

THAÍZ ROSA RIBEIRO

Estudos computacionais e síntese de derivados sulfonamídicos candidatos a inibidores da enzima sn-1-diacilglicerol lipase alfa (DAGL-alfa) para o tratamento da obesidade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista – Unesp – Campus Araraquara como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

ARARAQUARA – SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

R484e Ribeiro, Thaiz Rosa
Estudos computacionais e síntese de derivados sulfonamídicos candidatos a inibidores da enzima sn-1-diacilglicerol lipase alfa (DAGL-alfa) para o tratamento da obesidade / Thaiz Rosa Ribeiro. – Araraquara : [s.n.], 2019
124 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Nailton Monteiro do Nascimento Junior

1. Química farmacêutica. 2. Síndrome metabólica.
3. Obesidade. 4. Sulfonamidas. 5. Estudos de validação.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estudos computacionais e síntese de derivados sulfonamídicos candidatos a inibidores da enzima SN-1-diacilglicerol lipase alfa (DAGL-) para o tratamento da obesidade"

AUTORA: THAIZ ROSA RIBEIRO

ORIENTADOR: NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof.ª Dr.ª ANGELA REGINA ARAUJO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. CARLOS ALBERTO MONTANARI
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química - Universidade de São Paulo - USP - São Carlos

Araraquara, 28 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS:

Nome: Thaíz Rosa Ribeiro

Nome em citações bibliográficas: Ribeiro, T. R.

Data de nascimento: 15/01/1994

Naturalidade: Barretos/SP – Brasil

E-mail para contato: gisele1640@hotmail.com

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7473677929163003>

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” .
Instituto de Química de Araraquara. Departamento de Química Orgânica.
Laboratório de Química Medicinal, Síntese Orgânica e Modelagem Molecular
(LaQMedSOMM). Rua Professor Francisco Degni, 55. CEP: 14800-060.
Araraquara/SP - Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

Mestrado em Química – Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP IQ-CAr), Araraquara SP. Título da dissertação: Estudos computacionais e síntese de derivados sulfonamídicos candidatos a inibidores da enzima sn-1-diacilglicerol lipase alfa (DAGL-alfa) para o tratamento da obesidade. Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior, Bolsa: CNPq.

Graduação em Química – De 2011 a 2014. Bacharelado em química tecnológica – Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (UNIFEB), Barretos – SP. Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Canovas Martinez.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS CIENTÍFICOS:

RIBEIRO, T. R.; BATISTA, V. S.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Molecular modeling studies of the *Penicillium Camemberti* Lipase (PCL) enzyme: Docking and validation of bioactive compounds. 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2018**, Foz do Iguaçu - Paraná.

RIBEIRO, T. R.; BATISTA, V. S.; NASCIMENTO JUNIOR, N. M. Estudos de modelagem molecular da enzima *Penicillium Camemberti* Lipase (PCL): ancoragem e validação de compostos bioativos. III Simpósio de Química Medicinal da Unesp, **2018**, São José do Rio Preto – São Paulo.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO E/OU PALESTRA:

RIBEIRO, T. R.; BATISTA, V. S.; NASCIMENTO JUNIOR, N. M. Estudos de modelagem molecular da enzima *Penicillium Camemberti* Lipase (PCL): ancoragem e validação de compostos bioativos. III Simpósio de Química Medicinal da Unesp, **2018**, São José do Rio Preto – São Paulo.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

III Simpósio de Química Medicinal da Unesp – “Desafios na Pesquisa e Inovação de Antibióticos” (III SIMQUIMED), **2018**. São José do Rio Preto – São Paulo.

PRÊMIOS E TÍTULOS:

Menção Honrosa de terceiro lugar para o trabalho: RIBEIRO, T. R.; BATISTA, V. S.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Estudos de modelagem molecular da enzima *Penicillium Camemberti* Lipase (PCL): ancoragem e validação de compostos bioativos. III Simpósio de Química Medicinal – “Desafios na Pesquisa e Inovação de Antibióticos” (III SIMQUIMED), **2018**. São José do Rio Preto – São Paulo.

DEMAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS:

Estágio de Docência UNESP- Curso de Licenciatura em Química, auxiliando na disciplina de Química Orgânica I, supervisionado pelo Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior no ano de **2017**.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO CIENTÍFICO:

Membro da comissão organizadora: Segunda Escola de Modelagem Molecular da Unesp (2ª EMMUnesp), Araraquara/SP, **2019**.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL:

De ago./2013 a ago./2014. Mariol Industrial Ltda., Av. Mario de Oliveira, Barretos - SP.
Tipo: Indústria; Departamento: Pesquisa e Desenvolvimento; Cargo: Jovem aprendiz.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a minha família, minha mãe, Gisele Ribeiro, meu irmão João Victor Ribeiro de Oliveira e a minha querida avó Rosa Ribeiro Thomé, por me apoiar, por lutar essa batalha comigo e sempre me incentivar a ir em busca dos meus sonhos. Agradeço também o amor da minha vida, João Victor Biagi Santiago, por tudo que fez e faz, jamais poderei agradecer o suficiente.

Não posso deixar de mencionar meus sogros Maria Emília Biagi Santiago e João Manoel Santiago, que em todos os momentos fizeram com que eu me sentisse uma filha querida, estendendo a mão e me acompanhando nessa caminhada.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior, pela compreensão e paciência, e também pelos conselhos e apoio durante este período. Aos colegas do LaQMedSOMM, Victor de Sousa Batista, Marcelle Alcântara Vieira, por trilhar esta jornada comigo, agradeço pelos conselhos, ideias e discussões durante o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos meus velhos e novos amigos, Gisele, Denis, Danilo, Karoline e Aline sem vocês esta caminhada seria muito mais difícil.

Aos professores Dr. Luis Octavio Regasini e Dra. Lourdes Campaner dos Santos pelas valiosas contribuições à minha qualificação.

Aos professores Dr. Carlos Alberto Montanari e Dra. Angela Regina Araújo por disponibilizarem seu tempo para a leitura, correção e arguição na minha defesa de dissertação.

A toda equipe de funcionários do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, que foram sempre solícitos e prestativos para comigo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida e à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 2018/00187-7) pelos recursos fornecidos, possibilitando a conclusão deste trabalho.

EPÍGRAFE

“O mundo é tão imprevisível. As coisas acontecem de repente, inesperadamente. Queremos achar que temos controle da nossa existência. De um jeito temos, de outros não temos. Somos governados por forças do acaso e da coincidência”.

Paul Auster

(ode aos pés)

Ninguém recomeça

Ninguém esquece

Ninguém supera

Não se iluda com as curas instantâneas

A gente só continua

Colocamos um passo na frente do outro

Não precisamos ser fortes

Precisamos ter a força suficiente para esse

Simple movimento

Dessa forma tudo ficará para trás

Não pense muito

Às vezes são os seus pés que irão salvar a sua alma

Eles não esquecerão o caminho percorrido

Zack Magiezi

RESUMO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de 13% da população mundial é classificada como obesa (2016). Consequentemente, há um elevado gasto em saúde para os cofres públicos e para a população de modo geral, visto que a obesidade é uma doença multifatorial, a qual está diretamente relacionada com doenças cardiometabólicas. O tratamento da obesidade pode ser realizado com reeducação alimentar, atividade física regular e psicoterapia, mas quando há distúrbios metabólicos/psicológicos e/ou elevados riscos cardiometabólicos, se fazem necessárias intervenções medicamentosa e cirúrgica. Uma alternativa aos tratamentos atualmente utilizados é modular o Sistema Endocanabinóide, através da inibição da enzima sn-1-Diacilglicerol lipase α (DAGL- α), principal responsável pela produção de 2-araquidonoilglicerol (2-AG), que é diretamente responsável pela ativação de receptores CB1, que por sua vez, tem como função o controle do apetite, contornando assim os efeitos adversos observados na atuação direta sobre o receptor em questão. No presente projeto de pesquisa foram realizados estudos computacionais e a síntese de novos derivados sulfonamídicos candidatos a inibidores da enzima DAGL- α . A etapa de estudos *in silico* da enzima DAGL- α e dos derivados sulfonamídicos propostos, foi realizada por meio da abordagem SBDD (*structure-based drug design*), visando compreender os requisitos estruturais necessários para a atividade inibitória, uma vez que se busca inibição competitiva, e finalmente a triagem virtual de 84 compostos planejados. Nesse contexto, foi realizada a validação e análise meticulosa do modelo empregando a enzima *Penicillium camembertii* lipase (PCL), dada a indisponibilidade da estrutura cristalográfica de DAGL- α humana, utilizando substâncias da literatura com atividades *in vitro* conhecidas. Após avaliação das quatro funções de pontuação pertencentes ao programa GOLD (GoldScore, ChemScore, ChemPLP e ASP), observou-se que a função ASP forneceu a predição de interações com potencial capacidade de discernir ligantes ativos e inativos, propiciando a seleção de 8 compostos com promissora atividade inibitória frente à enzima DAGL- α para a etapa de síntese. Dentre eles, 3 substâncias foram obtidas com elevado grau de pureza através de uma única etapa e os outros 2 compostos por meio de 4 etapas de reação, envolvendo irradiação por micro-ondas na última etapa.

Palavras-chave: Obesidade; DAGL- α ; Sulfonamidas; Receptor CB1; Sistema Endocanabinóide; Ancoragem Molecular; Triagem virtual; Planejamento Racional e Síntese.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), ca. 13% of the world population can be classified as obese (2016). Consequently, the government expenses regarding to health of population are high, because obesity is a multifactorial disease, which is directly related with cardiometabolic diseases. The treatment of obesity can be conducted through changes in food intake, practice of physical activities regularly and psychotherapy, however when metabolic or psychological disturbs and/or increased cardiometabolic risks, approaches related with the use of drugs and/or surgery are required. An alternative to replace the current treatments is the modulation of the Endocannabinoid System, through the inhibition of the sn-1-diacylglycerol lipase alpha (DAGL- α), the main character for the production of 2-arachidonoylglycerol (2-AG), which is directly responsible by the activation of CB1 receptors. Then, the modulation of CB1 can control appetite, avoiding deleterious effects observed when bioactive compounds modulate CB1 directly. In this research project were performed computational studies and synthesis of novel sulfonamide candidate inhibitors of the enzyme DAGL- α . The step of an *in silico* study of DAGL- α and bioactive compounds retrieved from literature was performed by SBDD approach (structure-based drug design), to understand the required structural features for the inhibitory activity, followed by Structure Based Virtual Screening (SBVS) of the novel designed derivatives. In this context, the validation and detailed assessment of a *in silico* model is necessary, by using Penicillium Camemberti lipase (PCL), because of the unavailability of the crystallographic structure of human DAGL- α . After assessing the four scoring functions belonging to the GOLD program (GoldScore, ChemScore, ChemPLP and ASP), it was observed that ASP scoring function provided the prediction of interactions with potential ability to discriminate active and inactive ligands, allowing the selection of 8 compounds with promising inhibitory activity against the DAGL- α enzyme for the synthesis step. Among them, 3 substances were obtained with a high degree of purity through a single step and the other 2 compounds were obtained by 4 reaction steps, involving microwave irradiation in the last step.

Keywords: Obesity; DAGL- α ; Sulfonamides; CB1 receptor; Endocannabinoid System; Molecular Docking; Virtual Screening; Planning and Synthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama das reações enzimáticas catabólicas envolvendo glicose e frutose.....	21
Figura 2 - Estrutura tridimensional da leptina (12) (PDB ID 1AX8) à esquerda e modelo teórico da estrutura tridimensional da grelina (13) (PDB ID 1P7X), à direita.....	23
Figura 3 – Estruturas químicas dos neurotransmissores serotonina (14) e ácido gama-aminobutírico (GABA) (15) e do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) (16).....	24
Figura 4 – Estruturas químicas, constantes de afinidade e concentração inibitória de alguns dos fármacos registrados no Brasil para o tratamento da obesidade, segundo a ANVISA.....	26
Figura 5 – Fórmula estrutural e constante de afinidade do fármaco Rimonabanto (21).....	28
Figura 6 – Estruturas químicas e constantes de afinidade de um dos compostos presentes na Cannabis sativa, Δ^9 -THC (22) e dos endocanabinóides, AEA (23) e 2-AG (24).....	30
Figura 7 – Esquema ilustrando a formação e degradação dos endocanabinóides.....	31
Figura 8 – Mecanismo geral de catálise de lipase.....	33
Figura 9 – Estruturas químicas com padrão estrutural sulfonamídico com atividade inibitória frente a enzima DAGL- α	35
Figura 10 – Modelo farmacofórico rudimentar, demonstrando os principais pontos de interação entre os derivados sulfonamídicos e a enzima DAGL- α , obtido através do modelo por homologia desenvolvido por Chupak <i>et al.</i>	36
Figura 11 – Fluxograma das etapas em uma abordagem SBDD.....	37
Figura 12 – Ligante co-cristalizado na estrutura de MAGL-humano PDB ID: 3PE6 (em laranja) e pose de ancoragem validada por redocagem (em ciano)	38
Figura 13 – Representação das interações obtidas através do modelo por homologia desenvolvido utilizando lipase de <i>thermomyces lanuginosa</i> (humicola) em complexo com ácido oleico (PDB ID:1GT6)	41
Figura 14 – Estruturas químicas de substâncias com atividade frente à enzima DAGL- α	43
Figura 15 – Representação das estruturas químicas das 84 substâncias de padrão estrutural sulfonamídico planejadas (Séries A e B) e seus respectivos análogos simplificados, SM A e SM B	44

Figura 16 – Representação das estruturas químicas dos grupos substituintes propostos para modificações estruturais.....	45
Figura 17 – Tríade catalítica (S145, H259 e D199), demonstrando o átomo de referência utilizado em destaque.....	47
Figura 18 – Rota sintética demonstrando as 4 etapas para obtenção de 87 e 89	49
Figura 19 – Reação de formação do cloridrato do éster metílico da L-prolina (85)	49
Figura 20 – Reação de obtenção da sulfonamida 54 , a partir do cloridrato do éster metílico da L-prolina.....	50
Figura 21 – Reação de hidrólise do grupo éster, para a obtenção da sulfonamida 53	51
Figura 22 – Reação de formação do produto final 87 , proveniente da <i>p</i> -anisidina.....	52
Figura 23 – Reação de formação do produto final 89 , proveniente da <i>o</i> -metoxi- <i>p</i> -nitroanilina.....	53
Figura 24 – Reação de formação da sulfonamida 92 , adaptado de Elgaher, <i>et al</i> , 2016....	54
Figura 25 – Reação de formação da sulfonamida 93 , adaptado de Kloeckner <i>et al</i> , 2014.....	54
Figura 26 – Reação de formação da sulfonamida 96 e 97 , adaptado de Dutra <i>et al</i> , 2014.....	55
Figura 27 – Reação de formação da sulfonamida 99 , adaptado de Laha <i>et al</i> , 2014.....	56
Figura 28 – Estrutura cristalográfica de <i>Penicillium Camembertii</i> lipase (PDB ID 5CH8). Demonstrando a tríade catalítica em destaque (S145, H259 e D199)	58
Figura 29 – Sobreposição da sequência primária das lipases PCL (PDB 5CH8) e DAGL- α humana, com identificação da posição dos resíduos conservados ou homólogos.....	60
Figura 30 – Gráfico de Ramachandram para a estrutura cristalográfica de <i>Penicillium Camembertii</i> lipase (PDB ID 5CH8)	61
Figura 31 – Representação da melhor pose de docking obtida com a função ASP de uma estrutura classificada como ‘Ativa’ com $CI_{50} = 302$ nM, indicando as interações com os resíduos-chave da enzima PCL.....	62
Figura 32 – Compostos sulfonamídicos selecionados com base nos estudos <i>in silico</i> , como candidatos a ligantes da enzima sn-1 DAGL- α	64
Figura 33 – Sobreposição das melhores poses obtidas para os 8 derivados sulfonamídicos (laranja) triados para a etapa de síntese.....	65

Figura 34 – a) Vista superior e b) Vista lateral da sobreposição das melhores poses de docking obtidas para as substâncias 87 e 89 ; c) Representação da melhor pose de docking obtida com a função ASP da estrutura 87 e da d) estrutura 89	66
Figura 35 – a) Representação da melhor pose de docking obtida com a função ASP da estrutura 92 e da b) estrutura 93	67
Figura 36 – a) Representação da melhor pose de docking obtida com a função ASP da estrutura 96 , b) da estrutura 97 e da c) estrutura 100	68
Figura 37 – Representação da melhor pose de docking obtida com a função ASP da estrutura 99	69
Figura 38 – Reação de obtenção do cloridrato de éster metílico da L-prolina (85)	69
Figura 39 – Espectro de RMN ¹ H obtido para cloridrato de éster metílico da L-prolina; solvente: DMSO-d ₆ , 600 MHz.....	70
Figura 40 – Espectro de RMN DEPT-Q obtido para cloridrato de éster metílico da L-prolina; solvente: DMSO-d ₆ , 150 MHz.....	71
Figura 41 – Mecanismo proposto para a formação do cloridrato de éster metílico da L-prolina.....	72
Figura 42 – Representação da cromatoplaça obtida para o cloridrato de éster metílico da L-prolina (85), utilizando ácido fosfomolibdico como revelador químico.....	73
Figura 43 – Reação de obtenção da sulfonamida 54 , a partir do cloridrato do éster metílico da L-prolina (85)	73
Figura 44 – Representação da cromatoplaça obtida para a reação de obtenção da sulfonamida 54 , a partir do cloridrato de éster metílico da L-prolina (85), utilizando ácido fosfomolibdico como revelador químico.....	74
Figura 45 – Espectros de RMN ¹ H e DEPT-Q obtidos para a sulfonamida 54 ; solvente: DMSO-d ₆ , 600 MHz para ¹ H e 150 MHz para DEPT-Q.....	75
Figura 46 – Reação de hidrólise do grupo éster, para a obtenção da carboxi sulfonamida 53	76
Figura 47 – Mecanismo proposto para a formação da carboxi sulfonamida 53	76
Figura 48 – Espectro de Infravermelho, ATR, cm ⁻¹ da sulfonamida 53	77
Figura 49 – Reação de formação do produto final 87 , proveniente da <i>p</i> -anisidina.....	77
Figura 50 – Reação de formação do produto final 89 , proveniente da <i>o</i> -metoxi- <i>p</i> -nitroanilina.....	78

Figura 51 – Representação da cromatoplaça obtida, após purificação da sulfonamida 89	79
Figura 52 – Mecanismo proposto para a formação da sulfonamida 89	79
Figura 53 – Reação de formação da sulfonamida 92	80
Figura 54 – Reação de formação da sulfonamida 93	81
Figura 55 – Reação de formação da sulfonamida 99	81
Figura 56 – Mecanismo proposto para a formação das sulfonamidas 92, 93 e 99	82
Figura 57 – Reação de formação da sulfonamida 96 e 97	82
Figura 58 – Mecanismo proposto para a formação das sulfonamidas 96 e 97	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos níveis limites dos componentes da síndrome metabólica.....	19
Tabela 2 – Classificação dos valores de atividade das substâncias obtidas da literatura.....	46
Tabela 3 – Demonstrativo das porcentagens de interações, por resíduo, para classificação das substâncias da literatura, referentes a função ASP.....	63
Tabela 4 – Interações previstas para os 8 derivados sulfonamídicos selecionados para a etapa de síntese.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2-AG: 2-araquidonoil-glicerol
- 3D-QSAR: *tridimensional quantitative structure-activity relationship*
- 5-HT₁₋₇: Receptores de serotonina (de 1 a 7)
- 5-HT_{2C}: Receptores de serotonina 2C
- AEA: Anandamida
- AgRp: Proteína relacionada ao Agouti (do inglês, *Agouti-related protein*)
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- Arc: Núcleo arqueado do hipotálamo
- ATP-III: Painel de tratamento adulto III (do inglês, *Adult Treatment Panel III*)
- CB: Receptor canabinoide
- CCD: Cromatografia em camada delgada
- DAGL: Diacilglicerol lipase
- FDA: *Food and Drug Administration*
- GABA_A e GABA_B: Receptores de ácido gama-aminobutírico A e B
- GLP-1: Peptídeo-1 semelhante ao glucagon
- GPCR: Receptores acoplados à proteína G
- HDL: Lipoproteína de alta densidade (do inglês, *High-density lipoprotein*)
- IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IMC: Índice de massa corporal
- InsR: Receptores de insulina
- LepR-b: Receptores de leptina
- NCEP: Programa Nacional de Educação sobre o Colesterol (do inglês, *National Cholesterol Education Program*)
- NPY: Neuropeptídeo Y
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- PFK: Enzima fosfofrutokinase
- PNS: Pesquisa Nacional de Saúde
- POMC: Pro-opiomelanocortina (do inglês, *Proopiomelanecortin*)
- RMN: Ressonância magnética nuclear

SEC: Sistema endocanabinóide

SNC: Sistema nervoso central

SNRI: Inibidor de recaptação de serotonina e noradrenalina

Δ^9 -THC: Δ^9 -tetrahydrocannabinol

LBDD: Design de fármacos baseado no ligante (do inglês, *ligand-based drug design*)

SBDD: Design de fármacos baseado na estrutura do receptor (do inglês, *structure-based drug design*)

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 OBESIDADE: DADOS ESTATÍSTICOS E DIAGNÓSTICO.....	18
1.2 CAUSAS E FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE.....	20
1.3 O TRATAMENTO MEDICAMENTOSO.....	25
1.4 O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NO CONTEXTO DO CONTROLE DO APETITE.....	29
1.5 A ENZIMA DAGL- α COMO ALVO PARA O TRATAMENTO DA OBESIDADE.....	32
1.6 SULFONAMIDAS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA FRENTE À DAGL- α	34
1.7 MODELAGEM MOLECULAR NO CONTEXTO DA QUÍMICA MEDICINAL.....	36
1.7.1 ESTUDOS COMPUTACIONAIS APLICADOS À ENZIMA DAGL- α	40
2. OBJETIVO.....	42
3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	42
4. METODOLOGIA.....	45
4.1 ANCORAGEM MOLECULAR DA ENZIMA <i>PENICILLIUM CAMEMBERTTI</i> LIPASE (PCL).....	45
4.2 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS...48	
4.2.1 ROTA SINTÉTICA PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS 87 e 89 – Série A.....	48
4.2.1.1 Metodologia para obtenção do cloridrato do éster metílico da L-prolina.....	49
4.2.1.2 Metodologia para obtenção do intermediário 54.....	50
4.2.1.3 Metodologia para obtenção da <i>p</i> -toluenosulfonil L-prolina (53)	51
4.2.1.4 Metodologia para obtenção do derivado sulfonamídico 87.....	52
4.2.1.5 Metodologia para obtenção do derivado sulfonamídico 89.....	53
4.2.2 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DO DERIVADO SULFONAMÍDICO 92 – SÉRIE B.....	54
4.2.3 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DO DERIVADO SULFONAMÍDICO 93 – SÉRIE B.....	54
4.2.4 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DO DERIVADO SULFONAMÍDICO 96 e 97 – SÉRIE B.....	55

4.2.5 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DO DERIVADO SULFONAMÍDICO 99 – SÉRIE B.....	56
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.4 CARACTERIZAÇÃO COM TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	57
4.5 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DAS MOLÉCULAS OBTIDAS.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 ANCORAGEM MOLECULAR COM ENZIMA <i>PENICILLIUM CAMEMBERTTI</i> LIPASE (PCL).....	58
5.2 COMPOSTOS SELECIONADOS PARA A ETAPA DE SÍNTESE COM BASE NOS ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	63
5.3 SÍNTESE, MECANISMOS E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS.....	69
5.3.1 PRIMEIRA ETAPA - Obtenção do éster metílico da L-prolina na forma de cloridrato (85)	69
5.3.2 SEGUNDA ETAPA - Obtenção da sulfonamida 54, a partir do cloridrato do éster metílico da L-prolina.....	73
5.3.3 TERCEIRA ETAPA - Obtenção da <i>p</i> -toluenosulfonil L-prolina (53)	76
5.3.4 OBTENÇÃO DO DERIVADO SULFONAMÍDICO 87, proveniente da <i>p</i> -anisidina.....	77
5.3.5 OBTENÇÃO DO DERIVADO SULFONAMÍDICO 89, proveniente da <i>o</i> -metoxi- <i>p</i> -nitroanilina.....	78
5.3.6 OBTENÇÃO DO DERIVADO SULFONAMÍDICO 92 – SÉRIE B.....	80
5.3.7 OBTENÇÃO DO DERIVADO SULFONAMÍDICO 93 – SÉRIE B.....	81
5.3.8 OBTENÇÃO DO DERIVADO SULFONAMÍDICO 99 – SÉRIE B.....	81
5.3.9 OBTENÇÃO DO DERIVADO SULFONAMÍDICO 96 e 97 – SÉRIE B.....	82
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	84
7. REFERÊNCIAS.....	85
8. ANEXOS.....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE: DADOS ESTATÍSTICOS E DIAGNÓSTICO

A obesidade pode ser definida como o acúmulo de tecido adiposo de forma anormal ou excessiva, gerado por meio do desequilíbrio energético entre o consumo e o gasto de calorias, que implica no surgimento de inflamação crônica, acarretando em riscos à saúde, incluindo distúrbios como a síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, entre outras comorbidades.^{1,2} Seu diagnóstico pode ser feito, a princípio, pelo cálculo do índice de massa corporal (IMC), obtido através da razão entre a massa corporal e o quadrado da altura (Kg/m^2). Conforme proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na classificação internacional para adultos, caracteriza-se como obesidade valores de IMC acima de 30.³

Outro método igualmente difundido é a medida da circunferência abdominal que, juntamente com o IMC, traz uma interpretação mais concisa dos níveis de gordura corporal,⁴ uma vez que os valores de referência utilizados para avaliação de riscos cardiometabólicos dependem da distribuição da gordura corporal, bem como do gênero do indivíduo; para o masculino, valores acima de 102 cm apresentam risco elevado; para o feminino, valores acima de 88 cm apresentam alto risco, segundo o Programa Nacional de Educação sobre o Colesterol (NCEP) – Painel de tratamentos para adultos III (ATP-III).^{5,6} Existem ainda outros métodos de avaliação, como a pesagem hidrostática, ultrassonografia, técnicas de imagem, como ressonância magnética, tomografia computadorizada. Contudo, estas técnicas se mostram limitadas quanto à prática clínica e apresentam custo elevado para a sua constante aplicabilidade.⁴

Segundo a OMS, em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos tinham excesso de peso, sendo mais de 650 milhões de obesos, perfazendo um total de 13% da população mundial.² No Brasil, dados obtidos através da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), disponibilizados em 2015 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estimam que mais da metade da população brasileira apresenta sobrepeso (56,9%), enquanto que desse total 20,8% é obesa.⁷

Em decorrência do aumento no número de indivíduos com excesso de peso e obesidade, aumentam-se os gastos em saúde, especialmente com medicamentos e planos de saúde. Essa elevação nos gastos pode estar relacionada diretamente à

obesidade, bem como às doenças associadas.⁸ De acordo com Bahia *et al.*, no período entre 2008 e 2010, os gastos totais por ano no Brasil com todas as doenças relacionadas ao sobrepeso e a obesidade foram de US\$ 2,1 bilhões, sendo US\$ 1,4 bilhão, devido a internações e US\$ 679 milhões devido a procedimentos ambulatoriais.⁹ Os impactos econômicos da obesidade vão muito além do tratamento da doença em si e estão interligados com vários outros fatores, como tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, infecciosas e doenças psiquiátricas, além daquela diretamente ligada a obesidade, denominada síndrome metabólica.

A obesidade traz inúmeros impactos associados ao acúmulo de gorduras, como doenças respiratórias, metabólicas, neurológicas, renais, além de um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de riscos cardiovasculares, relacionados ao depósito central de gordura e a resistência à insulina, conhecida como síndrome metabólica.⁵ A **Tabela 1**, demonstra mais detalhadamente a relação entre os componentes que caracterizam a síndrome metabólica e seus níveis limites, segundo o Programa Nacional de Educação sobre o Colesterol – Painel de tratamentos para adultos III, disponibilizado pela Associação Brasileira de Cardiologia.

Tabela 1: Classificação dos níveis limites dos componentes da síndrome metabólica.¹⁰

Componentes da síndrome metabólica segundo NCEP-ATP III	
Componentes	Níveis
Circunferência abdominal	Homens: > 102 cm / Mulheres: > 88 cm
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL
Colesterol HDL	Homens: < 40 mg/dL / Mulheres: < 50 mg/dL
Pressão arterial	≥ 130/85 mmHg
Glicemia de jejum	≥ 110 mg/dL

Esse transtorno é caracterizado principalmente pela resistência à insulina, que juntamente com dois ou mais componentes listados na **Tabela 1**, aumentam o risco cardiometabólico, bastante evidenciado em indivíduos obesos.^{5,10}

A insulina tem demonstrado ser um importante regulador da homeostase energética e do metabolismo lipídico. Além disso, ela se encontra em níveis altíssimos em indivíduos obesos (hiperinsulinemia), evidenciando, nesse caso, a incapacidade desse hormônio de promover o metabolismo natural de glicose,^{11,12} bem como

aumento da produção hepática desse açúcar e alteração no metabolismo de lipídeos e proteínas.¹¹

Há, ainda, um efeito pró-aterogênico causado pela hiperinsulinemia,¹¹ que pode ser exacerbado pela diminuição dos níveis de Colesterol HDL (*High-density lipoprotein*), uma vez que essa lipoproteína plasmática parece afetar potencialmente as vias de inflamação de vários componentes-chave do complexo macromolecular denominado inflamassoma, diminuindo sua expressão por meio da inibição da sua ativação, mostrando que o HDL em altos níveis, pode prevenir doenças cardiovasculares, como aterosclerose (enrijecimento das artérias) e hipertensão arterial.^{13,14}

Altos níveis de triglicérides parecem alterar de maneira significativa o risco de doenças cardiovasculares, aumentando-o, principalmente em associação com baixos níveis de HDL.¹⁵ Além disso, essa classe de lipoproteínas parece estar relacionada com doenças no fígado, como esteatose hepática¹⁶ e aumento dos níveis séricos de insulina.

Ademais, encontram-se ainda diversas comorbidades associadas ao excesso de peso, como diabetes tipo 2, dislipidemia, apneia do sono, alterações ósseas, entre outras,⁴ que devem ser acompanhadas e analisadas juntamente com a perda ou aumento de peso, pois estes fatores podem influenciar na resposta terapêutica, bem como na qualidade de vida do indivíduo.

1.2 CAUSAS E FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE

Dentre as hipóteses levantadas para explicar a causa da obesidade, tem-se os fatores genéticos e os fatores ambientais, destacando-se o estilo de vida e os hábitos alimentares, além de fatores emocionais.⁴

Globalmente, tem havido aumento da ingestão de alimentos industrializados altamente calóricos e ricos em gordura e aumento considerável na inatividade física devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho, mudança de modos de transporte e aumento da urbanização, o que fez com que a prevalência mundial da obesidade quase triplicasse entre 1975 e 2016.²

Um dos fatores relacionados a esse fenômeno é o aumento da ingestão de frutose, carboidrato metabolizado pelo fígado em uma via distinta a da glicose (**Figura 1**).

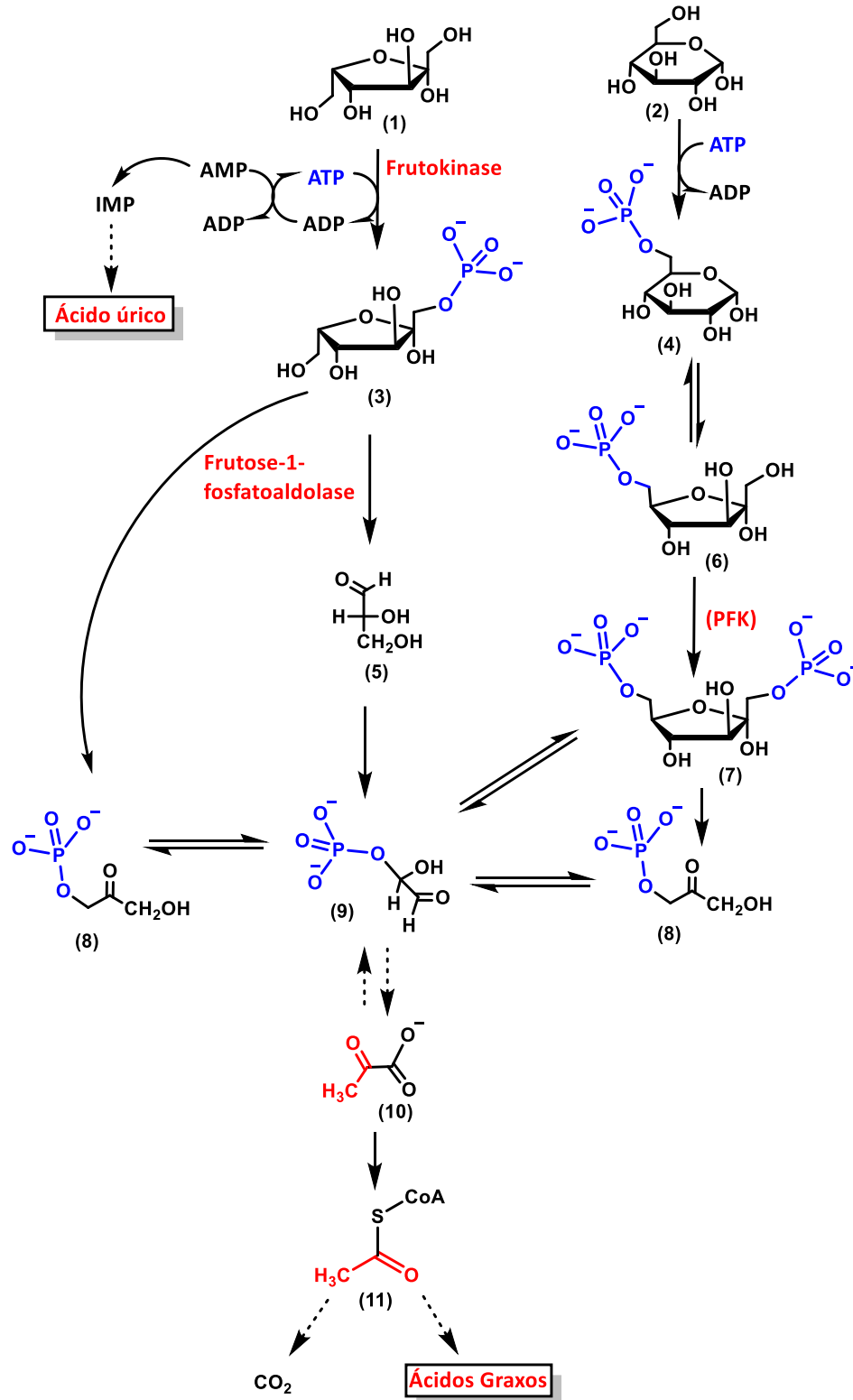


Figura 1: Diagrama das reações enzimáticas catabólicas envolvendo glicose e frutose.^{17,18}

Setas tracejadas indicam múltiplas etapas.

Nesta via, demonstrada pela **Figura 1**, nota-se a diferença entre o metabolismo da frutose **(1)** e da glicose **(2)**, principalmente pelas reações enzimáticas que ocorrem nas etapas iniciais. Sendo, assim como a glicose, metabolizada no fígado, a frutose é convertida em frutose-1-fosfato **(3)** pela enzima frutoquinase (ou frutokinase), que é então dividida em gliceraldeído **(5)**, convertido para gliceraldeído-3-fosfato **(9)** e depois em fosfato de di-hidroxiacetona **(8)**, pela frutose-1-fosfatoaldolase, ambos são mandados para diversas vias metabólicas, podendo formar substratos energéticos como, glicose, glicogênio, ácidos graxos, entre outros. Ocorre também a formação de maior quantidade de piruvato **(10)**, já que os processos de metabolização da frutose contornam o principal agente limitante da glicólise, a enzima fosfofrutokinase (PFK), o que pode estimular a lipogênese hepática e posteriormente a produção de ácidos graxos (triglicerídeos), levando à dislipidemia, um fator de risco comum e proeminente para doenças cardiovasculares. Além disso, a elevada absorção e fosforilação da frutose podem levar à diminuição de fosfato intracelular, ocasionando em aumento da produção de ácido úrico, componente bastante presente em complicações metabólicas. Essas discrepâncias no metabolismo hepático da frutose podem sobrecarregar o fígado, ocasionar acúmulo de gordura nos adipócitos, contribuindo para a resistência à insulina, aparecimento de inflamações crônicas, aumento do nível de lipídeos no sangue (hiperlipidemia) e posteriormente no desenvolvimento de doenças metabólicas.^{17,19,20,21,22}

Além do desequilíbrio metabólico, também se pode citar os desequilíbrios neuroquímicos. Pois, além de modular comportamentos e emoções, o Sistema nervoso central (SNC), principalmente o hipotálamo, está intimamente ligado a homeostase do balanço energético, interagindo com tecidos periféricos, como pâncreas, fígado, tecido adiposo e intestino,²³ de onde partem sinalizadores periféricos, como insulina e leptina, para levarem informações ao SNC, considerando o estado energético do organismo.^{12,24} Mais especificamente no núcleo arqueado do hipotálamo (Arc), se encontram duas populações neuronais responsáveis pela expressão de neuropeptídeos com efeito direto na homeostase do consumo e gasto de energia, os anorexígenos (POMC) e os orexígenos (AgRP e NPY). Destaca-se ainda, a interação existente da leptina **(12)** (**Figura 2**) e insulina com esse sistema de neurônios, mediada pelos receptores LepR-b e InsR, favorecendo a produção de neuropeptídeos que agem nos receptores AgRP/NPY, por meio da baixa expressão

da insulina, aumentando a orexia, enquanto o hormônio peptídico leptina **(12)** estimula a atividade de POMC, diminuindo o apetite.^{24,25}

Hormônio peptídico composto por 167 resíduos de aminoácidos, descoberto em 1994,²⁶ a leptina **(12)** (**Figura 2**) ou proteína *ob*, produzida majoritariamente no tecido adiposo, apresenta importante papel na regulação do balanço energético, agindo como sinalizador periférico, indicando ao hipotálamo²⁷ o decréscimo da fome após a ingestão de alimentos. Contudo, nos indivíduos obesos esse processo não ocorre, sendo consequência da resistência à leptina. Conhecida como hiperleptinemia, a resistência à leptina indica a falha na sinalização desse peptídeo, uma vez que se encontra expresso em níveis superiores nesses indivíduos, sem a esperada anorexia, proveniente dessa expressão.¹² Mutações no gene receptor de leptina, responsável por transmitir o sinal de ligação com a mesma para dentro da célula - LepR-b ou Ob-Rb - com o intuito de suprimir sua expressão, indicaram aumento considerável no tecido adiposo de ratos, levantando-se a hipótese do gene *ob-ob* (nome derivado do conjunto de ratos *ob/ob* com comprovada deficiência de leptina),^{28,29} pois a leptina não participa somente na regulação da ingestão de alimentos como um fator de saciedade, mas também no gasto energético, uma vez que em animais que apresentam deficiência no gene *ob*, observa-se um conjunto de sintomas e manifestações clínicas semelhante à obesidade.³⁰

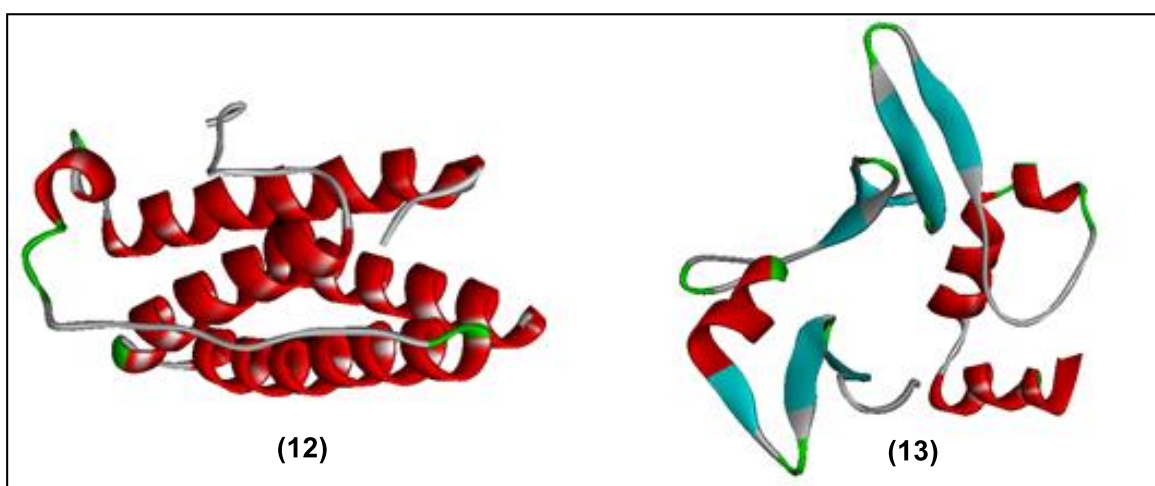


Figura 2: Estrutura tridimensional da leptina **(12)** (PDB ID 1AX8) à esquerda e modelo teórico da estrutura tridimensional da grelina **(13)** (PDB ID 1P7X), à direita.

Outro importante peptídeo associado à regulação e controle do balanço energético é a grelina **(13)** (**Figura 2**), que age de forma oposta e complementar a leptina, sendo sintetizada principalmente no estômago.^{31,32} Tschop e colaboradores

descobriram, em 2000, que a grelina não atuava somente como ligante endógeno do receptor do secretagogo do hormônio do crescimento, mas também como regulador da ingestão de alimentos, peso corporal, adiposidade e metabolismo energético.³³ Posteriormente, foram descritos vários sistemas a níveis central e periférico modulados por esse importante hormônio peptídico, tais como: estimulação da motilidade intestinal e secreção ácida gástrica, modulação do sono, sensação gustativa, regulação do metabolismo da glicose, modulação do estresse, ansiedade, além de melhoria das funções cardiovasculares, como vasodilatação e contratilidade cardíaca.³⁴

Envolvendo diversos circuitos neurais, a grelina inibe, no Arc, a atividade dos neurônios que estimulam POMC, enquanto aumenta a atividade dos neurônios que expressam AgRP/NPY, sendo demonstrado por Chen e colaboradores a importância desses orexígenos no comportamento alimentar.^{35,36} Além do Arc, outros locais do hipotálamo são afetados pela ação da grelina, alterando o balanço energético. Um deles, demonstrado por Kola e colaboradores, é a liberação de endocanabinóides, juntamente com o acréscimo da atividade da proteína cinase ativada por AMP (adenosina monofosfato) hipotalâmica (AMPK), tendo o receptor canabinóide CB1 envolvido. Ademais os dados fornecidos por esse estudo sugerem que a interação entre a grelina e o sistema endocanabinóide (SEC) é determinante para o efeito indutor de apetite.^{34,37}

Há também outros importantes sistemas com neurotransmissores e hormônios, atuando de modo a inibir ou exacerbar o ganho de peso. Dentre eles podem-se citar a serotonina **(14)**,³⁸ o ácido gama-aminobutírico (GABA) **(15)**,³⁹ o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) **(16)**,⁴⁰ representados na **Figura 3**.

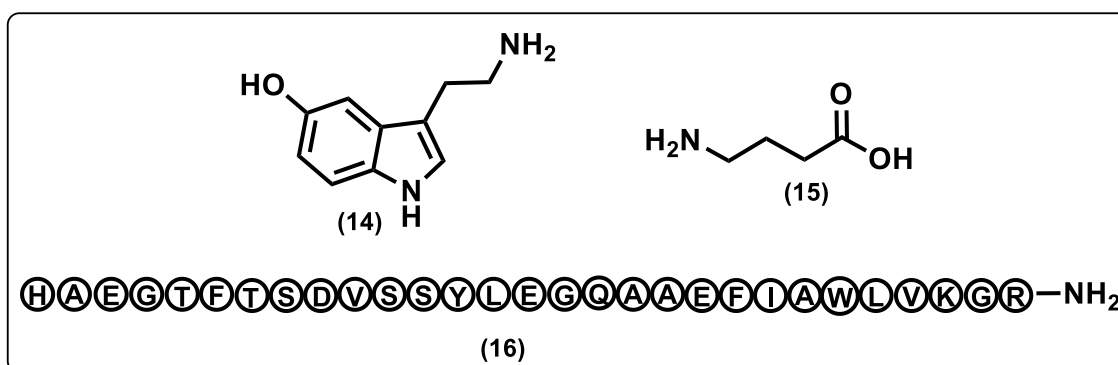


Figura 3: Estruturas químicas dos neurotransmissores serotonina **(14)**, ácido gama-aminobutírico (GABA) **(15)** e do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) **(16)**.

Os efeitos mediados pela serotonina **(14)**, provém de 14 subtipos diferentes de receptores, classificados em sete famílias principais, 5-HT₁₋₇.⁴¹ Graças a estudos com agonistas que aumentam a liberação pré-sináptica de serotonina e bloqueiam sua recaptação, foi possível validar os receptores de serotonina 5-HT_{2C} como alvos farmacológicos para controle de apetite e subsequente perda de peso, já que sua expressão parece estar restrita ao SNC.^{41,42} Além disso, existe forte interação entre AgRP/NPY e 5-HT, indicando baixos níveis desse sistema de neurônios, após tratamento com agonistas desse receptor específico,⁴³ acarretando na redução do apetite e consequentemente na perda de peso.

O neurotransmissor inibitório predominante no SNC, conhecido como GABA **(15)**, atua em dois tipos de receptores: receptores GABA_A ionotrópicos (GABA_ARs), localizados principalmente nos neurônios pós-sinápticos e receptores metabotrópicos GABA_B (GABA_BRs), que desempenham, assim como o próprio neurotransmissor, papel importante na homeostase energética, principalmente pelo fato dos neurônios AgRP e POMC serem GABAérgicos e interagirem fortemente com outros hormônios, como a leptina. Visto que, esse hormônio peptídico estimula a ação dos neurônios POMC, reduzindo a liberação de GABA dos neurônios AgRP.^{39,44}

O peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) **(16)** é um hormônio incretina,⁴⁵ liberado predominantemente do intestino delgado em resposta à ingestão de alimentos. Além de reduzir as glicemias (de jejum e pós-prandial) e aumentar a secreção de insulina dependente de glicose, o GLP-1 demonstrou inibir a secreção de glucagon e o lento esvaziamento gástrico. Além disso, estudos não clínicos e clínicos demonstraram aumento da saciedade, redução da ingestão alimentar e subsequente redução no peso corporal após a administração de GLP-1, levando a investigações sobre o seu potencial para o tratamento da obesidade.^{45,46}

1.3 O TRATAMENTO MEDICAMENTOSO

Existem inúmeras abordagens recomendadas para o tratamento e prevenção da obesidade, dentre elas se destaca o tratamento convencional, que se baseia em alterações comportamentais relacionadas aos hábitos alimentares, a exercícios voltados ao aumento do gasto calórico (incluindo atividade física regular), psicoterapia e reeducação alimentar, juntamente com orientações nutricionais focadas na ingestão

de alimentos mais saudáveis, mas há casos onde não se obtêm resultados adequados com as abordagens supracitadas, sendo necessária a busca por alternativas e tratamentos mais rigorosos.

Uma das alternativas, conhecida como intervenção terciária, é a cirurgia bariátrica,⁴ aplicada a indivíduos em estágios mais graves, com IMC igual ou maior que 40 Kg/m², associada a comorbidades cardiovasculares com altos níveis de mortalidade que, após rigorosa avaliação, pode ser eventualmente melhorada com a perda de peso induzida cirurgicamente. Ademais, esse tipo de intervenção também pode englobar um regime mais rígido de refeições com baixíssimas calorias, além da utilização de medicamentos antiobesidade.⁴

Existem ainda situações onde as intervenções cirúrgicas e as dietas de baixas calorias não são aplicáveis, tornando a medicação o único recurso disponível ao indivíduo obeso. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2017, os quatro fármacos registrados para o tratamento da obesidade no Brasil eram sibutramina (17), orlistat (18), lorcaserina (19) e o peptídeo liraglutida (20),⁴⁷ ilustrados pela **Figura 4**.

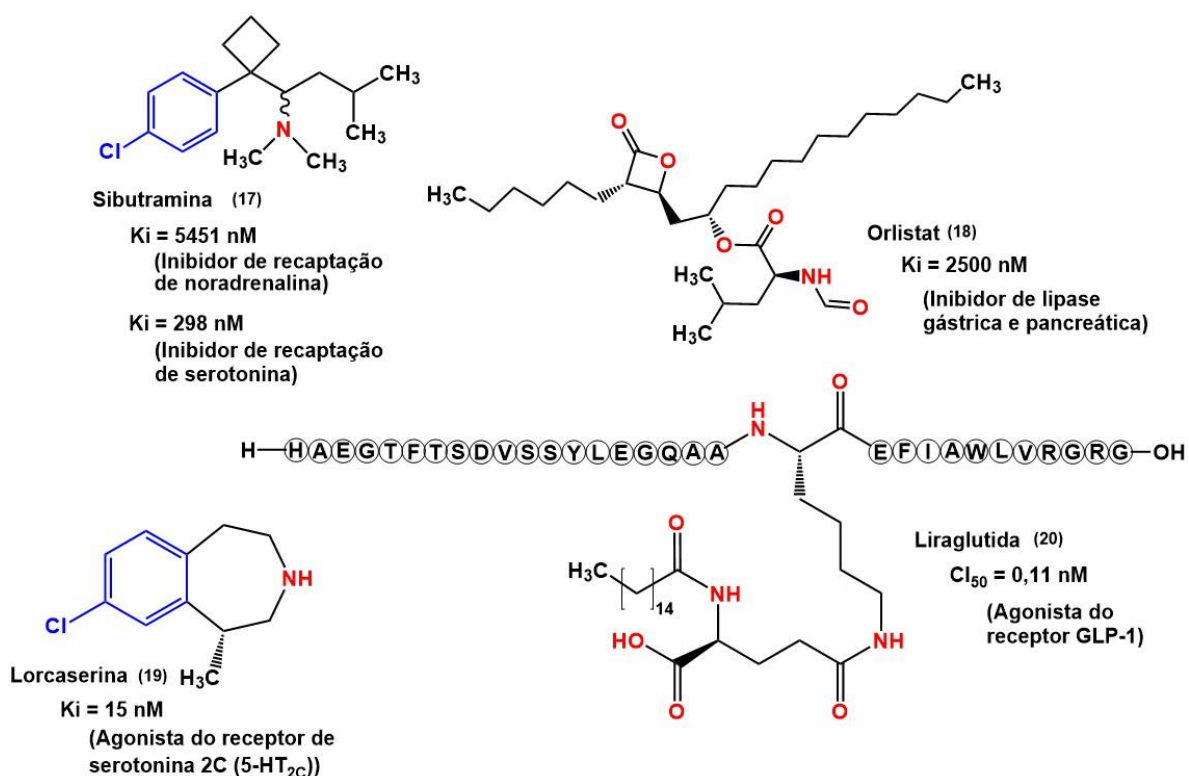


Figura 4: Estruturas químicas, constantes de afinidade e concentração inibitória de alguns dos fármacos registrados no Brasil para o tratamento da obesidade, segundo a ANVISA.⁴⁷

A sibutramina (**17**), foi sintetizada pela primeira vez em 1980, inicialmente voltada para uso como antidepressivo, agindo como inibidor de recaptação de serotonina e noradrenalina (SNRI), permitindo que esses neurotransmissores permaneçam na fenda sináptica, promovendo a sensação de saciedade.^{48,49} Aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 1997, a sibutramina não causa dependência psíquica nem química, contudo seu uso não deve ser recomendado para pacientes obesos com doenças cardiovasculares e deve ser feito com monitoramento constante a pacientes que apresentam hipertensão arterial.^{4,49} Efeitos colaterais comumente relatados são, insônia, náusea, boca seca e constipação.⁵⁰

Aprovado em 1999 pela FDA, o orlistat (**18**) (THL – tetraidrolipstatina) age focado na redução da medida da circunferência abdominal e conseqüentemente na diminuição dos riscos de doenças cardiometabólicas. Sua utilização é muitas vezes associada a problemas gastrointestinais, como descarga de gordura, flatulência excessiva e urgência fecal, devido principalmente ao seu mecanismo de ação, além da redução de absorção de vitaminas lipossolúveis, sendo necessária a administração concomitante com multivitamínicos durante seu tratamento a longo prazo.^{4,51}

Agonista do receptor de serotonina 2C (5-HT_{2C}), a lorcaserina (**19**), aprovada pelo FDA em 2012, demonstrou eficácia no tratamento da obesidade,⁵² por meio da ativação desses receptores, através do sistema de neurônios POMC e AgRP/NPY,^{42,43} além da diminuição dos níveis de colesterol total e triglicérides.⁴² Contudo, estudos de Fase 3 mostraram que efeitos colaterais como náusea, cefaleia e tontura estão entre os mais comuns e sua incidência aumenta consideravelmente em doses supraterapêuticas.^{42,52}

Indicada para indivíduos obesos ou com IMC >27 kg/m² com comorbidades, a liraglutida (**20**) leva a melhoria considerável de parâmetros glicêmicos, pressão arterial e níveis lipídicos, com conseqüente redução de riscos cardiovasculares, assim como aumento da qualidade de vida, uma vez que sua administração é indicada em conjunto com modificação de estilo de vida, como dietas mais saudáveis e exercícios físicos. A liraglutida é um análogo de GLP-1 com uma sequência de aminoácidos com 97% de homologia em relação ao GLP-1 nativo, divergindo apenas pela substituição do resíduo de lisina (Lys, K) pelo aminoácido arginina (Arg, R) na posição 34 e na adição de ácido glutâmico, juntamente com uma extensa cadeia carbônica (16 carbonos) após o aminoácido K26.^{53,54} Foi inicialmente desenvolvida para controle glicêmico do

diabetes, se mostrando mais tarde bastante eficaz para a diminuição do peso corporal, independente do aumento anormal de glicose no sangue, além de reduzir o risco dessa doença metabólica associada à obesidade, sendo aprovada pelo FDA em 2014 para essa finalidade. Mesmo sendo muito bem tolerada, seus efeitos adversos mais reportados são gastrointestinais, como náusea, diarreia e constipação, que podem ser mitigados com a alteração da dose ingerida.^{4,46}

Outro fármaco importante, utilizado como agente antiobesidade, foi o rimonabanto **(21)** (**Figura 5**), aprovado em 2006 pelo FDA, sendo o primeiro bloqueador do receptor CB1, com alta afinidade para o mesmo e potencial redução da ingestão alimentar, medida da circunferência abdominal e níveis de colesterol e triglicerídeos. Contudo, seus efeitos adversos mais frequentes são: náusea, tontura, diarreia, insônia e principalmente distúrbios psiquiátricos, incluindo depressão e ansiedade, podendo levar a descontinuação de seu uso.^{50,51,55}

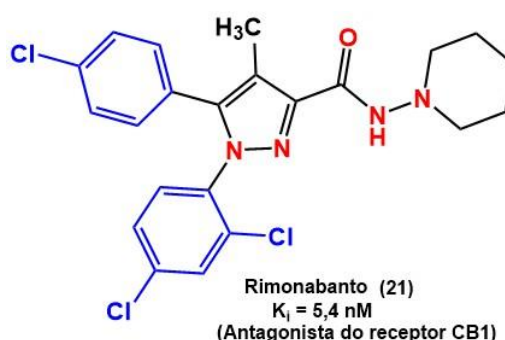


Figura 5: Fórmula estrutural e constante de afinidade do fármaco Rimonabanto **(21)**.⁵⁶

Devido aos graves efeitos colaterais relacionados aos fármacos citados, intensificam-se as buscas por novas alternativas terapêuticas que possam reduzir o peso corporal e/ou minimizar os fatores de risco cardiometabólicos para o tratamento da obesidade. Neste contexto, a modulação do Sistema Endocanabinóide afetando indiretamente o receptor CB1, por meio da inibição da enzima sn-1-Diacilglicerol lipase alfa (DAGL- α), apresenta-se como uma estratégia promissora para essa finalidade.

1.4 O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NO CONTEXTO DO CONTROLE DO APETITE

Após o isolamento e caracterização do principal componente psicoativo da *Cannabis sativa*, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (**22**), em 1964, por Gaoni e Mechoulam,⁵⁷ deu-se início, de forma intensiva, aos esforços para a compreensão de sua atividade, através de seu mecanismo de ação e consequente entendimento do sistema ao qual ele afeta. O sistema endocanabinóide (SEC) é constituído então, por dois receptores principais acoplados à proteína G (GPCR): (a) CB1, descoberto em 1988,⁵⁸ principal alvo farmacológico do Δ^9 -THC,⁵⁹ expresso principalmente nos terminais pré-sinápticos em várias regiões, incluindo tronco encefálico, hipocampo, córtex, diencéfalo, mesencéfalo, hipotálamo e cerebelo, regulando ainda a liberação dos neurotransmissores, glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), acetilcolina, norepinefrina, entre outros,^{60,61} sendo o receptor mais abundante acoplado à proteína G no cérebro⁶² e (b) CB2, descoberto em 1993⁶³ e cuja expressão é predominante nas células do sistema imune, sendo recentemente encontrado também no cérebro, especialmente nas células da micróglia.⁶⁴ Os receptores CB1 e CB2 em humanos compartilham 44% da identidade global de aminoácidos e possuem sete hélices transmembranares. Em suas regiões transmembranares, a identidade sequencial passa a 68%.^{62,65}

A ativação de CB1 e CB2 é mediada por dois ligantes endógenos, araquidonoil-etanolamida (também conhecido como anandamida) (AEA) (**23**) e 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) (**24**), que são considerados os principais endocanabinóides (ECs).⁶⁶

O primeiro endocanabinóide descoberto foi a AEA, em 1922 por Devane e colaboradores e seu nome vem da palavra sânscrita “Ananda” (felicidade interna),⁶² uma vez que AEA exerce um efeito modulador no circuito de recompensa, agindo como uma substância endógena auto-administrada pelo cérebro semelhante à *Cannabis*, além de desempenhar importante papel nos efeitos de drogas de abuso, incluindo não-cannabinóides. Pertencente à subclasse conhecida como *N*-acetiletanolaminas (NAEs), a AEA (assim como Δ^9 -THC) ativa receptores CBs com baixa eficácia intrínseca (agonista parcial). Já o 2-AG, que pertence à subclasse de monoacilgliceróis (MAGs), apresenta-se como agonista pleno dos receptores CBs,

com elevados níveis teciduais e celulares, encontrando-se em níveis de 10 a 100 vezes maiores do que a AEA.⁶²

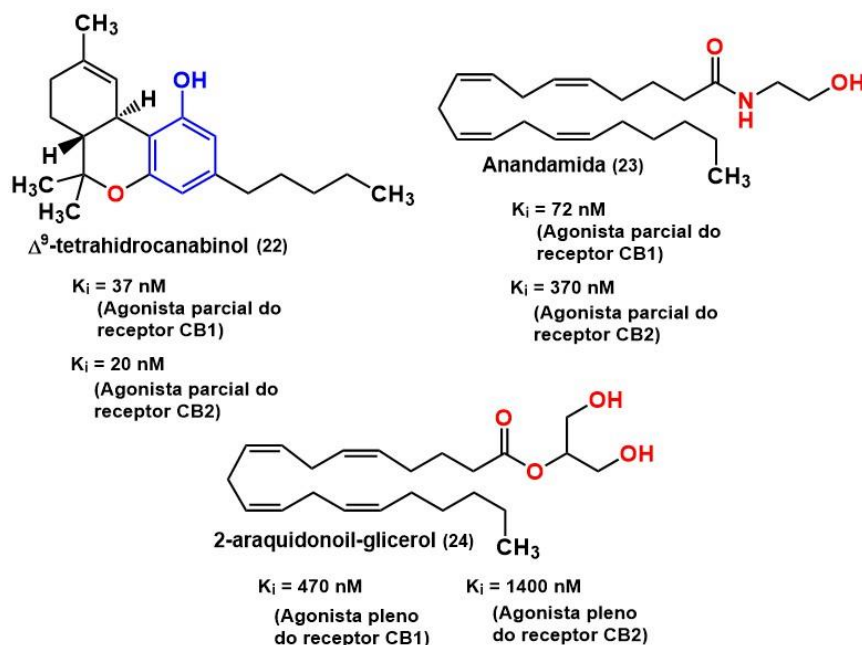


Figura 6: Estruturas químicas e constantes de afinidade de um dos compostos presentes na *Cannabis sativa*, Δ^9 -THC (22) e dos endocanabinóides, AEA (23) e 2-AG (24).⁶¹⁻⁶⁹

Ademais, o SEC é constituído por enzimas de produção, transporte e degradação dos endocanabinóides, como *N*-aciltransferase (NAT), *N*-araquidonoil-fosfatidil-etanolamina Fosfolipase D (NAPE-PLD), Fosfolipase C (PLC), Diacilglicerol lipase (DAGL), Amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) e Monoacilglicerol lipase (MAGL), representando pontos de extrema importância para a regulação dos níveis teciduais dos ligantes endógenos, uma vez que não há maneira de armazená-los de forma estável em vesículas sinápticas e não há vias neuronais canabinóides conhecidas, levando o sistema a agir sob demanda, sintetizando os endocanabinóides após despolarização celular dependente de Ca^{2+} ou estimulação do receptor canabinóide.^{61,62,65}

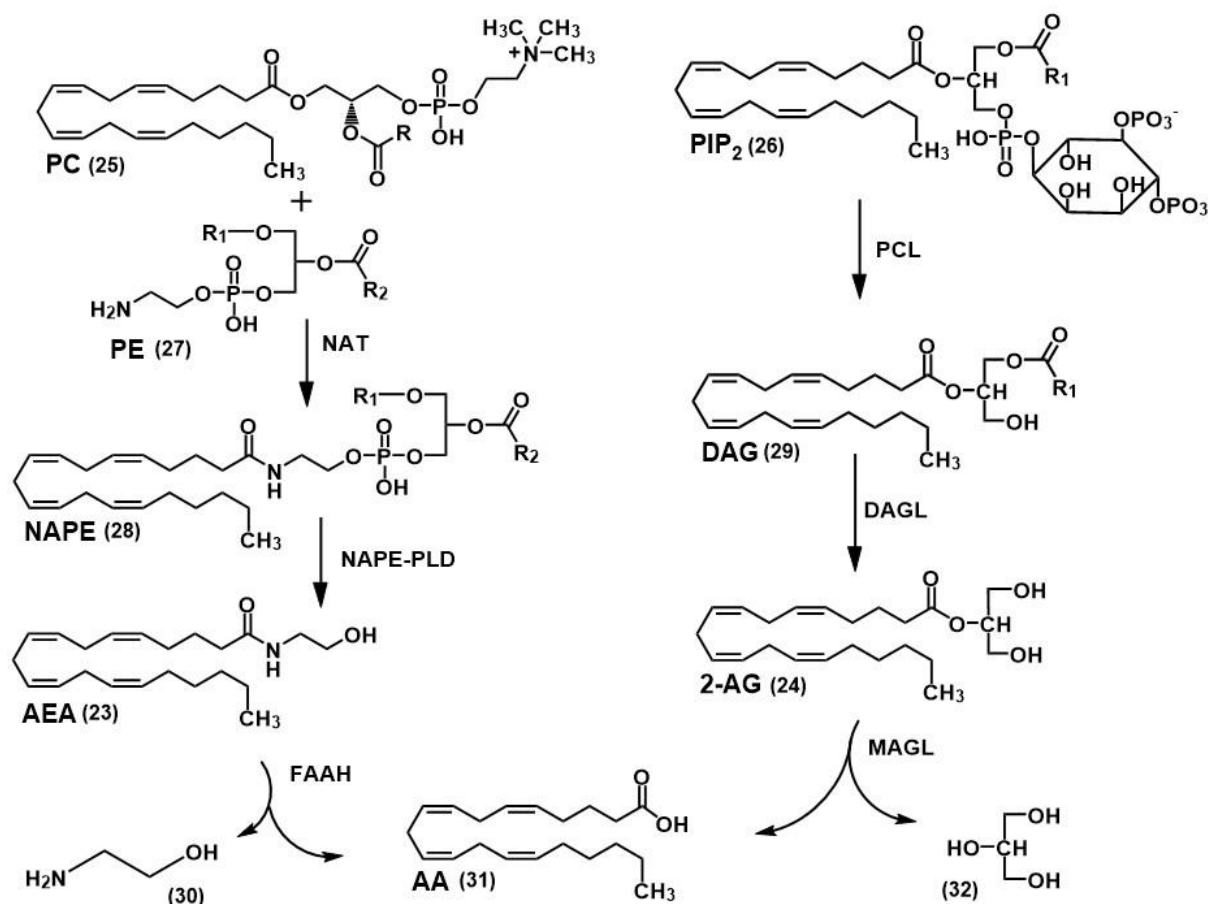


Figura 7: Esquema ilustrando a formação e degradação dos endocanabinóides.^{61,62,65}

Os endocanabinóides são formados a partir de precursores de fosfolipídios, como demonstrado na **Figura 7**. Na via de obtenção de AEA (**23**), Fosfatidilcolina (PC) (**25**) e Fosfatidiletanolamina (PE) (**27**) sofrem transferência enzimática catalisada pela enzima NAT, na qual o grupo acil é substituído pelo grupo amino, formando *N*-araquidonoil-fosfatidil-etanolamina (NAPE) (**28**). Essa última é então hidrolisada a AEA (**23**), pela NAPE-PLD. Já a via de obtenção de 2-AG (**24**) se inicia pela hidrólise de 2-araquidonoil-fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) (**26**) catalisada pela enzima PLC, resultando na formação de diacilglicerol (DAG) (**29**), que é mais tarde desacilado pela DAGL específica para *sn*-1 (numeração estereoespecífica – *sn* – utilizada para diferenciar os três carbonos da subunidade do glicerol, numerando-se de cima para baixo), para finalmente produzir 2-AG (**24**).^{61,62}

Como já mencionado, os endocanabinóides são produzidos sob demanda e não há como armazená-los, de forma que, após a sua produção e sinalização, são rapidamente metabolizados por enzimas de degradação, tais como FAAH, que divide

AEA em ácido araquidônico (AA) **(31)** livre e etanolamina **(30)** e MAGL, que hidrolisa 2-AG também em AA e glicerol **(32)**.^{61,62,65}

Mediante as múltiplas conexões neurais e endócrinas, atribuídas a elevada interação dos ligantes endógenos e dos receptores CBs com outros meios moduláveis, observa-se que o SEC participa de inúmeras vias fisiológicas de regulação, estando envolvido em algumas das principais funções básicas do corpo humano, afetando a fisiologia e patologia do sistema nervoso central (SNC) e periférico,⁷⁰ por meio de sua participação em vários processos como aprendizagem e memória, desenvolvimento neuronal, nocicepção ou algesia, inflamação, regulação do apetite, digestão, amamentação, metabolismo, balanço energético, termogênese, motilidade, ciclo vigília-sono, regulação do estresse, emoções e dependência química.⁶⁶

Com enfoque direcionado ao controle de apetite, o SEC é um caminho de sinalização clinicamente comprovado para o balanço energético,⁷¹ uma vez que há estreita relação entre o SEC e os neuropeptídeos orexigenos (AgRP e NPY), visto que a modulação de CB1 (em neurônios glutamatérgicos ou GABAérgicos) pode inervar esses neuropeptídeos.⁷² Ademais, os níveis de 2-AG são elevados no hipotálamo com o aumento da produção de grelina em jejum e reduzidos quando há acréscimo dos hormônios promotores da saciedade, como a leptina.⁷² Dessa forma, pode-se prever que, alterações nos níveis de grelina e leptina modulam a liberação de determinados mediadores orexigênicos e anorexigênicos, bem como ocorre com o estímulo dos receptores CB1.^{72,73,74}

1.5 A ENZIMA DAGL- α COMO ALVO PARA O TRATAMENTO DA OBESIDADE

Uma alternativa aos tratamentos atuais no combate a obesidade, seria atuar no sistema endocanabinóide, através da inibição da enzima sn-1-Diacilglicerol lipase α (DAGL- α). As enzimas DAGL são proteínas de membrana intracelulares com múltiplos domínios, que possuem como uma de suas funções catalisar a conversão de diacilglicerol (DAG) em 2-araquidonoilglicerol (2-AG), substância endógena que age seletivamente como agonista do receptor canabinóide CB1.^{75,76} Elas pertencem à grande família das serina-hidrolases, com a típica dobra α/β hidrolase e a tríade

catalítica Ser-His-Asp.⁷¹ Existem duas isoformas conhecidas: sn-1-Diacilglicerol lipase α e sn-1-Diacilglicerol lipase β (DAGL- β).⁷⁵ A DAGL- α se encontra, majoritariamente, no sistema nervoso central (SNC) e é a principal responsável pela síntese de 2-AG no tecido nervoso, enquanto que DAGL- β está presente em maior quantidade nos órgãos periféricos.^{75,77} São enzimas de 1042 e 672 resíduos de aminoácidos, respectivamente, possuindo quatro domínios transmembranares, separados por loops curtos, pouco conservados. Apresenta um conjunto central de oito cadeias de β -folhas, bilateralmente ligadas por Ligações de Hidrogênio, conectadas através de α -hélices e loops, bem como contendo espaçamento crítico da tríade catalítica (serina, aspartato e histidina) dentro de um sítio ativo hidrofóbico.^{78,79}

A atividade da enzima DAGL- α (**Figura 8**), como todas as lipases, se dá pela catálise da conversão de diacilgliceróis (DAG) em monoacilgliceróis (2-AG), através da desprotonação da serina (**33**), tornando-a mais nucleofílica, para o posterior ataque ao grupo carbonila do substrato **34**, formando assim um intermediário acil-enzima tetraédrico (**35**). Após isso, um nucleófilo (**37**) (como H₂O por exemplo) ataca a enzima acilada resultando no produto metabolizado **38** e na regeneração do sítio catalítico (**40**).^{80,81}

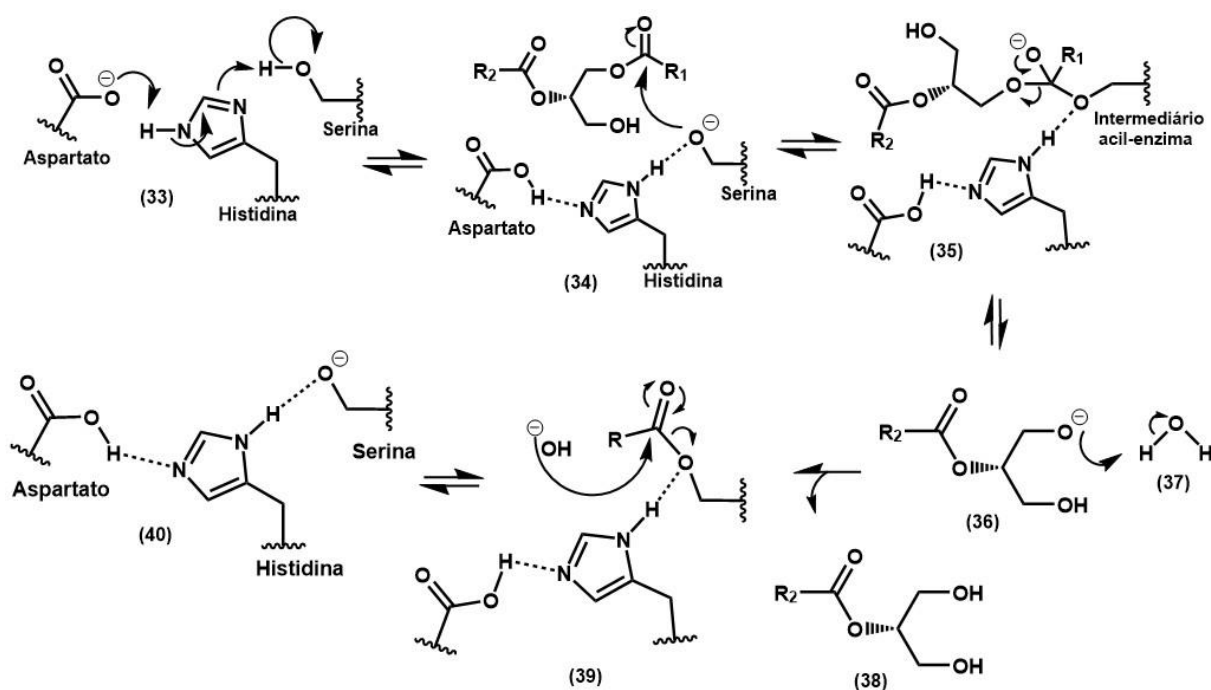


Figura 8: Mecanismo geral de catálise de lipase.^{80,81}

Recentes descobertas apontam que a inibição de DAGL- α pode ser benéfica no tratamento de distúrbios metabólicos, tais como obesidade e suas doenças recorrentes,⁷¹ uma vez que modular CB1 diretamente, como já mencionado, devido seus efeitos colaterais exacerbados, se tornou uma alternativa inviável.

1.6 SULFONAMIDAS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA FRENTE À DAGL- α

Atualmente, diferentes classes de inibidores da enzima DAGL- α vem sendo reportadas, uma das mais promissoras são as sulfonamidas. Janssen *et al*, reportaram a importância da subunidade sulfonamídica, capaz de orientar a posição espacial dos ligantes na região catalítica da enzima, bem como a importância de halogêneos ligados diretamente ao anel aromático da extremidade da molécula, como no composto **41**, apresentando menor valor de concentração inibitória quando comparado com moléculas similares. Além disso, a presença de um doador/aceptor de ligação de hidrogênio, como ácido carboxílico, demonstrado na região A (**Figura 9**), se mostrou essencial para a atividade do composto **43**.⁷⁵ Pois, quando modificado e adicionado um grupo éster no lugar, ocorre perda da atividade, como pode ser observado para o composto **45**.⁷⁵ Ademais, os anéis aromáticos ocupam, separadamente, bolsões hidrofóbicos abertos, ilustrado no composto **42** alterando a atividade conforme são variados seus substituintes, bem como modificando sua posição (*orto*, *meta* ou *para*), como demonstrado pela região B, no composto **44** em relação ao composto **43**.⁸²

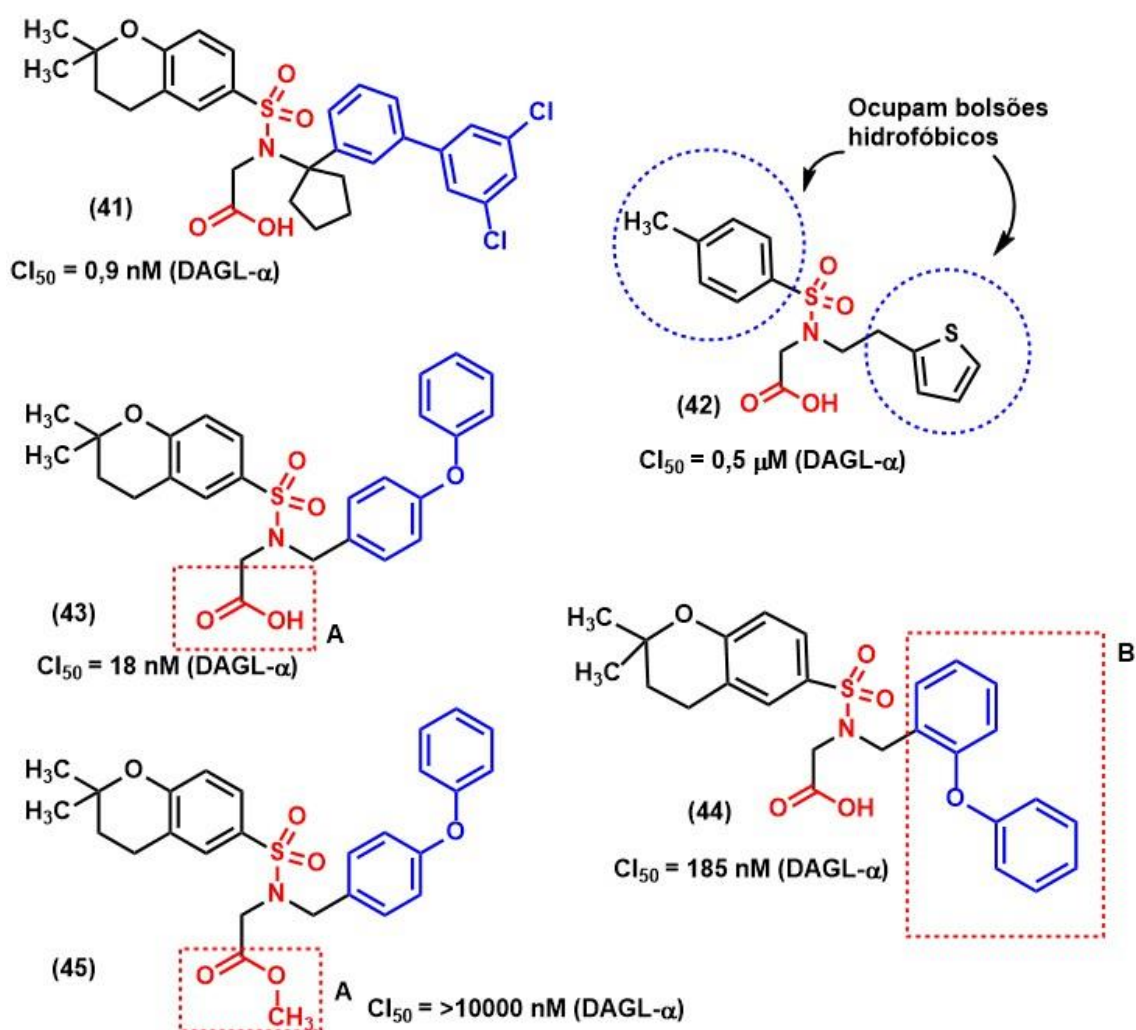


Figura 9: Estruturas químicas com padrão estrutural sulfonamídico com atividade inibitória frente a enzima DAGL- α .^{75,82,83}

Por meio de estudos computacionais, Chupak *et al*, descreveram um modelo farmacofórico rudimentar (**Figura 10**), para tentar explicar os principais pontos de potencial interação entre os derivados sulfonamídicos e a enzima DAGL- α , por meio do modelo por homologia desenvolvido (seção 1.7.1). Nele, é possível observar a importância da presença de subunidades aromáticas ligadas diretamente ao enxofre e ligadas através de um espaçador metileno ao nitrogênio.⁸²

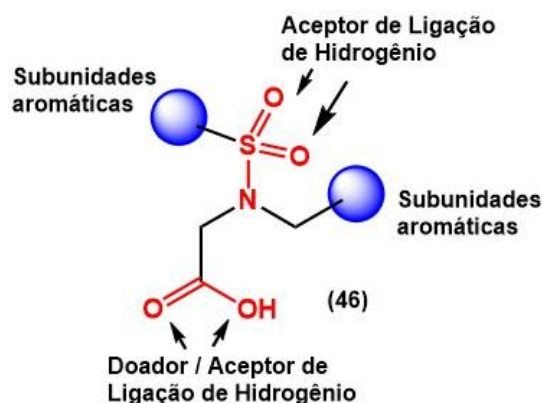


Figura 10: Modelo farmacofórico rudimentar, demonstrando os principais pontos de interação entre os derivados sulfonamídicos e a enzima DAGL- α , obtido através do modelo por homologia desenvolvido por Chupak *et al.* **Fonte:** Adaptado de Chupak *et al.*, 2016.⁸²

1.7 MODELAGEM MOLECULAR NO CONTEXTO DA QUÍMICA MEDICINAL

A modelagem molecular tem papel fundamental nos estudos dirigidos à compreensão das interações entre a biomacromolécula e ligantes bioativos, além de propiciar a triagem virtual de novos compostos planejados de modo consistente, reduzindo o tempo e o custo destinados à busca por novos candidatos à fármacos.⁸⁴

Por meio desse estudo, é possível trabalhar em duas vertentes: seja por meio da estrutura do ligante (LBDD do inglês: *ligand-based drug design*) ou por meio da estrutura do receptor (SBDD do inglês: *structure-based drug design*).⁸⁵ No primeiro caso, o estudo se baseia na estrutura de uma molécula (ligante) e na ausência de informações tridimensionais disponíveis para o receptor/enzima.⁸⁶ No segundo, utiliza-se macromoléculas (receptores ou enzimas) já conhecidas, obtidas experimentalmente, ou construídas por meio de modelagem comparativa.⁸⁵

Dentro do estudo de SBDD, o *docking*, ou ancoragem molecular, é uma ferramenta amplamente difundida no planejamento racional de fármacos, que tem como objetivo, prever a orientação e a conformação de um ligante dentro de um sítio de ligação em um receptor ou enzima.^{87,88} Pode ser aplicado na triagem virtual de novas moléculas, na otimização de compostos com afinidade já descrita pelo alvo de interesse e auxiliar no entendimento das características do reconhecimento molecular, a fim de proporcionar de maneira assertiva o direcionamento da seleção de compostos a serem futuramente sintetizados.⁸⁹ Na **Figura 11** é apresentado um fluxograma das principais etapas na abordagem SBDD.

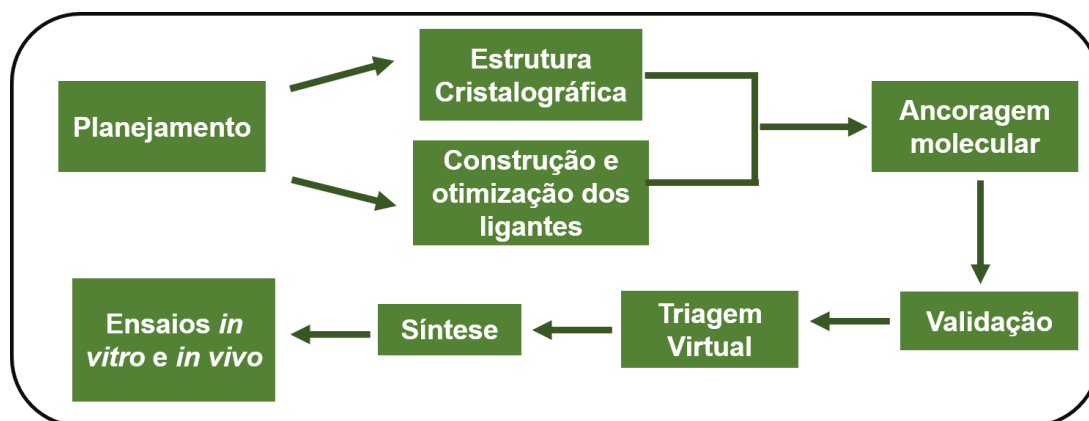


Figura 11: Fluxograma das etapas em uma abordagem SBDD.⁸⁵

Na triagem virtual baseada na estrutura do receptor ou enzima, é ancorado um conjunto de moléculas em um sítio de ligação previamente selecionado e validado, aliada à previsão do modo de ligação (conformação e orientação). A validação pode ser feita por meio de redocagem (*redocking*), onde o ligante presente na proteína de interesse (receptor ou enzima) é virtualmente removido do sítio ao qual foi co-cristalizado e é recolocado pelo programa, por meio das condições calculadas para a melhor orientação possível do ligante no sítio.⁸⁹ Sendo então avaliada a concordância entre a posição obtida pelo programa e a orientação previamente encontrada experimentalmente. Na **Figura 12** é demonstrado um exemplo de redocagem bem-sucedido, ilustrando uma interação hidrofóbica (π -alquil) entre H269 e o ligante co-cristalizado, sendo mantida após a redocagem.

Outras abordagens de validação geralmente utilizadas são: curva característica de operação do receptor (*receiver operating characteristic curve*, ROC) e relação estrutura-atividade quantitativa tridimensional (*tridimensional quantitative structure-activity relationship*, 3D-QSAR).⁸⁹ A primeira validação, curva ROC, avalia a capacidade do programa de ancoragem utilizado de discernir ligantes ativos e inativos, de modo a plotar a curva levando em consideração os falsos positivos, falsos negativos e os ligantes classificados corretamente.⁹⁰ Já a validação conhecida como 3D-QSAR, avalia o protocolo de ancoragem quanto ao alinhamento de uma série de ligantes com atividade relatada para o receptor, de modo que seja possível descrever quantitativamente as variações dessa atividade, por meio de fatores relacionados a estrutura tridimensional desses ligantes. Sendo possível construir modelos

estatísticos que liguem a atividade biológica às propriedades moleculares dessa série de ligantes para posterior previsão da atividade de novos compostos.⁹¹

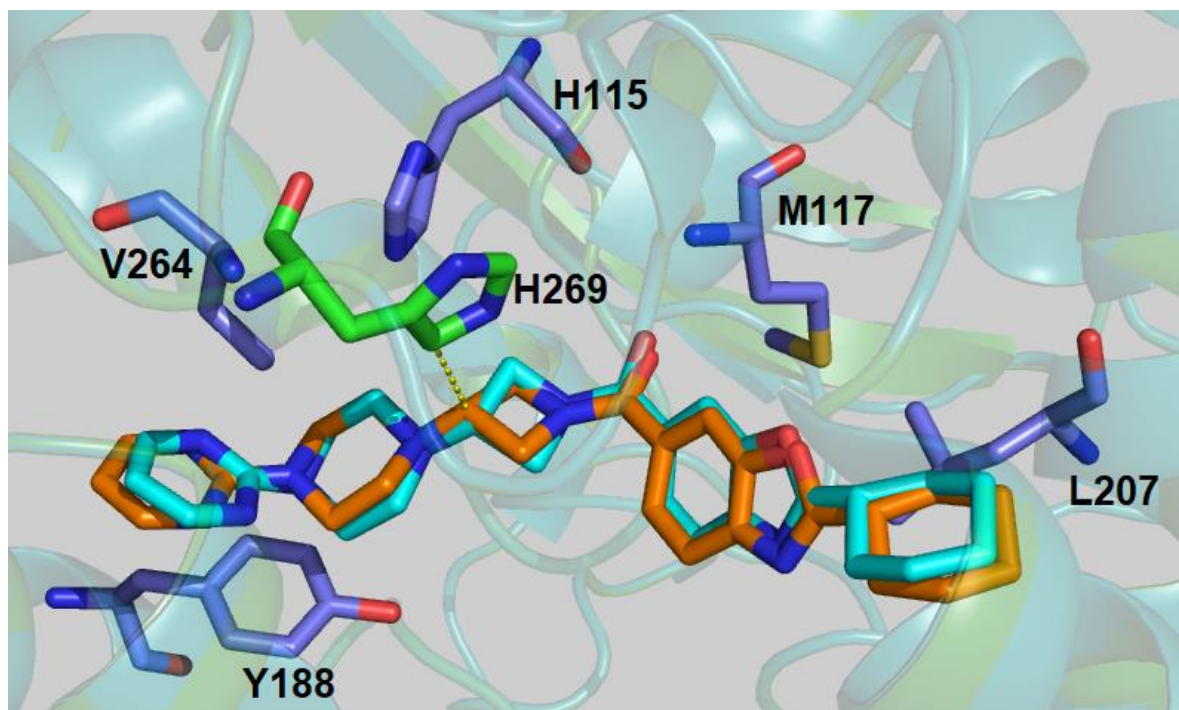


Figura 12: Ligante co-cristalizado na estrutura da MAGL-humana (PDB ID: 3PE6) (em laranja) e pose de ancoragem obtida por redocagem (em ciano), RMSD = 0,6232. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.

Cada metodologia de validação deve ser avaliada, dependendo da finalidade desejada para o protocolo a ser validado, bem como os parâmetros, vantagens e desvantagens de aplicação. Assim, para uma abordagem onde não há ligantes co-cristalizados na proteína de interesse, nem um extenso banco de dados de ligantes ativos para a proteína em questão, se faz necessária a validação com ligantes da literatura. Para isso, utiliza-se ligantes com atividade comprovada frente ao receptor e um conjunto de compostos inativos encontrados na literatura científica e pede-se para o programa classificá-los. Assim é possível avaliar a confiabilidade das funções de pontuação em diferenciar àqueles compostos mais promissores na etapa que se segue (triagem virtual). Alternativamente, após a classificação, pode-se utilizar a curva ROC, como análise pós-ancoragem,⁹² como uma ferramenta de aprimoramento do protocolo, mas nem sempre se faz necessário essa abordagem adicional.

O *docking*, fornece uma classificação (*Score*) das moléculas ancoradas, através da melhor posição obtida no cálculo.^{85,87,88} Esta classificação não pode ser

usada como o único critério para triagem de moléculas promissoras, devendo ser combinada com outros métodos de avaliação, como as interações observadas entre as moléculas e os resíduos-chave dos aminoácidos do sítio ativo, assim como a orientação e a conformação observadas.^{85,93}

Para isso, é necessária a aplicação de funções de pontuação que estimem a variação de energia dos complexos ligante-proteína, previstos pelo programa de ancoragem, por meio da avaliação de fenômenos físico-químicos envolvidos na ligação desses complexos. Essas funções podem ser classificadas em três grupos: funções baseadas no campo de força, empíricas e baseadas em conhecimento (*knowledge-based*).^{85,94}

As funções de pontuação baseadas no campo de força estimam a energia de ligação somando as contribuições de termos físicos para interações atômicas, como interações eletrostáticas, van der Waals, alongamento de ligação e flexão de ângulo das ligações químicas. Este tipo de função de pontuação aplica um método *ab initio* para calcular a energia associada a cada termo, o que pode ser considerada uma vantagem, já que ela pode ser continuamente aperfeiçoada conforme novos campos de força, métodos quânticos e modelos de solvatação são desenvolvidos nos campos teóricos. Contudo, o resultado não tem sido tão adequado, mesmo quando teorias de níveis altíssimos são aplicadas, uma vez que a predição de energia livre se mostra de extrema de complexidade. Alguns exemplos de funções de pontuação baseadas em campo de força são: DOCK, AutoDock, GoldScore, dentre outras.^{85,94-96}

Uma segunda abordagem utilizada para avaliar a energia de ligação do complexo ligante-receptor é a função de pontuação empírica. Para tanto, consideram-se termos de ligações de hidrogênio, interações iônicas e apolares, de van der Waals, eletrostáticas, bem como efeitos de hidrofobicidade e entropia. Uma das vantagens deste tipo de função, além de serem consideravelmente mais rápidas do que as de campo de força, é a simplicidade de seus termos, possibilitando seu ajuste através da adição, remoção ou modificação dos mesmos, permitindo a solução de problemas mais específicos. Contudo, a capacidade preditiva dessa função, por ser empírica, depende da qualidade e consistência dos dados de afinidade reportados na literatura, levando às dificuldades na construção de funções mais eficientes. A função de pontuação LUDI foi o primeiro exemplo de uma função empírica. Outras funções de pontuação empíricas são GlideScore, ChemScore, ChemPLP.^{85,94-96}

As funções de pontuação baseadas em conhecimento, aplicam-se em termos matemáticos baseados na frequência de ocorrência de um contato específico, indicando se essa interação é energeticamente favorável ou não. Ou seja, a pontuação é calculada favorecendo contatos preferenciais e penalizando interações repulsivas. Como essas funções não dependem da reprodução de afinidades de ligação (métodos empíricos) ou de cálculos *ab initio* (métodos de campo de força), elas oferecem um equilíbrio adequado entre precisão e velocidade. Além disso, buscam apontar implicitamente os fatores energéticos do reconhecimento molecular através dos potenciais em pares. Contudo, a definição de um estado inicial onde a interação entre os pares é inexistente é um dos maiores desafios relacionados à construção dessas funções, uma vez que não existe sistema físico real onde essa condição seja observada, sendo então necessárias aproximações que podem comprometer a qualidade do resultado. DrugScore, ITScore e ASP são exemplos de funções de pontuação baseadas em conhecimento.^{85,94-96}

1.7.1 ESTUDOS COMPUTACIONAIS APLICADOS À ENZIMA DAGL- α

Vários estudos já foram executados, visando compreender a atividade de alguns ligantes frente à enzima DAGL- α . Contudo, como não há estrutura cristalográfica disponível para ela, estudos com modelagem molecular comparativa foram realizados para essa finalidade. Todas as enzimas aplicadas possuem a mesma tríade catalítica (Ser-His-Asp) e a mesma dobra α/β hidrolase presente na DAGL- α .^{75,82,97,98}

Baggelaar e colaboradores utilizaram, com o intuito de gerar um modelo farmacofórico inicial, a estrutura cristalográfica do domínio tioesterase da sintase de ácidos graxos humanos (PDB ID: 2PX6). Nela se encontra co-cristalizado o ligante THL, sendo ligado covalentemente à serina catalítica, por meio de seu grupo carbonila da subunidade lactona. Usando esse modelo, foi testado, *in silico*, um conjunto de inibidores de lipase comercialmente disponíveis. Após isso, desenvolveu-se um modelo computacional por modelagem molecular comparativa, visando compreender como ocorriam as interações entre os ligantes com atividade e a enzima huDAGL- α . Para tanto, utilizou-se a estrutura cristalográfica mutante (S146A) da lipase de *thermomyces lanuginosa* (*humicola*) lipase em complexo com ácido oleico (PDB

ID:1GT6).⁹⁷ Outros estudos foram desenvolvidos, utilizando a mesma estrutura cristalográfica como base para a construção de uma estrutura tridimensional da proteína por modelagem molecular comparativa e mesmo usando classes de compostos distintos, como sulfonamidas e α -cetoheterociclos, foi constatado a importância da presença de um doador/aceptor de ligação de hidrogênio (como ácido carboxílico), interagindo com a serina ou a histidina catalítica. Ademais, os ligantes podem ser direcionados pelos resíduos de L410, V526 e I529, criando bolsões hidrofóbicos próximos à tríade catalítica.^{75,82,97,98} Na **Figura 13**, observa-se uma representação das interações obtidas através do modelo por homologia desenvolvido por Janssen *et al*, dentre as interações observadas, destaca-se a ligação de hidrogênio realizada entre o hidrogênio da hidroxila da cadeia lateral da S472 e o oxigênio do ácido carboxílico, destaca-se ainda a interação cátion- π entre o nitrogênio da cadeia lateral da H650 e o anel aromático ligado por espaçador metilênico ao nitrogênio sulfonamídico, além do empilhamento- π observado entre a Y303 e o anel aromático da extremidade da estrutura.

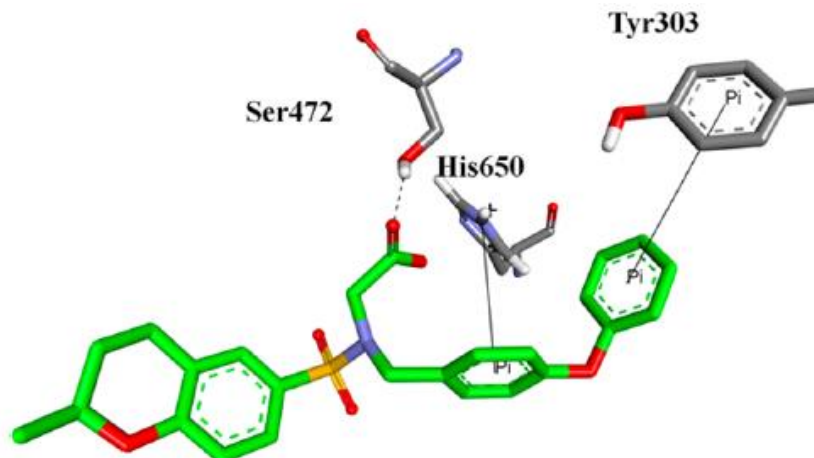


Figura 13: Representação das interações obtidas através do modelo por homologia desenvolvido a partir da lipase de *thermomyces lanuginosa (humicola)* em complexo com ácido oleico (PDB ID:1GT6). **Fonte:** Adaptado de Janssen *et al.*, 2014.⁷⁵

2. OBJETIVO

Este trabalho visa a triagem virtual e síntese de 8 derivados sulfonamídicos, em quantidade e em grau de pureza adequados para a avaliação da atividade inibitória frente a enzima DAGL- α , a qual está diretamente relacionada ao controle do apetite e conseqüentemente pode ser modulada para o tratamento da obesidade. Maior detalhamento pode ser compreendido nas metas a seguir:

- Estudos computacionais para a obtenção de um modelo da DAGL- α que possibilite a compreensão das interações entre compostos com atividade inibitória frente a esta enzima;
- Planejamento, triagem virtual, síntese, isolamento, purificação e caracterização dos 8 derivados de padrão estrutural sulfonamídico;

3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

A partir das estruturas químicas de substâncias com atividade frente à enzima diacilglicerol lipase alfa (DAGL- α), mostradas na **Figura 14**, podemos observar as subunidades aromáticas (destacadas em azul) bifenila, fenila, benzodioxola, dentre outras, assim como a presença de subunidades que podem atuar como doadores ou aceptores de ligação de hidrogênio (destacadas em vermelho) como, carbamato, amida, carbonila, sulfonamida e carboxila.^{82,98,99} Estas subunidades podem inspirar o planejamento estrutural de novas substâncias potencialmente bioativas frente à enzima DAGL- α .

Com o intuito de desenvolver substâncias com potencial bioativo frente à DAGL- α , o planejamento estrutural de novas substâncias pode se inspirar em substâncias com atividade comprovada, mais especificamente suas subunidades estruturais, levando à obtenção de estruturas inéditas.⁸⁴

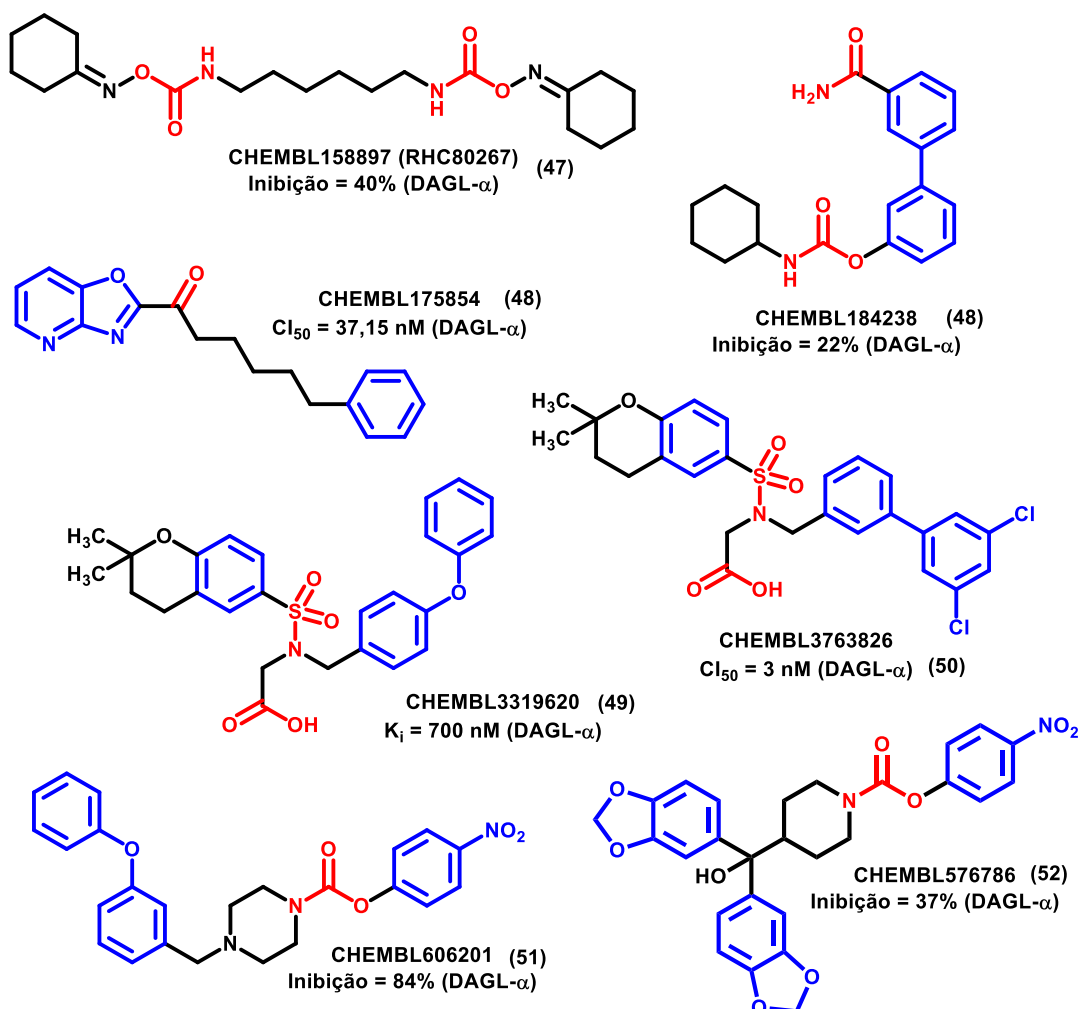


Figura 14: Estruturas químicas de substâncias com atividade frente à enzima DAGL- α .^{82,98,99}

Baseado nessas subunidades, foi possível realizar o planejamento estrutural de 84 derivados sulfonamídicos potencialmente bioativos frente à DAGL- α , que pode ser demonstrado pela **Figura 15**, divididos em **Série A**, **Série B** e seus respectivos análogos simplificados, **SM A** e **SM B**. A **Série A** apresenta o átomo de nitrogênio da sulfonamida também sendo o heteroátomo do anel pirrolidínico, podendo seu átomo de carbono α estar substituído com uma carboxila, éster metílico, assim como amidas *N*-substituídas, de acordo com os grupos representados por “**R**” (contendo subunidades aromáticas, heteroaromáticas, alifáticas, alicíclicas, além de simplificações moleculares) (**Figura 16**). Numa estratégia de simplificação molecular, a 4-metilfenila, ligada ao átomo de enxofre, pode ser substituída por uma metila, gerando **SM A**.

Já a **Série B** apresenta o nitrogênio da sulfonamida ligado diretamente a uma fenila, a qual pode apresentar diferentes substituintes em *-para*, como o grupo amino e seu respectivo derivado *N*-acetilado. No nitrogênio da sulfonamida também se pode variar os substituintes de acordo com o grupo “**R**” (**Figura 16**), para o qual diversas variações podem ser exploradas: outras subunidades aromáticas, heteroaromáticas, alifáticas, alicíclicas, além de simplificações moleculares. Numa estratégia de simplificação molecular, a 4-metilfenila, ligada ao átomo de enxofre, também pode ser substituída por uma metila, fornecendo **SM B**.

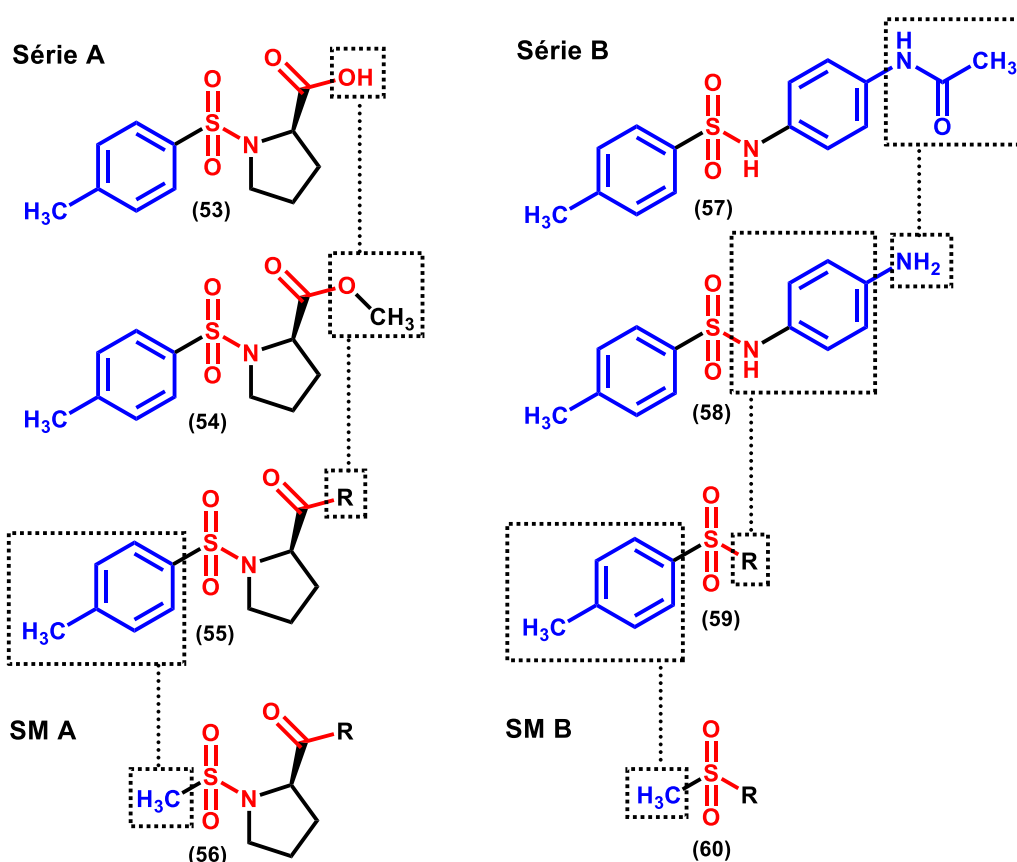


Figura 15: Representação das estruturas químicas das 84 substâncias planejadas possuindo padrão estrutural sulfonamídico (**Séries A e B**), e seus respectivos análogos simplificados, **SM A** e **SM B**.

De forma mais detalhada, na **Figura 16**, destacam-se as 20 variações observadas em “**R**”. A subunidade mostrada em **61** pode ser *N*-metilada para gerar **62** ou ser alongada por meio de um espaçador metileno ($-\text{CH}_2-$) para fornecer **63**. Visando avaliar os efeitos eletrônicos, **61** pode ser nitrada em *para*- fornecendo **64**, nitrada novamente em *orto*- para fornecer **65** e os grupos nitro podem ser removidos e/ou substituídos por grupos metoxila, visando avaliar as contribuições eletrônicas destes dois grupos em **66-68**. Paralelamente, diversas variações de subunidades alifáticas

podem ser exploradas (69-73), assim como as subunidades alicíclicas piperidina, morfolina e tiomorfolina podem ser estudadas em 74-76. Adicionalmente, subunidades heterocíclicas aromáticas são mostradas para 77-80, de modo a tornar possível a avaliação da contribuição delas para a atividade.

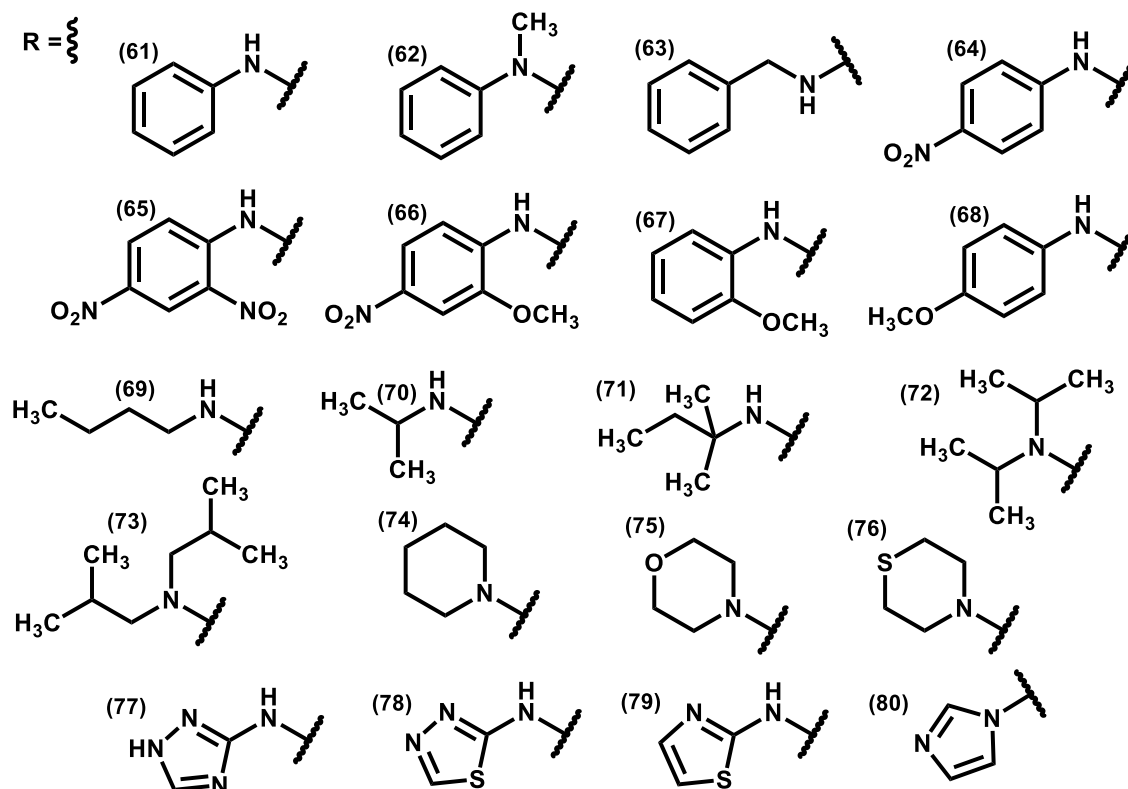


Figura 16: Representação das estruturas químicas dos grupos substituintes, propostos para modificações estruturais

Utilizando ancoragem molecular, serão selecionados, por meio de triagem virtual, utilizando um modelo computacional validado para a enzima DAGL- α , apenas 8 compostos para as etapas de síntese e futura avaliação farmacológica.

4. METODOLOGIA

4.1 ANCORAGEM MOLECULAR COM ENZIMA *PENICILLIUM CAMEMBERTTI* LIPASE (PCL)

Para se obter informações relacionadas à enzima sn-1 DAGL- α , utilizando-se do método baseado na estrutura da biomacromolécula (SBDD), seguiu-se os estudos de modelagem molecular, como preparação do alvo molecular, seleção dos compostos para o banco de dados (validação), ancoragem molecular e análise das poses geradas.⁸⁵

Como não há estrutura cristalográfica pra a DAGL- α , buscou-se a sequência primária (FASTA) da enzima DAGL- α humana no servidor proteômico National Center for Biotechnology Information (NCBI), que foi utilizada para procurar uma estrutura cristalográfica (template) com melhor identidade sequencial (maior que 30%), comparando-se o resíduos de aminoácidos utilizando o servidor Swiss Model, assim encontrou-se a estrutura cristalográfica da cadeia A da mono- e diacilglicerol lipase (MDLA) mutante (N225Q) de *Penicillium Camemberti* lipase (PCL) (PDB ID 5CH8), com 31,50% de identidade sequencial.¹⁰⁰ Foi verificado se os resíduos de aminoácidos de interesse, estariam em regiões favoráveis, permitidas ou não-permitidas (proibidas) no Gráfico de Ramachandran, gerado a partir do servidor RAMPAGE, para tanto observou-se os ângulos diedros ϕ e Ψ .

Paralelamente, buscou-se na literatura substâncias com atividade inibitória frente a DAGL- α , que apresentassem subunidades sulfonamidas, subunidades aromáticas, assim como similaridade estrutural com os derivados propostos, além de estrutura tridimensional bem definida, com os centros estereogênicos conhecidos. Em seguida, as substâncias selecionadas foram agrupadas arbitrariamente (**Tabela 2** - Estruturas químicas ilustradas no **Anexo I**), como 'Muito ativas' ($CI_{50} \leq 100$ nM), 'Ativas' (100 nM $< CI_{50} \leq 1000$ nM), 'Pouco ativas' (1000 nM $< CI_{50} \leq 10000$ nM) e 'Inativas' ($CI_{50} > 10000$ nM), conforme seus valores de atividade.

Tabela 2: Classificação dos valores de atividade das substâncias obtidas da literatura.

Muito Ativos	≤ 100 nM	15 ligantes
Ativos	101 – 1000 nM	15 ligantes
Pouco Ativos	1001 – 10000 nM	15 ligantes
Inativos	> 10000 nM	15 ligantes

Esses ligantes, além dos 84 propostos para o projeto, foram construídos usando o programa Discovery Studio Visualizer (DSV), com seus estados de protonação em pH intracelular (pH 7,4)^{85,87} obtidos com o auxílio do programa MarvinSketch, seguido de minimização energética (MMFF) e otimização através do método semi-empírico PM7, no qual também se utilizou a opção de otimização da geometria das mesmas em conjunto com o cálculo do campo de força dos ligantes, através da interface Mercury CSD, utilizando o MOPAC2016. As estruturas foram

salvas em formato *.mol2 após a otimização geométrica, para serem utilizadas na ancoragem molecular.

Posteriormente, utilizando o programa GOLD, realizou-se a ancoragem molecular, entre as substâncias construídas e minimizadas e a enzima previamente encontrada. Para isso foram usadas diferentes funções de pontuação (ChemPLP, ChemScore, GOLDScore e ASP), com o intuito de avaliar a orientação espacial dos ligantes, bem como suas interações relevantes com a biomacromolécula. Considerando dados de mutagênese disponíveis para a enzima, pode-se observar que o resíduo de Histidina (His, H259) e o resíduo de Serina (Ser, S145), estão envolvidos em importantes interações ligante-proteína, sendo constatado que a H259 é um aminoácido crítico para a função da enzima, enquanto que S145, melhora drasticamente a eficiência das reações que a envolvem.¹⁰⁰ Assim, foi utilizado como átomo de referência, o carbono entre os dois átomos de nitrogênio do grupo imidazol, pertencente ao resíduo H259, localizado na região central em relação aos resíduos da tríade catalítica (**Figura 17**), além do raio definido igual a 10 Å, ancoragem rígida, sítio de ligação anidro e 50 poses de docking para cada ligante, como parâmetros de ancoragem.^{85,101}

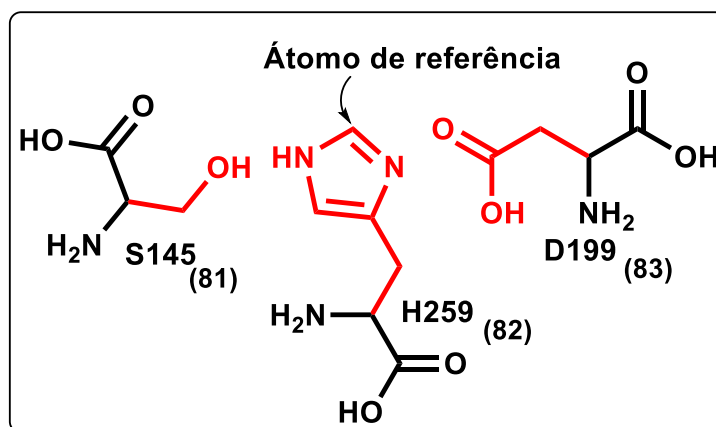


Figura 17: Tríade catalítica (S145, H259 e D199), demonstrando o átomo de referência utilizado em destaque.

Inicialmente, com o objetivo de validar o modelo, realizou-se apenas os estudos de docking com os ligantes buscados na literatura, através da escolha da função de pontuação que melhor se adequou para a aplicação no presente trabalho, levando em consideração as interações das substâncias encontradas na literatura com resíduos do sítio ativo (H259 e S145), bem como suas orientações no sítio ativo. Feito isso, cada complexo foi extraído do programa GOLD, levando em consideração o melhor

valor de pontuação das 50 poses geradas, para cada ligante. Assim, possibilitando observar por meio de análise criteriosa, através do programa DSV, as interações entre os resíduos e os ligantes com atividade *in vitro* comprovada, permitindo a classificação dos ligantes com base em suas características químicas, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, empilhamentos aromáticos, interações hidrofóbicas, entre outras.

Após a validação do modelo, aplicou-se todos os parâmetros de ancoragem molecular utilizados anteriormente e sem alterações, às moléculas propostas para o projeto, utilizando apenas a função de pontuação com melhor desempenho na etapa supracitada, obtendo-se então, dados que foram usados na triagem virtual de possíveis novos inibidores da enzima sn-1-DAGL- α .

4.2 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS

4.2.1 Rota sintética para obtenção dos derivados sulfonamídicos **87** e **89** – Série A

A síntese dos derivados sulfonamídicos **87** e **89** se iniciou com a L-prolina (**84**), juntamente com coreto de tionila (SOCl_2), submetidos a agitação por 1 hora em metanol (MeOH) em banho de gelo e por mais 2 horas a temperatura ambiente. O cloridrato de éster metílico (**85**) obtido foi acoplado ao cloreto de *p*-toluenosulfonila (*p*-TsCl) com auxílio de trietilamina (TEA) em diclorometano (DCM) por 2 horas, resultando em **54**. O produto da reação anterior (**54**) foi colocado em refluxo por 4 horas em hidróxido de sódio e dioxano. Para finalizar a rota sintética, o composto *p*-toluenosulfonil L-prolina (**53**) foi utilizado como precursor dos dois produtos finais da Série A. No primeiro, **53** foi solubilizado em dioxano, juntamente com *p*-metoxianilina (**86**) e colocado no reator de micro-ondas por 1 hora, para a formação do composto **87**. Já para a formação de **89**, *p*-toluenosulfonil L-prolina (**53**), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDCI), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e *o*-metoxi-*p*-nitroanilina (**88**) foram colocados em agitação por 12 horas a temperatura ambiente e atmosfera inerte, como demonstrado pela **Figura 18**.

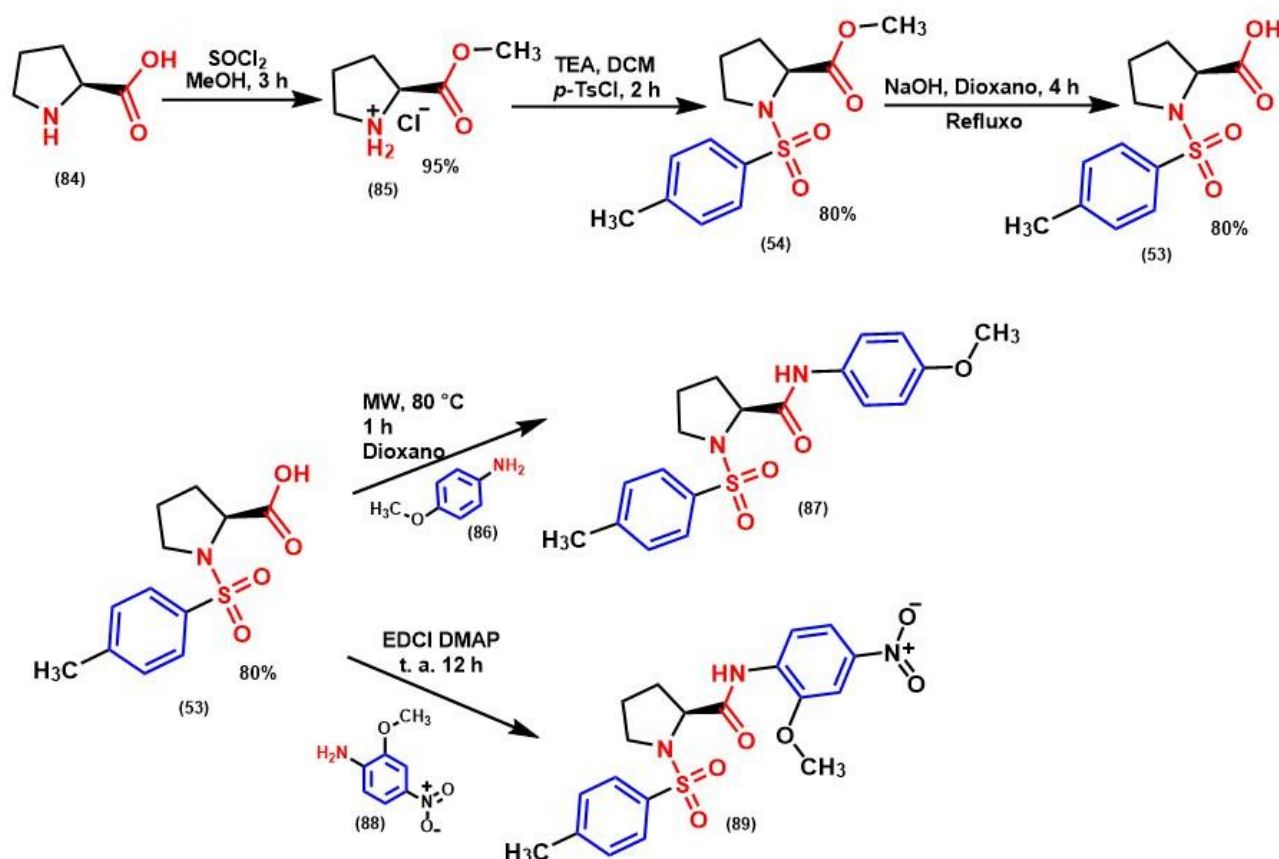


Figura 18: Rota sintética demonstrando as 4 etapas para obtenção de **87** e **89**.

A seguir, são apresentadas de forma detalhada, as metodologias empregadas na rota sintética ilustrada pela **Figura 18**, para obtenção dos compostos da Série A, selecionados por meio da triagem virtual.

4.2.1.1 Metodologia para obtenção do cloridrato do éster metílico da L-prolina (**85**)

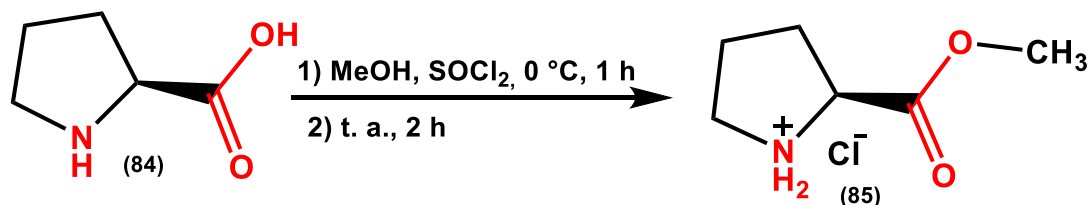


Figura 19: Reação de formação do cloridrato do éster metílico da L-prolina (**85**).

Para a obtenção do cloridrato do éster metílico da L-prolina (**84**), exemplificado pela **Figura 19**, foi utilizado aproximadamente 150 μL (2 mmol) de cloreto de tionila (SOCl_2), adicionado gota a gota em 1 h com agitação e resfriamento, em banho de

gelo, à solução de 116 mg (1 mmol) de L-prolina (**85**) em 1 mL de metanol (MeOH). A mistura foi adicionalmente agitada em temperatura ambiente por 2 horas. Após remover o solvente sob pressão reduzida, obteve-se um sólido branco em rendimento de 95% (157 mg).¹⁰²

R_f = 0,71 em MeOH:CHCl₃ (7:3); RMN de ¹H a 600 MHz, DMSO-d₆ δ-ppm: 10,69 (s, 1H), 9,34 (s, 1H), 4,39 (m, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,25 (m, 2H), 2,29 (m, 1H), 2,04 (m, 2H) e 1,96 (m, 1H).

4.2.1.2 Metodologia para obtenção do intermediário **54**

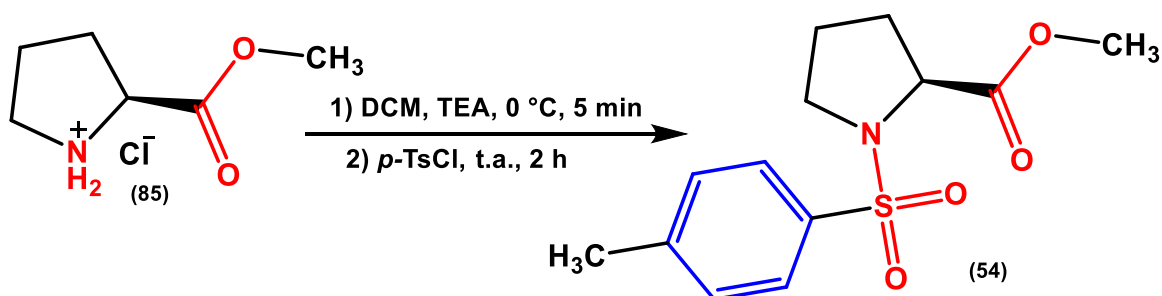


Figura 20: Reação de obtenção da sulfonamida **54**, a partir do cloridrato do éster metílico da L-prolina.

Inicialmente, 165,5 mg (1 mmol) de cloridrato de éster metílico da L-prolina (**85**), obtido na reação anterior, foram recolhidos em um balão de 5 mL, juntamente com 2 mL de DCM anidro a 0 °C. A essa solução, 420 µL (3 mmol) de TEA foram adicionados, gota a gota, e após 5 minutos de agitação à mesma temperatura, adicionou-se 191 mg (1 mmol) de cloreto de *p*-toluenosulfonila sólido (*p*-TsCl). A mistura reacional foi levada lentamente até à temperatura ambiente durante um período de 2 horas, sendo por fim, adicionados 2 mL de água destilada, seguida de agitação por mais 15 minutos. Ao final, esta solução foi recolhida em um funil de separação, sendo então extraída, utilizando-se DCM (3 x 10 mL), seguido de solução saturada de NaCl (1 x 10 mL), coletando-se a fase orgânica, que então foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrada e concentrada sob pressão reduzida, seguida da remoção de solvente residual em bomba de alto vácuo, obtendo-se um sólido laranja, com 80% de rendimento (227 mg).¹⁰³

R_f = 0,58 em MeOH:CHCl₃ (7:3); RMN de ¹H a 600 MHz, DMSO-d₆ δ-ppm: 7,73 (m, 2H), 7,43 (m, 2H), 4,19 (dd, J = 8,6, 4,3 Hz, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,37 (m, 1H), 3,15

(dt, $J = 9,7, 7,0$ Hz, 1H), 2,41 (s, 3H), 1,92 (dtd, $J = 12,4, 8,6, 7,0$ Hz, 1H), 1,83 (m, 2H) e 1,58 (dtt, $J = 12,3, 7,1, 4,8$ Hz, 1H).

4.2.1.3 Metodologia para obtenção da *p*-toluenosulfonil L-prolina (**53**)

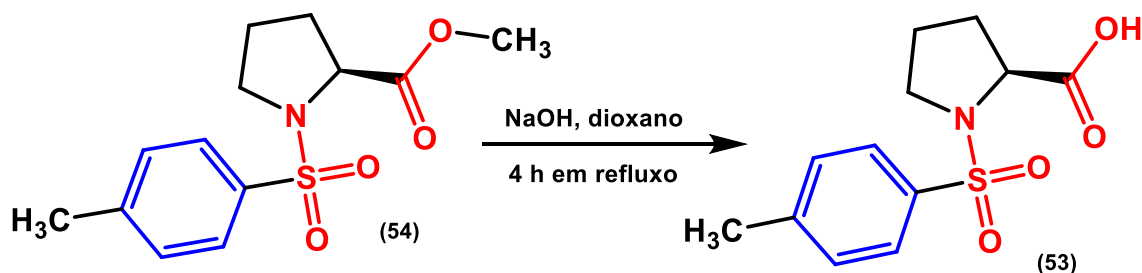


Figura 21: Reação de hidrólise do grupo éster, para a obtenção da sulfonamida (**53**).

Para a obtenção da *p*-toluenosulfonil L-prolina (**53**), a reação demonstrada pela **Figura 21**, foi adaptada de Bertilsson *et al.* (2000), onde 283 mg (1,0 mmol) da sulfonamida **54** foi submetida a refluxo em 6 mL da mistura 1:1 de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M e dioxano, por 4 horas, para a reação de hidrólise de seu grupo éster. Após resfriamento até temperatura ambiente, o pH da mistura resultante foi ajustado para neutro com adição de 6 mL de HCl 1 N e o ácido carboxílico foi extraído da fase aquosa, utilizando DCM (3 x 10 mL) e solução saturada de NaCl (1 x 10 mL). A fase orgânica, então foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrada e evaporada sob pressão reduzida, obtendo-se um óleo incolor com rendimento de 80% (215 mg).¹⁰⁴

$R_f = 0,60$ em MeOH:CHCl₃ (7:3); RMN de ¹H a 600 MHz, DMSO-d₆ δ -ppm: 7,73 (m, 2H), 7,43 (m, 2H), 4,07 (dd, $J = 8,5, 4,4$ Hz, 1H), 3,35 (ddd, $J = 9,6, 7,0, 5,0$ Hz, 1H), 3,14 (dt, $J = 9,8, 7,1$ Hz, 1H), 2,41 (s, 3H), 1,84 (m, 3H) e 1,55 (dddd, $J = 12,1, 7,1, 5,0, 2,0$ Hz, 1H).

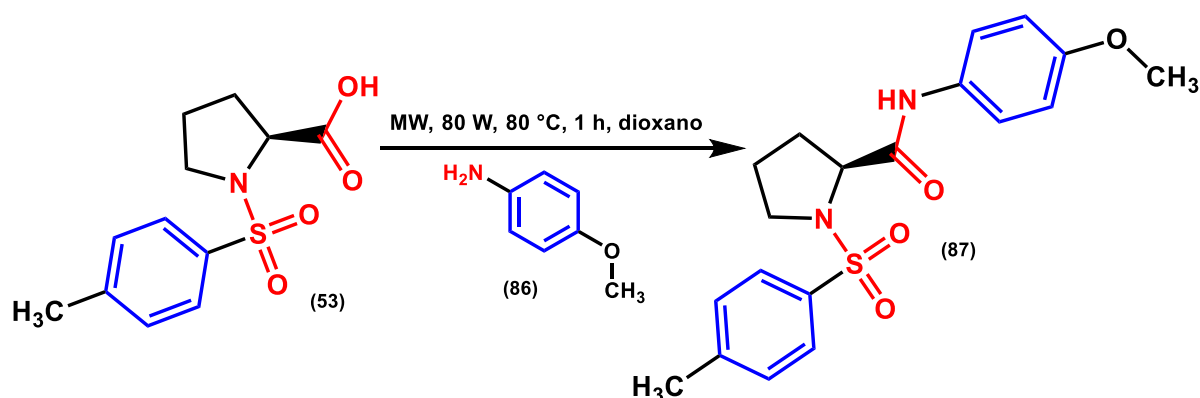
4.2.1.4 Metodologia para obtenção do derivado sulfonamídico **87**

Figura 22: Reação de formação do produto final **87**, proveniente da *p*-anisidina.

Em um tubo para reator de micro-ondas equipado com agitador magnético, adicionou-se 246 mg (2 mmol) de *p*-metoxianilina (**86**) e 269 mg (1 mmol) da *p*-toluenosulfonil L-prolina (**53**). Visando homogeneização, 1 mL de dioxano foi adicionado ao tubo, que foi colocado no reator de micro-ondas científico CEM Discover o qual foi programado com os seguintes parâmetros: Potência = 80 W, Temperatura = 80 °C, Tempo = 1 hora e em sistema fechado.

Ao término da reação, o sistema foi resfriado até temperatura ambiente e a solução foi transferida para um funil de separação, de onde foi coletada a fase orgânica, previamente lavada com solução de HCl 1 N (3 x 10 mL) e solução saturada de NaCl (1 x 10 mL). A fase orgânica, então foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrada e evaporada sob pressão reduzida, obtendo-se um óleo de coloração marrom.¹⁰⁵ Foi necessária purificação do composto obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), obtendo-se 97% de pureza. Ao final do processo um óleo marrom foi obtido com rendimento de 15% (56 mg).

R_f = 0,90 em MeOH:CHCl₃ (1:1); RMN de ¹H a 600 MHz, DMSO-d₆ δ-ppm: 8,67 (s, 1H), 7,76 (d, 2H), 7,51 (d, 2H), 7,37 (d, 2H), 6,88 (d, 2H), 4,18 (dd, J = 8,5, 4,4 Hz, 1H), 3,64 (s, 3H), 3,36 (dd, J = 9,6, 7,0 Hz, 1H), 3,13 (dd, J = 9,8, 7,1 Hz, 1H), 2,40 (s, 3H), 1,86 (m, 3H) e 1,57 (dddd, J = 12,1, 7,1, 5,0, 2,0 Hz, 1H).

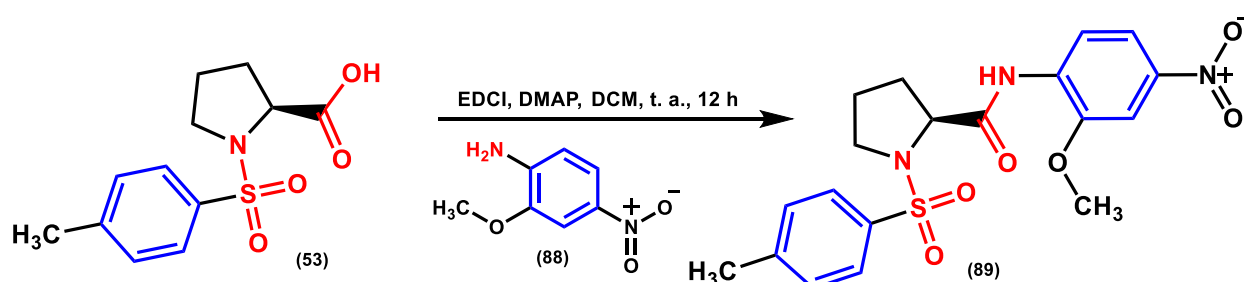
4.2.1.5 Metodologia para obtenção do derivado sulfonamídico **89**

Figura 23: Reação de formação do produto final **89**, proveniente da *o*-metoxi-*p*-nitroanilina.

A uma solução em agitação contendo 172 mg (1 mmol) de *o*-metoxi-*p*-nitroanilina (**88**) e 160 mg (1,3 mmol) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) em 3 mL de DCM, adicionou-se 269 mg (1 mmol) de *p*-toluenosulfonyl L-prolina (**53**), seguida da adição de 202 mg (1,3 mmol) de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDCI) a temperatura ambiente. A mistura reacional resultante foi agitada a mesma temperatura por 12 horas, sendo então lavada, sucessivamente, com solução aquosa de ácido cítrico (10%), água destilada e solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Após extração, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para fornecer um sólido amarelo.¹⁰⁶ Foi necessária purificação do composto obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), obtendo-se 100% de pureza. Ao final do processo, um sólido amarelo foi obtido com rendimento de 30% (120 mg).

$R_f = 0,84$ em MeOH:CHCl₃ (1:1); RMN de ¹H a 600 MHz, DMSO-d₆ δ-ppm: 9,57 (s, 1H), 8,49 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,70 (m, 3H), 7,31 (d, 2H), 4,19 (dd, J = 8,5, 4,4 Hz, 1H), 3,99 (s, 3H), 3,55 (ddd, J = 9,6, 7,0, 5,0 Hz, 1H), 3,17 (dt, J = 9,8, 7,1 Hz, 1H), 2,46 (s, 3H), 1,86 (m, 3H) e 1,57 (dddd, J = 12,1, 7,1, 5,0, 2,0 Hz, 1H).

A seguir, são apresentadas de forma detalhada as metodologias empregadas para obtenção dos compostos da Série B, selecionados por meio da triagem virtual.

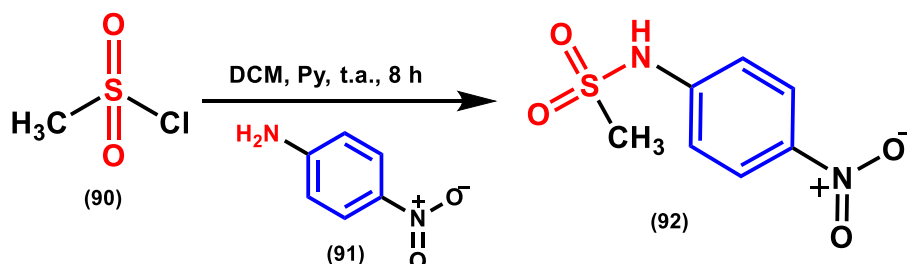
4.2.2 Metodologia para obtenção do derivado sulfonamídico **92** – Série B

Figura 24: Reação de formação da sulfonamida **92**, adaptado de Elgaher, *et al*, 2016.

Foram utilizados 68,0 mg (0,5 mmol) de *p*-nitroanilina (**91**) em 2,5 mL de DCM anidro. A mistura reacional foi adicionada em um balão de 5 mL, juntamente com o agitador magnético. Adicionou-se aproximadamente 44 μ L (0,55 mmol) de piridina (Py) e o sistema reacional foi saturado com atmosfera inerte (Argônio). Em seguida, adicionou-se aproximadamente 43 μ L (0,55 mmol) de cloreto de metanossulfonila (MsCl) (**90**), gota a gota, ao balão de reação. Após isso, a mistura reacional foi submetida a agitação por 8 horas, seguido da remoção do solvente sob pressão reduzida.

O material obtido foi lavado com HCl 1 N (3 x 10 mL), água, *n*-hexano e recolhido por filtração. Um sólido verde foi obtido em rendimento de 94% (99,5 mg).¹⁰⁷

$R_f = 0,53$ em Hexano:AcOEt (7:3); RMN de ^1H a 600 MHz, DMSO- d_6 δ -ppm: 10,82 (s, 1H), 8,30 (m, 2H), 7,43 (m, 2H), 3,25 (s, 3H).

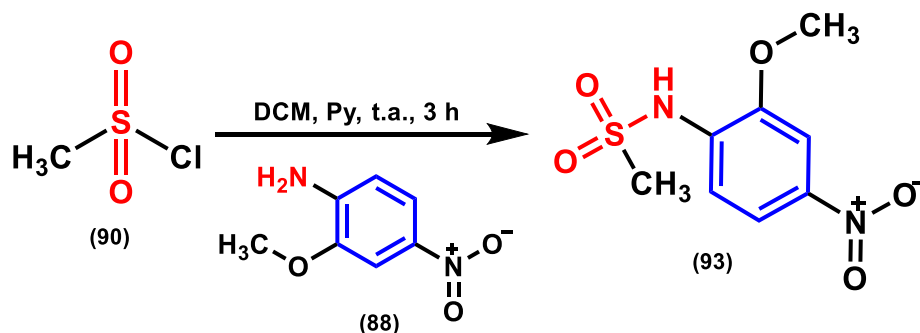
4.2.3 Metodologia para obtenção do derivado sulfonamídico **93** - Série B

Figura 25: Reação de formação da sulfonamida **93**, adaptado de Kloeckner *et al*, 2014.

Inicialmente, 172 mg (1 mmol) de *o*-metoxi-*p*-nitroanilina (**88**) foram adicionados em um balão de 5 mL, juntamente com 2 mL de DCM anidro. Foi

adicionado o agitador magnético e em seguida o sistema reacional foi saturado com atmosfera inerte (Argônio).

Posteriormente, adicionou-se 120 μL (1,5 mmol) de Py. Imergiu-se o balão em banho de gelo. Após isso, adicionou-se aproximadamente 86 μL (1,1 mmol) de MsCl (**90**), gota a gota, ao balão de reação e a mistura reacional foi aquecida lentamente à temperatura ambiente, permanecendo sob agitação por 3 horas.

O processo de isolamento se iniciou com adição de 2,5 ml de água destilada, sendo então extraída com DCM (3 x 10 mL), seguido de solução saturada de NaCl (1 x 10 mL). Em seguida, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para fornecer um sólido amarelo.¹⁰⁸ Sendo necessária uma etapa adicional de purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.2.4 Metodologia para obtenção do derivado sulfonamídico **96** e **97** - Série B

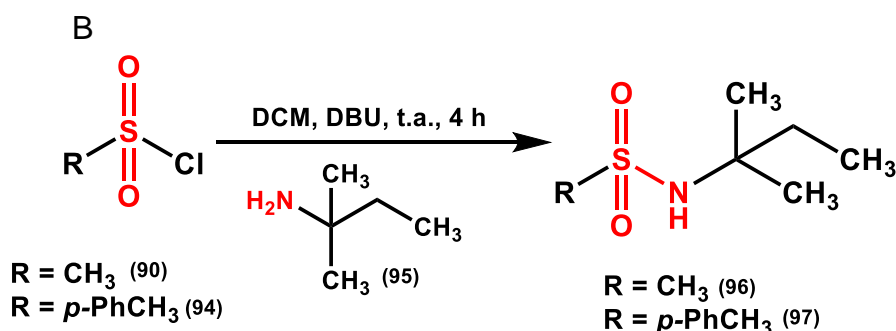


Figura 26: Reação de formação da sulfonamida **96** e **97**, adaptado de Dutra *et al*, 2014.

Inicialmente, 394 μL (3,3 mmol) de 2-metilbutan-2-amina (**95**), 5 mL de DCM anidro e 504 μL (3,3 mmol) de 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) foram adicionados em um balão de 25 mL. Foi adicionado o agitador magnético e em seguida o sistema reacional foi saturado com atmosfera inerte (Argônio). Após saturação com atmosfera inerte, adicionou-se, aproximadamente, 531 mg (2,73 mmol) de *p*-toluenossulfonila (*p*-TsCl) (**94**) ao balão de reação em pequenas porções. E seguida, a mistura reacional foi agitada por 4 horas, fornecendo **97**.

Para obtenção de seu análogo simplificado (**96**), 787 μL (6,6 mmol) de 2-metilbutan-2-amina (**95**), 10 mL de DCM anidro e 1 mL (6,6 mmol) de DBU foram adicionados em um balão de 10 mL. Seguiu-se o mesmo procedimento acima,

adicionando, aproximadamente 431 μL (5,5 mmol) de MsCl (**90**), gota a gota, ao balão de reação. E seguida a mistura reacional foi agitada por 4 horas, fornecendo **96**.

No processo de isolamento, utilizou-se uma solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (pH calculado em 9), para a realização da extração quimicamente ativa. A fase orgânica foi coletada e seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Um óleo laranja foi obtido em rendimento de 41% (367 mg) para o produto obtido a partir do MsCl (**90**). Já para o produto obtido do *p*-TsCl (**94**), obteve-se um óleo incolor, sendo necessária uma etapa adicional de purificação por coluna flash.¹⁰⁹

Composto **96**: $R_f = 0,67$ em $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (7:3); RMN de ^1H a 600 MHz, DMSO-d_6 δ -ppm: 6,69 (s, 1H), 2,92 (s, 3H), 1,54 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,22 (s, 6H), 0,84 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H).

4.2.5 Metodologia para obtenção do derivado sulfonamídico **99** – Série B

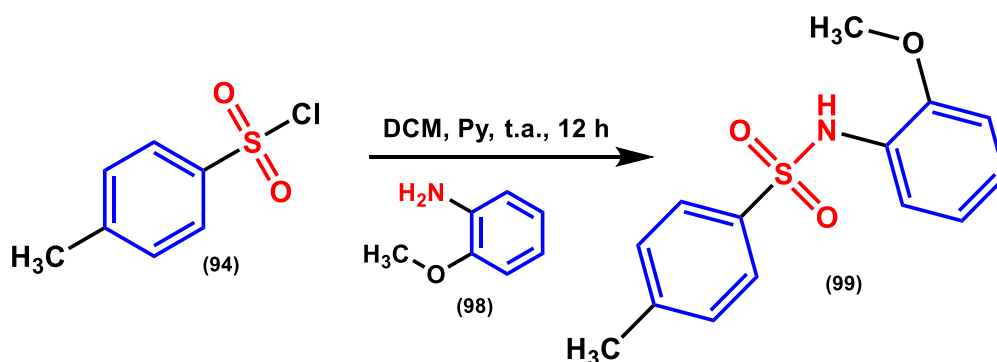


Figura 27: Reação de formação da sulfonamida **99**, adaptado de Laha *et al*, 2014.

Foram utilizados 195 mg (1 mmol) de *p*-TsCl (**94**) em 2 mL de DCM anidro. A mistura reacional foi adicionada em um balão de 5 mL, juntamente com o agitador magnético. Adicionou-se aproximadamente 160 μL (2 mmol) de Py e o sistema reacional foi saturado com atmosfera inerte (Argônio). Em seguida, adicionou-se aproximadamente 137 μL (1,2 mmol) de *o*-metoxianilina (**98**) ao balão de reação. Após isso, a mistura reacional foi submetida a agitação por 12 horas.

O processo de isolamento se iniciou com a adição de 2 mL de água destilada, sendo então extraída, utilizando-se DCM (3 x 10 mL), seguido de solução saturada de NaCl (1 x 10 mL). Em seguida, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o

solvente foi evaporado sob pressão reduzida para fornecer um sólido avermelhado em rendimento de 82% (228 mg).¹¹⁰

R_f = 0,56 em MeOH:CHCl₃ (7:3); RMN de ¹H a 600 MHz, DMSO-d₆ δ-ppm: 9,38 (s, 1H), 7,60 (m, 2H), 7,31 (m, 2H), 7,20 (dd, J = 7,9, 1,6 Hz, 1H), 7,10 (ddd, J = 8,1, 7,4, 1,6 Hz, 1H), 6,91 (dd, J = 8,2, 1,3 Hz, 1H), 6,86 (td, J = 7,6, 1,3 Hz, 1H), 3,51 (s, 3H), 2,35 (s, 3H).

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

O monitoramento das reações ocorreu com aplicação da cromatografia em camada fina (CCF), em placas com reveladores sensíveis a radiações de 254 nm e 365 nm, utilizando ácido fosfomolibdico como revelador químico quando necessário. Para a purificação dos compostos obtidos, foi utilizada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), por meio do cromatógrafo líquido shimadzu, bombas modelo LC-20AT, com detector de arranjo de diodos UV-DAD, modelo SPD-M20-A, injetor automático modelo SIL-20A, comunicador modelo CBM 20A e a aquisição de dados foi realizada com o software LC Solution versão 1.23-SP. A coluna utilizada foi da marca Phenomenex C-18, com dimensões de 250 mm x 10 mm.

4.4 CARACTERIZAÇÃO COM TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos no espectrômetro de RMN Bruker Fourier 600, operando com frequência de 600 MHz para os núcleos de hidrogênio e 150 MHz para os átomos de carbono. Os espectros de RMN foram processados com o software MestreNova 6.0.2. Para obtenção dos espectros de infravermelho, foi utilizado o equipamento FT-IV da Vertex-70, com detector DLaTGS, com o modo ATR selecionado. Para processamento dos dados de infravermelho foi selecionado o software Origin 8.

4.5 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DAS MOLÉCULAS OBTIDAS

Foi utilizado o cromatógrafo a líquido Shimadzu. Modelo das bombas: LC-20AT, com detector de arranjo de diodos UV-DAD modelo SPD-M20-A, injetor automático modelo SIL-20A, comunicador modelo CBM 20A e a aquisição de dados foi realizada

com o software LC Solution, versão 1.23-SP. A coluna utilizada foi da marca Phenomenex C-18, com dimensões de 250 mm x 4,6 mm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANCORAGEM MOLECULAR DA ENZIMA *PENICILLIUM CAMEMBERTTI* LIPASE (PCL)

Visando compreender como substâncias obtidas da literatura científica, com atividade inibitória frente à enzima DAGL- α , interagem, foram realizados estudos de ancoragem molecular, utilizando um modelo baseado na estrutura cristalográfica da cadeia A da mono- e diacilglicerol lipase (MDLA) mutante N225Q de *Penicillium Camemberti* lipase (PCL)¹⁰⁰ (**Figura 28**) (PDB ID 5CH8), com resolução de 1,62 Å, a qual pôde ser obtida através do sítio Protein Data Base (PDB), visto que não há estrutura cristalográfica conhecida para a DAGL- α humana.

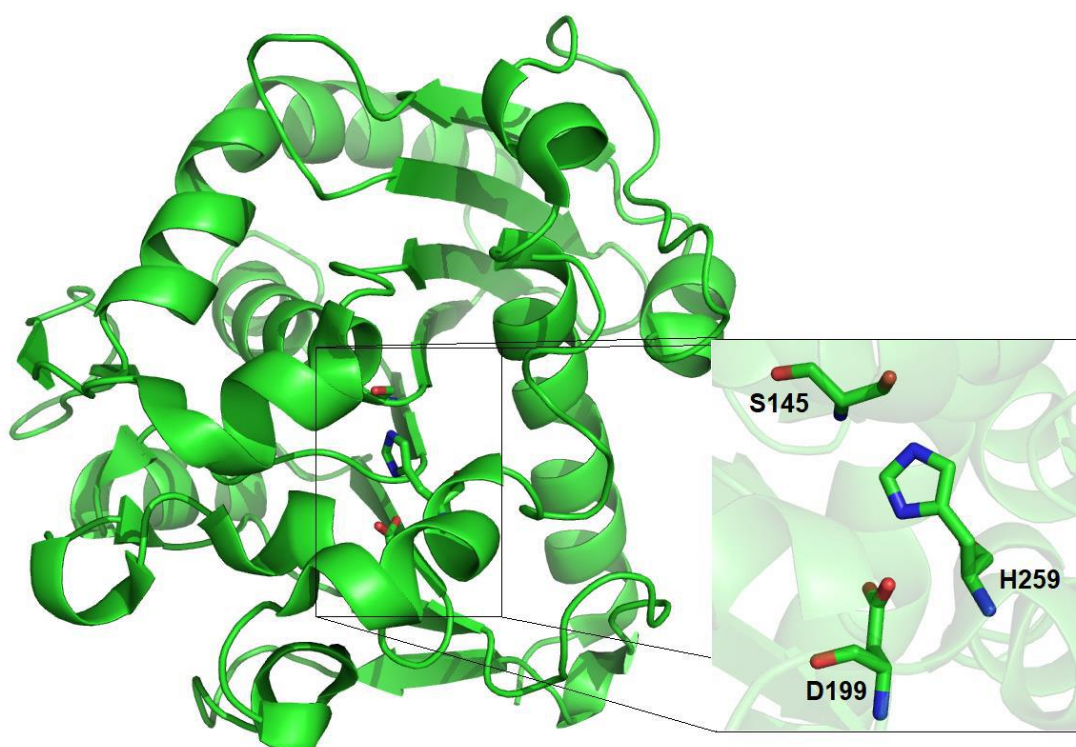


Figura 28: Estrutura cristalográfica de *Penicillium Camemberti* lipase (PDB ID 5CH8). Demonstrando a tríade catalítica em destaque (S145, H259 e D199)¹.

¹ Representação em verde (átomos de carbono), em vermelho (átomos de oxigênio) e em azul (átomos de nitrogênio). Hidrogênios são omitidos para maior clareza.

Para a seleção da estrutura cristalográfica, a sequência primária (FASTA) da DAGL- α humana foi obtida do servidor proteômico do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e após identificação da melhor correlação entre os resíduos de aminoácidos, utilizando o servidor Swiss Model, constatou-se identidade sequencial de 31,50% entre a estrutura cristalográfica (PDB ID 5CH8) e a sequência primária da DAGL- α .

Além da alta similaridade estrutural, também é observada a preservação do arranjo dos resíduos catalíticos, representada pelo alinhamento das sequências primárias das duas lipases (**Figura 29**), sendo possível verificar o alto índice de conservação, principalmente dos resíduos S145/S472 e D199/D524 do sítio catalítico das duas enzimas. Também se observou que o resíduo de aminoácido H650 (pertencente a DAGL- α) não demonstrou conservação com H259 (pertencente a PCL), o que pode ser explicado pela diferença de tamanho entre as duas enzimas, não permitindo que o alinhamento alcance o último resíduo da tríade catalítica. Porém, esse tipo de alinhamento não nos dá informações relativas à posição espacial dos resíduos de interesse. Para isso, Pedicord *et al* em 2011, através de dados de mutagênese dirigida, relataram que a substituição dos resíduos catalíticos S472 e D524 por alaninas diminuía a atividade da enzima DAGL- α drasticamente. Já a identificação da histidina catalítica não foi trivial, devido a limitação da homologia das estruturas tridimensionais conhecidas, bem como dos alinhamentos unidimensionais.⁷⁹ Assim, seis potenciais histidinas foram substituídas por alaninas e observou-se que apenas a mutação da H650 causou a perda completa da atividade⁷⁹, revelando o terceiro aminoácido do sítio catalítico, uma vez que o mecanismo geral de catálise das lipases ocorre por meio da ativação da serina catalítica, através dos resíduos de aspartato e histidina (**Figura 8**).^{80,81}

Além disso, considerando dados de mutagênese disponíveis para a enzima PCL, pode-se observar que o resíduo de H259 e o resíduo de S145, estão envolvidos em importantes interações ligante-proteína, sendo constatado que a H259 é um aminoácido crítico para a função da enzima, enquanto que S145, melhora drasticamente a eficiência das reações que a envolvem,¹⁰⁰ corroborando que essa enzima pode ser empregada para os estudos de modelagem molecular, por conta da similaridade estrutural e os resíduos-chave conservados.

<u>PDB 5CH8</u>	-----			
<u>hu-DAGL-α</u>	1	MPGIVFRRRWSVGSDDLVLPAIFLFLHHTWFVILSVVLFGLVYNPHEACSLNLVDHGRGYLGILLSCMIAEMAIWLS	80	
<u>PDB 5CH8</u>	-----			
<u>hu-DAGL-α</u>	81	MRGGILYTEPRDSMQYVLYVRLAILVIEFIIYAIVGIVWLQYYTSCNDLTAKNWTLGMVVCNWWVILSVICITVLCVFDPT	160	
<u>PDB 5CH8</u>	-----			
<u>hu-DAGL-α</u>	161	GRTFVKLRATKRRQRNLRTYNLRHRLEEGQATSWSRRLKVFLCCTRTKDSQSDAYSEIAYLFAEFFRDLDIVPSDIIAGL	240	
<u>PDB 5CH8</u>	1	-----DVSTS-----ELDQFEFVQYAAASYEADYT-----AQV	30	
<u>hu-DAGL-α</u>	241	VLLRQRQRAKRNAVLDEANNIDILAFLSGMPVTRNTKYLDLKNSEQMLRYKEVCYMLFALAAYGHPMYLMRKPACGLCQL	320	
<u>PDB 5CH8</u>	31	GDKLSC-----SKGNCPEVEATGATVSYDFSDSTIT-----DTAGYIADVHTNSAVVLAFR	81	
<u>hu-DAGL-α</u>	321	ARSCSCCLCPARPRFAPGVTIEEDNCCGCNAI--AIRRHFLDENMTAVDIVYTSCHDAVYETPFYVAVDHDKKKVVISIR	398	
<u>PDB 5CH8</u>	82	GSYSVRNMVADATFVHTN---PGLCDGCLAELGFWSWKLVRRDDIIKELK-----EVVAQNPNYELVVVGS	151	
<u>hu-DAGL-α</u>	399	GTLSFKDALDLDLGAERLPVEGHGHTLWGHKGMVLSAEYIKKKLEQEMVLSQAFGRDLGRGTRKHYGLIVVGS	478	
<u>PDB 5CH8</u>	152	TLAATDLRGKGYPSAKLYAYASPRVGNAAAKYITAQGNFRFHTDIPKLPLLSM-GYVHVSPEY--ITSPNQATV	228	
<u>hu-DAGL-α</u>	479	AILSFLLRPQ-YPTLKCFAYSPPGGLLSEDAEYKKEF-VTAVVLGDIYPRIGLSQLEGFRRQLLDVLRSTKPKWRII	556	
<u>PDB 5CH8</u>	229	--STSDIKVIDGDVDFDNGTGTGLPLLTDFAHIIWYFVQVDAGKGPLPFKRV-----	279	
<u>hu-DAGL-α</u>	557	VGATKCIKSELPEEVEVTTLASTRLWT---HPSDLTIALSASTPLYPGRIIHVHHPAEQCCCEQEPTFYFAIWG	632	
<u>PDB 5CH8</u>	-----			
<u>hu-DAGL-α</u>	633	DNKAFNEVIISPAMLHEHLPYVVMMEGLNKVLENYNKGKTALLSAAKVMVSPTEVDLTPELIFQQQLPTGPPMPTGLALE	712	
<u>PDB 5CH8</u>	-----			
<u>hu-DAGL-α</u>	713	LPTADHRNSSVRSKSQSEMSLEGFSEGRLLSPVVAARQDPVELLLSTQERLAAELQARRAPLATMESLSDTESLYSF	792	
<u>PDB 5CH8</u>	-----			
<u>hu-DAGL-α</u>	793	DSRRSSGFRSIRGSPSLHAVLERDEGHLYIDPAIPEENPSLSSRTELLAADSLSKHSQDTQPLEAALGSGGVTPERPSS	872	
<u>PDB 5CH8</u>	-----			
<u>hu-DAGL-α</u>	873	AAANDEEEVGGGGGPPASRGELALHNGRLGDSFSPQVLEFAEFIDSLFNLDKSSSFQDLYCMVVPESPTSDYAEQPKS	952	
<u>PDB 5CH8</u>	-----			
<u>hu-DAGL-α</u>	953	PSQQEILLRAQFEPNLVPKPPRLFAGSADPSSGSLSPFPLSSSGELMDLPTGLSSQECLAADKIRTSPTGHSQSPA	1032	
<u>PDB 5CH8</u>	-----			
<u>hu-DAGL-α</u>	1033	KQDELVISAR	1042	

Figura 29: Sobreposição da sequência primária das lipases PCL (PDB 5CH8) e DAGL- α humana, com identificação da posição dos resíduos conservados ou homólogos.²

Ademais, verificou-se os ângulos φ e Ψ dos resíduos de aminoácidos da estrutura cristalográfica da enzima PCL, por meio do servidor online RAMPAGE,¹¹¹ observando-se através do Gráfico de Ramachandram obtido, que os resíduos catalíticos não estão em regiões proibidas (**Figura 30**). Destes, a S145 encontra-se em região permitida (juntamente com S58, D92, T197 e F263 – aminoácidos que se

² Resíduos em vermelho estão completamente conservados, resíduos em azul estão substituídos por resíduos homólogos, mas na mesma posição. Os resíduos destacados por caixas demonstram a conservação e alinhamento (S145/S472 e D199/D524) do sítio catalítico das duas enzimas. E destacados por estrelas, os resíduos H259 (PDB 5CH8) e H650 (DAGL- α).

mostraram de pouca importância para o estudo). Os demais (98,1%), encontram-se em regiões favoráveis, possibilitando a continuidade do trabalho com esta enzima.

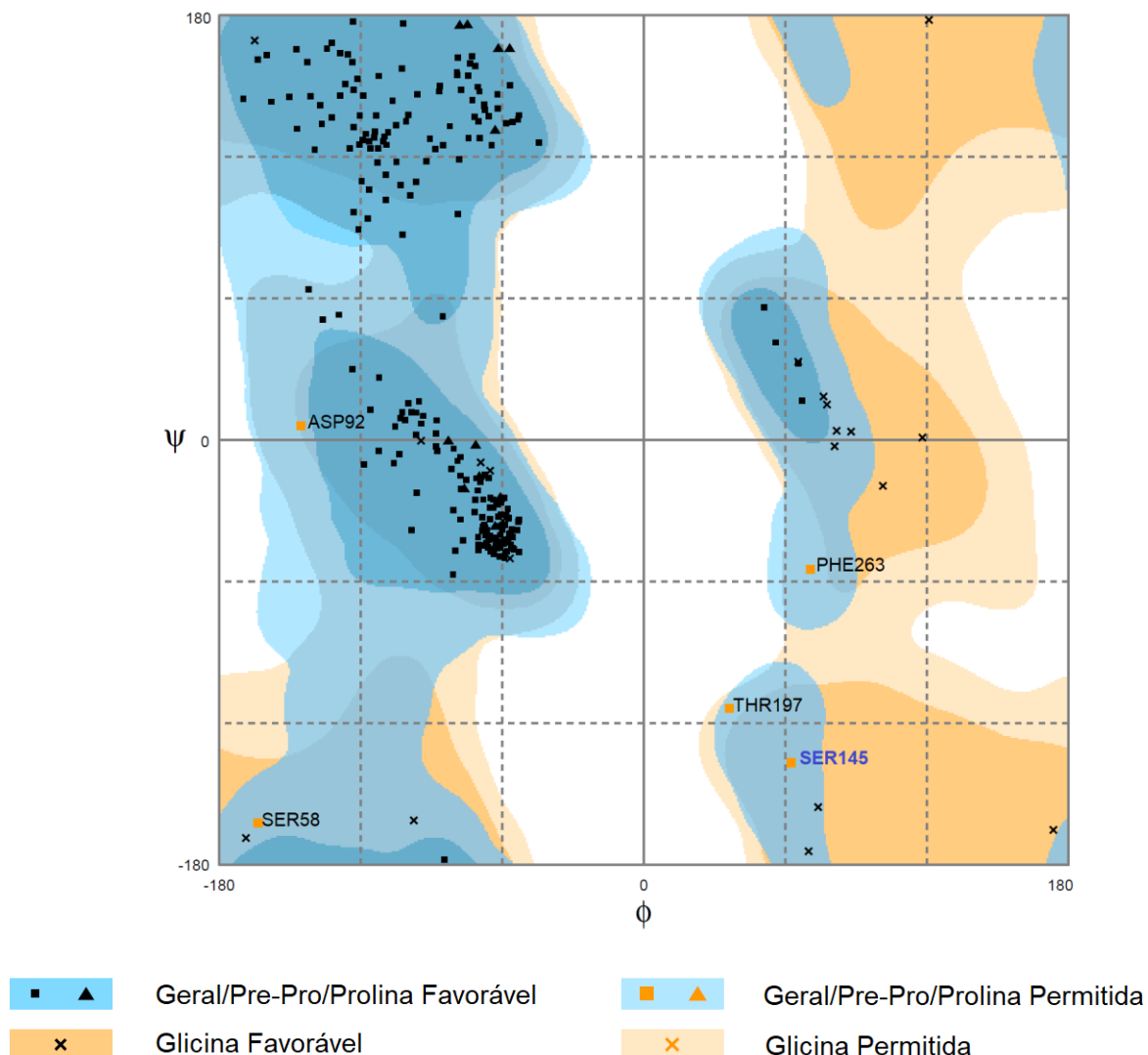


Figura 30: Gráfico de Ramachandram para a estrutura cristalográfica de *Penicillium Camembertii* lipase (PDB ID 5CH8).

Após a construção e otimização dos ligantes da literatura científica (conforme descrito na seção 4.1), foram realizados os estudos de ancoragem molecular, avaliando-se as quatro funções de pontuação (ChemPLP, ChemScore, GOLDScore e ASP). Foram analisadas as interações dos ligantes descritos na literatura com resíduos chave para a atividade, bem como suas orientações no sítio ativo como parâmetros de distinção, visto que não é possível correlacionar diretamente os valores de atividade (CI_{50}) com as pontuações (SCORE) obtidas, de forma confiável.⁹¹

Foi possível observar, por meio do programa DSV, que as funções de pontuação que demonstraram maior número de interações entre as substâncias da

literatura e os resíduos do sítio ativo (H259 e S145), foram ASP e GoldScore (**Anexo II**), sendo ASP escolhida por apresentar melhor desempenho na previsão de interações-chave entre os resíduos catalíticos e as moléculas selecionadas da literatura, como demonstrado na **Tabela 3**.

Na **Figura 31**, é mostrada a melhor pose de ancoragem molecular, obtida com a função de pontuação ASP, para um ligante classificado como “Ativo”, com $CI_{50} = 302$ nM (**Anexo I – Figura 2**), no modelo *in silico* da enzima PCL. Podemos observar que o nitrogênio do aromático do ligante realiza ligação de hidrogênio não-clássica com a cadeia lateral do resíduo de H259, assim como a cadeia lateral do resíduo de S145 realiza o mesmo tipo de interação com um dos hidrogênios da subunidade piridina, além de interação similar com um dos átomos de flúor, enquanto que esse último também participa de uma ligação de halogênio com a espinha dorsal do resíduo de H144.^{112,113,114} Adicionalmente, o resíduo de Y84 realiza interação do tipo empilhamento T, se encontrando em uma aproximação ortogonal em relação a subunidade *p*-clorofenila, ligada à sulfonamida. Por fim, observa-se uma interação hidrofóbica entre o grupo trifluormetila e o anel aromático do resíduo Y21.

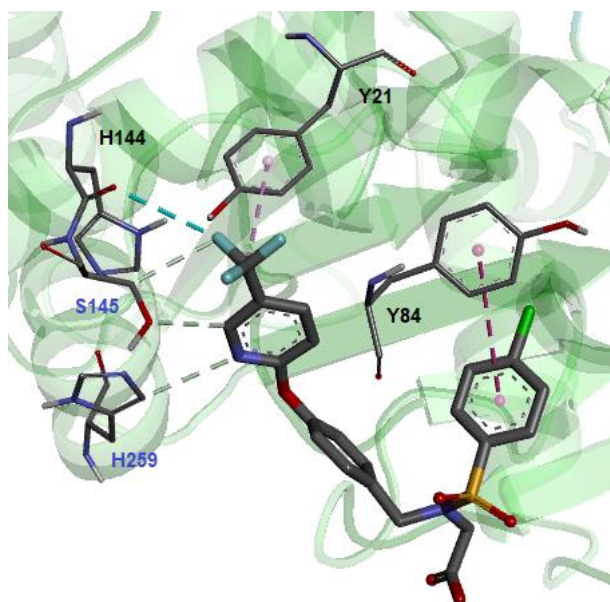


Figura 31: Representação da melhor pose de docking, obtida com a função ASP, de uma estrutura classificada como ‘Ativa’ com $CI_{50} = 302$ nM, indicando as interações com os resíduos-chave da enzima PCL.³

³ H259: Ligação de Hidrogênio não-clássica; S145: Ligação de Hidrogênio não-clássica; H144: Interação de Halogênio; Y21: Hidrofóbica; Y84: Empilhamento T. (Linhas tracejadas em cinza – Ligação de Hidrogênio não-clássica; linhas tracejadas em azul – Ligação de halogênio; linhas tracejadas em rosa e lilás – Hidrofóbica e empilhamento T, respectivamente). Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.

A função ASP também foi a única capaz de discernir entre ligantes ativos e inativos, por meio da interação desses com resíduos de interesse, tais como H259, H144, Y21 e Y84. Como pode ser observado na **Tabela 3**, os resíduos acima citados demonstram maior frequência de interações (dada em porcentagem) para as moléculas agrupadas como 'Ativas', quando comparados com àquelas classificadas como 'Inativas' para a função ASP, tornando-se então a função de pontuação válida para a etapa de triagem, pois, dentre as quatro funções utilizadas no estudo, foi a única capaz de posicionar as moléculas de forma que as porcentagens de interações observadas estivessem de acordo com os valores de potência (CI₅₀), quando separadas em macro grupos ('Ativas' e 'Inativas').

Tabela 3: Demonstrativo das porcentagens de interações, por resíduo, para classificação das substâncias da literatura, referentes à função ASP.

Função - ASP				
Ligantes/Resíduos	H259	H144	Y21	Y84
Ativas	53,3%	33,4%	30%	30%
Inativas	16,7%	13%	13%	20%

Escolhida a função ASP, o próximo estágio do trabalho proposto foi a triagem virtual, onde primeiro se observou os resíduos de aminoácidos que constantemente estavam envolvidos com as substâncias agrupadas como 'Ativas', (H259, H144, Y84 e Y21), com base em seus respectivos percentuais de interações. Utilizando-os como marcadores, foi possível a avaliação e escolha de 8 compostos, dentre os 84 planejados para o projeto, caracterizados como mais promissores quanto à atividade inibitória frente à enzima alvo, para posteriormente serem sintetizados.

5.2 COMPOSTOS SELECIONADOS PARA A ETAPA DE SÍNTESE COM BASE NOS ESTUDOS *IN SILICO*

Baseado nas informações discutidas na seção 5.1, foram selecionados 8 derivados para a etapa de síntese, como demonstrado na **Figura 32**. As interações entre as substâncias e os resíduos de aminoácidos previstas pelo modelo computacional validado estão ilustradas pela **Tabela 4**.

Tabela 4: Interações previstas para os 8 derivados sulfonamídicos selecionados para a etapa de síntese. Os resíduos de interesse estão em destaque (vermelho).

Ligante	ASP	H259	H144	Y84	Y21	R87	K270	D267	F256	V86	I260
89	28,6085	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
87	26,3724	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
99	25,5643	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
93	24,3898	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
100	22,7781	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
92	21,9389	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
97	19,8718	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
96	16,8574	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Interações:

- Ligação de hidrogênio com átomos da ligação peptídica
- Ligação de hidrogênio com átomos da cadeia lateral do resíduo
- Ligação de hidrogênio não clássica
- Ânion- π
- Cátion- π
- Empilhamento-T
- Empilhamento- π
- π -Enxofre
- Hidrofóbica

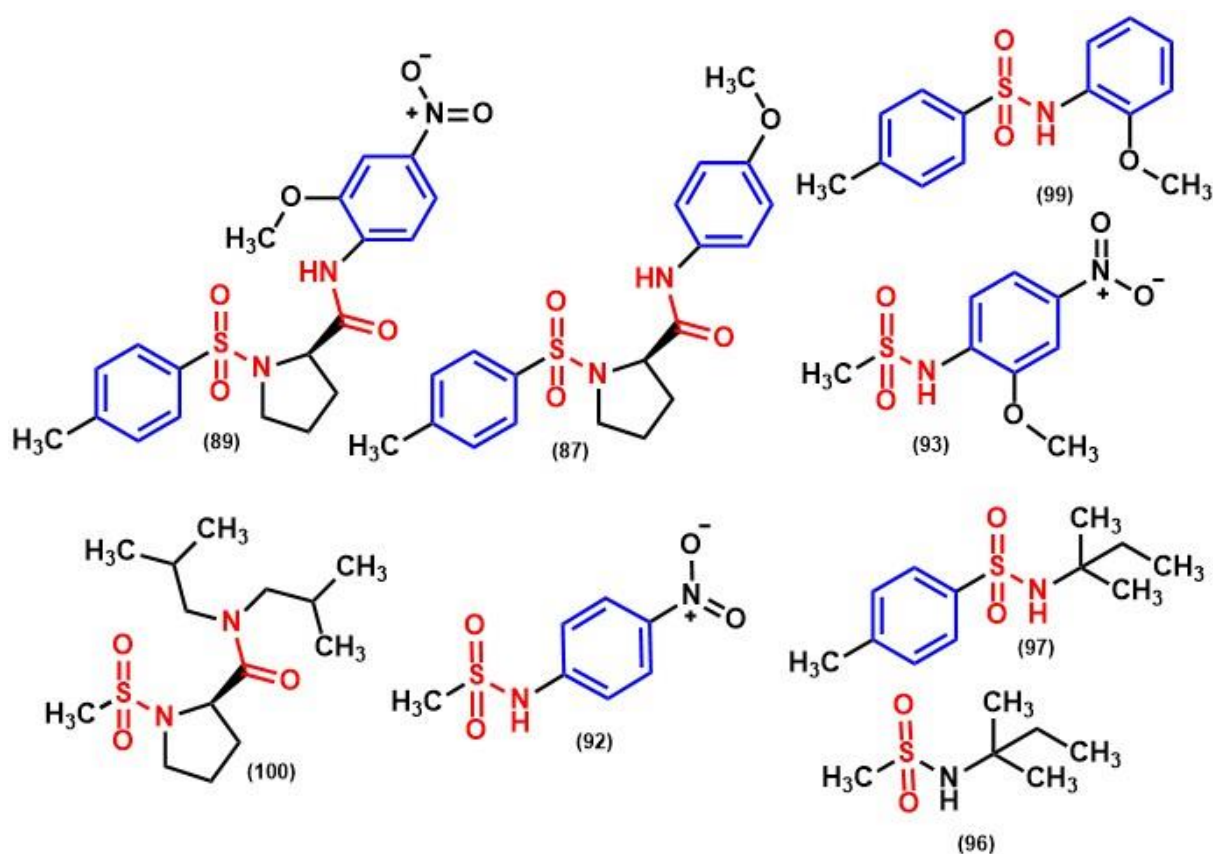


Figura 32: Compostos sulfonamídicos selecionados com base nos estudos *in silico*, como candidatos a ligantes da enzima sn-1 DAGL- α .

É possível observar pelos dados mostrados na **Tabela 4**, que todos os ligantes selecionados interagem com a H259 catalítica, bem como com outros resíduos de interesse. Ademais, observa-se por meio da **Figura 32**, que as moléculas selecionadas como as mais promissoras apresentam em sua estrutura grupos

aceptores/doadores de ligação de hidrogênio e pelo menos um anel aromático, com exceção das substâncias **96** e **100**, em concordância com os dados encontrados na literatura, que mostraram a importância desses requisitos estruturais para a atividade.^{75,82,97,98} A sobreposição das substâncias triadas pelo modelo computacional é mostrada na **Figura 33**.

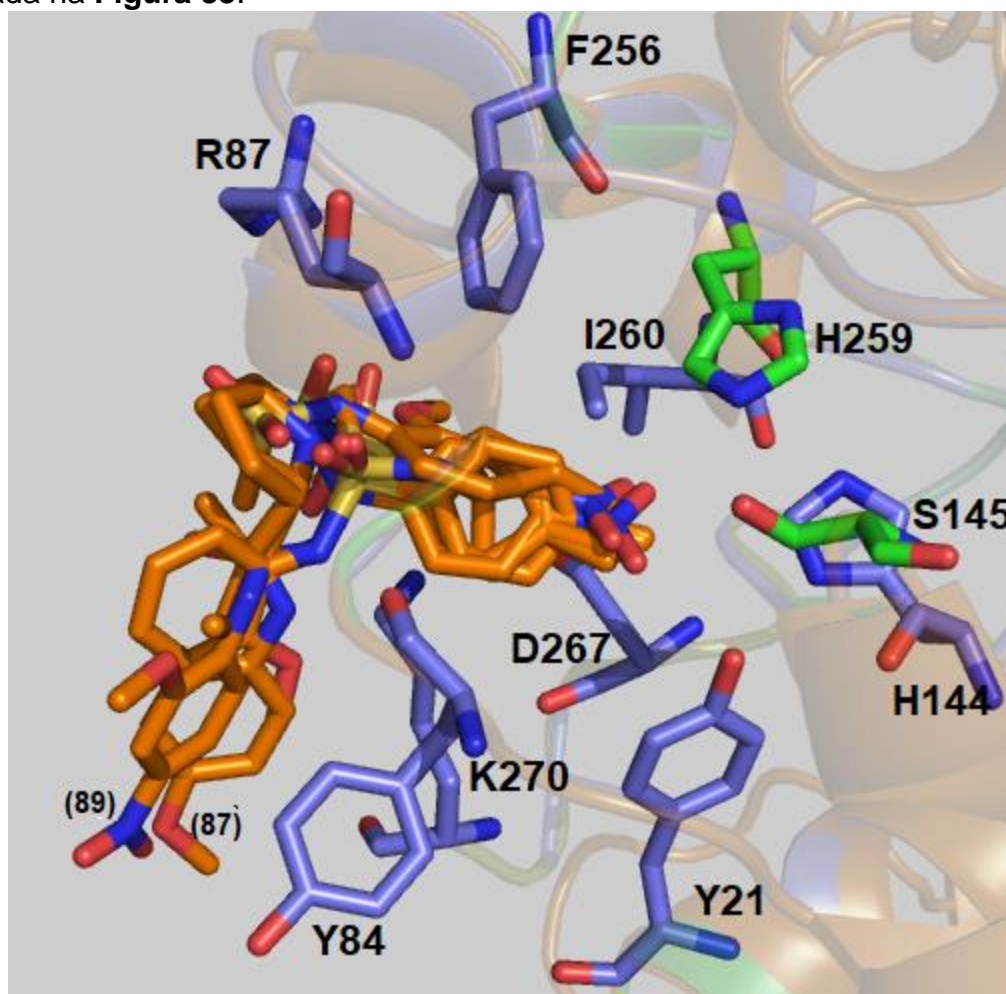


Figura 33: Sobreposição das melhores poses obtidas para os 8 derivados sulfonamídicos (laranja) triados para a etapa de síntese. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Resíduos catalíticos H259 e S145 em destaque (verde).

A sobreposição mostrada pela **Figura 33**, ilustra a concordância obtida entre as melhores poses das substâncias triadas, mostrando o grupo sulfona orientado para a mesma região em quase todas as estruturas, interagindo com o resíduo R87, por meio de interações de hidrogênio (mostradas na **Tabela 4**), direcionando os anéis aromáticos para mais perto dos resíduos catalíticos.

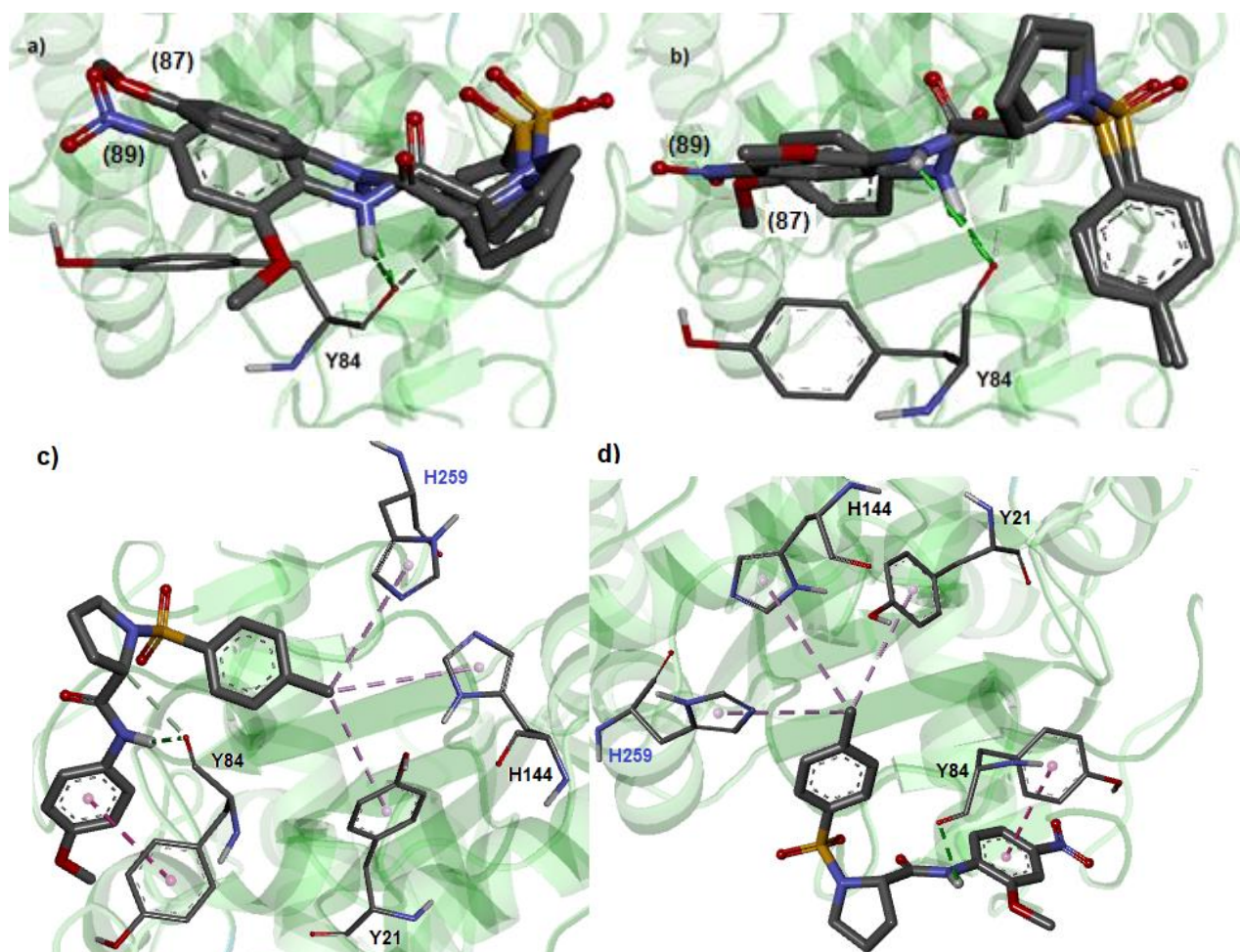


Figura 34: a) Vista superior e b) Vista lateral da sobreposição das melhores poses de docking obtidas para as substâncias **87** e **89**. c) Representação da melhor pose de docking obtida com a função ASP da estrutura **87** e da d) estrutura **89**; Linhas tracejadas em verde e cinza – ligação de hidrogênio e ligação de hidrogênio não clássica, respectivamente, em rosa e lilás – hidrofóbicas. Átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Para as duas substâncias, demonstradas pela **Figura 34**, é possível observar o direcionamento do grupo tolúil para dentro do bolsão hidrofóbico, causado pela geometria do grupo sulfonila, fazendo também com que as subunidades aromáticas e seus respectivos substituintes na outra extremidade da molécula fiquem orientados para fora da enzima, como pode ser melhor observado na **Figura 33**. Isso pode ser explicado, em partes, pela presença do anel pirrolidínico, conferindo certa restrição conformacional, além da orientação imposta pelo grupo sulfonila. Observa-se em **87**, uma ligação de hidrogênio não-clássica entre a cadeia lateral da Y84 e o carbono alfa a carbonila pertencente ao anel pirrolidínico, orientando a posição da amida. Ademais, nota-se que os anéis aromáticos substituídos pelo grupo metoxila, realizam interações

do tipo empilhamento (π e T) com o resíduo de Y84, reforçando a interação com o sítio catalítico da enzima.

Dentre as moléculas selecionadas na etapa de triagem virtual, as substâncias **92** e **93** foram as únicas com apenas duas interações significativas com os resíduos marcadores H144 e H259 (catalítico), como demonstrado pela **Figura 35**. Contudo, esse tipo de interação (ambos com ligação de hidrogênio não clássica) advinda desses resíduos não foi constatada em nenhum outro ligante selecionado, permitindo maior aproximação dessas substâncias com o sítio catalítico (S145-D199-H259), quando comparadas aos demais ligantes selecionados, uma vez que a ligação de hidrogênio é a interação com maior força e menor comprimento, se assemelhando a uma ligação efetiva.

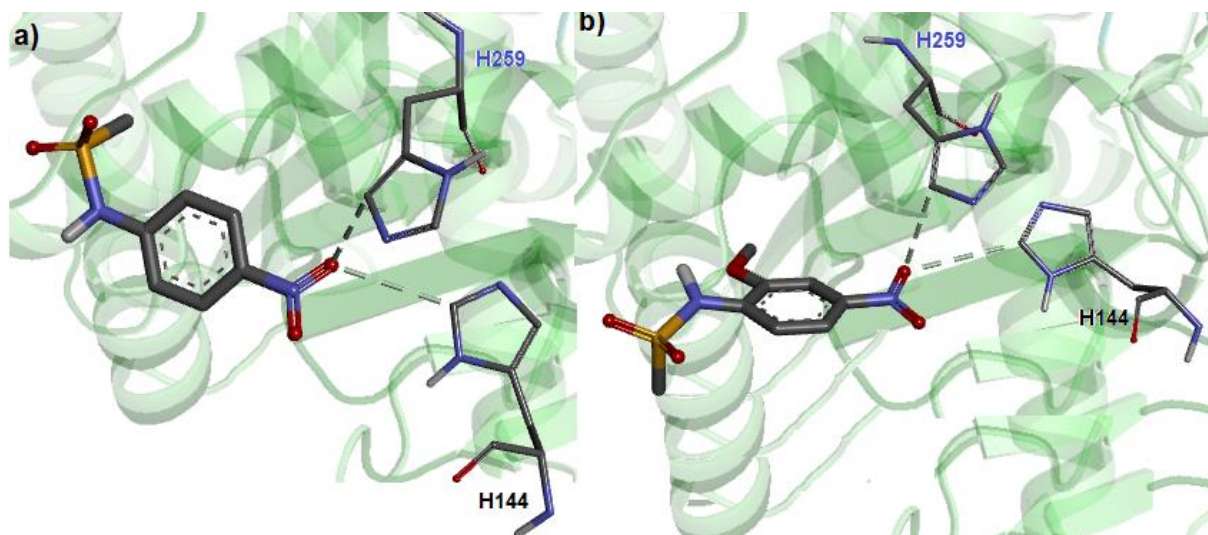


Figura 35: a) Representação da melhor pose de docking obtida com a função ASP da estrutura **92** e da **b)** estrutura **93**; Linhas tracejadas em cinza – ligação de hidrogênio não clássica. Átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

É possível observar, por meio da **Figura 36**, que, embora as estruturas compartilhem certas semelhanças em suas cadeias alifáticas, apresentaram interações diferentes com os resíduos de aminoácidos destacados. Uma possível explicação para essa observação, pode ser a afinidade dos resíduos H144 e H259 por interações hidrofóbicas, o que é evidenciado pela orientação dessas estruturas na enzima, de modo a favorecer a orientação do grupo toluila em **97**, como pode ser observado na **Figura 36-b)**, em detrimento de grupos menos hidrofóbicos, como ocorre também nas moléculas **87** e **89** (**Figura 34**). Já nas moléculas que apresentam

grupo metila, diretamente ligado ao enxofre, como observado na **Figura 36-a)** e **-c)**, as interações hidrofóbicas entre esses mesmos resíduos ocorrem nas cadeias alifáticas. Ademais, observa-se ligação de hidrogênio entre a espinha dorsal da Y84 e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da sulfonamida das substâncias **96** e **97** (**Figura 36-a)** e **-b)**) e uma interação π -enxofre entre a Y84 e o enxofre do grupo sulfonila da substância **100** (**Figura 36-c)**).

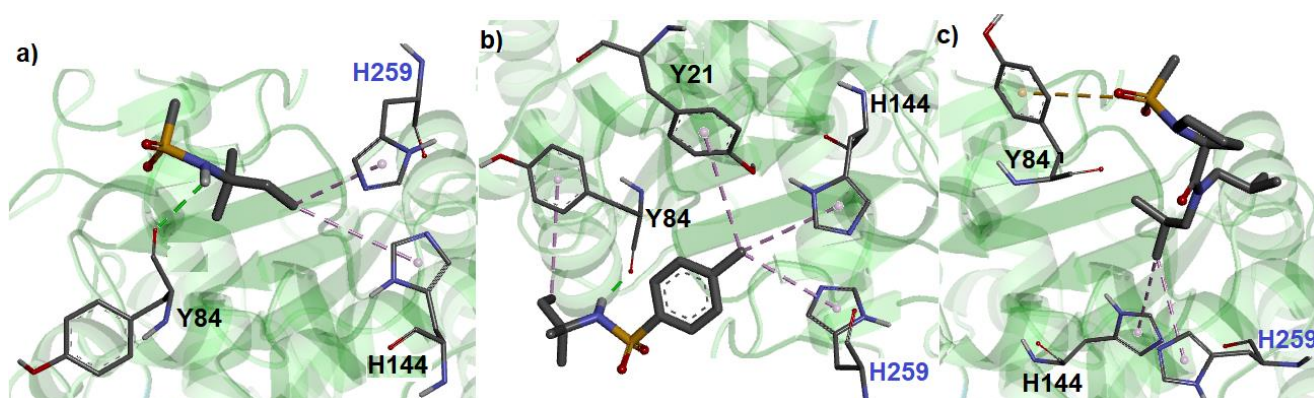


Figura 36: a) Representação da melhor pose de docking obtida com a função ASP da estrutura **96**, b) da estrutura **97** e da c) estrutura **100**; Linhas tracejadas em verde e cinza – ligação de hidrogênio e ligação de hidrogênio não clássica, respectivamente; em amarelo – π -enxofre; em rosa e lilás – hidrofóbicas. Átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Diferentemente das outras substâncias, a molécula **99**, demonstrada pela **Figura 37**, apresenta uma ligação de hidrogênio não clássica entre a cadeia lateral do resíduo de aminoácido K270 e o nitrogênio do grupo sulfonamida que age comoceptor, já que, segundo o programa MarvinSketch, em pH intracelular, esse nitrogênio encontra-se desprotonado. Observa-se também um empilhamento- π entre o anel aromático ligado diretamente ao nitrogênio do grupo sulfonamida e o resíduo Y84. Ademais, assim como as moléculas **87**, **89**, **97** o grupamento toluila interage com os resíduos Y21, H144 e H259, por meio de interações hidrofóbicas.

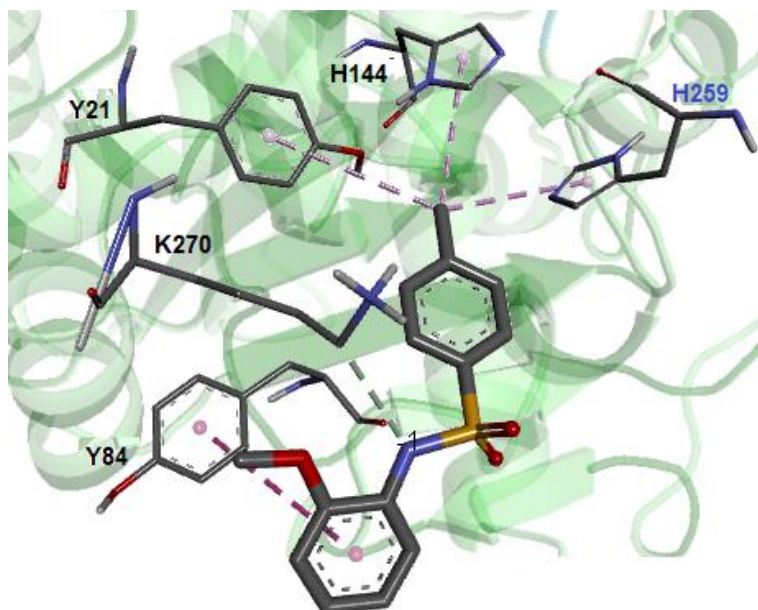


Figura 37: Representação da melhor pose de docking obtida com a função ASP da estrutura **99**; Linhas tracejadas em cinza – ligação de hidrogênio não clássica, respectivamente; em rosa e lilás – hidrofóbicas. Átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

5.3 SÍNTESE, MECANISMOS E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS

5.3.1 Primeira etapa - Obtenção do éster metílico da L-prolina na forma de cloridrato (**85**)

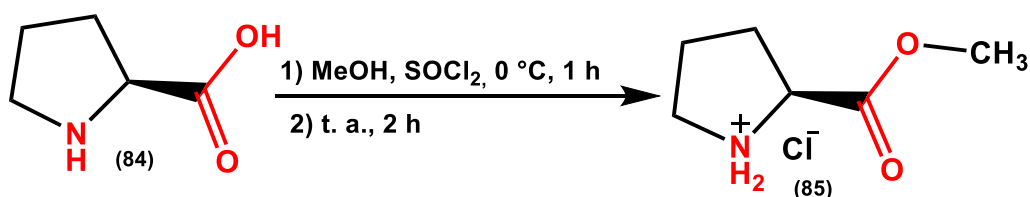


Figura 38: Reação de obtenção do cloridrato de éster metílico da L-prolina (**85**).

No espectro de RMN de ^1H do cloridrato de éster metílico da L-prolina (**85**), representado pela **Figura 39**, podemos observar a presença de um multipletto em 1,96 ppm, referente aos dois átomos de hidrogênio H-1 (magneticamente equivalentes), dois multiplettos em 2,04 ppm e 2,29 ppm, referentes aos dois átomos de hidrogênio H-2, que devido à sua vizinhança são magneticamente distintos, um multipletto com deslocamento químico igual à 3,25 ppm correspondente aos dois hidrogênios H-3,

além de um multipletto em 4,39 ppm referente ao hidrogênio H-5, que acopla com os hidrogênios H-2.

É possível observar também a presença de um singlete em 3,79 ppm, apresentando uma integral igual a três, representando os 3 hidrogênios equivalentes (H-4) ligados ao átomo de carbono do grupo éster recém-formado. Ademais, devido à sua vizinhança distinta, os dois átomos de hidrogênio pertencentes ao nitrogênio, apresentam-se com diferentes deslocamentos químicos. Além disso, observa-se também um possível traço de metanol, juntamente com os sinais referentes a H-3, já que o processo de extração se baseia apenas na remoção do solvente sob pressão reduzida. Observando-se no espectro DEPT-Q um pequeno sinal em 50 ppm, o que pode corroborar essa hipótese, além dos sinais esperados para o composto em questão, como ilustrado pela **Figura 40**.

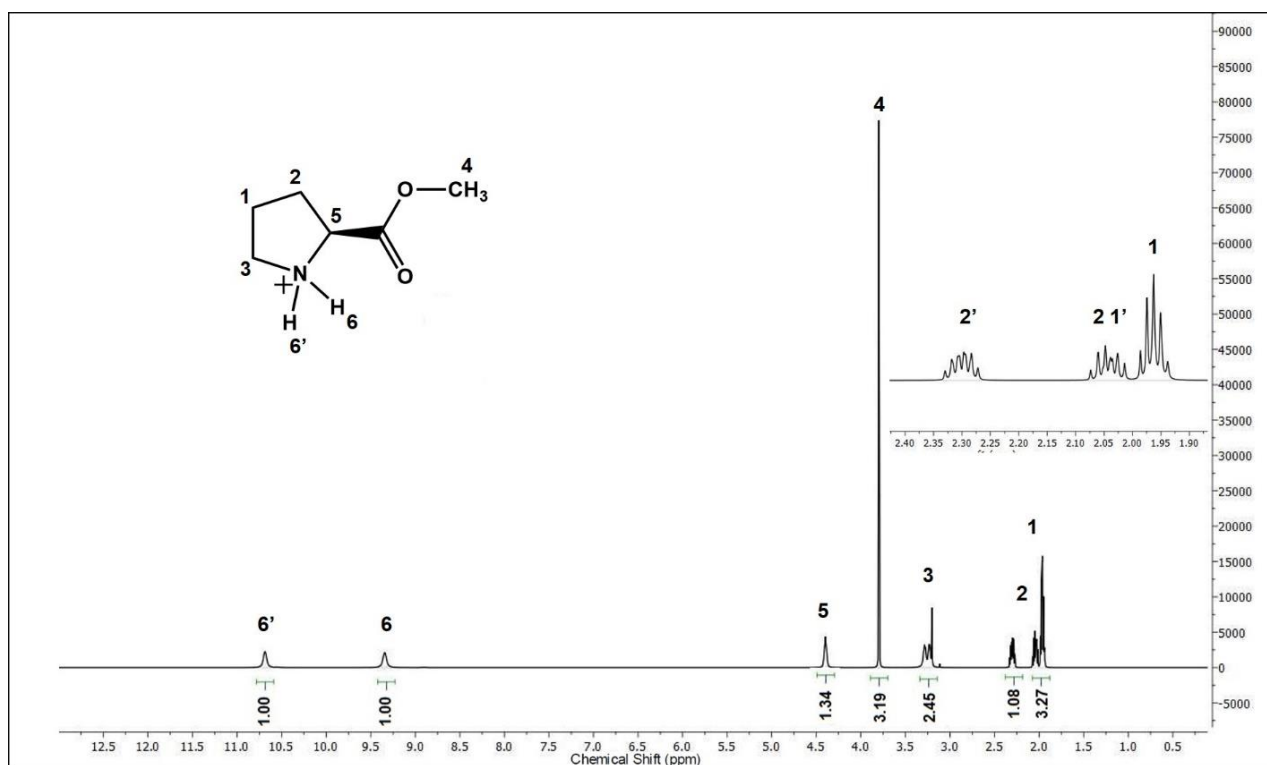


Figura 39: Espectro de RMN ¹H obtido para cloridrato de éster metílico da L-prolina; solvente: DMSO-d₆, 600 MHz.

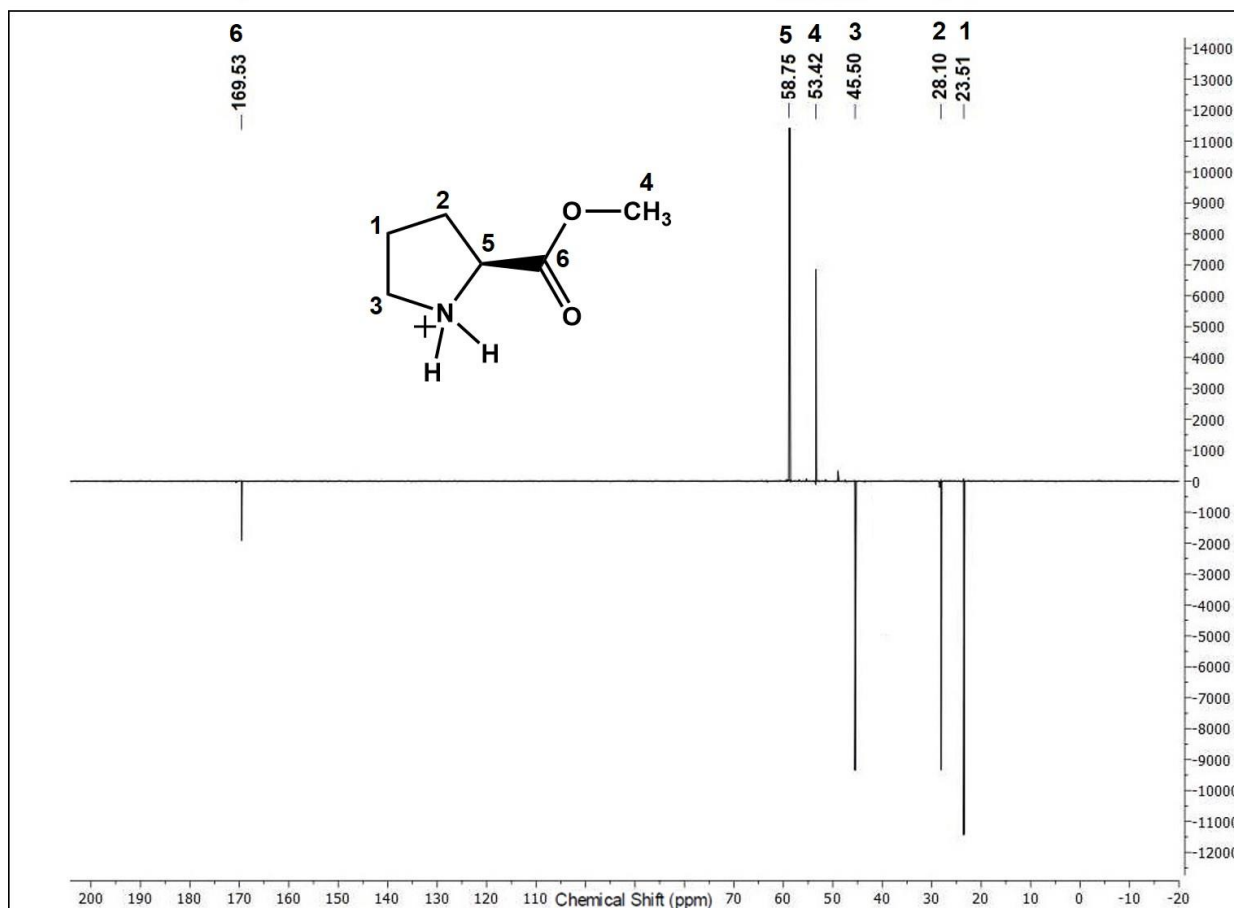


Figura 40: Espectro de RMN DEPT-Q, obtido para cloridrato de éster metílico da L-prolina; solvente: DMSO- d_6 , 150 MHz.

O mecanismo de reação proposto (**Figura 41**), inicia-se com o ataque do ácido carboxílico da L-prolina (**84**) ao átomo de enxofre pertencente ao cloreto de tionila (**101**), formando **102**. Assim, é possível reagir-lo com o cloreto liberado, mesmo com a baixa nucleofilicidade apresentada por esse halogênio, formando um intermediário tetraédrico (**103**), que gera o cloreto ácido desejado (**107**), juntamente com dióxido de enxofre (**104**) e ácido clorídrico (**105**).¹¹⁵

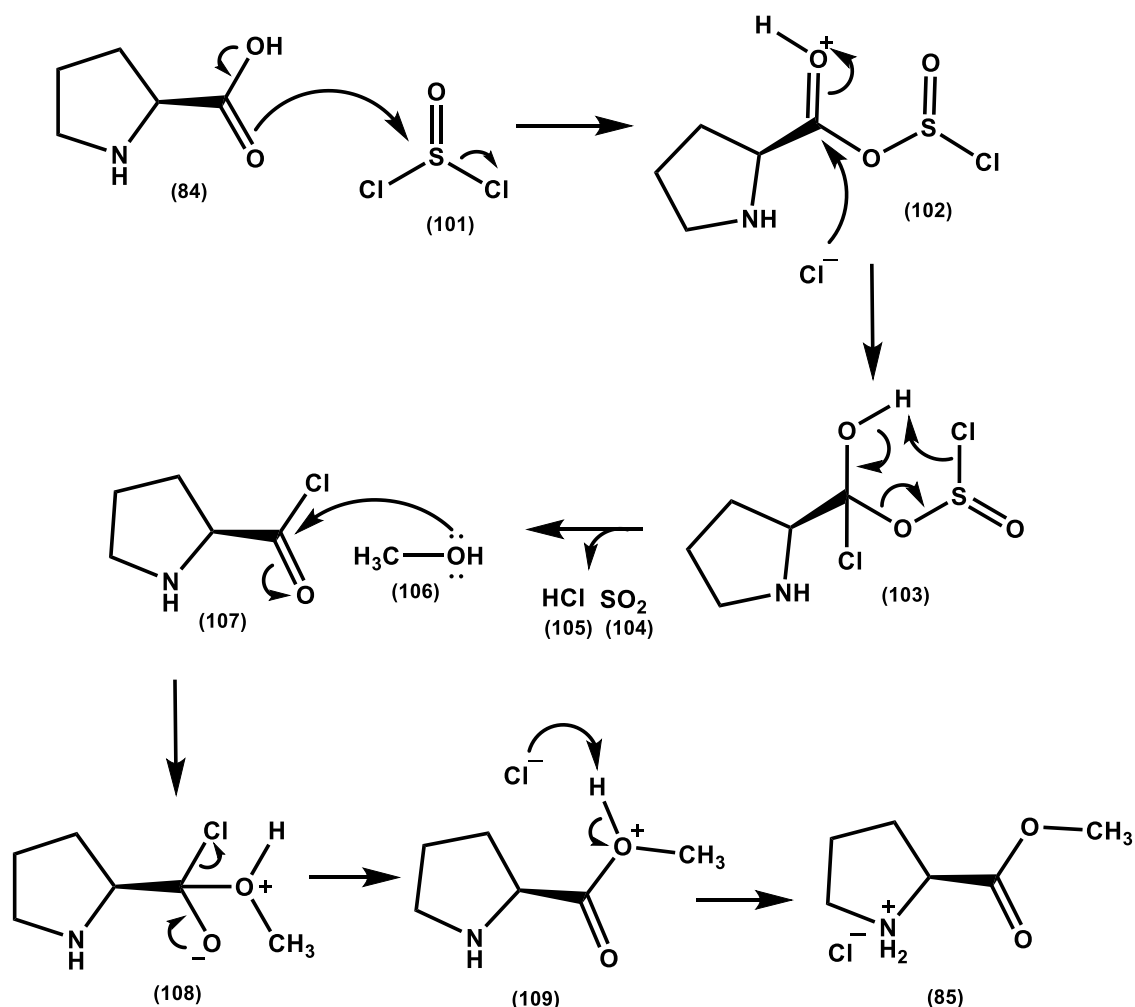


Figura 41: Mecanismo proposto para a formação do cloridrato de éster metílico da L-prolina.

Após a formação do cloreto de ácido carboxílico **107**, é possível reagir-lo com metanol (**106**), in situ, por meio de uma reação de substituição nucleofílica acílica, formando o cloridrato de éster metílico da L-prolina (**85**), após a formação do intermediário tetraédrico (**109**) e posterior eliminação do cloreto (bom grupo abandonador).¹⁰²

Seguido do processo de isolamento, foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD), obtendo-se o R_f do cloridrato do éster metílico da L-prolina (**85**) igual a 0,71 em eluente $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (7:3), representado pela **Figura 42**. Nela, pode-se observar maior retenção da L-prolina, comparada ao seu cloridrato. Isso se deve à presença do ácido carboxílico como doador de ligação de hidrogênio no aminoácido, enquanto no produto há substituição pelo grupo metoxila, ocorrendo maior interação do material de partida (**84**) com a sílica.

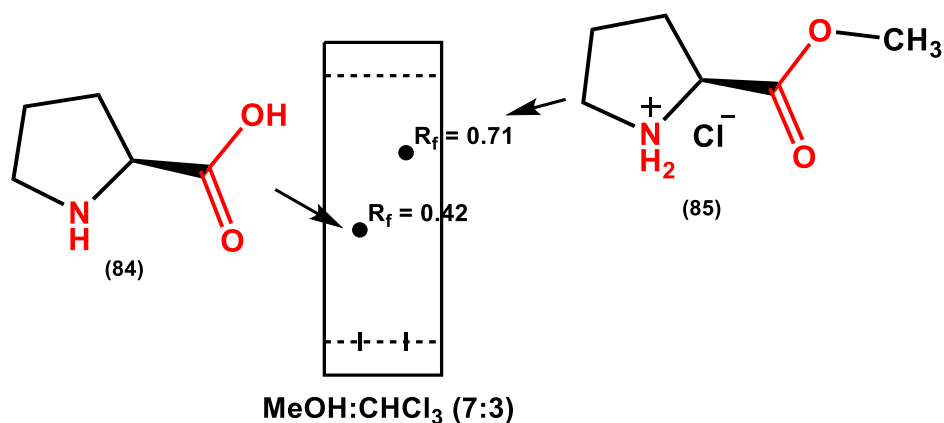


Figura 42: Representação da cromatoplaça obtida para o cloridrato de éster metílico da L-prolina (**85**), utilizando ácido fosfomolibdico como revelador químico.

5.3.2 Segunda etapa - Obtenção da sulfonamida **54**, a partir do cloridrato do éster metílico da L-prolina.

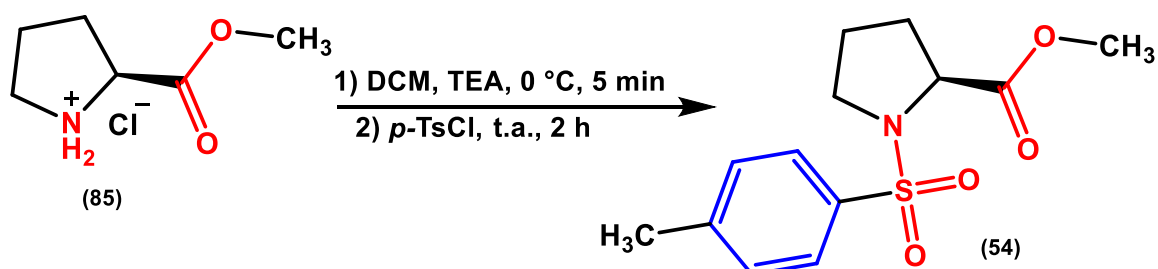


Figura 43: Reação de obtenção da sulfonamida **54**, a partir do cloridrato do éster metílico da L-prolina (**85**).

Após o processo de extração, foi realizada a CDD, obtendo-se o R_f do produto **86** como 0,58 em eluente MeOH:CHCl₃ (7:3), representado pela **Figura 44**. Nota-se maior interação do produto com a cromatoplaça, uma vez que a inserção do grupo sulfona aumenta a quantidade de aceptores de ligação de hidrogênio, conferindo ao produto maior polaridade, tornando o seu valor de R_f menor do que o observado no seu precursor.

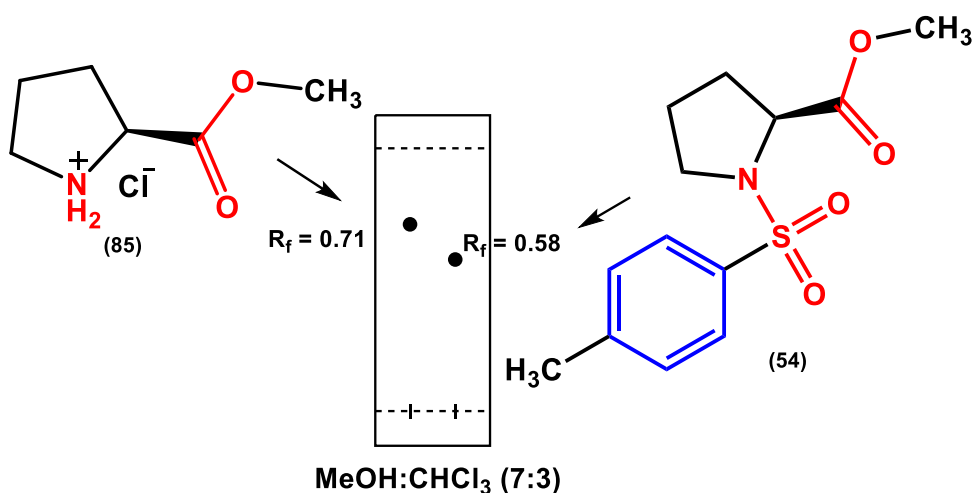


Figura 44: Representação da cromatoplaca obtida para a reação de obtenção da sulfonamida **54**, a partir do cloridrato de éster metílico da L-prolina (**85**), utilizando ácido fosfomolibdico como revelador químico.

Os espectros de RMN de ¹H e DEPT-Q foram obtidos para elucidação estrutural do composto **54** e estão representados pela **Figura 45**. Dois dupletos são encontrados na região ampliada do espectro de ¹H, característica de aromáticos, sinalizando os hidrogênios H-7 (2H) e H-8 (2H), pertencentes ao grupo *p*-toluila, sendo estes ligeiramente diferentes, por serem magneticamente distintos. Os demais sinais, se assemelham com o espectro de **85**. No espectro DEPT-Q, encontram-se os sinais esperados para **54**: com os sinais de carbonos quaternários (C-9, C-10 e C-11) na mesma fase que os sinais metilênicos (C-2, C-3 e C-4).

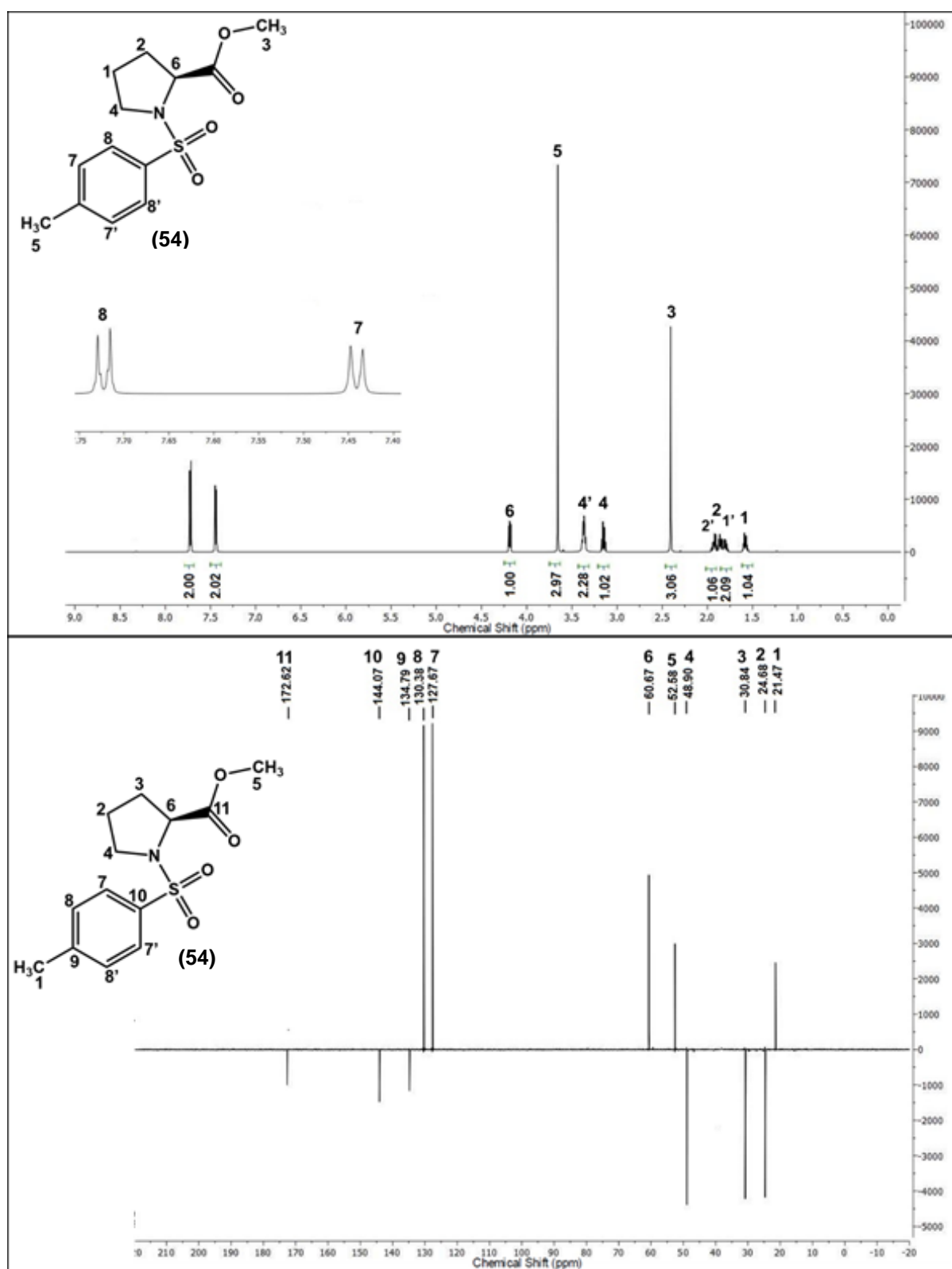


Figura 45: Espectros de RMN ^1H e DEPT-Q, obtidos para a sulfonamida **54**; solvente: DMSO-d_6 , 600 MHz para ^1H e 150 MHz para DEPT-Q.

5.3.3 Terceira etapa - Obtenção da *p*-toluenosulfonil L-prolina (53)

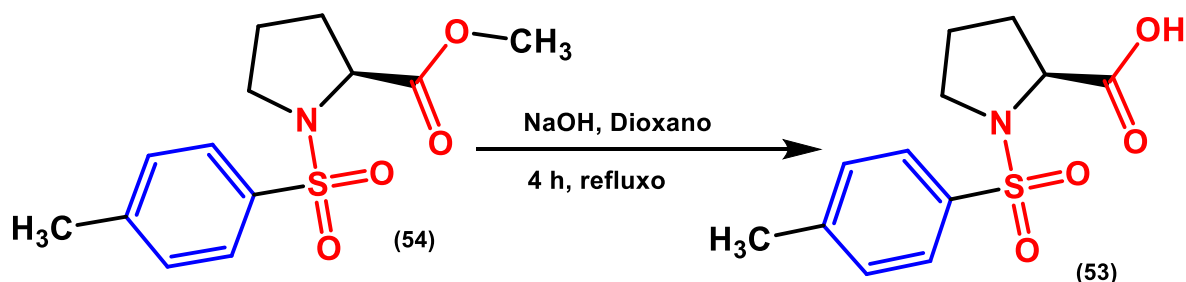


Figura 46: Reação de hidrólise do grupo éster, para a obtenção da carboxi sulfonamida 53.

Na Figura 47, observa-se o mecanismo proposto para a obtenção da sulfonamida 53, se iniciando com o ataque nucleofílico da hidroxila à carbonila, formando o intermediário quaternário 111. Em seguida, a dupla ligação é restabelecida, forçando a saída do grupo metoxila, que abstrai o próton do ácido carboxílico 53, devido a sua elevada basicidade, sendo liberado na forma de metanol (106). Com posterior adição de HCl, ocorre a protonação do ânion 113 e formação do ácido carboxílico como produto final 53.

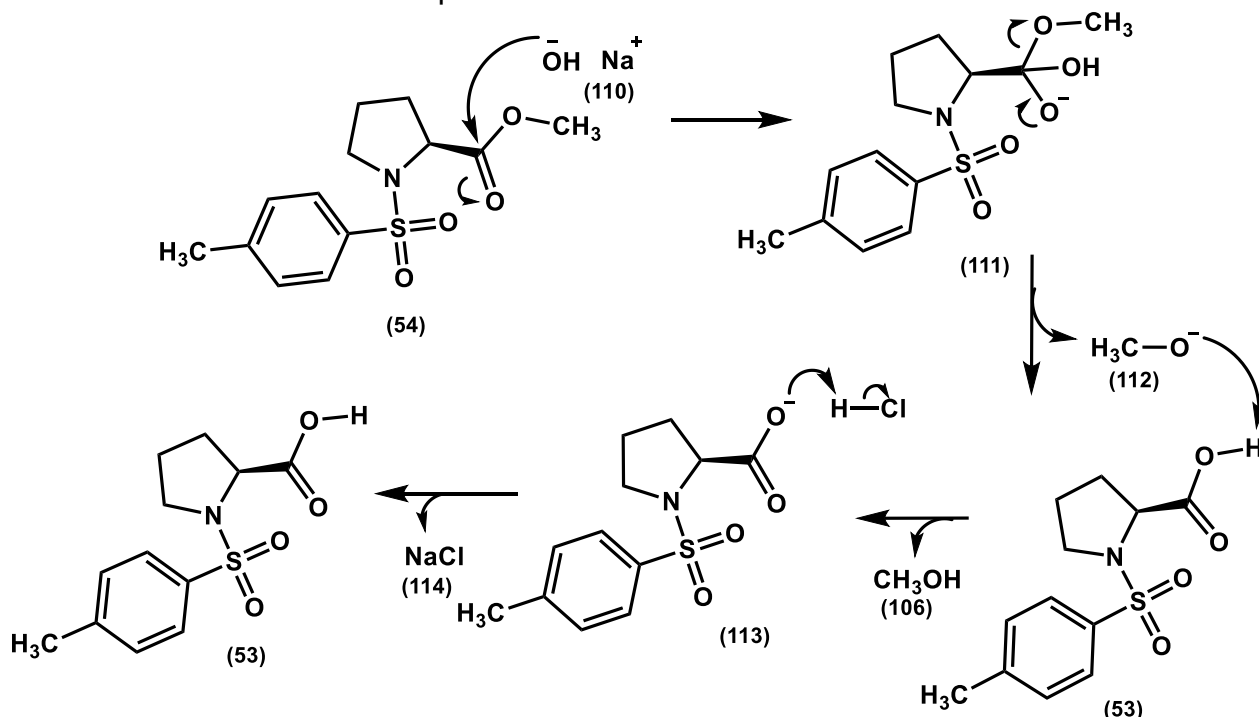


Figura 47: Mecanismo proposto para a formação da carboxi sulfonamida 53.

Com a obtenção do espectro de Infravermelho (IV), foi possível observar a interconversão de grupo funcional, éster para ácido carboxílico, demonstrada pela banda em 3545 cm^{-1} , referente à hidroxila livre. Ademais, são observados

estiramentos em 1716 cm^{-1} , correspondente a $\text{C}=\text{O}$ proveniente de ácido carboxílico, em 1335 cm^{-1} correspondente a sulfona, e por fim 1153 cm^{-1} , referente a amina ($\text{C}-\text{N}$), indicando, neste caso, sulfonamida terciária.

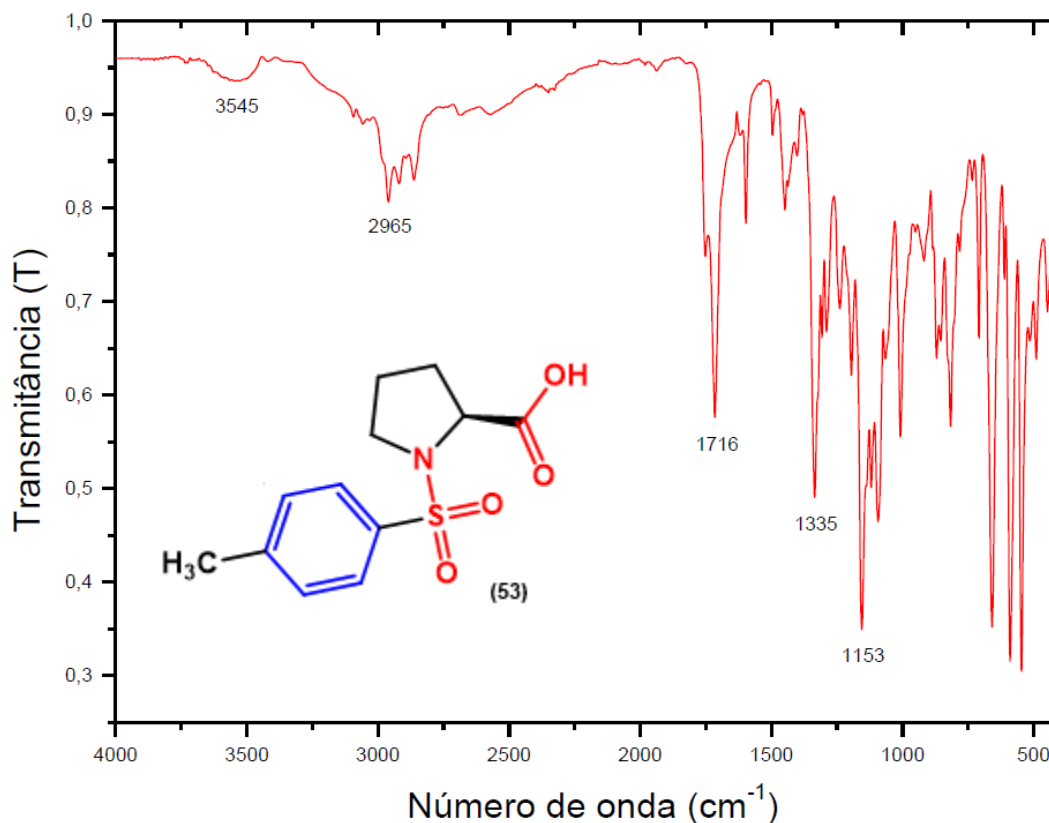


Figura 48: Espectro de Infravermelho, em modo ATR, da sulfonamida **53**.

5.3.4 Obtenção do derivado sulfonamídico **87**, proveniente da *p*-anisidina

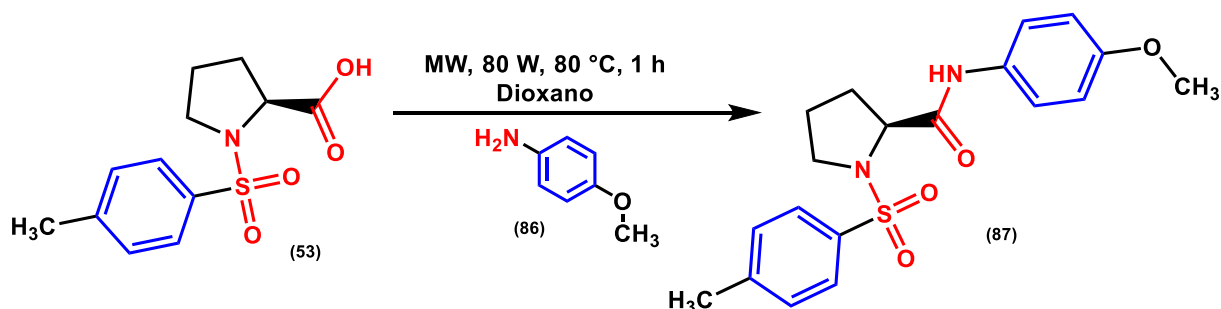


Figura 49: Reação de formação do produto final **87**, proveniente da *p*-anisidina.

Com o intuito de se obter o produto desejado de forma mais eficiente e mais rápida, aplicou-se a metodologia de MAOS (síntese orgânica auxiliada por micro-ondas - *microwave-assisted organic synthesis*, em inglês), que vem sendo extensivamente aplicada e reportada na literatura.¹¹⁶

Assim aplicou-se a metodologia MAOS (descrita na seção 4.2.1.4) para o ácido **53** e a *p*-anisidina (**86**), utilizando 1 mL de dioxano para solubilização, a temperaturas de 60 °C, 70 °C e 80 °C, sendo a última evidenciada como melhor condição, devido ao maior rendimento obtido (15% - após purificação), dentre as temperaturas testadas. Além disso, foram testados 30 minutos, 1 hora e 2 horas, sendo 1 hora o melhor tempo para essa reação, pois não houve alteração significativa quanto as manchas observadas na CCD após esse período.

Após o processo de isolamento, observou-se na cromatoplaça obtida para o produto **87** a presença de duas manchas com *R_f* muito próximos, indicando que não seria possível a purificação por coluna flash preparativa. Assim, optou-se por utilizar o método de purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), monitorando em diferentes comprimentos de onda (190, 254 e 390 nm), eluente Acetonitrila:H₂O (gradiente 5-100%).

5.3.5 Obtenção do derivado sulfonamídico **89**, proveniente da *o*-metoxi-*p*-nitroanilina

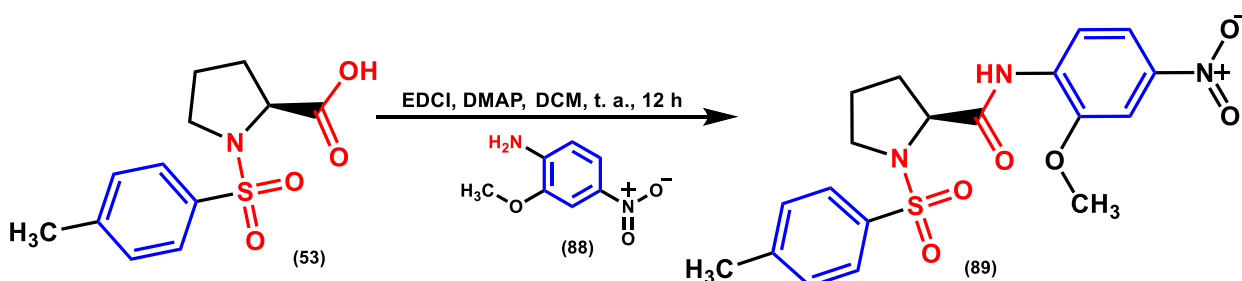


Figura 50: Reação de formação do produto final **89**, proveniente da *o*-metoxi-*p*-nitroanilina.

Observou-se, após o processo de extração, a presença de duas manchas na cromatoplaça com *R_f* muito próximos, indicando que não seria possível a purificação por coluna flash preparativa. Assim, optou-se por utilizar o método de purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), monitorando em diferentes comprimentos de onda (190, 254 e 390 nm), eluente ACN:H₂O (gradiente 5-100% de ACN). Após o processo de purificação, foi realizada a CCD, obtendo-se o *R_f* do produto **89** como 0,84 em eluente MeOH:CHCl₃ (1:1), representado pela **Figura 51**.

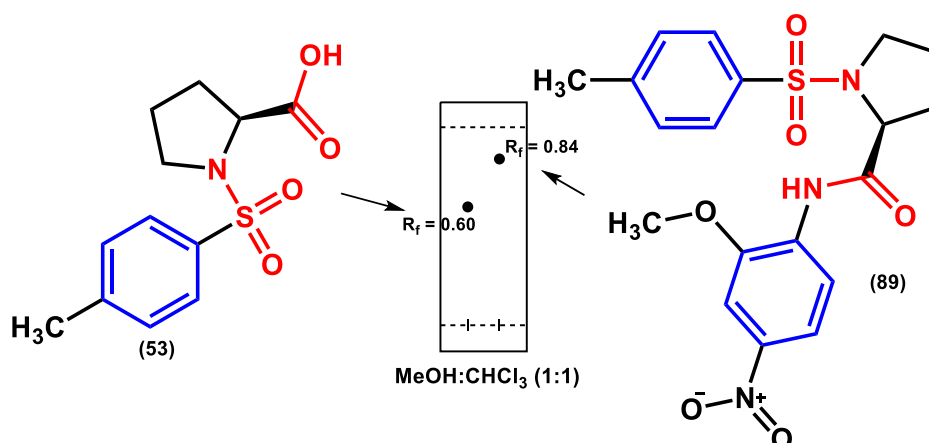


Figura 51: Representação da cromatoplaça obtida, após purificação da sulfonamida **89**.

No mecanismo proposto, demonstrado pela **Figura 52**, observa-se a retirada do hidrogênio do ácido carboxílico **53** pelo nitrogênio do grupo carbodiimida do agente acoplante EDCI (**115**), possibilitando o ataque ao carbono desse mesmo grupo, formando um éster com carbono carbonílico mais eletrofílico (**118**).

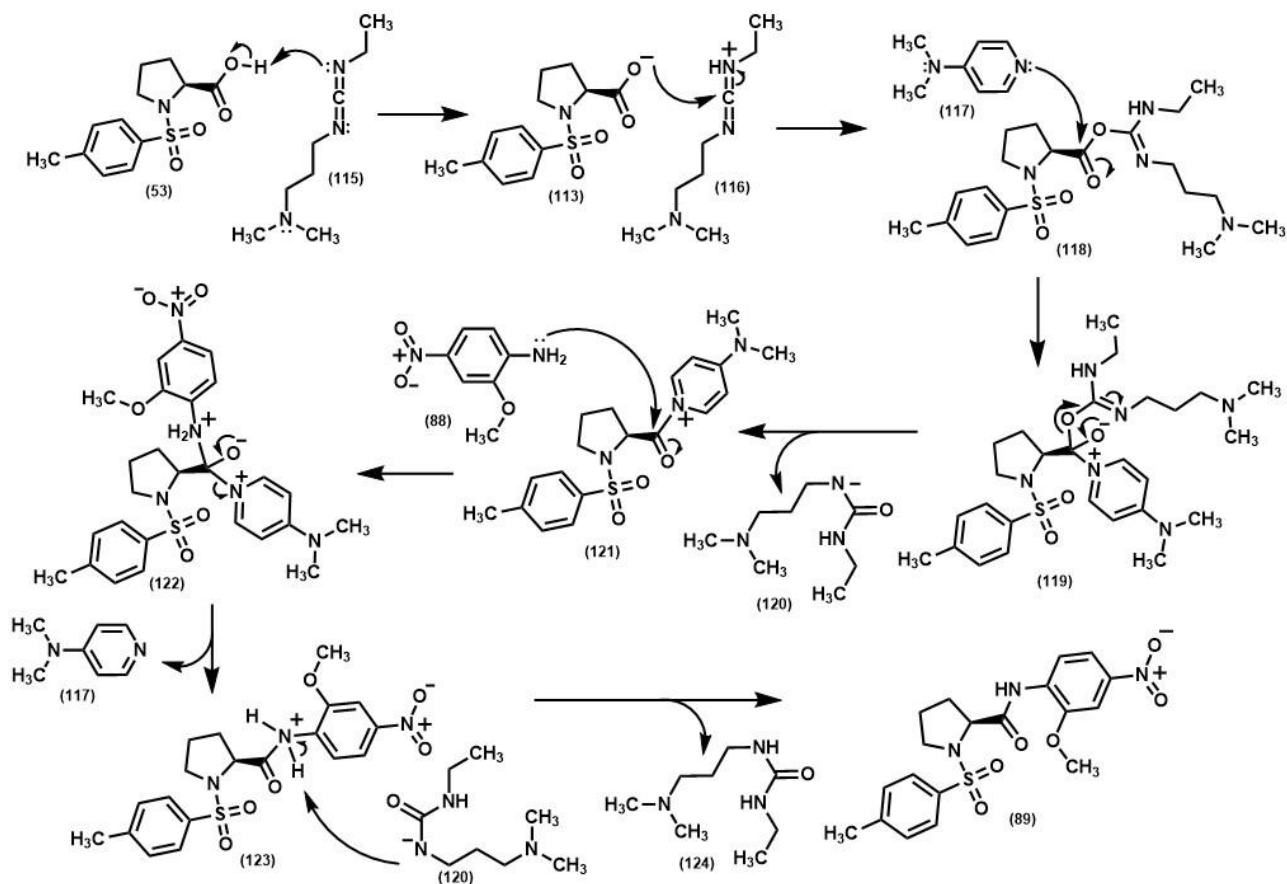


Figura 52: Mecanismo proposto para a formação da sulfonamida **89**.

Em seguida, o DMAP (**117**) realiza um ataque nucleofílico ao éster obtido, para a formação do intermediário tetraédrico **119**, que ao reestabelecer a carbonila, elimina o precursor da ureia, dando origem ao intermediário **121**, com melhor grupo abandonador. Este, por sua vez, reage rapidamente com a anilina **88**, regenerando o catalisador DMAP (**117**) no meio reacional, seguido da formação da ureia **124**, por meio da desprotonação do grupo amida formado (**123**), gerando, finalmente a sulfonamida de interesse **89**.

5.3.6 Obtenção do derivado sulfonamídico **92** – Série B

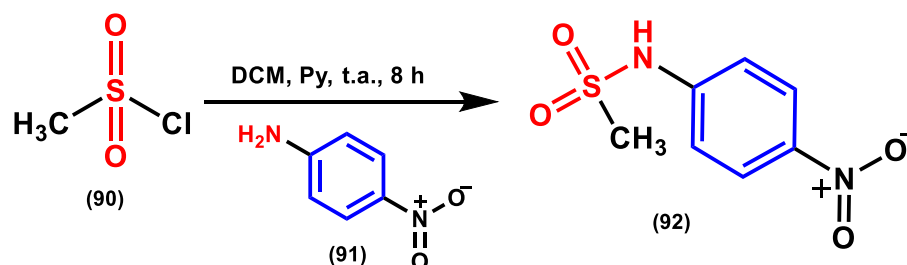
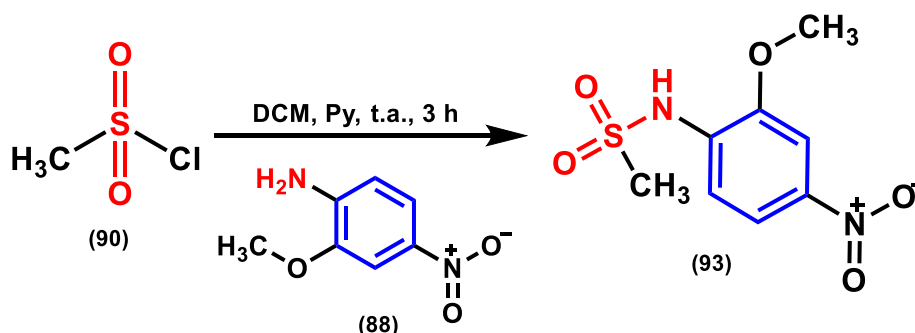
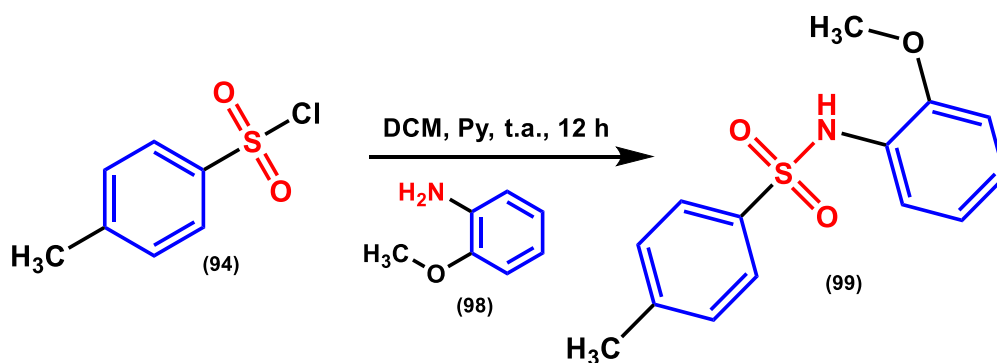


Figura 53: Reação de formação da sulfonamida **92**.

A reação foi inicialmente mantida por 12 horas, sob agitação a temperatura ambiente, gerando o produto com 71% de rendimento. Com o intuito de reduzir o tempo de reação, a síntese foi repetida e o rendimento foi avaliado depois de 8 horas (após monitoramento por CCD), obtendo-se 94% de rendimento. Uma hipótese para explicar a diminuição do rendimento observada no maior tempo de reação, seria a diminuição do pH do meio reacional por consequência da formação dos subprodutos (Py e HCl), favorecendo assim a clivagem do produto obtido. Uma vez que em meio ácido, o nitrogênio do grupo sulfonamida abstrai um próton, quebrando a ligação com o enxofre e voltando ao material de partida (*p*-nitroanilina).

5.3.7 Obtenção do derivado sulfonamídico **93** – Série BFigura 54: Reação de formação da sulfonamida **93**.

Após a extração, somente uma mancha foi observada na CCD. Contudo, o espectro de RMN de ^1H mostrou sinais com deslocamento químico em regiões que não correspondem à sulfonamida analisada, sendo necessária uma etapa adicional de purificação por CLAE, observando-se o surgimento de dois sinais com tempos de retenção diferentes para o eluente ACN:H₂O (gradiente 5-100% de ACN), indicando a coeluição e sobreposição da impureza com a mancha do produto desejado na CCD.

5.3.8 Obtenção do derivado sulfonamídico **99** – Série BFigura 55: Reação de formação da sulfonamida **99**.

Após o processo de isolamento, obteve-se o composto **99** com 82% de rendimento, sem a aplicação de etapas adicionais de purificação. Tal fato pode ser explicado pela doação de densidade eletrônica, do grupo metoxila para o grupo amina, uma vez que o mesmo é um ativador forte, favorecendo o acoplamento para a formação da sulfonamida.

Na **Figura 56**, é demonstrado o mecanismo proposto para três das cinco sulfonamidas obtidas para a Série B (**92**, **93** e **99**). Nele, observa-se o ataque

nucleofílico da anilina correspondente (*p*-nitroanilina, *o*-metoxi-*p*-nitroanilina e *o*-metoxianilina) aos respectivos cloretos de sulfonila (MsCl ou *p*-TsCl), formando o intermediário **125**. Após isso, a base piridina (**126**) abstrai um dos prótons do nitrogênio da sulfonamida, restabelecendo sua neutralidade, gerando o produto desejado.

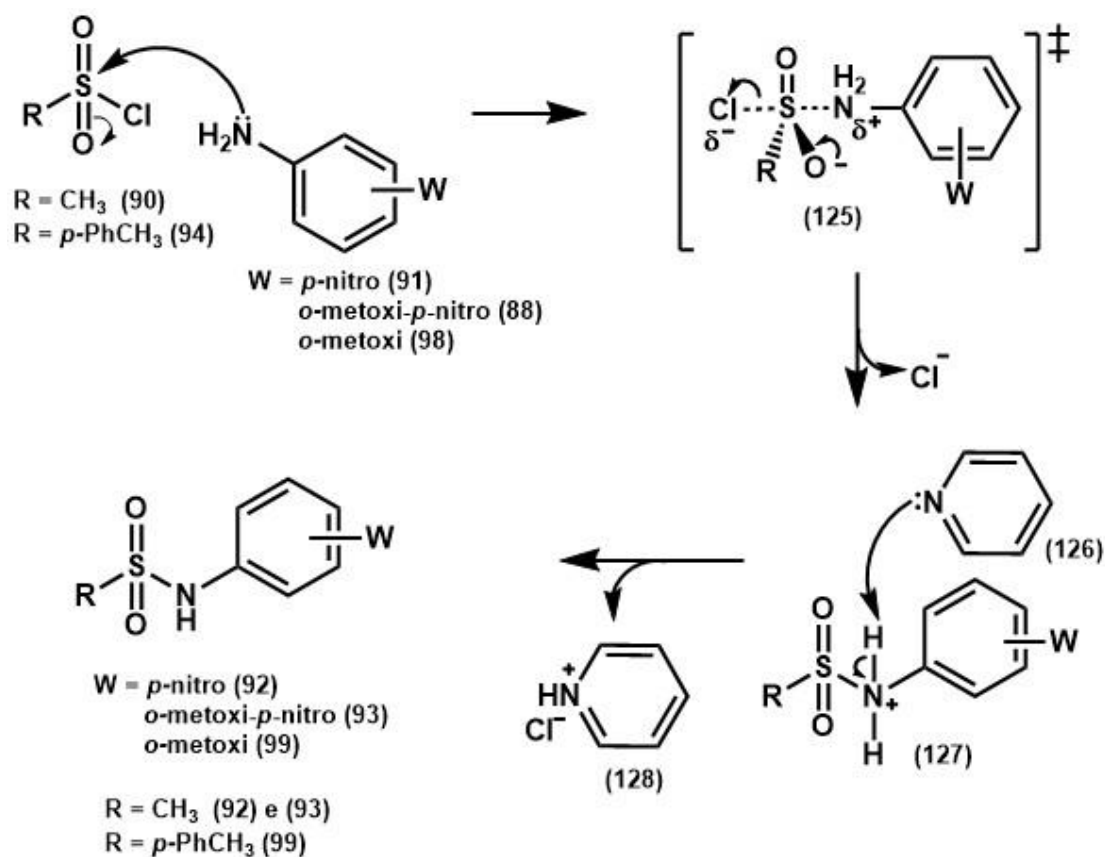


Figura 56: Mecanismo proposto para a formação das sulfonamidas **92**, **93** e **99**.

5.3.9 Obtenção dos derivados sulfonamídicos **96** e **97** – Série B

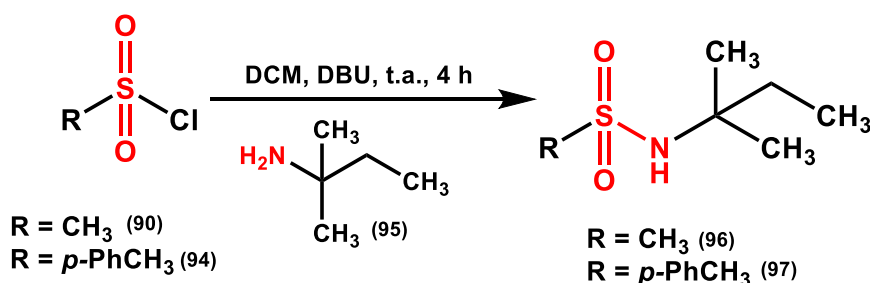


Figura 57: Reação de formação das sulfonamidas **96** e **97**.

Usando solução de ácido fosfomolibdico como revelador para CCD, foi possível observar o aparecimento de somente uma mancha para o produto **96**. Constatou-se

também, por meio do espectro de RMN de ^1H , somente a presença dos sinais característicos para esse composto. Já o composto **97**, observou-se, duas manchas na cromatoplaça em eluente $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (7:3), indicando a presença de impurezas. Assim, se faz necessária a aplicação de coluna flash preparativa, uma vez que as manchas se encontram com valores de R_f distintos.

Para a formação das sulfonamidas **96** e **97**, é necessária a ativação da amina **97**, por meio da estabilização da carga positiva do nitrogênio (gerada após o ataque nucleofílico) pela base não-nucleofílica DBU (**129**), resultando no intermediário nucleofílico **131**, que atacará o enxofre do cloreto de sulfonila, fornecendo, após a eliminação do cloreto, a sulfonamida correspondente.¹¹⁷ Esse mecanismo está ilustrado na **Figura 58**.

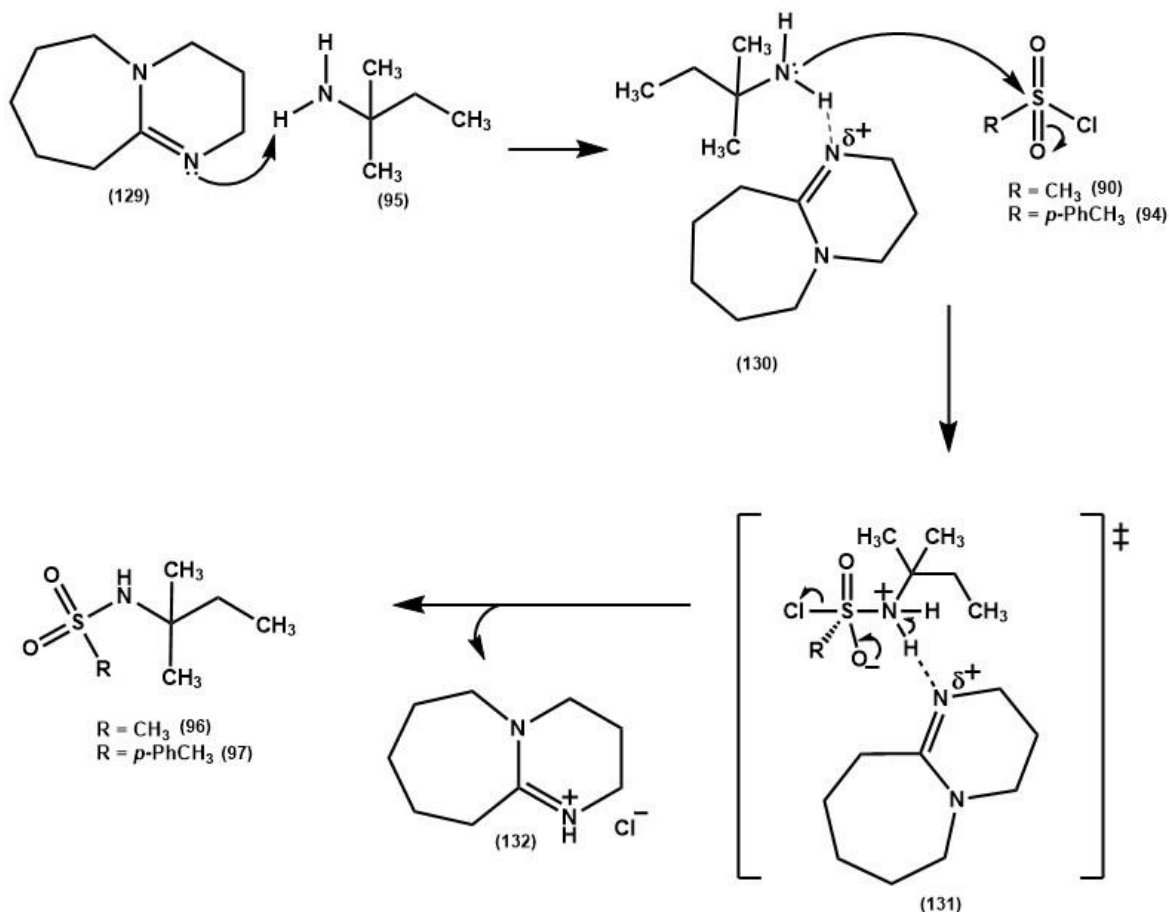


Figura 58: Mecanismo proposto para a formação das sulfonamidas **96** e **97**.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O modelo *in silico* obtido por meio de modelagem molecular para a enzima PCL foi apropriadamente validado, analisado e empregado na triagem virtual das substâncias propostas, apresentando a função de pontuação (ASP) com capacidade de diferenciar ligantes ativos e inativos, propiciando de forma adequada a seleção de 8 derivados sulfonamidicos promissores à inibição da enzima DAGL- α .

Destes, 5 compostos foram obtidos com bons rendimentos de reação. Dois desses compostos, foram obtidos em 4 etapas, com rendimentos globais de 9% e 18%, para **87** e **89**, respectivamente. Já os outros 3 compostos foram obtidos em 1 etapa, com rendimentos de 41%, 82% e 94% para **96**, **99** e **92**, respectivamente, sendo necessária a aplicação de purificação por CLAE para dois dos cinco produtos obtidos.

Os ligantes obtidos em grau de pureza acima de 95%, serão enviados para a Universidade de Leiden, com a colaboração do professor Dr. Mario van der Stelt, onde serão realizados testes bioquímicos a fim de avaliar a atividade inibitória frente a enzima DAGL- α humana. Paralelamente, serão enviados à Universidade Federal de Goiás, com a colaboração da Professora Dr^a Mônica Rodrigues Ferreira Machado, onde serão administrados em ensaios de teratogenicidade e obesidade, em modelos de *zebra fish*.

O modelo *in silico* desenvolvido neste trabalho pode ser utilizado na triagem de novos ligantes com subunidades sulfonamídicas para inibição da enzima DAGL- α , bem como no direcionamento de novos estudos aplicados ao entendimento dos complexos ligante-enzima.

Como perspectivas futuras, há a purificação dos produtos **93** e **97**, por CLAE e coluna flash, respectivamente, além da síntese, isolamento e caracterização da substância **100**, selecionada na etapa de triagem. Para em também seguida serem enviadas para realização dos ensaios biológicos.

7. REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION 2011. Waist circumference and waist–hip ratio: report of a WHO expert consultation, Geneva, 8–11, December 2008.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. News. Fact sheets. Detail. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>> Acessado em: 20/08/19.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global Database on Body Mass Index**. BMI classification. Disponível em: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp?intro-Page=intro_3.html> Acessado em: julho de 2019.
4. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica – ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade, 4a. ed., São Paulo - SP, 2016.
5. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA *et al.* I Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. supl. 1, p. 3-28, 2005.
6. AMARAL, O. PEREIRA, C. Obesidade da genética ao ambiente. **Millenium-Journal of Education, Technologies, and Health**, n. 34, p. 311-322, 2016.
7. **Pesquisa nacional de saúde: 2013: ciclos de vida: Brasil e grandes regiões** / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento – Rio de Janeiro: IBGE, 2015. 92 p.
8. CANELLA, D. S.; NOVAES, H. M. D.; LEVY, R. B. Influência do excesso de peso e da obesidade nos gastos em saúde nos domicílios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 11, p. 2331-2341, 2015.
9. BAHIA, L. et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BioMed Central Public Health**, v. 12, n. 1, p. 440, 2012.
10. EXPERT PANEL ON DETECTION, Evaluation et al. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, v. 285, n. 19, p. 2486, 2001.
11. WANG, C. C. L.; GOALSTONE, M. L.; DRAZNIN, B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 2735-2740, 2004.
12. VARELA, L.; HORVATH, T. L. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. **EMBO Reports**, v. 13, n. 12, p. 1079-1086, 2012.
13. THACKER, S. G. et al. High-density lipoprotein reduces inflammation from cholesterol crystals by inhibiting inflammasome activation. **Immunology**, v. 149, n. 3, p. 306-319, 2016.

14. RADER, D. J.; HOVINGH, G. K. HDL and cardiovascular disease. **The Lancet**, v. 384, n. 9943, p. 618-625, 2014.
15. BUDOFF, M. Triglycerides and triglyceride-rich lipoproteins in the causal pathway of cardiovascular disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 118, n. 1, p. 138-145, 2016.
16. BOULLART, A. C. I.; DE GRAAF, J.; STALENHOF, A. F. Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 5, p. 867-875, 2012.
17. MALIK, V. S.; HU, F. B. Fructose and cardiometabolic health: what the evidence from sugar-sweetened beverages tells us. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 66, n. 14, p. 1615-1624, 2015.
18. JENSEN, T. et al. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 5, p. 1063-1075, 2018.
19. VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. 4a. ed., Artmed Editora: Porto Alegre, 2014.
20. BOTEZELLI, J. D.; DE MOURA, R. F.; ROSSI, C. A.; DALIA, R. A.; CAMBRI, L. T.; ROSTOM DE MELLO, M. A. Consumo de frutose e exercício físico, impacto na síndrome metabólica. **Motriz: Revista de Educação Física** 2010, 16, 231.
21. BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutrition & Metabolism** 2005, 2, 5.
22. HERMAN, M. A.; SAMUEL, V. T. The sweet path to metabolic demise: fructose and lipid synthesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 10, p. 719-730, 2016.
23. DELINT-RAMIREZ, I. et al. Genetic obesity alters recruitment of TANK-binding kinase 1 and AKT into hypothalamic lipid rafts domains. **Neurochemistry International**, v. 80, p. 23-32, 2015.
24. DE BONA SCHRAIBER, R. et al. Diet-induced obesity causes hypothalamic neurochemistry alterations in Swiss mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 2, p. 565-573, 2019.
25. OKADA-JÚNIOR, C. Y. Planejamento e síntese de novos candidatos a inibidores da enzima sn-1-diacilglicerol lipase alfa (DAGL- α). 2017. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
26. ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425, 1994.
27. OGAWA, Y. et al. Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 3, p. 1647-1652, 1995.
28. IWAKURA, H. et al. Establishment of leptin-responsive cell lines from adult mouse hypothalamus. **PLoS One**, v. 11, n. 2, 2016.

29. NEGRÃO, A. B.; LICINIO, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 3, p. 205-214, 2000.
30. KORACH-ANDRE, M. et al. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 1, p. E106-E116, 2005.
31. RITZE, Y. et al. Gastric ghrelin, GOAT, leptin, and leptinR expression as well as peripheral serotonin are dysregulated in humans with obesity. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 28, n. 6, p. 806-815, 2016.
32. SCHERMA, M. et al. Brain activity of anandamide: a rewarding bliss?. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 309, 2019.
33. TSCHÖP, M.; SMILEY, D. L.; HEIMAN, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 908, 2000.
34. MÜLLER, T. D. et al. Ghrelin. **Molecular Metabolism**, v. 4, n. 6, p. 437-460, 2015.
35. CHEN, H. Y. et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 2607-2612, 2004.
36. VERHULST, P. J. et al. Role of ghrelin in the relationship between hyperphagia and accelerated gastric emptying in diabetic mice. **Gastroenterology**, v. 135, n. 4, p. 1267-1276, 2008.
37. KOLA, B. et al. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. **PloS one**, v. 3, n. 3, p. e1797, 2008.
38. WATANABE, H. et al. Serotonin improves high fat diet induced obesity in mice. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0147143, 2016.
39. TONG, Q. et al. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 9, p. 998, 2008.
40. FERNÁNDEZ-GARCÍA, J. C.; COLOMO, N.; TINAHONES, F. J. Effects of GLP-1 receptor agonists on carbohydrate metabolism control. **Medicina Clinica**, v. 143, p. 18-22, 2014.
41. ANDREWS, M. D. et al. Pyrimido [4, 5-d] azepines as potent and selective 5-HT_{2C} receptor agonists: Design, synthesis, and evaluation of PF-3246799 as a treatment for urinary incontinence. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 9, p. 2715-2720, 2011.
42. SMITH, S. R. et al. Multicenter, placebo-controlled trial of lorcaserin for weight management. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 3, p. 245-256, 2010.

43. HALFORD, J. C. G. et al. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 201-213, 2005.
44. ITO, Y. et al. GABA type B receptor signaling in proopiomelanocortin neurons protects against obesity, insulin resistance, and hypothalamic inflammation in male mice on a high-fat diet. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 43, p. 17166-17173, 2013.
45. Boletim CIM-UFC nº225 (setembro de 2011) – Centro de Informação Sobre Medicamentos da Universidade Federal do Ceará.
46. VAN CAN, J. et al. Effects of the once-daily GLP-1 analog liraglutide on gastric emptying, glycemic parameters, appetite and energy metabolism in obese, non-diabetic adults. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 6, p. 784, 2014.
47. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RSS. Inibidores de apetite. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/3423550> Acessado em junho de 2019.
48. LUQUE, C. A.; REY, J. A. Sibutramine: a serotonin–norepinephrine reuptake-inhibitor for the treatment of obesity. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 33, n. 9, p. 968-978, 1999.
49. SCHEEN, A. J. Sibutramine on cardiovascular outcome. **Diabetes Care**, v. 34, n. Supplement 2, p. S114-S119, 2011.
50. PADWAL, R. S.; MAJUMDAR, S. R. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 71-77, 2007.
51. SANJAY, D. et al. New drug targets to treat the obesity. **International Journal of Current Research and Review**, v. 5, n. 2, p. 71, 2013.
52. HIGGINS, G. A. et al. Studies to examine potential tolerability differences between the 5-HT_{2C} receptor selective agonists lorcaserin and CP-809101. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 1074-1084, 2017.
53. DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1696-1705, 2006.
54. EVERS, A. et al. Design of novel exendin-based dual glucagon-like peptide 1 (GLP-1)/glucagon receptor agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 4293-4303, 2017.
55. VAN DIEPEN, H.; SCHLICKER, E.; MICHEL, M. C. Prejunctional and peripheral effects of the cannabinoid CB₁ receptor inverse agonist rimonabant (SR 141716). **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 378, n. 4, p. 345-369, 2008.
56. MUCCIOLI, G. G. et al. 1-Benzhydryl-3-phenylurea and 1-benzhydryl-3-phenylthiourea derivatives: New templates among the CB₁ cannabinoid

- receptor inverse agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 23, p. 7486-7490, 2005.
57. GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646-1647, 1964.
 58. DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605-613, 1988.
 59. MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561, 1990.
 60. FISAR, Z. Phytocannabinoids and endocannabinoids. **Current Drug Abuse Reviews**, v. 2, n. 1, p. 51-75, 2009.
 61. TSUBOI, K. et al. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: biological activities and metabolism. **Inflammation and Regeneration**, v. 38, n. 1, p. 28, 2018.
 62. SCHERMA, M. et al. Brain activity of anandamide: a rewarding bliss? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 309, 2019.
 63. MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61, 1993.
 64. NÚÑEZ, E. et al. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. **Synapse**, v. 53, n. 4, p. 208-213, 2004.
 65. BASAVARAJAPPA, B. S. Neuropharmacology of the endocannabinoid signaling system-molecular mechanisms, biological actions and synaptic plasticity. **Current Neuropharmacology**, v. 5, n. 2, p. 81-97, 2007.
 66. AIZPURUA-OLAIZOLA, O. et al. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 1, p. 105-110, 2017.
 67. FRANCISCHETTI, E. A.; ABREU, V. G. de; VIRGINIA, G. O sistema endocanabinóide: nova perspectiva no controle de fatores de risco cardiometabólico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. 548-558, 2006
 68. BRIZZI, A. et al. Resorcinol-sn-glycerol derivatives: novel 2-arachidonoylglycerol mimetics endowed with high affinity and selectivity for cannabinoid type 1 receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 24, p. 8278-8288, 2011.
 69. BRIZZI, A. et al. Structure–affinity relationships and pharmacological characterization of new alkyl-resorcinol cannabinoid receptor ligands: Identification of a dual cannabinoid receptor/TRPA1 channel agonist. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 17, p. 4770-4783, 2014.
 70. MACCARRONE, M. et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 5, p. 277-296, 2015.

71. JANSSEN, F. J.; VAN DER STELT, M. Inhibitors of diacylglycerol lipases in neurodegenerative and metabolic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 16, p. 3831-3837, 2016.
72. MOROZOV, Y. M. et al. Cannabinoid type 1 receptor-containing axons innervate NPY/AgRP neurons in the mouse arcuate nucleus. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 4, p. 374-381, 2017.
73. SOLOMON, A. et al. Participación del sistema nervioso y del tracto gastrointestinal en la homeostasis energética. **Revista de Medicina de la Universidad de Navarra**, v. 50, n. 1, p. 27, 2016.
74. RIBEIRO, A. G. C. O papel do Sistema Endocanabinóide no comportamento alimentar: Trabalho de Investigação. 2010.
75. JANSSEN, F. J. et al. Discovery of glycine sulfonamides as dual inhibitors of sn-1-diacylglycerol lipase α and α/β -hydrolase domain 6. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6610-6622, 2014.
76. DEL CAÑO, G. G. et al. Nuclear phospholipase C- β 1 and diacylglycerol Lipase- α in brain cortical neurons. **Advances in Biological Regulation**, v. 54, p. 12-23, 2014.
77. BISOGNO, T. et al. A novel fluorophosphonate inhibitor of the biosynthesis of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol with potential anti-obesity effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 4, p. 784-793, 2013.
78. REISENBERG, M. et al. The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1607, p. 3264-3275, 2012.
79. PEDICORD, D. L. et al. Molecular characterization and identification of surrogate substrates for diacylglycerol lipase α . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, n. 4, p. 809-814, 2011.
80. REIS, P. et al. Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147, p. 237-250, 2009.
81. SANT'ANNA, C. M. R.; DOS SANTOS VIANA, A.; DO NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. A semiempirical study of acetylcholine hydrolysis catalyzed by *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase. **Bioorganic Chemistry**, v. 34, n. 2, p. 77-89, 2006.
82. CHUPAK, L. S. et al. Structure activity relationship studies on chemically non-reactive glycine sulfonamide inhibitors of diacylglycerol lipase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1455-1468, 2016.
83. APPIAH, K. K. et al. Identification of Small Molecules That Selectively Inhibit Diacylglycerol Lipase- α Activity. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 19, n. 4, p. 595-605, 2014.
84. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. 3ª Edição. Porto Alegre, Artmed, 2015.

85. FERREIRA, L. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.
86. APAROY, P.; KUMAR REDDY, K.; REDDANNA, P. Structure and ligand-based drug design strategies in the development of novel 5-LOX inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 3763-3778, 2012.
87. YURIEV, E.; RAMSLAND, P. A. Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 5, p. 215-239, 2013.
88. PANTSAR, T.; POSO, A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1899, 2018.
89. BATISTA, V. S. & NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Molecular Docking: Considerations of a Low Cost and Suitable Methodology and Some Successful Applications. **Medicinal & Analytical Chemistry International Journal**, 2 (2018).
90. VERDONK, M. L. et al. Virtual screening using protein– ligand docking: avoiding artificial enrichment. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 3, p. 793-806, 2004.
91. VILAR, S.; COSTANZI, S. Predicting the biological activities through QSAR analysis and docking-based scoring. In: **Membrane Protein Structure and Dynamics**. Humana Press, Totowa, NJ. p. 271-284, 2012.
92. HEVENER, K. E. et al. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 2, p. 444-460, 2009.
93. KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935, 2004.
94. LIU, J.; WANG, R. Classification of current scoring functions. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 3, p. 475-482, 2015.
95. MENG, X. Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.
96. SALMASO, V.; MORO, S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: an overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.
97. BAGGELAAR, M. P. et al. Development of an activity-based probe and *in silico* design reveal highly selective inhibitors for diacylglycerol lipase- α in brain. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 46, p. 12081-12085, 2013.
98. JANSSEN, F. J. et al. Comprehensive Analysis of Structure–Activity Relationships of α -Ketoheterocycles as sn-1-Diacylglycerol Lipase α Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 9742-9753, 2015

99. JOHNSTON, M. et al. Assay and inhibition of diacylglycerol lipase activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 14, p. 4585-4592, 2012.
100. TANG, Q. et al. Lipase-Driven Epoxidation Is A Two-Stage Synergistic Process. **Chemistry Select**, v. 1, n. 4, p. 836-839, 2016.
101. OKADA-JUNIOR, C. Y. et al. Phthalimide Derivatives with Bioactivity against Plasmodium falciparum: Synthesis, Evaluation, and Computational Studies Involving bc 1 Cytochrome Inhibition. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 9424-9430, 2018.
102. PAVLUSHIN, A. V.; MOSHKIN, V. S.; SOSNOVSKIKH, V. Y. A novel diastereoselective α -functionalization of proline with benzaldehydes: synthesis of α -(α -hydroxybenzyl) prolines. **Mendeleev Communications**, v. 27, n. 6, p. 628-630, 2017.
103. CHAUDHURI, S. et al. Highly Stereoselective Syntheses of Proline-Derived Vicinal Amino Alcohols through Grignard Addition onto N-Tosylprolinal. **Synlett**, v. 27, n. 02, p. 215-220, 2016.
104. BERTILSSON, S. K.; ANDERSSON, P. G. A rigid dirhodium (II) carboxylate as an efficient catalyst for the asymmetric cyclopropanation of olefins. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 603, n. 1, p. 13-17, 2000.
105. NASCIMENTO-JÚNIOR, Nailton M. **Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Ligantes de Receptores de Quimiocinas CC e CXCR2**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
106. HU, L. et al. Spiro urea compounds as RSV antiviral compounds. U.S. Patent n. 9,738,652, 22 ago. 2017.
107. ELGAHER, W. A. M. et al. Discovery and structure-based optimization of 2-ureidothiophene-3-carboxylic acids as dual bacterial RNA polymerase and viral reverse transcriptase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 15, p. 7212-7222, 2016.
108. KLOECKNER, U.; NACHTSHEIM, B. J. Mild hypervalent iodine mediated oxidative nitration of N-aryl sulfonamides. **Chemical Communications**, v. 50, n. 72, p. 10485-10487, 2014.
109. DUTRA, L. A. et al. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837-4847, 2014.
110. LAHA, J. K.; JETHAVA, K. P.; DAYAL, N. Palladium-Catalyzed Intramolecular Oxidative Coupling Involving Double C (sp²)-H Bonds for the Synthesis of Annulated Biaryl Sultams. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 17, p. 8010-8019, 2014.
111. <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php> (Acessado em julho de 2019)

112. METRANGOLO, P. et al. The fluorine atom as a halogen bond donor, viz. a positive site. **CrystEngComm**, v. 13, n. 22, p. 6593-6596, 2011.
113. LI, W. et al. The enhancing effects of group V σ -hole interactions on the F... O halogen bond. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 36, p. 19282-19289, 2014.
114. MENDEZ, L. et al. Looking back, looking forward at halogen bonding in drug discovery. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1397, 2017.
115. CLAYDEN, J.; GREEVES N.; WARREN S. et al. Organic Chemistry. New York: Oxford University Press, 2000.
116. NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. et al. MAOS and medicinal chemistry: Some important examples from the last years. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9274-9297, 2011.
117. LIMA, E. C. de et al. DBU as a Catalyst for the Synthesis of Amides via Aminolysis of Methyl Esters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2186-2190, 2011.

ANEXO A – Estruturas químicas das substâncias encontradas na literatura com atividade inibitória comprovada frente DAGL- α

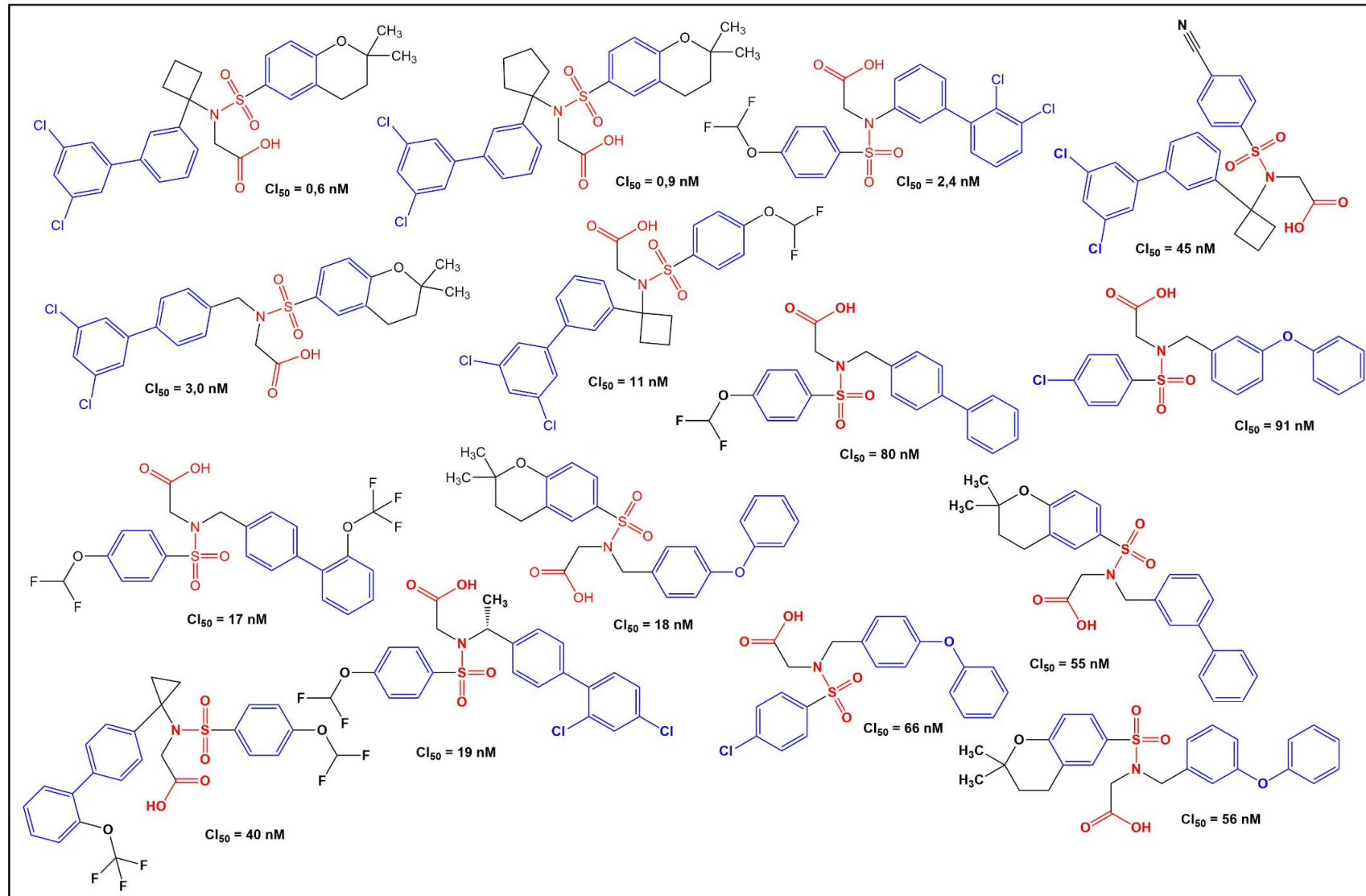


Figura 1: Estruturas químicas das substâncias classificadas como “Muito Ativas”.

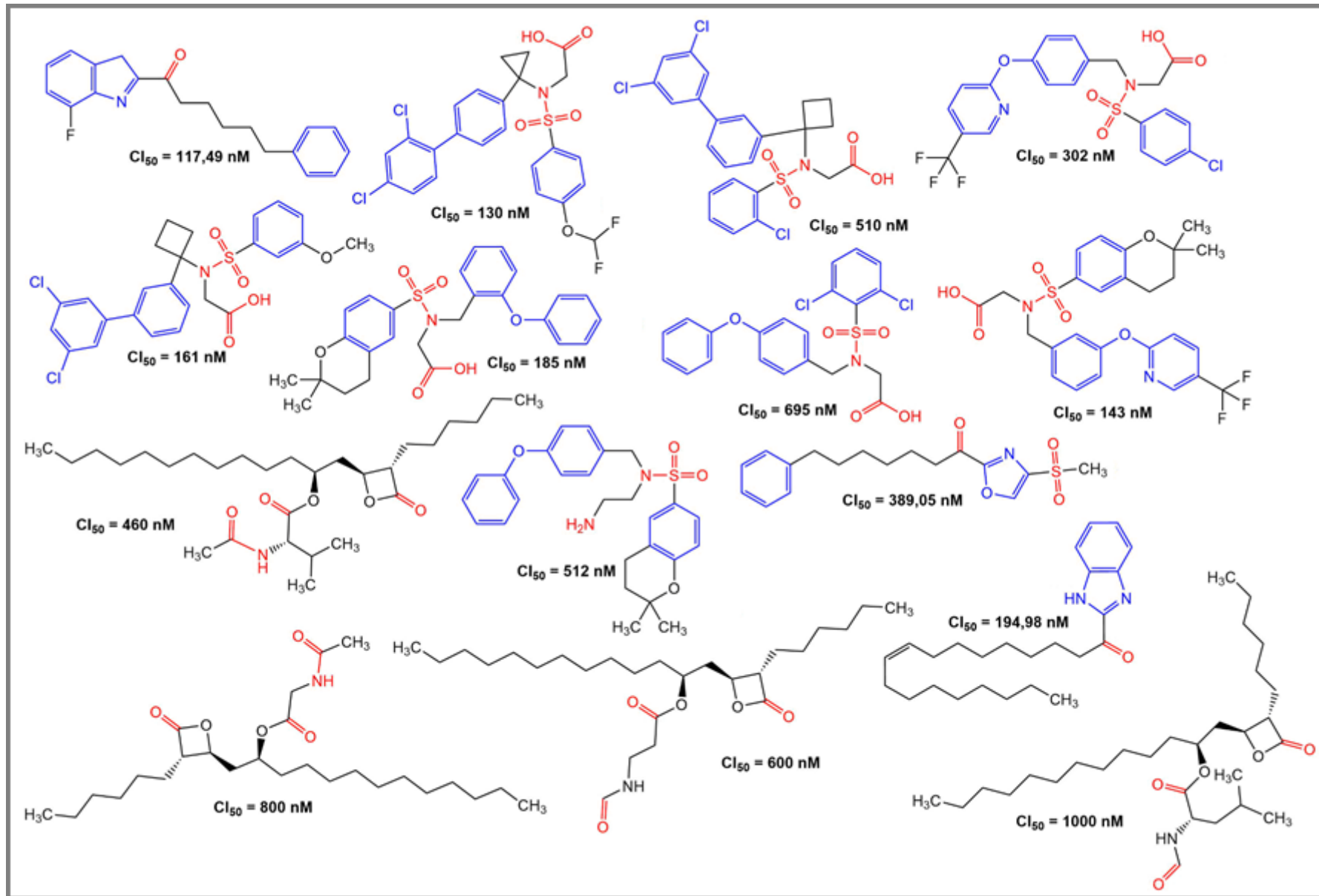


Figura 2: Estruturas químicas das substâncias classificadas como "Ativas".

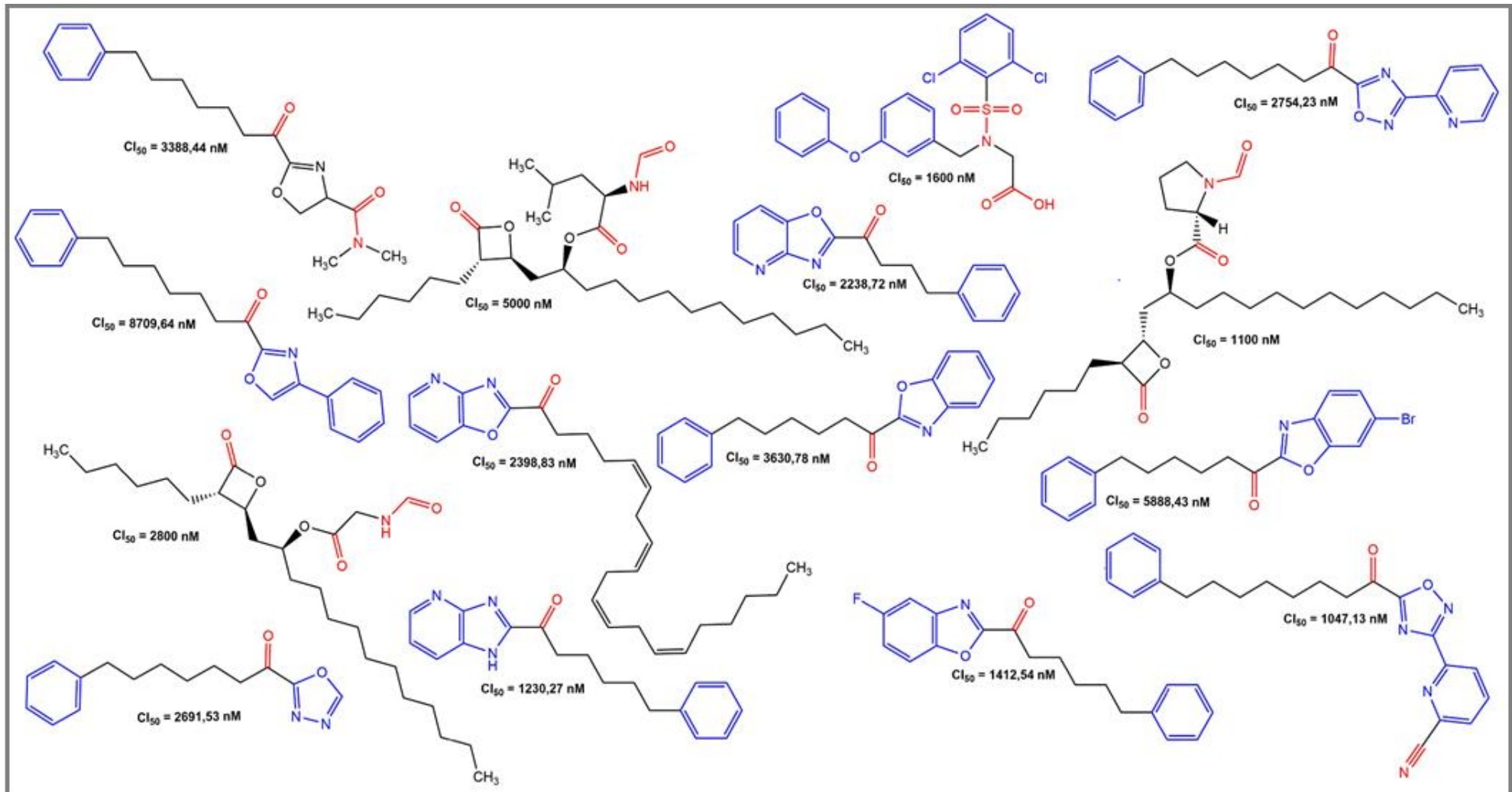


Figura 3: Estruturas químicas das substâncias classificadas como “Pouco Ativas”.

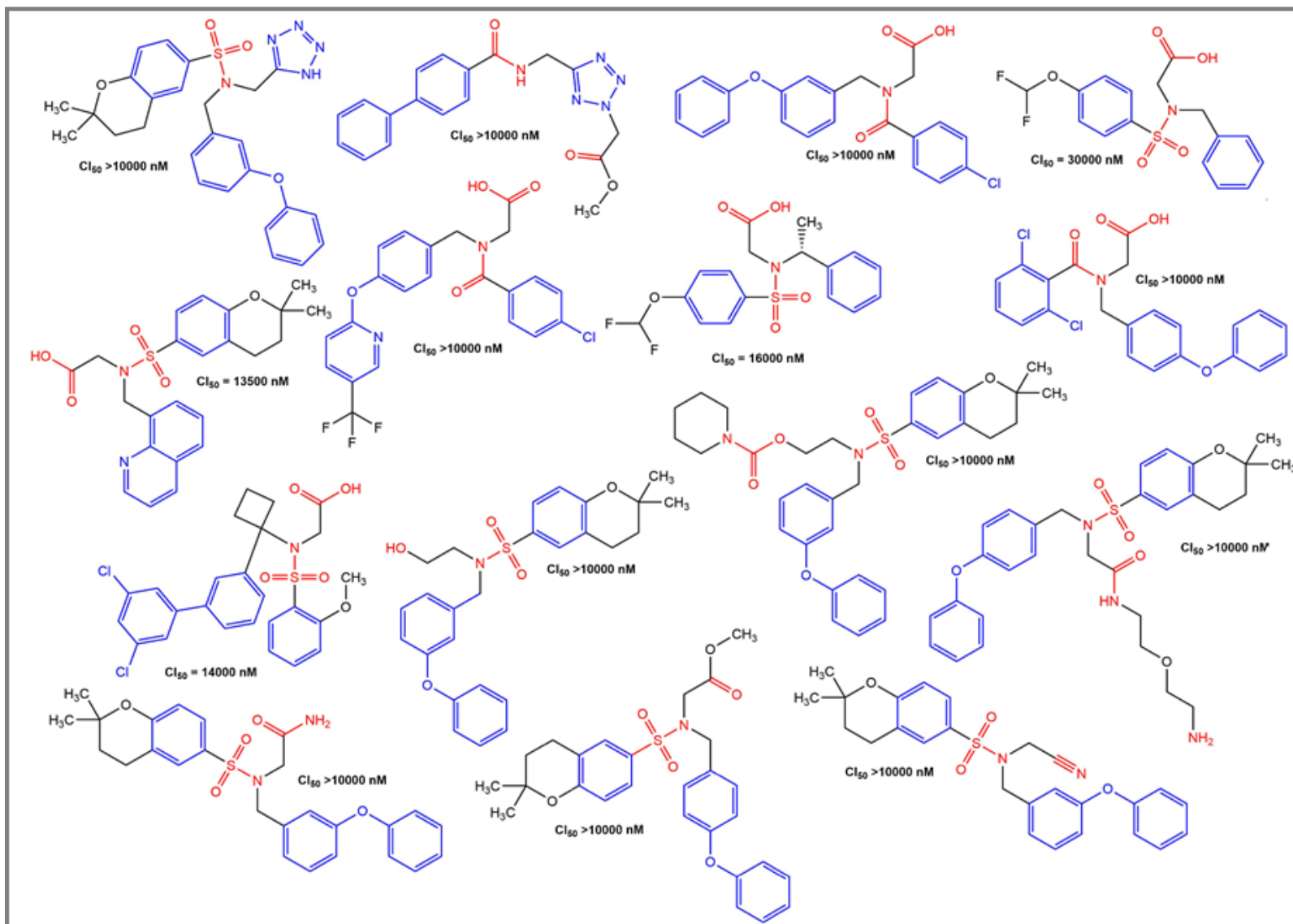


Figura 4: Estruturas químicas das substâncias classificadas como “Inativas”.

ANEXO B – Planilha das interações para os compostos classificados como “Muito ativos”, “Ativos”, “Pouco ativos” e “Inativos”

Ligante	Cl ₅₀ (nM)	ASP	H144	Y21	H259	Y84	S145	K270	F256	R87	I260	D267	V86	W261	S83	Q225	E257	S85	N88	G82	L146	Q265	F256-E257	L253	T254	R81	A268
ma_Op6_1	0,6	28,2396																									
ma_Op9_2	0,9	26,0876																									
ma_2p4_3_seg	2,4	31,7816																									
ma_3p0_4_pri	3,0	29,0723																									
ma_11_5	11	27,4294																									
ma_17_6_pri	17	35,8981																									
ma_18_7	18	37,9839																									
ma_19_8_pri	19	31,0457																									
ma_40_9	40	34,3790																									
ma_45_10_pri	45	25,1621																									
ma_55_11	55	35,8694																									
ma_56_12	56	37,7282																									
ma_66_13_seg	66	32,8017																									
ma_80_14_pri	80	34,3832																									
ma_91_15	91	35,6054																									
	%		20	20	53,3	40	0	86,7	86,7	93,3	80	80	93,3	40	20	6,67	40	6,67	6,67	0	0	0	0	0	0	0	0
a_117p49_1	117,49	31,1219																									
a_130_2	130	36,4330																									
a_143_3_pri	143	41,6933																									
a_161_4	161	27,3653																									
a_185_5	185	36,3923																									
a_194p98_6_pri	194,98	33,6549																									
a_302_7	302	38,9978																									
a_389p05_8	389,05	33,3874																									
a_460_9	460	34,3870																									
a_510_10_seg	510	24,2071																									
a_512_11_pri	512	34,5145																									
a_600_12_pri	600	34,3442																									
a_695_13_pri	695	34,3489																									
a_800_14_pri	800	30,0062																									
a_1000_15	1000	33,0286																									
	%		46,7	40	53,3	20	13,3	46,7	66,7	73,3	53,3	60	86,7	53,3	20	0	53,3	0	0	13,3	6,67	13,3	6,67	6,67	6,67	0	0

Figura 5: Planilha demonstrando as interações, em porcentagem, para a função ASP, dos ligantes “muito ativos” e “ativos”.

Ligante	Cl ₅₀ (nM)	ASP	H144	Y21	H259	Y84	S145	K270	F256	R87	I260	D267	V86	W261	S83	Q225	E257	S85	N88	G82	L146	Q265	F256-E257	L253	T254	R81	A268
pa_1047p13_1_pri	1047,13	35,0682																									
pa_1100_2_pri	1100	31,1779																									
pa_1230p27_3_pri	1230,27	33,6912																									
pa_1412p54_4_pri	1412,54	32,5059																									
pa_1600_5	1600	34,5437																									
pa_2238p72_6	2238,72	30,5569																									
pa_2398p83_7_pri	2398,83	32,8059																									
pa_2691p53_8	2691,53	30,2842																									
pa_2754p23_9	2754,23	33,5099																									
pa_2800_10_pri	2800	31,0733																									
pa_3388p44_11	3388,44	33,6068																									
pa_3630p78_12_pri	3630,78	31,7749																									
pa_5000_13	5000	31,0147																									
pa_5888p43_14_pri	5888,43	32,2665																									
pa_8709p67_15	8709,67	33,0566																									
%			13,3	20	20	33,3	0	46,7	13,3	33,3	53,3	73,3	80	20	0	6,67	20	0	6,67	0	0	6,67	0	6,67	0	6,67	0
i_10000_1_pri	10000	34,3249																									
i_10000_2_seg	10000	32,9707																									
i_10000_3	10000	36,4931																									
i_10000_4	10000	36,9745																									
i_10000_5	10000	40,4918																									
i_10000_6_seg	10000	39,2717																									
i_10000_7_pri	10000	37,3100																									
i_10000_8	10000	38,8698																									
i_10000_9_pri	10000	37,4353																									
i_10000_10	10000	28,2539																									
i_10000_11_pri	10000	35,6625																									
i_13500_12_pri	13500	27,9913																									
i_14000_13	14000	23,5480																									
i_16000_14	16000	29,8142																									
i_30000_15	30000	32,0369																									
%			13,3	6,67	13,3	6,67	0	80	86,7	86,7	80	93,3	100	66,7	0	0	66,7	0	0	0	0	6,67	0	13,3	13,3	0	6,67

Figura 6: Planilha demonstrando as interações, em porcentagem, para a função ASP, dos ligantes “pouco ativos” e “inativos”.

Ligante	GoldScore	CI ₅₀ (nM)	K270	Y84	F256	R87	I260	H144	S145	D267	V86	Y21	H259	W261	Q265	N88	S83	G82	E257	S85	T254	R81	L253	L146
ma_0p6_1_seg	44,2561	0,6																						
ma_0p9_2	43,2728	0,9																						
ma_2p4_3_pri	50,8489	2,4																						
ma_3p0_4	42,9077	3,0																						
ma_11_5_pri	42,4298	11																						
ma_17_6_seg	51,9639	17																						
ma_18_7_seg	48,4268	18																						
ma_19_8	50,6386	19																						
ma_40_9_pri	41,2168	40																						
ma_45_10_pri	44,4664	45																						
ma_55_11	59,226	55																						
ma_56_12	56,0396	56																						
ma_66_13_pri	45,6975	66																						
ma_80_14	46,057	80																						
ma_91_15	51,5582	91																						
%			93,3	46,7	73,3	73,3	66,7	46,7	6,67	66,7	93,3	46,7	46,7	26,7	6,67	13,3	6,67	6,67	6,67	6,67	0	0	0	0
a_117p49_1_seg	46,0734	117,49																						
a_130_2	47,8883	130																						
a_143_3	52,5031	143																						
a_161_4_pri	41,3368	161																						
a_185_5_pri	53,5109	185																						
a_194p98_6	43,8854	194,98																						
a_302_7	48,9669	302																						
a_389p05_8	52,9979	389,05																						
a_460_9	38,8895	460																						
a_510_10	40,3185	510																						
a_512_11	44,7893	512																						
a_600_12_pri	60,8151	600																						
a_695_13	50,5775	695																						
a_800_14	44,4769	800																						
a_1000_15	44,0092	1000																						
%			80	33,3	40	80	46,7	33,3	0	53,3	86,7	40	46,7	13,3	6,67	0	0	0	33,3	6,67	6,67	13,3	6,67	6,67

Figura 7: Planilha demonstrando as interações, em porcentagem, para a função GoldScore dos ligantes “muito ativos” e “ativos”.

Ligante	GoldScore	Cl ₅₀ (nM)	K270	Y84	F256	R87	I260	H144	S145	D267	V86	Y21	H259	W261	Q265	N88	S83	G82	E257	S85	T254	R81	L253	L146
pa_1047p13_1	51,6542	1047,13	■			■				■	■	■	■											
pa_1100_2	28,4658	1100		■							■	■	■								■		■	
pa_1230p27_3	50,7646	1230,27	■			■				■	■	■							■		■			
pa_1412p54_4_pri	46,7091	1412,54	■	■		■		■		■	■	■		■					■			■		
pa_1600_5_pri	51,2476	1600	■	■	■					■	■	■							■					
pa_2238p72_6	44,7037	2238,72	■	■		■	■			■	■	■							■					
pa_2398p83_7_pri	51,7541	2398,83	■	■	■						■	■		■										
pa_2691p53_8	51,3417	2691,53									■	■					■			■				■
pa_2754p23_9	45,8228	2754,23	■	■						■	■	■		■					■					
pa_2800_10_pri	35,9381	2800	■		■						■	■										■		■
pa_3388p44_11_pri	46,8827	3388,44	■			■				■	■	■											■	
pa_3630p78_12	45,794	3630,78	■	■		■	■			■	■	■							■					
pa_5000_13	35,5856	5000		■	■	■	■	■	■		■	■	■	■										
pa_5888p43_14	49,8928	5888,43	■	■		■				■	■	■							■		■			
pa_8709p67p_15	45,5648	8709,67				■				■	■	■							■		■			
%			80	26,7	13,3	60	33	13,3	0	66,7	86,7	13,3	20	20	0	0	6,67	0	33,3	13,3	13,3	13,3	6,67	13,3
i_10000_1	53,994	10000	■		■	■	■	■			■	■		■										
i_10000_2_seg	56,1987	10000	■		■	■	■	■			■	■		■					■					
i_10000_3	40,4307	10000	■	■		■	■			■	■	■		■										
i_10000_4	47,8941	10000	■		■	■	■			■	■	■		■										
i_10000_5	58,0619	10000	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■										
i_10000_6	57,5217	10000	■	■	■	■	■			■	■	■		■					■					
i_10000_7	54,5442	10000	■		■	■	■			■	■	■		■										
i_10000_8	56,89	10000	■		■	■	■			■	■	■		■					■					
i_10000_9	55,2014	10000	■		■	■	■			■	■	■		■					■					
i_10000_10_pri	48,8356	10000	■	■	■	■	■			■	■	■		■									■	
i_10000_11	51,118	10000	■		■	■	■			■	■	■		■		■								
i_13500_12_seg	40,5111	13500	■	■	■	■	■			■	■	■	■	■										
i_14000_13_pri	42,089	14000	■	■	■	■	■	■		■	■	■		■										
i_16000_14_pri	41,952	16000	■	■	■	■	■			■	■	■		■					■					
i_30000_15	47,8654	30000	■	■	■	■	■			■	■	■		■					■					
%			100	26,7	80	93,3	60	20	0	60	100	33,3	20	40	6,67	0	0	0	33,3	0	0	0	6,67	0

Figura 8: Planilha demonstrando as interações, em porcentagem, para a função GoldScore, “pouco ativos” e “inativos”.

Ligante	ChemScore	Cl ₅₀ (nM)	K270	Y84	F256	R87	I260	H144	S83	D267	V86	Y21	H259	W261	Q265	E257	S85	Q225	R81	L146	T254	L253
ma_0p6_1_seg	27,2698	0,6	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
ma_0p9_2_seg	27,2753	0,9	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■									
ma_2p4_3_seg	21,3041	2,4	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■	■						
ma_3p0_4_pri	27,9230	3,0	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■									
ma_11_5_pri	23,7983	11	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
ma_17_6	18,8121	17	■				■	■		■	■	■	■			■						
ma_18_7	28,4599	18	■	■		■	■	■		■	■	■	■			■						
ma_19_8_pri	20,2668	19	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■			■		■				
ma_40_9_pri	16,8494	40	■	■		■	■	■		■	■	■	■				■					
ma_45_10_pri	23,4794	45	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■									
ma_55_11_pri	28,6353	55	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■									
ma_56_12_pri	26,9858	56	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
ma_66_13_pri	25,0397	66	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
ma_80_14_pri	23,5933	80	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■									
ma_91_15_pri	25,6636	91	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
%			100	73,3	46,7	73,3	40	40	13,3	100	93,3	40	60	0	6,67	20	13,3	6,67	0	0	0	0
a_117p49_1_pri	27,6764	117,49	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
a_130_2_seg	20,8149	130	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■	■						
a_143_3_pri	21,8407	143	■	■		■	■	■		■	■	■	■			■	■					
a_161_4_seg	22,0557	161	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■			■	■					
a_185_5_pri	25,8345	185	■	■		■	■	■		■	■	■	■			■						
a_194p98_6_pri	25,9836	194,98	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■						■	■		
a_302_7_pri	21,3266	302	■	■		■	■	■		■	■	■	■		■	■						
a_389p05_8_pri	21,1300	389,05	■	■		■	■	■		■	■	■	■		■	■						
a_460_9_pri	23,3259	460	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
a_510_10_pri	23,3491	510	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■									
a_512_11_seg	27,7465	512	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
a_600_12_pri	19,7024	600	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■									
a_695_13	24,4110	695	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
a_800_14	24,1680	800	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
a_1000_15_seg	23,4818	1000	■	■		■	■	■		■	■	■	■									
%			80	33,3	20	60	46,7	20	0	53,3	73,3	60	26,7	33,3	13,3	26,7	0	0	13,3	26,7	0	0

Figura 9: Planilha demonstrando as interações, em porcentagem, para a função ChemScore dos ligantes “muito ativos” e “ativos”.

Ligante	ChemScore	Cl ₅₀ (nM)	K270	Y84	F256	R87	I260	H144	S83	D267	V86	Y21	H259	W261	Q265	E257	S85	Q225	R81	L146	T254	L253
pa_1047p13_1_pri	24,7409	1047,13																				
pa_1100_2_seg	24,3451	1100																				
pa_1230p27_3_pri	24,0981	1230,27																				
pa_1412p54_4_pri	25,2032	1412,54																				
pa_1600_5	25,0612	1600																				
pa_2238p72_6	21,8583	2238,72																				
pa_2398p83_7_pri	26,4274	2398,83																				
pa_2691p53_8_pri	18,4446	2691,53																				
pa_2754p23_9	24,8861	2754,23																				
pa_2800_10_pri	20,2641	2800																				
pa_3388p44_11_pri	23,2313	3388,44																				
pa_3630p78_12_pri	25,7472	3630,78																				
pa_5000_13	24,2128	5000																				
pa_5888p43_14_pri	26,2893	5888,43																				
pa_8709p67_15	27,9303	8709,67																				
%			66,7	33,3	0	26,7	33,3	0	0	73,3	73,3	26,7	0	20	0	6,67	26,7	0	26,7	6,67	0	0
i_10000_1	27,0821	10000																				
i_10000_2	25,8570	10000																				
i_10000_3_pri	27,2729	10000																				
i_10000_4_pri	27,8621	10000																				
i_10000_5_pri	30,4655	10000																				
i_10000_6_pri	27,5369	10000																				
i_10000_7	26,9654	10000																				
i_10000_8_pri	29,4198	10000																				
i_10000_9_pri	26,0733	10000																				
i_10000_10	20,6236	10000																				
i_10000_11_pri	19,8828	10000																				
i_13500_12_pri	21,6066	13500																				
i_14000_13	25,0212	14000																				
i_16000_14_pri	19,4660	16000																				
i_30000_15	18,5596	30000																				
%			86,7	53,3	60	86,7	53,3	20	0	100	100	20	20	13,3	0	13,3	6,67	0	0	0	6,67	6,67

Figura 10: Planilha demonstrando as interações, em porcentagem, para a função ChemScore, “pouco ativos” e “inativos”.

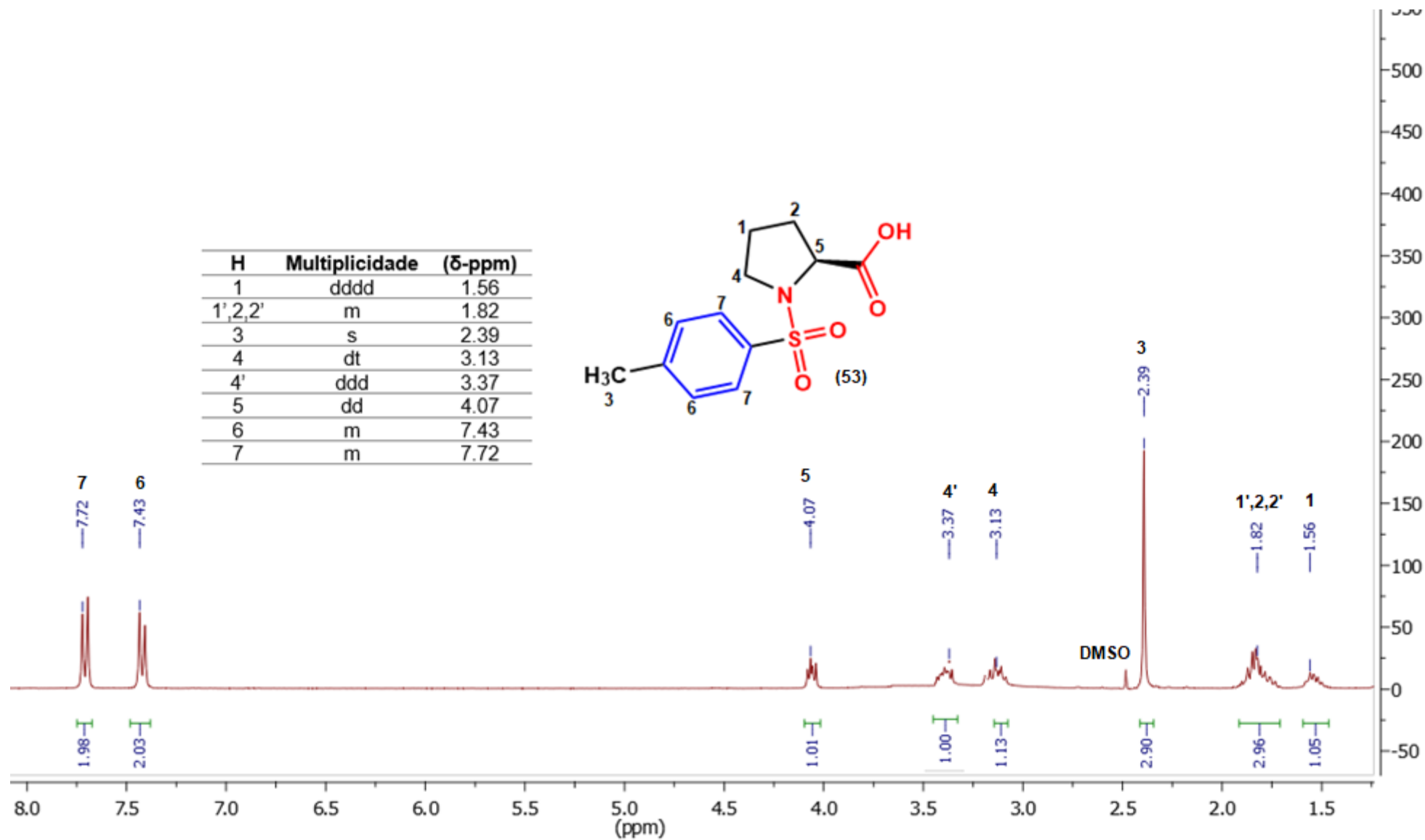
Ligante	CHEMPLP	Cl ₅₀ (nM)	K270	Y84	F256	R87	I260	H144	S85	D267	V86	Y21	H259	W261	E257	Q265	S83	N88	Q225	L253	T254	L146	F256-E257	R81	A268
ma_0p6_1_seg	57,2632	0,6																							
ma_0p9_2	65,0765	0,9																							
ma_2p4_3_pri	55,6629	2,4																							
ma_3p0_4_seg	57,5631	3,0																							
ma_11_5	64,1346	11																							
ma_17_6_seg	58,3107	17																							
ma_18_7_pri	67,3167	18																							
ma_19_8	52,8418	19																							
ma_40_9	58,8968	40																							
ma_45_10_pri	57,8237	45																							
ma_55_11_pri	69,6066	55																							
ma_56_12_pri	68,8853	56																							
ma_66_13_pri	60,8716	66																							
ma_80_14	64,7182	80																							
ma_91_15_pri	64,6586	91																							
%			100	60	86,7	100	46,7	33,3	20	80	73,3	13,3	33,3	13,3	33,3	6,67	6,67	6,67	6,67	0	0	0	0	0	0
a_117p49_1	63,5927	117,49																							
a_130_2	58,1215	130																							
a_143_3	54,1751	143																							
a_161_4_pri	46,9695	161																							
a_185_5	68,3689	185																							
a_194p98_6_pri	64,9570	194,98																							
a_302_7_pri	61,2204	302																							
a_389p05_8	62,4977	389,05																							
a_460_9	68,9922	460																							
a_510_10_pri	49,7904	510																							
a_512_11_pri	63,9551	512																							
a_600_12_pri	70,0001	600																							
a_695_13_pri	61,8956	695																							
a_800_14_seg	64,7962	800																							
a_1000_15_pri	65,5057	1000																							
%			73,3	33,3	73,3	66,7	33,3	40	0	53,3	86,7	33,3	53,3	6,67	40	6,67	6,67	6,67	0	26,7	6,67	6,67	0	0	0

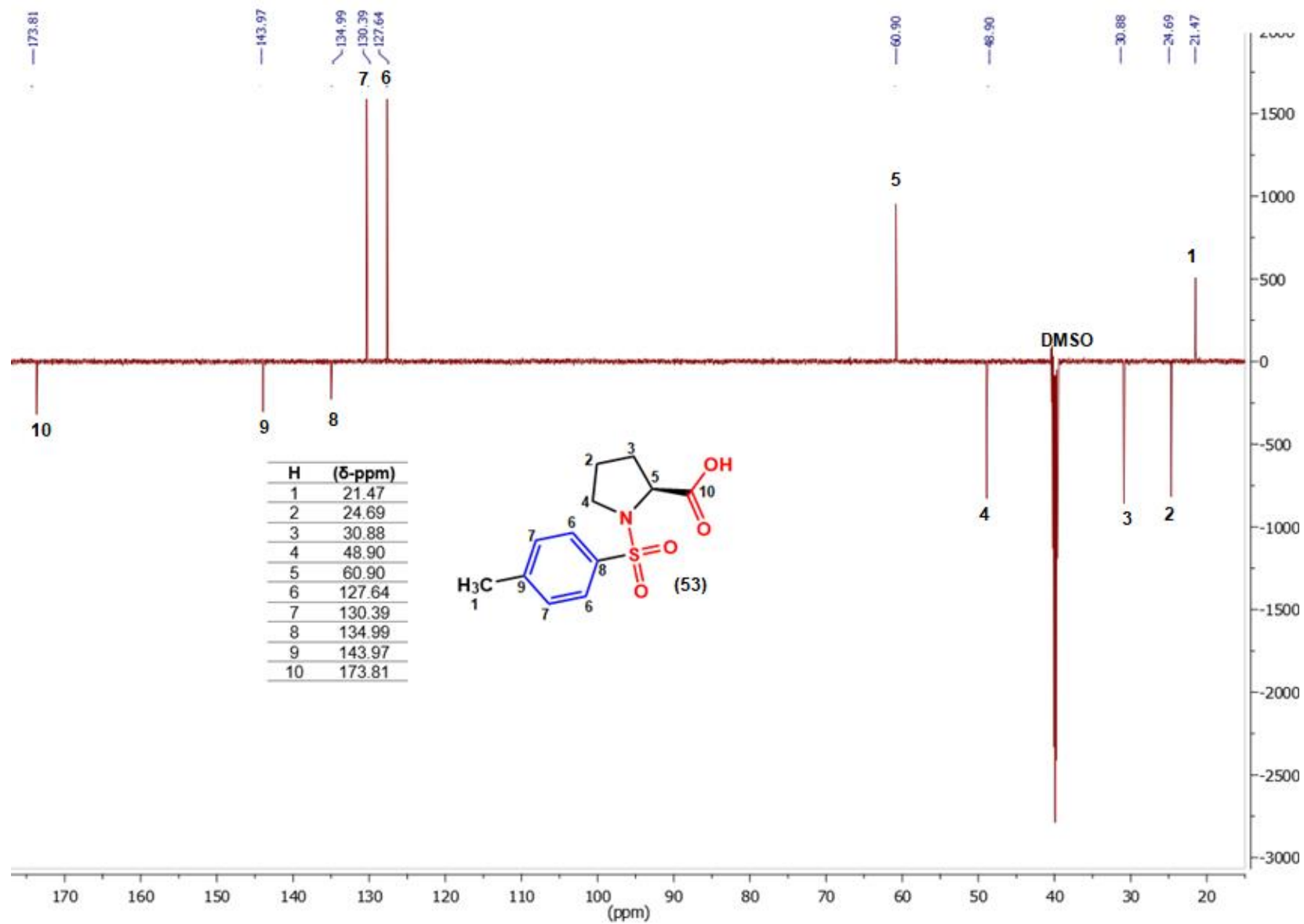
Figura 11: Planilha demonstrando as interações, em porcentagem, para a função ChemPLP dos ligantes “muito ativos” e “ativos”.

Ligante	CHEMPLP	Cl ₅₀ (nM)	K270	Y84	F256	R87	I260	H144	S85	D267	V86	Y21	H259	W261	E257	Q265	S83	N88	Q225	L253	T254	L146	F256-E257	R81	A268
pa_1047p13_1_seg	67,5473	1047,13																							
pa_1100_2	72,2699	1100																							
pa_1230p27_3	62,0899	1230,27																							
pa_1412p54_4_pri	63,8711	1412,54																							
pa_1600_5_pri	62,6098	1600																							
pa_2238p72_6_pri	54,0383	2238,72																							
pa_2398p83_7_pri	66,9478	2398,83																							
pa_2691p53_8	56,0360	2691,53																							
pa_2754p23_9	63,8851	2754,23																							
pa_2800_10	68,6988	2800																							
pa_3388p44_11	64,7853	3388,44																							
pa_3630p78_12	64,2286	3630,78																							
pa_5000_13	69,0506	5000																							
pa_5888p43_14	63,9294	5888,43																							
pa_8709p67_15	64,8646	8709,67																							
%			33,3	20	26,7	86,7	26,7	6,67	0	80	93,3	13,3	6,67	6,67	6,67	0	0	6,67	0	0	26,7	0	13,3	6,67	0
i_10000_1	66,9888	10000																							
i_10000_2	61,6816	10000																							
i_10000_3	65,9728	10000																							
i_10000_4	65,5704	10000																							
i_10000_5	75,8668	10000																							
i_10000_6_pri	72,1442	10000																							
i_10000_7_pri	66,1573	10000																							
i_10000_8_pri	66,7040	10000																							
i_10000_9_pri	63,7103	10000																							
i_10000_10	57,9064	10000																							
i_10000_11	59,9945	10000																							
i_13500_12	52,5827	13500																							
i_14000_13	54,6584	14000																							
i_16000_14_pri	51,2745	16000																							
i_30000_15_pri	60,6772	30000																							
%			80	20	53,3	93,3	33,3	6,67	0	86,7	93,3	6,67	6,67	13,3	46,7	6,67	0	0	0	13,3	13,3	0	0	0	6,67

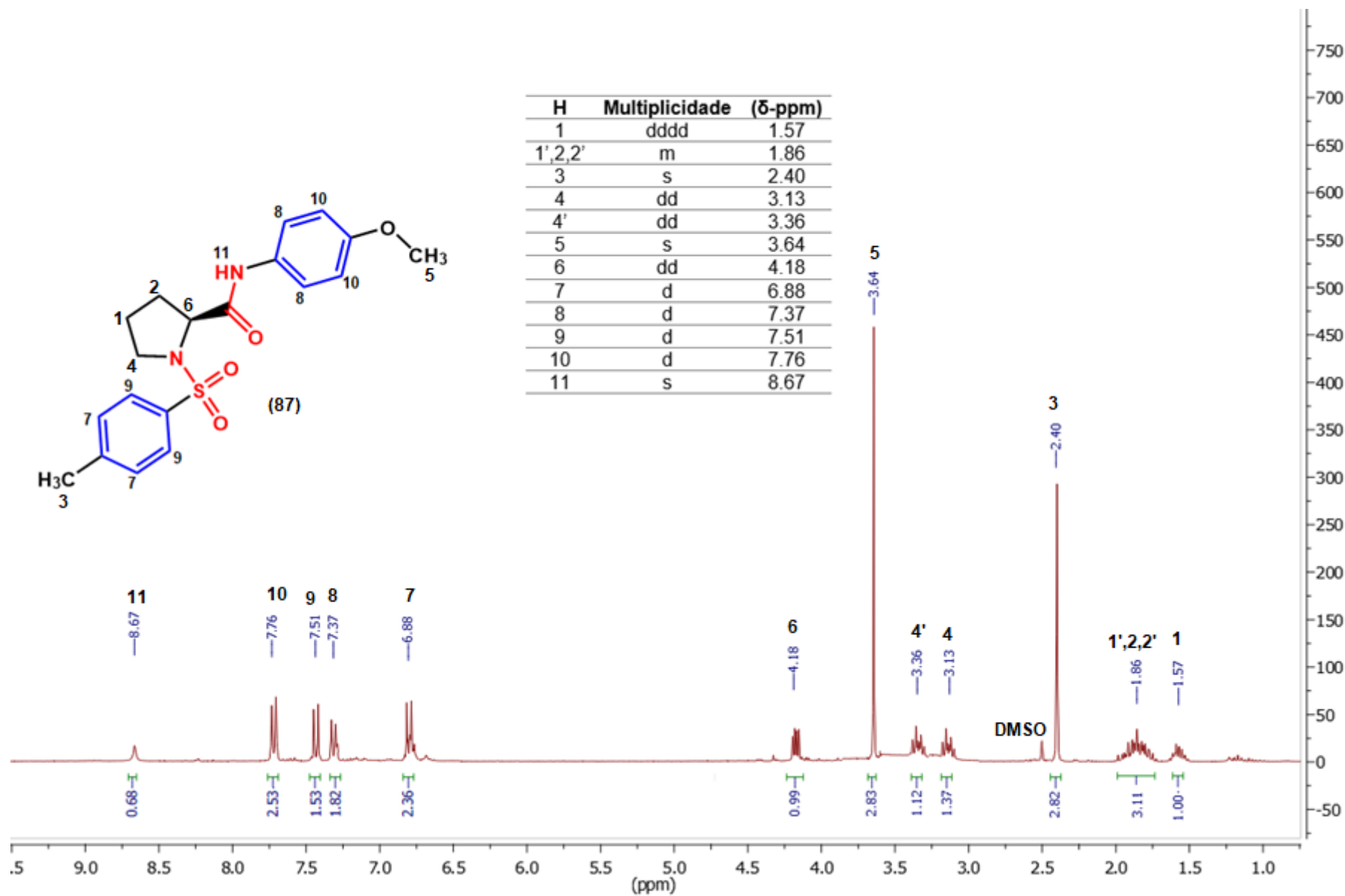
Figura 12: Planilha demonstrando as interações, em porcentagem, para a função ChemPLP, “pouco ativos” e “inativos”.

ANEXO C – Espectro de RMN de ^1H , obtido para o intermediário 53; Solvente: DMSO- d_6 , 600 MHz.

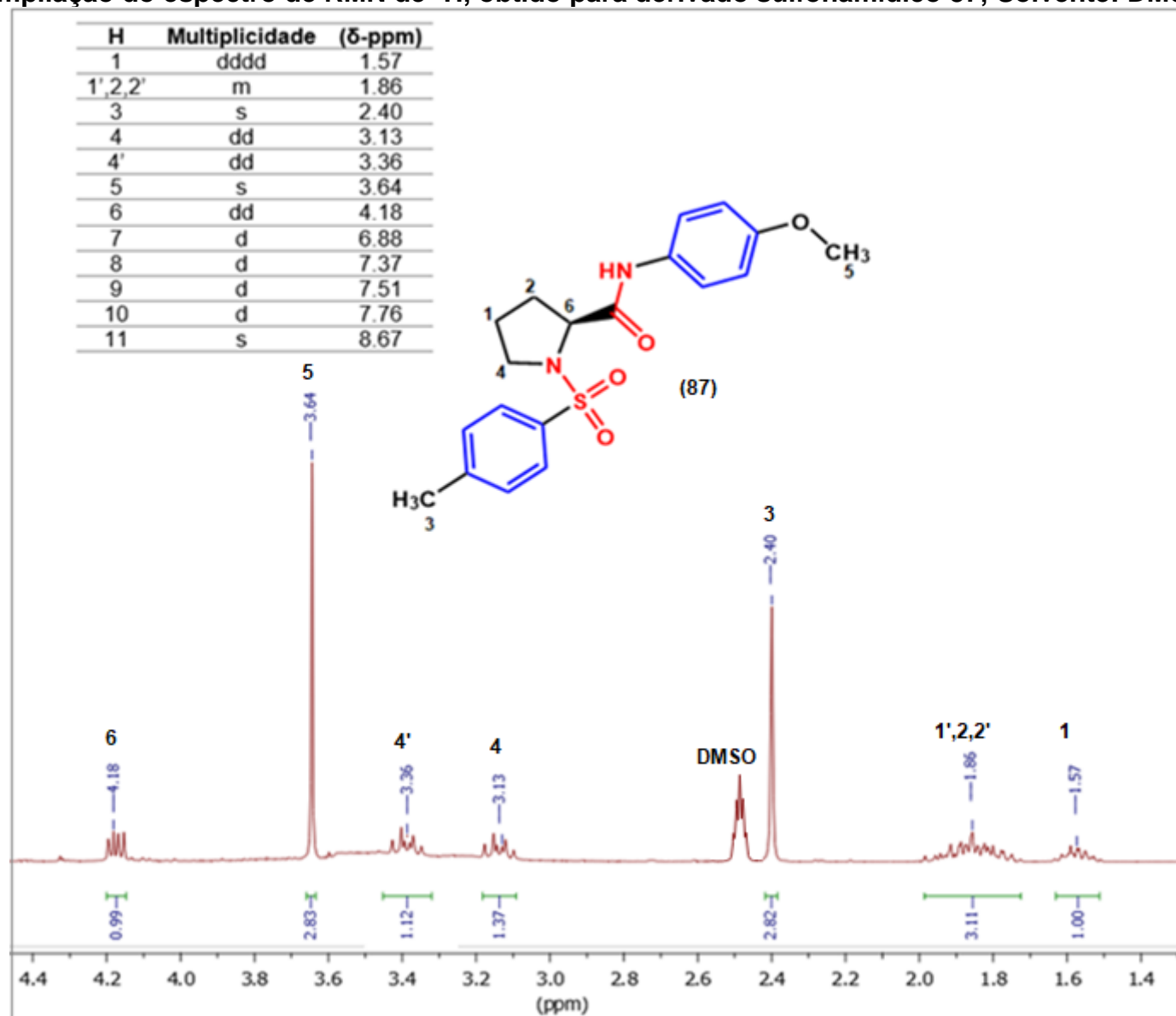


ANEXO D – Espectro de RMN DEPT-Q, obtido para o intermediário 53; Solvente: DMSO-d₆, 150 MHz.

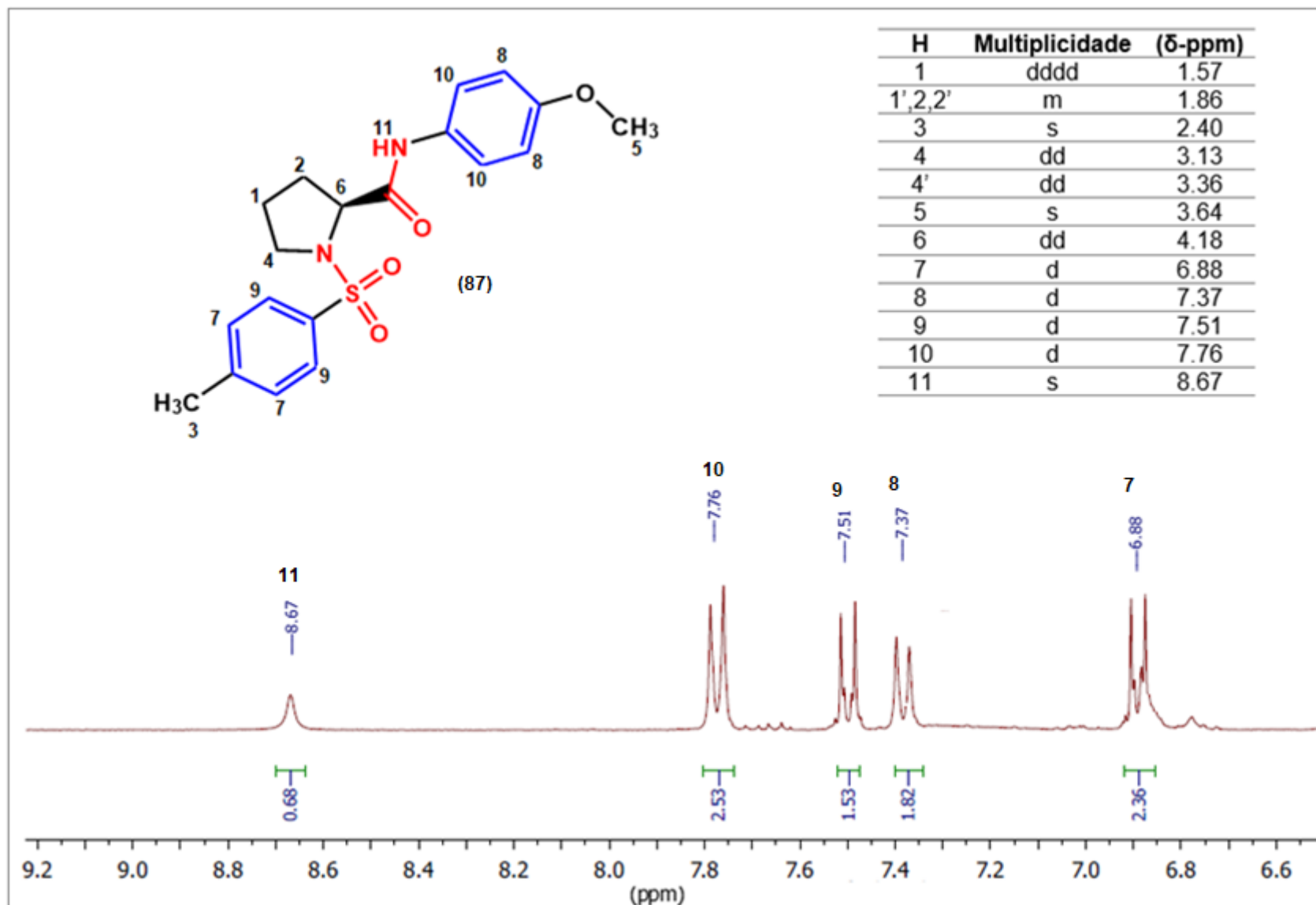
ANEXO E – Espectro de RMN de ^1H , obtido para derivado sulfonamídico 87; Solvente: DMSO-d_6 , 300 MHz.



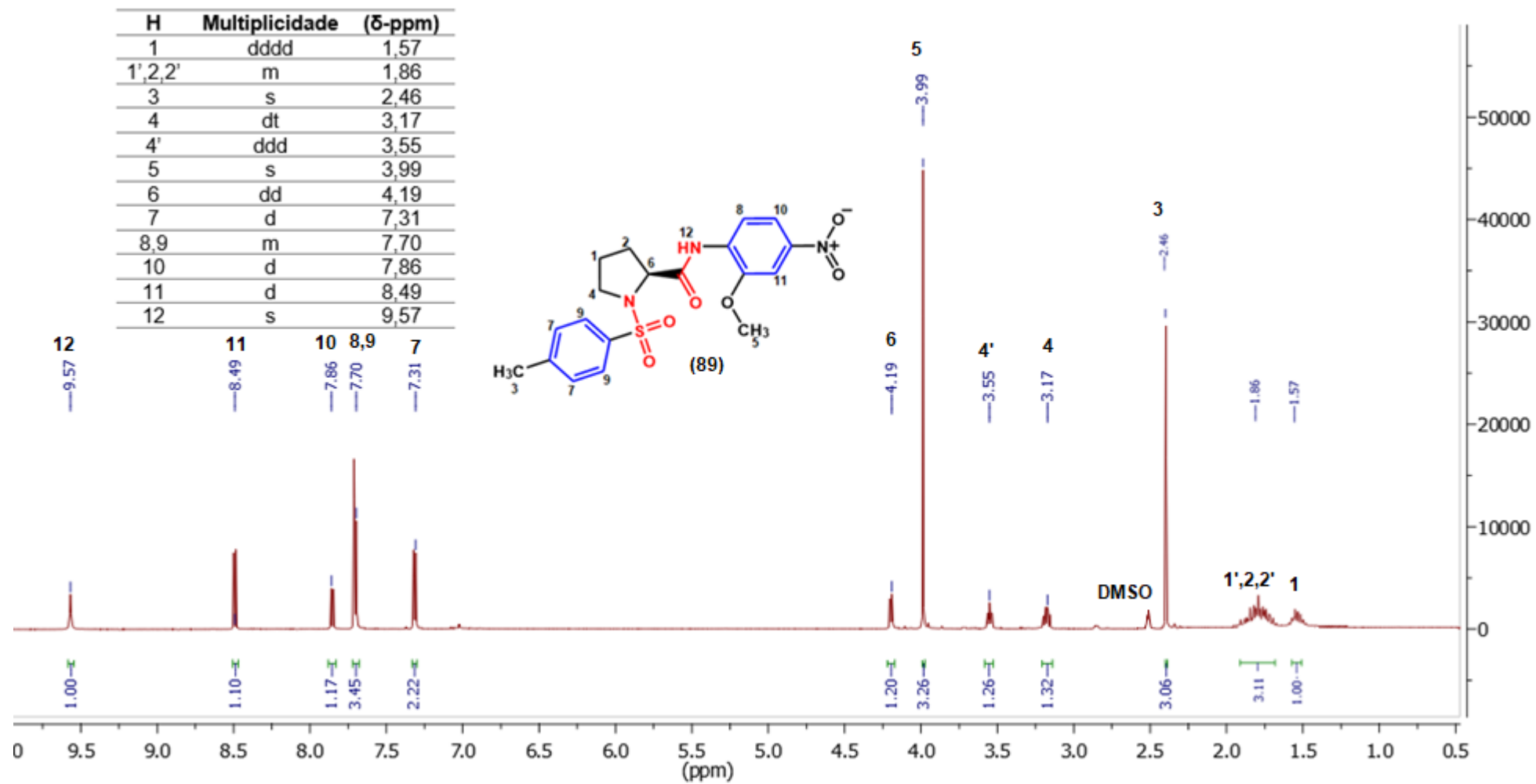
ANEXO F – Ampliação do espectro de RMN de ^1H , obtido para derivado sulfonamídico 87; Solvente: DMSO- d_6 , 300 MHz.



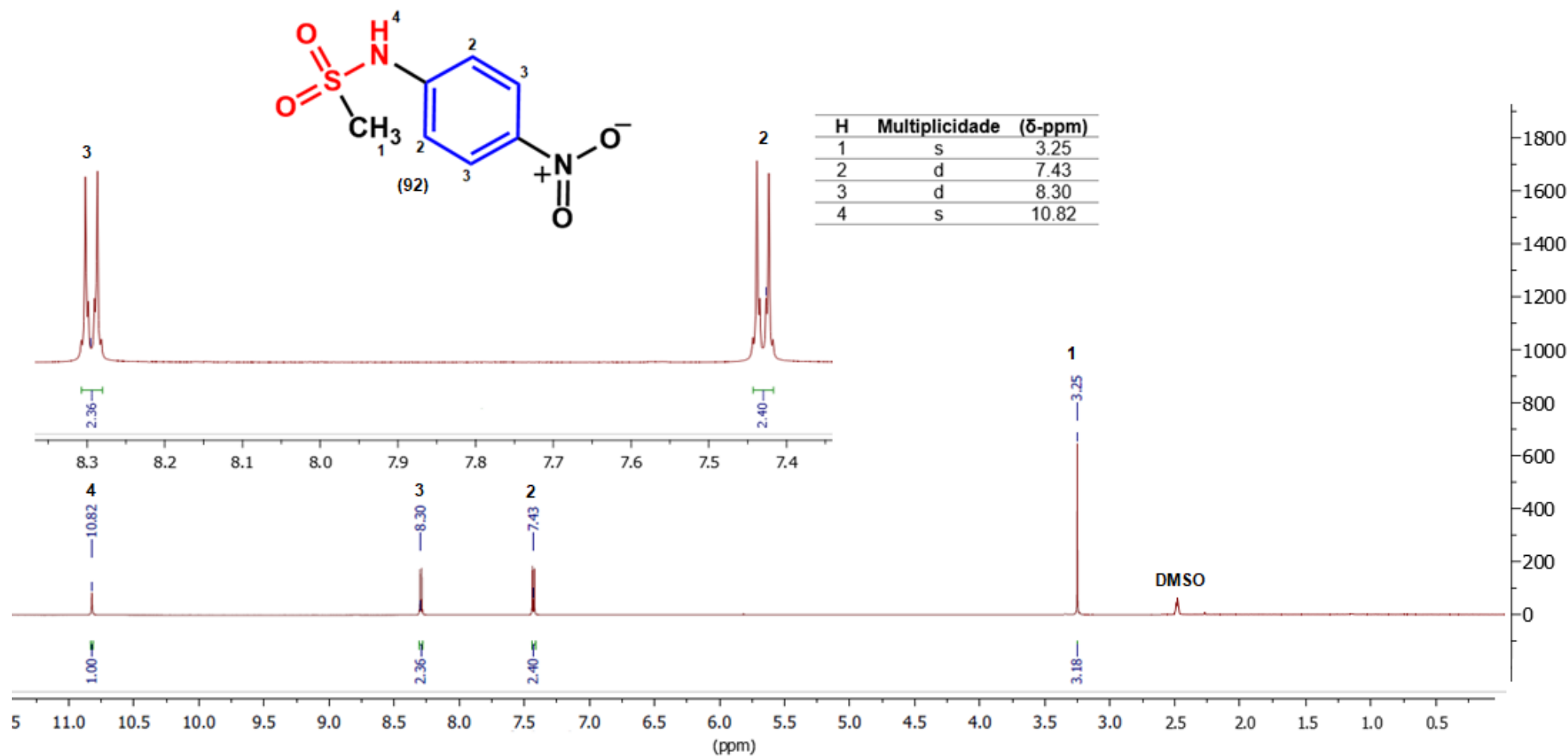
ANEXO G – Ampliação do espectro de RMN de ^1H , obtido para derivado sulfonamídico 87; Solvente: DMSO-d_6 , 300 MHz.



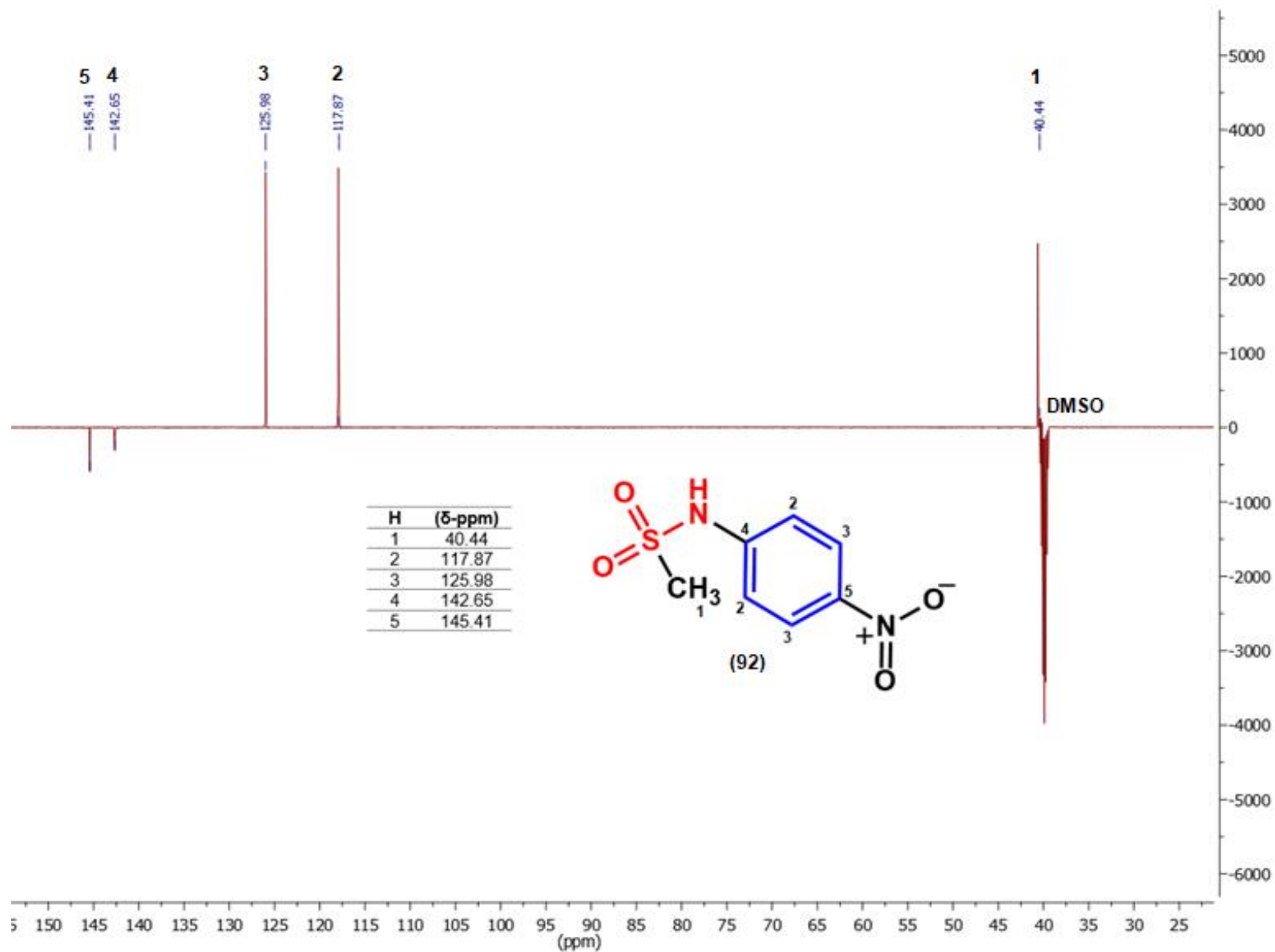
ANEXO H – Espectro de RMN de ^1H , obtido para o derivado sulfonamídico 89; Solvente: DMSO-d_6 , 600 MHz.



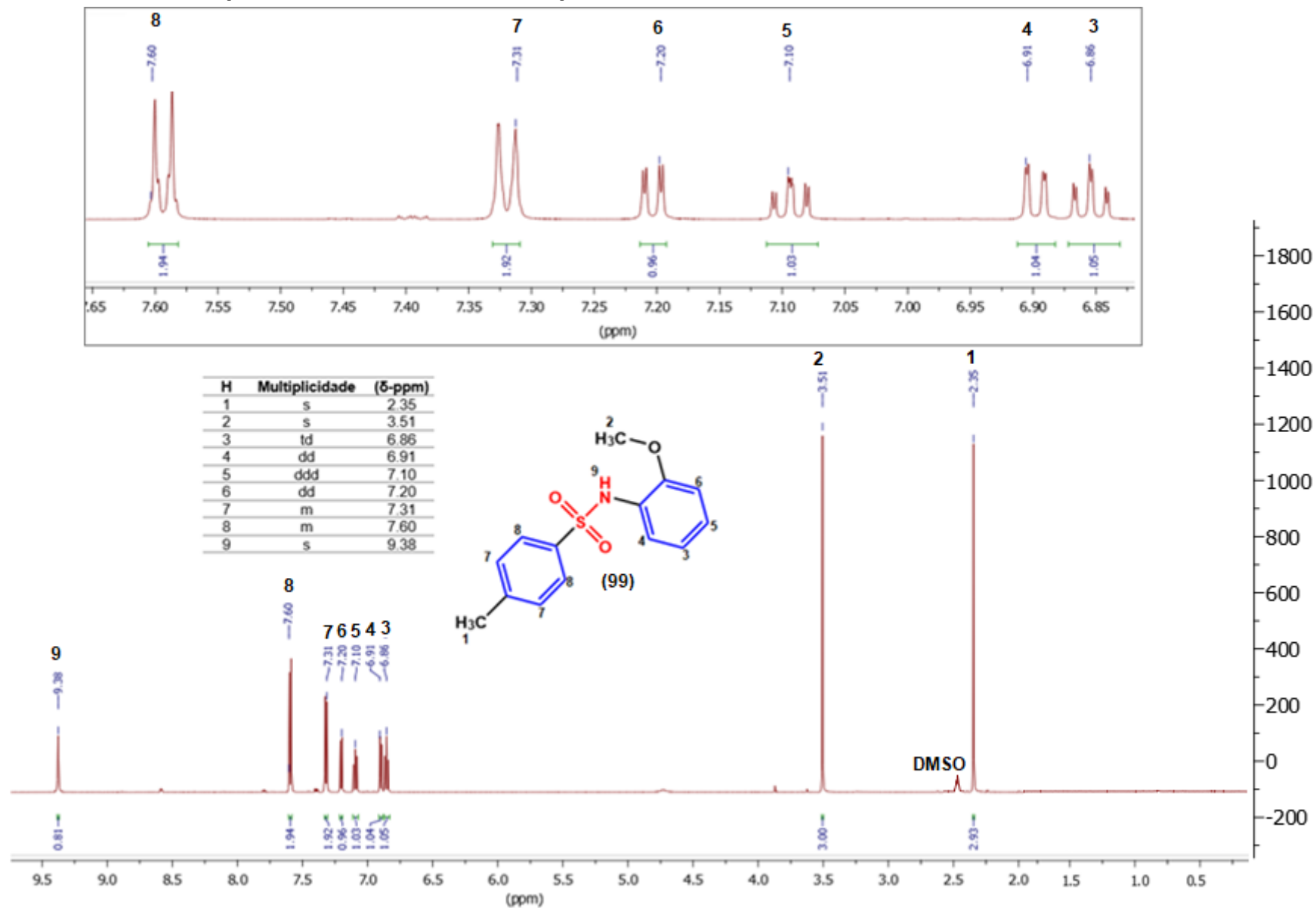
ANEXO I – Espectro de RMN de ^1H , obtido para derivado sulfonamídico 92; Solvente: DMSO-d_6 , 600 MHz.



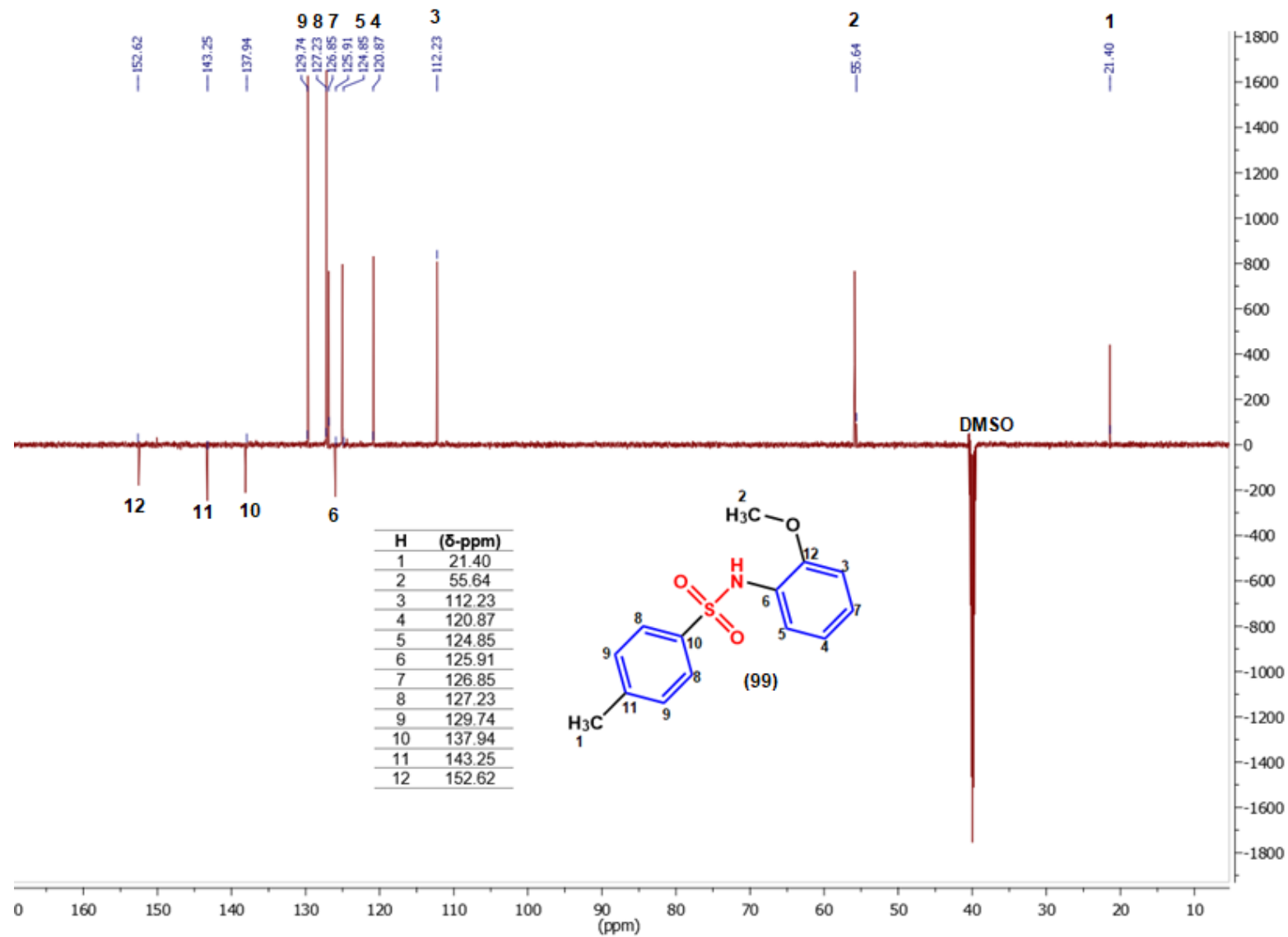
ANEXO J – Espectro de RMN DEPT-Q, obtido para o derivado sulfonamídico 92; Solvente: DMSO-d₆, 150 MHz.



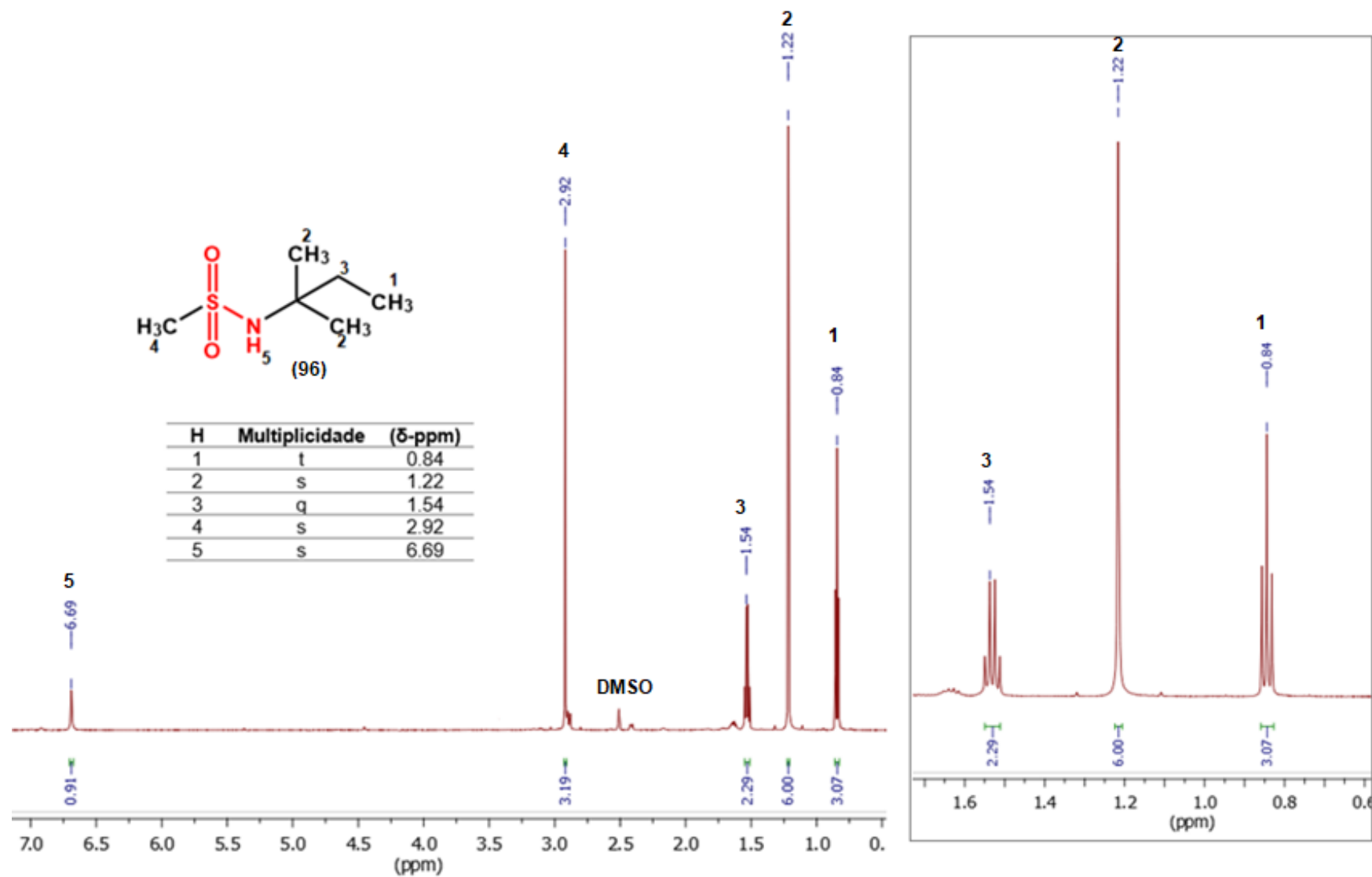
ANEXO K – Espectro de RMN de ^1H , obtido para derivado sulfonamídico 99; Solvente: DMSO-d_6 , 600 MHz.



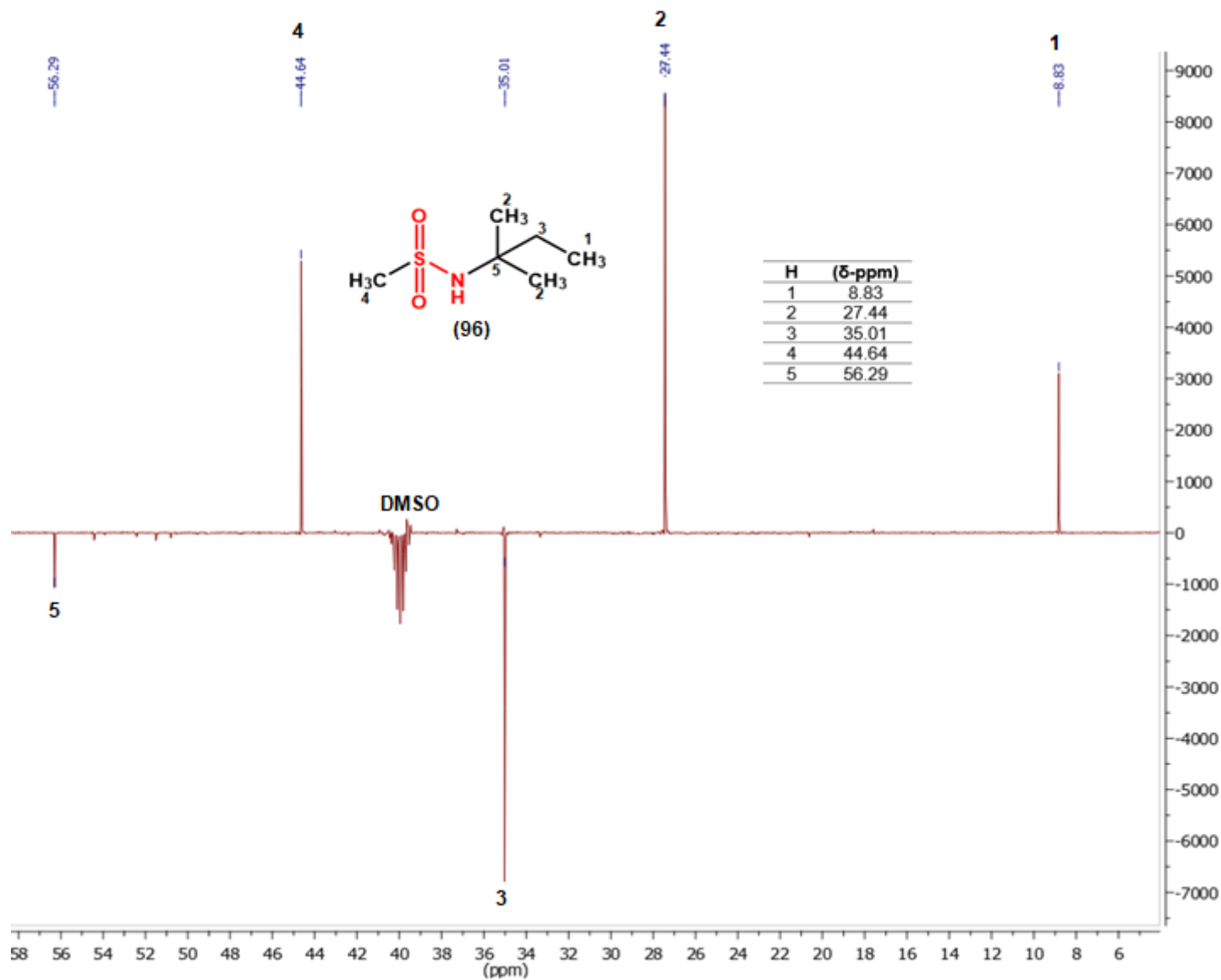
ANEXO L – Espectro de RMN DEPT-Q, obtido para o derivado sulfonamídico 99; Solvente: DMSO-d₆, 150 MHz.



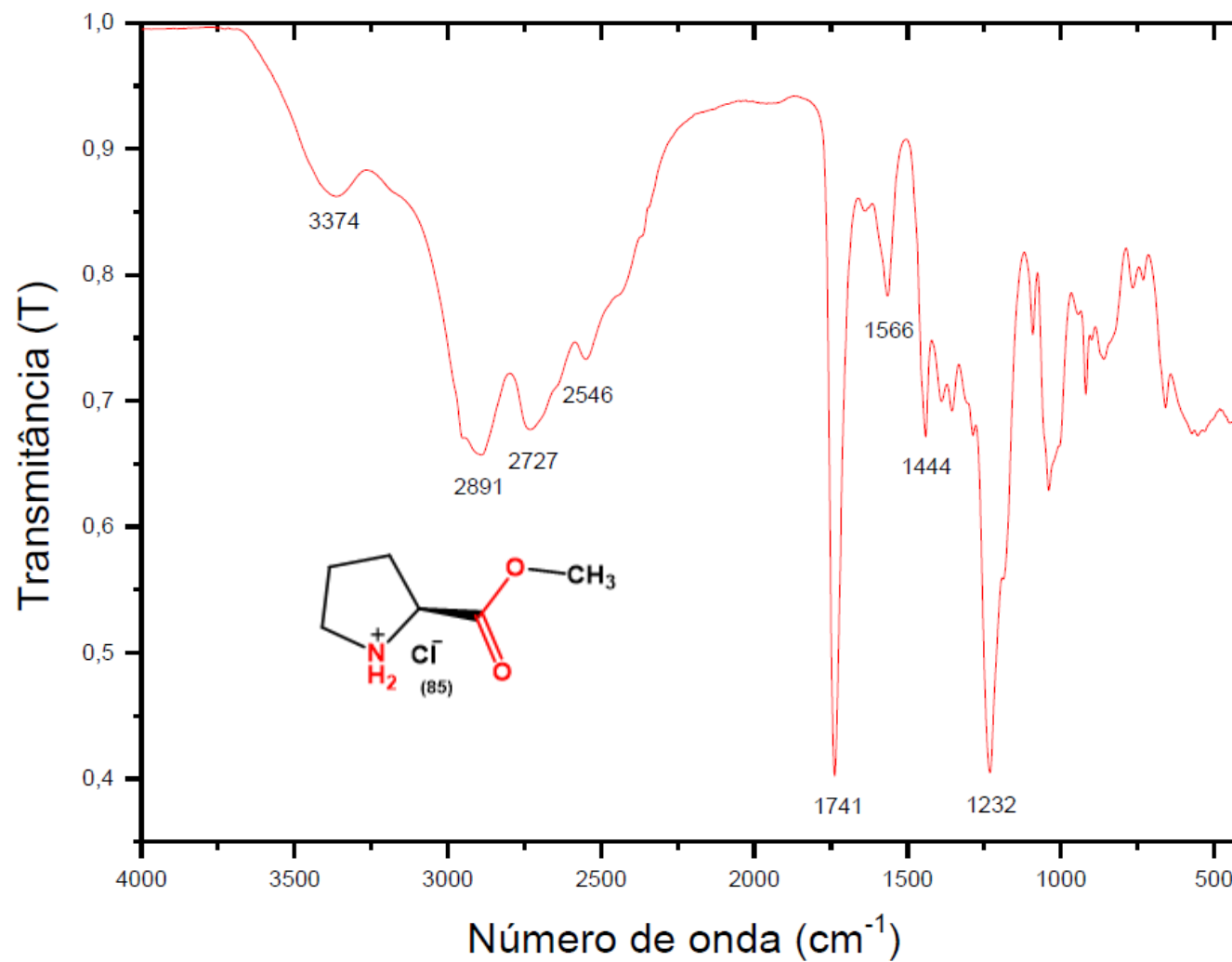
ANEXO M – Espectro de RMN de ^1H , obtido para derivado sulfonamídico 96 e ampliação à direita; Solvente: DMSO- d_6 , 600 MHz.



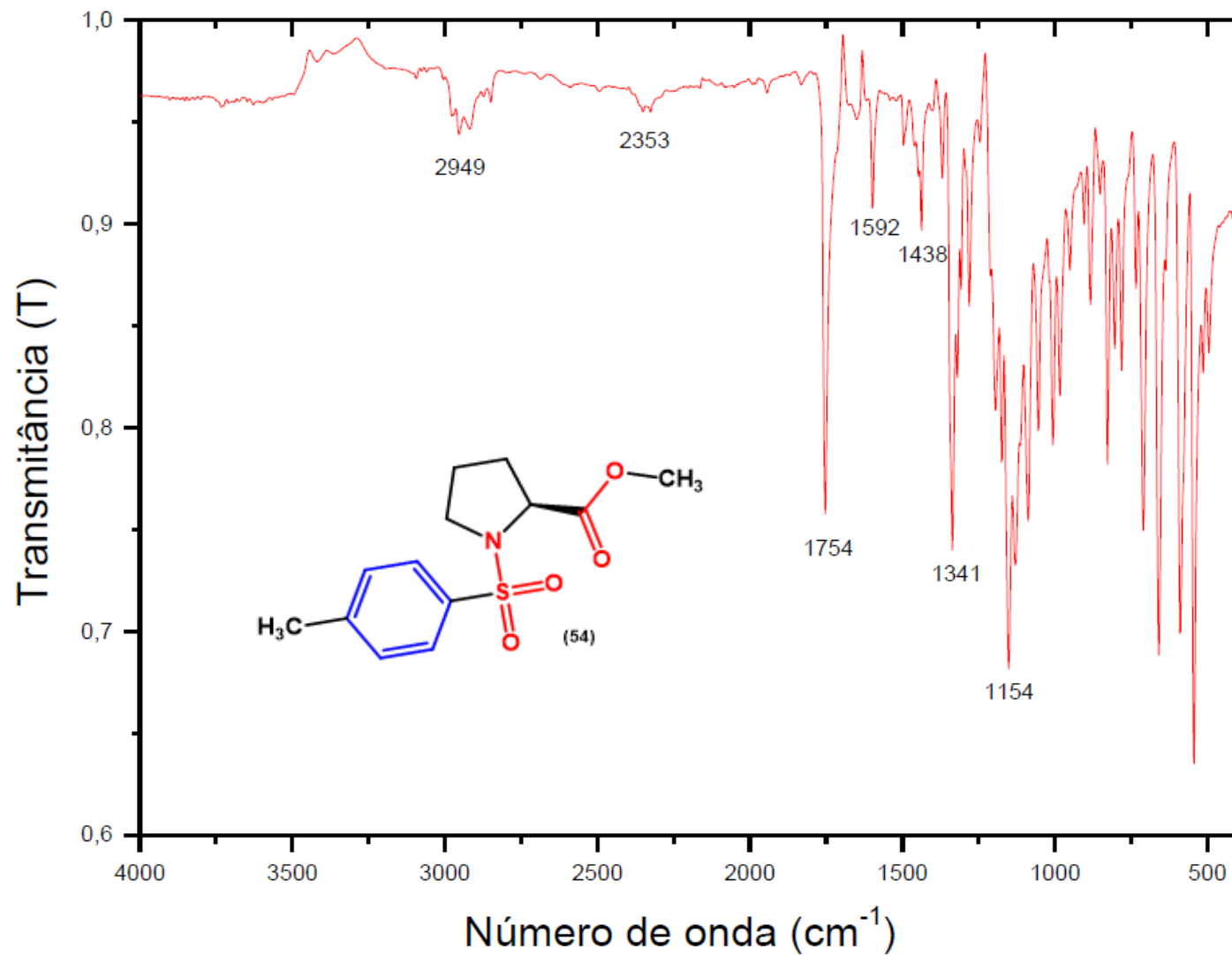
ANEXO N – Espectro de RMN DEPT-Q, obtido para o derivado sulfonamídico 96; Solvente: DMSO-d₆, 150 MHz.

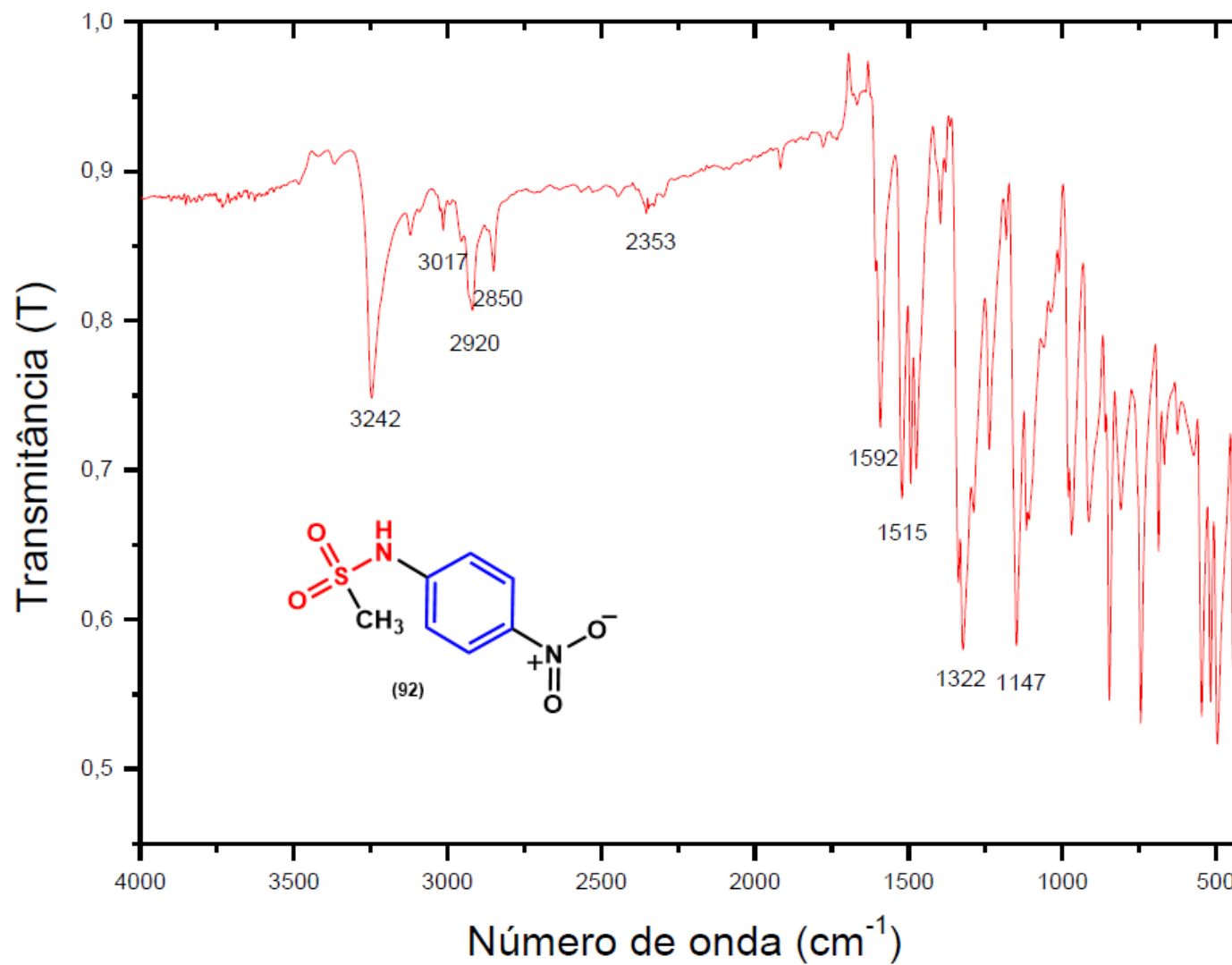


ANEXO O – Espectro de IV, obtido para o intermediário 85 – ATR-FTIR.

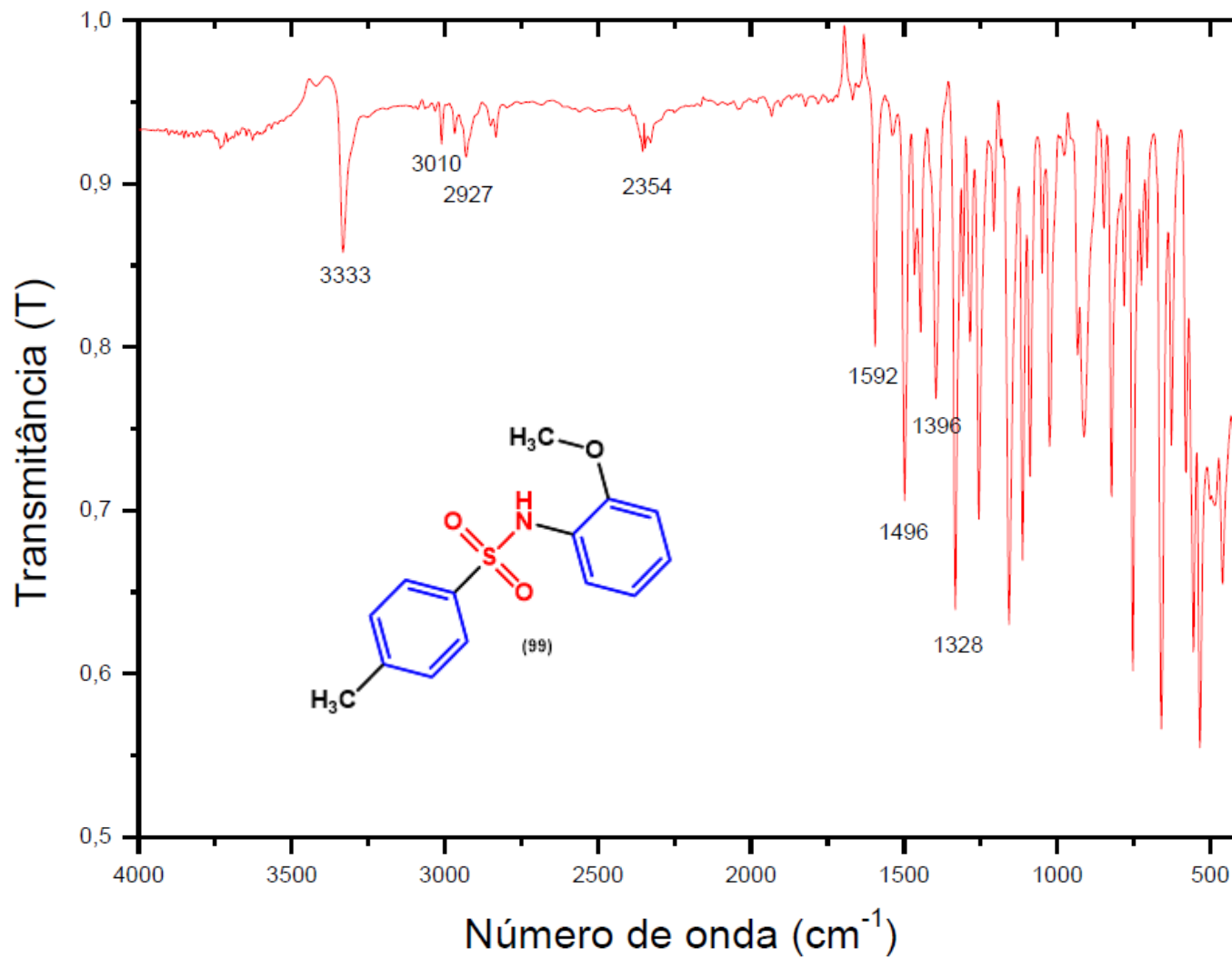


ANEXO P – Espectro de IV, obtido para o intermediário 54 – ATR-FTIR.

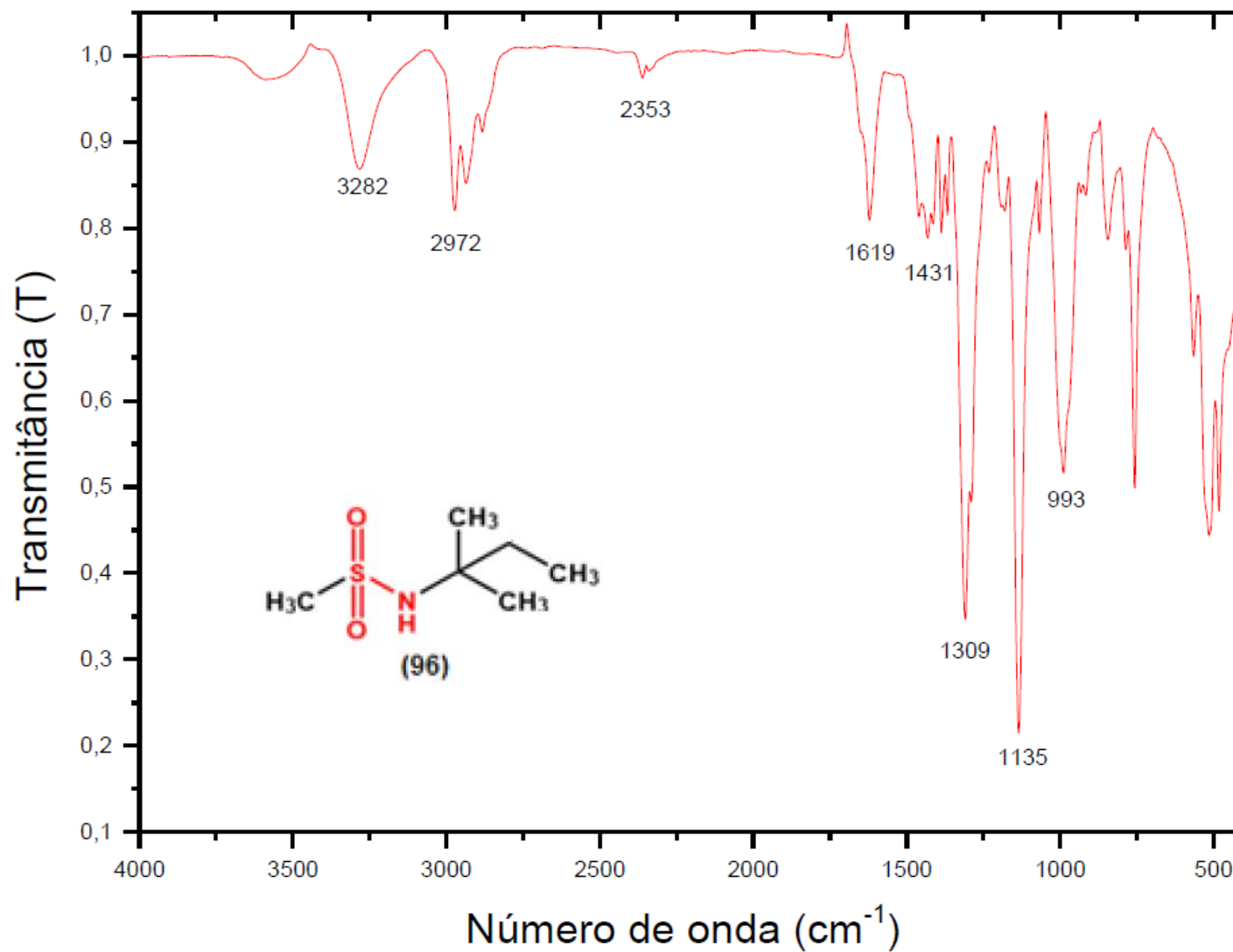


ANEXO Q – Espectro de IV, obtido para o derivado sulfonamídico 92 – ATR-FTIR.

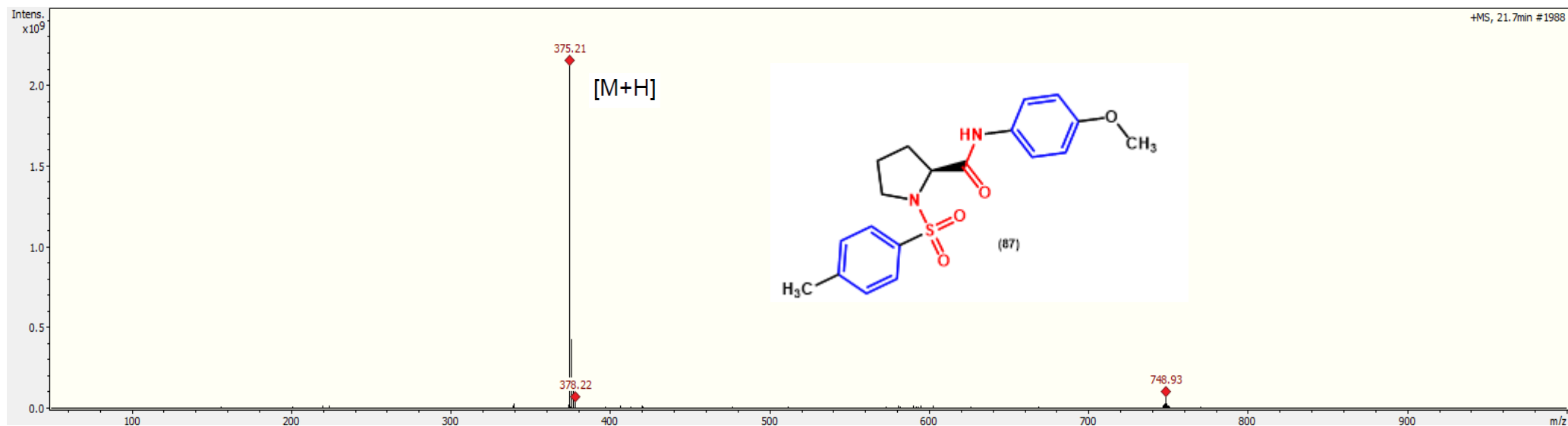
ANEXO R – Espectro de IV, obtido para o derivado sulfonamídico 99 – ATR-FTIR.



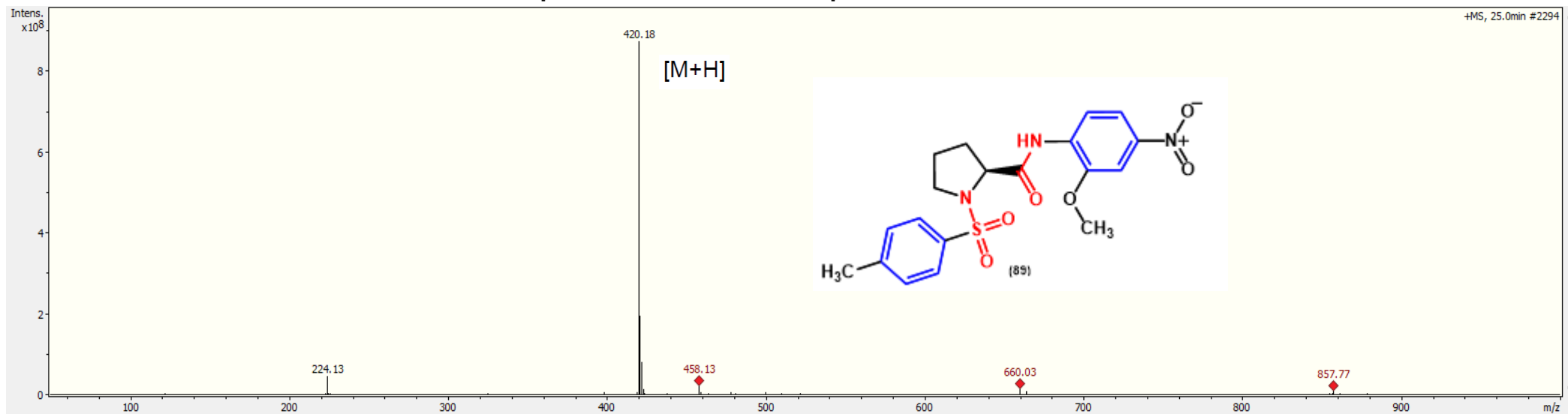
ANEXO S – Espectro de IV, obtido para o derivado sulfonamídico 96 – ATR-FTIR.



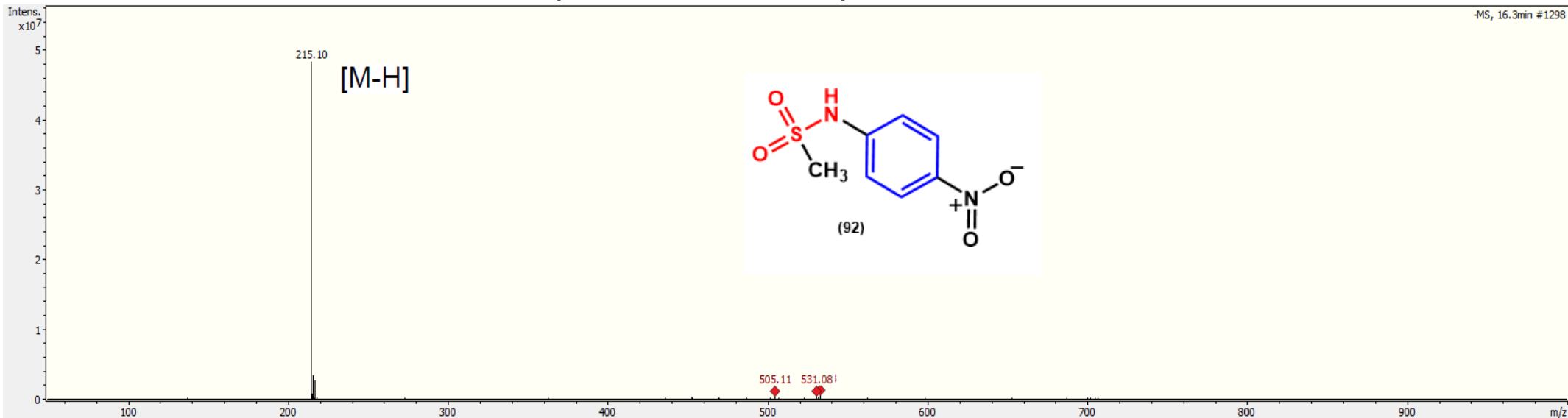
ANEXO T – Espectro de massas obtido para o derivado sulfonamídico 87.



ANEXO U – Espectro de massas obtido para o derivado sulfonamídico 89.



ANEXO V – Espectro de massas obtido para o derivado sulfonamídico 92.



ANEXO W – Espectro de massas obtido para o derivado sulfonamídico 99.

