



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

MATEUS MELLO DE SOUZA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS CARBAMATOS CONTENDO O
NÚCLEO NITROIMIDAZOOXAZINA COM POTENCIAL ATIVIDADE FRENTE A
Leishmania spp.

Araraquara, SP
2024

MATEUS MELLO DE SOUZA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS CARBAMATOS CONTENDO O
NÚCLEO NITROIMIDAZOOXAZINA COM POTENCIAL ATIVIDADE FRENTE A
Leishmania spp.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
Coorientadora: Andressa Franciéli Bonjorno

Araraquara, SP

2024

-
- S729s** Souza, Mateus Mello de.
Síntese e avaliação de novos derivados carbamatos contendo o núcleo nitroimidazooxazina com potencial atividade frente a *Leishmania spp.* / Mateus Mello de Souza. – Araraquara, 2024.
57 f. : il.
- Trabalho de Conclusão de Cursos (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
- Orientador: Jean Leandro dos Santos.
Coorientadora: Andressa Franciéli Bonjorno.
1. Leishmaniose. 2. Doenças negligenciadas. 3. Química medicinal. 4. Nitroimidazooxazina. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Bonjorno, Andressa Franciéli, coorient. III. Título.

Deixo essa dedicatória à minha Mãe, Regina de Mello Ceres Cardillo, e à minha irmã, Natalia Mello de Souza. Vocês são as pessoas mais importantes na minha vida, que sempre estiveram ao meu lado, cuidando de mim e me apoiando. Sem vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui.

Te amo, mãe. Te amo, Irmã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus orientadores, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos e Andressa Franciéli Bonjorno, por acreditarem na minha capacidade de desenvolver um projeto científico e por todos os ensinamentos que me transmitiram. Minha formação não seria a mesma sem vocês.

Agradeço a minha mãe Regina e a minha irmã Natalia, que sempre estiveram comigo nessa jornada, desde o começo, me dando determinação para continuar trilhando meus caminhos. Mesmo nos momentos mais difíceis, vocês foram a razão para eu não desistir de tudo.

Ainda deixo meus agradecimentos para todos os membros do Lapdesf. Foram muitas as trocas e os momentos de aprendizagem e apoio que tivemos ao longo de cada dia no laboratório.

Agradeço especialmente também ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Radler do programa Aristides Pacheco Leão, processo nº 2022/11847-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e a instituição de fomento que possibilitou a execução de parte desse trabalho na Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. Obrigado por toda a dedicação dos demais professores envolvidos durante meu período de estágio, Profª Drª Marina Amaral Alves, Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga e a Profª Gabriela Vanini Costa.

O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 5312 em 2022 e 9019 para 2023. Que por dois anos financiaram todo o trabalho envolvido com a execução desse projeto.

Também deixo meus agradecimentos à pró-reitoria de pesquisa (PROPe) e a Faculdade de Ciências Farmacêutica - Unesp Araraquara (FCFAR), pois sem o apoio financeiro e a infraestrutura necessária, fazer ciência de impacto que revolucione nossa sociedade seria impossível.

RESUMO

As leishmanioses são um problema global de saúde pública e o desenvolvimento de novos medicamentos é urgente, considerando os problemas de ineficiência, via de administração e toxicidade das terapias atuais. Diversos compostos nitro-heterocíclicos desenvolvidos para tuberculose apresentam excelente atividade *in vitro* e *in vivo* frente a *Leishmania* spp. Dois compostos análogos à pretomanida contendo a função carbamato foram sintetizados, caracterizados e avaliados em ensaios pré-clínicos de estabilidade à hidrólise em plasma e coeficiente de partição. Os compostos A2 e A6 apresentaram valor de Log P ideal (1,9) e considerável estabilidade plasmática.

Palavras-chave: leishmaniose; doenças negligenciadas; química medicinal; nitroimidazooxazina.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a global public health problem and the development of new medicines is urgent, considering the problems of inefficiency, route of administration and toxicity of current therapies. Several nitroheterocyclic compounds developed for tuberculosis show excellent in vitro and in vivo activity against *Leishmania* spp. Two compounds analogous to pretomanid containing the carbamate function were synthesized, characterized and evaluated in preclinical tests of stability to hydrolysis in plasma and partition coefficient. Compounds A2 and A6 presented an ideal Log P value (1.9) and considerable plasma stability.

Keywords: leishmaniasis; neglected diseases; medicinal chemistry; nitroimidazooxazine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais espécies de <i>Leishmania</i> com importância clínica.....	17
Figura 2: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	18
Figura 3: Mapas epidemiológicos dos casos notificados de LVH e LTA no Brasil (2016-2022).....	20
Figura 4: fármacos utilizados na terapia de leishmaniose.....	23
Figura 5: Estrutura química de alguns compostos com o anel nitroimidazol.....	26
Figura 6: Esquema de proposta para mecanismo de ação dos compostos nitroimidazooxazina em <i>Leishmania</i>	28
Figura 7: Rota sintética para obtenção do núcleo (S)-nitroimidazooxazina.....	32
Figura 8: Síntese dos produtos finais.....	35
Figura 9: Ilustração da metodologia do ensaio de estabilidade plasmática.....	37
Figura 10: Planejamento estrutural dos compostos carbamato nitroimidazooxazina.....	38
Figura 11: Mecanismo de formação da ligação carbamatos.....	39
Figura 12: modelagem de homologia E9BB55_LEIDO (NTR2).....	41
Figura 13: Espectro de RMN 1H do composto A2 (600 MHz, DMSO-d6).....	43
Figura 14: Espectro de RMN 13C do composto A2 (150 MHz, DMSO-d6).....	43
Figura 15: Espectro de RMN 1H do composto A6 (600 MHz, DMSO-d6).....	44
Figura 16: Espectro de RMN 13C do composto A6 (150 MHz, DMSO-d6).....	44
Figura 17: Resultados do ensaio de estabilidade plasmática.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Revisão dos medicamentos anti- <i>Leishmania</i> disponíveis	25
Tabela 2: Resumo dos principais nitroimidazóis bicíclicos candidatos a ensaios clínicos de LVH.....	30
Tabela 3: Deslocamentos químicos (ppm) dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos protótipos A2 e A6.....	45
Tabela 4: Dados do ensaio de estabilidade plasmática.....	47
Tabela 5: Dados do ensaio de determinação do coeficiente de partição (Log P)....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AmB	Anfotericina B
AmB-L	Anfotericina B lipossomal
APC	Células apresentadoras de antígenos, do inglês, <i>antigen presenting cells</i>
AUC	Área sob a curva, do inglês, <i>area under the curve</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD	Células dendríticas
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCM	Diclorometano
DHP	3,4-diidro-2H-pirano
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCFAr	Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus Araraquara
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FMNH ₂	Mononucleotídeo de flavina reduzido
IFN-γ	Interferon gama
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCPC	Leishmaniose cutânea pós-calazar
LID	Lidocaína
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LVH	Leishmaniose visceral humana
MAC	Complexo de Ataque à Membrana C5b-9
MS	Ministério da Saúde

NaH	Hidreto de sódio
NAP	Naproxeno
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilo, do inglês, <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>)
NK	<i>Natural Killer Cell</i>
NTX	Nitroimidazooxazina
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OPC-67683	Delamanida
PA-824	Pretomanida
PFOR	Piruvato:ferredoxina oxidoreductase
PPTS	Piridínio-p-toluenossulfonato
PSG	Gel secretor de promastigota, do inglês, <i>promastigote secretory gel</i>
RA	Reações adversas
RMN	Ressonância magnética nuclear
SFM	Sistema fagocítico-mononuclear
SN ₂	Substituição nucleofílica bimolecular
SUS	Sistema Único de Saúde
TBAF	Fluoreto de tetrabutylamônio
THA	tripanossomíase humana africana
THF	Tetraidrofurano
TIPSCI	Triisopropilsilano
TrxR	Tiorredoxina redutase
Unesp	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

LISTA DE SÍMBOLOS

A2	((S)-2-nitro-6,7-di-hidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-il(3-fluoro-4-tiomorfolinofenil)carbamato)
A6	((S)-2-nitro-6,7-di-hidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-il(3-fluoro-4-(4-(piridin-2-il) pierazin-1-il) fenil)carbamato)
C3Cl6O3	trifosgênio
<i>k</i>	Fator de capacidade
CIM50	Concentração inibitória mínima
Log P	Coeficiente de partição
NH(CO)O	Carbamato
tR	Tempo de retenção
δ	Deslocamento químico
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Leishmanioses	16
2.1.1 Ciclo biológico.....	17
2.1.2 Epidemiologia	18
2.1.3 Relação parasita-hospedeiro	21
2.2 Tratamentos	22
2.3 Compostos nitroimidazooxazina com atividade anti-<i>Leishmania</i>.....	25
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MÉTODOS	32
4.1 Síntese do intermediário-chave nitroimidazooxazina	32
4.2 Síntese dos derivados carbamato.....	34
4.3 Métodos analíticos.....	35
4.4 Determinação da estabilidade plasmática.....	36
4.5 Determinação experimental do coeficiente de partição (Log P).....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1 Síntese e caracterização	38
5.2 Ensaio de estabilidade plasmática.....	46
5.3 Determinação experimental do Log P	49
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) referem-se a um grupo de 20 enfermidades com variados patógenos, que incluem vírus, bactérias, parasitas, fungos e toxinas. Essas infecções afetam primariamente regiões de vulnerabilidade social, marcadas pela pobreza, precárias condições sanitárias, fome, dificuldade de acesso ou total ausência à serviços de saúde, dentre outros motivos (OMS, 2023).

A Leishmaniose é uma DTN, que abrange um grupo de manifestações infecciosas causadas por diferentes espécies de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. A leishmaniose visceral humana (LVH) é a forma mais grave da doença, sendo a espécie *Leishmania infantum/Leishmania chagasi* o agente etiológico da doença na América Latina. A incidência de LVH no mundo é de até 90.000 ao ano, e 90% de todos os casos ocorrem no Brasil, África Oriental e Índia (DNDi, 2020).

A doença é vetorizada no Brasil pela espécie *Lutzomyia longipalpis*, que são flebotomíneos conhecidos popularmente como “mosquito-palha”. Uma grande problemática observada é o aumento das regiões endêmicas, que cresce principalmente em centros urbanos, devido a urbanização do vetor e participação do cão doméstico como reservatório da forma promastigota de *Leishmania* spp (Freitas, et al. 2022). Dados referentes ao número de casos notificados no Sistema Único de Saúde (SUS), consultados pelo DATASUS, indicam a notificação de 10.734 casos de LVH entre os anos de 2018 a 2022, espalhados por vários estados brasileiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Estão descritas três manifestações de leishmaniose: leishmaniose tegumentar (LT), leishmaniose visceral humana (LVH) e leishmaniose mucocutânea (LMC). A LT é a forma mais comum da infecção, marcada por ulcerações na pele do indivíduo infectado. A LVH é a manifestação mais grave, com taxa de mortalidade de até 95% quando não tratada, tendo como sintomas febre, pancitopenia e hepatoesplenomegalia. Casos graves de LVH resultam em hiperpigmentação da pele, que deu origem ao termo calazar, derivado da palavra hindí (*Kala*)(azar), que significa "febre negra". Também há o quadro de ulceração mucocutânea, sendo o mais incapacitante por gerar destruição parcial ou total das mucosas da cavidade nasal e orofaríngea (WILHELM, 2019).

As diretrizes nacionais para o tratamento de leishmaniose no SUS preconiza o uso da formulação antimoniato N-metil glucamina como primeira linha de tratamento

em pacientes adultos. Para pacientes pediátricos, imunocomprometidos e adultos em que o tratamento com antimoniais não foi eficiente, recomenda-se administração de anfotericina B lipossomal. A miltefosina é indicada apenas para uso veterinário. No Brasil, apenas os 3 medicamentos supracitados são indicados para o tratamento de leishmaniose, todos com limitações (administração parenteral, surgimento de cepas resistentes), graves reações adversas (RA) como cardiotoxicidade e tratamentos longos que variam de 20 a 40 dias. Diante do arsenal terapêutico atual, o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de leishmaniose é urgente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A instituição internacional sem fins lucrativos, *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (DNDi) desenvolve novos tratamentos eficazes, seguros e acessíveis para para DTNs. A DNDi preconiza como perfil de produto ideal um tratamento eficaz contra a leishmaniose visceral, capaz de combater cepas resistentes e adequada para todas as populações, incluindo mulheres grávidas e pacientes imunocomprometidos. O tratamento deve ser administrado em um período máximo de dez dias, podendo ser feito via oral, uma vez ao dia, ou até três doses de injeções intramusculares (DNDi, 2020).

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia econômica para identificar de forma rápida, fármacos já existentes e sua atividade contra uma patologia diferente da qual o medicamento é indicado. O fármaco anfotericina B, com indicação original de agente antifúngico, hoje é muito utilizado para o tratamento da LVH. Partindo dessa estratégia, o DNDi avaliou uma série de 700 nitro heterocíclicos contra tripanossomíases, como leishmaniose, doença de chagas, doença do sono, dentre outras (DNDi, 2014). Um dos nitros heterocíclicos mais promissores da série foi o fexinidazol, um derivado 5-nitroimidazol, que possui sua atividade antitripanossomal descrita desde a década de 1960, e foi redescoberto nessa ação como um excelente agente contra tripanossomíase humana africana (THA). O primeiro representante da classe dos 5-nitroimidazóis é o metronidazol, utilizado principalmente no tratamento de infecções anaeróbicas (ANG *et al.*, 2017; PATTERSON *et al.*, 2013).

Ainda dentro da classe dos nitroimidazóis, Patterson e colaboradores (2013) investigaram a atividade da molécula pretomanida (PA-824), um fármaco aprovado para o tratamento de tuberculose multirresistente, em diferentes linhagens celulares de *Leishmania*. A concentração inibitória mínima (CIM₅₀) de (R)-PA-824 em *L.*

donovani LdBOB (derivada de MHOM/SD/62/1S-CL2D) em seu estágio amastigota foi na ordem 0.93 μM , enquanto para o enantiômero (S)-PA-824 CIM_{50} de 4.92 μM . No mesmo estudo, verificou-se que ambos os análogos sem o grupamento nitro foram inativos, o que evidencia a função nitroimidazooxazina (NTX) como grupo farmacofórico contra leishmaniose (PATTERSON *et al.*, 2013).

No mesmo estudo, utilizando modelo animal de LVH, camundongos infectados com *L. donovani* receberam administração oral de pretomanida (30 ou 100 mg.kg^{-1}), duas vezes por dia, por cinco dias. Após 14 dias da inoculação, os fígados foram analisados para determinar a carga parasitária. O grupo tratado com (R)-PA-824 30 mg.kg^{-1} teve supressão de 35%, enquanto o regime de 100 mg.kg^{-1} apresentou supressão de 99,9% na carga parasitária. Para comparação, os medicamentos de primeira linha estibogluconato de sódio (supressão de 41,9%) e miltefosina (supressão de 68,7%) também foram avaliados sob o mesmo protocolo. Logo, o regime de tratamento de 10 doses de 100 mg.kg^{-1} por 5 dias de (R)-PA-824 se mostrou mais eficaz e com ótima tolerância a efeitos adversos, em comparação com os medicamentos de primeira linha atualmente utilizados (PATTERSON *et al.*, 2013).

A hipótese do mecanismo de ação para os nitroimidazóis é de que o grupo nitro sofre biorredução por alguma isoforma de nitroredutase, decompondo o derivado nitroimidazol em ânion nitrito e um radical imidazol correspondente. Essas espécies reativas de nitrogênio (ERN) culminam em danos oxidativos no DNA e proteínas essenciais do parasita. Células de mamíferos não possuem potencial de oxirredução suficientemente negativo para realizar a bioativação do grupo nitroimidazol, o que justifica sua toxicidade seletiva aos tripanossomatídeos (ANG *et al.*, 2017).

Diante das evidências de atividade dos derivados nitroimidazooxazina em modelos *in vitro* e *in vivo* de LVH, o presente trabalho de conclusão de curso reposicionou dois análogos da pretomanida planejados em 2021 contra *Mycobacterium tuberculosis* por pesquisadores do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos (FCFAr - UNESP).

Para o desenvolvimento do trabalho, foi realizado a síntese, purificação e caracterização de dois derivados carbamato nitroimidazooxazina, bem como ensaios pré-clínicos de atividade biológica, citotoxicidade, determinação do Log P e estabilidade à hidrólise enzimática.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Leishmanioses

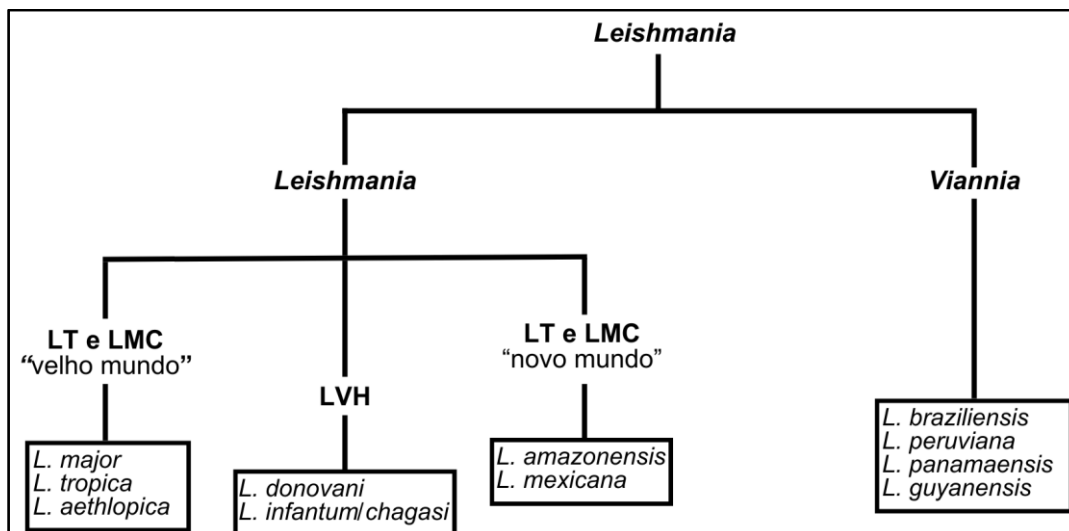
O termo leishmaniose refere-se a um conjunto de doenças infecciosas, com diferentes formas de manifestação, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae*. Atualmente, 54 espécies de *Leishmania* estão descritas, sendo 21 espécies patogênicas para humanos. As leishmanioses afetam cerca de 100 países, mas 90% dos casos estão distribuídos em três focos geográficos: (i) Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Síria; (ii) Argélia e Tunísia; e (iii) Brasil e Peru (AKHOUNDI *et al.*, 2017).

A Leishmaniose Visceral Humana é classificada como a segunda DTN causada por vetor com maior número de óbitos, e a incidência é de 50 mil a 90 mil casos por ano (DNDi, 2020). Trata-se de uma infecção negligenciada, pois sua disseminação está diretamente relacionada com aspectos socioeconômicos, que se restringem a países emergentes. Isso torna o desenvolvimento de novos tratamentos para essas doenças irrelevantes no contexto da lucratividade (VASCONCELOS, 2016).

As principais espécies patogênicas aos mamíferos então divididas entre o subgênero *Leishmania* e *Viannia*, e a doença apresenta três manifestações características. A manifestação mais comum é a leishmaniose tegumentar (LT), também denominada como leishmaniose tegumentar americana (LTA); há ainda a leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose visceral humana (LVH), leishmaniose cutânea pós-calazar (LCPC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (WILHELM. 2019).

Diante da relação entre espécie, quadro clínico e a região geográfica de prevalência, as espécies de *Leishmania* podem ser agrupadas. Por exemplo, a espécie *Leishmania infantum* é o agente etiológico responsável pela LVH na América Latina, enquanto *Leishmania donovani* é o causador de LVH na África Oriental e Ásia (**Figura 1**). (SAMPAIO, 2013).

Figura 1: Principais espécies de *Leishmania* com importância clínica.



Fonte: Adaptado de Sampaio, 2013.

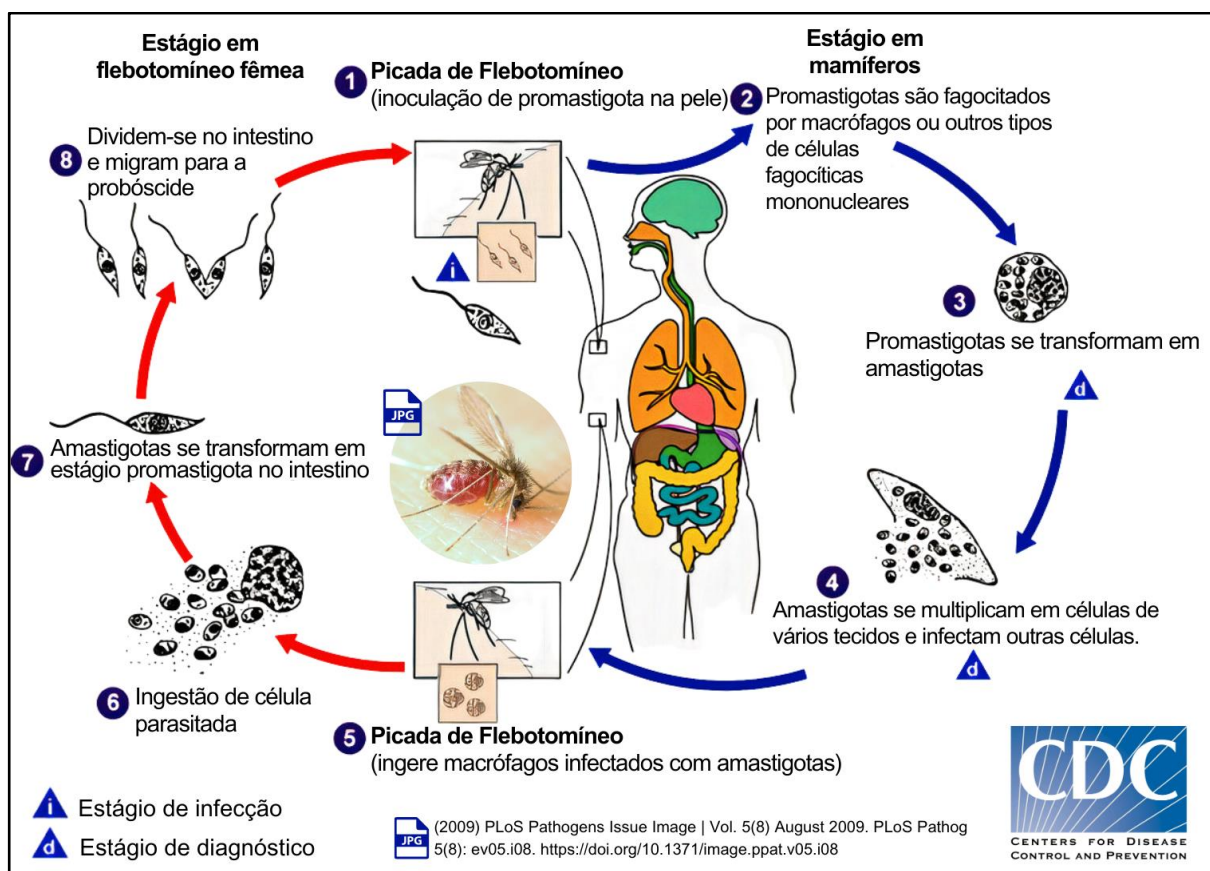
Quanto aos seus aspectos, a *Leishmania* é um parasita heteroxênico e possui ciclo genético dimórfico, que alterna entre promastigota e amastigota. A forma promastigota é flagelada, móvel, infectante e localiza-se no no tubo digestivo do flebotomíneo, enquanto a forma amastigota é imóvel e parasita células do sistema fagocítico-mononuclear (SFM) (SIQUEIRA-BATISTA, 2020).

2.1.1 Ciclo biológico

O ciclo biológico da leishmaniose se inicia com a inoculação de promastigotas metacíclicas pelo vetor flebotomíneo infectado (**Figura 2**) na pele do hospedeiro mamífero. O vetor regurgita um gel de proteofosfoglicanos sintetizado pelos parasitas, que é denominado gel secretor de promastigota (PSG, do inglês *promastigote secretory gel*) que veicula os parasitas até a derme. Em seguida, células SFM são recrutadas até o local de inoculação e fagocitam os promastigotas, que ao serem internalizados, se diferenciam em amastigotas (ROGERS *et al.*, 2009).

Mesmo com a internalização dos parasitas em um fagolisossomo de célula do sistema fagocitário-mononuclear, o parasita evade das respostas inatas do hospedeiro por diversos mecanismos e subverte o microambiente citotóxico da célula para um que seja favorável à sobrevivência e reprodução do parasita (KUMARI; SINGH, 2022).

Figura 2: Ciclo biológico da *Leishmania*.



Os amastigotas se multiplicam e rompem a membrana da célula hospedeira, liberando-os e viabilizando a infecção de novas células. As células infectadas ainda podem alcançar a corrente sanguínea, momento em que o vetor se alimenta de sangue do hospedeiro e ingere macrófagos infectados. Após a ingestão dos parasitas, no tubo digestivo do vetor eles se diferenciam em promastigotas procíclicos, que migram para a probóscide e amadurecem em promastigotas metacíclicas, a forma infectante definitiva de *Leishmania*, resultando na manutenção do ciclo da doença (SIQUEIRA-BATISTA, 2020).

2.1.2 Epidemiologia

No Brasil e no mundo as leishmanioses são um grave problema de saúde pública a décadas. Anteriormente, as áreas prevalentes se restringiam afastadas de grandes centros urbanos, mas a adaptação do vetor e atuação do cão doméstico como reservatório do parasita promoveu a urbanização da doença e criou rotas de

transmissão, mudando o cenário das leishmanioses para um problema urbano e ampliando as áreas endêmicas (FREITAS, *et al.*, 2022).

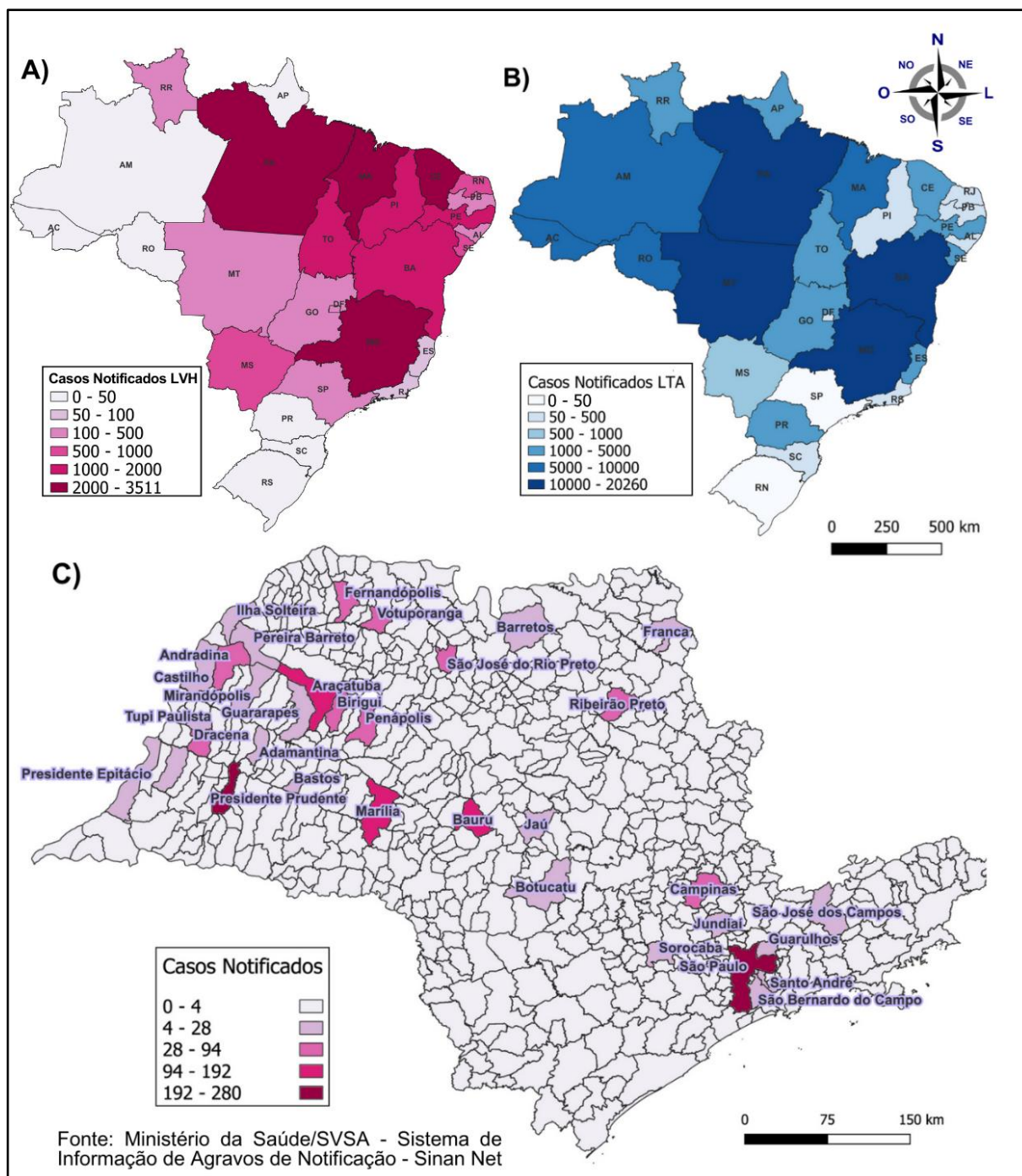
Como mencionado anteriormente, as leishmanioses afetam muitos países, mas 90% dos casos estão concentrados no Brasil, África Oriental e Índia. Para a forma visceral da doença, a América Latina apresenta incidência anual de em média 3.500 casos, e 96% são no Brasil, o que mostra a importância do país na manutenção da endemidade na América Latina (OPAS, 2022).

Ainda sobre a situação epidemiológica de leishmaniose no Brasil, dados referentes ao número de casos notificados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), consultados pelo DATASUS, indicam a notificação de 12.799 casos de LVH entre os anos de 2018 a 2022, espalhados por vários estados brasileiros. A região nordeste possui 56% dos casos notificados, sendo o Maranhão o estado com mais notificações (2.076 notificações). Ainda podemos destacar os estados de Minas Gerais (1.197 notificações) e São Paulo (538 notificações), evidenciando a presença da doença por todo o território brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). O controle de LVH no estado de São Paulo é desafiador, pois a divisa com os estados endêmicos Mato Grosso do Sul (664 notificações) e Minas Gerais culmina em rotas de disseminação do vetor infectado por todo o sudeste brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

Ainda, casos de coinfeção LVH-HIV relatados em diversos países apontam mais um problema, pois pacientes HIV soropositivos têm rápida e progressiva evolução da doença. Dos quase 13 mil casos notificados entre 2018-2022, cerca de 14% dos pacientes com LVH eram HIV soropositivos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

Na **Figura 3** temos em A) os dados sobre o número de casos notificados de LVH no período de 2016 a 2022, e em B) o número de casos de LTA no mesmo período. Os estados de Minas Gerais, Pará, Maranhão e Ceará notificaram mais de 2.000 casos, evidenciando a prevalência da infecção no norte, nordeste e sudeste brasileiro. Os estados do sul não apresentaram casos de LVH, mas Paraná e Santa Catarina notificaram LTA. Em C) vemos os municípios do estado de São Paulo, e a região metropolitana de São Paulo e Presidente Prudente são os mais afetados.

Figura 3: Mapas epidemiológicos dos casos notificados de LVH e LTA no Brasil (2016-2022). A) Distribuição dos casos notificados de LVH no Brasil, B) Distribuição dos casos notificados de LTA no Brasil, C) Distribuição de casos de LVH nos municípios de São Paulo.



Fonte: Dados obtidos do Ministério da Saúde/SVSA - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, 2023.

2.1.3 Relação parasita-hospedeiro

O objetivo geral da química farmacêutica medicinal visa o desenvolvimento de novas moléculas bioativas para aplicação em diversas áreas. Compreender as interações moleculares parasita-hospedeiro e fatores de virulência envolvidos em infecções são fundamentais para a busca de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novas terapias (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Nesse sentido, discutindo primeiro a resposta imunológica complexa do hospedeiro infectado com promastigotas metacíclicos de *Leishmania*, a infecção se inicia com a regurgitação do flebotomíneo infectado, estimulada pela secreção de PSG dos promastigotas. A lesão na membrana basal, endotélio vascular e a inoculação dos parasitas na derme, somado aos componentes tóxicos da saliva do vetor, geram uma resposta inflamatória primária que rapidamente resulta em um infiltrado inflamatório com neutrófilos, macrófagos residentes e células dendríticas (CD) (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2019; ROGERS *et al.*, 2009).

O microambiente do infiltrado inflamatório recruta primariamente neutrófilos (recrutados e ativados principalmente pelas citocinas IL-12 e TNF- α), que criam um ambiente extracelular citotóxico ao parasita, principalmente por meio da secreção de proteínas antimicrobianas, espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), bem como armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET, do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2019).

Ainda no infiltrado inflamatório, moléculas de revestimento do parasita ativam as três vias do sistema complemento (via clássica, via alternativa e via da lecitina), que ativam moléculas C3 em C3b, capaz de opsonizar o parasita e endossar a fagocitose, e ainda recrutar e formar o Complexo de Ataque à Membrana C5b-9 (MAC). Macrófagos residentes e células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *antigen presenting cells*) também são recrutados e realizam fagocitose do patógeno. As APCs que fagocitaram com sucesso o parasita migram para os nódulos linfáticos e iniciam a diferenciação de células Th0 em Th1, somado com a ativação de células NK. A ativação efetiva de Th1 e célula NK é fundamental para que aconteça o controle da infecção, pois essas células secretam IFN- γ , uma citocina fundamental para estimular a síntese de enzimas produtoras de ERO e ERN, que incrementa a resposta citotóxica frente às células de *Leishmania* (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2019; KUMARI; SINGH, 2022).

As espécies de *Leishmania* possuem diversos mecanismos de persistência, que contribuem para sua sobrevivência e evasão das respostas imunológicas do hospedeiro. Os amastigotas são capazes de inibir a degradação proteolítica e oxidativa do ambiente intracelular dos macrófagos, através da síntese de antioxidantes, e se multiplicam até que ocorra a lise da membrana celular e liberação de amastigotas no espaço extracelular, que infectando novas células. A lesão ulcerativa característica da LTA é decorrente desse processo inflamatório granulomatoso com reprodução do parasita. As espécies *L. infantum/chagasi* e *L. donovani* ainda podem migrar para o tecido sanguíneo e infectam principalmente o fígado e o baço, por serem órgãos muito vascularizados e com muitos macrófagos residentes (KUMARI; SINGH, 2022).

Outros mecanismos de persistência estão descritos para *Leishmania*, como: presença de moléculas de lipofosfoglicanos que delimitam um revestimento externo na célula parasitária, que desestabiliza a membrana do fagolisossomo e impede sua maturação. O ambiente ácido do fagolisossomo é neutralizado por V-ATPase (bomba de prótons). O sistema complemento pode ser inibido, pois os lipofosfoglicanos dificultam a inserção do complexo de ataque à membrana e a metalopeptidase GP63 expressa pelo parasita cliva moléculas C3b, tornando-as inativas. A saliva do vetor também é importante para o sucesso da infecção, pois contém endonucleases capazes de inativar as NETs e anticoagulantes que facilitam a dispersão do parasita (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2019; KUMARI; SINGH, 2022).

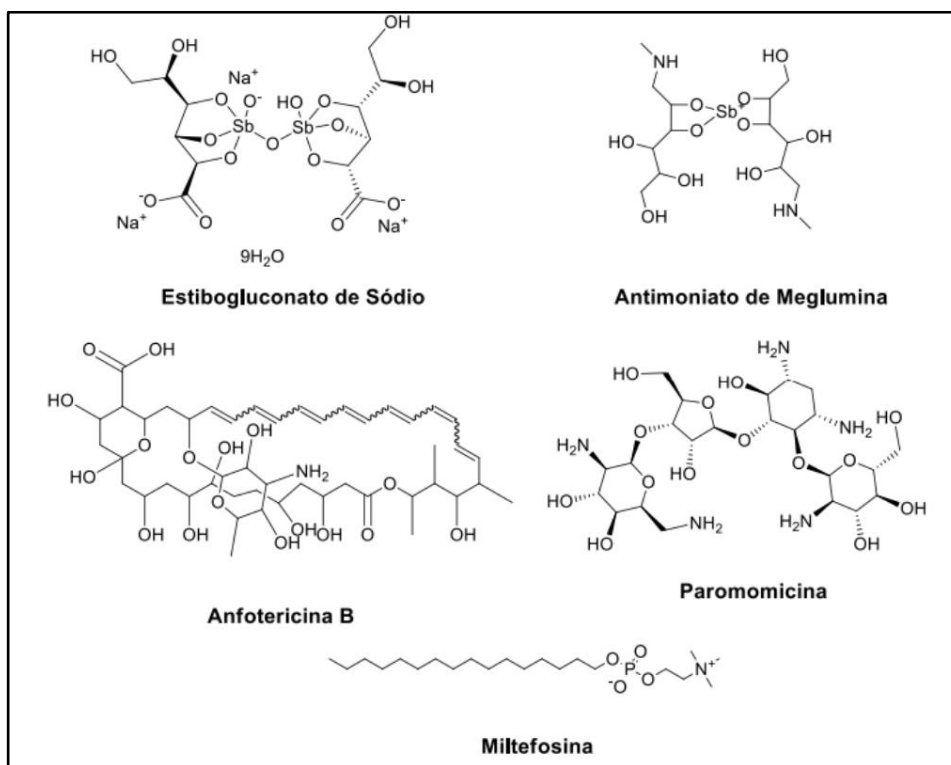
2.2 Tratamentos

Mesmo diante de uma doença letal que possui impacto global à saúde pública, as opções de tratamento são limitadas e insatisfatórias. A nível mundial, diferentes intervenções são indicadas pela OPAS/OMS (2022) para o tratamento de leishmanioses, relacionando grupo clínico, região demográfica e espécie de *Leishmania* causadora da infecção (**Tabela 1**).

Essas considerações são essenciais ao definir a intervenção, uma vez que as leishmanioses são um conjunto diverso de doenças infecciosas que acomete populações geneticamente diversas, distribuídas em diferentes regiões do planeta, que estão suscetíveis a diferentes perfis de resposta imunológica e fisiológica. A

Figura 4 ilustra as estruturas moleculares dos principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses (ARRUDA BRAZ, 2021).

Figura 4: fármacos utilizados na terapia de leishmaniose.



Fonte: Adaptado de (ARRUDA BRAZ, 2021).

Infusões de antimoniais pentavalente foram por cerca de seis décadas o principal tratamento contra leishmania em todo o mundo, e certamente salvaram a vida de inúmeros pacientes. Na década de 1920, o cientista e médico indiano Upendranath Brahmachari, realizou a síntese do primeiro antimoniato pentavalente utilizado no tratamento da leishmaniose, a ureia estibamina, o que rendeu ao pesquisador uma indicação ao prêmio nobel de medicina e fisiologia em 1922. Mais tarde, os compostos antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio se tornaram as formulações comercializadas até hoje (SANGSHETTI *et al.*, 2015).

O antimoniato de meglumina é a primeira linha de tratamento para leishmaniose no SUS. As reações adversas (RA) mais comum estão relacionadas com sua cardiotoxicidade. São RA arritmogênicas, tratando-se de efeitos colaterais como inversão e achatamento da onda T e aumento do intervalo QTC, além de apresentar tempo de tratamento longo, de 20 a 40 dias e via de administração parenteral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A anfotericina B é um antifúngico macrolídeo polieno com ótima atividade leishmanicida. Seu mecanismo baseia-se na inibição da via do ergosterol, um componente importante da membrana plasmática. Sem sua biossíntese, a membrana plasmática do parasita desenvolve poros aquosos, que interferem nas funções de membrana e culminam na morte celular (SANGSHETTI *et al.*, 2015).

O sal desoxicolato de anfotericina B é extremamente tóxico e seu uso exige internação com monitoramento terapêutico durante o período de tratamento, por essa razão, formulações lipossomais de anfotericina B (AmB-L) foram introduzidas, nas quais partículas lipídicas carregam as moléculas de anfotericina B para o interior das células SFM, uma vez que possuem diâmetro ideal para serem rapidamente engolfadas pela célula, diminuindo a biodisponibilidade do fármaco aos tecidos orgânicos suscetíveis e aumentando sua eficácia (SANGSHETTI *et al.*, 2015).

No Brasil, a Amb-L é definida como segunda linha de tratamento para leishmaniose, reservada apenas para pacientes refratários ao tratamento com antimoniais e outros grupos especiais, como crianças, idosos e gestantes. Entretanto, o medicamento é utilizado como primeira escolha de tratamento nas regiões endêmicas da Ásia, África e Europa. Sua ampla distribuição é limitada principalmente pelo alto custo do medicamento, exigência de armazenamento refrigerado e administração endovenosa (ARRUDA BRAZ, 2021).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), foi o primeiro medicamento administrado por via oral eficaz contra leishmaniose. O esquema de administração consiste em uma dose diária de $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, por 28 dias, que demonstrou eficácia de 94% em pacientes com LVH, durante seus estudos clínicos na década de 1990 (SANGSHETTI *et al.*, 2015). Na década seguinte de sua utilização, estudos desenvolvidos na Índia, Bangladesh, Nepal e Etiópia, relataram taxas de recidiva de até 20%, e diminuição da eficácia, o que evidencia o surgimento rápido de cepas resistentes ao fármaco, o que compromete seu uso em programas nacionais de erradicação de leishmaniose. Suas principais reações adversas estão relacionadas com manifestações gastrointestinais, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, e teratogenicidade (SUNDAR; SINGH, 2016).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, reposicionado para o tratamento de LVH desde 2006. Seu perfil de eficácia e indução de resistência *in vitro* é comparável com a miltefosina, mas não está disponível para via oral

(ARRUDA BRAZ, 2021). Em um estudo clínico conduzido em países da África Oriental, patrocinado pelo DNDi, concluiu que a associação paromomicina mais miltefosina (PM+MF) demonstrou ter a mesma eficácia que a associação convencional de paromomicina mais estibogluconato de sódio. Esse resultado é promissor, uma vez que a intervenção PM+MF substitui a injeção dolorosa do estibogluconato de sódio pela administração oral de miltefosina e não oferece risco de cardiotoxicidade, (MUSA *et al.*, 2023).

Tabela 1: Revisão dos medicamentos *anti-Leishmania* disponíveis.

Fármaco	Posologia	Eficácia	Vantagem	Desvantagem
Anfotericina B (AmB)	0,75–1,0 mg/kg para 15–20 infusões diárias ou em dias alternados na Índia (IV)	>95%–100%	Nenhuma resistência primária conhecida. Eficaz em regiões resistentes ao antimônio	Alto custo e necessidade de internação prolongada, calafrios, febre, nefrotoxicidade, hipocalcemia
Anfotericina B lipossomal (L-AmB)	10 mg/kg em dose única, IV	>96%	Altamente eficaz, baixa toxicidade, resistência não documentada	Alto custo, armazenamento sob refrigeração
Antimoniais pentavalentes: estibogluconato de sódio (Sb ⁺⁵)	20 mg/kg/dia (IM) por 20–40 dias	80–90% (<50% em Bihar, Índia)	Baixo custo e facilmente disponível em áreas endêmicas	Toxicidades (vômitos, cardíacas, hepáticas), resistência adquirida no subcontinente indiano
Miltefosina	50 mg/dia para adultos <25 kg e 100 mg/dia >50 kg adultos (oral)	85–95%	Primeiro medicamento oral para LVH. Atualmente primeira linha de tratamento no subcontinente indiano	Potencialmente teratogênico, vômito e diarreia com toxicidade hepática e renal ocasional. Passível de resistência
Paromomicina (PM)	11 mg/kg de base/dia por 21 dias (IM)	>95% na Índia, 46–85% na África	Efeito sinérgico com antimoniais em África, eficaz, bem tolerado e barato	Dor no local da injeção, ototoxicidade reversível, nefrotoxicidade
Pentamidina	4 mg/kg/dia 3 vezes por semana para 15–20 doses (IM ou IV)	70–80%	Prevenção secundária em pacientes com HIV. Pode ser usado em combinação com outros medicamentos	Baixa eficácia e toxicidades associadas, como gastrointestinais, cardíacas (arritmias, hipotensão), pancreatite e diabetes mellitus dependente de insulina irreversível

IM, intramuscular; IV, endovenoso.

Fonte: Adaptado de (Sundar; Singh, 2016).

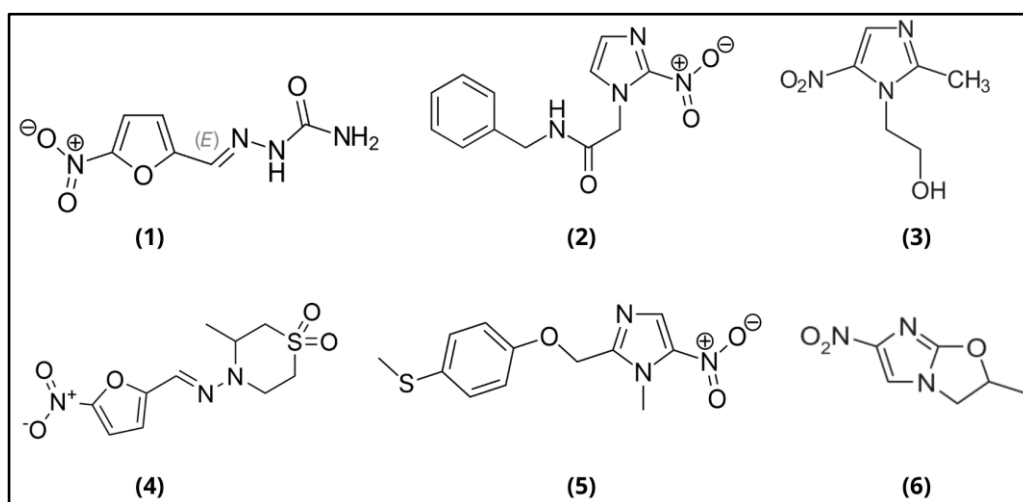
2.3 Compostos nitroimidazooxazina com atividade anti-*Leishmania*

O interesse nas propriedades antimicrobianas de compostos nitroaromáticos iniciou-se em 1944, quando a pomada de nitrofurazona (**1**) foi utilizada durante a 2^a

Guerra Mundial como antimicrobiano tópico. Mais tarde, ensaios clínicos evidenciaram sua eficácia no tratamento de doença de Chagas e THA. Outros compostos nitroaromáticos das classes da nitrofurazona e nitroimidazol continuaram sendo investigados, o que levou ao desenvolvimento dos fármacos nifurtimox (2), benzonidazol (3), metronidazol (4), fexinidazol (5), dentre outros (**Figura 5**) (PATTERSON; FAIRLAMB, 2019).

Mais tarde, em 1989 a *Hindustan Ciba-Geigy Ltda.* relatou a atividade frente a *Mycobacterium tuberculosis* de uma série de compostos nitroimidazólicos bicíclicos. Desses compostos, o CGI-17341 (6) demonstrou a melhor eficácia *in vitro* e *in vivo*, mas a pesquisa foi descontinuada devido aos efeitos de mutagenicidade observados nos ensaios pré-clínicos. Entretanto, a ótima atividade do composto (6) encorajou pesquisas subsequentes para o desenvolvimento de novos compostos nitroimidazólicos bicíclicos otimizados sem evidência de mutagenicidade, até que em 2000 a companhia farmacêutica *Otsuka Holdings Co Ltd* desenvolveu o medicamento pretomanida (**Tabela 2**), atualmente aprovado por diversas agências reguladoras para o tratamento de tuberculose multirresistente (PATTERSON; FAIRLAMB, 2019).

Figura 5: Estrutura química de alguns compostos com o anel nitroimidazol.



Fonte: Elaboração própria.

O espectro e mecanismo de ação, bem como a toxicidade seletiva de um composto nitroimidazólico, estão profundamente ligados com a estrutura química da molécula e posição do grupo nitro no anel nitroimidazol. Mas em geral, a atividade

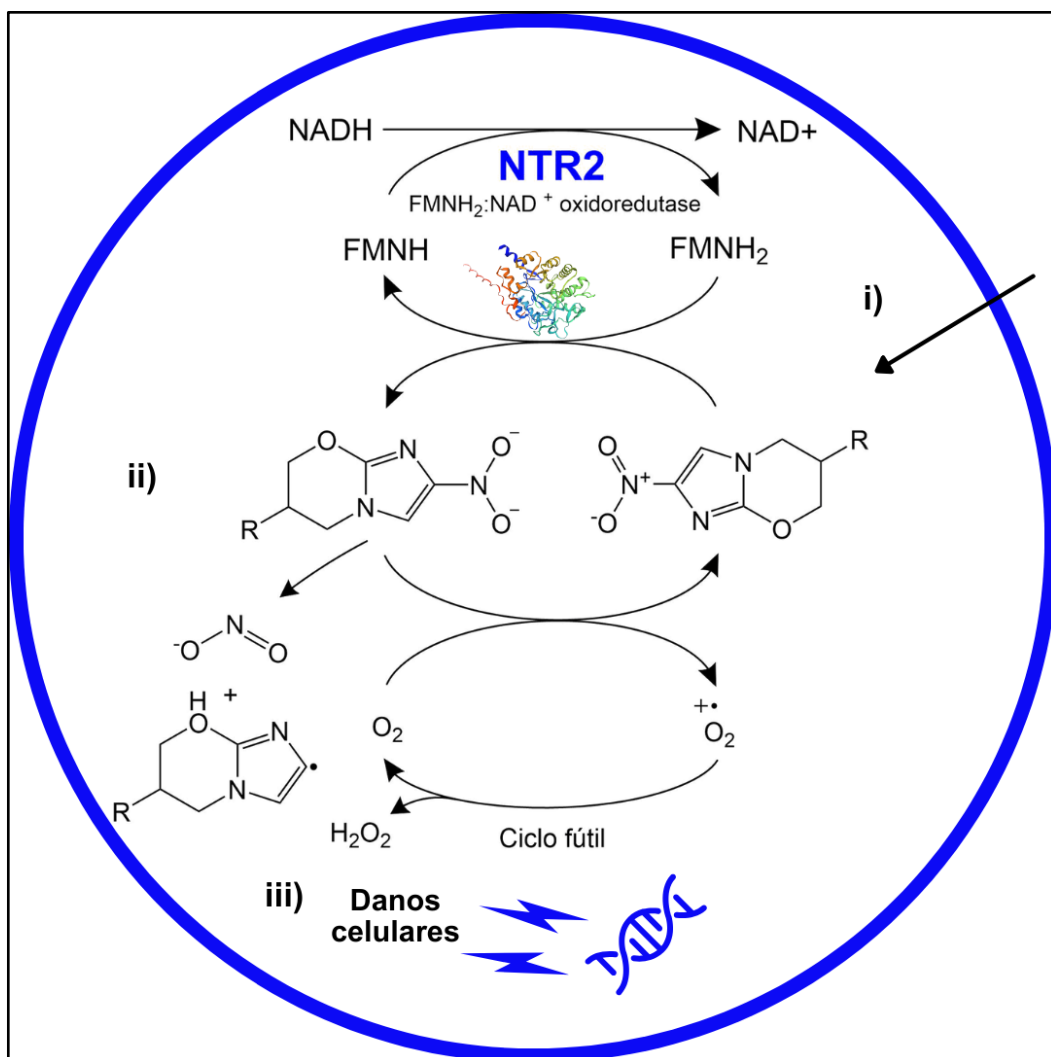
desses compostos pode ser explicada por um mecanismo de três etapas: i) o composto se difunde através da membrana plasmática; ii) oxirredutases citosólicas reduzem o grupo nitro do composto; iii) são produzidas espécies reativas que causam danos ao material genético e proteínas da célula parasitária (ANG *et al.*, 2017).

A depender do microrganismo alvo, o mecanismo de oxirredução pode ser totalmente diferente. A bioativação do metronidazol (4-nitroimidazol) é uma das mais bem compreendidas, e envolver a enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductase (PFOR) em protozoários anaeróbios e microaerófilos, como como *T. vaginalis*, *E. histolytica* e *G. lamblia*. A PFOR recebe elétrons de proteínas ferredoxina, que então reduz o metronidazol para formar ânion nitro reativo, que rapidamente se decompõe em ânion nitrito e um radical imidazol, que degradam o material genético e proteínas essenciais da célula patogênica. Ainda, a tiorredoxina redutase (TrxR) e a nitroreductase 1 (NTR1) estão implicadas na ativação de 5-nitroimidazóis nos mesmos protozoários supracitados (ANG *et al.*, 2017).

Os mecanismos moleculares exatos envolvidos na atividade *leishmanicida* da pretomanida ainda não estão totalmente esclarecidos, mas experimentos de proteômica mostraram que a bioativação de nitroimidazóis bicíclicos em *Leishmania donovani* implica a atividade de outra oxirredutase, denominada nitroreductase tipo 2 (NTR2) (WYLLIE *et al.*, 2016).

A NTR2 (ORF name: CGC21_18120; LDBPK_120730) é uma enzima com atividade NADH:flavina oxidoreductase. A biorredução catalisada por NTR2 sobre compostos nitro-heterocíclicos é realizada pelo cofator reduzido mononucleotídeo de flavina (FMNH₂), que transfere elétrons para o anel nitroimidazol, formando a espécie ânion nitro reativo, que rapidamente se decompõe em ânion nitrito e um radical imidazol, que são moléculas reativas que degradam o material genético e proteínas essenciais da célula de *Leishmania*. As moléculas de FMNH recebem novamente elétrons por NADH, assim o cofator reduzido FMNH₂ é restaurado e a NTR2 recupera sua atividade catalítica (**Figura 6**) (ANG *et al.*, 2017; DOWNING *et al.*, 2011; WYLLIE *et al.*, 2016).

Figura 6: Esquema de proposta para mecanismo de ação dos compostos nitroimidazooxazina em *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de (ANG. *et al.*, 2017).

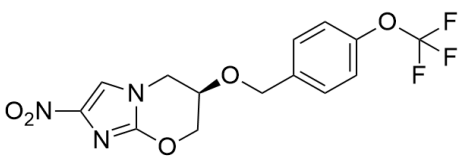
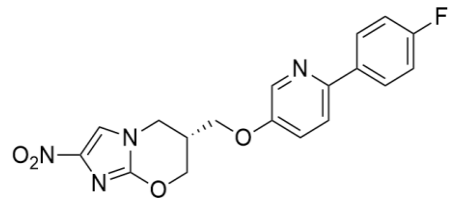
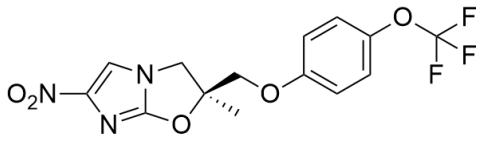
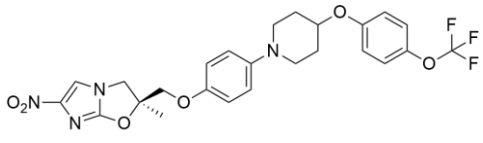
Essa biorredução, em geral, não ocorre em células de mamíferos, pois somente sistemas anaeróbios têm potencial redox suficientemente negativo para reduzir o grupo nitro. Quando o gás oxigênio está presente, o intermediário ânion radical nítro é rapidamente reoxidado pelo O₂, formando oxigênio singlete que catalisa a formação de peróxido de hidrogênio, liberando novamente a molécula de O₂ que continuará anulando a biorredução do composto nitroimidazólico, o que caracteriza um ciclo fútil (**Figura 5**). Dessa forma, o composto não é metabolizado em ERN e permanece inócuo para as células de mamíferos (ANG *et al.*, 2017).

Motivados pelas evidências anteriores da atividade de derivados nitroimidazólicos contra LVH, Patterson e colaboradores (2013) investigaram a atividade *in vitro* e *in vivo* da pretomanida frente *Leishmania donovani*. Os resultados mostraram que a pretomanida se mostrou mais eficaz e com ótima tolerância a efeitos adversos, em comparação com os medicamentos de primeira linha atualmente utilizados (PATTERSON *et al.*, 2013).

Mais recentemente, a delamanida que também é um fármaco aprovado para o tratamento de tuberculose multirresistente, foi investigada frente a LVH devido a sua similaridade estrutural com a pretomanida, por possuir um núcleo 2-nitroimidazo-oxazol como grupo farmacofórico, que difere do núcleo NTX por possuir um anel de 5 membros condensado ao anel nitroimidazólico. Os resultados também foram promissores, embora sua eficácia *in vivo* e *in vitro* tenha sido consideravelmente inferior à pretomanida (PATTERSON *et al.*, 2016).

A partir da identificação da delamanida e pretomanida como candidatos clínicos para LVH, grupos de pesquisa vinculados ao DNDi desenvolveram dois protótipos mais potentes, com perfil de solubilidade e segurança superiores, partindo do *screening* de uma biblioteca de compostos análogos a esses fármacos. Assim, os protótipos DNDI-0690 e DNDI-VL-2098 (**Tabela 2**) foram descritos como mais eficazes, seguros, e com menor tempo de tratamento (5 dias), quando comparados aos tratamentos convencionais (20-40 dias), além de serem administrados por via oral (GUPTA *et al.*, 2015; THOMPSON *et al.*, 2017).

Tabela 2: Resumo dos principais nitroimidazóis bicíclicos candidatos a ensaios clínicos de LVH.

Composto/Classe	CIM ₅₀ (μM)	Supressão parasitária	Espécie	Posologia	Referência
 Pretomanida (R)-PA-824 2-nitroimidazooxazina	0,93	> 99%	<i>L. donovani</i>	(R)-PA-824 a 100 mg.kg ⁻¹ , uma vez por dia, durante 5 dias	Patterson <i>et al.</i> , 2013
 DNDI-0690 2-nitroimidazooxazina	0,08	> 96%	<i>L. infantum</i>	12,5 mg.kg ⁻¹ , duas vezes por dia, durante 5 dias	Thompson <i>et al.</i> , 2017
 Delamanida (OPC-67683) 2-nitroimidazol-oxazol	7,1	22-66%	<i>L. infantum</i>	50 mg.kg ⁻¹ , uma vez ao dia, durante 5 dias.	Thompson <i>et al.</i> , 2016
 DNDI-VL-2098 2-nitroimidazol-oxazol	0,06	> 99%	<i>L. donovani</i>	50 mg.kg ⁻¹ , uma vez ao dia, durante 5 dias.	Gupta <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Elaboração própria.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Síntese e avaliação pré-clínica preliminar de dois derivados carbamato nitroimidazooxazina com potencial atividade anti-*Leishmania*.

3.2 Objetivos específicos

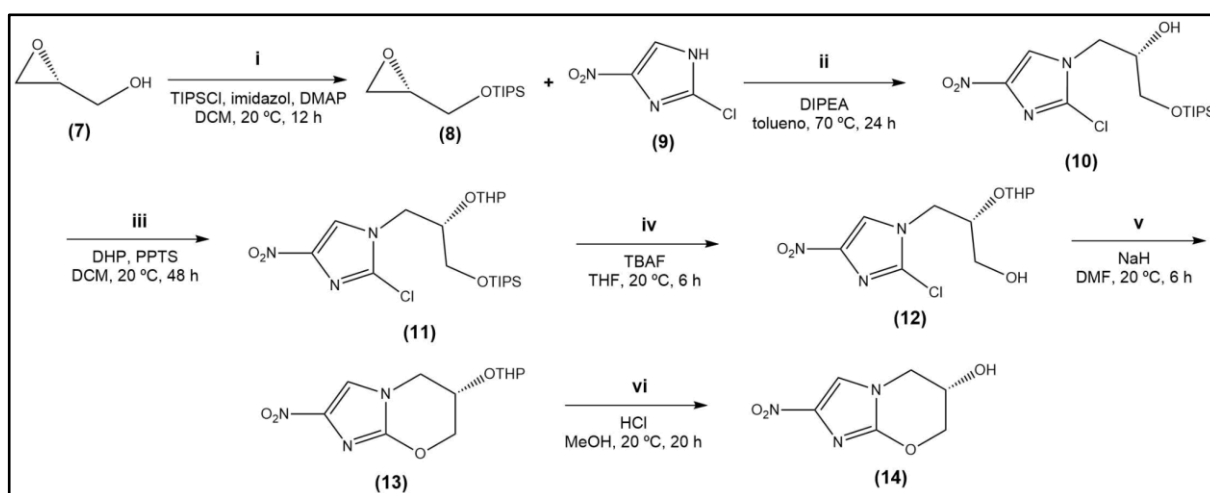
- Síntese, isolamento e purificação dos compostos A2 e A6 e seus intermediários;
- Determinação estrutural por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C ;
- Determinação experimental do coeficiente de partição (Log P);
- Avaliação da estabilidade à hidrólise enzimática em plasma murino.

4 MÉTODOS

4.1 Síntese do intermediário-chave nitroimidazooxazina

Para a síntese do intermediário-chave (**14**) (**Figura 7**), se deu início pelo tratamento de (R)-glicidol (**7**) com o composto químico cloreto de triisopropilsilano (TIPSCI), um agente protetor de álcool primário, para formar o composto (**8**), com imidazol e 4-dimetilaminopiridina utilizados como catalisadores da substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) da reação. Com o produto purificado, iniciou-se uma nova reação com 2-cloro-4-nitro-1H-imidazol (**9**) solubilizados em solvente aprótico, DIPEA foi utilizado como base, para obtenção de (**10**). Partindo da abertura do epóxido pelo ataque nucleofílico no carbono estereogênico, há a troca da configuração do estereocentro ($R \rightarrow S$). O carbono secundário formado, foi subsequentemente protegido com DHP em meio de diclorometano e catalisador PPTS, levando a formação de (**11**). Para formação do anel imidazooxazina, iniciou-se pelo tratamento do álcool primário com o agente desprotetor TBAF, formando o álcool desprotegido (**12**), que foi reduzido com NaH em DMF, concluindo a ciclização do segundo anel (**13**). O grupo protetor do álcool secundário é hidrolisado com HCl, formando o intermediário-chave (**14**) (BONJORNO, 2021; FERNANDES, 2021).

Figura 7: Rota sintética para obtenção do núcleo (S)-nitroimidazooxazina.



Fonte: Procedimento experimental.

- I. Em balão reacional adicionou-se 0,0675 mols de (R)-glicidiol, imidazol e 0,00645 mols de DIPEA foram acrescentados. Os reagentes foram solubilizados em 50 mL de diclorometano (DCM) anidro, e iniciou-se a adição lenta de triisopropilsilano (TIPSCI). A reação foi mantida por 12 h à temperatura ambiente, sob atmosfera de N₂. Para realizar o isolamento do produto, o meio foi filtrado sobre celite 545 sob pressão reduzida, diluído em H₂O e extraído por método simples de extração líquido-líquido. Os extratos foram lavados em triplicata com 20 mL de solução salina, filtrados e secos com Na₂SO₄ anidro, resultando em um óleo viscoso amarelado. O óleo é purificado por cromatografia líquida em coluna de vidro aberta, com sílica *flash* como fase estacionária e hexano:éter etílico (95:5 v/v) como fase móvel, levando ao isolamento de um óleo pouco viscoso e transparente.
- II. Adicionou-se 0,0159 mols de (7), 0,0174 mols de (8) e 0,0118 mols de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA), solubilizados em 70 mL de tolueno e mantido a 70 °C em sistema de refluxo por 24 h, sob atmosfera de N₂. Posteriormente, o meio reacional foi evaporado por pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo amarronzado com pequenos cristais brancos. Esse óleo foi purificado em fase normal, com hexano:éter etílico (1:1 v/v) como FM. O produto (9) isolado após a cromatografia é um sólido branco.
- III. Aproximadamente 7,276 mmol do composto (9) e de piridínio-p-toluenossulfonato (PPTS) foram adicionados em balão reacional, junto de 0,03785 mols de 3,4-diidro-2H-pirano (DHP), solubilizados em 50 mL de DCM anidro. A reação foi mantida sob agitação e isolada da luz com papel alumínio durante 48 horas em temperatura ambiente isolado com atmosfera de N₂. Subsequentemente, o meio reacional contendo o intermediário (5) foi diluído em DCM e lavado com solução saturada de NaHCO₃ (3x, 20 mL). A fase orgânica foi filtrada e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada à pressão reduzida, levando a um óleo amarelo. O óleo foi purificado em cromatografia líquida em fase normal com FM hexano:éter etílico (3:7 v/v).
- IV. Adicionou-se solução de fluoreto de tetrabutilamônio (TBAF) (solução 1 M em THF) (23,07 mmol) a 7,69 mmol de (10), e solubilizou-se os compostos em 60 mL de tetraidrofurano (THF). A reação foi mantida em atmosfera inerte de N₂ ao abrigo da luz, durante 6 horas em temperatura ambiente. Para o isolamento do composto (11) dilui-se o meio reacional com acetato de etila, e

a fase orgânica foi lavada com NaHCO_3 e seca com Na_2SO_4 anidro. O óleo amarelado contendo o intermediário de interesse foi purificado em CL de fase normal, com FM acetato de etila:éter etílico (2:8 v/v).

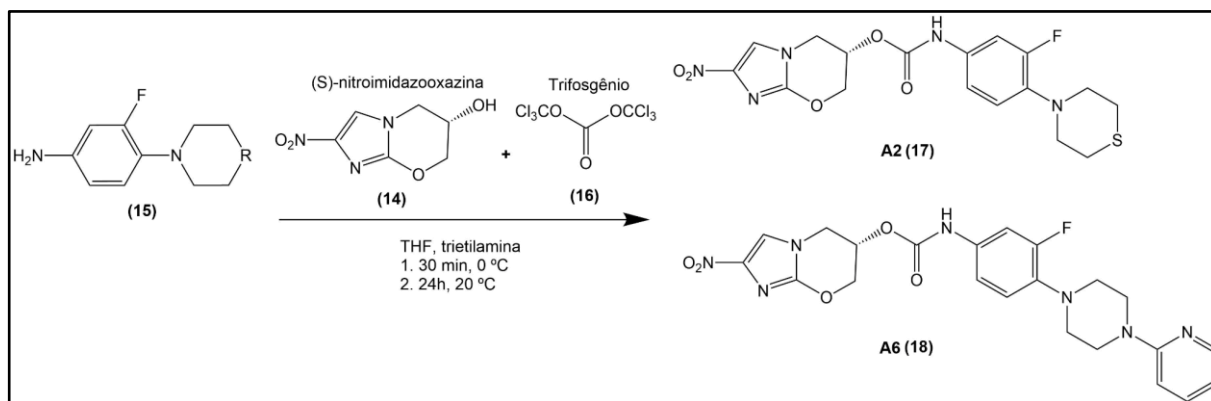
- V. Com o intermediário (**12**) purificado, foi transferido 0,01164 mols para um balão reacional, e adicionado 20 mL de dimetilformamida (DMF) anidro. A solução foi mantida em banho de gelo até atingir 0 °C e prosseguiu-se com a adição lenta do hidreto de sódio 0,03492 mols. Após 30 minutos do fim da adição, retirou-se o banho de gelo e manteve-se a reação sob agitação por 6 horas em temperatura ambiente sob atmosfera inerte e protegido da luz. Após a reação, (**13**) foi diluído em 70 mL de uma solução gelada de NaHCO_3 junto com algumas gotas de ácido acético, a fim de neutralizar qualquer hidreto residual. A purificação foi feita em CL com FM hexano:acetato de etila (2:8 v/v)
- VI. Em balão de 50 mL adicionou-se 1,12 mmols do intermediário protegido (**13**), 13 gotas de HCl concentrado e 20 mL de metanol. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 20 horas ao abrigo da luz. Subsequentemente, o metanol foi evaporado sob pressão reduzida e o *crude* foi ressuspendido em 30 mL de acetato de etila, que foi lavado com solução saturada de NaHCO_3 e o pH ajustado para 8. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3x, 20 mL). Seguiu-se para a purificação em CL com FM hexano:acetato de etila 2:8 em uma coluna de sílica *flash* de 20 cm. O intermediário-chave (**14**) é isolado, sendo um óleo amarelo claro viscoso.

4.2 Síntese dos derivados carbamato

Em balão de 25 mL adicionou-se nitroimidazooxazina (1,437 mmols) em 5 mL de THF anidro degaseificado, contendo 80 μL de trietilamina anidra e 1,112 mmols de trifosgênio. A reação foi agitada em banho de gelo por 30 minutos e depois mantida a temperatura ambiente sob agitação em atmosfera inerte por 24h, formando uma suspensão branca. Uma solução do substituinte amina (1,112 mmols) em THF anidro (1 mL) foi adicionada e a reação foi mantida sob agitação por 24 horas (**Figura 8**). Para a purificação, foram adicionados 5 mL de NaHCO_3 (solução saturada) e em seguida foi feita a extração. A fase aquosa foi lavada com DCM (10x). A fase orgânica é seca, filtrada e evaporada à pressão reduzida. A purificação

foi realizada em coluna manual em fase normal, com FM hexano:acetato (1:1), mudando para hexano:acetato (1:9) quando acabar a eluição da arilamina não reagida (FERNANDES, 2021).

Figura 8: Síntese dos produtos finais.



Fonte: Procedimento experimental.

4.3 Métodos analíticos

- a) *Cromatografia em camada delgada* (CCD): As análises por cromatografia em camada delgada (CCD)-(Merck®) foram realizadas em cromatoplasmas de alumínio (AL TLC) de sílica gel 60 F254 para o acompanhamento das reações. A visualização das substâncias foi feita em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm).
- b) Determinação da faixa de fusão: As faixas de fusão dos compostos intermediários e finais foram determinadas em um equipamento de ponto de fusão capilar *Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific®*.
- c) Ressonância magnética nuclear (RMN): As análises de RMN de H^1 e C^{13} unidimensionais (*Bruker 600* e *Bruker 300*, operando a 600 MHz e 300 MHz, respectivamente, para o núcleo de H^1 e TMS como referência interna e a 150 MHz para C^{13}) foram realizadas utilizando solvente deuterado (DMSO d_6). Os valores de deslocamento químico foram reportados em ppm (δ).

4.4 Determinação da estabilidade plasmática

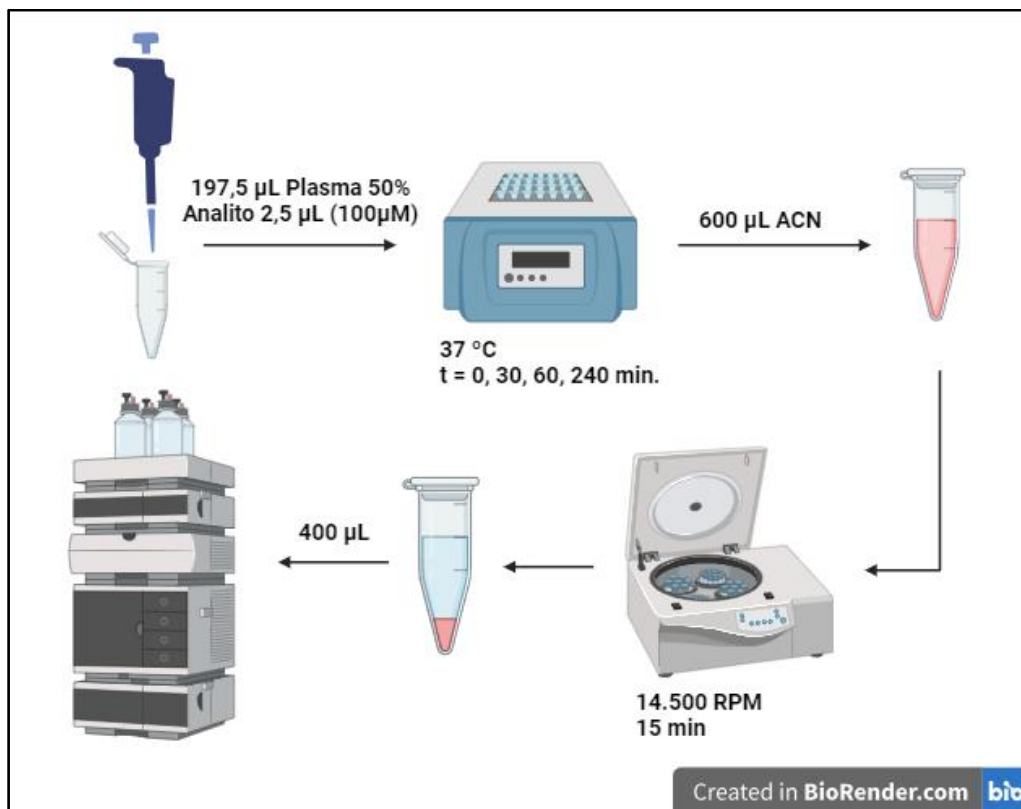
Foi preparado 20 mL solução de plasma fresco de ratos *twister* machos, diluída em proporção (1:1) com solução tampão fosfato-salino pH 7,4. As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se soluções de 100 µM, e dessa solução foram adicionados 2,5 µL em 197,5 µL da solução de plasma (**Figura 9**).

As amostras (LID, lidocaína, controle positivo; NAP, naproxeno, controle negativo; A2 e A6, compostos investigados), após entrarem em contato com a solução de plasma, foram suavemente agitadas e incubadas em temperatura de 37 °C. Uma triplicata de cada amostra foi incubada a 0, 30, 60 e 240 minutos.

Ao final do tempo correspondente da amostra, a reação foi interrompida com a adição de 600 µL de acetonitrila fria, os microtubos foram então centrifugados a 14.500 rpm/15 min e 400 µL do sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro e levado para análise em cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta-visível (CLAE-UV/Vis).

O sistema CLAE-UV/Vis utilizado foi o modelo *Agilent 1110 Series* HPLC acoplado ao Detector de Fluorescência *Agilent 1110 Series* com o software *Agilent Chemstation* LC B.04.03. A separação ocorreu em coluna YMC-Pack Pro C18 (250 mm × 2 mm d.i., 5 µm df). Fase móvel: acetonitrila/água com 0,1% de ácido fórmico (70:30, v/v). O volume de injeção foi de 20 µL com vazão de 1,0 mL/min e tempo total de corrida de 13 minutos. A temperatura da coluna foi de 40 °C e o comprimento de onda do detector UV/Vis a 254 nm.

Figura 9: Ilustração da metodologia do ensaio de estabilidade plasmática.



Fonte: Elaboração própria. Criado com o *software* BioRender.com.

4.5 Determinação experimental do coeficiente de partição (Log P)

O Log P dos compostos sintetizados foram determinados em sistema CLAE-UV/Vis, a partir do fator de capacidade (k) correlacionado com o Log P de substâncias referências, listadas nas diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD/OCDE) para testes de produtos químicos (117) (OECD, 2004).

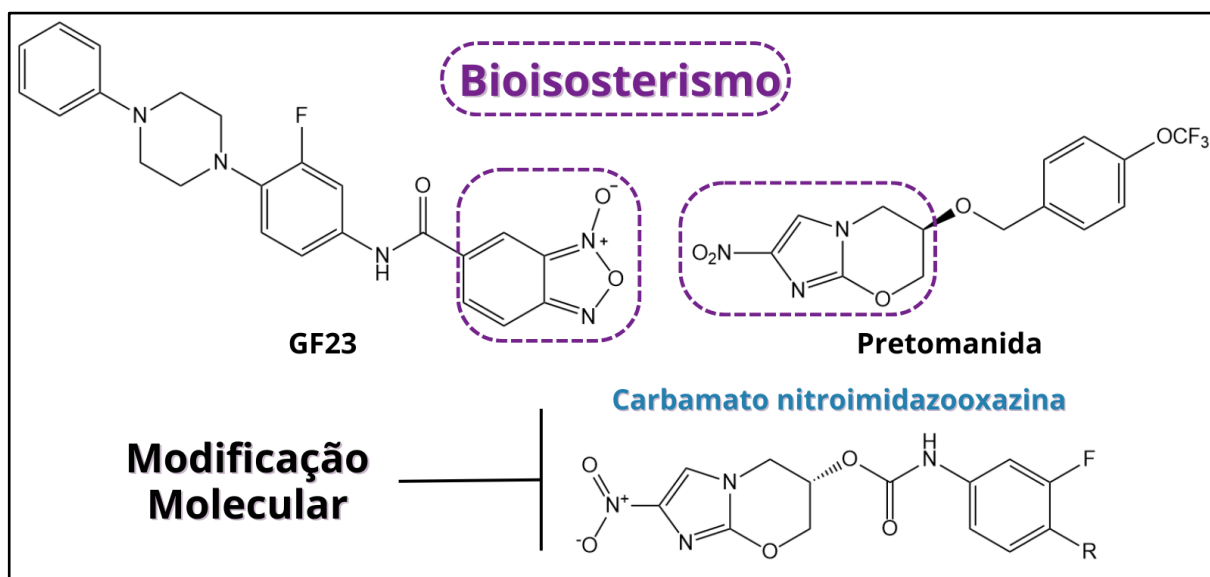
O sistema CLAE-UV/Vis configurado foi composto por coluna C18, detector UV com comprimento de onda a 210 nm, com fase móvel metanol:água (3:1, v/v), vazão de 1 mL/min durante, com tempo de corrida total de 45 minutos. As substâncias referências utilizadas foram: anilina, acetanilida, p-cresol, nitrobenzeno, clorobenzeno, naftaleno, bifenil, fenantreno e trifetilamina, e uma solução de tiouréia foi estabelecida como padrão de volume morto. As injeções das amostras no sistema CLAE foram realizadas em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Síntese e caracterização

Os compostos A2 (sólido creme; rendimento 22%; P.F: 233-236 °C) e A6 (sólido creme; rendimento 11%; P.F: 211-214 °C) (**Figura 8**), primariamente foram planejados frente a *M. tuberculosis* multiresistente, e no presente trabalho reposicionados e investigados como potenciais agentes anti-*Leishmania*. O planejamento dos dois protótipos partiu da troca bioisostérica entre o composto benzofuroxano GF23 (**Figura 10**), que possui excelente atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*, pelo anel nitroimidazooxazina presente na pretomanida. Além do sistema nitroimidazólico modificado, a ligação éter foi substituída pela função carbamato (FERNANDES, 2021).

Figura 10: Planejamento estrutural dos compostos carbamato nitroimidazooxazina.



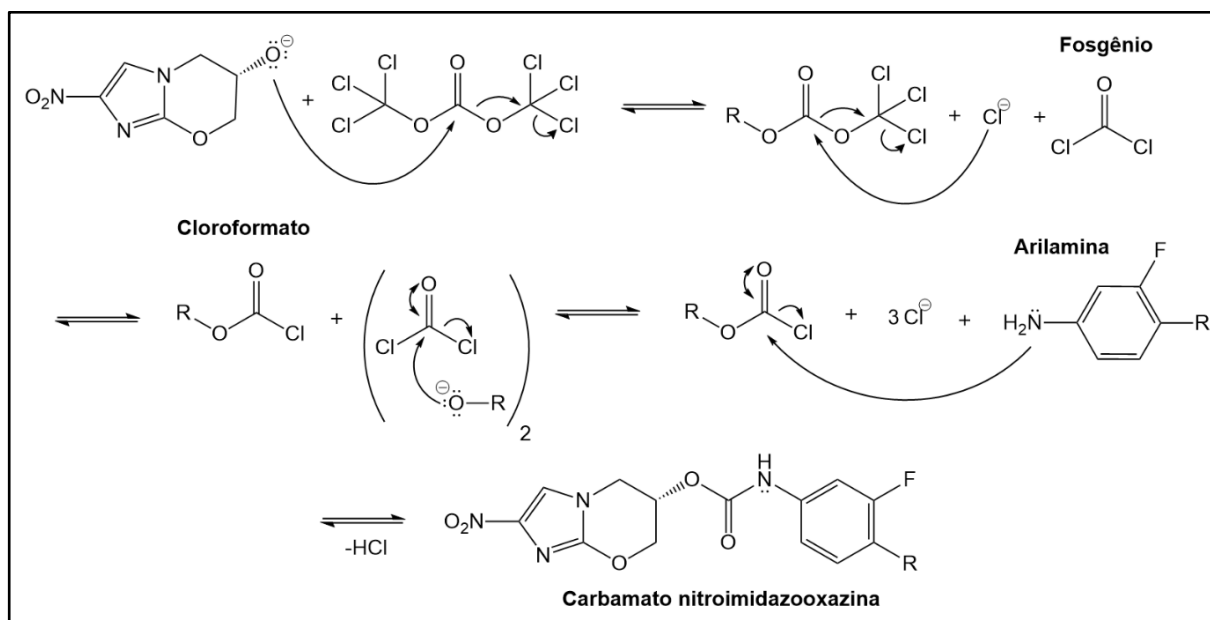
Fonte: Elaboração Própria.

A função carbamato diminui a liberdade conformacional da molécula, pois a hibridização sp^2 da carbonila confere geometria planar para a molécula. Essa maior restrição conformacional pode influenciar na interação com o sítio ativo, incrementando ou não a seletividade do composto com seu alvo. Patterson e colaboradores (2013) demonstraram que o enantiômero (R)-pretomanida se mostrou 5x mais ativo que a forma (S)-pretomanida, mesmo que esse último já possui

relevante valor de CIM_{50} ($4,92 \mu M$ em amastigotas de *L. donovani* internalizados em macrófagos). Como o derivado carbamato possui simetria mais rígida, uma hipótese considerada é que a restrição conformacional favoreça a interação com seu receptor.

O mecanismo da reação se inicia com o ataque nucleofílico do oxigênio eletronegativamente carregado à carbonila do trifosgênio, que leva a formação de um intermediário carbonato e liberação de um íon cloreto e uma primeira molécula de fosgênio. O primeiro íon cloreto liberado rapidamente reage com o intermediário carbonato, que culmina na formação de um intermediário cloroformato e liberação da segunda molécula de fosgênio. Os dois equivalentes de fosgênio produzidos a partir do trifosgênio reagem com outras moléculas de nitroimidazooxazina, formando mais dois equivalentes do intermediário cloroformato. Ao término dessa primeira reação, a arilamina correspondente é adicionada no meio reacional, que leva a um ataque nucleofílico do nitrogênio anilínico ao intermediário cloroformato, levando a saída do íon cloreto e formando o composto final com a função carbamato nitroimidazooxazina (**Figura 11**) (FERNANDES, 2021).

Figura 11: Mecanismo de formação da ligação carbamatos.



Fonte: Adaptado de (FERNANDES, 2021).

O trifosgênio é um reagente mortal que oferece risco à vida se inalado os vapores da sublimação, então deve-se usar capela de exaustão e máscara com filtro

de carvão ativado para realizar a manipulação desse reagente, mas se mantém estável até temperaturas de 200 °C e é uma alternativa menos tóxica para o reagente difogêsnio, que é um gás (QU *et al.*, 2021; MAJER; RANDAD, 1994). Seu uso é relacionado principalmente com reações de halogenação, entretanto é descrito também como agente para substituição em aminas N,N'-assimétricas (MAJER; RANDAD, 1994).

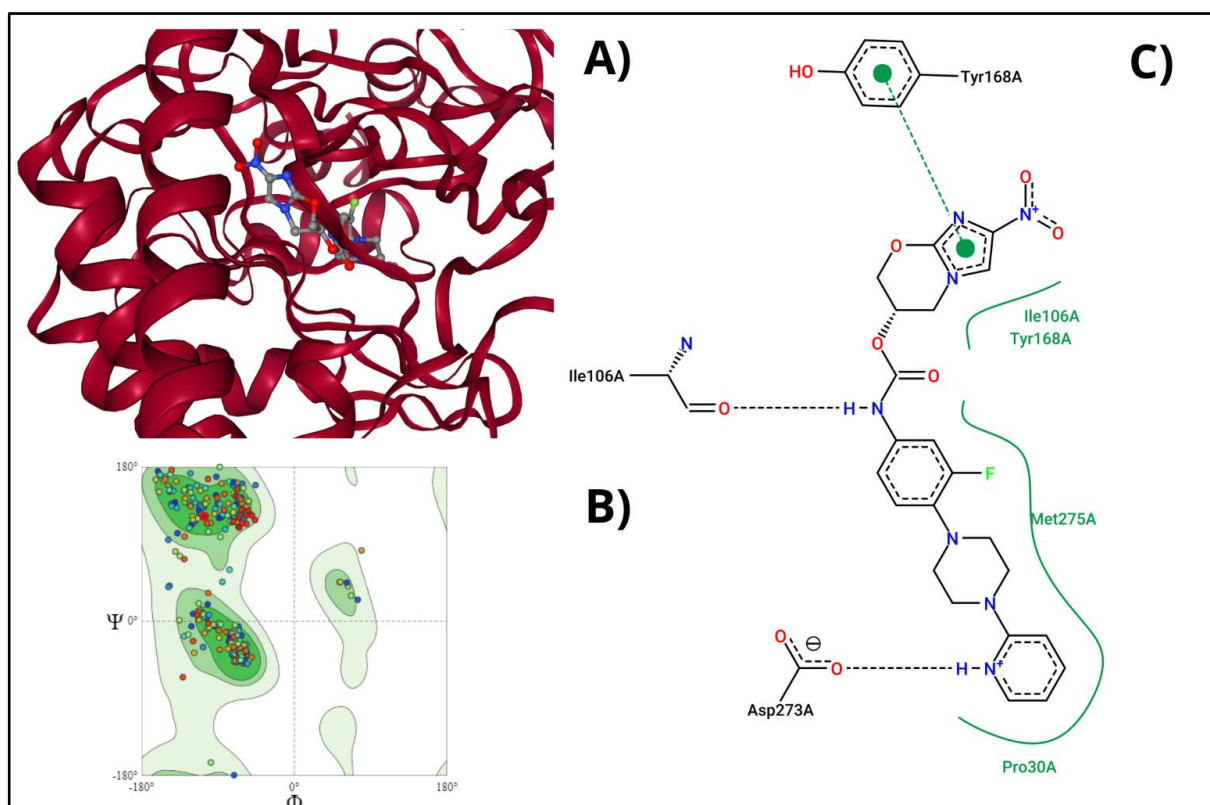
Para compreender as possíveis interações realizadas entre o alvo farmacológico e os compostos sintetizados, foi elaborada a construção de um modelo da enzima NTR2 por modelagem de homologia, através do *software* livre *Swiss Model* (**Figura 12**).

A modelagem de homologia é aplicada quando a estrutura tridimensional de uma proteína não foi determinada experimentalmente por cristalografia de raio-X, por exemplo. Os modelos construídos partem da identificação e seleção de proteínas-molde para construção do modelo alvo, e em seguida ocorre um alinhamento das sequências dos aminoácidos com diversas outras estruturas tridimensionais que foram determinadas experimentalmente, assim, as coordenadas preservadas são copiadas de modelo para modelo. Utilizando uma biblioteca de fragmentos, inserções e exclusões são remodeladas para reconstruir as cadeias laterais, com ângulos diédricos ϕ e ψ que sejam favorecidos pelo gráfico de Ramachandran. Por fim, a estrutura do modelo construído é regularizada por um campo de força. O resultado do modelo foi validado pelo *software MolProbity versão 4.4*. Que mostrou ótimas pontuações, com um Ramachandran Favorecido de 95,81 %. Os outros indicadores utilizados pelo *software* também foram favoráveis, o que valida o modelo para uso em demais estudos de *docking* e modelagem molecular aplicados ao desenvolvimento de novos fármacos (BIOZENTRUM, 2024; CAMACHO *et al.*, 2009; STEINEGGER *et al.*, 2009).

Após a construção do modelo, uma simples ancoragem utilizando o site *Protein.plus* foi realizada para análise das interações proteína-ligante. Os arquivos da NTR2 e do ligante A6 foram selecionados, e o próprio *server* definiu todas as configurações necessárias, bem como a cavidade de interação proteína-ligante (**Figura 12**). O diagrama 2D da ancoragem NTR2-A6 mostra 3 pontos de interações. Primeiro ocorrem duas interações de doação de hidrogênio, entre a porção C-terminal ligada ao resíduo Ile106A com o hidrogênio da função carbamato, que é fortemente eletropositivo. Ainda há ligação de hidrogênio entre a pirimidina com o

aceptor de hidrogênio Asp273A, carregado eletronegativamente em pH fisiológico. O anel aromático imidazol do grupo farmacofórico interage com um resíduo de tirosina na posição 168A, por empilhamento π - π , provavelmente direcionando o grupo nitro para a interação com o cofator FMNH₂ dependente de NADH, responsável pela biorredução e ativação do composto em *Leishmania* (BARREIRO; FRAGA, 2015; WYLLIE *et al.*, 2016).

Figura 12: modelagem de homologia E9BB55_LEIDO (NTR2). A) Ancoragem NTR2-A6. B) Diagrama de Ramachandran do modelo C) Diagrama 2D da interação NTR2-A6.



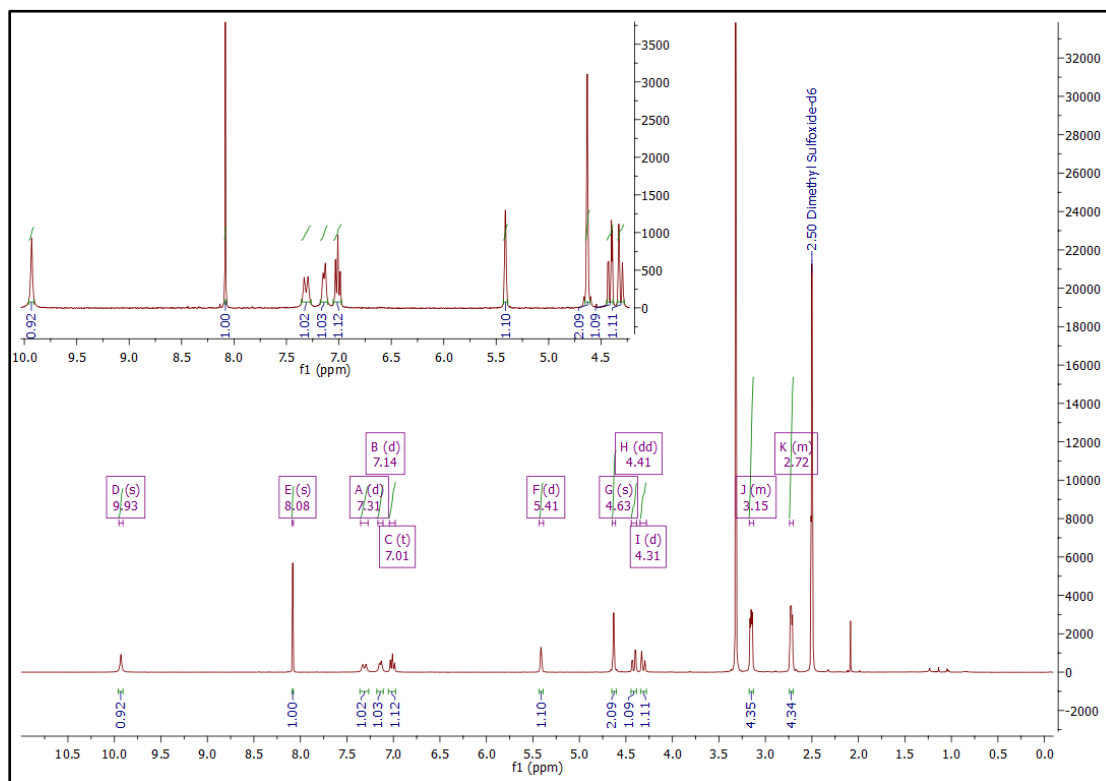
Fonte: Elaboração própria.

Os espectros de RMN foram obtidos pelo equipamento *Brucker Ascend 300* MHz e 600 MHz, de ¹H e 150 MHz para ¹³C, pertencente ao Instituto de Química da UNESP- Araraquara. Analisando e discutindo os RMNs de ¹H dos compostos A2 e A6, vemos um sinal em 9.93 e 9.94, respectivamente, que integram para 1 hidrogênio. Esse sinal em cada um dos resultados do RMN indica um núcleo fortemente desblindado de elétrons, por estar ligado em átomos eletronegativos, características essas que podemos atribuir ao hidrogênio da função carbamato. Os

reagentes também possuíam um singlete integrando para 1 na região de 7.0 ppm, referentes ao álcool de NTX e à arilamina. Esse deslocamento no equilíbrio químico era esperado após o acoplamento, devido ao caráter mais eletronegativo da função carbamato, o que evidencia que a reação de acoplamento ocorreu com êxito e os compostos finais foram sintetizados. Além disso, há a presença dos sinais dos núcleos aromáticos e alifáticos. Os espectros de ^{13}C de ambos os compostos também possuem todos os sinais atribuíveis aos núcleos de carbono dos compostos (**Tabela 3**) (**Figura 12-15**) (PAVIA *et al.*, 2015).

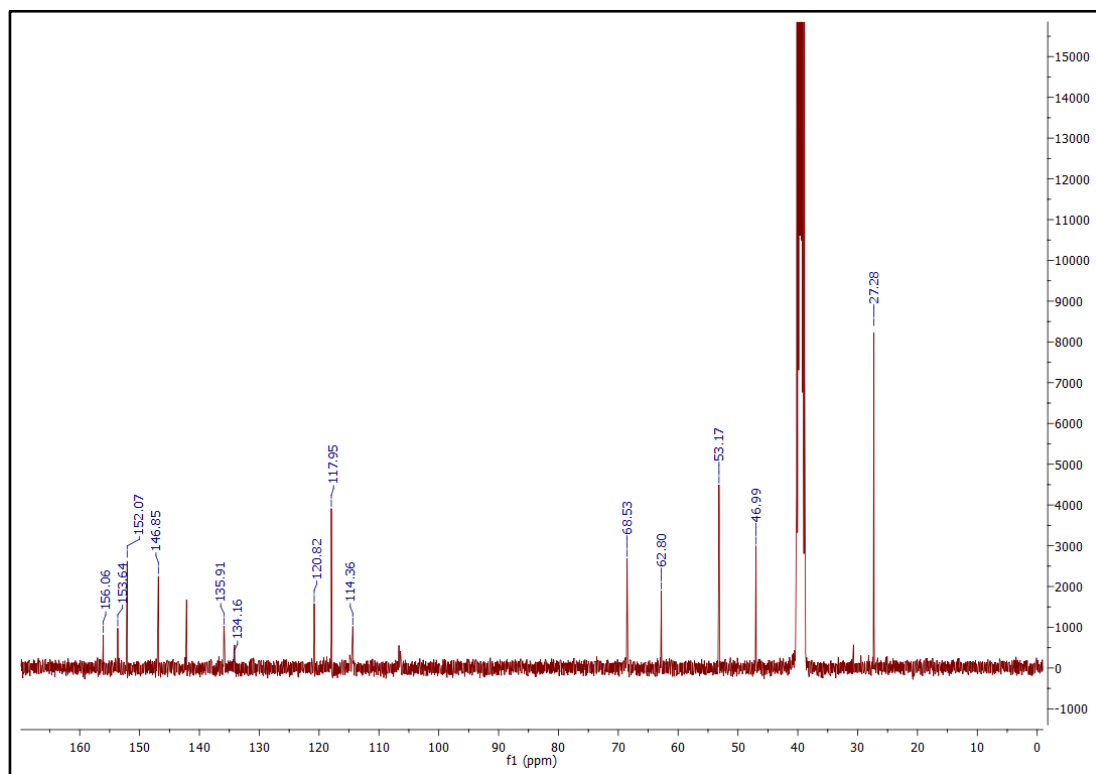
Para completar a determinação estrutural dos compostos, é necessário um experimento de RMN bidimensional, chamado HSQC (Coerência Quântica Única Heteronuclear, do inglês *Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*) usado para determinar correlações de ligação simples próton-carbono, bem como um espectro de infravermelho, que poderia indicar a mudança da função álcool para a função carbamato (PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 13: Espectro de RMN ^1H do composto **A2** (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



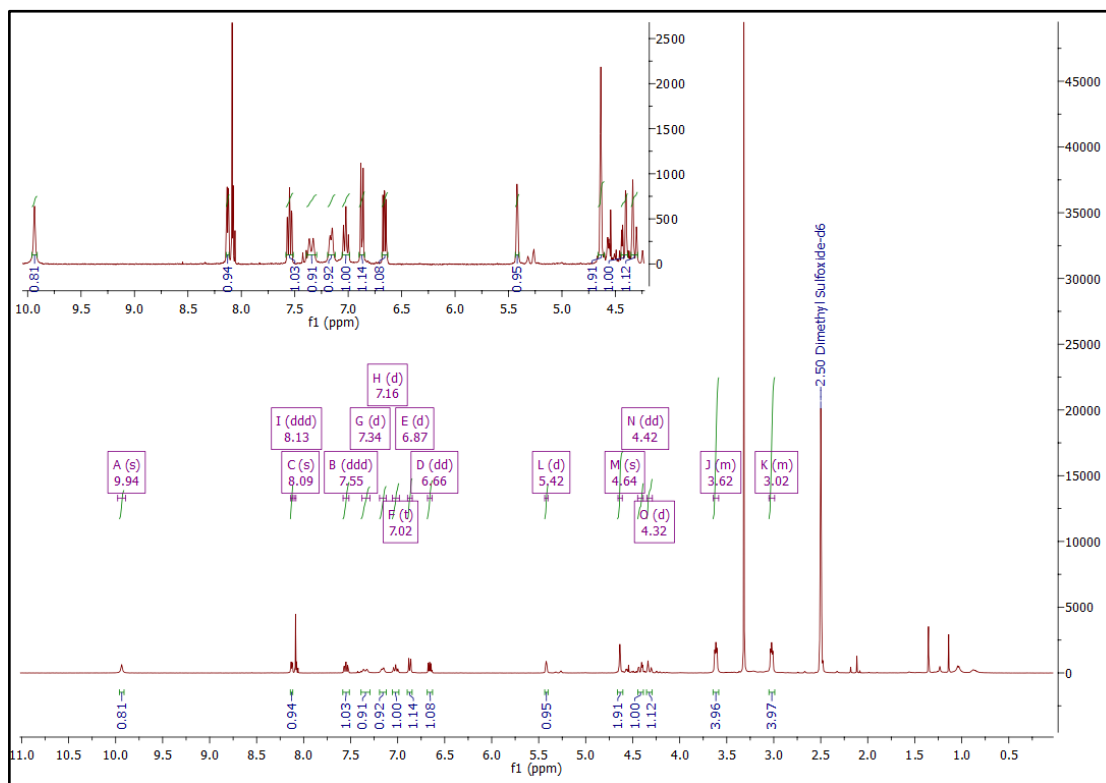
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C do composto **A2** (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



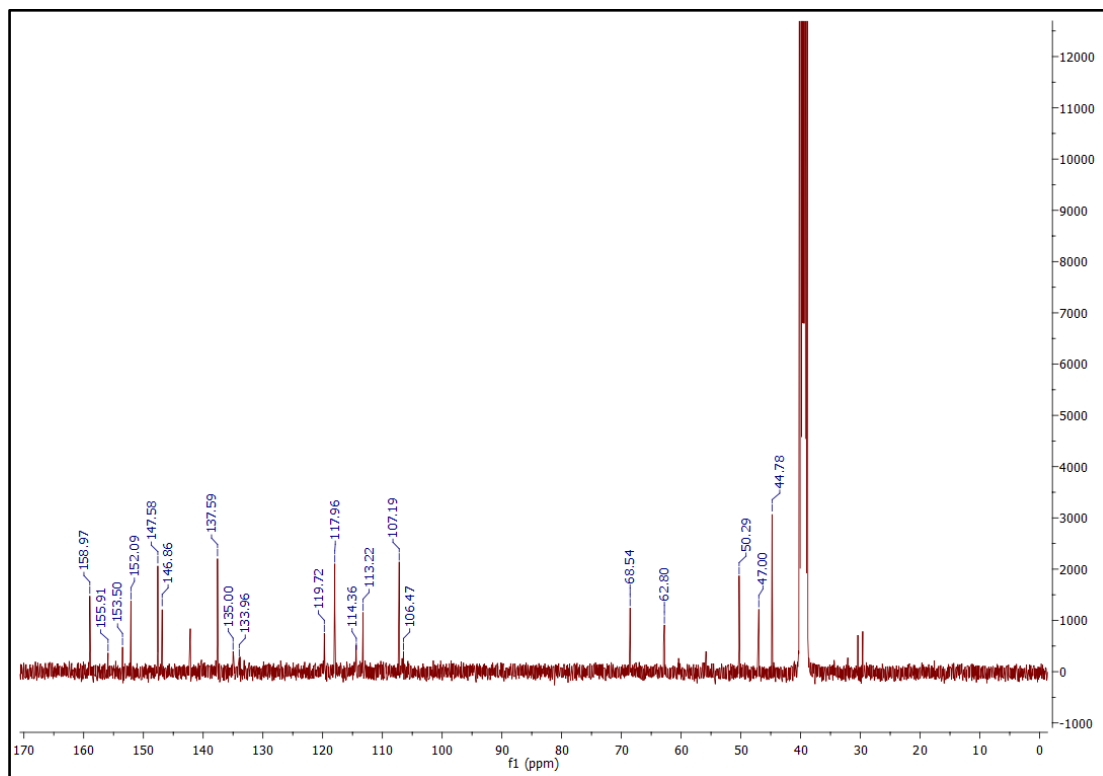
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 15: Espectro de RMN ^1H do composto **A6** (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



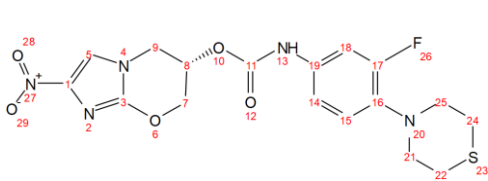
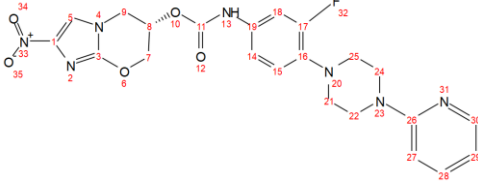
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C do composto **A6** (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 3: Deslocamentos químicos (ppm) dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos protótipos A2 e A6.

 A2  A6			
Posição	δ ^1H	δ ^{13}C	
1		146.8	
3		153.6	
5	7.14 (d, J= 8.0 Hz 2H)	120.8	7.34 (d, J=14.7 Hz, 1H)
7	4.41	62.8	4.64
8	5.41	68.5	5.42
9	4.63	53.1	4.32
11		152.0	
13	9.93 (s, 1H)		9.94 (s, 1H)
14	7.31 (d, J=14.1 Hz, 1H)	114.3	7.16 (d, J=7.8 Hz 1H)
15	7.01 (t, J= 9.2Hz 1H)	114.3	6.87(d, J=8.7 Hz, 1H)
16		135.9	
17		156.0	
18	8.08 (s, 1H)	117.9	8.09 (s, 1H)
19		134.1	
21	3.17	46.9	3.64
22	2.74	46.9	3.05
24	2.70	27.2	2.99
25	3.13	27.2	3.59
26			
27			6.66 (dd, J=6.8, 1H)
28			7.55 (dd, J=8.9, 7.1, 20Hz 1H)
29			6.66 (dd, J=5.1 Hz, 1H)
30			8.13 (dd, J= 4.9, 1.9, 0.6 Hz, 1H)

Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 Ensaio de estabilidade plasmática

A metodologia descrita foi adaptada de Di, L. e colaboradores, (2005), e executada no Laboratório de Metabolômica (LAB META – LADETEC / IQ – UFRJ) sob orientação da Prof. Dr. Marina Amaral Alves (NPPN-UFRJ).

Informações sobre a labilidade plasmática de um composto são extremamente importantes no desenvolvimento de novos fármacos. Um fármaco que sofre hidrólise enzimática tende a um tempo de meia-vida curto e atividade baixa *in vivo*, além de dificultar outros ensaios farmacocinéticos. Diante disso, é desejável a busca de protótipos com boa estabilidade plasmática, com exceção de pró-fármacos e alguns casos especiais (DI *et al.*, 2005).

Em síntese, a avaliação da estabilidade plasmática de uma nova molécula é importante ainda no início da fase pré-clínica, por possibilitar um planejamento racional que melhore as propriedades físico-químicas dos protótipos avaliados.

Moléculas com grupos funcionais éster, carbamato e amida podem ser suscetíveis às reações metabólicas de oxirredução e hidrólise catalisadas por esterases e hidrolases sanguíneas (DI *et al.*, 2005). Os protótipos A2 e A6 possuem a função carbamato (R-NH(CO)O-NTX), o que pode ser um indício de labilidade metabólica. Entretanto, os substituintes da molécula são heterociclos aromáticos, grupos volumosos que podem resultar em um impedimento estérico que incremente a estabilidade biológica dos protótipos (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Inesperavelmente, durante o tratamento dos dados, foi observado problemas técnicos na resolução dos picos registrados nos cromatogramas, indicando coeluição do analito com outras impurezas ou produtos de degradação. Essa coeluição interferiu no tratamento automático dos dados, realizada no *software Agilent Chemstation* LC B.04.03, o que prejudicou a aquisição dos dados e integridade dos valores de concentração remanescente calculados.

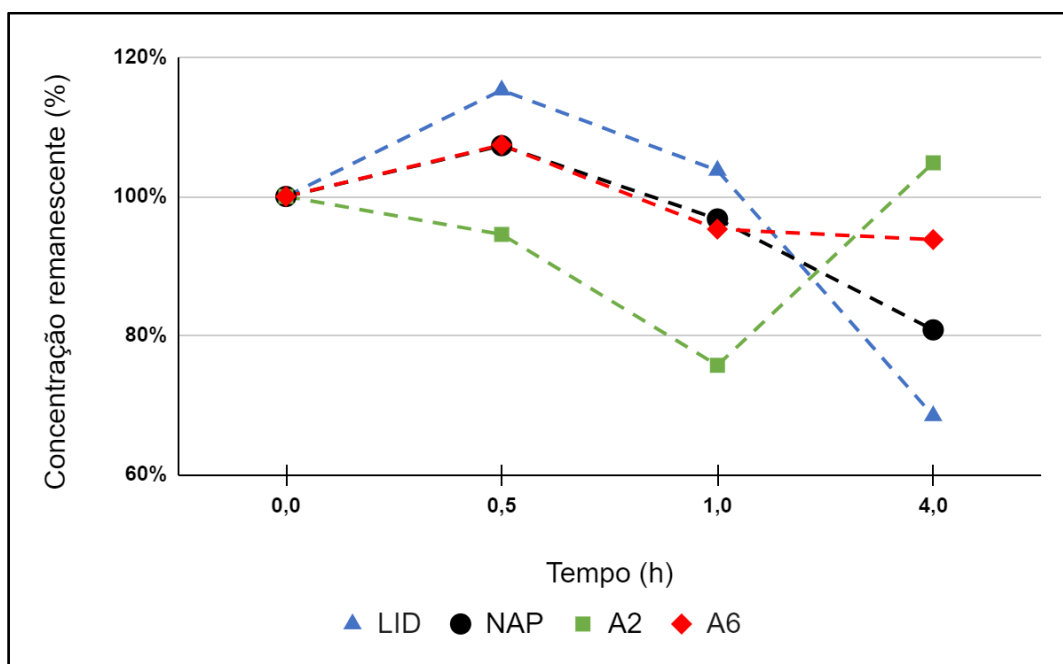
O problema técnico relatado foi atribuído a ineficiência da separação dos compostos na coluna cromatográfica utilizada, que por consequência enviesou os valores de AUC (área sob a curva, do inglês *area under the curve*) obtidos e utilizados nos cálculos. Danos à coluna cromatográfica prejudicam toda a qualidade de uma análise, oriundos de perda do empacotamento, formação de caminhos preferenciais, degradação da fase estacionária ou entupimento da coluna (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Ainda foi realizado tentativas manuais para obter os valores com maior integridade, utilizando o *software* livre *OpenChrom Lablicate Edition 1.5.0*®, mas por possível incompatibilidade entre o arquivo *output* gerado no *Agilent Chemstation* com o *OpenChrom*, a seleção manual do intervalo de *tR* do pico do analito, seguida pela integração da área sob a curva, não pode ser executada no *software*.

Para que os dados ainda pudessem ser aproveitados e um resultado preliminar com aceitável confiabilidade seja oferecido, os dados *outliers* entre os valores das triplicatas de cada amostra foram manualmente removidos e as médias foram então calculadas. Os resultados estão representados na **Figura 14**.

O valor médio de AUC no tempo de 0 horas é definido como o valor total da concentração (100%), e os valores nos tempos subsequentes são definidos como a concentração remanescente do analito após contato com as enzimas plasmáticas (DI *et al.*, 2005).

O fármaco lidocaína (LID) foi utilizado como controle positivo, pois sua meia vida curta (1,5-2 horas) e presença da função amida o elegem como fármaco suscetível à hidrólise metabólica. O naproxeno (NAP) é um fármaco com metabolismo extensivamente hepático e seu tempo de meia vida é relativamente longo (14 horas). Assim, no protocolo utilizado, espera-se que a concentração de LID decresça ao longo do tempo, enquanto que a concentração de NAP permaneça constante.

Figura 17: Resultados do ensaio de estabilidade plasmática.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 4: Dados do ensaio de estabilidade plasmática.

Composto	Tempo (h)	Média AUC	Concentração remanescente (%)
LID	0,0	10.720.771,00	100,0%
LID	0,5	12.361.443,50	115,3%
LID	1,0	11.123.438,00	103,8%
LID	4,0	7.338.744,00	68,5%
NAP	0,0	104.476.754,67	100,0%
NAP	0,5	112.122.515,50	107,3%
NAP	1,0	101.097.874,67	96,8%
NAP	4,0	84.431.208,00	80,8%
A2	0,0	171.910.289,67	100,0%
A2	0,5	162.540.648,00	94,5%
A2	1,0	130.168.843,00	75,7%
A2	4,0	180.239.704,33	104,8%
A6	0,0	18.178.412,33	100,0%
A6	0,5	19.527.986,67	107,4%
A6	1,0	17.324.337,00	95,3%
A6	4,0	17.051.456,67	93,8%

Fonte: Dados da pesquisa.

Observando os resultados preliminares da análise no gráfico da **Figura 14**, pode-se observar que todos os compostos em pelo menos um dos intervalos de incubação pré-estabelecidos ultrapassam a concentração de 100%. Isso é reflexo do desvio padrão elevado do conjunto de dados, em consequência dos problemas técnicos supracitados. As amostras de LID mostraram notável redução na concentração após o tempo de 4 horas (68%), um indício de que houve degradação enzimática. No tempo 4, NAP apresentou concentração remanescente de 80%, mas o esperado era que esse valor se mantivesse mais próximo de 100%.

Os protótipos investigados mantiveram concentrações mais estáveis ao longo do tempo, principalmente o composto A6. Isso sugere de forma preliminar que os derivados carbamato nitroimidazooxazina apresentam estabilidade plasmática satisfatória até o tempo de 4 horas, o que sustenta um perfil farmacocinético positivo sobre os protótipos sintetizados.

5.3 Determinação experimental do Log P

Como descrito na literatura, a proposta de mecanismo de ação dos compostos nitroimidazooxazina envolve a difusão passiva pela membrana e bioativação por atividade de NTR2 para que exerça atividade biológica (Wyllie, S. et. 2016). Diante disso, conhecer as propriedades físico-químicas de um fármaco é crucial para entender sua farmacocinética.

Uma dessas propriedades é a de lipofilicidade, que desempenha papel crucial na interação fármaco-receptor. O coeficiente de partição de um composto diz sobre a relação das concentrações, após sofrer extração por uma mistura de octanol/água. Ou seja, o Log P evidencia a tendência da molécula de se difundir para a fase orgânica, que é uma propriedade essencial para fármacos que precisam atravessar a membrana plasmática (BHARATE; KUMAR; VISHWAKARMA, 2016).

O fator de capacidade (k) foi determinado pela expressão: $k=(t_R-t_0)/t_0$, em que t_R é o tempo de retenção da substância em estudo e t_0 é o volume morto, determinado pelo t_R da tiouréia. A equação de regressão linear foi calculada pela correlação entre Log k versus o Log P das substâncias referências utilizadas (anilina, acetanilida, p-cresol, nitrobenzeno, clorobenzeno, naftaleno, bifenil, fenantreno e trifetilamina), que abrangem uma faixa de Log P de 0,9-6,5. Os resultados do

experimento mostram que os compostos A2 e A6 possuem Log P de 1,97 e 1,98, respectivamente.

Tabela 5: Resultados do ensaio da determinação do Log P.

Composto	Log P	tR médio tiouréia	tR médio composto	K	Log K	Log P ¹
Anilina	0,9	1,69	2,18	0,285	-0,545	0,75
Acetanilida	1,0	1,81	2,40	0,324	-0,490	0,90
p-Cresol	1,9	1,81	2,86	0,584	-0,234	1,59
Nitrobenzeno	1,9	1,68	3,22	0,912	-0,040	2,12
Clorobenzeno	2,8	1,60	5,60	2,488	0,396	3,31
Naftaleno	3,6	1,77	7,29	3,109	0,493	3,57
Bifenil	4,0	1,74	10,75	5,149	0,712	4,17
Fenantreno	4,5	1,78	14,79	7,309	0,864	4,58
Trifenilamina	5,7	1,76	33,60	18,096	1,258	5,65
DDT	6,5	1,76	49,23	26,898	1,430	6,12
A2	-	1,78	3,22	0,805	-0,094	1,97
A6	-	1,76	3,20	0,811	-0,091	1,98

¹ Equação de regressão linear: $y = 2,72x + 2,23$ $R^2=0,981$

Fonte: Dados da pesquisa.

É descrito um modelo bilinear que correlaciona biodisponibilidade oral *versus* Log P, apontando que fármacos com valor de Log P inferior a 1 apresentam baixa biodisponibilidade oral, pois o caráter hidrossolúvel desses compostos os impede de difundir membranas plasmáticas e interagir com seu receptor alvo. Se o Log P do composto for superior a 4, sua atividade biológica também tenderá a ser baixa, pois a alta lipossolubilidade do composto tenderá que o mesmo permaneça solubilizado na membrana plasmática, diminuindo sua biodisponibilidade intracelular (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Diante disso, valores de Log P de 1 a 3 compreendem uma faixa ideal de lipofilicidade, que refletem em boas propriedades farmacocinéticas e atividade biológica para a maioria dos fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2015). Os valores de Log P do ensaio reportados na **Tabela 3** tiveram boa exatidão em relação aos valores de Log P tabulados das substâncias referências, evidenciando que os

compostos sintetizados no trabalho, com valores de Log P de aproximadamente 1,9, possuem um perfil ideal de lipofilicidade para um candidato a fármaco.

CONCLUSÃO

Diversos compostos nitro heterocíclicos aromáticos têm sido investigados para o tratamento de diversas DTNs, e a classe nitroimidazooxazina vem sendo descrita na última década de forma promissora para o desenvolvimento de novos fármacos frente a *Leishmania* spp. O composto nitroimidazooxazina líder DNDI-0690 se mostrou superior aos medicamentos convencionais em diversos resultados pré-clínicos.

Nenhum bioisótero carbamato da pretomanida com atividade anti-*Leishmania* foi descrito, mostrando o caráter de ineditismo do presente trabalho, logo os protótipos sintetizados poderão ser depositados para obtenção de patente internacional. Além disso, a troca bioisotérica escolhida pode influenciar significativamente na atividade biológica da molécula, e essas informações podem ser compiladas para que a relação estrutura atividade dos compostos nitroimidazol bicíclicos seja mais bem compreendida.

Os compostos (S)-2-nitroimidazooxazina A2 e A6 foram obtidos, respectivamente, com rendimento global de 22% e 11%. O esquema sintético utilizado possui múltiplas etapas, em virtude da manutenção do centro quiral S, necessário para avaliações frente a *M. tuberculosis* que serão realizadas em outro trabalho. Novas rotas sintéticas podem ser desenvolvidas, visando principalmente a redução do custo de síntese que resultem na mistura racêmica dos enantiômeros produzidos.

O Log P de aproximadamente 1,90 obtido para ambos os protótipos sustenta um perfil farmacocinético adequado. Os resultados de estabilidade plasmática foram interpretados de maneira preliminar, mas sugerem que os derivados carbamato possuem satisfatória estabilidade plasmática para que possua atividade *in vivo*.

Futuramente, estudos de citotoxicidade em células THP-1 diferenciadas em macrófagos serão conduzidos, gerando resultados de CIM₅₀ para *L. infantum* e de toxicidade em células de mamíferos. Assim, uma avaliação pré-clínica completa da bioatividade e propriedades físico-químicas dos protótipos A2 e A6, bem como outros protótipos derivatizados, poderão ser feitos.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1–29, out. 2017.
- ANG, C. W. et al. Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 7636–7657, 28 set. 2017.
- ARRUDA BRAZ, C. **Planejamento e desenvolvimento de novos compostos com atividade frente a Leishmania spp.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração.** Rio de Janeiro, 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 6028: Informação e documentação: resumo: apresentação.** Rio de Janeiro, 2021.
- BHARATE, S.; KUMAR, V.; A. VISHWAKARMA, R. Determining Partition Coefficient (Log P), Distribution Coefficient (Log D) and Ionization Constant (pKa) in Early Drug Discovery. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 19, n. 6, p. 461–469, 9 jun. 2016.
- BIOZENTRUM. Relatório de modelagem de homologia SWISS-MODEL. **Modelagem de homologia "E9BB55_LEIDO E9BB55 NADH: flavina oxidoreductase/NADH oxidase, putativo"**. Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/interactive/UpxHZj/models/report.html#promod3>. 10 de janeiro de 2024.
- BRASIL. Ministério da Educação. Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. **Portaria nº 206, de 4 de setembro de 2018.** Dispõe sobre obrigatoriedade de citação CAPES. [Página 22 do Diário Oficial da União - Seção 1, número 172, de 05/09/2018 - Imprensa Nacional](#). Acesso em: 10 de dezembro de 2023.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS (Departamento de Informática do SUS).** Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def> Acesso em 31 de julho de 2023.
- BONJORNO, A. F. **Síntese de novos derivados nitroimidazooxazina planejados para o tratamento da tuberculose.** Trabalho de conclusão de curso em Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp. Araraquara. 2021.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos.** 3. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2015.

CAMACHO, C., et al. BLAST+: arquitetura e aplicações. **BMC Bioinformática** v. 10, 421, 2009. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.10.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis**. 2017. Disponível em <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html#print>>. Acesso em: 25/10/2023.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. I.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Editora Unicamp. 2006.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N. Leishmania Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, but Is There an End?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 19, set. 2019.

COSTA, Af Ali Uthant Moreira Lima da. **Alterações ósseas na leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão : aspectos clínicos, de imagens e histopatológico**.

DI, L. et al. Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 297, n. 1–2, p. 110–119, jun. 2005.

DOWNING, T., et al. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2143–2156. <https://doi.org/10.1101/gr.123430.111>. 2011.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. **Uma abordagem inovadora de P&D voltada aos pacientes negligenciados: dez anos de experiência e lições aprendidas pela DNDi**. Genebra, 2014.

FERNANDES, G. F.; SANTOS, J. L. **Planejamento, síntese e avaliação anti-Myco**acterium tuberculosis** de novos derivados benzofuroxanos e nitroimidazooxazinas úteis para o tratamento da tuberculose multirresistente**. Tese (Doutorado em Química) - Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2021.

FREITAS, A. L. DE et al. Leishmaniose visceral canina: Revisão. **Pubvet**, v. 16, n. 10, p. 1–20, out. 2022.

GUPTA, S., et al. Nitroimidazo-oxazole compound DNDI-VL-2098: an orally effective preclinical drug candidate for the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 518–527, 2015. <https://doi.org/10.1093/jac/dku422>.

JUNIOR, Z. Doenças Negligenciadas: Revisão da Literatura Sobre As Intervenções Propostas. **Sau. & Transf. Soc.** Florianópolis, 2016.

KUMARI, D.; SINGH, K. Exploring the paradox of defense between host and Leishmania parasite. **International Immunopharmacology**, v. 102, p. 108400, jan. 2022.

MAJER, P.; RANDAD, R. S. A Safe and Efficient Method for Preparation of N,N'-Unsymmetrically Disubstituted Ureas Utilizing Triphosgene. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 1937–1938, 1 abr. 1994.

MELA, M. F. DA S. **Leishmanioses, derivados guanidínicos e cisteíno proteases: atividade biológica in vitro e in vivo para o desenvolvimento racional de fármacos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Araraquara: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

MUSA, A. M. et al. Paromomycin and Miltefosine Combination as an Alternative to Treat Patients With Visceral Leishmaniasis in Eastern Africa: A Randomized, Controlled, Multicountry Trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 76, n. 3, p. e1177–e1185, 8 fev. 2023.

NAKWEYA, G. Drug combination offers shorter, more effective visceral leishmaniasis treatment. **Nature**. Africa, 10 out. 2022.

OECD/OCDE. **Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography**. 117. Guidelines for the testing of chemicals, 2004.

PATTERSON, S. et al. The R enantiomer of the antitubercular drug PA-824 as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4699–4706, out. 2013.

PATTERSON, S. et al. The anti-tubercular drug delamanid as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis. **eLife**, v. 5, n. 24, maio, 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, R. J. **Introdução à espectroscopia**. 5th ed. Cengage Learning, 2015.

QU, R.-Y. et al. Structure-Guided Discovery of Silicon-Containing Subnanomolar Inhibitor of Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase as a Potential Herbicide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 459–473, 13 jan. 2021.

ROGERS, M. et al. Proteophosphoglycans Regurgitated by Leishmania-Infected Sand Flies Target the L-Arginine Metabolism of Host Macrophages to Promote Parasite Survival. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, p. e1000555, 21 ago. 2009.

SAMPAIO, A. C. **Parasitologia**. São Paulo: Editora Rideel, 2013.

SANGSHETTI, J. N. et al. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **RSC Advances**, v. 5, n. 41, p. 32376–32415, 2015.

STEINEGGER, M., et al. HH-suite3 para detecção remota rápida de homologia e anotação profunda de proteínas. **BMC Bioinformatics**. 2019.

SIQUEIRA-BATISTA, RODRIGO. **Parasitologia - Fundamentos e Prática Clínica**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2020.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 3–4, p. 98–109, 31 jun. 2016.

THOMPSON, A. M., et al. Repositioning Antitubercular 6-Nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-b][1,3]oxazoles for Neglected Tropical Diseases: Structure–Activity Studies on a Preclinical Candidate for Visceral Leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2530–2550, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01699>.

THOMPSON, A. M., et al. 7-Substituted 2-Nitro-5,6-dihydroimidazo[2,1-b][1,3]oxazines: Novel Antitubercular Agents Lead to a New Preclinical Candidate for Visceral Leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 4212–4233, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00034>.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 79–99, 1 mar. 2019.

VASCONCELOS, S.; KOVALESKI, F.; TESSER JUNIOR, C. Doenças negligenciadas: revisão da literatura sobre as intervenções propostas. **Saúde & Transformação Social / Health & Social Change**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 114–131, 2016.

WILHELM, T. J. Viszerale Leishmaniose. **Der Chirurg**, v. 90, n. 10, p. 833 – 837, 11 out. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics 2023 Monitoring health for the SDGs Sustainable Development Goals HEALTH FOR ALL**. Geneva, 2023.

WYLLIE, S. et al. Activation of Bicyclic Nitro-drugs by a Novel Nitroreductase (NTR2) in Leishmania. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 11, p. e1005971, 3 nov. 2016.