amínicos **20-26** e catiônicos **30-36**

De maneira geral, excetuando-se os compostos LDT247Me (**34**) e LDT134Me (**36**), os derivados catiônicos apresentaram melhor perfil antiproliferativo que os derivados amínicos na forma de cloridratos. Quando comparados à miltefosina (**6**), os derivados LDT119Me (**31**), LDT246Me (**30**) e LDT136Me (**35**) apresentaram atividade antiproliferativa superior, enquanto LDT138 (**28**) similar.

Estes resultados apontam para provável efeito anfifílico facial em face da contribuição da carga positiva para as atividades observadas. A carga positiva originada pela adição do grupo metila ao nitrogênio é permanente e não varia com o pH do meio. Pelo contrário, as aminas submetidas à ionização aos cloridratos, pelo borbulhamento de ácido clorídrico gasoso, são dependentes do pK_{aH} da amina (ácido conjugado) que sofre influência do pH do meio. Neste contexto, aminas com pK_{aH} 7,4 apresentarão 50 % das duas espécies possíveis em pH 7,4: neutra e catiônica. Desta forma, o estabelecimento de relações estrutura-atividade mais detalhadas quanto à contribuição do nitrogênio catiônico para o perfil de atividade depende da obtenção de dados experimentais de pK_{aH} para cada composto.

6.2.6 Potencial hemolítico

Todos derivados foram avaliados quanto ao atividade potencial hemolítico em teste espectrofotométrico. O experimento foi realizado em triplicata com variação na concentrações dos compostos-alvo por diluição seriada bem como quanto ao percentual de hematócrito. A concentração final foi próxima de 2200 μM tendo como parâmetro valor de HEM_{50} superior ao encontrado em agentes antileishmania (Tabela 9).

Tabela 9: Concentração dos compostos necessária para causar 50% de hemólise (HEM_{50}) após 2 h de incubação na suspensão de eritrócito a 2% de hematócrito

Derivados	HEM_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	HEM_{50} (μM)
Intermediários		
LDT10 (18)	>1000	>3284,0*
LDT117 (19)	>1000	>2430,4*
LDT137 (29)	>1000	>2676,8*
Amínicos		
LDT246 (20)	>1000	>2489,6*
LDT119 (21)	681,0 \pm 79,0	1638,2 \pm 190,0
LDT118 (22)	>1000	>2394,2*
LDT120 (23)	>1000	>2305,6*
LDT131 (24)	488,0 \pm 142,0	1171,2 \pm 340,8
LDT247 (25)	128,0 \pm 44,0	297,2 \pm 102,2
LDT136 (26)	481,0 \pm 151,0	930,7 \pm 292,2
LDT134 (27)	>1000	>2295,2*
LDT138 (28)	374,0 \pm 37,0	1076,0 \pm 106,5
N-Metilamônicos		
LDT246Me (30)	11,0 \pm 4,0	26,0 \pm 9,6
LDT119Me (31)	99,0 \pm 28,0	229,8 \pm 65,0
LDT118Me (32)	33,0 \pm 8,0	76,3 \pm 18,5
LDT120Me (33)	41,0 \pm 17,0	91,4 \pm 37,8
LDT247Me (34)	55,0 \pm 6,0	123,4 \pm 13,5
LDT136Me (35)	12,0 \pm 3,0	22,6 \pm 5,6
LDT134Me (36)	57,0 \pm 6,0	126,5 \pm 13,3
Miltefosina (6)	21,0 \pm 3,0	51,5 \pm 7,4

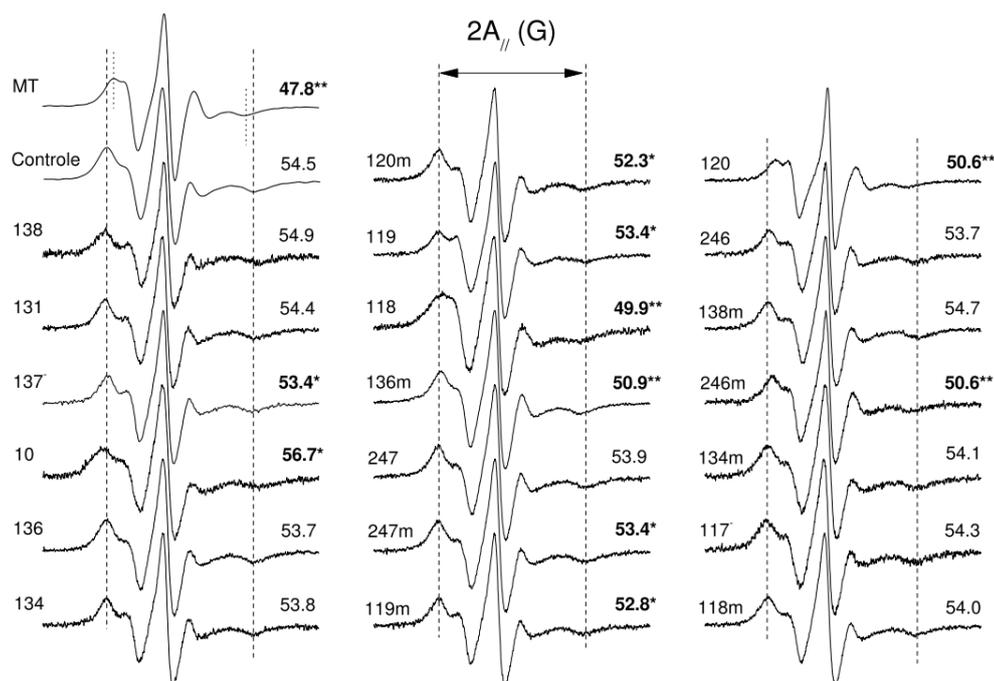
*sem atividade inibitória na concentração máxima do experimento

Os compostos intermediários e derivados amínicos apresentaram valores de HEM_{50} que variaram de 2,7 a 3,3 mM – 52 vezes menos hemolíticos que a miltefosina. Este resultado corrobora a necessidade do grupo catiônico para a interação com a membrana por meio do carácter anfifílico presente na miltefosina. Por sua vez, a maioria dos derivados amínicos apresentou HEM_{50} entre de 1,1 a 2,5 mM, com exceção de LDT247 (**25**) e LDT136 (**26**) que apresentaram valores submilimolar de 297,2 μ M e 930,7 μ M, respectivamente. Neste sentido, como anteriormente abordado, a presença de espécies protonadas (catiônicas) dependerá dos valores de pK_{aH} de cada amina no pH do experimento, o que modulará os perfis de hemólise. Já os derivados catiônicos *N*-metilamínicos **30-36** exibiram perfis de hemólise cujo HEM_{50} variou entre 22,6 μ M a 229,8 μ M. Neste contexto, os derivados LDT246Me (**30**) e LDT136Me (**35**) apresentaram atividade hemolítica maior que a miltefosina (**6**); enquanto LDT118Me (**32**) e LDT120Me (**33**) exibiram perfil similar e LDT119Me (**31**), LDT247Me (**34**) e LDT134Me (**36**) foram os menos hemolíticos.

6.2.7 Análise da fluidez da membrana

Os derivados foram avaliados quanto à fluidez da membrana por meio do EPR utilizando o marcador de spin 5-DSA incorporado em membrana de promastigotas de *L. amazonensis* sem tratamento (controle negativo), tratadas com a miltefosina (controle positivo) e com os derivados amínicos. Fornecendo os dados presentes na Figura **13**.

Figura 13: Espectros de EPR do marcador de spin 5-DSA incorporado em membrana de promastigotas de *L. amazonensis* sem tratamento e tratados com derivados LDT, tendo Miltefosina (6, MT) como controle positivo



O parâmetro espectral de EPR, $2A_{//}$, desdobramento hiperfino máximo, medido conforme indicado na Figura 17, é a separação em unidade de campo magnético (G, gauss) entre o primeiro pico de ressonância e o último pico invertido no espectro. As linhas verticais foram adicionadas para ajudar na visualização das posições dos picos. As intensidades dos espectros (unidades arbitrárias) foram normalizadas para a mesma intensidade de pico central. Do início ao fim de cada espectro há variação de campo magnético de 100 G. Os valores do $2A_{//}$ medidos estão indicados no final dos espectros; os valores indicados com asterisco diferem do controle por mais de 0,8 G (erro experimental estimado), indicando pequeno aumento de fluidez de membrana, enquanto os indicados com dois asteriscos mostram grande aumento de fluidez semelhante à miltefosina (6).

Os derivados LDT118 (22), LDT120 (23), LDT136Me (35) e LDT246Me (30) apresentaram maior capacidade de interferir na fluidez da membrana, deixando-a mais fluida e, conseqüentemente, favorecendo a *lise* celular.

Porém, o tratamento com o cardanol saturado (**18**) resultou em maior rigidez da membrana citoplasmática, o que desfavorece a *lise* celular e contribui para maior proliferação do parasito. A Tabela 10 apresenta comparação do potencial hemolítico com a alteração de fluidez na membrana de promastigotas de *L. amazonenses* e destaca que LDT118 (**22**) e LDT120 (**23**) aumentaram a fluidez da membrana próximos ao perfil da miltefosina sem apresentar hemólise.

Tabela 10: Comparação do potencial hemolítico com a alteração de fluidez na membrana de promastigotas de *L. amazonensis*

Amostra	HEM ₅₀	EPR	
	(μ M)	2A/ (G)	Varição relativa ao controle
Miltefosina (6)	51,5 \pm 7,4	47,8	-6,7
LDT118 (22)	>2394,2*	49,9	-4,6
LDT120 (23)	>2305,6*	50,6	-3,9
LDT246Me (30)	26,0 \pm 9,6	50,6	-3,9
LDT136Me (35)	22,6 \pm 5,6	50,9	-3,6
LDT120Me (33)	91,4 \pm 37,8	52,3	-2,2
LDT119Me (31)	229,8 \pm 65,0	52,8	-1,7
LDT137 (29)	>2676,8*	53,4	-1,1
LDT119 (21)	1638,2 \pm 190,0	53,4	-1,1
LDT247Me (34)	297,2 \pm 102,2	53,4	-1,1
LDT136 (26)	930,7 \pm 292,2	53,7	-0,8
LDT246 (20)	>2489,6*	53,7	-0,8
LDT134 (27)	>2295,2*	53,8	-0,7
LDT247 (25)	297,2 \pm 102,2	53,9	-0,6
LDT118Me (32)	76,3 \pm 18,5	54,0	-0,5
LDT134Me (36)	126,5 \pm 13,3	54,1	-0,4
LDT117 (19)	>2430,4*	54,3	-0,2
LDT131 (24)	1171,2 \pm 340,8	54,4	-0,1
LDT138 (28)	1076,0 \pm 106,5	54,9	0,4
LDT10 (18)	>3284,0*	56,7	2,2

*sem atividade inibitória na concentração máxima do experimento

Conclusões e Perspectivas

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1. Conclusões

Este trabalho compreendeu estudos referentes à síntese e caracterização de novos derivados amínicos, protonáveis e *N*-metilcatiônicos, planejados racionalmente a partir do cardanol saturado e avaliações quanto a atividade antiproliferativa frente à forma promastigota de *L. amazonensis*, ao potencial hemolítico e análise de fluidez da membrana do parasito.

As metodologias sintéticas mostraram-se eficazes para a obtenção dos derivados a partir do cardanol saturado comercial (LDT10, **18**), as quais compreenderam procedimentos clássicos de conversão de grupos funcionais, tais como *O*-haloalquilação com 1,2-dibromoetano, azidação, aminação e *N*-alquilação, estas últimas explorando reações de substituição nucleofílica bimolecular à temperatura ambiente, sob aquecimento assistido por micro-ondas doméstico ou brando em banho de óleo. Neste sentido foram sintetizados três intermediários e 16 compostos-alvo em rendimentos que variaram de 65 % a 98 %, os quais foram caracterizados por análise de espectros de RMN de hidrogênio e de carbono 13.

Os intermediários LDT10 (**18**), LDT117 (**19**) e LDT137 (**29**) bem como os derivados-alvo **20-28** e **30-36** foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa frente a *L. amazonenses* com destaque para LDT10 (**18**, Cl_{50} 166,8 ± 6,2 μM) entre os intermediários; LDT138 (**28**, Cl_{50} 14,4 ± 1,2 μM) e LDT246 (**20**, Cl_{50} 38,8 ± 12,7 μM) entre os derivados-alvo amínicos acíclicos e cíclicos, respectivamente; e LDT119Me (**31**, Cl_{50} 6,7 ± 0,5 μM) entre os derivados catiônicos.

Os compostos foram ainda avaliados quanto ao potencial hemolítico sendo os intermediários e a maioria dos compostos amínicos identificados como não hemolíticos com valores de HEM_{50} na faixa 2700 a 3300 μM; o derivado amínico LDT247 (**25**, HEM_{50} 930,7 μM) com baixo potencial de hemólise; e os demais derivados amínico acíclico LDT136 (**26**) e os *N*-metilcatiônicos **30-36** hemolíticos com variação de HEM_{50} de 22,6 μM a 297,2

μM . Comparados à miltefosina (**6**), os derivados catiônicos apresentaram diferentes perfis de hemólise, sendo superiores para LDT246Me (**30**) e LDT136Me (**35**); semelhantes para LDT118Me (**32**) e LDT120Me (**33**); e inferiores para LDT119Me (**31**), LDT247Me (**34**) e LDT134Me (**36**).

A análise do perfil de fluidez da membrana em experimentos de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) revelou a não linearidade entre os diferentes compostos em que os derivados amínicos, **22** e **23**, e os catiônicos, **30** e **35**, levaram à maior fluidez da membrana de *L. amazonensis* semelhante à **6**, favorecendo à *lise* celular; enquanto a ação do cardanol saturado LDT10 (**18**) tornou à rigidez da membrana o que favorece à proliferação do parasito.

7.2. Perspectivas

Compreendem as perspectivas deste trabalho estudos complementares de toxicidade e EPR frente à forma amastigota axênica e macrófagos peritoniais bem como estudos *in vivo* visando a racionalização dos resultados e planejamento de novas séries contendo os arcabouços moleculares desenvolvidos neste trabalho.

Referências

8. REFERÊNCIAS

Aichelburg AC, Walochnik J, Assadian O, Prosch H, Steuer A, Pernecky G, et al. Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* sp. infection with miltefosine. *Emerg. Infect. Dis.* 2008;14(11):1743-6. doi: 10.3201/eid1411.070854

Almén KS, Nordström KJV, Robert Fredriksson and Helgi B Schiöth. Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. 13 August 2009 *BMC Biology* 2009, 7:50 doi:10.1186/1741-7007-7-50

Bastos MM, Boechat N, Hoelz LVB, de Oliveira AP. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. *Rev Virtual Quim.* 2016;8 (6):2072-4.

Bruce A. *Biologia Molecular da Celula*. 5º ed. Porto Alegre-RS. Artmed, 2010; P. 617–228.

Carneiro EA. Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo Gás, Salvador, Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP, 2004.

Centers for Disease Control and Prevention. [internet]. Leishmaniasis; c2017 [cited 2018 July 23]. Available from: <http://www.dpd.cdc.gov/HTML/Leishmaniasis.html>

Chin JN, Rybak MJ, Cheung, PB Savage. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;1268-3.

Daltin, D. Introdução e primeiros conceitos. *Tensoativos: química, propriedades e aplicações*. São Paulo: Blucher. 2011. P. 1-44.

De Oliveira LF, Dias SC. *Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens*. *Quím nova esc.* 2017;39(3):228-6. Portuguese.

Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2576-97. doi: 10.1093/jac/dks275.

Gajate C, Mollinedo F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr Drug Metab.* 2002;3:491-25.

Ilgoutz SC, McConville MJ. Function and Assembly of the *Leishmania* Surface Coat. *Int J Parasitol.* 2001;31(9):899-8.

Keenan TW, Morre DJ. Phospholipid class and fatty acid composition of golgi apparatus isolated from rat liver and comparison with other cell fractions. *Biochem.* 1970;9:19-5.

Klare JP, Steinhoff HJ. Spin labeling EPR. *Photosynth Res.* 2009;102(2-3):377-90.

Lacaz-Vieira F, Malnic G. *Biofísica*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A. 1981. p. 64-85.

Lemes LFN, Ramos GA, de Oliveira AS, da Silva FMR, Couto GC, Boni, MS, et al. Cardanol-derived AChE inhibitors: towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. *Eur jour of med chem*. 2016;108:687-00.

Lima J, Godinho P, Georgikopouloub K, Calogeropouloub T, de Souzaa W, Rodrigues JCF. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity in vitro against *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasit*. 2013;135:153-5.

Llull D, Rivas L, García E. In vitro bactericidal activity of the antiprotozoal drug miltefosine against *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1844-8. doi: 10.1128/AAC.01428-06

Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde. 1ª edição. Brasília-DF, 2014.

Mazzetto SE, Lomonaco D, Mele G. Cashew nut oil: opportunities and challenges in the context of sustainable industrial development. *Química Nova*. 2009;32(3):732-1.

Matias R, Rosa AC, Oliveira AKM, Pereira KCL, Silvia Rizzi ES, Machado AA. Cashew nut shell liquid and formulation: toxicity during the germination of lettuce, tomato seeds and coffee senna and seedling formation. *Acta Scientiarum Agronomy Maringá*. 2017;39(4):487-5.

Mendes CS, Coelho AB, Féres JG, Souza EC, Cunha DA. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2016; 21(1):263-2. Portuguese.

Menezes JPB, Guedes CES, Petersen ALOA, Fraga DBM, Veras PST. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Bio Med Research International*. 2015.

Ministério da Agricultura e Pecuária e Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta nº 001/2016.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Ministério da Saúde. 1st ed. 2017. Brasília: Editora MS. Portuguese.

Neves DP, de Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia Humana*. 11th ed. São Paulo: Atheneu. 2005. Portuguese.

Ouellette M, Drummel-Smith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updates*. 2004;7;257-6.

Pan American Health Organization [internet]. Informe de Leishmaniose nº6; 2018. [cited 2018 august 10]. Available from: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5

Ponte CB, Alves EAR, Sampaio RNR, Urdapilleta AAA, Kückelhaus CS, Muniz-Junqueira MI, Kückelhaus SAS. Miltefosine enhances phagocytosis but decreases nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. *Inter Immunopharmacology*. 2012;13:114–9.

Portal Ministério da Saúde [internet]. Boletim Epidemiológico 2018; c2018 [cited 2018 july 23]. Available from: <http://www.saude.df.gov.br/wpconteudo/uploads/2018/05/Informativo-Epidemiol%C3%B3gico-das-Leishmanioses-no-DF-n%C2%B0-01-2018.pdf>

Portal Ministério da Saúde [internet]. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA); c2018 [cited 2018 july 23]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>.

Portal do Ministério do Meio Ambiente [internet]. Biodiversidade Brasileira; c2017. [cited 2018 july 23]. Available from: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>

Quinn PJ, Wolf C. The liquid-ordered Phase in Membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2009;1788(1):33-6.

Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views. *Parasitol Today*. 2000;16(7):292-7.

Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america- a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Jan 19;4(1):e584.

Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americans. *Inter Jour for Parasi: Parasites and Wildlife*. 2014;3:251-2.

Savage PB, Li C, Taotafa U, Ding B, Guan Q. *FEMS Microbiology Letters*. 2002; P.1-7

Schneider P, Bordier C, Etges R. Membrane Proteins and Enzymes of Leishmania. *Subcell Biochem*. 1992;18:39-72.

Schreier S. Estudos estruturais e dinâmicos de membranas pelo método do marcador de spin [dissertation]. Instituto de Química: Universidade de São Paulo; 1979. Portuguese.

Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Ver Immun*. 2016;16(9):581.

Stasiuk M, Janiskewska A, Kozubek A. Phenolic Lipids Affect the Activity and Conformation of Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (Electric eel). *Nutrients*. 2014;6:1823-1.

Stasiuk M, Kozubek A. Biological activity of phenolic lipids. *Cell and Mol Life Sci*. 2010;67(6):841-60.

Swartz HM, Bolton JR, Borg DC. Biological Applications of Electron Spin Resonance. 1st ed. New York: John Wiley & Sons. 1972.

Turro NJ, Lei XG, Ananthapadmanabhan KP, Aronson M. Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant - Interactions: The BSA/SDS System. *Langmuir*. 1995;11:2525-3.

Van Helvoort A, van Meer G. Intracellular lipid heterogeneity caused by topology of synthesis and specificity in transport. Examples: sphingolipids. *FEBS Lett*. 1995;369:18-1.

Varela-M RE, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Müller I, Modolell M, Muñoz DL, et al. In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(4):e1612.

Voirin C, Caillol S, Sadavarte NV, Tawade BV, Boutevin B, Wadgaonkar PP. Functionalization of cardanol: towards biobased polymers and additives. *Polym Chem*. 2014;5:3142-62.

Wassef MK, Fioretti TB, Dwyer DM. Lipid Analyses of Isolated Surface Membranes of *Leishmania* Donovanii Promastigotes. *Lipids*. 1985;20(2):108-5.

Wikipedia [internet]. Lipidový raft; c2018 [cited 2018 july 23]. Available from: https://cs.wikipedia.org/wiki/Lipidov%C3%BD_raft

World Health Organization [internet]. Leishmaniasis; c2018 [cited 2018 july 23]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

Yoneyama KAG, Tanaka AK, Silveira TGV, Takahashi HK, Straus AH. Characterization of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* Membrane Microdomains, and their Role in Macrophage Infectivity. *J Lipid Res*. 2006;47(10):2171-8.

Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and Sphingolipid Metabolism in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 2010;170(2):55-4.

