

1 UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
2 NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
3 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
4

5  
6  
7  
8  
9 LAÍS FLÁVIA NUNES LEMES

10  
11  
12  
13 **SÍNTESE DE LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS PLANEJADOS A PARTIR**  
14 **DOS ÁCIDO ANACÁRDICO E CARDANOL E AVALIAÇÃO DAS**  
15 **ATIVIDADES TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA**

16  
17  
18  
19  
20  
21  
22 BRASÍLIA

23 2021

24



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina

1

2

3

4

LAÍS FLÁVIA NUNES LEMES

5

6

7

8

**SÍNTESE DE LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS PLANEJADOS A PARTIR  
DOS ÁCIDO ANACÁRDICO E CARDANOL E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA**

10

11

12

13

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

14

15

16

17

18

19

Orientador: Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

20

21

22

BRASÍLIA

23

2021

24

## Ficha Catalográfica

1

2

3

4

5

6

7

Ns NUNES LEMES, LAÍS FLÁVIA  
SÍNTESE DE LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS PLANEJADOS A PARTIR  
DOS ÁCIDO ANACÁRDICO E CARDANOL E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA / LAÍS FLÁVIA NUNES LEMES;  
orientador LUIZ ANTONIO SOARES ROMEIRO. -- Brasília, 2021.  
202 p.

Tese (Doutorado - Mestrado em Medicina Tropical) --  
Universidade de Brasília, 2021.

1. Alquilfosfolipídeos. 2. Trypanosoma cruzi. 3.  
Leishmania amazonensis. 4. Líquido da Casca da Castanha do  
Caju (LCC). I. SOARES ROMEIRO, LUIZ ANTONIO, orient. II.  
Título.

8

9

1

2

LAÍS FLÁVIA NUNES LEMES

3

4 **Síntese de Lipídeos Fosfolípidos Planejados a Partir dos Ácido**

5 **Anacárdico e Cardanol e Avaliação das Atividades Tripanocida e**

6 **Leishmanicida.** Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-

7 Graduação em Medicina Tropical, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade

8 de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina

9 Tropical.

10

11

### **Banca Examinadora**

12

13

14

**Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro**

15

Universidade de Brasília – UnB

16

17

**Prof. Dr. Ricardo Menegatti**

18

Universidade Federal de Goiás – UFG

19

20

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio**

21

Universidade de Brasília – UnB

22

23

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Luciana Hagstrom Bex**

24

Universidade de Brasília – UnB

25

26

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo**

27

Universidade de Brasília – UnB

28

29

Brasília

30

2021

31

## DEDICATÓRIA

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

*Aos meus pais*

*Edivan de Souza Lemes e Neusa Nunes de Jesus Lemes. Obrigada por me ensinarem os maiores valores dessa vida. Obrigada por me guiarem desde os primeiros passos e por me darem asas para ir atrás dos meus objetivos, sem deixar de ser porto seguro sempre quando precisei.*

## AGRADECIMENTO

1

2

3 A Deus, onipresente, onisciente e onipotente. Por Sua benevolência. A  
4 minha alma suspira e desfalece. Gratidão sempre.

5 Aos meus pais, Edivan de Souza Lemes e Neusa Nunes de Jesus  
6 Lemes, pelo amor, apoio incondicional, pelo exemplo, compreensão e por  
7 todas palavras de ânimo. À minha irmã Cristiane Nunes Lemes que sempre  
8 esteve ao meu lado e que foi presença nos momentos que tive que estar  
9 ausente e a meus sobrinhos. Aos meus tios Jaime e Elzi, pois sem eles nada  
10 seria possível e aos meus primos, Lucival, Luciene, Maria, Silvana e Jean.

11 Ao meu orientador Dr Luiz Antonio Soares Romeiros pela oportunidade,  
12 dedicação, ensinamentos, competência e por todo suporte envidado na minha  
13 formação humana e profissional.

14 Aos amigos do laboratório LDT pelo apoio na elaboração do trabalho,  
15 especialmente Andressa Oliveira pela dedicação incansável e por todo  
16 comprometimento com a ciência e pela contribuição na realização desse  
17 trabalho, além de sua amizade; e Luciana Nascente pela contribuição na  
18 elaboração do trabalho e também pela amizade. Sem vocês não seria  
19 possível.

20 À serendipidade. Aos amigos que a vida trouxe, aos que manteve e  
21 aos que o tempo por algum motivo distanciou, mas que durante essa longa  
22 jornada estiveram presentes de forma direta ou indireta e que contribuíram  
23 para continuidade de um sonho e a construção do que hoje se concretiza.  
24 Minha eterna gratidão!

25 À Universidade Católica de Brasília (UCB) pelo espaço físico, parte  
26 realizada no LADETER, e pelo incentivo no desenvolvimento da pesquisa e  
27 apoio ao docente.

1           Ao professor Dr Wanderley de Souza e às Dra Sara Silva e Emile  
2 Barrias do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, do Instituto de  
3 Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela  
4 contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

5           Ao professor Dr Antônio Alonso e Dra Laís Alonso e toda equipe do  
6 Laboratório de Biofísica, do Instituto de Física da Universidade Federal de  
7 Goiás pela contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

8           Ao professor Edilberto Rocha Silveira do Centro Nordestino de  
9 Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal  
10 do Ceará, pela concessão de espectros RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ .

11           À equipe do *Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry,*  
12 *National Hellenic Research Foundation* em nome da Dra Theodora  
13 Calogeropoulou pela receptividade e por todo ensinamento durante a visita  
14 técnica realizada ao laboratório, assim como por viabilizarem uma parte do  
15 trabalho. Aos membros da equipe de pesquisa Marina Roussaki, John  
16 Christopoulos, George Magoulas, Olga Kirkilessi, Eva Chaz, Andy e Iago pelo  
17 suporte durante o tempo que estive no laboratório.

18           À FAPDF pela concessão do benefício para visita técnica realizada ao  
19 *Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic*  
20 *Research Foundation* (Grécia).

21           Ao professor Dr Ângelo Henrique de Lira Machado por viabilizar uma  
22 das etapas da reação no laboratório de química orgânica do Instituto de  
23 Química da Universidade de Brasília.

24           Ao programa de pós graduação do Núcleo de Medicina Tropical e aos  
25 professores que compõem o programa pela pela excelência e cuidado com a  
26 formação dos profissionais.

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

## LISTA DE FIGURAS

1		
2		
3		
4	FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
5	FIGURA 2 - FORMAS APRESENTADAS PELO <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
6	FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS NITROHETEROCÍCLOS UTILIZADOS NO	
7	TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	28
8	FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DA <i>LEISHMANIA SP.</i>	32
9	FIGURA 5 - FORMAS APRESENTADAS PELO PARASITO DA <i>LEISHMANIA SP.</i>	33
10	FIGURA 6 - FÁRMACOS RECOMENDADOS PELA OMS PARA O TRATAMENTO DA	
11	LEISHMANIOSE	35
12	FIGURA 7 - EXEMPLO DE LIPÍDEOS ENCONTRADOS NAS MEMBRANAS	39
13	FIGURA 8 - COMPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS EM CÉLULAS AMASTIGOTAS E	
14	TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	40
15	FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE RAFTS NA MEMBRANA DE <i>L. (L.)</i>	
16	<i>amazonensis</i>	42
17	FIGURA 10 - ALQUILFOSFOLIPÍDEOS RELACIONADOS À COLINA	44
18	FIGURA 11 - LIPÍDEOS FENÓLICOS ENCONTRADOS NO LCC	48
19	FIGURA 12 - PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	51
20	FIGURA 13 - ESTRUTURA DE MARKUSH PARA ANÁLISE DE RMN	57
21	FIGURA 14 - CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO LDT10 (26) POR RMN DE <sup>1</sup> H E DE <sup>13</sup> C.	
22		58
23	FIGURA 15 - CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO LDT11 (27) POR RMN DE <sup>1</sup> H E DE <sup>13</sup> C	
24		60
25	FIGURA 16 - CARACTERIZAÇÃO DO NÚCLEO AROMÁTICO DO DERIVADO LDT77 (29)	
26	POR RMN DE <sup>1</sup> H	60
27	FIGURA 17 - DERIVADOS SINTETIZADOS A PARTIR DO CARDANOL SATURADO	
28	(LDT10, 26)	61
29	FIGURA 18 - ROTA SINTÉTICA PARA OBTENÇÃO DO DERIVADO LDT29 (30) E LDT381	
30	(31)	62
31	FIGURA 19 - ROTA SINTÉTICA PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ÁLCOOIS LDT72	
32	(34) E LDT74 (35)	65
33	FIGURA 20 - VIABILIDADE CELULAR DE EPIMASTIGOTAS TRATADOS COM 5,0 μM E	
34	20,0 μM DOS ANÁLOGOS LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS	69
35	FIGURA 21 - CURVA DOSE-RESPOSTA DO EFEITO DOS ANÁLOGOS LIPÍDEOS	
36	FOSFOCOLÍNICOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	70
37	FIGURA 22 - ESTRUTURA DO ANÁLOGO FOSFOLIPÍDEOS DA MILTEFOSINA (8),	
38	CICLOALQUILFOSFOLIPÍDEO TCAN26 (36).	71
39	FIGURA 23 - AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE	
40	TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	72
41	FIGURA 24 - AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES	
42	73	
43	FIGURA 25 - CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS LDT301 (21), LDT304 (24) E LDT305	
44	(25) EM CÉLULAS LLC-MK2 APÓS 72 H DE TRATAMENTO.	75
45	FIGURA 26 - HEPATOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM CÉLULAS DA LINHAGEM	
46	HEPG2	77
47	FIGURA 27 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE	
48	EPIMASTIGOTAS TRATADOS COM O COMPOSTO LDT304 (24)	79

1	FIGURA 28 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE	
2	EPIMASTIGOTAS TRATADOS COM O COMPOSTO LDT305 (25)	79
3	FIGURA 29 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE EPIMASTIGOTAS	
4	TRATADOS COM OS ANÁLOGOS LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS	80
5	FIGURA 30 - CITOTOXICIDADE DOS ANÁLOGOS FOSFOLIPÍDEOS FRENTE A	
6	PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i>	85
7	FIGURA 31 - IC <sub>50</sub> DOS COMPOSTOS LDT304 (24) E LDT305 (25) E MILTEFOSINA (8)	
8	SOBRE PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i> EM DIFERENTES	
9	CONCENTRAÇÕES DE PARASITO/ML.	89
10	FIGURA 32 - ESPECTRO DE EPR DO MARCADOR DE SPIN 5-DSA INCORPORADO NA	
11	MEMBRANA DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. (L) amazonensis</i> TRATADA COM	
12	MILTEFOSINA (8), SEM TRATAMENTO (CONTROLE) E COM 5 DERIVADOS	
13	FOSFOCOLINA.	90
14	FIGURA 33 - ESPECTRO DE RPE COM INCORPORAÇÃO DO SPIN LABEL 5-DSA NA	
15	MEMBRANA DE PROMASTIGOTAS TRATADAS COM DIFERENTES	
16	CONCENTRAÇÕES DOS ANALOGOS LDT304 (24) E LDT305 (25) E DA	
17	MILTEFOSINA (8).	92
18	FIGURA 34 - ESPECTRO DE EPR COM SPIN-LABEL 5-DSA NA MEMBRANA	
19	PLAMÁTICA DE ERITRÓCITOS TRATADOS COM OS LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS	
20	E A MILTEFOSINA (8)	98
21	FIGURA 35 - ANÁLOGOS APL ERUCILFOSFOCOLINA (37) E ERUFOSINA (38)	99
22	FIGURA 36 - AVALIAÇÃO DOS ANÁLOGOS LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS LDT304 (24),	
23	LDT305 (25) E MILTEFOSINA (8) SOBRE MACRÓFAGOS J774.A1 INFECTADOS	
24	COM AMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> GFP+.	100
25		

26

27

## LISTA DE TABELAS

1		
2		
3		
4	TABELA 1 - MASSA MOLAR, RENDIMENTO, ESTADO FÍSICO E RF DOS DERIVADOS	
5	FOSFOCOLÍNICOS	67
6	TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RMN DE <sup>1</sup> H, RMN DE <sup>13</sup> H,	
7	RMN DE <sup>31</sup> P E MS (ESI)	67
8	TABELA 3 - IC <sub>50</sub> DE EPIMASTIGOTAS APÓS TRATAMENTO COM ANÁLOGOS DE	
9	FOSFOLIPÍDEOS POR 24, 48 E 72 H.	70
10	TABELA 4 - ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA IN VITRO DE PROMASTIGOTAS DE <i>L.</i>	
11	<i>amazonensis</i> POR MEIO DO MÉTODO MTT NA CONCENTRAÇÃO DE 1 X 10 <sup>7</sup>	
12	PARASITOS/ML.	85
13	TABELA 5 - EFEITO HEMOLÍTICO DOS DERIVADOS ALQUILFOSFOCOLÍNICOS	94
14	TABELA 6 - PERFIL HEMOLÍTICO NO SANGUE TOTAL E EM ERITRÓCITOS	
15	RECONTITUÍDOS EM PBS PARA OS DERIVADOS LDT304 (24) E LDT305 (25) EM	
16	COMPARAÇÃO A MILTEFOSINA (8)	96
17	TABELA 7 - CITOTOXICIDADE (CC50) DOS ANÁLOGOS LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS	
18	LDT304 (24) E LDT305 (25) SOBRE MACRÓFAGOS J774.A1 NÃO INFECTADOS	101
19		

## ABREVIACOES

- 1
- 2
- 3  $\tau_c$  – Correlação rotacional
- 4 (L) – *Leishmania*
- 5 (V) – *Viannia*
- 6 5-DSA – cido 5-doxilesterico
- 7 AcOEt – Acetato de Etila
- 8 AFL – Alquilfosfolipídios
- 9 Akt – proteína quinase B - PKB
- 10 AMA – Amastigotas
- 11 BZN – benznidazol
- 12 CC<sub>50</sub> – Concentração Citotóxica em 50%
- 13 CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- 14 CDCl<sub>3</sub> – Clorofórmio Deuterado
- 15 CD<sub>3</sub>OD – Metanol Deuterado
- 16 DALY – *Disability Adjusted Life of Years* – Anos de Vida Perdidos Ajustados
- 17 por Incapacidade
- 18 DC – Doença de Chagas
- 19 DCM – Diclorometano
- 20 DMSO – Dimetilsulfóxido
- 21 DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas
- 22 DRG – *Diagnosis Related Groups*
- 23 EPC – etanolamina fosforilceramida
- 24 GC – Glicoconjugado
- 25 GPI – Glicosilfosfatadilinositol
- 26 GIPLs – Glicoinositolfosfolipídios
- 27 GP63 – Metaloprotease leishmanolisina
- 28 GSL – Glicoesfingolipídios
- 29 HC<sub>50</sub> – Concentração Hemolítica em 50%
- 30 HCl – cido Clorídrico

- 1 Hex – Hexano
- 2 HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida
- 3 IC<sub>50</sub> – Concentração Inibitória em 50 %
- 4 IL – Interleucina
- 5 INF $\gamma$  – Interferon Gama
- 6 IM – Intramuscular
- 7 IV – Intravenosa
- 8 IPC – Inositol fosforilceramida
- 9 LADETER - Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas
- 10 LDT – Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas
- 11 LC – Leishmaniose Cutânea
- 12 LCC – Líquido da Casca da Castanha do Caju
- 13 LIT – “*Liver infusion tryptose*”
- 14 LMC – Leishmaniose Mucocutânea
- 15 LPG – lipofosfoglicano
- 16 LV – Leishmaniose Visceral
- 17 MeCN – Acetonitrila
- 18 MeOH – Metanol
- 19 MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- 20 MTS/PMS - ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-  
21 2H-tetrazolium] metossulfato de fenazina)
- 22 MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol
- 23 NFX – Nifurtimox
- 24 NK – Natural *Killer*
- 25 MS – Espectro de Massas
- 26 MSNT – (1-(2-mesitilenosulfonil)-3-nitro-1*H*-1,2,4-triazola)
- 27 OMS – Organização Mundial de Saúde
- 28 OPAS – Organização Panamericana de Saúde
- 29 pH – Potencial Hidrogeniônico
- 30 PC – Fosfatidilcolina
- 31 PE – Fosfatidiletanolamina

- 1 PI – Fosfatidilinositol
- 2 PMS – Sulfato de metilfenazina
- 3 PRO – Promastigotas
- 4 FG – Fosfoglicanos
- 5 PS – Fosfatidilserina
- 6 PG – Fosfatidilglicerol
- 7 PPG – Proteofosfoglicanos
- 8 Py – Piridina
- 9 Rf – Fator de Retenção
- 10 Rh123 – Marcador rodamina
- 11 RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- 12 RPE – Ressonância Paramagnética de Elétrons
- 13 ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
- 14 SDS – Duodecil sulfato de sódio
- 15 SFB – Soro Fetal Bovino
- 16 SM – Esfingomielina
- 17 TEA – Trietilamina
- 18 TG – triglicerídeos
- 19 TGF- $\beta$  – Fator de Transformação do Crescimento - beta
- 20 *Th1* – T *help* 1 - Linfócito T auxiliar 1
- 21 THF – Tetrahydrofurano
- 22 TNF $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa
- 23 TMS – Tetrametilsilano
- 24 VO – Via Oral
- 25 UFG – Universidade Federal de Goiás
- 26 UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
- 27 UnB – Universidade de Brasília
- 28

# ÍNDICE

1		
2		
3		
4	1 INTRODUÇÃO	21
5	1.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS	21
6	DOENÇA DE CHAGAS	23
7	1.2.1 Forma de Transmissão e Ciclo de Vida do Parasito	23
8	1.2.2 Manifestações Clínicas da Infecção por <i>T. cruzi</i> – Doença de Chagas	26
9	1.2.3 Tratamento da Doença de Chagas	27
10	LEISHMANIOSE	30
11	1.3.1 Forma de Transmissão e Ciclo de Vida do Parasito	31
12	1.3.2 Manifestações Clínicas da Infecção por <i>Leishmania spp.</i> – Leishmanioses	33
13	1.3.3 Tratamento da Leishmanioses	34
14	BIOMEMBRANAS: FOSFOLIPÍDEOS E ESFINGOLIPÍDEOS	38
15	1.2.1 Membrana do <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
16	1.2.2 Membrana da <i>Leishmania</i>	42
17	ALQUILFOSFOLIPÍDEOS	44
18	1.6.1 Lipídeos fenólicos do Líquido da Casca da Castanha do Caju (LCC)	47
19	2 JUSTIFICATIVA	50
20	3 OBJETIVOS	54
21	3.1 Objetivo Geral	54
22	3.2 Objetivos Específicos	54
23	4 RESULTADO E DISCUSSÃO - Derivados fosfocolínicos planejados a partir do LCC	56
24	4.1 Resultados da SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS E	
25	FINAIS 56	
26	4.1.1 Purificação do cardanol saturado (26, LDT10)	58
27	4.1.2 Obtenção do ácido anacárdico saturado (27, LDT11)	59
28	4.1.3 Reação de <i>orto</i> -formilação e oxidação do aldeído (29, LDT77) para obtenção do	
29	ácido isoanacárdico (28, LDT380)	60
30	4.1.4 Derivados ésteres metílicos dos ácidos anacárdico (26, LDT11) e isoanacárdico	
31	saturados (28, LDT380)	62
32	4.1.5 Derivados álcoois obtidos a partir da mistura de cardanois e ácidos anacárdicos	
33	insaturados	63

1	4.1.6 Obtenção dos derivados lipídeos fosfolínicos	66
2	5 RESULTADO E DISCUSSÃO - ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DOS ANÁLOGOS	
3	FOSFOLIPÍDEOS	69
4	5.1 Triagem dos análogos de lipídeos fosfolínicos em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	69
5	5.2 Efeitos dos análogos fosfolipídeos sobre a proliferação de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	70
6	5.3 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	72
7	5.4 Avaliação de atividades de compostos análogos lipídeos fosfolínicos em	
8	amastigotas de <i>T. cruzi</i>	73
9	5.5 Avaliação da citotoxicidade dos análogos fosfolipídeos em células LLC-MK <sub>2</sub>	75
10	5.6 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células da linhagem HEPG2	76
11	5.7 Efeitos dos análogos de fosfolipídeos na morfologia de epimastigotas por	
12	microscopia eletrônica de varredura	77
13	5.8 Análise do efeito ultraestrutural em epimastigotas tratados com os lipídeos	
14	fosfolínicos	80
15	6 RESULTADO E DISCUSSÃO - AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES DE COMPOSTOS ANÁLOGOS DE	
16	FOSFOLIPÍDEOS EM <i>Leishmania amazonensis</i>	84
17	6.1 Triagem <i>in vitro</i> e tratamento com os análogos fosfolipídeos frente a promastigotas	
18	de <i>Leishmania amazonensis</i> pelo ensaio MTS/PMS	84
19	6.2 Triagem <i>in vitro</i> e tratamento com os análogos fosfolipídeos frente a promastigotas	
20	de <i>Leishmania amazonensis</i> pelo ensaio MTT	85
21	6.3 Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> de promastigotas em diferentes concentrações	
22	de células do parasito/mL	88
23	6.4 Análise da fluidez da membrana por ressonância paramagnética de elétrons (RPE)	90
24	6.5 Efeito da concentração da miltefosina ( <b>8</b> ) e dos análogos LDT304 ( <b>24</b> ) e LDT305 ( <b>25</b> )	
25	sobre a dinâmica molecular da membrana de promastigotas	92
26	6.6 Avaliação da atividade hemolítica	94
27	6.7 Aumento da dinâmica molecular da membrana de eritrócitos tratados com	
28	miltefosina ( <b>8</b> ) e os análogos lipídeos fosfolínicos <b>24</b> e <b>25</b> .	97
29	6.8 Avaliação dos derivados lipídeos fosfolínicos frente a amastigotas intracelulares de	
30	<i>Leishmania amazonensis</i> e citotoxicidade sobre macrófagos.	100
31	7 CONCLUSÃO	105
32	8 PARTE EXPERIMENTAL	108
33	8.1 GENERALIDADES, MATERIAIS E MÉTODOS	108
34	8.2 METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	110
35	8.2.1 Obtenção do derivado 2-hidróxi-4-pentadecilbenzaldeído (LDT77, 29)	111
36	8.2.2 Obtenção do derivado ácido 2-hidróxi-4-pentadecilbenzóico (LDT380, 28)	112

1	8.2.3 Obtenção do LCC natural	113
2	8.2.4 Obtenção da mistura de ácidos Anacárdicos (LDT11i, 17) a partir do LCC natural	
3		114
4	8.2.5 Obtenção da mistura de cardanois (LDT10i, 18)	115
5	8.2.6 Obtenção do derivado ácido 2-hidróxi-6-pentadecilbenzóico (LDT11, 27)	115
6	8.2.7 Obtenção dos intermediários 2-hidróxi-6-pentadecilbenzoato de metila (LDT29,	
7	30) e 2-hidróxi-4-pentadecilbenzoato de metila (LDT381, 31)	116
8	8.2.8 Obtenção da mistura de 3-metóxicardanois (LDT27i, 32) e de 2-pentadecil-6-	
9	metóxifenilbenzoato de metila (LDT28i, 33)	118
10	8.2.9 Obtenção dos derivados álcoois 8-(3-metóxifenil)octan-1-ol (LDT72, 34) e 2-(8-	
11	hidróxiocetil)-6-fenilbenzoato de metila (LDT74, 35)	119
12	8-(3-Metóxifenil)octan-1-ol (LDT72, <b>34</b> )	120
13	8.2.10 Obtenção dos lipídeos fosfolínicos a partir dos Intermediários fenólicos e	
14	álcoois	122
15	2-(Carbometóxi)-5-pentadecilfenil(2-(trimetilamonio)etilfosfato (LDT302, <b>22</b> )	124
16	8.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO FRENTE A <i>Trypanosoma cruzi</i> ,	
17	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM EPIMASTIGOTAS E	
18	CITOTOXICIDADE DOS ANÁLOGOS LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS	127
19	8.3.1 Local do estudo	128
20	8.3.2 Cepas do parasito e células utilizadas	128
21	8.3.3 Composto teste	129
22	8.3.4 Ensaios de viabilidade para triagem inicial dos compostos em epimastigotas de <i>T.</i>	
23	<i>cruzi</i>	129
24	8.3.5 Avaliação da atividade antiproliferativa dos compostos no estágio epimastigota	
25	de <i>T. cruzi</i>	130
26	8.3.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática de tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	
27	tratados com os análogos fosfolipídeos	130
28	8.3.7 Avaliação da proliferação de amastigota de <i>T. cruzi</i> tratados com os análogos	
29	fosfolipídeos	131
30	8.3.8 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células da linhagem LLC-MK <sub>2</sub>	131
31	8.3.9 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células da linhagem HEPG2	132
32	8.3.10 Avaliação de alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de	
33	transmissão (MET)	133
34	8.3.11 Avaliação de alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura	
35	(MEV)	134
36	8.3.12 Análises estatísticas	134

1	8.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> FRENTE AO <i>Leishmania amazonensis</i> ,	
2	CITOTOXICIDADE, PERFIL HEMOLÍTICO E ANÁLISE DE FLUIDEZ DE MEMBRANA POR RPE	
3	(RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA) DOS ANÁLOGOS LIPÍDEOS	
4	FOSFOCOLÍNICOS	135
5	8.4.1 Local do estudo	135
6	8.4.2 Cepas do parasito e células utilizadas	135
7	8.4.3 Ensaio de citotoxicidade sobre promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	
8	utilizando método MTS/PMS	136
9	8.4.4 Ensaio de atividade antiproliferativa in vitro de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	
10		137
11	8.4.5 Ensaio <i>in vitro</i> da citotoxicidade em macrófagos	138
12	8.4.6 Citotoxicidade da miltefosina e dos analogos frente a amastigotas intracelulares	
13		139
14	8.4.7 Análise de fluidez da membrana de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	
15	por RPE (Ressonância Paramagnética Eletrônica)	140
16	8.4.8 Ensaio de hemólise	142
17	8.4.9 Análise estatística	143
18	9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
19		
20		
21		
22		

## RESUMO

1

2

3 As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) consistem em um grupo de  
4 doenças transmissíveis e que afetam principalmente regiões de pobreza, por  
5 exemplo a Leishmaniose e a doença de Chagas (DC). A descoberta de novos  
6 fármacos e desenvolvimento de novos tratamentos para DTNs constitui um  
7 desafio para o controle dessas doenças uma vez que os medicamentos  
8 disponíveis para o tratamento apresentam limitações associadas à toxicidade,  
9 perfil de efeitos adversos, longa duração do tratamento, resistência do  
10 parasito, entre outros. Novos fármacos, eficazes, seguros, acessíveis são  
11 necessários para o tratamento das DTNs, incluindo a DC e leishmaniose.  
12 Alquilfosfolipídeos (AFL) têm demonstrado atividade contra os  
13 tripanossomatídeos que ocasionam essas doenças, entre eles a miltefosina,  
14 sendo um protótipo interessante. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi  
15 sintetizar novos análogos de lipídeos fosfolínicos a partir ácido anacárdico  
16 e do cardanol, explorando a contribuição lipofílica desses compostos, assim  
17 como e avaliar a atividade frente ao *Trypanosoma cruzi* e a *Leishmania*  
18 *amazonensis*. As metodologias sintéticas utilizadas permitiram a obtenção de  
19 5 novos lipídeos fosfolínicos, LDT301 (**21**), LDT302 (**22**), LDT303 (**23**),  
20 LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**). Os derivados **24** e **25** se destacaram na série,  
21 com melhor perfil de atividade, apresentando atividade antiproliferativa,  
22 redução da viabilidade celular, alteração da permeabilidade da membrana e  
23 alterações morfológicas e ultraestruturais sobre formas evolutivas do *T. cruzi*.  
24 Os derivados também demonstraram atividade antiproliferativa sobre *L.*  
25 *amazonensis*, com redução da proliferação e viabilidade celular de  
26 promastigotas e amastigotas, assim como capacidade de perturbar a  
27 membrana de promastigotas medido por meio de ressonância paramagnética  
28 de elétrons. Os compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) não demonstraram  
29 toxicidade celular frente as linhagens e nas concentrações testadas, com bom  
30 índice de seletividade sobre macrófagos e baixo potencial hemolítico.

31

32 Palavra-chave: Alquilfosfolipídeos, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*  
33 *amazonensis*, Líquido da Casca da Castanha do Caju (LCC), Ácido  
34 anacárdico, Cardanol

35

1

2

## ABSTRAT

3

4 Neglected tropical diseases (NTDs) are a group of diseases that affect poor  
5 regions e.g. Leishmaniasis and Chagas' disease (CD). The discovery of new  
6 drugs and the development of new treatments for NTDs is a challenge for the  
7 control of these diseases considered that drugs available for treatment have  
8 limitations associated with toxicity, adverse effect, long duration of treatment  
9 and parasite resistance. New drugs, effective, safe are needed for the  
10 treatment of NTDs, like CD and leishmaniasis. Alkylphospholipids (APL) have  
11 shown activity against trypanosomatids that cause these diseases, including  
12 miltefosine, being an interesting prototype. Thus, the goal of this work was to  
13 synthesize new analogs of phosphocolinic lipids from anacardic acid and  
14 cardanol, exploring the lipophilic contribution of these compounds, as well as  
15 and evaluating the activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*  
16 *amazonensis*. The synthetic methodologies used made it possible to obtain 5  
17 new phosphocolinic lipids, LDT301 (**21**), LDT302 (**22**), LDT303 (**23**), LDT304  
18 (**24**) and LDT305 (**25**). Derivatives **24** and **25** stood out in the series, with a  
19 better activity profile, presenting antiproliferative activity, reduction of cell  
20 viability, alteration of membrane permeability and morphological and  
21 ultrastructural changes on evolutionary forms of *T. cruzi*. Derivatives also  
22 demonstrated antiproliferative activity on *L. amazonensis*, with reduced  
23 proliferation and cell viability of promastigotes and amastigotes, as well as the  
24 ability to disturb the promastigote membrane measured by electron  
25 paramagnetic resonance. The compounds LDT304 (**24**) and LDT305 (**25**) did  
26 not demonstrate cellular toxicity in relation to the strains and in the tested  
27 concentrations, with a good selectivity index over macrophages and low  
28 hemolytic potential.

29

30 Keyword: Alkylphospholipids, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*,  
31 Cashew Nut Shell Liquid (CNSL), Anacardic acid, Cardanol

32

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

---

---

# CAPÍTULO 1

---

---

---

---

***Introdução***

---

---

# 1 INTRODUÇÃO

2

3

## 4 1.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

5

6

7       As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) consistem em um grupo  
8 de doenças transmissíveis e prevalentes em regiões tropicais e subtropicais,  
9 principalmente em países com índices significativos de pobreza, sem  
10 saneamento básico, geograficamente propícios ao contato com vetores e  
11 outros hospedeiros. As DTNs afetam globalmente mais de um bilhão de  
12 pessoas com impactos significativos sobre a saúde pública e a economia [1].  
13 O número limitado de medicamentos disponíveis, a resistência aos fármacos,  
14 os efeitos adversos graves e os custos, além do perfil de toxicidade,  
15 protocolos de administração dos medicamentos, longa duração de  
16 tratamentos, entre outros, consistem em algumas das limitações no controle  
17 das DTNs [2].

18       A Organização Mundial de Saúde (OMS) lista 17 DTNs, entre as quais  
19 podemos destacar dois grupos de doenças causadas por protozoários  
20 cinetoplastídeos – a doença de Chagas (DC) e as Leishmanioses – que  
21 apresentam como agentes etiológicos os tripanosomatídeos do gênero  
22 *Trypanosoma* e *Leishmania*, respectivamente [1]. Embora esses  
23 tripanosomatídeos pertençam à mesma família, apresentem genes ortólogos  
24 e alguns processos metabólicos semelhantes, eles exibem desenvolvimentos  
25 distintos que refletem em diferentes ciclos de vida, forma de transmissão,  
26 evolução nos hospedeiros, patogênese e virulência, promovendo diferentes  
27 manifestações clínicas e evolução das doenças que ocasionam. Como  
28 característica comum, a doença de Chagas e a Leishmaniose apresentam  
29 impacto social, econômico e sobre a saúde pública, estando associadas com

1 aumento dos Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade (DALY -  
2 *Disability Adjusted Life of Years*) [3].

3 Como estratégias gerais de prioridade para o controle das duas DNTs,  
4 a OMS cita a melhoria no diagnóstico e caracterização dessas doenças;  
5 controle dos vetores em áreas endêmicas; desenvolvimento de vacinas para  
6 prevenir e bloquear a transmissão; identificação de casos assintomáticos; e  
7 melhoria na terapêutica e prevenção de resistência pelo desenvolvimento de  
8 novos agentes terapêuticos, combinação de agentes anti-cinetoplastídeos,  
9 reposicionamento de fármacos aprovados para outras doenças e que  
10 apresentem eficácia frente a esses tripanosomatídeos [1, 3].

11 O desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de DTNs  
12 enfrenta vários desafios, um deles é o de não ser um mercado  
13 financeiramente atraente devido à perspectiva de baixos retornos financeiros  
14 contrastado pelo longo período de investimento e pesquisa para introdução  
15 de um novo medicamento. Porém, iniciativas da OMS têm tentado priorizar  
16 estudos na área das DNTs designando grupos de referência de doenças  
17 (*Diagnosis Related Groups* - DRGs). Desta forma, a doença de Chagas e a  
18 Leishmaniose foram enquadradas no grupo 3 (DRG3) e consideradas como  
19 área prioritária [3]. Mesmo diante de esforços para o desenvolvimento de  
20 novas estratégias terapêuticas frente aos tripanosomatídeos que ocasionam  
21 essas duas doenças, os compostos utilizados atualmente na prática clínica  
22 foram introduzidos há décadas e apresentam diversas limitações. Dessa  
23 forma, a identificação de novos alvos e desenvolvimento de novos fármacos  
24 para o tratamento dessas doenças torna-se importante [4]. Tendo em mente  
25 que estas doenças atingem majoritariamente países subdesenvolvidos e em  
26 desenvolvimento, a descoberta de novos agentes terapêuticos de baixo custo,  
27 mais que uma necessidade, é a possibilidade para enfrentamento destes  
28 desafios em saúde pública.

29

30

## 1 1.2 DOENÇA DE CHAGAS

2

3

4 A DC apresenta principal distribuição em áreas consideradas  
5 endêmicas na América Latina. Nas últimas décadas, entretanto, focos têm  
6 sido identificados na América do Norte e em países Europeus associados à  
7 mobilidade da população entre a América Latina e o resto do mundo. Estima-  
8 se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* em  
9 todo o mundo [5-8].

10 No ano de 2010, o número total de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* foi  
11 estimado em 5.742. Estes casos estavam distribuídos em 21 países da  
12 América Latina e destes 1.157 (20 %) registrados no Brasil. No ano de 2015  
13 a estimativa mundial era de que 80 % das pessoas atingidas pela DC estavam  
14 sem acesso ao diagnóstico ou tratamento, havendo ainda dificuldade de  
15 estimar a real prevalência da DC. Isso contribui para o elevado impacto da  
16 morbimortalidade e custo social da doença, sendo um dos grandes desafios  
17 de saúde pública na América Latina. Mesmo diante de melhorias alcançadas  
18 com o controle de vetores, controle de qualidade de transfusões e  
19 transplantes, medidas sanitárias para minimizar a transmissão oral e vetorial,  
20 a doença ainda requer prioridade e atenção [9].

21

### 22 1.2.1 Forma de Transmissão e Ciclo de Vida do Parasito

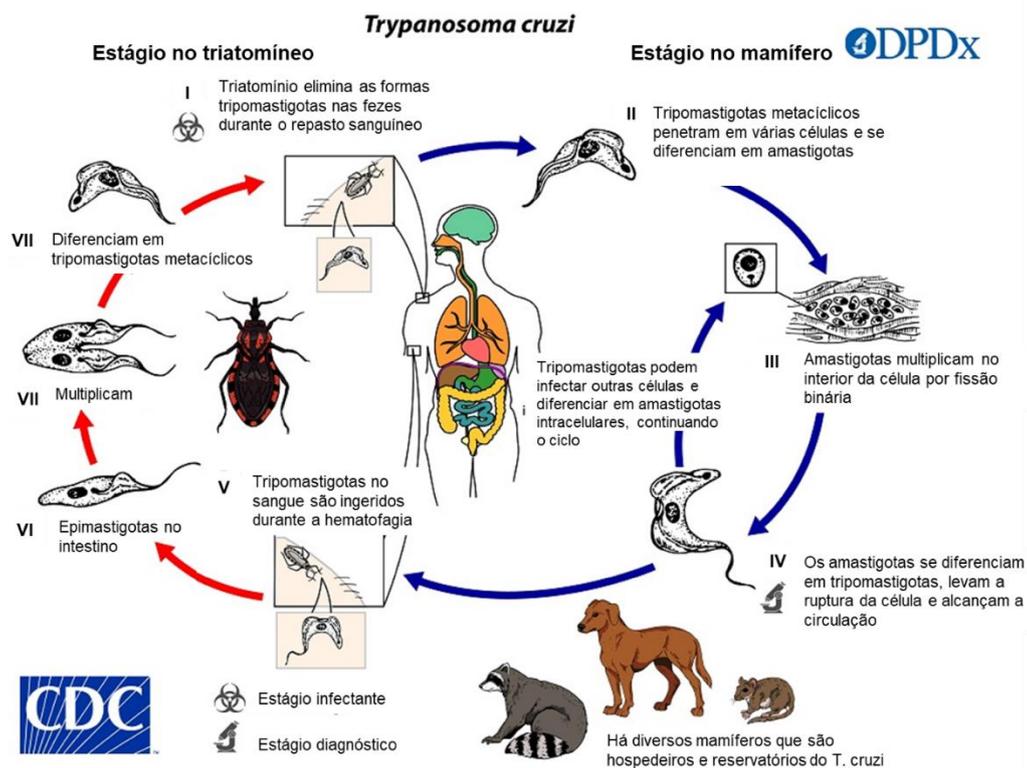
23

24 A DC, também denominada tripanossomíase americana, é ocasionada  
25 pelo protozoário *T. cruzi*. Atualmente são conhecidas seis linhagens distintas  
26 desse parasito, classificadas como *Tc* de I a VI (*TcI-VI*). As linhagens variam  
27 de acordo com a distribuição geográfica, especificidade no hospedeiro e  
28 patogenicidade. Na América Latina a transmissão vetorial ocorre por meio

1 dos triatomíneos hematófagos (Triatominae – Hemiptera: Reduviidae),  
 2 conhecidos popularmente como barbeiro. O *T. cruzi* apresenta ciclo  
 3 heteroxênico com uma fase no hospedeiro mamífero e outra no vetor (Figura  
 4 1).

5

6 **Figura 1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***



7

8 Fonte: Modificado de [8]

9

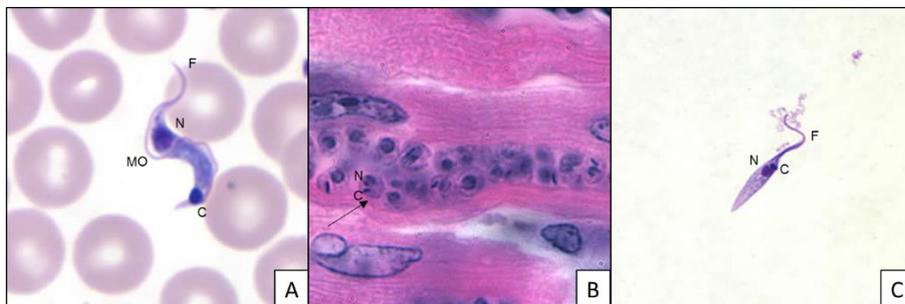
10 Durante o repasto sanguíneo o vetor infectado defeca eliminando a  
 11 forma infectante tripomastigota metacíclica nas fezes e urina (I). O prurido  
 12 ocasionado na região da picada favorece o contato das formas infectantes  
 13 com a porta de entrada gerada pela picada, na qual o parasito é inoculado. O  
 14 parasito pode ser ainda introduzido no organismo pelo contato com mucosa  
 15 dos olhos e boca. Os tripomastigotas entram em contato com o organismo do  
 16 hospedeiro, penetram nas células e se diferenciam em amastigotas (II). Por  
 17 sua vez, os amastigotas intracelulares se multiplicam por fissão binária (III),  
 18 diferenciam em tripomastigotas levando à ruptura da célula hospedeira (IV),

1 sendo liberados para circulação sanguínea por meio da qual podem infectar  
2 novas células e iniciar nova replicação [5, 6].

3 A continuidade do ciclo natural ocorre quando o triatomíneo, durante o  
4 repasto sanguíneo, se infecta com a forma tripomastigota (V). No triatomíneo o  
5 tripomastigota se diferencia em epimastigota (VI), que replica por fissão  
6 binária no intestino do inseto (VII), e no intestino posterior se diferencia em  
7 tripomastigota metacíclico (VIII), sendo excretado nas fezes durante o repasto  
8 sanguíneo (I), reiniciando o ciclo [5, 6].

9 No hospedeiro mamífero, o *T. cruzi* pode ser encontrado em duas  
10 formas: tripomastigota e amastigota (Figura 2). O tripomastigota – forma  
11 alongada que apresenta flagelo estendido ao longo da borda externa da  
12 célula, formando uma membrana ondulante – apresenta o cinetoplasto na  
13 região terminal e o núcleo localizado mais centralmente, sendo considerada a  
14 forma infectante, podendo ser encontrada no sangue dependendo da  
15 parasitemia. Já o amastigota é uma forma arredondada, intracelular, não  
16 apresenta flagelo e pode ser encontrada no interior de várias células,  
17 preferencialmente células de origem mesenquimal. A forma epimastigota,  
18 também alongada com presença de flagelo e cinetoplasto, é localizada  
19 anterior ao núcleo. Esta forma é encontrada no intestino do vetor (Figura 2)  
20 [6, 7].

21 **Figura 2 - Formas apresentadas pelo *Trypanosoma cruzi***



22

23 Formas apresentadas pelo *T. cruzi*. [A] Forma tripomastigota no sangue – corada com Giemsa. [B]  
24 Forma amastigota em tecido cardíaco corado com hematoxilina e eosina. [C] Forma epimastigota obtida  
25 de cultura corado com Giemsa. F – flagelo; N – núcleo; MO – membrana ondulante; C – cinetoplasto  
26 Fonte: Modificado de [8]

1           Outras formas de transmissão também apresentam relevância  
2 epidemiológica para doença de Chagas. Neste contexto, o *T. cruzi* também  
3 pode ser transmitido por via não vetorial como pelo consumo de alimentos  
4 contaminados, transfusão sanguínea ou transplante de órgãos, transmissão  
5 transplacentária ou vertical e por acidente laboratorial [5].

6

### 7   **1.2.2 Manifestações Clínicas da Infecção por *T. cruzi* – Doença de Chagas**

8

9           A DC apresenta duas fases: aguda e crônica. A fase aguda ocorre após  
10 a infecção pelo parasito e pode durar cerca de 2 meses (2 a 8 semanas). Na  
11 maioria dos casos os sintomas nesta fase são ausentes ou leves e  
12 inespecíficos, dificultando o diagnóstico. Os primeiros sinais visíveis podem  
13 ser lesão na pele (Chagoma – inflamação na região de inoculação) ou edema  
14 da palpebra de um olho só (sinal de Romana), que ocorrem em menos de 50  
15 % dos casos. Durante a fase aguda há alta parasitemia e outros sintomas  
16 podem aparecer incluindo febre, cefaleia, edema nos linfonodos, palidez, dor  
17 muscular, dificuldade de respirar, edema e dor abdominal ou torácica. A  
18 parasitemia reduz substancialmente com 90 dias de infecção. Em caso de  
19 transmissão oral com alimento ou bebida contaminada, a fase aguda parece  
20 ser mais severa com alta mortalidade quando comparada à transmissão  
21 vetorial [5-7].

22           A fase aguda tende a resolver de forma espontânea e os pacientes  
23 infectados não tratados evoluem para forma crônica. A maioria dos indivíduos  
24 nunca desenvolvem sintomas ou envolvimento visceral na forma crônica,  
25 sendo considerada como forma indeterminada. Adicionalmente, apresentam  
26 sorologia positiva para *T. cruzi*, mas sem manifestação clínica da doença  
27 envolvendo alterações cardíacas e digestivas. Porém, aproximadamente 30-  
28 40 % dos infectados crônicos podem apresentar alterações entre 10 a 30 anos  
29 após a infecção, principalmente cardiomiopatias, megaesôfago e megacólon,  
30 sendo o envolvimento cardíaco o mais frequente, caracterizando a fase  
31 crônica determinada ou sintomática [6].

1           Considerando a patogênese da DC na fase aguda, a resposta  
2 observada no hospedeiro é secundária à presença do parasito e à resposta  
3 inflamatória. Neste sentido, o controle eficiente da resposta do sistema imune  
4 ao parasito tem sido relacionado à intensa resposta inflamatória com ativação  
5 de anticorpos e da resposta inata (mediada por células Natural *Killer* – NK e  
6 Macrófagos), por meio da ativação de linfócito T auxiliar 1 (*Th1* – *T help 1*) por  
7 citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) e  
8 interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Por sua vez, a patogênese da fase crônica não é  
9 completamente entendida. Durante a fase crônica a inflamação tem sido a  
10 principal contribuição para progressão da doença e dano tecidual. Há hipótese  
11 do envolvimento de autoantígenos com reação cruzada a antígenos de *T.*  
12 *cruzi* com desenvolvimento de autoanticorpos e reação autoimune; porém  
13 essa relação ainda não é totalmente elucidada. Há também o envolvimento  
14 de fatores relacionados à resposta do hospedeiro, persistência da infecção e  
15 virulência do parasito [6].

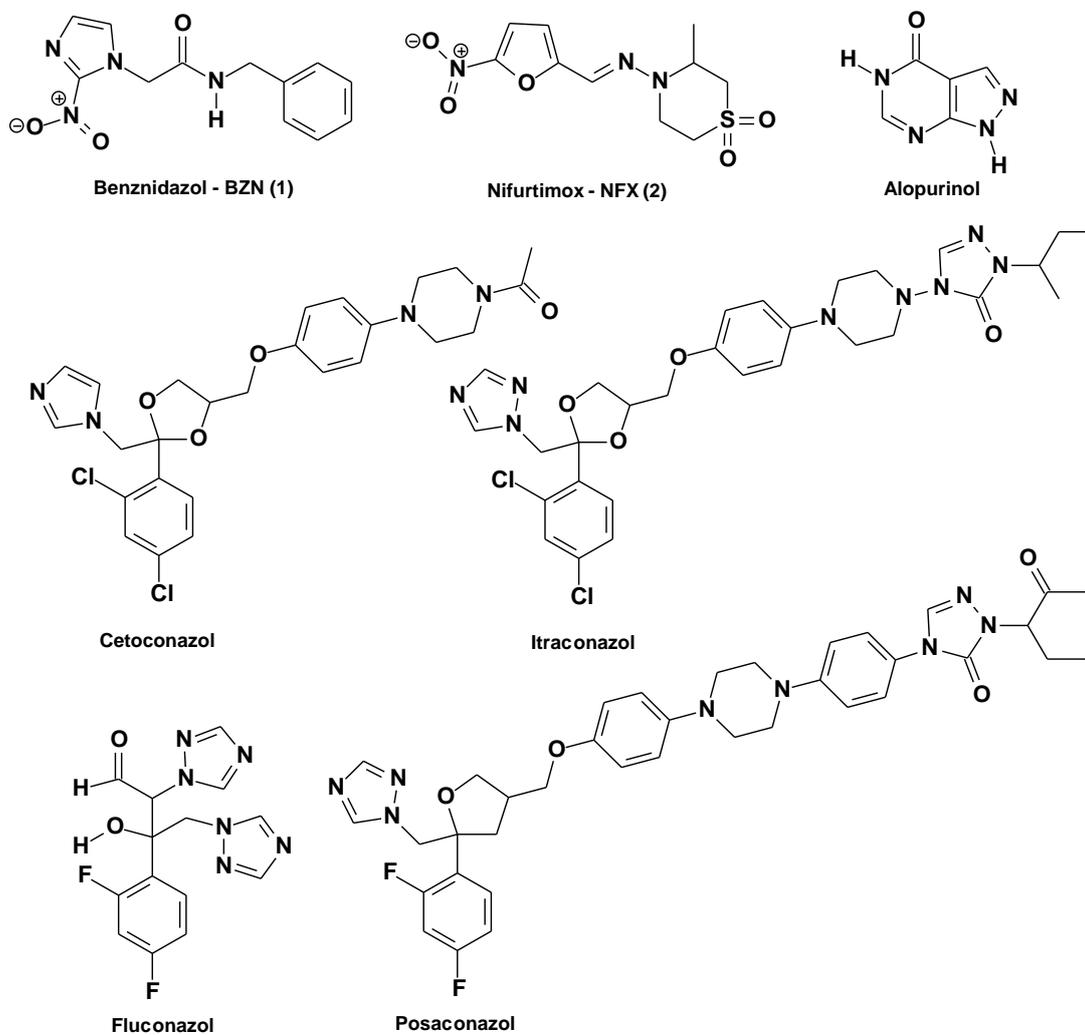
16

### 17 **1.2.3 Tratamento da Doença de Chagas**

18

19           De acordo com a OMS (2012) [3], o principal objetivo do tratamento  
20 específico contra infecção pelo *T. cruzi* é eliminar o parasito na fase aguda, e  
21 assim impedir a cadeia de transmissão e reduzir a probabilidade do  
22 desenvolvimento da doença de Chagas crônica sintomática. Apenas dois  
23 fármacos antitripanosoma, pertencentes à classe dos nitroheterocíclis, estão  
24 disponíveis para tratamento específico: o benznidazol (**1**, BZN – agente  
25 derivado nitroimidazólico introduzido em 1970 - Roche) e o nifurtimox (**2**, NFX  
26 – composto nitrofurânico introduzido em 1960 - Bayer) (Figura **3**). São a base  
27 para o tratamento da doença de Chagas há mais de 50 anos [5, 6, 9, 10].

- 1 **Figura 3** - Estrutura química dos nitroheterocícos utilizados no tratamento da  
 2 doença de Chagas BZN e NFX e outros fármacos utilizados como supressores  
 3 da parasitemia



- 4
- 5 No Brasil o medicamento disponível para o tratamento antiparasitário  
 6 da doença de Chagas é o BZN (1), sendo atualmente produzido por  
 7 laboratório brasileiro e distribuído por solicitação junto ao Ministério da Saúde,  
 8 não havendo disponibilidade no mercado farmacêutico [9]. O mecanismo de  
 9 ação do benznidazol envolve diferentes alvos e alterações celulares, entre  
 10 eles: (i) formação de radicais livres; (ii) formação de metabólitos eletrofílicos;  
 11 e (iii) indução de dano mitocondrial [7].

1           Em geral, o BZN (1) é bem tolerado e apresenta baixo perfil de efeitos  
2 adversos em crianças quando comparado a adultos. Entre os efeitos adversos  
3 está a dermatopatia por hipersensibilidade como efeito mais frequente. Em  
4 casos leves ou moderados de dermatopatia é preconizado a continuidade do  
5 tratamento e avalia-se a introdução de corticoides para alívio do quadro;  
6 entretanto em casos graves é necessário a suspensão. O uso de BNZ (1)  
7 pode ocasionar polineuropatia periférica, dose-dependente, com  
8 aparecimento mais comum ao final do tratamento, devendo-se nesse caso  
9 suspender a medicação. Adicionalmente, BZN (1) pode ocasionar depressão  
10 da medula óssea, mas que apresenta recuperação sem sequelas após  
11 suspensão do medicamento, sendo nesse caso indicada a interrupção do uso.  
12 A intolerância digestiva é rara, mas pode ser controlada com medicamentos  
13 para gastrite e úlcera. O acometimento hepático, embora possa ser grave, é  
14 raro. Em casos de intolerância ao BZN (1), o NFX (2) entra como segunda  
15 opção terapêutica. Ambos são genotóxicos e, portanto, contraindicados na  
16 gestação, principalmente no primeiro trimestre [9-11]. O NFX não é  
17 disponibilizado no Brasil, sendo fornecido em situações especiais via  
18 solicitação à Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e OMS [3, 9, 11].

19           O NFX (2) apresenta efeitos adversos e toxicidade semelhantes aos  
20 descritos para o BZN (1), com menor tolerância digestiva, podendo ocasionar  
21 também anorexia, perda de peso e distúrbios psíquicos [9]. O mecanismo de  
22 ação do NFX envolve: (i) indução de estresse oxidativo; (ii) ativação mediada  
23 por nitroreduases eucarióticas com formação de espécies radicalares; (iii)  
24 inibição da atividade de desidrogenases do parasito; e (iv) alteração do  
25 potencial de membrana mitocondrial [7]. Em caso de falha terapêutica ao BZN  
26 (1), o NFX (2) pode ser utilizado, porém observa-se resistência cruzada entre  
27 os dois fármacos por apresentarem mecanismos bem semelhantes. Os dois  
28 fármacos são disponibilizados em formulações para uso por via oral e  
29 apresentam tratamento prolongado (período maior que 60 dias), podendo os  
30 efeitos supracitados levar à descontinuidade do tratamento, cuja taxa de  
31 descontinuação reconhecida de 15 % a 20 % [3, 9, 11].

1 O tratamento com fármacos específicos antitripanosomal é  
2 recomendado para a fase aguda, DC congênita, reativação da infecção, e na  
3 doença crônica em menores de 18 anos. São considerados efetivos em  
4 recém-nascidos (99 % de cura) e fase aguda (80 % de redução da  
5 parasitemia). Deve-se avaliar as particularidades e condições clínicas de cada  
6 caso. O tratamento antiparasitário na fase crônica da doença e com forma  
7 cardíaca avançada não tem se mostrado efetivo, podendo até mesmo ser  
8 prejudicial em algumas circunstâncias. Um dos motivos é que a fase crônica  
9 já cursa com parasitemia negativa, sendo que a ausência do parasito não será  
10 indicativo de cura [3, 6, 9].

11 Quando há impossibilidade do uso do BZN (1) e NFX (2), embora não  
12 haja evidências clínicas de comprovada eficácia terapêutica (nível de  
13 evidência baixo), outros medicamentos, por exemplo o alopurinol e  
14 antifúngicos azólicos (inibidores da síntese de ergosterol) como o  
15 cetoconazol, itraconazol, fluconazol e posaconazol, podem ser usados como  
16 supressores de parasitemia por *T. cruzi* [6, 9]. Esta limitação de opções  
17 terapêuticas também evidencia o caráter de negligência da doença de  
18 Chagas, havendo necessidade da busca por novos tratamentos.

19

### 20 1.3 LEISHMANIOSE

21

22 As leishmanioses são parasitoses resultantes da infecção por  
23 protozoários do gênero *Leishmania*. Apresentam amplo espectro de  
24 manifestações clínicas que vão depender da espécie de *Leishmania*  
25 envolvida, da resposta imune do hospedeiro, podendo ser assintomática ou  
26 sintomática, localizada ou difusa. As três principais manifestações clínicas  
27 incluem duas formas que afetam a pele e mucosas (tegumentar), como a  
28 leishmaniose cutânea (LC), forma mais comum, e a leishmaniose  
29 mucocutânea (LMC); e a leishmaniose visceral (LV), forma mais grave da  
30 doença, também conhecida como calazar [12].

1 Endêmicas em cinco continentes, 98 países e territórios, as  
2 leishmanioses contabilizam 1,3 milhão de novos casos anuais e mais de 350  
3 milhões de pessoas em risco de transmissão. Estima-se que ocorra 0,7-1,2  
4 milhão de casos de LC por ano, contribuindo as Américas, litoral Mediterrâneo  
5 e Ásia Ocidental com 30 % dos casos, sendo 75 % desses concentrados no  
6 Brasil, Síria e Afeganistão. Com relação à LMC, há cerca de 35.000 casos por  
7 ano, majoritários na América do Sul, principalmente no Brasil, Peru e Bolívia.  
8 O Brasil apresenta o maior número de casos de LC e LMC na América do Sul.  
9 O número de casos de LV no mundo é estimado para 0,2-0,4 milhão de  
10 pessoas por ano com concentração de 90 % no Brasil, Bangladesh, Etiópia,  
11 Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão, e letalidade em torno de 10-20 %,  
12 especialmente em áreas de maior acometimento, constituindo sério problema  
13 de saúde pública. A LV canina também exerce impacto na distribuição  
14 epidemiológica da doença representando importante reservatório [12-15].

15

### 16 **1.3.1 Forma de Transmissão e Ciclo de Vida do Parasito**

17

18 São descritas 22 espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem com  
19 diferente distribuição no mundo. Nas Américas, 15 espécies, agrupadas no  
20 subgênero *Leishmania* (*L*) e *Viannia* (*V*), estão associadas ao  
21 desenvolvimento de LC e LMC. Sete espécies patogênicas foram identificadas  
22 no Brasil, onde as três principais são *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*  
23 e *L. (V.) guyanensis*. Nas Américas a *Leishmania infantum* (sinonímia *L.*  
24 *chagasi*) é a espécie envolvida na LV [15-17].

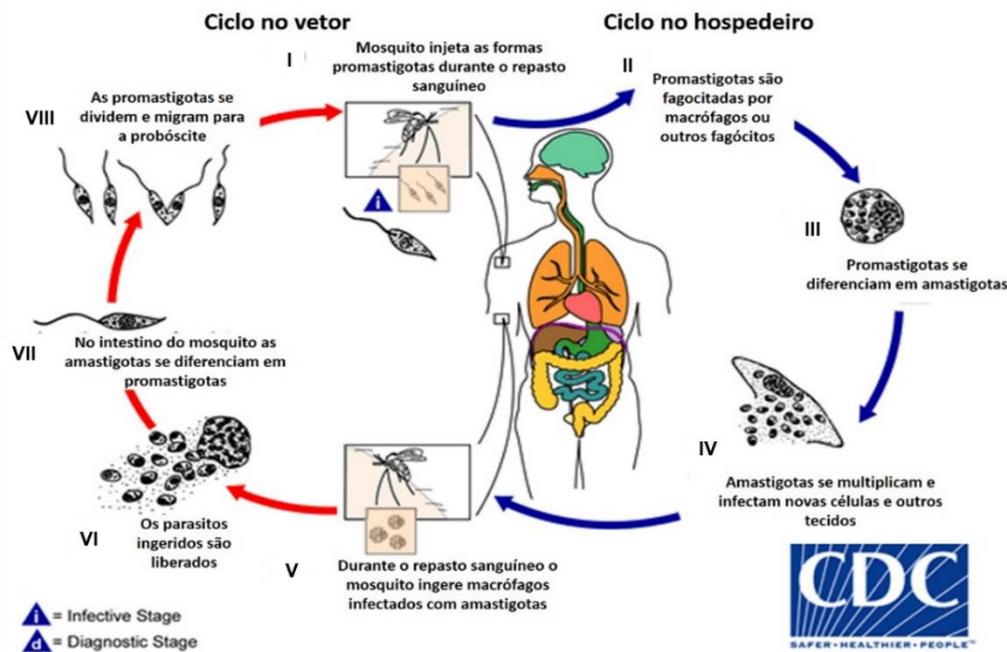
25 O ciclo de vida da *Leishmania* é heteroxênico com transmissão entre o  
26 mosquito vetor e reservatórios mamíferos (Figura 4). A transmissão da  
27 leishmaniose ocorre por meio da picada da fêmea do flebotomíneo infectada.  
28 Há várias espécies envolvidas na transmissão podendo variar dependendo da  
29 região geográfica. No Brasil, o gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente

1 como mosquito palha, tatuquira, birigui entre outros, é o principal vetor  
2 associado à transmissão [18].

3 No momento do repasto sanguíneo, o vetor infectado inocula  
4 promastigotas metacíclicas (I), regurgitando-as. As promastigotas são  
5 fagocitadas por macrófagos ou outras células fagocíticas (II), diferenciam-se  
6 em amastigotas e multiplicam-se por fissão binária (III), gerando o rompimento  
7 das células (IV), podendo infectar outras células e tecidos. Dando  
8 continuidade ao ciclo, o flebotomíneo durante o repasto sanguíneo em  
9 indivíduos infectados, ingere células infectadas com amastigotas (V). No  
10 flebotomíneo, os amastigotas são liberados (VI), transformam-se em  
11 promastigotas (VII), desenvolvem-se no intestino do inseto (VIII) (no intestino  
12 grosso quando se trata do subgênero *Vianna* e no intestino médio o subgênero  
13 *Leishmania*), e a seguir migram para a probóscide (I) podendo assim infectar  
14 novo hospedeiro mamífero durante o hábito hematófago do inseto [18].

15

16 **Figura 4 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp.**



17

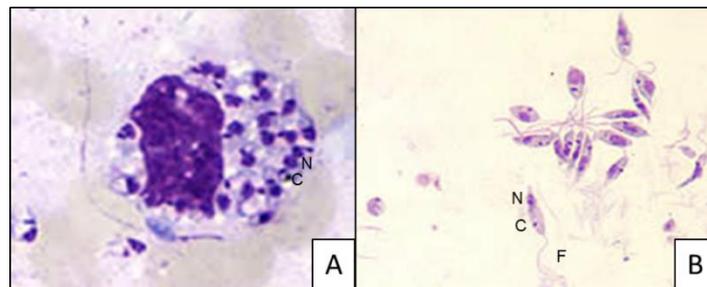
18

Fonte: Modificado de [18]

1 Como pode ser observado no ciclo de vida do protozoário, a  
 2 *Leishmania spp.* apresenta duas principais formas, as promastigotas – forma  
 3 extracelular de 15 a 20 mm, alongada, delgada e flagelada, encontrada no  
 4 vetor e considerada a forma infectante – e as amastigotas – forma intracelular  
 5 obrigatória de 3 a 5 mm, não flagelada, encontrada normalmente em  
 6 macrófagos do hospedeiro mamífero – relacionada às manifestações clínicas  
 7 da doença (Figura 5) [19].

8

9 **Figura 5 - Formas apresentadas pelo parasito da *Leishmania sp.***



10

11 Formas apresentadas pelo parasito da *Leishmania spp.* [A] Forma amastigota no interior do macrófago  
 12 corada com Giemsa, com grande núcleo e cinetoplasto proeminente. [B] Forma promastigota obtida de  
 13 cultura e corada com Giemsa. Observa-se a presença do flagelo, núcleo e cinetoplasto. F – flagelo; N –  
 14 núcleo; C – cinetoplasto. **Fonte:** Modificado de [18]

15

### 16 **1.3.2 Manifestações Clínicas da Infecção por *Leishmania spp.* –** 17 **Leishmanioses**

18

19 O tipo de manifestação clínica da doença vai depender da interação  
 20 complexa entre a cepa do parasito envolvida na infecção e de fatores  
 21 relacionados à resposta imune do hospedeiro. A variabilidade das repostas  
 22 relacionadas às cepas é provavelmente secundária às diferenças genômicas  
 23 evolutivas, tornando a espécie mais adaptada à pele ou a invadir órgãos  
 24 viscerais. As manifestações clínicas também parecem ser influenciadas pela  
 25 capacidade do hospedeiro em apresentar resposta inata ou adaptativa efetiva,

1 envolvendo teorias quanto à polarização da resposta imune, sendo esta  
2 interação mais complexa [19]. Alguns estudos sugerem que a resposta imune  
3 do hospedeiro pode ser a chave para o controle da doença, assim como pela  
4 resposta observada no organismo. Além disso, fatores de virulência  
5 relacionados à cepa do parasito também devem ser considerados [19-21].

6 Independente da forma de manifestação clínica, estabelecer o  
7 tratamento específico para limitar a evolução da doença, minimizar danos,  
8 aliviar os sinais e sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente é  
9 essencial, uma vez que as LC e LMC podem ocasionar deformidades e  
10 desconfigurações e outras complicações, e a forma visceral possui alta  
11 letalidade podendo levar a óbito em 90 % dos casos não tratados [22].

12

### 13 **1.3.3 Tratamento da Leishmanioses**

14

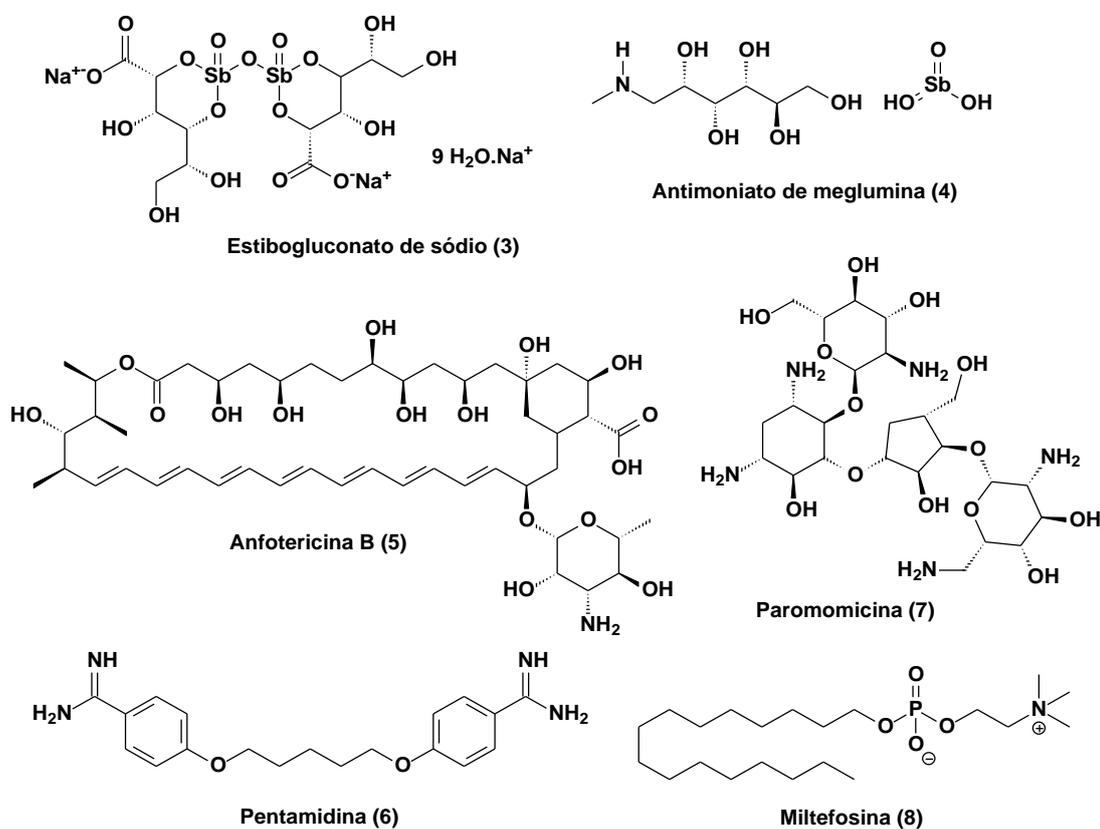
15 O protocolo de tratamento das LV, LC e LMC no Brasil apresenta como  
16 primeira linha os antimoniais pentavalentes – antimoniato de meglumina  
17 (Glucantime®) 20 mg Kg/dia por 30 dias – para LV e 20 dias para LMC e LC.  
18 A segunda linha de tratamento inclui a anfotericina B (lipossomal ou  
19 convencional). Adicionalmente para as LC e LMC também pode ser utilizada  
20 a pentamidina [15].

21 Atualmente duas formulações de antimonial pentavalente estão  
22 disponíveis, o estibogluconato de sódio (**3**) e o antimoniato de meglumina (**4**)  
23 (Figura **6**). O mecanismo de ação dos antimoniais está relacionado à inibição  
24 da glicólise e da oxidação de ácidos graxos, interferindo no metabolismo  
25 energético. **3** e **4** apresentam baixa biodisponibilidade oral e são utilizados na  
26 forma intravenosa (IV) ou intramuscular (IM). Os efeitos adversos mais  
27 comuns estão associados à cardiotoxicidade incluindo o prolongamento do  
28 intervalo QTc – associado à arritmia cardíaca severa ou fatal quando > 0,5 s  
29 –, taquicardia ventricular, fibrilação ventricular. Artralgias, mialgias e elevação

1 das enzimas hepáticas também são efeitos adversos comuns. Devido a alta  
 2 toxicidade, os antimoniais não constituem a primeira escolha para o  
 3 tratamento de gestantes e também não devem ser utilizados em pacientes  
 4 HIV positivo. Há descrição de resistência em algumas regiões e possível  
 5 variabilidade na resposta para LC dependendo da espécie envolvida [15, 19,  
 6 23, 24].

7

8 **Figura 6** - Fármacos recomendados pela OMS para o tratamento da  
 9 leishmaniose



Fonte: Próprio autor

12 Em caso de refratariedade ou limitação pela toxicidade ao tratamento  
 13 com antimoniais, ou ainda em caso de gestantes e pacientes HIV positivo, o  
 14 fármaco de escolha será a anfotericina B. A anfotericina B (5) é um antibiótico  
 15 isolado do *Streptomyces nodosus*, inicialmente identificado por sua ação

1 antifúngica. Seu mecanismo de ação consiste na ligação ao ergosterol  
2 presente na membrana da *Leishmania spp.* promovendo a formação de  
3 poros, alterando a permeabilidade. Pode ser encontrada na forma de  
4 desoxicolato de anfotericina B ou em formulações lipídicas possuindo  
5 administração IV. O desoxicolato de anfotericina B apresenta vários efeitos  
6 adversos, entre eles reações relacionadas à infusão, nefrotoxicidade,  
7 hipocalcemia e miocardites, sendo necessária a hospitalização para sua  
8 administração e monitoramento (4 a 5 semanas). A anfotericina B lipossomal  
9 apresenta eficácia em baixas doses e menor toxicidade, porém tem como  
10 limitação seu alto custo [15, 23].

11 A pentamidina (**6**), licenciada inicialmente para o tratamento da  
12 tripanossomíase africana, é considerada hoje no Brasil uma alternativa  
13 terapêutica para LC. Na Índia foi utilizada como segunda linha aos antimoniais  
14 para o tratamento da LV, entretanto sua alta toxicidade e rápida emergência  
15 de resistência fez com que fosse substituída no protocolo pela anfotericina B.  
16 Atualmente, **6** é considerada principalmente em uso de terapias combinadas,  
17 administrada IV ou IM, por aproximadamente 30 dias. O mecanismo de ação  
18 da pentamidina está associado à inibição da biossíntese de poliaminas e  
19 disfunção do potencial de membrana mitocondrial. Os principais efeitos  
20 adversos consistem em severa hipoglicemia e hipotensão, febre, miocardite e  
21 toxicidade renal. Há também o risco de induzir dano pancreático podendo  
22 levar a quadro de diabetes tipo 1 (4-12 % dos pacientes) [19, 23, 24].

23 A paramomicina (**7**) é um dos fármacos recomendados pela OMS  
24 consistindo em alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose em  
25 alguns países. Consiste em aminoglicosídeo de amplo espectro isolado do  
26 *Streptomyces krestomuceticus*. O mecanismo de ação está relacionado à  
27 inibição da síntese de proteína e também parece alterar a permeabilidade da  
28 membrana. A paramomicina possui administração IV para LV e pode ser  
29 utilizada na forma tópica em LC. Adicionalmente, **7** demonstrou eficácia no  
30 tratamento da leishmaniose em alguns países; entretanto, entre seus efeitos

1 adversos comuns está a dor relacionada à injeção (55 %), a ototoxicidade (2  
2 %) e toxicidade hepática (6 %) [23, 24].

3 A miltefosina (**8**, hexadecilfosfocolina), inicialmente desenvolvida como  
4 fármaco antitumoral, é um alquilfosfolípídeo (AFL) que apresentou atividade  
5 antileishmania tendo sido aprovada para o tratamento da leishmaniose em  
6 diversos países, compondo a lista de fármacos recomendados pela OMS. É  
7 considerada o primeiro tratamento efetivo para leishmaniose por via oral e  
8 com baixa toxicidade em comparação aos antimoniais. Os efeitos adversos  
9 mais comuns incluem eventos gastrointestinais, toxicidade hepática e renal.  
10 Tem como limitação sua teratogenicidade. Como desvantagem, sua alta meia-  
11 vida está relacionada ao risco de desenvolvimento de resistência [23, 24].

12 O mecanismo de ação da miltefosina (**8**) sobre as células tumorais e  
13 parasitos da *Leishmania* não está totalmente elucidado. Vários alvos de ação  
14 sobre os tripanossomatídeos têm sido sugeridos, incluindo alteração do  
15 metabolismo de alquilídeos e de éteres lipídicos, biossíntese de  
16 fosfolípídeos e do glicosilfosfatidilinositol (GPI). Ainda são observadas  
17 alteração da transdução de sinal e na fluidez da membrana, inibição da Akt  
18 (também denominada proteína quinase B – PKB), indução da apoptose e  
19 inibição da acil-CoA:alquilespecífica aciltransferase envolvida no  
20 remodelamento lipídico. Também tem sido demonstrado que **8** se insere na  
21 membrana do parasito por miscibilidade, interage com esteróis e também  
22 promove inibição da rotação (*turnover*) de fosfolípídeos e das vias de  
23 sinalização dependentes de lipídeos [19, 25-28].

24 Considerando as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da  
25 leishmaniose, novos fármacos são necessários devido à toxicidade, custo e  
26 risco de resistência. Neste sentido, estudos para melhor entendimento da  
27 relação parasito-hospedeiro têm sido realizados para identificar moléculas e  
28 vias bioquímicas que poderiam facilitar o desenvolvimento de fármacos mais  
29 efetivos e com menor perfil de toxicidade e risco de resistência [24]. A

1 miltefosina (**8**) por ser efetiva, ter baixa toxicidade e apresentar possível  
2 mecanismo multialvo, envolvendo alterações em lipídeos de membrana,  
3 consiste em protótipo promissor para o desenvolvimento de análogos AFL  
4 tendo a membrana como um dos possíveis alvos.

5

#### 6 1.4 BIOMEMBRANAS: FOSFOLIPÍDEOS E ESFINGOLIPÍDEOS

7

8

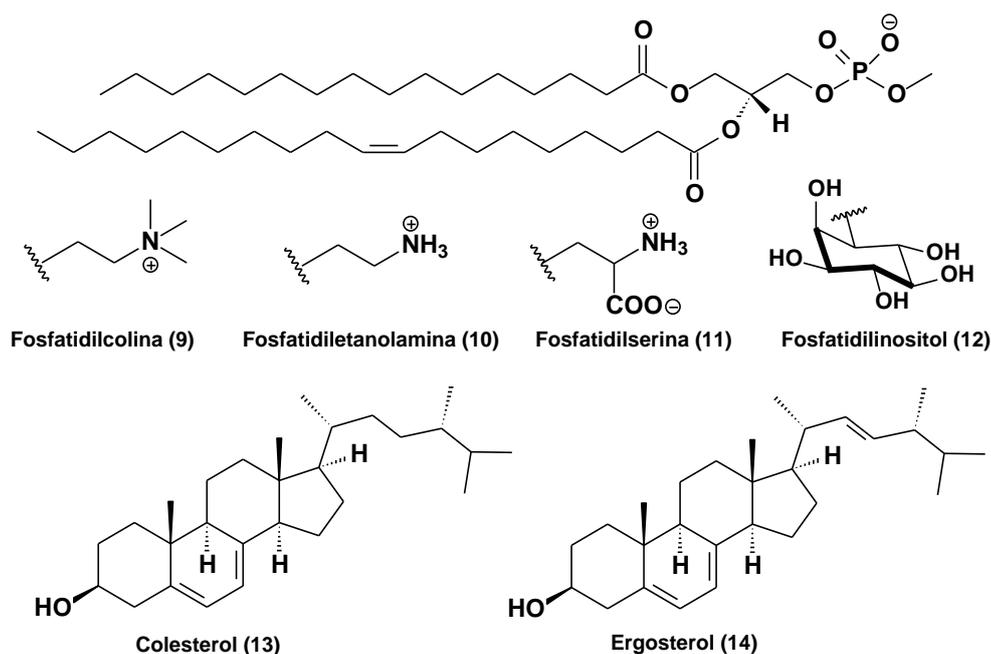
9 A membrana das células eucarióticas apresenta importante função na  
10 delimitação tanto do ambiente interno e externo quanto de organelas. Entre  
11 as funções essenciais das membranas está a de barreira de permeabilidade  
12 seletiva, manutenção da integridade bioquímica do meio interno, sinalização,  
13 adesão, presença de enzimas e atividade metabólica, presença de  
14 receptores, canais iônicos e moléculas sinalizadoras. Esta complexidade de  
15 funções é importante para homeostase celular, metabolismo, crescimento e  
16 morte celular [29].

17 Organizadas como bicamada lipídica fluida, as membranas são  
18 constituídas de lipídeos, proteínas e carboidratos. Entre os lipídeos de  
19 membrana estão os derivados do glicerol e os esfingolipídeos. Os lipídeos  
20 derivados do glicerol podem ser divididos em fosfolipídeos – apresentam o  
21 glicerol ligado a dois ácidos graxos e o grupo fosfato – e glicosilglicerídeos –  
22 possuem a esterificação com glicosídeos substituindo o grupo fosfato, por  
23 exemplo, a galactose ou glicose. Os esfingolipídeos apresentam a esfingosina  
24 em substituição ao glicerol e também podem ser classificados em  
25 fosfoesfingolipídeos ou glicoesfingolipídeos. Os lipídeos fosforilados podem  
26 apresentar grupos catiônicos, básico ou zwitteriônicos, por exemplo a colina  
27 (**9**), etanolamina (**10**), serina (**11**), ou outro substituinte associado ao fosfato,  
28 como o inositol (**12**) (Figura 7). A cadeia dos ácidos graxos pode ser saturada  
29 ou insaturada, cujos tamanho e grau de insaturação influenciam nas  
30 propriedades físicas da membrana. Esses lipídeos apresentam ainda

1 característica anfífilica conferida por uma parte ou subunidade polar e outra  
 2 apolar, sendo importante na manutenção da função biológica da membrana e  
 3 na organização da bicamada lipídica [30].

4 As membranas são altamente enriquecidas com fosfolípeos e  
 5 esfingolípídeos contendo colina. Nas células eucarióticas cerca de 40 % dos  
 6 lípeos são fosfatidilcolinas (PC) apresentando a forma zwitteriônica em pH  
 7 biológico [29, 31, 32]. Os esteroides, colesterol (13) e ergosterol (14), também  
 8 fazem parte da composição da membrana das células eucarióticas,  
 9 apresentam núcleo esteroide rígido e influenciam diretamente na fluidez,  
 10 empacotamento e formação de microdomínios na membrana [29, 30].

11

12 **Figura 7 - Exemplo de lípeos encontrados nas membranas**

13

14

15

Fonte: Próprio autor

16 As membranas celulares não são homogêneas, mas consistem em  
 17 meio heterogêneo com organização lipídica complexa e dinâmica,  
 18 apresentando microdomínios distintos como as “rafts” [29]. Os lípeos *rafts*  
 19 são organizados em domínios enriquecidos de colesterol, esfingolípídeos,  
 20 receptores e proteínas ancoradas a GPI. Esses microdomínios são

1 importantes, participam de vários processos, entre eles a transdução de sinal,  
2 moduladores da sinalização, interações complexas com proteínas e  
3 transporte de lipídeos, fagocitose e outras funções não totalmente elucidadas  
4 [25, 33].

5 Cada tipo de membrana é altamente especializada em seus diferentes  
6 atributos, determinado pela presença de lipídeos e proteínas específicas que  
7 refletem em suas funções celulares [29]. Protozoários tripanosomatídeos  
8 como *T. cruzi* e *Leishmania spp* são dependentes da biossíntese de lipídeos  
9 para seus estágios proliferativos, assim como mudanças na composição de  
10 lipídeos de membrana e metabolismo lipídico para adaptação ao meio  
11 dependendo do estágio no hospedeiro [34].

12

#### 13 **1.4.1 Membrana do *Trypanosoma cruzi***

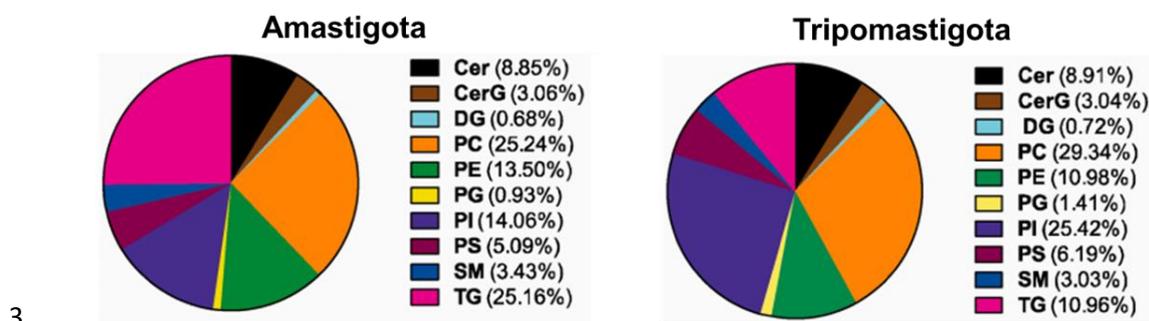
14

15 Assim como outras células eucarióticas, a membrana do *T. cruzi*  
16 contém vários fosfolipídeos, esfingolipídeos, lipídeos neutros e esteroides  
17 [35]. Os fosfolipídeos fazem parte da maior fração de espécies de lipídeos da  
18 membrana desse protozoário. Entre os fosfolipídeos, a PC é a mais  
19 abundante (20-30 %) tanto na membrana de tripomastigotas como de  
20 amastigotas. Observa-se diferença da composição da membrana entre os  
21 estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* (Figura 8). O fosfatidilinositol (PI) é o  
22 lipídeo mais presente na membrana de tripomastigotas e o segundo lipídeo  
23 mais abundante em amastigotas. Já os glicerídeos são majoritários em  
24 amastigotas, seguido de triglicerídeos (TG), com cerca de 25 %, podendo  
25 esse aumento estar relacionado ao processo de internalização na célula  
26 hospedeira [34].

27

28

1 **Figura 8** - Composição de lipídeos em amastigotas e tripomastigotas de *T.*  
 2 *cruzi*



4 Cer - ceramida; CerG - hexosilceramida; DG - diacilglicerol; PC - fosfatidilcolina; PE-  
 5 fosfatidiletanolamina; PG - fosfatidilglicerol; PI - fosfatidilinositol; PS - fosfatidilserina; SM -  
 6 esfingomielina; TG- triacilglicerol. Modificado de [34]

7

8 Os glicerolfosfolipídeos também são encontrados em abundância no *T.*  
 9 *cruzi*, entre eles a fosfatidiletanolamina (PE – 10 a 13 %), fosfatidilserina (PS  
 10 – 5 a 6 %) e fosfatidilglicerol (PG – ~1 %). Já os esfingolipídeos constituem  
 11 aproximadamente 10 % dos lipídeos. Em tripomastigotas, a  
 12 etanolaminofosforilceramida e esfingomielina (SM: colinafosforilceramida)  
 13 constituem aproximadamente 50 % dos esfingolipídeos. O *T. cruzi* também  
 14 apresenta em sua membrana o ergosterol – explorado como alvo para  
 15 introdução de novos tratamentos pela via da biossíntese de esteróis de  
 16 tripanossomatídeos, dado a sua importância na homeostase celular [34].

17 Por sua vez, epimastigotas de *T. cruzi* apresentam 35 % de  
 18 fosfolipídeos e 65 % de lipídeos neutros. Entre os fosfolipídeos a PC também  
 19 é a mais abundante (44 %), seguida de PE (28 %), PI (12 %), SM (4 %) [36].  
 20 Os esfingolipídeos SM, inositol fosforilceramida (IPC) e etanolamina  
 21 fosforilceramida (EPC) são dominantes, correspondendo a 80 % dos  
 22 esfingolipídeos [34].

23

## 1 1.4.2 Membrana da *Leishmania*

2

3 Na membrana da *Leishmania spp.* os fosfolipídeos correspondem a 70  
4 % dos lipídeos totais incluindo a PC, (30-40 %), PE (~10 %), e PI (~ 10 %). O  
5 mais abundante glicerolfosfolipídio também é a PC. Diferente das células de  
6 mamíferos ou plantas e do *T. cruzi*, o parasito da *Leishmania* não sintetiza  
7 SM. O esfingolipídio majoritário é o IPC não glicosilado, ausente em  
8 mamíferos, e a ceramida [31].

9 Além de serem componentes importantes da membrana, os  
10 fosfolipídeos também desempenham múltiplos papéis na *Leishmania*, entre  
11 eles o de ancorar fatores de virulência e.g. LPG, glicoinositolfosfolipídeos  
12 (GIPLs) e GPI, que formam uma barreira protetora e desempenham funções  
13 críticas na infectividade [31, 32].

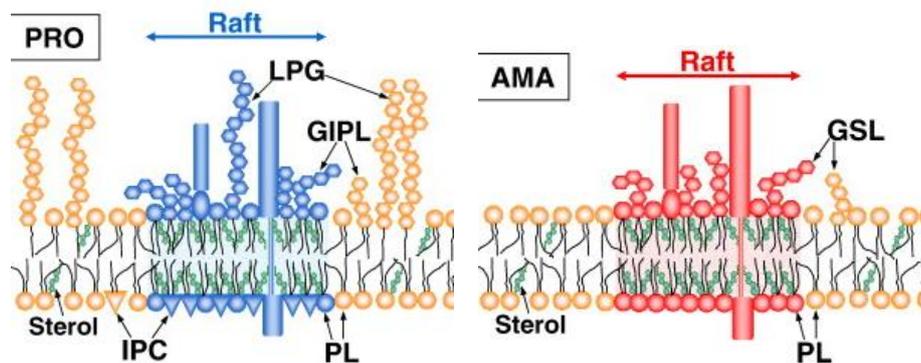
14 Glicoconjugados (GC) são expressos na superfície de amastigotas e  
15 promastigotas (Figura 9). A capacidade da *Leishmania* sobreviver no intestino  
16 do vetor e no ambiente hidrolítico e ácido dos fagolisossomo dos macrófagos  
17 está associada com a expressão de complexos GC. Em promastigotas esses  
18 GC incluem GPI ancorados a gp63; o LPG e a família dos glicolipídeos GPI  
19 livres, GIPLs e fosfoglicanos (FG) ou proteofosfoglicanos (PPG). Em  
20 amastigota a expressão de LPG e gp63 é baixa, sendo os glicoesfingolipídeos  
21 (GSL) a principal classe expressa nas amastigotas de *L. (L) amazonensis*,  
22 apesar de estar ausente em promastigotas [32, 37].

23 Os esfingolipídeos apresentam importância em processos biológicos  
24 como adesão, reconhecimento molecular, transdução e formação das *rafts*  
25 (Figura 9). Nas *rafts* também pode ser observado maior concentração de  
26 ergosterol, tornando a região mais rígida. Adicionalmente, podem ser  
27 observadas proteínas transmembrana e glicosilfosfatidilinositol ancorados. O  
28 IPC é o principal esfingolipídio presente na forma promastigota, ausente na  
29 célula de mamíferos, localizado principalmente nas *rafts*. GIPL também é  
30 encontrado em maior quantidade na promastigota; enquanto que na

1 amastigota GSLs e esteróis estão presentes em maior quantidade nas rafts  
2 [37].

3

4 **Figura 9** - Representação esquemática de rafts na membrana de *L. (L.)*  
5 *amazonensis*



6

7 Promastigota (PRO), Amastigota (AMA), Ergosterol (sterol), glicoinositolfosfolipídeo (GPIPL), lipofosfoglicanos (LPG),  
8 inositol fosforilceramida (IPC), fosfolipídeos (PL), glicosíngolipídeos (GSL).

9

**Fonte:** Modificado de [37]

10

11 Esses esfingolipídeos são importantes para virulência cuja depleção de  
12 gene, relacionado à enzima produtora de esfingolipídeos, está associada à  
13 geração de promastigotas viáveis de *L. major*, porém não virulento. A  
14 importância do IPC na infectividade de formas promastigotas de *L. (L.)*  
15 *amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis* foi demonstrada em ensaio  
16 com *aureobasidin A*, inibidor da enzima que sintetiza IPC, levando à redução  
17 de 95 % do número de macrófagos infectados em cultura [37].

18 A composição dos lipídeos da membrana da *Leishmania* é diferente da  
19 encontrada em mamíferos. Como principais componentes da membrana,  
20 esses lipídeos podem determinar a permeabilidade, fluidez, transporte de  
21 vesículas, absorção de nutrientes por endocitose e macroautofagia [32].

22

## 1 1.5 ALQUILFOSFOLIPÍDEOS

2

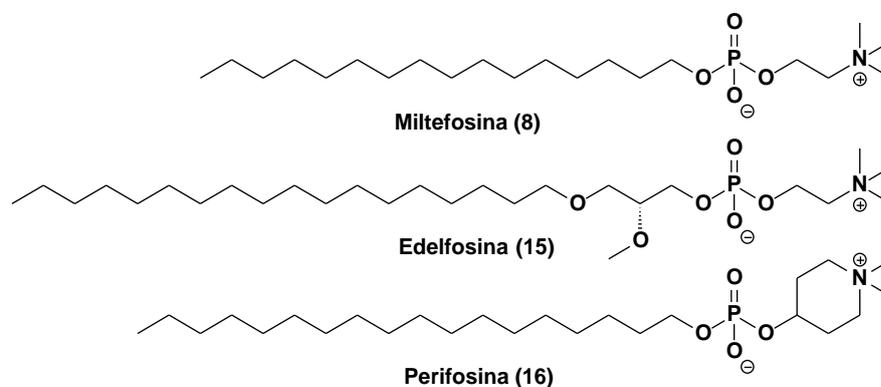
3

4 Os alquilfosfolipídeos (AFL) são estruturalmente relacionados a  
 5 fosfolipídeos de ocorrência natural, entre eles a PC. Inicialmente  
 6 desenvolvidos como fármacos antitumorais, demonstraram posteriormente  
 7 atividade antiparasitária contra patógenos tripanosomatídeos. A miltefosina  
 8 (**8**) foi o primeiro representante da classe com aprovação para o tratamento  
 9 da leishmaniose. Similar mecanismo de ação tem sido descrito para a  
 10 miltefosina sobre *Leishmania sp.*, *T. cruzi* e células neoplásicas. Embora não  
 11 totalmente elucidados, os principais mecanismos incluem a indução da  
 12 apoptose e desregulação da sinalização dependente de lipídeos [28, 33, 38].

13 Os análogos AFL apresentam essencialmente uma longa cadeia  
 14 carbônica que permite particionamento e acúmulo na porção lipídica da  
 15 membrana. Desta forma, alteram a permeabilidade e fluidez, a composição  
 16 dos lipídeos de membrana e interferem tanto no metabolismo de fosfolipídeos,  
 17 incluindo a fosfatidilcolinas, quanto na transdução de sinal e proliferação [33,  
 18 38]. Como exemplo temos os análogos AFL relacionados a colina, a  
 19 miltefosina, edelfosina e perifosina (Figura 10).

20

21 **Figura 10** - Alquilfosfolipídeos relacionados à colina



22

23

Fonte: Próprio autor

1 A miltefosina (**8**) tem sido associada a diferentes modificações em nível  
2 celular. Estas modificações incluem alterações no metabolismo de  
3 fosfolípidos e na composição da membrana com redução da quantidade de  
4 PC; aumento do nível de PE associado à apoptose; inibição do transporte de  
5 colina para dentro da célula do parasito; inibição da citocromo *c* oxidase e  
6 inibição da sinalização pela PI3K/Akt/PKB também associadas à promoção da  
7 apoptose [28]. Estudo realizado por Moreira e colaboradores (2014) [39]  
8 utilizando ressonância paramagnética de elétrons (RPE) e marcadores de  
9 spin mostraram que a miltefosina (**8**) promove alteração direta sobre a  
10 membrana de promastigotas de *L. amazonensis*, alterando a sua fluidez.

11 A edelfosina (**15**, 1-O-octadecil-2-O-metilglicerol-3-fosfocolina) é um  
12 éter lipídico com promissora atividade imunomoduladora e anti-proliferativa. A  
13 edelfosina induz apoptose em células tumorais envolvendo interação com  
14 lipídeos *rafts* e com a mitocôndria. Alguns estudos demonstraram que a  
15 edelfosina tem boa atividade frente a parasitos da *Leishmania spp.* e que seus  
16 mecanismos moleculares são semelhantes aos observados sobre a célula  
17 tumoral [40-42]. Entre os efeitos observados para edelfosina (**15**) estão a  
18 citotoxicidade sobre promastigotas e amastigotas, alteração mitocondrial e no  
19 cinetoplasto [26] bem como de lipídeos das *rafts* [42].

20 No *T. cruzi*, a miltefosina (**8**) e a edelfosina (**15**) apresentaram atividade  
21 sobre as três formas – epimastigota, tripomastigota e amastigota – pela  
22 alteração e prejuízo na biossíntese de fosfolípidos e esteróis nos parasitos.  
23 Esses AFL apresentaram capacidade de interferir na biossíntese da PC na  
24 etapa de transmetilação e também inibiram a incorporação da L-(metil-  
25 <sup>14</sup>C)metionina. Adicionalmente, a edelfosina (**15**) afetou a biossíntese do  
26 ergosterol. Esta interferência pode ter correlação com as alterações  
27 observadas na análise ultraestrutural com formação de bolhas e franzimento  
28 da membrana. Epimastigotas tratados com esses AFL apresentaram também  
29 inchaço no cinetoplasto e perda da organização da membrana confirmada por  
30 análise de citometria de fluxo com marcador rodamina (Rh123) [38].

31 A perifosina (**16**, fosfato de octadecil-(1,1-dimetilpiperidínio-4-il)) é um  
32 alquilfosfocolínico análogo da miltefosina. Apresenta o heterocíclico piperidina

1 como grupo cabeça que aumentou sua estabilidade metabólica. A perifosina  
2 (16) também demonstrou perfil leishmanicida, porém menor que a edelfosina  
3 (15) e próximo ao da miltefosina (8). Em adição, 16 exibiu redução no nível de  
4 ATP e também do potencial de membrana sobre cepas de *L. amazonensis* e  
5 *L. donovani*; aumento do número de células apoptóticas em relação ao  
6 controle para *L. amazonensis*; e aumento da externalização de fosfatidilserina  
7 na membrana após 48 h de incubação [43].

8           Devido à diversidade de respostas celulares desencadeadas pelos AFL  
9 e os resultados apresentados frente a esses tiponasomatídeos, análogos  
10 lipídeos fosfocolínicos podem ser relevantes na busca de novos fármacos.  
11 Novos tratamentos para leishmaniose e DC são necessários devido às  
12 limitações relacionadas aos tratamentos, como a toxicidade, custo,  
13 necessidade de acompanhamento em nível secundário de assistência, baixa  
14 efetividade dependendo da fase da doença, entre outros. Neste contexto, o  
15 desenvolvimento de novos fármacos é, então, uma necessidade emergente.

16

## 17 1.6 PRODUTOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS 18 FÁRMACOS

19

20           Há estimativa de que aproximadamente mais da metade dos agentes  
21 terapêuticos utilizados atualmente na clínica são derivados de origem natural,  
22 principalmente vegetal. As plantas constituem importante fonte de princípios  
23 ativos que podem tanto ser isolados e empregados diretamente ou mesmo  
24 utilizados como estrutura base para obtenção de compostos semi-sintéticos  
25 [2]. Os lipídeos fenólicos encontrados no Líquido da Casca da Castanha do  
26 Caju (LCC) são compostos lipofílicos com características biofóricas que  
27 podem ser explorados no desenvolvimento de novos análogos AFL.

28

### 1 1.6.1 Lipídeos fenólicos do Líquido da Casca da Castanha do Caju (LCC)

2

3 O *Anacardium occidentale*, Anacardiaceae, conhecido popularmente  
4 como cajueiro, é originário da América Tropical com principal distribuição pelo  
5 México, Peru e Brasil. Seu fruto, a castanha do caju, é um arquênio de casca  
6 coriácea lisa, com mesocarpo alveolado, repleto de líquido escuro, cáustico e  
7 inflamável denominado líquido da casca da castanha do caju (LCC). Na parte  
8 interna da castanha localiza-se a amêndoa que compõe a parte comestível,  
9 de interesse comercial [44-46].

10 O cajueiro é economicamente importante no Nordeste brasileiro,  
11 representando cerca de 99,5 % da produção brasileira. O LCC técnico –  
12 subproduto originado no beneficiamento do caju – apresenta pequeno valor  
13 comercial, porém alto potencial tecnológico devido à presença de seus  
14 constituintes fenólicos [47].

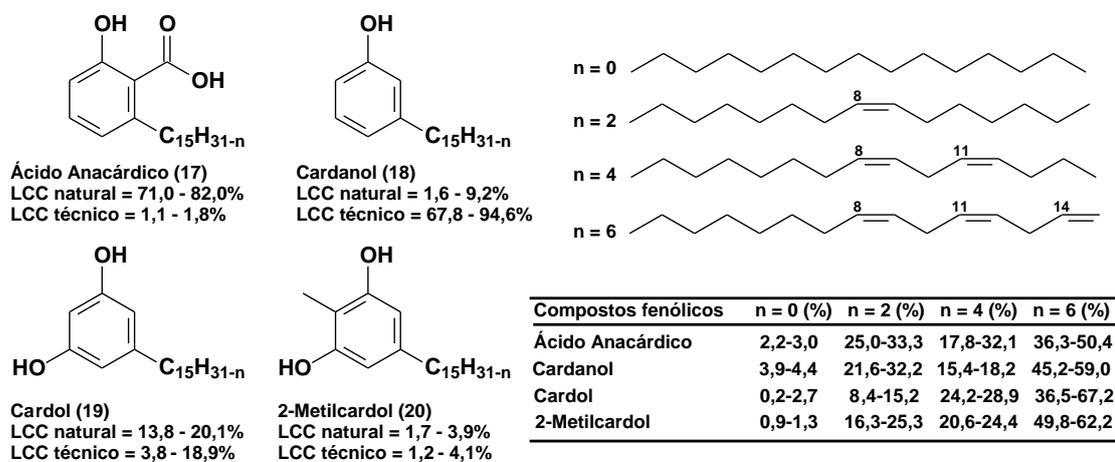
15 O LCC representa aproximadamente 25 % do peso da castanha e é  
16 considerado uma das fontes mais ricas de lipídeos fenólicos não-isoprenoides  
17 de origem natural, entre eles as misturas de ácidos anacárdicos (**17**),  
18 cardanois (**18**), cardois (**19**) e 2-metilcardois (**20**) (Figura 11). Esses  
19 compostos fenólicos apresentam cadeia com 15 átomos de carbono, com  
20 diferentes graus de insaturação [45, 48].

21 Os extratos do LCC podem ser classificados como natural ou técnico e  
22 apresentam diferenças na composição química de seus lipídeos fenólicos  
23 dependendo da técnica de extração utilizada (Figura 11). Quando obtido por  
24 maceração à temperatura ambiente com etanol, extração a frio por  
25 prensagem, extração por solvente a quente, por soxhlet, temos o LCC natural.  
26 Por sua vez, durante o processo de beneficiamento da castanha do caju  
27 normalmente utiliza-se o método térmico-mecânico para extração da  
28 amêndoa, o que consiste em promover o aquecimento das castanhas *in*  
29 *natura* a altas temperaturas, levando ao rompimento da casca externa,

1 separação da amêndoa com formação do LCC como subproduto. Quando  
 2 submetido a temperaturas igual ou superior a 180 °C, a mistura de ácidos  
 3 anacárdicos no LCC natural sofre descarboxilação aumentando a quantidade  
 4 da mistura de cardanois e polímeros no LCC gerando o LCC técnico [45, 47].

5

6 **Figura 11** - Lipídeos fenólicos encontrados no LCC



7

8

Fonte: Adaptado de [45]

9

10 Diversas atividades biológicas têm sido associadas aos constituintes  
 11 isolados do LCC ou derivados seus semi-sintéticos e.g. antioxidante,  
 12 inflamatória [47], anticolinesterásica [49], anti *T. cruzi* [50, 51], antitumoral [52],  
 13 anti-antiparasitária [52, 53], antifúngica, inibidor da tirosinase,  $\alpha$ -glicosidade,  
 14 invertase e aldose redutase, entre outras [54]. Industrialmente, estes lipídeos  
 15 fenólicos têm sido amplamente utilizados em síntese orgânica por meio da  
 16 química fina envolvendo a funcionalização da estrutura molecular desses  
 17 compostos. A exploração de suas características químicas e físico-químicas  
 18 peculiares permite diversidade de funcionalizações conferida pela  
 19 combinação natural da cadeia carbônica, com diferentes graus de  
 20 insaturação, assim como pela reatividade do anel fenólico. Esta matéria-prima  
 21 biodegradável e renovável [45, 48, 53] se apresenta como estratégica no  
 22 planejamento de fármacos sustentáveis e de baixo custo [55-58].

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

---

---

# CAPÍTULO 2

---

---

---

---

***Justificativa***

---

---

## 1    2    **JUSTIFICATIVA**

2

3            Um dos grandes obstáculos relacionado ao controle das DNTs é o  
4 pequeno número de opções terapêuticas disponível. Esse cenário é bem  
5 evidente para doença de Chagas que – após mais de 50 anos da introdução  
6 do primeiro medicamento – conta com apenas duas opções terapêuticas  
7 consideradas eficazes: o BZN (1) e o NFX (2). Esses fármacos ainda  
8 apresentam limitação quanto às suas eficácias na fase crônica da doença [3,  
9 6, 9, 10]. Para Leishmaniose há um número maior de fármacos disponíveis.  
10 Dentro dos fármacos indicados pela OMS temos os antimoniais  
11 pentavalentes, as anfotericinas B e sua forma lipossomal, a miltefosina, a  
12 paramomicina e a pentamidina. Esses fármacos também apresentam diversas  
13 as limitações, sendo que a miltefosina é o único disponível por via oral [23,  
14 24].

15            O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento e controle  
16 dessas doenças torna-se essencial e está dentro de um dos objetivos da  
17 OMS, envolvendo a busca por tratamentos eficazes, com bom nível de  
18 segurança, baixa toxicidade, baixo custo e com melhores esquemas de  
19 tratamento e administração e baixo custo. Grupos de pesquisa têm envidado  
20 esforços nesse sentido. A atividade antitripanosomatídea tem sido descrita na  
21 literatura para diversos análogos alquilfosfolínicos, entre eles alguns  
22 antitumorais desenvolvidos inicialmente para o tratamento do câncer,  
23 podendo destacar a miltefosina (8) que atualmente é reconhecida para o  
24 tratamento da leishmaniose [23, 64]. O reconhecimento da miltefosina como  
25 opção terapêutica eficaz para leishmaniose e resultado da avaliação da  
26 miltefosina e outros alquilfosfolídeos em *T. cruzi* sugere que análogos  
27 fosfolídeos podem ser um caminho interessante para o desenvolvimento de  
28 novos fármacos.

29            A miltefosina (8) apresenta-se como interessante protótipo por  
30 apresentar biodisponibilidade oral e menor toxicidade quando comparada aos  
31 outros tratamentos. Novos AFL têm sido sintetizados visando a obtenção de  
32 compostos com atividade superior e que apresentem bom perfil de segurança.

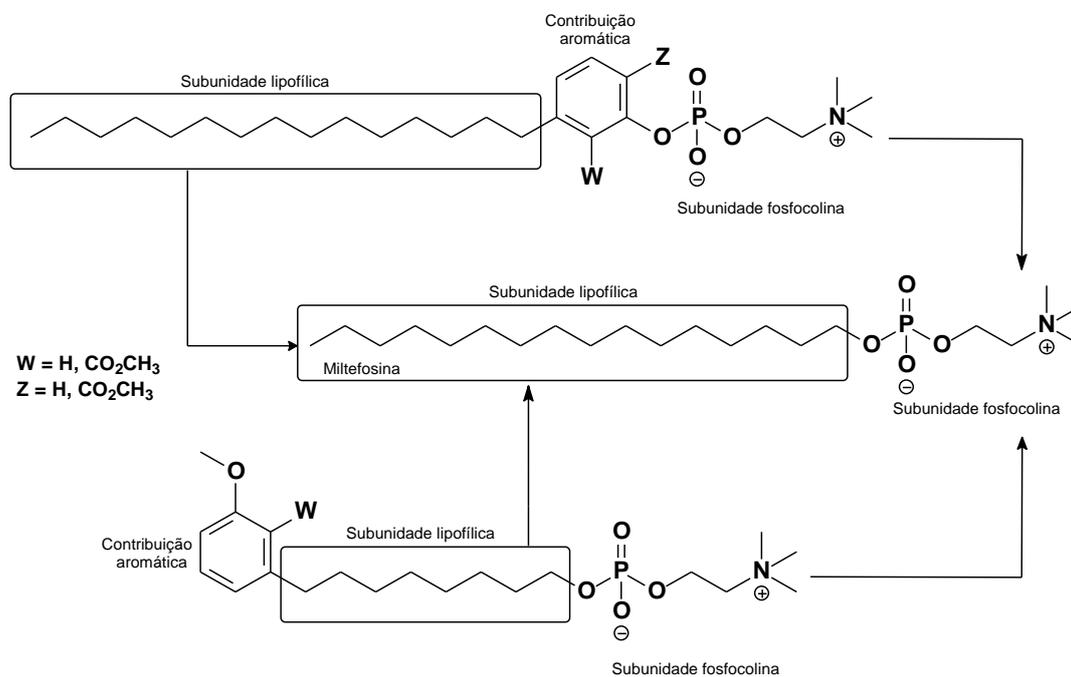
1 Com relação à estrutura química, a miltefosina é uma molécula anfifílica  
2 zwitteriônica que apresenta o grupo amino quaternário e o grupo fosfato  
3 negativamente carregado ( $pK_a \sim 2,0$ ), separados por dois metilenos, formando  
4 a PC. Apresenta também cadeia alquílica com 16 carbonos, mimetizando éter  
5 lipídicos como a PC (Figuras **7** e **10**). Estudos recentes têm demonstrado que  
6 alterações na cadeia carbônica podem melhorar a potência e minimizar efeitos  
7 adversos [40].

8 Os lipídeos fenólicos do LCC constituem sistema biofórico natural,  
9 permitindo por meio de modificações moleculares explorar as características  
10 eletrônicas e lipofílicas desses lipídeos. Dessa forma, análogos da miltefosina  
11 a partir de lipídeos fenólicos do LCC foram propostos (Figura **12**). Dois  
12 planejamentos foram racionalizados. O primeiro visou explorar a contribuição  
13 da cadeia lipofílica saturada com 15 átomos de carbono, e a presença do  
14 grupo fosfocolina substituído na hidroxila fenólica, enquanto avalia a influência  
15 do anel aromático e seus padrões de substituição, específico em cada lipídeo  
16 fenólico do LCC, sobre a atividade.

17 O segundo planejamento incluiu a clivagem oxidativa da cadeia  
18 carbônica com redução da cadeia para 8 átomos de carbono e condensação  
19 do álcool primário com o grupo fosfocolina, explorando a influência do anel  
20 aromático e seus padrões de substituição na subunidade lipofílica.

21

22

1 **Figura 12 - Planejamento estrutural**

2

3

**Fonte:** Próprio autor

4

5 O planejamento de análogos da miltefosina a partir lipídeos fenólicos  
 6 constitui uma estratégia para a obtenção de novas entidades químicas  
 7 utilizando de nossa biodiversidade de forma sustentável. Constitui uma  
 8 perspectiva de pesquisa relevante gerando agregação de valor e obtenção de  
 9 compostos a preços mais acessíveis, objetivando a busca por novos fármacos  
 10 para leishmaniose e DC.

11

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

---

---

# CAPÍTULO 3

---

---

---

---

## *Objetivos*

---

---

## 1 3 OBJETIVOS

2

### 3 3.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Sintetizar novos análogos de lipídeos fosfolípidos a partir do cardanol  
6 e do ácido anacárdico e avaliar a atividade antiparasitária frente a cepas de  
7 *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*.

8

### 9 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

10

- 11 • Sintetizar os análogos estruturais da miltefosina a partir de lipídeos  
12 fenólicos extraídos do LCC técnico ou LCC natural.
- 13 • Ratificar a formação dos intermediários sintéticos e derivados alvo por  
14 meio de métodos espectrofotométricos.
- 15 • Avaliar o efeito dos compostos sobre a proliferação e viabilidade celular de  
16 *Trypanosoma cruzi*, nas formas epimastigota, tripomastigota e amastigota;  
17 e da *Leishmania amazonensis* nas formas promastigota e amastigota.
- 18 • Avaliar a citotoxicidade dos compostos de melhor perfil em células de  
19 linhagem LLC-MK2, linhagem HEPG2 e macrófagos de murinos J774.A1.
- 20 • Avaliar os efeitos ultraestruturais e morfológicos dos compostos por  
21 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de  
22 Varredura (MEV) em formas epimastigota de *T. cruzi*.
- 23 • Analisar o efeito dos compostos-alvos sobre a membrana de *Leishmania*  
24 *amazonensis* por Ressonância Paramagnética de Elétrons (RPE).
- 25 • Avaliar a atividade hemolítica dos derivados alvo.
- 26 • Analisar o efeito dos compostos-alvos sobre a membrana de eritrócitos por  
27 Ressonância Paramagnética de Elétrons (RPE).
- 28 • Estabelecer a possível relação estrutura-atividade para os derivados alvo.

29

1

---

---

## CAPÍTULO 4

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

Derivados fosfocolínicos planejados

15

a partir do Ácido Anacárdico e

16

Cardanol

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

---

---

***Resultado e Discussão***

27

## 1 4 RESULTADO E DISCUSSÃO - DERIVADOS FOSFOCOLÍNICOS 2 PLANEJADOS A PARTIR DO LCC

3

4

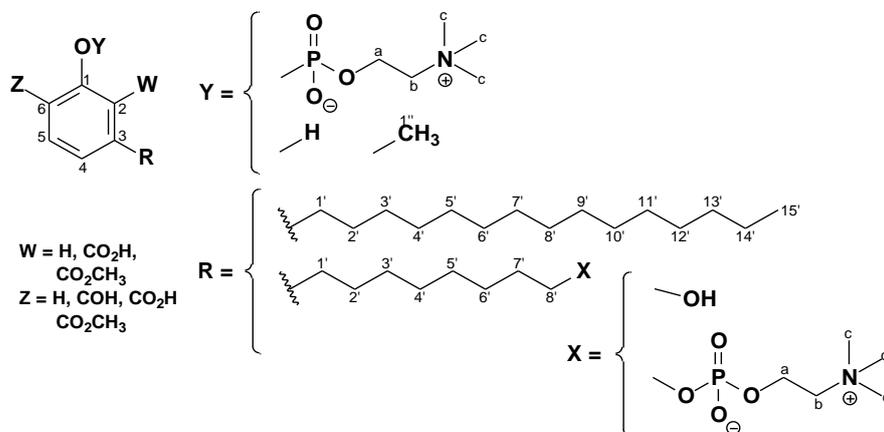
### 5 4.1 RESULTADOS DA SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS 6 INTERMEDIÁRIOS E FINAIS

7

8

9 O planejamento racional foi baseado na estrutura do AFL miltefosina  
10 (**8**), explorando a contribuição lipofílica dos lipídeos fenólicos derivados do  
11 LCC (Figuras **11** e **12**). Os lipídeos fenólicos do LCC apresentam a cadeia  
12 lateral lipofílica pentadecil alquil que pode ser saturada, mono-olefínica, di-  
13 olefínica ou tri-olefínica (Figura **11**) [45-47]. Devido a característica biofórica  
14 dessas moléculas, foi possível explorar diversas modificações moleculares no  
15 ácido anacárdico e cardanol. O planejamento sintético permitiu a obtenção  
16 de 5 novos derivados lipídeos fosfocolínicos: LDT301 (**21**), LDT302 (**22**),  
17 LDT303 (**23**), LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) e intermediários sintéticos a partir  
18 do ácido anacárdico e do cardanol. As metodologias empregadas  
19 compreenderam procedimentos de hidrogenação catalítica com Pd/C, O-  
20 acetilação, *orto*-formilação, O-alquilação, ozonólise, oxidação, fosforilação e  
21 hidrólise. Os compostos foram caracterizados por métodos espectroscópicos  
22 de análise por meio de RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C e RMN de <sup>31</sup>P, espectrometria  
23 de massas e/ou por dados de fator de retenção (Rf) e ponto de fusão (p.f.).

1 **Figura 13** - Estrutura de Markush para análise de RMN



2

3 Com o objetivo explorar a contribuição lipídica da cadeia dos derivados  
 4 do LCC, a cadeia de 15 carbonos foi considerada na sua forma saturada,  
 5 obtida por hidrogenação catalítica da mistura de ácidos anacárdicos ou do  
 6 cardanol saturado comercial. Por meio da clivagem oxidativa da cadeia lateral,  
 7 reduzindo o tamanho para 8 carbonos, o objetivo foi explorar a redução da  
 8 cadeia e contribuição aromática na posição terminal da cadeia sobre a  
 9 atividade dos compostos. Em todos os análogos foi mantida como  
 10 contribuição da cabeça polar a fosfocolina, semelhante à miltefosina (**8**),  
 11 conferindo característica anfifílica, conforme planejamento estrutural  
 12 apresentado na Figura **12**. A presença do anel aromático substituído traz uma  
 13 nova proposta dentro dos lipídeos fosfocolínicos, com contribuição de região  
 14 plana e possíveis efeitos eletrônicos e estéricos dos grupos substituídos no  
 15 anel. Dessa forma, por analogia estrutural, pode-se comparar a influência dos  
 16 substituintes em R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> para os derivados em que a fosfocolina foi substituída  
 17 na hidroxila fenólica, e a influência do anel e dos substituintes R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> na  
 18 extremidade da cadeia lipofílica. Assim como comparar o tamanho da cadeia,  
 19 da contribuição lipofílica e da posição do anel aromático na atividade dos  
 20 compostos. Os resultados da síntese desse planejamento são apresentados  
 21 a seguir.

22

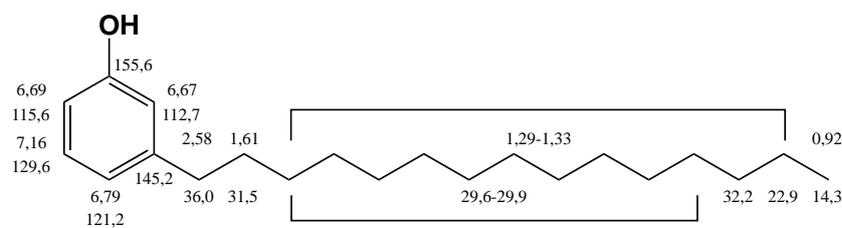
1 **4.1.1 Purificação do cardanol saturado (26, LDT10)**

2

3 O cardanol saturado (LDT10, **26**), obtido da Sigma-Aldrich® com pureza  
 4 90 %, foi recristalizado em hexano e caracterizado por Rf 0,35 (Hex:DCM 1:1).  
 5 A estrutura foi confirmada a partir da análise dos espectros de ressonância  
 6 magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e de carbono-13 (RMN de  $^{13}\text{C}$ ).  
 7 Desta forma, os assinalamentos referentes ao núcleo aromático foram  
 8 identificados na faixa de 6,67 ppm a 7,16 ppm em RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo 1 e 2,  
 9 pág 153 e 154) e confirmados pelos sinais entre 112,7 ppm e 155,6 ppm em  
 10 RMN de  $^{13}\text{C}$  (Anexo 3, pág 155). Os assinalamentos referentes à cadeia  
 11 lateral pentadecílica foram identificados como tripletos ou multipletos na faixa  
 12 de 0,92 ppm a 2,58 ppm em em RMN de  $^1\text{H}$ , corroborados pelos sinais entre  
 13 14,3 ppm e 36,1 ppm em RMN de  $^{13}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos nos  
 14 espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  estão apresentados na Figura 14.

15

16 **Figura 14 - Caracterização do derivado LDT10 (26) por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .**



17

18

<sup>a</sup>Dados dos deslocamentos químicos em ppm

19

20 Finalizando a análise para o derivado LDT10 (**26**), o espectro de  
 21 massas revelou produto relativo à massa ionizada ( $\text{M}^+\text{H}^-$ ) de 303,55 g/mol  
 22 (Anexo 4, pág 156).

23

24

#### 1 4.1.2 Obtenção do ácido anacárdico saturado (27, LDT11)

2

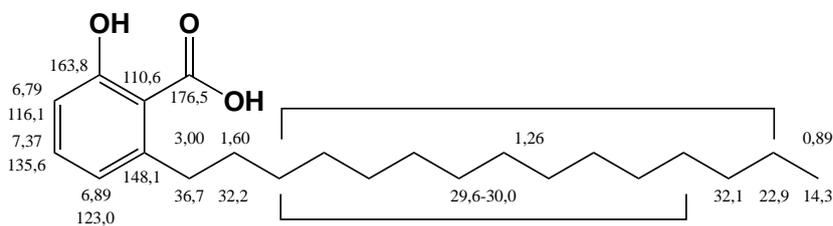
3 A mistura de ácidos anacárdicos (LDT11i, **17**) foi obtida em rendimento  
4 de 70 % a partir do LCC natural por meio da complexação com hidróxido de  
5 cálcio seguida de tratamento com HCl 6N conforme procedimento descrito por  
6 Cardoso (2017) [59]. O ácido anacárdico foi seletivamente isolado da mistura  
7 do LCC *in natura* por meio da precipitação com hidróxido de cálcio, na forma  
8 de anacardato de cálcio. Permitindo após liberação do complexo, extração e  
9 purificação, a obtenção da mistura de ácidos anacárdicos em bom  
10 rendimento. A mistura LDT11i (**17**) não foi caracterizada por métodos  
11 espectroscópicos e apresentou CCD com Rf característico do padrão  
12 presente no laboratório em 0,35 (Hex:AcOEt; 8:2).

13 Para obtenção do ácido anacárdico saturado (LDT11, **27**) a mistura  
14 LDT11i (**17**) foi submetida à reação de hidrogenação catalítica com Pd/C a 10  
15 % em etanol, conforme descrito por Alves (2015) [60]. Após purificação por  
16 recristalização em hexano, o derivado LDT11 (**27**) foi obtido como um sólido  
17 branco, floculoso, ponto de fusão 81-84 °C, rendimento de 70 %, e Rf 0,48  
18 (Hex:AcOEt; 8:2). O LDT11 (**27**) foi identificado por sinais característicos  
19 evidenciados pelos deslocamentos químicos referente ao grupo metila da  
20 cadeia 0,89 ppm RMN de <sup>1</sup>H (Anexo 5 e 6, pág. 157 e 158) e 14,3 ppm em  
21 RMN de <sup>13</sup>C (Anexo 7, pág.159). A cadeia saturada foi caracterizada por sinais  
22 entre 1,26 ppm a 3,00 ppm em RMN de <sup>1</sup>H e 22,9 ppm a 36,7 ppm em RMN  
23 de <sup>13</sup>C. Por sua vez, o grupo carboxila foi caracterizado pela presença do  
24 carbono quartenário em 176,5 ppm em RMN de <sup>13</sup>C (Figura **15**).

25

26

1 **Figura 15** - Caracterização do derivado LDT11 (**27**) por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$



<sup>a</sup>Dados dos deslocamentos químicos em ppm

2  
3  
4  
5

6 **4.1.3 Reação de *orto*-formilação e oxidação do aldeído (**29**, LDT77) para**  
7 **obtenção do ácido isoanacárdico (**28**, LDT380)**

8

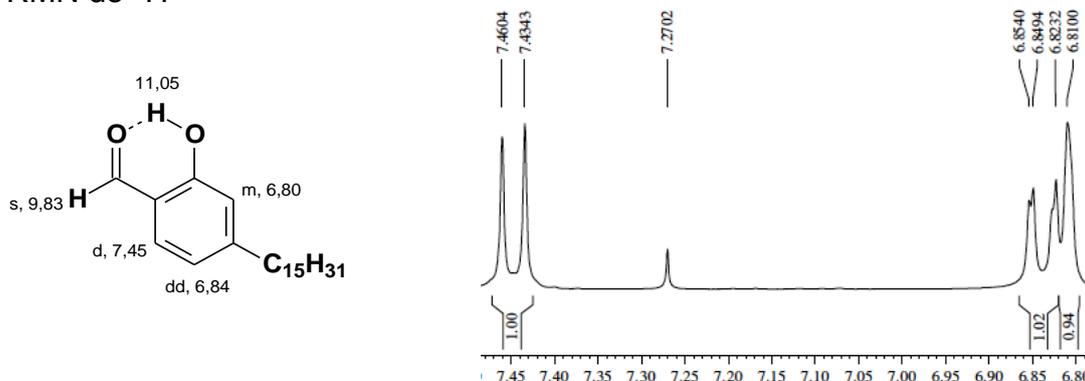
9 A reação de *orto*-formilação do LDT10 (**26**) foi realizada conforme  
10 procedimento descrito por Oliveira (2016) [61] (Figura **16**) como intermediário  
11 na obtenção do ácido isoanacárdico (**28**, LDT 380) – regioisômero do ácido  
12 anacárdico (**27**, LDT11).

13 A reação de *orto*-formilação levou à obtenção do aldeído LDT77 (**29**)  
14 como sólido branco, ponto de fusão 48-50 °C, R<sub>f</sub> 0,73 (Hex:DCM), em  
15 rendimento de 84 %. Conforme descrito por Oliveira (2016) [61], houve a  
16 formação de único produto favorecido na posição *orto* menos impedida  
17 (posição 6), de forma regioespecífica, confirmada pelo padrão de substituição  
18 no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  como multiplete (H2), duplo-duplete (H4) e duplete  
19 (H5). Adicionalmente, a presença de sinal em 11,05 ppm no RMN de  $^1\text{H}$   
20 (Anexo 8, pág 160), referente à ligação intramolecular entre o hidrogênio da  
21 hidroxila fenólica e a carbonila do aldeído, corrobora o padrão da *orto*-  
22 formilação (Figura **16**).

23

24

1 **Figura 16** - Caracterização do núcleo aromático do derivado LDT77 (**29**) por  
 2 RMN de  $^1\text{H}^a$



3  
 4  
 5 <sup>a</sup>Dados dos deslocamentos químicos em ppm

6  
 7 A presença do grupo formila foi confirmada pelos sinais em RMN de  $^1\text{H}$   
 8 em 9,83 ppm (Anexo 8 e 9 págs 160 e 161) e 196,0 ppm em RMN de  $^{13}\text{C}$   
 9 (Anexo 10, pág 162).

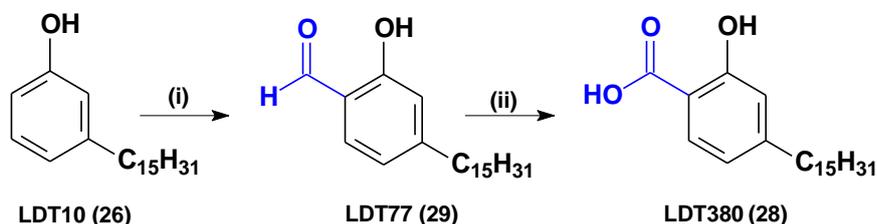
10 Para obtenção do ácido isoanacárdico (**28**, LDT380), lipídio fenólico  
 11 que não é encontrado naturalmente no LCC, o derivado LDT77 (**29**) foi  
 12 submetido à reação de oxidação com solução de clorito de sódio, conforme  
 13 procedimento descrito por Queiroz (2015) [62] (Figura 17), fornecendo o  
 14 derivado LDT380 (**28**), como sólido branco, ponto de fusão 91,9-93,9 °C,  
 15 rendimento de 89 % e Rf 0,67 (Hex:AcOEt). A presença do grupo carboxila foi  
 16 confirmada pelo simpleto largo em 11,78 ppm, referente ao hidrogênio da  
 17 carboxila, e deslocamento em 174,9 ppm referente à carbonila nos espectros  
 18 de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , respectivamente (Anexo 11 e 12, pág 163 e  
 19 164; Anexo 13, pág 165).

20 A Figura 17 apresenta a rota sintética para obtenção do ácido  
 21 isoanacárdico (**28**, LDT380) a partir do cardanol (**26**, LDT10) via o aldeído  
 22 LDT77 (**29**)

23

24

1 **Figura 17** - Derivados sintetizados a partir do cardanol saturado (LDT10, **26**)



2  
 3 (i)  $\text{MgBr}_2$ , TEA,  $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ , THF, 80 °C, 8 h, 84 %; (ii)  $\text{NaClO}_2/\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ , DMSO,  
 4 DCM, t.a., 16 h, 89%.

5

6 **4.1.4 Derivados ésteres metílicos dos ácidos anacárdico (**26**, LDT11) e**  
 7 **isoanacárdico saturados (**28**, LDT380)**

8

9 Para obtenção da metilação seletiva dos grupos ácidos na presença do  
 10 fenol, os derivados LDT11 (**27**) e LDT380 (**28**) foram submetidos à reação de  
 11 esterificação de Fisher em metanol, sob catálise com ácido sulfúrico, em  
 12 refluxo conforme procedimento descrito por Queiroz (2015) [62] levando aos  
 13 ésteres LDT29 (**30**) e LDT381 (**31**), respectivamente.

14 A reação forneceu derivado LDT29 (**30**), monometilado em rendimento  
 15 de 80 %, como sólido branco, ponto de fusão 37-40 °C, Rf 0,6 (Hex:AcOEt;  
 16 8:2). A esterificação de Fisher foi escolhida por favorecer a formação do éster  
 17 benzílico e preservar a hidroxila fenólica, para posterior substituição com a  
 18 fosfocolina, conforme planejamento estrutural (Figura **12**).

19 O éster LDT29 (**30**) foi caracterizado pela presença do sinal  
 20 característico da metoxila como simpleto em 3,97 ppm em RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo  
 21 14, pág.166) e deslocamento químico em 52,3 ppm em RMN de  $^{13}\text{C}$  (Anexo  
 22 15, pág.167). A hidroxila fenólica, em ligação de hidrogênio intramolecular, foi  
 23 observada pela presença de simpleto em 11,09 ppm em RMN de  $^1\text{H}$ . No  
 24 espectro de massas de alta resolução foi obtida a massa do intermediário

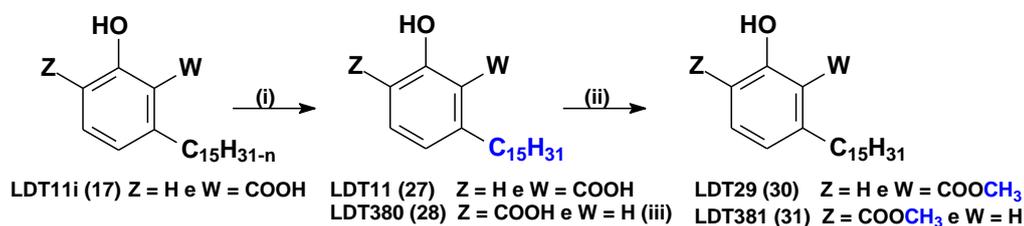
1 LDT29 (**30**) como produto relativo à massa ionizada (M·H)<sup>-</sup> de 361,49 g/mol  
2 (Anexo 16, Pág. 168).

3 Por sua vez, o isoanacardato de metila LDT381 (**31**) foi obtido em  
4 rendimentos de 90 %, como sólido branco, ponto de fusão 40,5-42,6 °C, Rf  
5 0,57 (Hex:DCM). A presença do grupo metoxila foi confirmada pelo simpleto  
6 em 3,94 ppm e pelo deslocamento em 52,3 ppm nos respectivos espectros de  
7 RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C (Anexo 17, 18 e 19, Pág 169, 170 e 171). No  
8 espectro de massas foi obtida a massa do LDT381 (**31**) como produto relativo  
9 à massa ionizada (M·H)<sup>-</sup> de 361,50 g/mol (Anexo 20, pág 172).

10 A Figura **18** apresenta a rota sintética para obtenção dos ésteres  
11 metílicos do ácidos anacárdico (**27**, LDT11) e isoanacárdico (**28**, LDT380).

12

13 **Figura 18** - Rota sintética para obtenção dos derivados LDT29 (**30**) e LDT381  
14 (**31**)



15

16 (i) H<sub>2</sub> (60 psi), Pd/C, EtOH, t.a. 6 h; LDT11 (**27**) 70%. (ii) MeOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 70 °C, 18h, LDT29  
17 (**30**) 80 %; LDT381 (**31**) 90%.

18

#### 19 **4.1.5 Derivados álcoois obtidos a partir da mistura de cardanois e ácidos** 20 **anacárdicos insaturados**

21

22 A mistura de cardanois (LDT10i, **18**) destilada obtida na forma de LCC  
23 técnico, fornecida pela empresa Resibras, foi purificada em coluna de gel de  
24 sílica eluída com mistura de hexanos e acetato de etila com rendimento de 80  
25 % em relação à massa utilizada. A mistura foi comparada com padrão

1 presente no laboratório, apresentando Rf 0,35 (Hex:DCM; 1:1) não tendo sido  
2 caracterizada por espectroscopia. O LCC técnico foi utilizado para obtenção  
3 da mistura de cardanol por apresentar maior concentração desses lipídeos  
4 fenólicos, em virtude do processo de descarboxilação do ácido anacárdico  
5 que ocorre em altas temperaturas durante o processo de extração das  
6 amêndoas [44, 45].

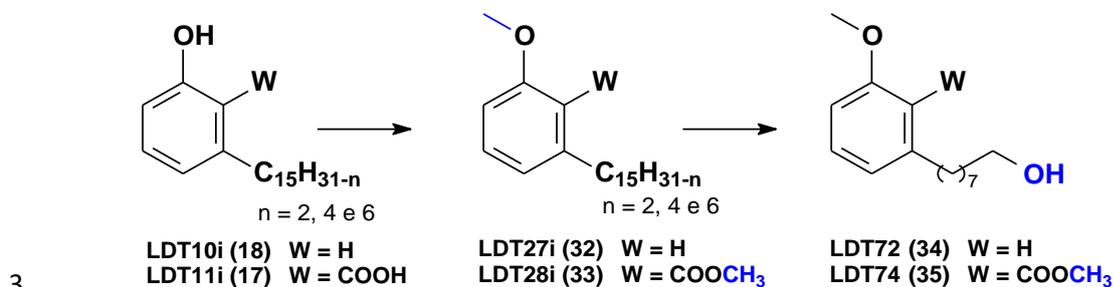
7 A mistura de ácidos anacárdicos foi obtida a partir do LCC *in natura*  
8 extraído a partir do mesocarpo esponjoso das cascas das castanhas de caju  
9 com etanol a 95 %, em aparelho de Soxhlet. A extração por Soxhlet é uma  
10 técnica reconhecida na literatura para extração do LCC e que tem como  
11 vantagem bom rendimento e redução da quantidade de solvente necessária  
12 para extração [45, 65]. Por sua vez, a mistura de ácidos anacárdicos (LDT11i,  
13 **17**) foi obtida como descrita anteriormente (4.1.2).

14 A partir das mistura de cardanois (LDT10i, **18**) e de ácidos anacárdicos  
15 (LDT11i, **17**) foram realizadas reações de O-metilação com iodeto de metila,  
16 fornecendo as respectivas misturas metiladas LDT27i (**32**) e LDT28i (**33**)  
17 (Figura **19**) em respectivos rendimentos de 80 % e 90 % obtidas como óleos  
18 marrons e Rfs 0,6 em (Hex:DCM) e 0,36 (Hex:AcOEt; 95 %:5 %). Os esterés  
19 e éteres apresentam LogP maior do que ácidos e fenóis que os originaram. A  
20 esterificação do ácido carboxílico e eterificação da hidroxila fenólica visou a  
21 manutenção da contribuição lipofílica conforme o planejamento dos derivados.  
22 De posse das misturas metiladas foram realizadas clivagens oxidativas das  
23 insaturações nas cadeias laterais por meio da reação de ozonólise e posterior  
24 tratamento redutivo com boridreto de sódio, conforme descrito por Lemes  
25 (2013) [63], fornecendo os derivados álcoois LDT72 (**34**) e LDT74 (**35**),  
26 respectivamente, com a cadeia lateral de 8 metilenos (Figura **19**).

27

28

- 1 **Figura 19** - Rota sintética para obtenção dos derivados álcoois LDT72 (**34**) e  
 2 LDT74 (**35**)



- 4 (i) CH<sub>3</sub>I, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 70 °C, 20 h; LDT27i (**32**) 80 %; LDT28i (**33**) 90 % (ii) 1. O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>,  
 5 DCM:MeOH, - 70 °C, 60 min 2. NaBH<sub>4</sub>, MeOH:EtOH, - 70 °C; t.a. 18 h; LDT72 (**34**) 85 %;  
 6 LDT74 (**35**) 80%.

7

8 O derivado LDT72 (**34**) foi obtido em sua forma pura como óleo incolor,  
 9 R<sub>f</sub> 0,4 (DCM). A formação do derivado LDT72 (**34**) foi caracterizada pela  
 10 ausência de assinalamentos relacionados à região dos hidrogênios olefínicos  
 11 bem como pela presença de tripleto em 3,64 ppm em RMN de <sup>1</sup>H (Anexo 21,  
 12 Pág. 173), referente ao grupo metileno ligado à hidroxila (8'), confirmado pelo  
 13 sinal de 63,2 ppm em RMN de <sup>13</sup>C (Anexo 22, Pág. 174). Adicionalmente, os  
 14 assinamentos simpleto em 3,81 ppm em RMN de <sup>1</sup>H e 52,3 ppm em RMN  
 15 de <sup>13</sup>C confirmam a presença do grupo metoxila. No espectro de massas de  
 16 alta resolução foi obtida a massa do derivado LDT72 (**34**) como sal de sódio  
 17 e pico a 259,04 g/mol, bem como produto relativo à massa ionizada (M<sup>+</sup>H)<sup>+</sup> de  
 18 236,98 g/mol (Anexo 23, Pág. 175).

19 Por sua vez, o hidroxiéster LDT74 (**35**) foi caracterizado pela presença  
 20 de tripleto em 3,61 ppm em RMN de <sup>1</sup>H (Anexo 24, Pág. 176), referente ao  
 21 grupo metileno ligado à hidroxila (H8'), confirmado pelo sinal em 63,1 ppm em  
 22 RMN de <sup>13</sup>C (Anexo 25, Pág. 177). As presenças das metoxilas fenólica – 3,80  
 23 ppm e 52,3 ppm e do grupo éster – 3,90 ppm e 56,2 ppm – em seus  
 24 respectivos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C confirmam as reações de  
 25 metilação. Adicionalmente, o sinal 169,2 ppm em RMN de <sup>13</sup>C corresponde à

1 carbonila do grupo carbometoxila. O espectro de massas de alta resolução  
2 registrou a massa do intermediário LDT74 (**35**) como sal de sódio e pico a  
3 317,18 g/mol, bem como produto relativo à massa ionizada (M<sup>+</sup>H)<sup>+</sup> de 294,83  
4 g/mol (Anexo 26, Pág. 178).

5

#### 6 **4.1.6 Obtenção dos derivados lipídeos fosfocolínicos**

7

8 Os análogos de lipídeos fosfocolínicos foram sintetizados por  
9 fosforilação dos intermediários lipídeos álcoois (LDT72, **34**; LDT74, **35**), ou  
10 dos intermediários lipídeos fenólicos de cadeia saturada com 15 átomos  
11 (LDT10, **26**; LDT29, **30**; LDT381, **31**) conforme procedimento sintético descrito  
12 por Calogeropoulou (2008), fornecendo os derivados LDT301 (**21**), LDT302  
13 (**22**), LDT303 (**23**), LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**). A síntese compreendeu duas  
14 etapas, sendo que inicialmente os respectivos álcoois ou fenóis foram  
15 fosforilados utilizando cloreto de fosforila (POCl<sub>3</sub>) e trietilamina em THF. Esta  
16 etapa foi realizada de forma lenta, adicionando-se gota a gota a solução  
17 contendo o álcool ou fenol, visando minimizar o risco de formação de  
18 subprodutos. Após hidrólise, extração e tratamento com piridina obteve-se o  
19 sal piridínio, que foi submetido à reação com tosilato de colina na presença  
20 do agente de condensação MSNT, comumente utilizado como um agente de  
21 condensação para síntese de oligonucleotídeos, para catalisar a formação da  
22 fosfocolina. Os derivados fosfocolínicos em rendimentos que variaram de 28  
23 % a 57 %, como sólidos ou líquidos viscosos, R<sub>f</sub> 0,25 a 0,60 (MeOH),  
24 conforme apresentados na Tabela 1.

25

1 **Tabela 1** - Massa molar, rendimento, estado físico e Rf dos derivados  
2 fosfocolínicos

Derivado	MM (g $\text{mol}^{-1}$ )	R (%)	Estado físico	Rf (MeOH)
LDT301	469,65	52	Sólido	0,60
LDT302	527,68	28	Sólido	0,45
LDT303	527,68	48	Sólido	0,45
LDT304	401,48	67	Líquido viscoso	0,30
LDT305	459,52	47	Líquido viscoso	0,25

3 MM = Massa Molar. R = Rendimento. Rf = Fator de Retenção

4

5 Os derivados lipídicos fosfocolínicos foram caracterizados por  
6 espectrometria de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , RMN de  $^{31}\text{P}$  ratificando a presença  
7 do grupo fosfocolina, conforme apresentado na Tabela 2. No espectro de  
8 massas de alta resolução foi obtida a massa dos derivados como sal de sódio,  
9 bem como produto relativo à massa ionizada ( $\text{M}^+\text{H}^+$ ), confirmando a formação  
10 dos produtos (Anexo 27 a 49, Pág. 179 a 201)

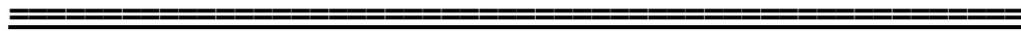
11

12 **Tabela 2** - Caracterização por espectroscopia RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , RMN  
13 de  $^{31}\text{P}$  e MS (ESI)

	LDT301	LDT302	LDT303	LDT304	LDT305
RMN $^1\text{H}$ a	6,93	4,25	4,50	4,25	4,26
RMN $^{13}\text{C}$ a	67,3	67,4	67,5	66,9	66,9
RMN $^1\text{H}$ b	3,64	3,54-3,57	3,74	3,63	3,63
RMN $^{13}\text{C}$ b	60,9	60,9	61,1	60,2	60,2
RMN $^1\text{H}$ c	3,19	3,09	3,26	3,22	3,32
RMN $^{13}\text{C}$ c	54,6	54,6	54,6	54,7	54,7
RMN $^{31}\text{P}$	-5,64	-6,42	-6,02	-0,04	-0,06
MS (ESI) m/z	470,40 [ $\text{M}^+\text{H}$ ] <sup>+</sup> , 492,25 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ] <sup>+</sup>	550,24 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ] <sup>+</sup>	550,32 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ] <sup>+</sup>	402,24 [ $\text{M}^+\text{H}$ ] <sup>+</sup> , 424,22 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ] <sup>+</sup>	460,24 [ $\text{M}^+\text{H}$ ] <sup>+</sup> , 482,22 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ] <sup>+</sup>

14 \*Resultados de RMN são apresentados em ppm

1



2

# CAPÍTULO 5

3



4

5

6

7

8

9

10

11

12

13 Avaliação tripanocida frente ao *Trypanosoma*

14

*cruzi*

15

16

17

18

19

20

21

22

23



24

## ***Resultado e Discussão***

25



26

27

## 1 5 RESULTADO E DISCUSSÃO - ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DOS 2 ANÁLOGOS FOSFOLIPÍDEOS

3

### 4 5.1 TRIAGEM DOS ANÁLOGOS DE LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS EM 5 EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

6

7

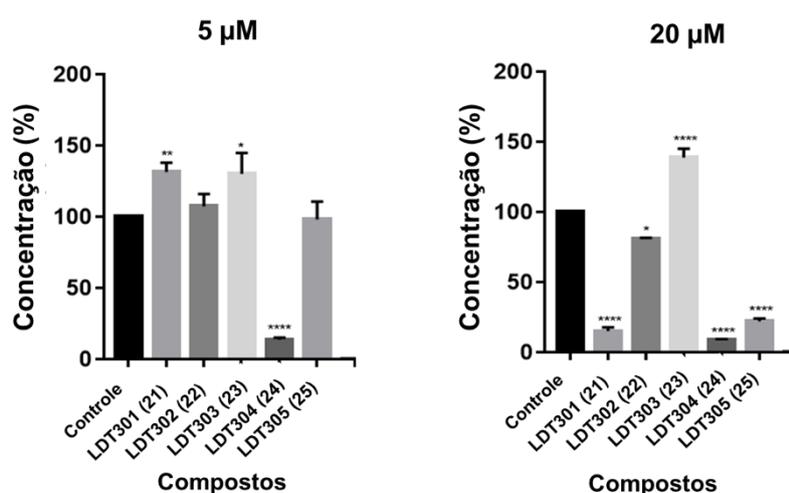
8 Para avaliar a atividade dos análogos fosfolipídeos em epimastigotas  
9 de *T. cruzi*, os compostos LDT301 (**21**), LDT302 (**22**), LDT303 (**23**), LDT304  
10 (**24**) e LDT305 (**25**) foram inicialmente submetidos a triagem nas  
11 concentrações iniciais de 5,0  $\mu\text{M}$  e 20,0  $\mu\text{M}$  utilizando o ensaio de viabilidade  
12 celular MTS/PMS. Como pode ser observado na Figura **20**, apenas o  
13 composto LDT304 (**24**) reduziu significativamente a viabilidade celular de  
14 epimastigotas na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$ . Com o aumento da concentração  
15 a 20,0  $\mu\text{M}$ , os compostos LDT301 (**21**), LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**)  
16 apresentaram redução significativa da viabilidade celular.

17

18 **Figura 20** - Viabilidade celular de epimastigotas tratados com 5,0  $\mu\text{M}$  e 20,0  
19  $\mu\text{M}$  dos análogos lipídeos fosfocolínicos

20

21



22

23

24

25

26

Viabilidade de epimastigotas tratados com 5,0  $\mu\text{M}$  e 20,0  $\mu\text{M}$  de análogos de fosfolipídeos. A viabilidade dos parasitos nas culturas foi avaliada 72 h após o tratamento, utilizando o ensaio de viabilidade celular MTS/PMS, quantificando por espectrofotometria (490 nm). Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão (barras) de experimentos em triplicata.

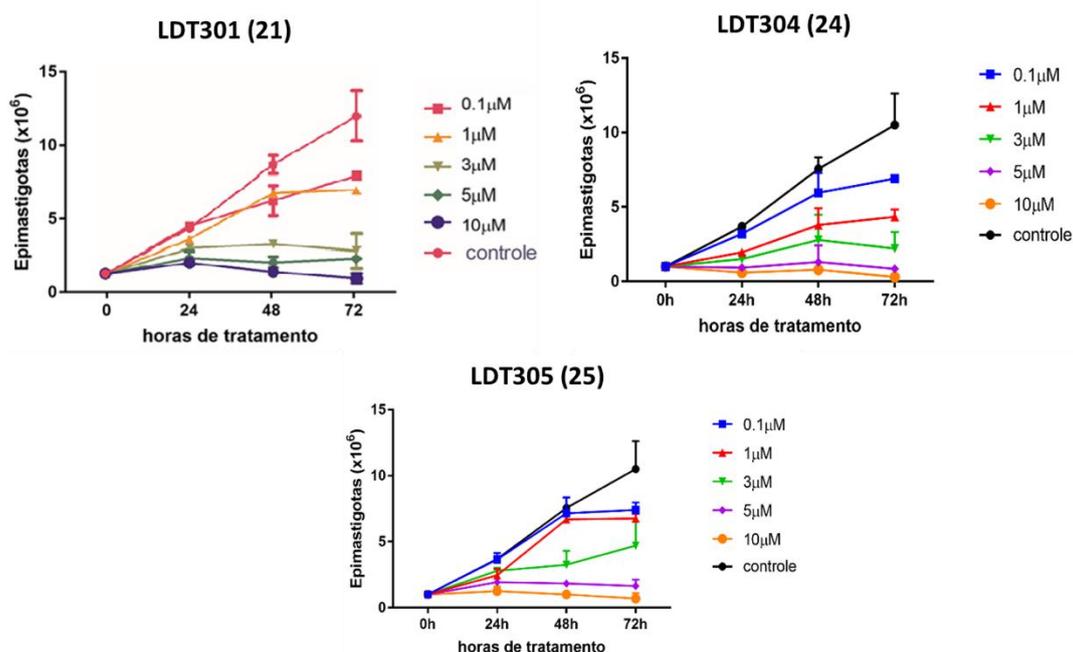
1 5.2 EFEITOS DOS ANÁLOGOS FOSFOLIPÍDEOS SOBRE A  
 2 PROLIFERAÇÃO DE EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

3

4 Os compostos que apresentaram inibição maior que 50 % na triagem  
 5 de viabilidade celular, LDT301 (**21**), LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**), foram  
 6 avaliados frente ao efeito antiproliferativo sobre epimastigotas de *T. cruzi* em  
 7 24 h, 48 h e 72 h de tratamento, conforme observado nas curvas dose x  
 8 resposta apresentadas na Figura **21**

9

10 **Figura 21** - Curva dose-resposta do efeito dos análogos lipídeos  
 11 fosfocolínicos sobre a proliferação de epimastigotas de *T. cruzi*



12

13 Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão (barras) de experimentos em triplicata. A medidas  
 14 foram realizadas em 24 h, 48 h e 72 h, em cinco concentrações diferentes. A densidade de células foi  
 15 mensurada utilizando citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus – contagem limite de 10000 eventos por  
 16 segundo.

17

18 A partir das curvas obtidas foram calculados os valores de IC<sub>50</sub> para os  
 19 derivados LDT301 (**21**), LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) considerando a  
 20 proliferação de epimastigotas em 24 h, 48 h e 72 h de tratamento. Os  
 21 resultados estão apresentados na Tabela **3**. Conforme pode ser observado na

1 Figura 21 e Tabela 3, os compostos foram efetivos reduzindo a proliferação  
 2 de epimastigotas de *T. cruzi*, tendo demonstrado respostas dose e tempo  
 3 dependentes em relação aos compostos utilizados.

4

5 **Tabela 3** – Concentração inibória (IC<sub>50</sub>) de epimastigotas após tratamento  
 6 com análogos de fosfolipídeos por 24, 48 e 72 h.

Composto	IC <sub>50</sub> (24h)	IC <sub>50</sub> (48h)	IC <sub>50</sub> (72h)
<b>LDT304 (TC387)</b>	3,30 µM	1,30 µM	0,61µM
<b>LDT301 (TC386)</b>	3,85 µM	2,89 µM	2,75 µM
<b>LDT305 (TC388)</b>	4,95 µM	4,72 µM	3,30 µM

7

8 Os dados foram obtidos a partir da quantificação celular por citometria de fluxo e contagem em Câmara  
 9 de Neubauer, plotagem em gráficos e análise através do programa *GraphPad Prism 7*.

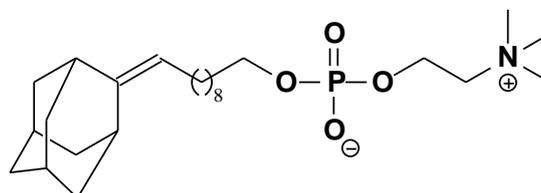
10

11

12 O composto LDT304 (**24**) apresentou maior inibição nos tempos  
 13 estudados com Concentração inibitória em 50% (IC<sub>50</sub>) de 3,30 µM (24 h), 1,30  
 14 µM (48 h) e 0,61 µM (72 h), respectivamente. O segundo composto mais  
 15 potente foi o LDT301 (**21**), com IC<sub>50</sub> de 3,85 µM (24 h), 2,89 µM (48 h), e 2,75  
 16 µM (72 h), seguido do LDT305 (**25**) com IC<sub>50</sub> 4,95 µM (24 h), 4,72 µM (48 h)  
 17 e 3,30 µM (72 h), após as h de tratamento determinadas.

18 A atividade antiproliferativa desses lipídeos fosfocolínicos foi superior à  
 19 descrita para miltefosina (**8**) no estudo de Santa-Rita et al (2000) [66] frente a  
 20 epimastigotas que apresentou para miltefosina (**8**) IC<sub>50</sub> de 17,4 µM (24 h), 9,2  
 21 µM (48 h), e 8,0 µM (72 h). O análogo estrutural da miltefosina (**8**), TCAN26  
 22 (**36**) – que consiste em um cicloalquilfosfolipídeo contendo o anel cicloalcano  
 23 adamantila (Figura 22) – na subunidade lipídica, foi descrito com atividade  
 24 promissora frente a epimastigotas de *T. cruzi*, apresentando IC<sub>50</sub> de 2,0 µM e  
 25 1,53 µM em 24 e 72 h de tratamento, respectivamente. Observa-se que o  
 26 composto LDT304 (**24**) apresentou atividade 2,5 vezes maior que o TCAN26  
 27 em 72 h (**36**).

- 1 **Figura 22** - Estrutura do análogo fosfolipídeos da miltefosina,  
 2 cicloalquilfosfolipídeo TCAN26 (**36**).



3 TCAN26 (**36**)

4

5 5.3 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE  
 6 TRIPOMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

7

8

9 Tem sido demonstrado que AFL são capazes de acumular na  
 10 membrana das células, interferir na transdução de sinalização celular baseada  
 11 em lipídeos e também na biossíntese de fosfolipídeos [67]. Esses  
 12 mecanismos corroboram para alteração da permeabilidade da membrana e  
 13 também para a morte celular. O efeito dos lipídeos fosfocolínicos LDT304 (**24**)  
 14 e LDT305 (**25**) foi avaliado sobre a membrana de células tripomastigotas  
 15 marcadas com iodeto de propídeos (PI) por meio de citometria de fluxo. As  
 16 tripomastigotas foram tratadas com os análogos fosfolipídeos por 24 h com  
 17 aumento da concentração de 1,0  $\mu\text{M}$  a 10,0  $\mu\text{M}$ , incubadas com PI e  
 18 posteriormente analisadas por citometria de fluxo. O PI é um pequeno  
 19 marcador fluorescente que tem a capacidade de se ligar ao DNA, mas que  
 20 não penetra passivamente em células com a membrana intacta. A captação e  
 21 exclusão de PI é então utilizada para discriminar células mortas, nas quais a  
 22 membrana se torna permeável, de células vivas intactas [68].

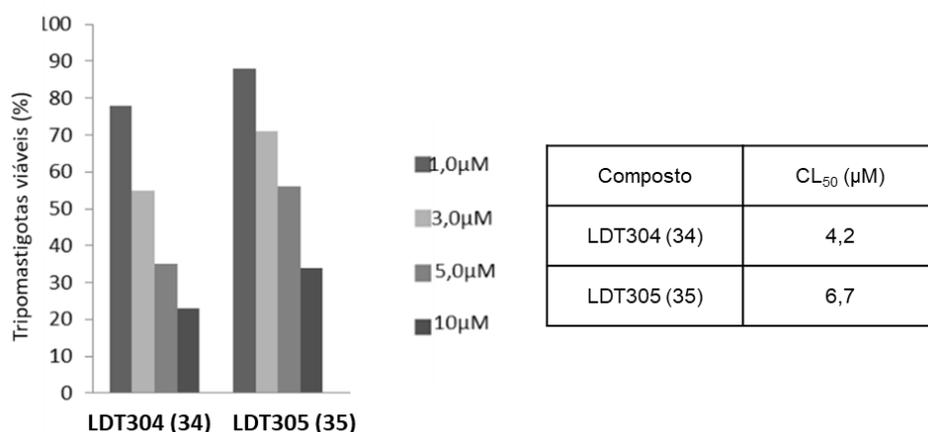
23

24 Como pode ser observado na Figura **23**, os compostos LDT304 (**24**) e  
 25 LDT305 (**25**) levaram a perda da integridade de membrana com resposta  
 26 concentração dependente. O tratamento com os análogos lipídeos  
 fosfocolínicos induziu a permeabilização da membrana plasmática do parasito

1 e consequente perda de viabilidade celular, apresentando os valores de IC<sub>50</sub>  
 2 de 4,2 μM e 6,7 μM, respectivamente.

3

4 **Figura 23** - Avaliação de integridade da membrana plasmática de  
 5 tripomastigotas de *T. cruzi*



6

7 Análise por citometria de fluxo da integridade da membrana plasmática em tripomastigotas de *T. cruzi*  
 8 por meio da marcação com iodeto de propídio (PI). Como controle positivo, os tripomastigotas foram  
 9 incubados com 0,1% de saponina (dado suprimido). Os gráficos apresentam a média de quatro  
 10 experimentos independentes e o CL<sub>50</sub> foi obtido via porcentagem de viabilidade em cada concentração  
 11 comparada ao controle não tratado.

12

13

14

#### 15 5.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES DE COMPOSTOS ANÁLOGOS LIPÍDEOS 16 FOSFOCOLÍNICOS EM AMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

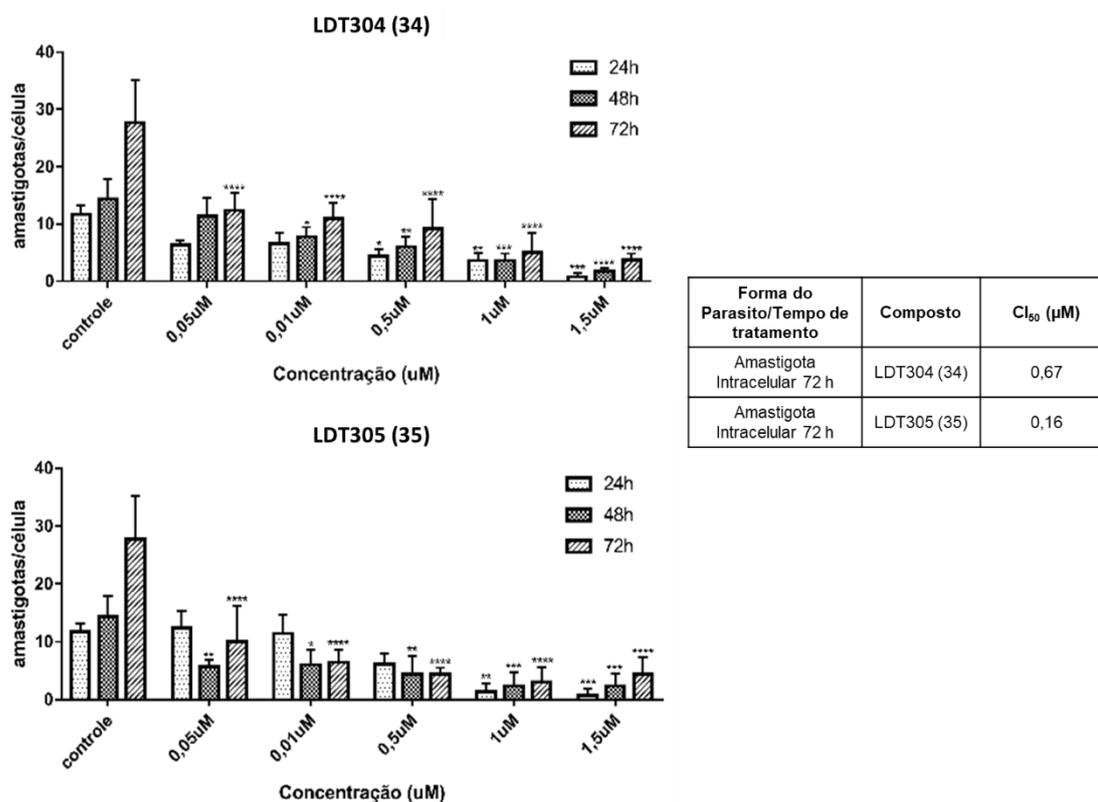
17

18 Considerando os resultados obtidos para epimastigotas e  
 19 tripomastigotas, os compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) foram testados  
 20 frente a amastigotas intracelulares com o objetivo de verificar a atuação dos  
 21 compostos nesse estágio de desenvolvimento intracelular. Células HFF-1 com  
 22 amastigotas intracelulares foram tratadas por 24, 48 e 72 h com concentração  
 23 entre 0,05 μM e 1,5 μM. A Figura **24** apresenta a curva concentração repostada  
 24 para os compostos podendo-se observar diminuição na proliferação de  
 25 amastigotas com resposta concentração dependente. Após 72 h de  
 26 tratamento o LDT304 (**24**) apresentou IC<sub>50</sub> de 0,67 μM, próximo aos valores

1 observados para forma epimastigota que foi  $IC_{50}$  de  $0,61 \mu M$ . Já o composto  
 2 LDT305 (**25**) apresentou efeito superior sobre as formas de amastigotas  
 3 intracelulares com  $IC_{50}$  de  $0,16 \mu M$ , valor 20 vezes menor do que o observado  
 4 para epimastigotas que foi de  $3,3 \mu M$ , tendo sido mais efetivo na forma  
 5 intracelular que está associada às manifestações clínicas da doença.  
 6 Comparando ao resultado obtido por Santa-Rita et al (2000) [66] do efeito da  
 7 miltefosina (**8**) sobre amastigotas intracelulares, o valor de  $IC_{50}$  foi de  $4,2 \mu M$   
 8 em 72 h de tratamento, também exibindo efeito maior sobre a forma  
 9 amastigota do que a epimastigota ( $IC_{50}$   $8,0 \mu M$ ). Considerando os resultados  
 10 obtidos por Santa-Rita et al (2000) [66], os análogos lipídeos fosfocolínicos  
 11 LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) apresentaram atividade superior a da miltefosina  
 12 (**8**).

13

14 **Figura 24 - Avaliação da proliferação de amastigotas intracelulares**



15

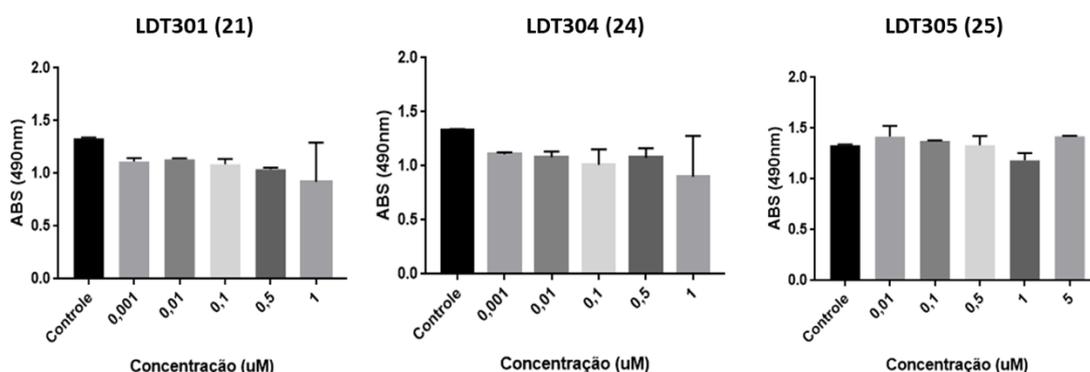
16 Proliferação de amastigotas intracelulares em HFF-1 tratados com análogos lipídeos fosfocolínicos.  
 17 Valores representam média  $\pm$  DP de 3 experimentos em duplicata.  $P < 0,05$ .

18

## 5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS ANÁLOGOS FOSFOLIPÍDEOS EM CÉLULAS LLC-MK<sub>2</sub>

Avaliação dos análogos fosfolipídeos em células LLC-MK<sub>2</sub>, oriundas de rim de macaco-Rhesus (*Macaca mulatta*), foi realizada considerando que essas células são hospedeiras e utilizadas para cultivo de tripomastigotas e obtenção de amastigotas intracelulares com o objetivo de verificar possível toxicidade celular. Foi realizado o ensaio de viabilidade celular MTS/PMS em células LLC-MK<sub>2</sub> não infectadas, avaliando o resultado após 72 h de tratamento. As concentrações foram definidas com base no teste de viabilidade e proliferação celular em epimastigotas como forma de comparação. As curvas com os resultados obtidos estão expressas na Figura 25.

**Figura 25** - Citotoxicidade dos compostos LDT301 (21), LDT304 (24) e LDT305 (25) em células LLC-MK<sub>2</sub> após 72 h de tratamento.



Para a análise, utilizou-se o leitor de microplacas Spectra Max Molecular Devices M2, com comprimento de onda de 490nm. As concentrações foram definidas com base no teste de viabilidade e proliferação celular em epimastigotas como forma de comparação.

A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que os compostos não apresentam citotoxicidade nas concentrações testadas, após 72 h de tratamento, frente às células LLC-MK<sub>2</sub>. Com base nos resultados não foi

1 possível calcular a concentração citotóxica em 50% (CC<sub>50</sub>), já que dentro das  
2 faixas de concentração definidas não houve redução de 50 % da viabilidade  
3 em nenhum dos pontos, porém pode-se relacionar que nas concentrações  
4 que os compostos exercem citotoxicidade/inibição da proliferação sobre formas  
5 evolutivas de *T. cruzi*. Adicionalmente, não observou-se toxicidade nas células  
6 hospedeiras LLC-MK2 que são utilizadas para testes *in vitro*. Avaliação em  
7 células humanas, mesmo que *in vitro*, seria importante para ter uma melhor  
8 correlação da possível citotoxicidade.

9

## 10 5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM CÉLULAS 11 DA LINHAGEM HEPG2

12

13

14 Uma das preocupações com relação ao desenvolvimento de novas  
15 substâncias com propriedades ativas é a seletividade frente ao organismo. A  
16 toxicidade hepática é um dos parâmetros na avaliação da toxicidade de  
17 compostos. O possível efeitos hepatotóxicos *in vitro* dos análogos LDT304  
18 (**24**) e LDT305 (**25**) foi avaliado em linhagem celular HEPG2 por meio do  
19 ensaio de redução da resazurina, cujos resultados estão apresentados na  
20 Figura **26**.

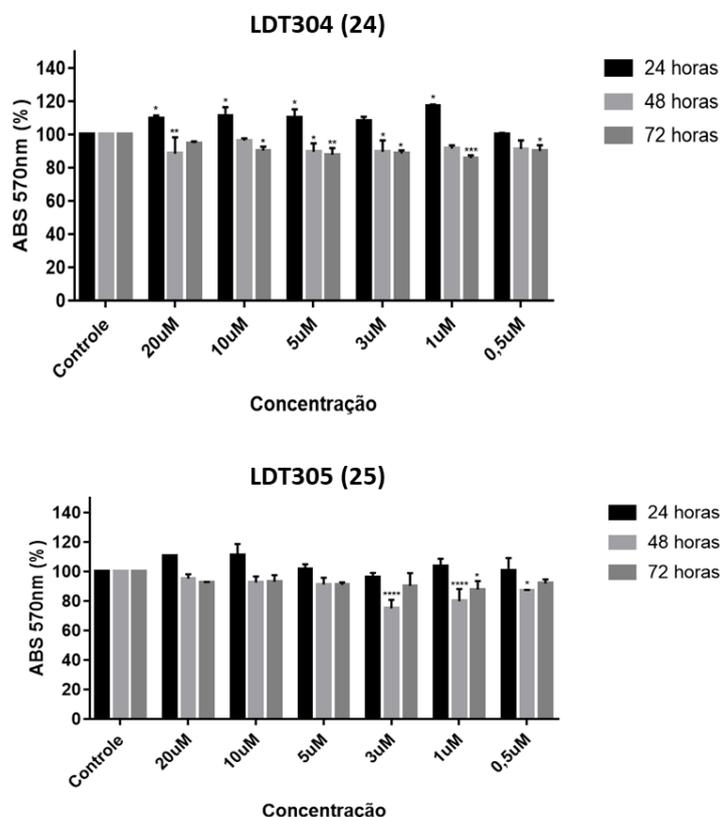
21 Também não foi possível determinar as CC<sub>50</sub>, já que dentro da faixa de  
22 concentração definida não houve redução de 50 % da viabilidade celular em  
23 nenhum dos pontos, sendo a maior redução observada pouco abaixo de 80  
24 %, causada pelo composto LDT305 (**25**), a 3,0 µM, por 48 h, sendo que não  
25 houve linearidade frente à resposta concentração dependente nas menores  
26 concentrações para esse composto.

27 Embora não tenha sido possível determinar a CC<sub>50</sub>, se os resultados  
28 obtidos no ensaio com a linhagem HEPG2 forem comparados às  
29 concentrações de IC<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub> obtidas nos ensaios com *T. cruzi*, pode-se inferir  
30 que concentrações usadas para reduzir a proliferação de tripomastigotas e

1 amastigotas intracelulares de *T. cruzi* não afetarão significativamente células  
 2 hepáticas HEPG2. Entretanto, testes mais avançados, como *in vivo* por  
 3 exemplo, devem ser realizados para uma análise mais aprofundada da  
 4 toxicidade.

5

6 **Figura 26** - Hepatotoxicidade dos compostos em células da linhagem HEPG2



7

8 Hepatotoxicidade dos compostos APLs avaliada em células da linhagem HEPG2.  $P < 0,05$ .

9

## 10 5.7 EFEITOS DOS ANÁLOGOS DE FOSFOLIPÍDEOS NA MORFOLOGIA 11 DE EPIMASTIGOTAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

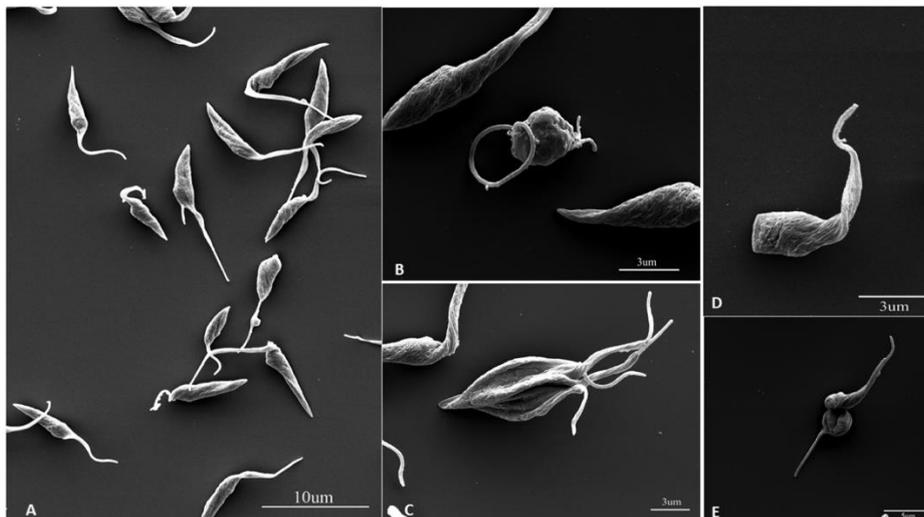
12

13 Os compostos LD304 (**24**) e LDT305 (**25**) foram avaliados frente ao  
 14 efeito sobre a morfologia e estrutura de formas epimastigotas de *T. cruzi*  
 15 utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). As concentrações de

1 tratamento foram determinadas a partir da média aproximada dos IC<sub>50</sub> em 24,  
2 48 e 72 h. Os compostos LD304 (**24**) e LDT305 (**25**) foram testados nas  
3 concentrações de 1,0 µM e 4,0 µM, respectivamente, com tratamento por 72  
4 h. Os resultados observados por meio da microscopia eletrônica de varredura  
5 estão apresentados nas Figuras **27** e **28**. Foram observadas alterações  
6 morfológicas nos epimastigotas tratados com os lipídeos fosfocolínicos. As  
7 principais alterações observadas foram no corpo e no flagelo, assim como  
8 alteração no processo de divisão celular.

9 As epimastigotas tratadas com LDT304 (**24**) apresentaram mudanças  
10 morfológicas na célula, problemas na membrana e deformidade no flagelo,  
11 conforme observado na Figura **27 (27.D)**. Também foi observado alterações  
12 no processo de divisão celular com formação de célula com vários flagelos  
13 (Figura **27.C**) ou da morfologia das epimastigotas que perderam a forma típica  
14 em comparação ao controle (Figura **27.E**). De forma semelhante, as  
15 epimastigotas tratadas com LDT305 (**25**) apresentaram alterações no  
16 processo de divisão celular, assim como formação de células com vários  
17 flagelos e mudanças morfológicas com perda da forma alongada típica,  
18 adquirindo forma mais arredondada e deformidade flagelar (Figuras **28.B**,  
19 **28.C**, **28.D**). As formas epimastigotas que não passaram por tratamento  
20 (controle) apresentaram típica forma alongada e sem alterações morfológicas,  
21 conforme observado no controle (Figuras **27.A** e **28.A**).

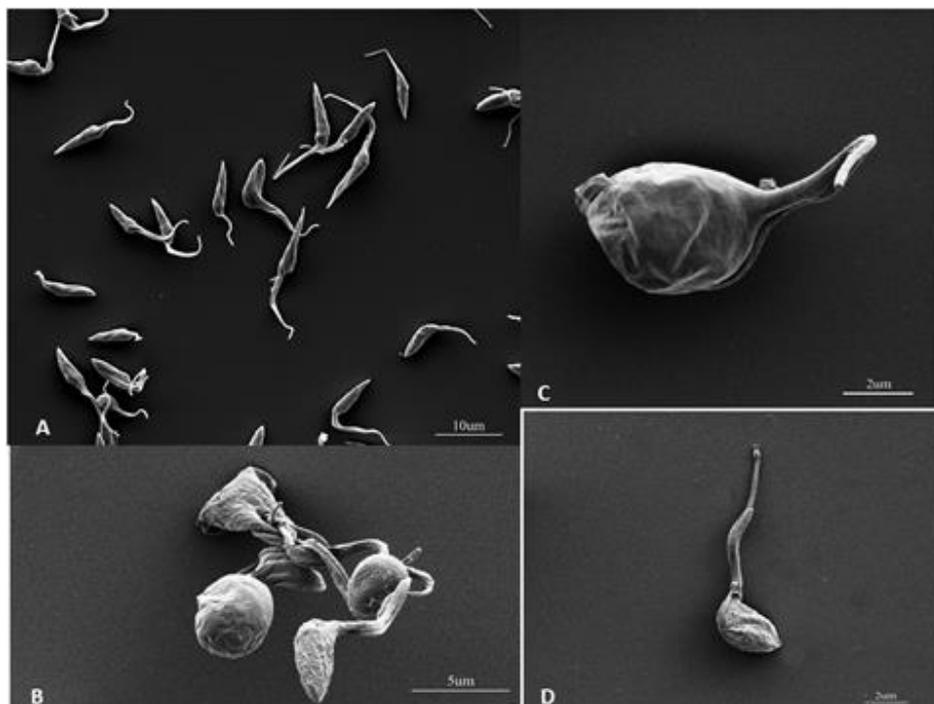
- 1 **Figura 27** - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de epimastigotas  
 2 tratados com o composto LDT304 (24)



- 3  
 4 Em (A) observamos a integridade das células não tratadas – controle. Em (B), (C), (D) e (E) são imagens  
 5 de células tratadas.

6  
 7

- 8 **Figura 28** - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de epimastigotas  
 9 tratados com o composto LDT305 (25)



- 10  
 11 Em (A) observamos a integridade das células não tratadas – controle. B, C, D mostram células tratadas

1 A forma epimastigota é alongada e apresenta um único flagelo. A  
2 presença de múltiplos flagelos sugere alterações no processo de divisão  
3 celular. Durante a replicação celular o flagelo antigo é mantido e um novo  
4 flagelo é montado a partir do corpo basal, na extremidade da célula. À medida  
5 que o novo flagelo se alonga sua ponta distal permanece em contato com o  
6 antigo. A citocinese é iniciada na extremidade anterior da célula e prossegue  
7 de forma helicoidal, dividindo as células em duas e separando os flagelos [69].

8 Estudos de Kohl et al (2003) [69] demonstraram que o flagelo não  
9 possui apenas função de motilidade, mas também é importante para  
10 morfogênese e divisão celular. Confirmaram também que o flagelo define a  
11 região de iniciação da citocinese e que células com ausência de flagelo  
12 perdem a polaridade da célula e não sofrem citocinese. Demonstraram ainda  
13 que o alongamento do flagelo controla a formação de estruturas  
14 citoesqueléticas. Por fim, verificaram que a perturbação da construção do  
15 flagelo tem como resultado interferência no transporte intraflagelar promovido  
16 por *rafts* entre os microtubulos e a membrana do flagelo [69]. Os  
17 alquilfosfolipídeos têm demonstrado a capacidade de afetar lipídeos *rafts* e  
18 conseqüentemente interferir na transdução de sinal, tráfico de lipídeos e  
19 processos de divisão celular mediada por esses domínios [67].

20

21

## 22 5.8 ANÁLISE DO EFEITO ULTRAESTRUTURAL EM EPIMASTIGOTAS 23 TRATADOS COM OS LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS

24

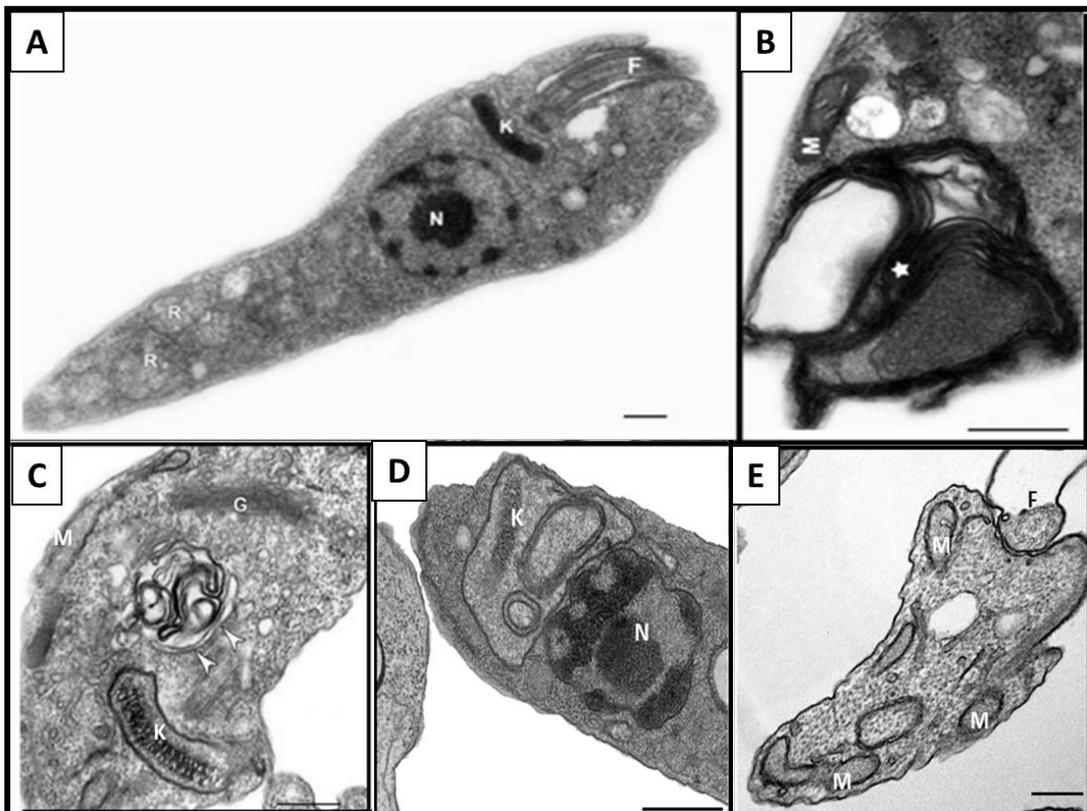
25

26 Por meio de microscopia de transmissão eletrônica (MET) foi  
27 observado que células de epimastigotas após 72 h de tratamento com os  
28 compostos LD304 (**24**) e LDT305 (**25**), Figura **29**, são observadas alterações  
29 na estrutura da célula. Observou-se a presença de figuras de mielina e  
30 vacúolos citoplasmáticos, após o tratamento LDT305 (**25**) (Figura **29.B**) e  
31 LD304 (**24**) (Figura **29.C**). A presença de figuras de mielina e formação de  
32 autofagosomo indica presença de autofagia [71]. O tratamento com LDT305

1 (25) mostrou ainda inchaço no cinetoplasto (Figura 29. D. e 29.E) e também  
 2 inchaço da membrana flagelar (Figura 29.E). Maior número de alterações foi  
 3 observado no grupo tratado com LDT34 (24).

4

5 **Figura 29** - Microscopia Eletrônica de Transmissão de epimastigotas tratados  
 6 com os análogos lipídeos fosfocolínicos



7

8 Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas tratados com os análogos fosfolipídeos por 72  
 9 h. Em (A), está o controle sem tratamento apresenta todas as estruturas preservadas. (C) Tratamento  
 10 com LDT304 (34); (B, D e E) Tratamento com LDT305 (35). Apresentando: **N** = núcleo; **K** = cinetoplasto;  
 11 **GC** = Complexo de Golgi; **F** = flagelo; **V** = vacúolo; **M** = mitocôndria; **ER** = retículo endoplasmático; **G** =  
 12 Glicossomo. Barras = 0,5 μm.

13

14

15 A capacidade dos AFL de interferir na biossíntese de lipídeos pode  
 16 afetar e contribuir para a desintegração do parasito por autofagia. Os lipídeos  
 17 intracelulares são importantes na manutenção de energia e da homeostase  
 18 durante períodos de privação a hidrólise de lipídeos e ácidos graxos induzem  
 19 a autofagia [64]. O LDT305 (25) também levou ao inchaço na membrana do

1 cinetoplasto e na membrana flagelar. Resultados similares foram observados  
2 em estudos utilizando a edelfosina (15) e miltefosina (8), e os efeitos foram  
3 associados à possível interferência no conteúdo lipídico. Os epimastigotas  
4 tratados com esses miltefosina e edelfosina apresentaram inchaço no  
5 cinetoplasto e perda da organização da membrana interna [66, 70, 71]. Além  
6 dessas alterações, observou-se também bolhas na membrana plasmática e  
7 na membrana do flagelo, sugerindo que tanto a membrana quanto a  
8 mitocôndria/cinetoplasto de epimastigotas sejam potenciais alvos desses  
9 compostos AFL [66]. Conforme resultado também observado para o LDT305  
10 (25).

11 Alterações similares foram observadas para epimastigotas tratadas  
12 com TCAN26 (36), resultando em protusões e deslocamento dos folhetos da  
13 membrana plasmática, alterações na membrana do flagelo e desorganização  
14 da membrana mitocondrial interna, com ausência de cristas [64]. Alterações  
15 marcantes foram observadas na membrana dos flagelos, assim como  
16 morfológicas também nos flagelos em epimastigotas tratadas com AFL, sendo  
17 importante relatar que a composição de fosfolípidos na membrana do flagelo  
18 é diferente da encontrada em outras membranas, podendo ter diferente  
19 susceptibilidade [64, 66].

20 O efeito inibitório dos AFL sobre a síntese de lipídeos e desorganização  
21 da membrana em células tumorais tem sido estudado. O principal fosfolípido  
22 envolvido é a PC, e as alterações envolveriam alterações da síntese em várias  
23 etapas e também da translocação da PC [6; 67]. Devido à importância dos  
24 fosfolípidos naturais na homeostase celular, verificar a seletividade desses  
25 compostos também torna-se importante.

26

27

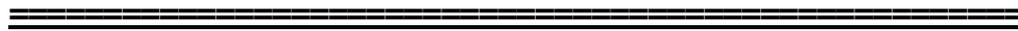
28

29

30

31

1



2

## CAPÍTULO 6

3



4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

**Avaliação da atividade leishmanicida**

14

**frente à *L. amazonensis***

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25



26

***Resultado e Discussão***

27



1 **6 RESULTADO E DISCUSSÃO - AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES DE**  
2 **COMPOSTOS ANÁLOGOS DE FOSFOLÍPÍDEOS EM *LEISHMANIA***  
3 ***AMAZONENSIS***

4

5

6 **6.1 TRIAGEM *IN VITRO* E TRATAMENTO COM OS ANÁLOGOS**  
7 **FOSFOLÍPÍDEOS FRENTE A PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA***  
8 ***AMAZONENSIS* PELO ENSAIO MTS/PMS**

9

10

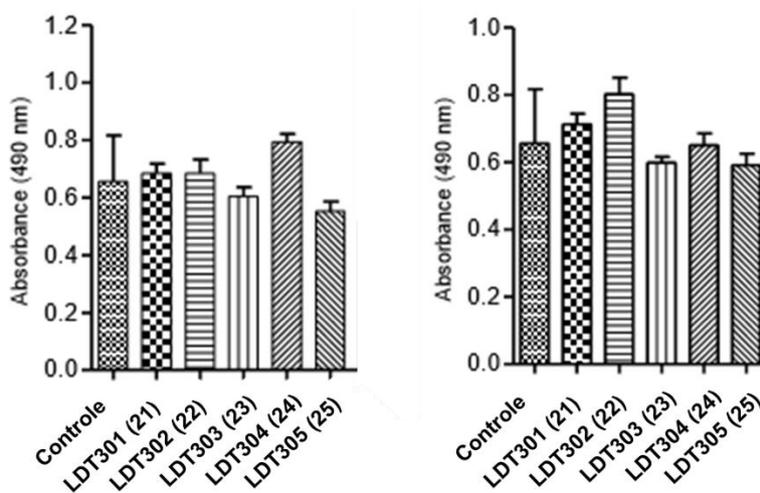
11 Os ensaios de viabilidade celular são frequentemente usados para  
12 fazer a triagem de compostos e determinar se as moléculas testadas  
13 apresentam efeitos sobre a proliferação celular ou mostram efeitos citotóxicos  
14 diretos que eventualmente levam à morte celular [72]. Inicialmente foi utilizado  
15 o teste MTS/PMS como triagem da viabilidade celular dos lipídeos  
16 fosfocolínicos sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.

17 Os promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados com os compostos  
18 LDT301 (**21**), LDT302 (**22**), LDT303 (**23**), LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) nas  
19 concentrações de 5,0  $\mu\text{M}$  e 20,0  $\mu\text{M}$  por 48 h. Os análogos lipídeos  
20 fosfocolínicos não apresentaram redução significativa da viabilidade celular  
21 de promastigotas, nas concentrações testadas, utilizando o ensaio MTS/PMS,  
22 quando comparado ao controle (Figura **30**). Dessa forma, seguindo protocolos  
23 do laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer da UFRJ, não foi dado  
24 seguimento a avaliação da atividade antiproliferativa e determinação do  $\text{IC}_{50}$   
25 em promastigotas e outras avaliações sequenciais, e.g. alterações estruturais,  
26 citotoxicidade em macrófagos e amastigotas intracelulares, que seriam os  
27 testes adicionais. Na triagem os compostos-alvo, utilizando mesmo método  
28 sobre epimastigotas de *T. cruzi*, foi observada atividade significativa para os  
29 compostos LDT301 (**21**), LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) podendo verificar  
30 diferente sensibilidade desses parasitos aos lipídeos fosfocolínicos testados.  
31 É importante enfatizar que esses protozoários apresentam similaridades e

1 diferenças em vias metabólicas que também influenciam na resposta a  
2 agentes químicos [64].

3

4 **Figura 30** - Citotoxicidade dos análogos fosfolipídeos frente a promastigotas  
5 de *Leishmania amazonensis*



6

7 Efeito citotóxico dos análogos fosfolipídeos em promastigotas de *L. amazonensis*. (a) Parasitos foram  
8 tratados com 5,0 µM por 48 h. (b) parasitos foram tratados com 20 µM por 48 h. Viabilidade celular  
9 avaliada pelo MTS/PMS.

10

## 11 6.2 TRIAGEM *IN VITRO* E TRATAMENTO COM OS ANÁLOGOS 12 FOSFOLIPÍDEOS FRENTE A PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA* 13 *AMAZONENSIS* PELO ENSAIO MTT

14

15

16 Em contraposição, a atividade antiproliferativa *in vitro* de promastigotas  
17 de *L. amazonensis* por meio do método MTT, realizada no laboratório de  
18 biofísica da UFG, na concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL evidenciou  
19 redução da viabilidade celular, comparativa ao controle positivo miltefosina  
20 (8). O ensaio de citotoxicidade também foi realizado como triagem inicial  
21 frente aos compostos alvo LDT301 (21), LDT302 (22), LDT303 (23), LDT304

1 (24) e LDT305 (25). Os resultados obtidos para diferentes concentrações  
2 permitiu o cálculo do IC<sub>50</sub>, resultado descrito na Tabela 4.

3 O derivado LDT304 (24) apresentou maior atividade antiproliferativa  
4 entre os compostos, tendo sido o efeito três vezes maior do que o  
5 demonstrado pela miltefosina (8) no mesmo ensaio. O segundo melhor  
6 composto foi o LDT301 (21) com atividade próxima à miltefosina, enquanto  
7 que o derivado LDT305 (25) o terceiro melhor. Os derivados LDT302 (22) e o  
8 LDT303 (23) apresentaram as menores atividades, sendo que o composto  
9 LDT303 (23) apresentou como limitação sua baixa solubilidade. É importante  
10 ressaltar que para triagem foi utilizado um número maior de células em relação  
11 às concentrações testadas, como protocolo padrão [26].

12

13 **Tabela 4** - Atividade antiproliferativa *in vitro* de promastigotas de *L.*  
14 *amazonensis*

Compostos	IC <sub>50</sub> (μM)	
	Média	DP
Miltefosina	22,0	3,6
LDT301 (42)	29,4	8,2
LDT302 (43)	53,3	13,7
LDT303 (44)	62,9	25,4
LDT304 (45)	6,8	3,3
LDT305 (46)	35,0	11,6

15 Método MTT na concentração de 1 x 10<sup>7</sup> parasitos/mL. \*DP – Desvio padrão

16

17 Uma variedade de compostos tetrazólicos tem sido utilizada para  
18 verificar a viabilidade celular. Os mais comumente utilizados são o MTT, MTS,  
19 XTT e WST-1. O ensaio de redução do tetrazol, o MTT, foi um dos primeiros  
20 ensaios desenvolvidos para o formato de triagem da viabilidade celular em  
21 placas de 96 poços, sendo uma técnica amplamente utilizada e com boas  
22 evidências de resultados.

1           O MTT funciona como substrato e ao ser adicionado ao meio de cultura,  
2 após incubação, observa-se a formação do formazan como composto púrpura  
3 com absorção em 570 nm. O formazan obtido da redução do MTT é  
4 diretamente proporcional ao número de células viáveis, já que apenas células  
5 metabolicamente ativas permitem a redução do composto. O formazan é um  
6 produto insolúvel que se acumula e precipita na célula e no meio de cultura  
7 necessitando de solubilização para quantificação. Esta é uma etapa  
8 importante do processo visto que a correta solubilização permitirá uma boa  
9 correlação com a absorção a 570 nm em espectrofotometro. Uma variedade  
10 de formas de solubilização pode ser aplicada, sendo uma delas o uso do SDS.  
11 Os mecanismos celulares que promovem a redução do formazan dentro da  
12 célula não são completamente elucidados, mas envolvem reações com NADH  
13 ou redutor similar que transfere os elétrons para o MTT [72].

14           O ensaio de redução do tetrazol MTS permite a redução do tetrazol por  
15 células viáveis, mas com geração de produto solúvel no meio de cultura,  
16 diferentemente do MTT. Assim, não há necessidade de adicionar reagente  
17 para solubilização de precipitados de formazan e a solubilidade no meio é  
18 favorecida pela carga negativa do produto, deixando o protocolo mais  
19 conveniente para elaboração. Entretanto essa carga negativa limita a  
20 permeabilidade do tetrazolium na célula. Devido a isso, o MTS é usado em  
21 combinação com reagente aceptor de elétrons, como por exemplo o sulfato  
22 de metilfenazina (PMS), que pode penetrar em células viáveis, transferir  
23 elétrons do citoplasma ou membrana plasmática e facilitar a conversão no  
24 formazan solúvel. Dessa forma a redução ocorre na superfície da célula, ou a  
25 nível da membrana plasmática por meio do transportador de elétrons. Isso  
26 difere do MTT que é positivamente carregado e penetra nas células  
27 eucarióticas e tem sua redução associada à mitocôndria, ao citoplasma, às  
28 membranas não mitocondriais, incluindo endosomas, lisosoma e a membrana  
29 plasmática [72, 73].

1 Há uma variedade de ensaios que podem ser padronizados e utilizados  
2 para estimar a variabilidade celular em cultura. Portanto, os dois métodos  
3 aplicados nos dois laboratórios são métodos padronizados e reconhecidos  
4 para esta análise. Por se tratarem de métodos diferentes, cepas e condições  
5 de cultivo diferentes, e número de células diferentes, uma comparação direta  
6 entre os dois resultados também não se torna possível. Cada método  
7 apresentará sua vantagem e desvantagem, como mencionado, devendo  
8 portanto ser adequado ao objetivo do estudos e condições de realização no  
9 laboratório. Independentemente do tipo de ensaio que está sendo usado, é  
10 importante poder quantificar o número de células viáveis ao final. É importante  
11 ter uma fonte consistente e controlada de células e qualidade dos reagents e  
12 tempo de experimentação do modelo experimental [72].

13

### 14 6.3 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DE PROMASTIGOTAS 15 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS DO PARASITO/ML

16

17

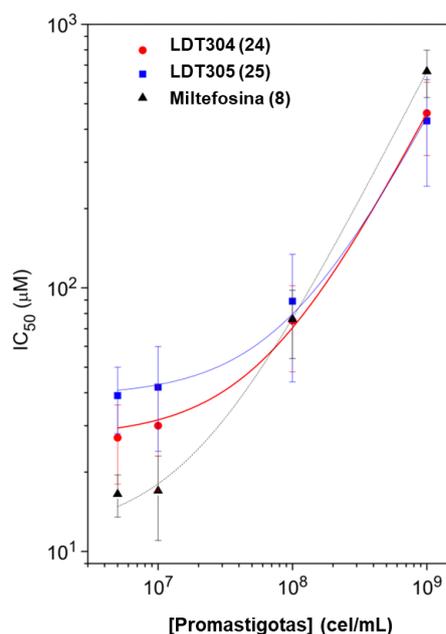
18 Devido à estrutura química dos AFL, eles se inserem facilmente em  
19 membranas, podendo induzir alterações na homeostase com provável  
20 distúrbio da estrutura e permeabilidade da membrana, podendo interferir tanto  
21 em processos vitais como na sobrevivência e crescimento. Esse efeito tem sido  
22 relatado tanto para células tumorais como para tripanosomatídeos [64, 75].

23 Com o objetivo de correlacionar o possível efeito dos derivados  
24 fosfolipídicos sobre a membrana das Leishmanias – conforme sugerido na  
25 literatura e baseado em estudos anteriores realizados com a miltefosina pelo  
26 grupo de pesquisa do laboratório de biofísica da UFG [74] – foi avaliado o  
27 efeito concentração de células dependente para os compostos LDT304 (**24**) e  
28 LDT305 (**25**) em comparação com a miltefosina (**8**) (Figura **31**).

1 O experimento considerou o aumento da concentração de células de  
2 parasitos por mL (parasitos/mL), conforme descrito por Fernandes e  
3 colaboradores (2017) [74], com a finalidade de aumentar a disponibilidade de  
4 membranas para interação com esses lipídeos fosfolípidicos. Observou-se  
5 que com menor concentração de células,  $1 \times 10^7$  parasitos/mL, os compostos  
6 LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) apresentaram valores de  $IC_{50}$  maiores que a  
7 miltefosina; entretanto ao aumentar a concentração de parasitos para  $1 \times 10^8$   
8 e  $1 \times 10^9$  parasitos/mL, a atividade antiproliferativa dos compostos-alvo e da  
9 miltefosina foi similar.

10

11 **Figura 31** -  $IC_{50}$  dos compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) e miltefosina  
12 sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis* em diferentes  
13 concentrações de parasito/mL.



14

15

16 Fernandes e colaboradores (2017) [74] retratam que em um ensaio  
17 com suspensão de células diluídas, a concentração e composição lipofílica da  
18 membrana pode ser negligenciada devido ao volume relativamente menor em  
19 comparação ao meio aquoso. Assim, o aumento do número de parasitos/mL

1 permite aumentar a concentração dos compostos lipofílicos da membrana,  
2 levando à melhor observação do particionamento entre a fase aquosa e  
3 lipofílica. É reconhecida a capacidade da miltefosina (**8**) de interagir com a  
4 membrana da célula e atingir rapidamente outras membranas dentro da  
5 célula, afetando o metabolismo celular em diferentes níveis [75]. Ambos  
6 lipídeos fosfolínicos, LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**), parecem interagir com a  
7 membrana, mas com afinidades diferentes da miltefosina, podendo envolver  
8 diferentes tipos de interação.

9 De acordo com Jiménez-López e colaboradores (2010) [75], o nível de  
10 particionamento dentro da bicamada lipídica da membrana depende do grau  
11 de insaturação, do tamanho da cadeia dos fosfolipídeos e também da  
12 quantidade de colesterol, podendo facilitar ou dificultar algumas interações.  
13 Dessa forma, alterações físico-químicas e da estrutura química dos derivados  
14 também podem interferir na forma de interação. O derivado LDT304 (**24**)  
15 apresenta cadeia que mimetiza o ácido graxo menor do que a encontrada na  
16 miltefosina (**8**), e também a contribuição planar do anel aromático e o dipolo  
17 negativo diretamente ligado ao anel. Por sua vez, LDT305 (**25**) apresenta  
18 estrutura similar com adição do grupo éster. Os substituintes no anel  
19 apresentam efeitos eletrônicos e estéricos que podem influenciar na  
20 conformação desses lipídeos fosfolínicos e na forma de interação.

21

#### 22 6.4 ANÁLISE DA FLUIDEZ DA MEMBRANA POR RESSONÂNCIA 23 PARAMAGNÉTICA DE ELÉTRONS (RPE)

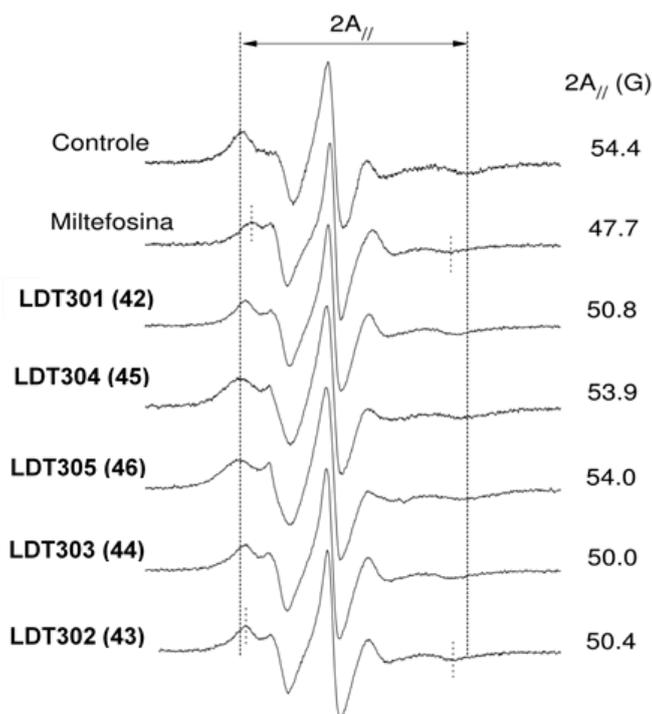
24

25 Até o momento, o mecanismo exato de ação dos AFL não foi  
26 estabelecido com precisão, embora a membrana pareça o local primário de  
27 sua atividade, de forma direta ou indireta, com interferência no transporte de  
28 lipídeos e transdução de sinal dependente de lipídeo. As alterações podem  
29 afetar a composição dos lipídeos de membrana e também a distribuição  
30 desses lipídeos, seja em domínios *raft* ou não [75]. A ressonância

1 paramagnética de elétrons (RPE) utilizando *spin label* tem sido utilizada para  
 2 verificar a interação direta da miltefosina (**8**) com a membrana de  
 3 promastigotas de *L. amazonensis* tendo sido observada a capacidade de  
 4 perturbar a membrana [39]. Realizou-se o espectro de RPE utilizando o  
 5 marcador de spin 5-DSA para verificar o efeito dos derivados fosfolípidicos  
 6 sobre a fluidez da membrana de promastigotas de *L. amazonensis* (Figura  
 7 **32**).

8

9 **Figura 32** - Espectro de Ressonância Paramagnética de Elétrons na  
 10 membrana de promastigotas de *L. amazonensis*



11

12 Promastigotas de *L. amazonensis* tratada com miltefosina, sem tratamento (controle) e  
 13 tratados com os derivados lipídicos fosfolípidicos. Marcador de *spin* 5-DAS. A figura exibe o  
 14 parâmetro  $2A_{//}$ , desdobramento hiperfino máximo. Esse desdobramento consiste na  
 15 separação em unidade de campo magnético (G, gauss) entre o primeiro pico de ressonância  
 16 e o último pico invertido no espectro. No gráfico foram adicionadas linhas verticais para  
 17 facilitar a visualização das posições dos picos. As intensidades dos espectros (unidades  
 18 arbitrárias) foram normalizadas para todos os espectros terem a mesma intensidade de pico  
 19 central, e a variação do campo magnético do início ao fim do espectro foi de 100 G. O valor  
 20 do  $2A_{//}$  medido para cada espectro de cada derivado e para os controles está indicado à frente  
 21 de cada espectro.

1 Os valores obtidos para os compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) na  
2 concentração de  $1 \times 10^9$  moléculas/células não demonstrou diferença de  
3 alteração da fluidez da membrana quando comparados ao controle negativo,  
4 considerando que o erro experimental estimado é de 0,8 G, porém fora os  
5 compostos que apresentaram maior atividade antiproliferativa. Entretanto os  
6 compostos LDT301 (**21**), LDT302 (**22**) e LDT303 (**23**) apresentaram aumento  
7 da fluidez da membrana, porém menos expressivo que para miltefosina (**8**).  
8 Sugere que esses compostos possam interagir com a membrana e/ou ter  
9 mecanismos moleculares de interação diferentes.

10

## 11 6.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA MILTEFOSINA (**8**) E DOS 12 ANÁLOGOS LDT304 (**24**) E LDT305 (**25**) SOBRE A DINÂMICA MOLECULAR 13 DA MEMBRANA DE PROMASTIGOTAS

14

15

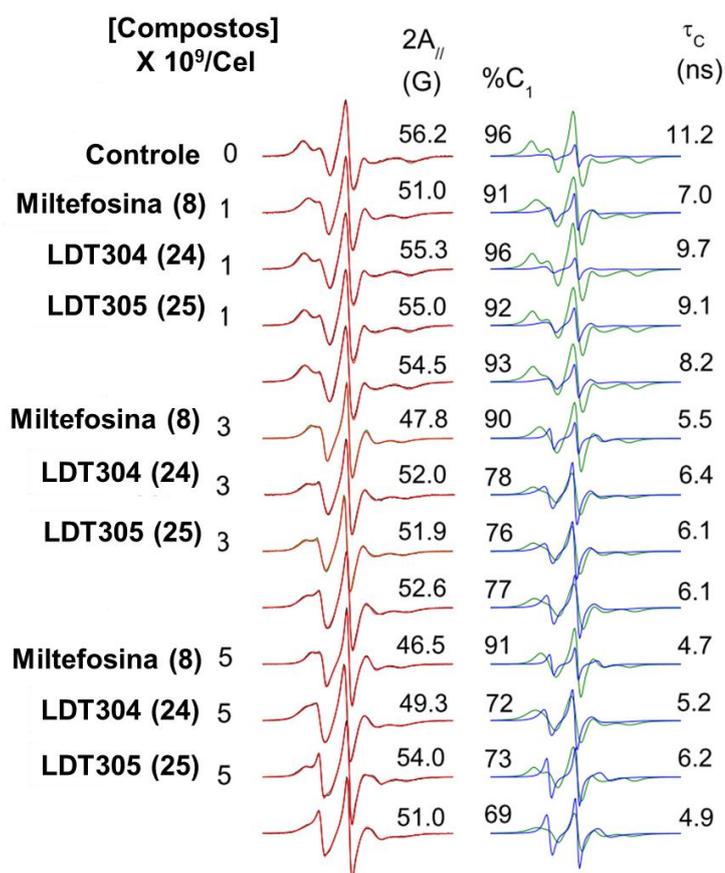
16 A avaliação por meio do espectro de RPE utilizando *spin-label* 5-DSA  
17 em promastigotas de Leishmania foi realizada para os derivados LDT304 (**24**)  
18 e LDT305 (**25**) considerando o aumento da concentração de  
19 moléculas/células para verificar se o aumento da concentração dos análogos  
20 influenciaria na alteração da dinâmica da membrana. Os resultados obtidos  
21 para os derivados lipídeos fosfocolínicos estão apresentados na Figura **33**. Os  
22 valores de correlação rotacional -  $\tau_c$ , obtidos a partir da simulação de  
23 espectros de RPE, refletem a dinâmica molecular da membrana e estão de  
24 acordo com o que é observado através do parâmetro  $2A_{//}$ .

25 Observou-se que na concentração de  $1 \times 10^9$  moléculas/célula a  
26 miltefosina já promove aumento na dinâmica molecular da membrana, mas os  
27 derivados lipídeos fosfocolínicos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) não levam a  
28 aumento expressivo na mesma concentração, quando comparado ao controle  
29 negativo (Figura **33**). Para as concentrações de 3 e  $5 \times 10^9$  moléculas/célula  
30 a miltefosina e os análogos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) apresentaram no

1 espectro de RPE clara resolução de dois componentes espectrais, com  
2 perturbação da membrana.

3

4 **Figura 33** - Espectro de RPE com incorporação do spin label 5-DSA na  
5 membrana de promastigotas tratadas com diferentes concentrações dos  
6 analogos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) e da miltefosina (**8**).



7

8 X corresponde a concentração, podendo ser igual a 0 (controle), 1 x 10<sup>9</sup>, 3 x 10<sup>9</sup> ou 5 x 10<sup>9</sup>. Os valores  
9 do parametro 2A<sub>||</sub> no RPE (divisão hiperfina externa), que é dado pela separação em unidades de campo  
10 magnético entre o primeiro pico e o ultimo pico invertido do espectro, também são indicados. A  
11 estimative de erro para o parâmetro 2A<sub>||</sub> foi de 0,5 G. Os espectros foram simulados utilizando o  
12 programa NLLS com modelo de dois componentes spectral. Para cada espectro, o componente *best-*  
13 *fitting* C1 (verde) e C2 (azul) estão apresentados no gráfico à direita, assim como a porcentagem do  
14 componente C1 no espectro e a correlação rotacional calculada (τ<sub>c</sub>).

15

16

17

18

1            Para as amostras tratadas com a concentração de  $1 \times 10^9$   
2 moléculas/célula, a porcentagem do componente 1 foi aproximadamente 90  
3 %. Entretanto, isso não permite assumir que o segundo componente tenha  
4 contribuição inferior a 10 %. Para as amostras tratadas com miltefosina ou os  
5 derivados na concentrações de 3 e  $5 \times 10^9$  moléculas/célula, a porcentagem  
6 do componente 1 foi também acima de 90 %; entretanto nessa concentração  
7 a porcentagem do segundo componente foi de aproximadamente 22 % e 28  
8 % para os compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**), respectivamente. A  
9 presença do segundo componente no espectro sugere que há uma população  
10 de *spin label* com maior dinâmica molecular, sugerindo que os análogos da  
11 miltefosina (**8**) possuem distribuição não homogênea na membrana  
12 plasmática do parasito, podendo acumular em interface proteína-lipídeos,  
13 aumentando a mobilidade nessas regiões da membrana (Figura **33**).

14            Estudos realizados utilizando espectro de RPE e com *spin label* para  
15 proteína indicou que a miltefosina (**8**) aumenta e promove a modificação da  
16 conformação de proteínas, sugerindo que **8** pode interagir com regiões  
17 lipofílicas, mas também na interface lipídeo-proteína podendo afetar a  
18 atividade de proteínas de membrana [76, 77]. Os lipídeos fosfolínicos  
19 LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) também parecem apresentar esse perfil. É  
20 importante ressaltar que enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos são  
21 principalmente localizadas na membrana do retículo endoplasmático,  
22 podendo ser possível alvo para alquilfosfolipídeos a partir da correlação da  
23 interação lipídeos-proteínas com alterações no metabolismo celular [75].

24

## 25 6.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

26

27            Um dos problemas relacionados à capacidade dos AFL de interagir  
28 com a membrana é que eles têm sido associados à capacidade de gerar  
29 hemólise, característica comum aos AFL, o que está relacionado a  
30 capacidade de gerar danos na membrana [78]. Assim, o teste de hemólise

1 permite avaliar a habilidade dessas substâncias gerarem lesões e afetarem a  
 2 estabilidade da membrana sendo importante indicativo de toxicidade para  
 3 esses compostos.

4 A Tabela 5 apresenta a atividade hemolítica para os derivados  
 5 análogos fosfocolínicos em comparação com a miltefosina, em meio contendo  
 6 PBS, em baixas concentrações dos análogos.

7

8 **Tabela 5** - Efeito hemolítico dos derivados alquilfosfocolínicos

Compostos	HM <sub>50</sub> (µg/mL)	HM <sub>50</sub> (µg/mL)	HM <sub>50</sub> µM
	Média	DP	
Miltefosina	19	5	47
LDT301 (31)	17	4	41
LDT302 (32)	18	4	34
LDT303 (33)	*	-	-
LDT304 (34)	**	-	-
LDT305 (35)	**	-	-

9

10 DP – Desvio padrão; HM = hematócrito; \*baixa solubilidade. Interferiu na mensuração do resultado.  
 11 \*\*não ocasionaram hemólise até a concentração máxima testada de 2 mM.

12

13 Os derivados fosfocolínicos LDT304 (24) e LDT305 (25) não  
 14 apresentaram atividade hemolítica até a concentração de 2 mM, avaliada na  
 15 triagem inicial. Já os derivados LDT301 (21) e LDT302 (22) apresentaram  
 16 ação hemolítica similar à miltefosina (8). Por sua vez, o derivado LDT303 (23)  
 17 apresentou baixa solubilidade no meio não fornecendo resultado conclusivo.

18 Devido aos resultados obtidos para os derivados LDT304 (24) e  
 19 LDT305 (25), quanto à atividade antiproliferativa e ausência de perfil  
 20 hemolítico nas concentrações inicialmente testadas, foi realizada nova análise  
 21 do perfil hemolítico com maiores concentrações dos compostos e a diferença  
 22 do perfil hemolítico no sangue total e em eritrócitos ressuspendidos em PBS

1 (Tabela 6). Para avaliação da atividade hemolítica em sangue total os  
 2 compostos foram diluídos no plasma separadamente, conforme descrito no  
 3 método, e depois as células foram reconstituídas no plasmas para obtenção  
 4 do sangue total.

5 A miltefosina (8) apresentou atividade hemolítica de 52,8 % a 2,5 mM  
 6 no sangue total. Nas mesmas condições de avaliação, os compostos LDT304  
 7 (24) e LDT305 (25) apresentaram respectivos percentuais de hemólise de  
 8 22,5 % e 40,6 % em concentrações três vezes maiores do que a da miltefosina  
 9 (8). Vale destacar que o derivado LDT305 (25) apresentou hemólise apenas  
 10 na concentração de 12,5 mM com potencial hemolítico de apenas 24,2 %  
 11 quando comparado à miltefosina (8).

12

13 **Tabela 6** - Perfil hemolítico no sangue total e em eritrócitos recontituídos em  
 14 PBS para os derivados LDT304 (24) e LDT305 (25) em comparação a  
 15 miltefosina

Concentração (mM)	Sangue total – %Hemolise		
	Miltefosina (8)	LDT304 (24)	LDT305 (25)
2,5	53,2 ± 7,8 <sup>a</sup>	-	-
7,5		22,5 ± 3,7	-
10,0		75,3	14,5
12,5			24,2 ± 6,4
	Eritrócitos em PBS – %Hemolise		
0,3	54,0 <sup>b</sup>	-	-
3,3	-	26,2	8,5
6,6	-	34,1	14,8
10,0	-	60,4	25,3

16 <sup>a,b</sup> Dados obtidos de [79]

17

18

1 Na avaliação realizada com eritrócitos reconstituídos em PBS, os  
2 análogos mantiveram baixo potencial hemolítico quando comparado à **8**. A  
3 miltefosina (**8**) produziu 54 % de hemólise a 0,3 Mm enquanto os análogos  
4 fosfocolínicos, mesmo em concentrações 11 vezes maiores, mantiveram  
5 atividade hemolítica menor do que 50 %. Destaca-se o composto LDT305  
6 (**25**) com baixo perfil hemolítico mesmo nas maiores concentrações testadas.

7 A miltefosina (**8**) apresenta alta atividade hemolítica quando  
8 administrada de forma parenteral devido alta afinidade pela membrana; no  
9 entanto, esta toxicidade é minimizada pela administração oral, em face da  
10 absorção lenta e ligação à proteína plasmática (96 % a 98 %) [40]. Observa-  
11 se, portanto, um 'efeito de proteção' do soro frente à citotoxicidade induzida  
12 pelos alquilfosfolipídeos em estudos *in vitro*, tendo sido também relatado para  
13 avaliação de células tumorais e *T. cruzi* [66]. Dessa forma, a avaliação do  
14 perfil hemolítico no sangue total e em eritrócitos reconstituídos em PBS visou  
15 avaliar a possível interferência de proteínas do sangue total na redução da  
16 atividade hemolítica. Desta forma, foi observado menor perfil hemolítico em  
17 eritrócitos em sangue total do que reconstituídos em PBS sinalizando possível  
18 interferência de proteínas do soro.

19

## 20 6.7 AUMENTO DA DINÂMICA MOLECULAR DA MEMBRANA DE 21 ERITRÓCITOS TRATADOS COM MILTEFOSINA (**8**) E OS ANÁLOGOS 22 LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS **24** E **25**.

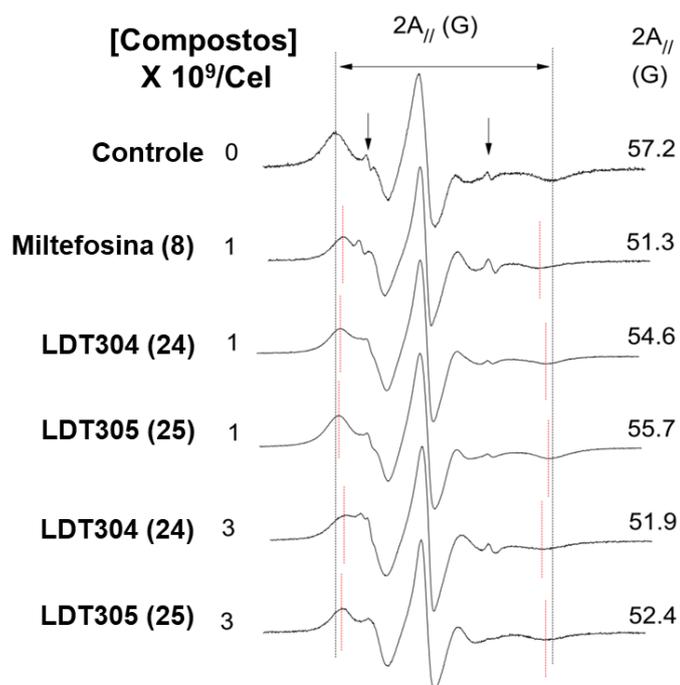
23

24 Diante do baixo potencial hemolítico, foi avaliado o efeito dos análogos  
25 LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) e da miltefosina (**8**) sobre a dinâmica molecular  
26 da membrana de eritrócitos. Desta forma, o espectro RPE da membrana de  
27 eritrócitos marcada com spin 5-DSA foi analisado comparando eritrócitos não  
28 tratados (controle negativo) e tratados com várias concentrações de **8** ou dos  
29 análogos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**). Os resultados estão apresentados na  
30 Figura **34**. Para o tratamento da suspensão de eritrócitos contendo  $1 \times 10^8$   
31 células/mL com a miltefosina (**8**) na concentração de  $1 \times 10^9$  moléculas/célula  
32 observou-se grande redução no parâmetro  $2A_{//}$  no espectro de RPE, indicando

1 notável aumento na dinâmica da membrana corroborando com o efeito  
 2 hemolítico. Já os derivados LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) em concentração  
 3 semelhante ( $1 \times 10^9$  moléculas/célula) mostraram apenas modesta redução  
 4 no parâmetro  $2A_{//}$ . Com o aumento da concentração para  $3 \times 10^9$   
 5 moléculas/célula, os derivados lipídeos fosfolínicos apresentaram dois  
 6 componentes no espectro de EPR indicando a presença de duas populações  
 7 de *spin label* com diferentes estados de mobilidade, contrário à miltefosina  
 8 para a qual a resolução de dois componentes no espectro não foi clara.

9

10 **Figura 34** - Espectro de EPR com spin-label 5-DSA na membrana plasmática  
 11 de eritrócitos tratados com os lipídeos fosfolínicos e a miltefosina



12

13 As concentrações estão expressas em número de moléculas/células, X corresponde a  
 14 concentração, podendo ser igual a 0 (controle),  $1 \times 10^9$  e  $3 \times 10^9$ . Os valores do parâmetro  $2A_{//}$  no  
 15 RPE (divisão hiperfina externa), que é dado pela separação em unidades de campo  
 16 magnético entre o primeiro pico e o último pico invertido do espectro, também são indicados.  
 17 A estimativa de erro para o parâmetro  $2A_{//}$  foi de 0,5 G. A seta aponta para a linha de  
 18 ressonância que indica mais claramente a resolução de um segundo componente spectral. A  
 19 faixa de varredura total do campo magnético em cada espectro de RPE foi de 100 G (eixo X)  
 20 e a intensidade está em unidades arbitrárias (eixo Y).

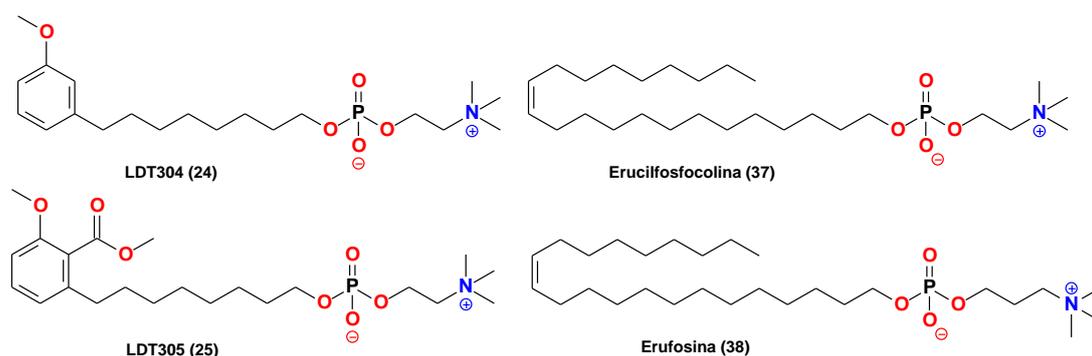
21

1 Os compostos que apresentaram menor potencial hemolítico foram os  
2 que exibiram maior IC<sub>50</sub> sobre as promastigotas. Diferenças na composição  
3 dos lipídeos de membrana do protozoário e dos eritrócitos – como por  
4 exemplo, o parasito contém ergosterol e nos eritrócitos alta concentração de  
5 colesterol bem como diferenças na composição e proporção de proteínas  
6 transmembrânicas e periféricas – poderiam justificar particularidades estruturais  
7 na interação entre os lipídeos fosfolípidos e a membrana.

8 Novos análogos APL relacionados à miltefosina têm sido desenvolvidos  
9 (Figura 35), tanto como antitumoral quanto antileishmania, buscando melhor  
10 atividade e redução dos efeitos adversos explorando alteração da cadeia  
11 alquílica e da distância entre o grupo fosfato e o nitrogênio [40]. Os compostos  
12 erucilfosfolina (37) e erufosina (38), que apresentam dupla ligação com  
13 configuração *Z* (*cis*) no nono carbono da cadeia carbônica, demonstraram  
14 redução da atividade hemolítica *in vitro*. Os compostos LDT304 (24) e LDT305  
15 (25) também apresentam padrão de restrição conformacional, devido ao anel  
16 aromático, o que poderia sugerir contribuição na redução do potencial  
17 hemolítico.

18

19 **Figura 35** - Análogos APL erucilfosfolina (37) e erufosina (38)



20

21

1 6.8 AVALIAÇÃO DOS DERIVADOS LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS FRENTE  
2 A AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E  
3 CITOTOXICIDADE SOBRE MACRÓFAGOS.

4

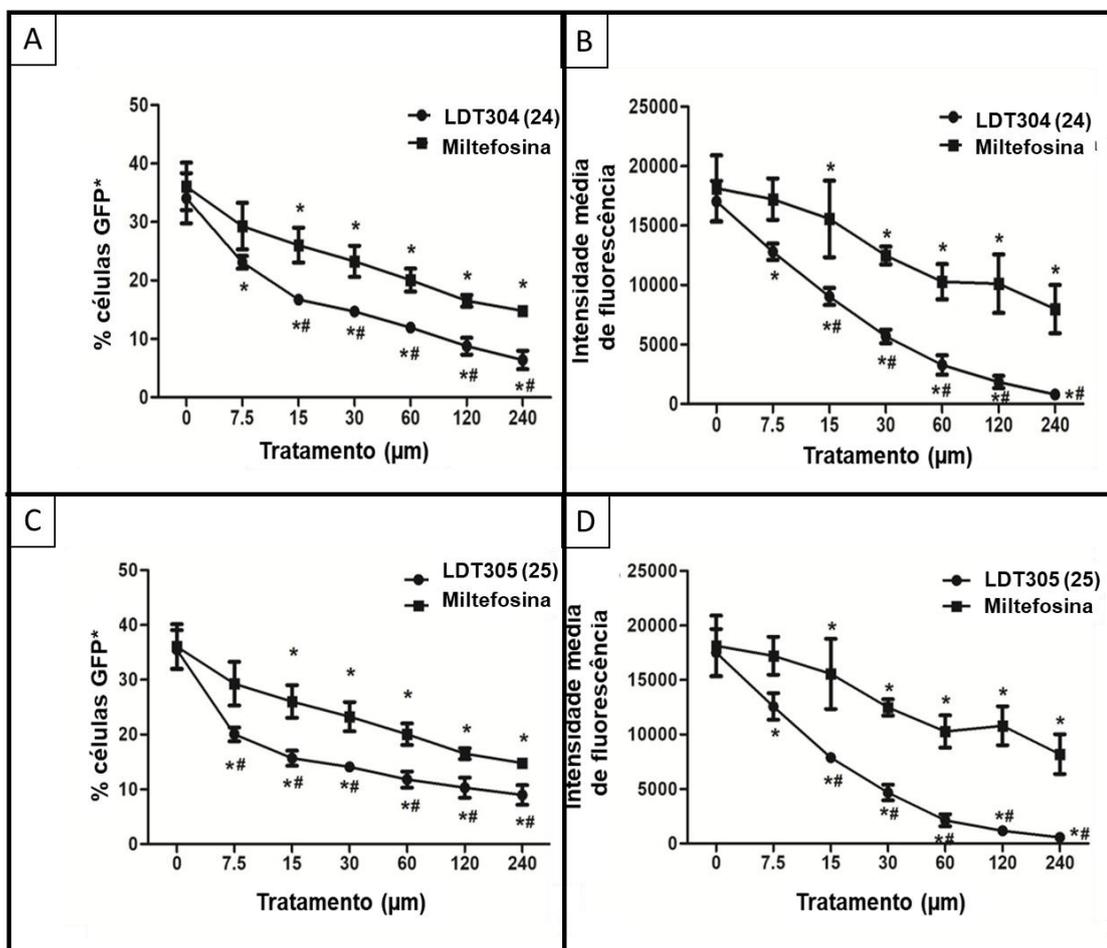
5

6 Para verificar se os compostos seriam capazes de exercer atividade  
7 antiproliferativa sobre a forma do parasito associada às manifestações  
8 clínicas, os compostos que apresentaram melhor perfil na avaliação sobre  
9 promastigotas e baixo potencial hemolítico, LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**), foram  
10 avaliados frente à capacidade de eliminar formas amastigotas intracelulares  
11 de *L. amazonensis* utilizando macrófagos J774.A11. Desta forma, foram  
12 utilizados macrófagos infectados com *L. amazonensis* expressando GFP<sup>+</sup> e  
13 após 24 h de tratamento com os derivados **24** e **25** foram analisados por meio  
14 de citometria de fluxo. Os resultados mostram a concentração mínima  
15 necessária para reduzir a porcentagem de macrófagos infectados com  
16 amastigotas GFP (gráficos à esquerda) e a intensidade média de  
17 fluorescência (gráficos à direita) (Figura **36**).

18 Os análogos lipídeos fosfocolínicos demonstraram efeito superior à  
19 miltefosina (**8**) sobre a redução de macrófagos infectados com resposta  
20 concentração dependente. Observou-se que os derivados apresentaram  
21 redução no número de macrófagos infectados na concentração de 7,5 µM,  
22 tendo resposta similar sido atingida pela miltefosina a 15,0 µM. Observou-se  
23 também que as formas amastigotas de *L. amazonensis* foram mais sensíveis  
24 do que as formas promastigotas aos novos lipídeos fosfocolínicos. Os dados  
25 demonstram que os compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) possuem similar  
26 capacidade de reduzir a infecção por amastigotas de *L. amazonensis* em  
27 macrófagos de murinos bem como ação leishmanicida superior à miltefosina  
28 (**8**).

29

- 1 **Figura 36** - Avaliação dos análogos lipídeos fosfolínicos LDT304 (**24**),  
 2 LDT305 (**25**) e miltefosina (**8**) sobre macrófagos J774.A1 infectados com  
 3 amastigotas de *L. amazonensis* GFP+.



- 4 Miltefosina foi utilizada como controle positivo. A porcentagem de células GFP+ (macrófagos  
 5 infectados com amastigotas) A e C e a intensidade média de fluorescência (IMF, estimada  
 6 pela quantidade de parasitos internalizados), B e D, foi avaliada por citometria de fluxo.  
 7 Significancia estatística: \*indica a diferença entre o grupo tratado e não tratado (controle) e #  
 8 indica a diferença entre a miltefosina e os análogos (P < 0,05).

10

11

- 12 Pensando na ação direta sobre as formas amastigotas, a penetração  
 13 por duas membranas pelos compostos seria necessária. É importante  
 14 ressaltar que embora os fosfolipídeos se difundam facilmente pela primeira  
 15 camada da membrana, a transferência para a segunda camada é limitada, e  
 16 muitas vezes ocorre de forma lenta, por difusão lateral ou *flip-flop*, com  
 17 limitação da passagem para a segunda camada relacionada à presença da

1 cabeça polar. Desta forma, os transportadores de fosfolipídeos são  
 2 importantes para penetração dos APL em quantidade na célula [28; 29].  
 3 Porém, os testes realizados não permitem inferir qual tipo de transporte  
 4 estaria presente.

5 Com o objetivo de verificar a toxicidade dos análogos lipídeos  
 6 fosfocolínicos sobre macrófagos não infectados realizou-se o teste de  
 7 viabilidade celular MTT em macrófagos cujos resultados de citotoxicidade  
 8 celular (CC<sub>50</sub>) estão apresentados na Tabela 7.

9 Os análogos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) apresentaram baixa  
 10 toxicidade sobre macrófagos não infectados com altos valores de CC<sub>50</sub> bem  
 11 acima das concentrações citotóxicas sobre formas promastigotas e  
 12 amastigotas intracelulares. Os compostos demonstraram ainda menor  
 13 citotoxicidade sobre macrófagos não infectados que a miltefosina (**8**), exibindo  
 14 índice de seletividade (SI) de 12 e 21 vezes para os derivados LDT304 (**24**) e  
 15 LDT305 (**25**), respectivamente.

16

17 **Tabela 7** - Citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) dos análogos lipídeos fosfocolínicos LDT304  
 18 (**24**) e LDT305 (**25**) sobre macrófagos J774.A1 não infectados.

Miltefosina ( <b>8</b> )	LDT304 ( <b>24</b> )	LDT305 ( <b>25</b> )
77 ± 23 <sup>c</sup>	956 ± 277	1633 ± 404

19 <sup>c</sup> Dado extraído da referência [76]

20

21 Alguns estudos sugerem que a longa cadeia alifática seria fator  
 22 importante para maior atividade dos AFL tendo em vista a interação com a  
 23 membrana [64]. No nosso estudo observamos que os análogos LDT304 (**24**)  
 24 e LDT305 (**25**), com a menor cadeia e com a presença da subunidade  
 25 aromática substituída, apresentaram maior atividade frente a diferentes  
 26 formas de *T. cruzi*, e também sobre formas de *L. amazonensis*, e menores  
 27 toxicidade sobre células, incluindo macrófagos, e potencial hemolítico. Esses  
 28 compostos mostraram que são capazes de se acumularem na membrana de

1 promastigotas à concentração dependente conforme observado no RPE, e  
2 que podem interagir com a membrana de eritrócitos e promastigotas de  
3 maneira diferente que a miltefosina, apresentando um segundo componente  
4 que suger a interação sugerindo interação lipídeos-proteína.

5 O derivado TCAN26 (**36**) também apresenta cadeia menor que a da  
6 miltefosina (11 carbonos) e a região terminal substituída com o grupo  
7 adamantilideno, o que parece contribuir para a maior atividade desses  
8 compostos e pronunciado efeito sobre a membrana [64]. Porém, os dados  
9 ainda não permitem estabelecer qual melhor relação estrutura-atividade.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

---

---

# CAPÍTULO 7

---

---

---

---

## ***Conclusão***

---

---

## 1 7 CONCLUSÃO

2

3

4 As metodologias sintéticas utilizadas neste trabalho permitiram a  
5 obtenção de cinco novos lipídeos fosfolínicos a partir do cardanol e do ácido  
6 anacárdico com bons rendimentos e pureza. Os compostos LDT301 (**21**),  
7 LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) reduziram em mais de 50 % a viabilidade de  
8 epimastigotas de *T. cruzi* tratadas a 20 µM com destaque para o composto  
9 LDT304 (**24**) por demonstrar significativa redução da viabilidade celular a 5,0  
10 µM. A avaliação antiproliferativa apresentou efeito concentração dependente,  
11 na qual o derivado LDT304 (**24**) foi o mais potente.

12 Os lipídios fosfolínicos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) demonstraram  
13 ainda a capacidade de induzir a permeabilização da membrana de  
14 tripomastigotas de *T. cruzi* e levar à perda da viabilidade celular, assim como  
15 atividade antiproliferativa frente a amastigotas de *T. cruzi*. Alterações  
16 morfológicas em epimastigotas foram observadas em relação aos controles  
17 negativos para os compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**), como modificação  
18 na forma, no contorno celular e no flagelo. A análise ultraestrutural mostrou  
19 ainda que esses lipídeos fosfolínicos promoveram alterações sugestivas de  
20 autofagia, com presença de figuras de mielina e vacúolos citoplasmáticos. Os  
21 compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) foram avaliados quanto à toxicidade  
22 sobre células LLC-MK2 e linhagens de células linhagem HEPG2 não tendo  
23 apresentado toxicidade nas concentrações testadas.

24 Os cinco análogos lipídeos fosfolínicos não apresentaram redução  
25 significativa da viabilidade celular de promastigotas de *L. amazonensis* nas  
26 concentrações testadas, utilizando o ensaio MTS/PMS; porém, os compostos  
27 LDT301 (**21**), LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) demonstraram atividade  
28 antiproliferativa *in vitro* sobre promastigotas de *L. amazonensis* por meio do  
29 método MTT na concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL com redução da  
30 viabilidade celular quando comparado à miltefosina. Diferenças entre os  
31 métodos e possíveis diferenças bioquímicas entre as cepas ainda necessitam

1 ser melhor exploradas para maior entendimento dessa diferença. Os  
2 compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) apresentaram ainda a capacidade de  
3 reduzir a infecção de macrófagos pelas amastigotas e baixa toxicidade sobre  
4 macrófagos não infectados com bom índice de seletividade.

5 Os espectros de RPE, utilizando o marcador de spin 5-DSA para  
6 verificar o efeito dos derivados fosfocolínicos sobre a fluidez da membrana de  
7 promastigotas de *L. amazonensis*, demonstraram que os derivados LDT304  
8 (**24**) e LDT305 (**25**) na concentração de  $1 \times 10^9$  moléculas/células não  
9 apresentam aumento da fluidez da membrana; porém na concentração de 3  
10 e  $5 \times 10^9$  moléculas/células observou-se em RPE a presença de dois pontos  
11 espectrais, demonstrando a capacidade de perturbação da membrana e por  
12 mecanismos possivelmente diferentes.

13 Os lipídeos fosfocolínicos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) não apresentam  
14 hemólise em concentrações menores que 2 mM, demonstrando potencial  
15 hemolítico baixo mesmo em maiores concentrações, utilizando tanto sangue  
16 total como eritrócitos reconstituídos em PBS, tendo, portanto, baixo potencial  
17 hemolítico. Quanto à interação com a membrana de eritrócitos, os derivados  
18 lipídeos fosfocolínicos apresentaram dois componentes no espectro, com  
19 diferentes estados de mobilidade, indicando a presença de diferente interação  
20 do *spin label* com a membrana e sugerindo interação lipídeo-proteína.

21 Os análogos lipídeos fosfocolínicos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**)  
22 apresentaram bom perfil de ação frente a esses tripanosomatídeos *in vitro*.  
23 Como perspectiva há a avaliação das alterações morfológicas e  
24 ultraestruturais de outras formas do parasito, tanto para *L. amazonensis* como  
25 *T. cruzi*, estudo em outras cepas de *T. cruzi* e *Leishmania spp.*, estudos *in*  
26 *vivo*, estudos de toxicidade aguda e crônica, perfil farmacocinético dos  
27 compostos, otimização da síntese para escançamento.

28

29

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

---

---

# CAPÍTULO 8

---

---



## *Parte Experimental*



## 1 8 PARTE EXPERIMENTAL

2

3

### 4 8.1 GENERALIDADES, MATERIAIS E MÉTODOS

5

6

7 Os procedimentos experimentais em Síntese Orgânica foram  
8 realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas  
9 (LADETER) da Universidade Católica de Brasília, no Laboratório de  
10 Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LDT) do Núcleo de Medicina  
11 Tropical da Universidade de Brasília (UnB), no Laboratório de Química  
12 Orgânica do Instituto de Química da UnB, e no laboratório de Síntese  
13 Orgânica e Química Medicinal do Instituto de Biologia, Química Medicinal e  
14 Biotecnologia da Fundação Nacional de Pesquisa Grega em Atenas.

15 Os reagentes e solventes químicos utilizados neste trabalho foram  
16 adquiridos das indústrias Sigma-Aldrich® (EUA), Tedia® (EUA) e PanReac®  
17 (Espanha). O diclorometano (DCM), acetonitrila (MeCN) e trietilamina (TEA)  
18 foram previamente tratados com hidreto de cálcio e destilados antes do uso.  
19 O tetraidrofurano (THF) foi tratado com sódio metálico, sob refluxo, utilizando  
20 benzofenona como indicador. A miltefosina utilizada como controle positivo foi  
21 obtida da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA) e o marcador de spin  
22 Ácido 5-doxilesteárico (5-DSA) foi obtido da Sigma-Aldrich® (EUA). O derivado  
23 3-pentadecilfenol (LDT10, **26**), também denominado cardanol saturado, foi  
24 obtido comercialmente da Sigma-Aldrich®, com pureza de 90% e  
25 recristalizado em hexano.

26 As reações foram realizadas sob agitação magnética, à temperatura  
27 ambiente, sob aquecimento em banho de óleo ou a 0 °C, sob atmosfera  
28 normal ou em atmosfera de argônio. As reações de ozonólise foram realizadas  
29 sob banho de gelo seco/acetona à temperatura de aproximadamente - 70 °C,  
30 sob fluxo contínuo de ozônio utilizando o BRO3-HA. As reações de

1 hidrogenação catalítica foram realizadas em aparelho Parr Instrument  
2 Company<sup>®</sup>, série 3910. Todas vidrarias utilizadas nas reações de fosforilação  
3 foram previamente dessecadas em estufa a 100 °C, ou com maçarico portátil,  
4 e resfriadas em dessecador. O POCl<sub>3</sub> foi destilado e a colina seca à vácuo por  
5 3 a 4 h antes de cada reação.

6 As reações foram monitoradas por meio de cromatografia em camada  
7 delgada (CCD) utilizando cromatofolhas (5,0 x 1,5 cm) de sílica Kieselgel 60  
8 F254 com indicador de fluorescência UV<sub>254</sub> nm, suportada em alumínio com  
9 espessura de 0,25 mm (SILICYCLE<sup>®</sup>), ou sob placa de vidro, visualizadas em  
10 lâmpada de UV (254-365 nm), e/ou reveladas com solução de ácido  
11 fosfomolibdico, o que permitiu mensurar os fatores de retenção (Rf).

12 A purificação dos intermediários sintéticos e compostos-alvo foi  
13 realizada por meio de cromatografia em coluna com fase fixa de gel de sílica  
14 G60 (70-230 mesh; 230-400 mesh, SILICYCLE<sup>®</sup>). Os solventes foram  
15 evaporados à pressão reduzida utilizando evaporador rotatório Tecnal<sup>®</sup> TE-  
16 211, ou Buchi<sup>®</sup> R205, V800 conectado ao sistema de alto-vácuo com pressão  
17 variando entre 10 e 0,1 mmHg. Os pontos de fusão, não corrigidos, foram  
18 determinados em aparelho digital de fusão MQAPF302.

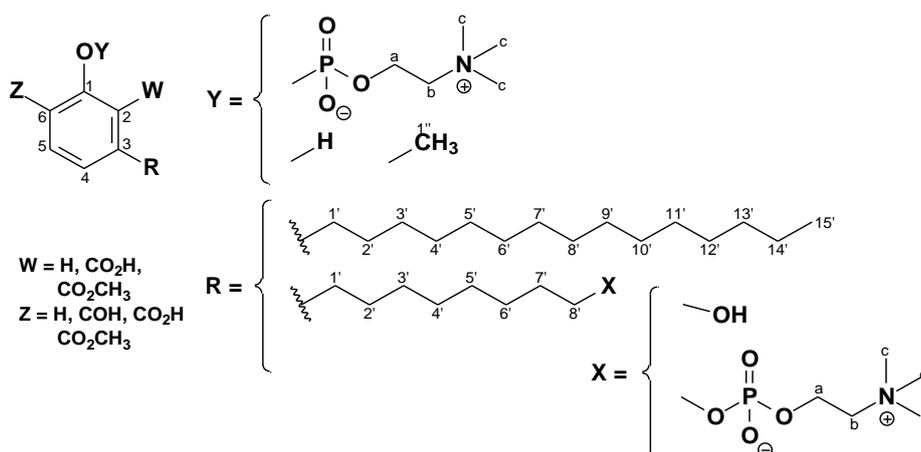
19 Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  
20 de <sup>1</sup>H – 300 MHz, 500 MHz ou 600 MHz) e de carbono-13 (RMN de <sup>13</sup>C – 75  
21 MHz ou 125 MHz) foram obtidos em aparelho Bruker Avance DRX300 e  
22 DRX500 do Centro Nordestino de Aplicação da Ressonância Magnética  
23 Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), enquanto  
24 que o de fósforo (RMN de <sup>31</sup>P 121 MHz) foi obtido em espectrômetro Varian  
25 300 e Varian 600 no Instituto de Biologia, Química Medicinal e Biotecnologia  
26 da Fundação Nacional de Pesquisa Grega, utilizando CDCl<sub>3</sub> ou CD<sub>3</sub>OD como  
27 solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os valores de  
28 deslocamento químico ( $\delta$ ) são referidos em parte por milhão (ppm) em relação  
29 ao TMS e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). As áreas dos  
30 sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas

1 como: simpleto (s); sinal largo (sl); duplete (d); tripleto (t) e multiplete (m). Os  
 2 espectros de massas foram obtidos em HPLC-LCQ da *Thermo Scientific* por  
 3 ionização positiva ou negativa ( $ES^+$  or  $ES^-$ ). As amostras foram preparadas  
 4 em solução de 10-20  $\mu\text{L}/\text{min}$ , utilizando MeOH como solvente. Os HR-MS  
 5 foram obtidos em UHPLC-LT1 da *Thermo Scientific*.

6 Reapresentamos a Figura 13 com as estruturas da *Markush* e  
 7 numerações padronizadas que foram aplicadas para análise dos espectros de  
 8 RMN.

9

10 **Figura 13** - Estrutura de Markush com numeração para os espectros de RMN



11

12

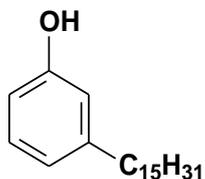
## 13 8.2 METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

14

15

16 O derivado 3-pentadecilfenol (LDT10, **26**), também denominado  
 17 cardanol saturado, foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich® com pureza  
 18 de 90 %. **26** foi recristalizado em hexano e posteriormente caracterizado por  
 19 RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas para confirmação da  
 20 estrutura e verificação da pureza.

21

1 3-Pentadecifenol (LDT10, **26**)

Sólido bege

Rendimento: 80 %

R<sub>f</sub>: 0,35 (Hex:DCM; 1:1)

Ponto de fusão: 44-45 °C

Fórmula Molecular: C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>O

Massa molar: 304,52 g/mol

2

3

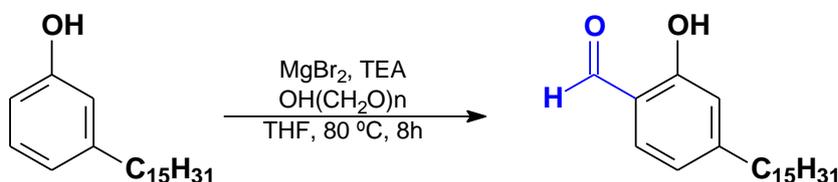
4 **RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,92 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, 15'); 1,29-1,33 (m,  
5 24H, 3'-14'); 1,60-1,61 (m, 2H, 2'); 2,58 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, 1'); 6,67-6,69 (m,  
6 2H, 2 e 6); 6,79 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, 4); 7,16 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, 5).

7 **RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14,3 (CH<sub>3</sub>, 15'); 22,9 (CH<sub>2</sub>, 14'); 29,6-29,9  
8 (CH<sub>2</sub>, 3'-12'); 31,5 (CH<sub>2</sub>, 2'); 32,2 (CH<sub>2</sub>, 13'); 36,0 (CH<sub>2</sub>, 1'); 112,8 (CH, 6);  
9 115,6 (CH, 2); 121,2 (CH, 4); 129,5 (CH, 5); 145,2 (CH, 3); 155,6 (C, 1).

10 **MS (ESI) m/z:** 303,55 [M·H]<sup>-</sup>, 607,16 [2M·H]<sup>-</sup>.

11

12 **8.2.1 Obtenção do derivado 2-hidróxi-4-pentadecilbenzaldeído (LDT77,**  
13 **29)**



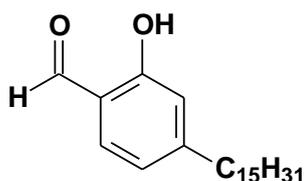
14

15

16 A um balão de 250,0 mL foram adicionados 10,0 g do LDT10 (**26**)  
17 (32,84 mmol), 9,15 mL de trietilamina (65,68 mmol), 12,1 g de brometo de  
18 magnésio (65,68 mmol) e tetrahidrofurano anidro (150,0 mL). A mistura  
19 permaneceu sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 60  
20 minutos. Após esse tempo foi adicionado, lentamente, 2,9 g de  
21 paraformaldeído (98,51 mmol) e o sistema reacional mantido sob agitação  
22 magnética, refluxo à 80 °C, acoplado a condensador com resfriamento a – 10  
23 °C, por 8 h. Após esse período, o sistema reacional foi resfriado à temperatura  
24 ambiente e, sob banho de gelo, a mistura foi acidificada com solução de HCl  
25 a 50 % até pH 3,0 e extraída com acetado de etila (3 x 20,0 mL). As frações

1 orgânicas reunidas foram lavadas com solução saturada de cloreto de sódio  
 2 (20,0 mL), tratadas com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado à  
 3 pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado em coluna cromatográfica  
 4 contendo gel sílica, eluída com mistura de hexano e diclorometano (1:1)  
 5 fornecendo o LDT77 (**29**).

6

7 2-Hidróxi-4-pentadecilbenzaldeído (LDT77, **29**)

8

9

10

Sólido branco

Rendimento: 84 %

R<sub>f</sub>: 0,73 (Hex:DCM; 1:1)

Ponto de fusão: 48-50 °C

Fórmula Molecular: C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>

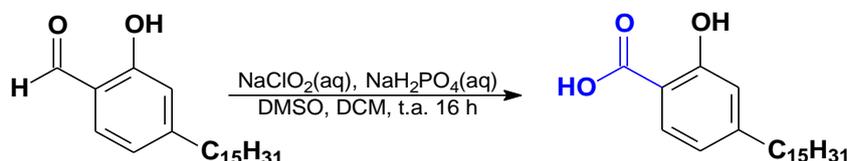
Massa molar: 332,53 g/mol

11 **RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,89 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H, 15'); 1,26-1,30 (m,  
 12 24H, 3'-14'); 1,60-1,65 (m, 2H, 2'); 2,62 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 1'); 6,80 (m, 1H, 2);  
 13 6,85 (dd, *J* = 8,5 Hz, *J* = 1,3 Hz, 1H, 4); 7,45 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5); 9,83 (s, 1H,  
 14 CHO); 11,05 (s, 1H, OH).

15 **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 14,3 (CH<sub>3</sub>, 15'); 22,9 (CH<sub>2</sub>, 14'); 29,4-29,9  
 16 (CH<sub>2</sub>, 3'-12'); 30,9 (CH<sub>2</sub>, 2'), 32,1 (CH<sub>2</sub>, 13'), 36,6 (CH<sub>2</sub>, 1'); 117,3 (CH, 2);  
 17 119,0 (C, 6); 120,7 (CH, 4); 133,8 (CH, 5); 154,0 (C, 3); 162,0 (C, 1); 196,0  
 18 (C=O).

19

20 **8.2.2 Obtenção do derivado ácido 2-hidróxi-4-pentadecilbenzóico**  
 21 **(LDT380, 28)**



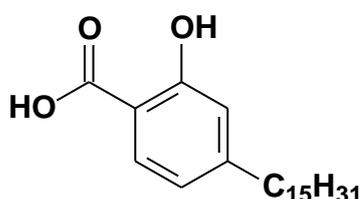
22

23

24 A um balão de 100,0 mL foi solubilizado 1,0 g do LDT77 (**29**) (3,01  
 25 mmol), diclorometano (20,0 mL) e DMSO (20,0 mL). Sob banho de gelo foi  
 26 adicionado solução de clorito de sódio 1 M (10,0 mL) e, lentamente, a solução  
 27 de monofosfato de sódio 1 M (10,0 mL). A mistura permaneceu sob agitação

1 magnética, à temperatura ambiente, por 16 h. Após esse período a mistura foi  
 2 acidificada com HCl 10 %, extraída com acetato de etila (2 x 20,0 mL). As  
 3 fases orgânicas foram reunidas e lavadas com solução saturada de cloreto de  
 4 sódio e tratada com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado a  
 5 pressão reduzida, o resíduo purificado por recristalização em hexano  
 6 fornecendo o intermediário LDT380 (**28**, ácido isoanacárdico)

8 Ácido 2-Hidróxi-4-pentadecilbenzóico (LDT380, **28**)



Sólido branco

Rendimento: 89 %

Rf: 0,67 (Hex:AcOEt; 1:1)

Ponto de fusão: 91,9-93,9 °C

Fórmula Molecular: C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>

Massa molar: 348,53 g/mol

10  
11  
12 **RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, Piridina):** δ 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H, 15'); 1,31 (m, 24H,  
 13 3'- 14'); 1,63-1,67 (m, 2H, 2'); 2,63 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, 1'); 6,89 (dd, *J* = 7,3 Hz,  
 14 *J* = 1,4 Hz, 1H, 4); 7,13 (s, 1H, 2); 8,25 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, 5); 11,04 (sl, 1H,  
 15 OH); 11,78 (sl, 1H, COOH)

16 **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, Piridina):** δ 14,8 (CH<sub>3</sub>, 15'); 23,4 (CH<sub>2</sub>, 14'); 30,0-30,5  
 17 (CH<sub>2</sub>, 3'- 12'); 31,7 (CH<sub>2</sub>, 2'); 32,6 (CH<sub>2</sub>, 13'); 36,8 (CH<sub>2</sub>, 1'); 113,2 (C, 6); 117,8  
 18 (CH, 2); 120,2 (CH, 4); 131,6 (CH, 5); 151,9 (C, 3); 163,5 (C, 1); 174,9 (CO<sub>2</sub>H).

### 20 8.2.3 Obtenção do LCC natural

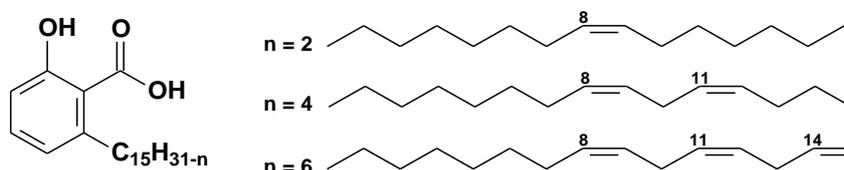
21  
22 O LCC natural foi obtido a partir da extração das castanhas de caju *in*  
 23 *natura*, adquiridas em Fortaleza. As castanhas foram cortadas (500,0 g) em  
 24 pequenos fragmentos, expondo o mesocarpo esponjoso, e adicionadas ao  
 25 extrator de soxhlet. O sistema foi acoplado a balão de 1000,0 mL, ao qual foi  
 26 adicionado etanol absoluto (500,0 mL). O sistema ficou sob refluxo,  
 27 aquecimento com manta, condensador de bola e com sistema de resfriamento  
 28 à 10 °C por 24 h, observando-se ao final o esgotamento pelo sifão. Após esse

1 período o sistema, o sistema foi resfriado a temperatura ambiente e separou-  
 2 se o extrato. O solvente foi evaporado à pressão reduzida, fornecendo o LCC  
 3 natural, como mistura de compostos fenólicos, entre eles o ácido anacárdico  
 4 (componente majoritário).

5

#### 6 **8.2.4 Obtenção da mistura de ácidos Anacárdicos (LDT11i, 17) a partir do** 7 **LCC natural**

8

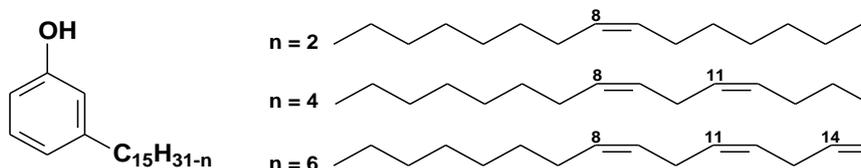


10

11 A um balão de 250,0 mL foram adicionados 30,0 g de LCC natural e  
 12 15,0 g de  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ , previamente solubilizado em água destilada (10,0 mL), e  
 13 200,0 mL da mistura de metanol e água destilada na proporção de 6:1. O  
 14 sistema reacional foi submetido a refluxo por 3 h sob agitação magnética,  
 15 aquecimento em banho de óleo a 80 °C, sistema de resfriamento do  
 16 condensador a 10 °C. Após esse período a reação foi resfriada para  
 17 temperatura ambiente e o precipitado foi filtrado à vácuo, fornecendo os sais  
 18 de anacardato de cálcio. O sal foi transferido para um erlenmeyer de 250,0  
 19 mL, solubilizado em 150,0 mL de acetato de etila, e sob agitação magnética,  
 20 banho de água/gelo, foi adicionado solução de HCl 50 %, até pH 1,0,  
 21 favorecendo a liberação da mistura de ácidos anacárdicos. A solução foi  
 22 transferida para um funil de separação, a fase orgânica foi separada, lavada  
 23 com solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de sódio anidro.  
 24 O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo purificado em coluna  
 25 cromatográfica de gel de sílica, eluída com hexano e acetato de etila no  
 26 gradiente de 5 %, 10 %, 20 % e 50 %, fornecendo a mistura de ácidos  
 27 anacárdicos em rendimento de 80 %, com  $R_f$  0,35 (Hex:AcOEt; 8:2).

1 **8.2.5 Obtenção da mistura de cardanois (LDT10i, 18)**

2

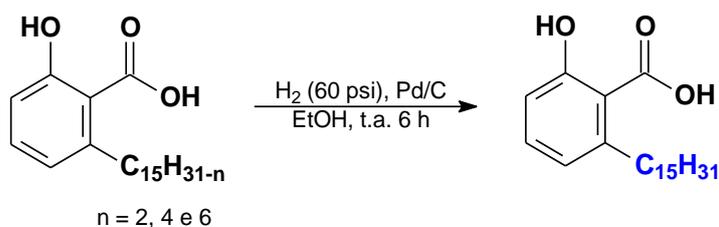


5 A mistura de cardanois insaturados foi purificada a partir do LCC  
6 técnico fornecido pela Resibras Indústria de Castanha. A purificação foi  
7 realizada por meio de coluna cromatográfica em gel de sílica, eluída com  
8 hexano, fornecendo a misturas de cardanois em rendimento de 80 % em  
9 relação à massa total aplicada na coluna. A mistura não foi caracterizada por  
10 métodos espectrométricos, mas foi comparada com padrão do laboratório,  
11 apresentando Rf 0,35 (DCM:Hex; 1:1) compatível com o padrão.

12

13 **8.2.6 Obtenção do derivado ácido 2-hidróxi-6-pentadecilbenzóico**  
14 **(LDT11, 27)**

15



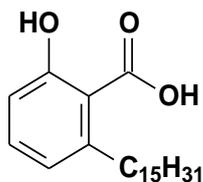
17 Ao frasco de hidrogenação foram adicionados 2,0 g da mistura de  
18 ácidos anacárdicos (~ 5,60 mmol), 0,1 g do catalisador paládio carvão a 10%  
19 (Pd/C) e etanol (50,0 mL). A atmosfera do sistema reacional foi alterada para  
20 hidrogênio por duas trocas consecutivas a 10 Psi em reator Paar. A seguir o  
21 sistema de hidrogenação foi submetido à pressão de 60 psi de hidrogênio e  
22 em 10 min ajustado novamente para 60 psi de hidrogênio, permanecendo à  
23 temperatura ambiente, sob agitação, por 6 h. Após esse tempo a mistura foi  
24 filtrada para remoção do catalisador. O solvente foi evaporado à pressão

1 reduzida e o resíduo obtido foi recristalizado em hexano fornecendo o ácido  
2 anacárdico saturado LDT11 (27).

3

4 **Ácido 2-Hidróxi-6-pentadecilbenzóico - LDT11 (27)**

5



6

7

8

Sólido Branco

Rendimento: 90 %

RF: 0,48 (Hex:AcOEt; 8:2)

Ponto de fusão: 81°C-84 °C

Fórmula Molecular: C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>

Massa molar: 348,52 g/mol

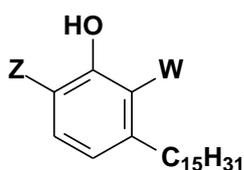
9 **RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,89 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H, 15'); 1,26 (m, 24H,  
10 3'-14'); 1,60 (qi, *J* = 6,6 Hz, 2H, 2'); 3,00 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, 1'); 6,79 (d, *J* = 7,4  
11 Hz, 1H, 6); 6,89 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, 4); 7,37 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, 5); 10,72 (s,  
12 ArOH).

13 **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14,3 (CH<sub>3</sub>, 15'); 22,9 (CH<sub>2</sub>, 14'); 29,6-30,0  
14 (CH<sub>2</sub>, 3'-12'); 32,1 (CH<sub>2</sub>, 13'); 32,2 (CH<sub>2</sub>, 2'); 36,7 (CH<sub>2</sub>, 1'); 110,6 (C, 2); 116,1  
15 (CH, 6); 123,0 (CH, 4); 135,6 (CH, 5); 148,1 (C, 3); 163,8 (C, 1); 176,5  
16 (ArCO<sub>2</sub>H).

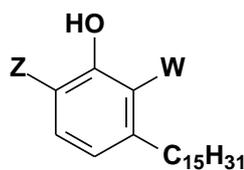
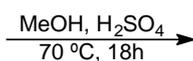
17

18 **8.2.7 Obtenção dos intermediários 2-hidróxi-6-pentadecilbenzoato de**  
19 **metila (LDT29, 30) e 2-hidróxi-4-pentadecilbenzoato de metila (LDT381,**  
20 **31)**

21



LDT11 (27) Z = H e W = COOH  
LDT380 (28) Z = COOH e W = H



LDT29 (30) Z = H e W = COOCH<sub>3</sub>  
LDT381 (31) Z = COOCH<sub>3</sub> e W = H

22

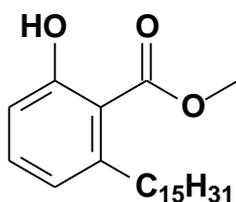
23

1 A um balão de 50,0 mL foi adicionada a mistura de ácidos anacárdicos  
 2 LDT11 (**27**) ou ácidos isoanacárdicos (LDT380, **28**) (2,00 mmol), solubilizado  
 3 em metanol (16,0 mL) e adicionado sob banho de gelo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,0 mL). O  
 4 sistema reacional permaneceu em refluxo, com sistema de resfriamento do  
 5 condensador a 0 °C e aquecimento em banho de óleo à 70 °C, sob agitação  
 6 magnética por 18 h. A mistura foi extraída com diclorometano (3 x 10,0 mL) e  
 7 a fase orgânica lavada com solução saturada de cloreto de sódio (15 mL),  
 8 tratada com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado à pressão  
 9 reduzida e mistura purificada em coluna cromatográfica de gel de sílica, eluída  
 10 com gradiente de hexano e acetato de etila 5 % a 40 %, fornecendo o LDT29  
 11 e LDT381 em rendimentos de 80 % e 90%, respectivamente.

12

13 2-Hidróxi-6-pentadecilbenzoato de metila (LDT29, **30**)

14



15

16

Sólido branco

Rendimento: 80 %

RF: 0,60 (Hex:AcOEt, 8:2)

Ponto de fusão: 37-40 °C

Fórmula Molecular: C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>

Massa molar: 362,54 g/mol

17 **RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H, 15'); 1,27-1,31 (m,  
 18 24H, 3'-14'); 1,53 (qi, *J* = 7,1 Hz, 2H, 2); 2,89 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, 1'); 3,97 (s,  
 19 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 6,72 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, 6); 6,84 (d, *J* = 8,28 Hz, 1H, 4); 7,29 (t,  
 20 *J* = 8,0 Hz, 1H, 5); 11,09 (s, 1H, OH).

21 **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14,3 (CH<sub>3</sub>, 15'); 22,9 (CH<sub>2</sub>, 14'); 29,6-30,1  
 22 (CH<sub>2</sub>, 3'-12'); 32,2 (CH<sub>2</sub>, 13'); 32,3 (CH<sub>2</sub>, 2'); 36,8 (CH<sub>2</sub>, 1'); 52,3 (CH<sub>3</sub>,  
 23 CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 115,8 (CH, 6); 122,7 (CH, 4); 134,4 (CH, 5); 146,4 (C, 3); 162,8 (C,  
 24 1); 172,2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

25 **MS (ESI) m/z:** 361,49 [M-H]<sup>-</sup>

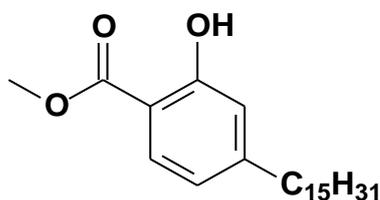
26

27

28

1 2-Hidróxi-4-pentadecilbenzoato de metila (LDT381, **31**)

2



Sólido branco

Rendimento: 90 %

R<sub>f</sub>: 0,57 (Hex:DCM; 1:1)

Ponto de fusão: 40,6-42,6 °C

Fórmula Molecular: C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>

Massa molar: 362,55 g/mol

3

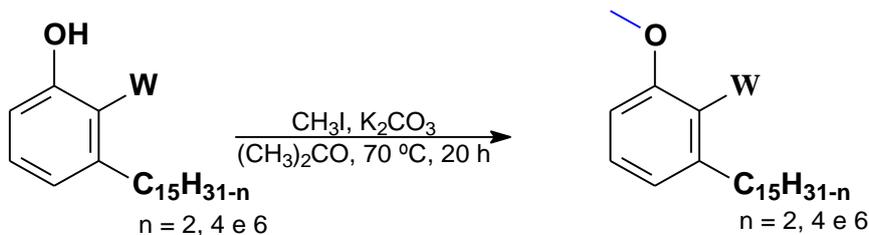
4 **RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H, 15'); 1,27-1,31 (m,  
5 24H, 3'-14'); 1,60-1,62 (m, 2H, 2'); 2,59 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, 1'); 3,94 (s, 3H,  
6 COOCH<sub>3</sub>); 6,71 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, 5); 6,81 (s, 1H, 4); 7,73 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H,  
7 6); 10,72 (s, 1H, OH).

8 **RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14,3 (CH<sub>3</sub>, 15'); 22,9 (CH<sub>2</sub>, 14'); 29,5-29,9  
9 (CH<sub>2</sub>, 3'-12'); 30,9 (CH<sub>2</sub>, 2'); 32,2 (CH<sub>2</sub>, 13'); 36,4 (CH<sub>2</sub>, 1'); 52,3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  
10 110,2 (C, 6); 117,2 (CH, 2); 120,0 (CH, 4); 130,0 (CH, 5); 152,2 (C, 3); 161,8  
11 (C, 1); 170,8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

12 **MS (ESI) m/z:** 361,50 [M-H]<sup>-</sup>.

13

14 **8.2.8 Obtenção da mistura de 3-metóxicardanois (LDT27i, **32**) e de 2-**  
15 **pentadecil-6-metóxfenilbenzoato de metila (LDT28i, **33**)**



LDT10i (**18**) W = H  
LDT11i (**17**) W = COOH

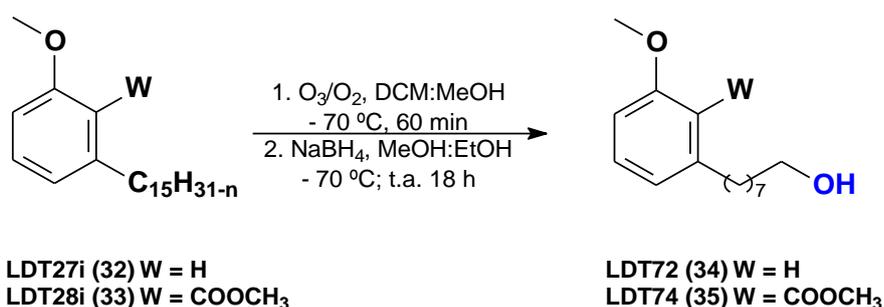
LDT27i (**32**) W = H  
LDT28i (**33**) W = COOCH<sub>3</sub>

16

17 A um balão de 125,0 mL contendo mistura de Cardanois (LDT10i, **18**),  
18 ou mistura de Ácidos Anacárdicos (LDT11i, **17**) (16,00 mmol) em acetona  
19 (30,0 mL) foi adicionado K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 equiv., ou 3 equiv., respectivamente). A  
20 solução permaneceu sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente.  
21 Ao final deste tempo foi adicionado o CH<sub>3</sub>I (64,00 mmol) e o sistema reacional  
22 foi submetido a refluxo, com sistema de resfriamento do condensador a 0 °C  
23 e aquecimento em banho de óleo à 70 °C, sob agitação magnética por 24 h.

1 Após este tempo o solvente foi evaporado à pressão reduzida, a mistura  
 2 resultante extraída com diclorometano (3 x 15 mL) e as fases orgânicas  
 3 reunidas foram lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (15 mL). A  
 4 fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado  
 5 à pressão reduzida. A mistura resultante foi purificada por cromatografia em  
 6 coluna contendo gel de sílica, eluída com mistura de hexanos e acetato de  
 7 etila no gradiente de 5 %, 10 %, 20 % para os derivados ésteres, fornecendo  
 8 3-Metóxicardanois (LDT27i, **32**), a mistura de 2-(pentadecil)-6-  
 9 metoxifenilbenzoato de metila (LDT28i, **33**) em rendimentos de 80 % e 90 %.  
 10

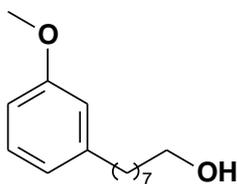
11 **8.2.9 Obtenção dos derivados álcoois 8-(3-metóxfenil)octan-1-ol (LDT72,**  
 12 **34) e 2-(8-hidróxiocetil)-6-fenilbenzoato de metila (LDT74, 35)**



13 A um balão de ozonólise (250,0 mL) contendo 4,0 g da mistura 3-  
 14 Metóxicardanois (LDT27i, **32**) ou da mistura de 2-(pentadecil)-6-  
 15 metoxifenilbenzoato de metila (LDT28i, **33**), foram adicionados diclorometano  
 16 (30 mL) e metanol (30 mL). O sistema reacional foi resfriado em banho de  
 17 gelo seco/acetona à temperatura a  $-70^\circ\text{C}$ , sob agitação magnética e fluxo  
 18 contínuo de ozônio (5 g/mL) por 60 minutos (3 x de 20''). O consumo do  
 19 material de partida foi acompanhado por CCD. Após esse tempo a solução foi  
 20 transferida para um erlenmeyer de 1000,0 mL e, sob banho de gelo seco foi  
 21 transferida a solução de 3,8 g de borohidreto de sódio (101,16 mmol) em  
 22 metanol (30,0 mL) e etanol (30,0 mL), permanecendo sob agitação magnética  
 23 por 18 h. Após esse período a mistura foi acidificada com solução de ácido  
 24 clorídrico 50 % até pH 3,0 e o resíduo foi extraído com diclorometano (3 x 20,0

1 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (15 mL), tratada com sulfato de sódio anidro e posteriormente evaporada à pressão reduzida. O resíduo foi purificado em coluna de gel de sílica, eluída com hexano e gradiente de acetato de etila 0 %, 5 %, 15 % e 25 %, fornecendo os derivado álcool 8-(3-metóxiifenil)octan-1-ol (LDT72, **34**), do derivado álcool 2-(8-hidróxiocetil)-6-fenilbenzoato de metila (LDT74, **35**) como óleos incolores e com rendimentos de 75 % e 85 %.

8

9 8-(3-Metóxiifenil)octan-1-ol (LDT72, **34**)

Óleo incolor

Rendimento: 85 %

Rf: 0,4 DCM

Fórmula Molecular: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>

Massa molar: 236,33 g/mol

10

11

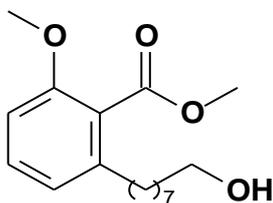
12 **RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1,33 (sl, 8H, 3'-6'); 1,54-1,63 (m, 4H, 2' e  
13 7'); 2,59 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, 1'); 3,64 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, 8'); 3,80 (s, 3H, 1');  
14 6,72-6,74 (m, 2H, 2 e 6); 6,78 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, 4); 7,20 (t, *J* = 8,2 Hz, 1H,  
15 5).

16 **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 25,9 (CH<sub>2</sub>, 3'); 29,4 (CH<sub>2</sub>, 6'); 29,5 (CH<sub>2</sub>, 4');  
17 29,6 (CH<sub>2</sub>, 5'); 31,5 (CH<sub>2</sub>, 2'); 32,9 (CH<sub>2</sub>, 7'); 36,2 (CH<sub>2</sub>, 1'); 55,3 (CH<sub>3</sub>, 1");  
18 63,2 (CH<sub>2</sub>, 8'); 111,0 (CH, 6); 114,4 (CH, 2); 121,0 (CH, 4); 129,3 (CH, 5);  
19 144,7 (C, 3); 159,7 (C, 1).

20 **MS (ESI) m/z:** 236,91 [M+H]<sup>+</sup>, 259,04 [M+Na]<sup>+</sup>.

21

22

1 2-(8-Hidróxiocetil)-6-metóxiibenzoato de metila (LDT-74, **35**)

Óleo incolor

Rendimento: 80 %

R<sub>f</sub>: 0,3 DCMFórmula Molecular: C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>

Massa molar: 294,39 g/mol

2

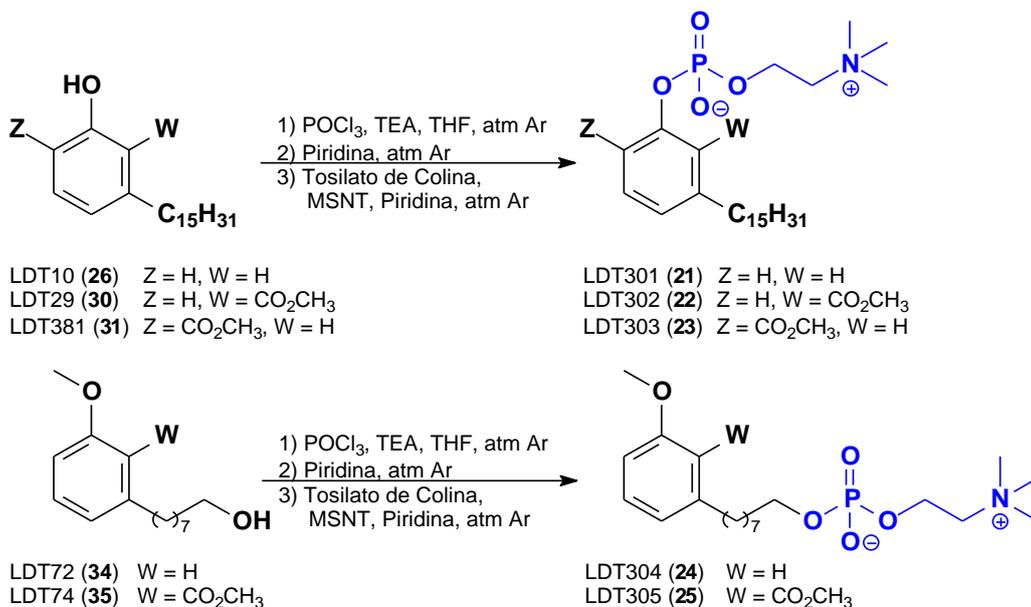
3

4 **RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1,30 (sl, 8H, 3'-6'); 1,51-1,56 (m, 4H, 2' e  
 5 7'); 2,53 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, 1'); 3,61 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, 8'); 3,80 (s, 3H, 1'); 3,90  
 6 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 6,75 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, 6); 6,81 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, 4); 7,25-  
 7 7,28 (m, 1H, 5).

8 **RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 25,3 (CH<sub>2</sub>, 3'); 29,4 (CH<sub>2</sub>, 6'); 29,5 (CH<sub>2</sub>, 4');  
 9 29,5 (CH<sub>2</sub>, 5'); 31,2 (CH<sub>2</sub>, 2'); 32,9 (CH<sub>2</sub>, 7'); 33,6 (CH<sub>2</sub>, 8'); 52,3 (CH<sub>3</sub>, 1');  
 10 56,2 (CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 63,1 (CH<sub>2</sub>, 8'); 108,5 (CH, 6); 121,6 (C, 2); 123,6 (CH,  
 11 4); 130,4 (CH, 5); 141,45 (C, 3); 156,4 (C, 1); 169,2 (C, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

12 **MS (ESI) m/z:** 294,83 [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>, 317,18 [M<sup>+</sup>Na]<sup>+</sup>, 610,81[2M<sup>+</sup>Na]<sup>+</sup>.

1

2 **8.2.10 Obtenção dos lipídeos fosfocolínicos a partir dos Intermediários**3 **fenólicos e álcoois**

4

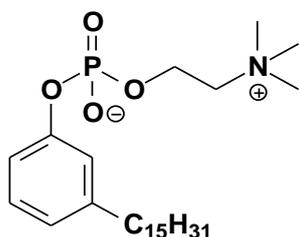
5 Os intermediários álcoois LDT72 (**34**) e LDT74 (**35**) ou fenóis LDT11  
 6 (**26**), LDT29 (**30**) e LDT381 (**31**) foram submetidos à fosforilação. A reação  
 7 ocorre em três etapas, sendo que a primeira envolve o preparo de duas  
 8 soluções. Solução **A**: a um balão de 50,0 mL foi adicionado 1 equivalente (1  
 9 eq) do intermediário álcool ou fenol (LDT72, LDT74, LDT11, LDT29 ou  
 10 LDT381),  $\frac{3}{4}$  do volume de THF (0,216 molL<sup>-1</sup>) e TEA (1,8 eq). Solução B: a  
 11 um balão de 50,0 mL com THF (0,26 molL<sup>-1</sup>), foi adicionado o POCl<sub>3</sub> (1,6 eq),  
 12 sob agitação magnética, atmosfera de argônio à 0 °C. A solução **A** foi  
 13 transferida para o funil de adição com equalização de pressão conectado ao  
 14 sistema e ajustado a adição de uma gota a cada 5 segundos, mantendo  
 15 agitação magnética, e sistema a 0 °C. Após finalizar a adição da solução foi  
 16 transferido para o funil de adição  $\frac{1}{4}$  do THF calculado para a solução A e o  
 17 gotejamento ajustado para uma gota a cada 10 segundos. Após finalizar a  
 18 adição o sistema evoluiu para temperatura ambiente, mantendo-se a agitação  
 19 magnética por 40 minutos. Após esse período realizou-se uma CCD eluída  
 20 com éter de petróleo e acetato de etila (8:2) utilizando como referência o

1 produto de partida, tendo sido observado redução do Rf, com consumo de  
2 todo produto. Adicionou-se então água ao sistema reacional, à 0 °C, em  
3 quantidade suficiente para observar desativação do excesso de  $\text{POCl}_3$ . Após  
4 esta etapa, a solução resultante foi extraída com acetato de etila (2 x 20,0  
5 mL), diclorometano (2 x 20,0 mL). As fases orgânicas foram reunidas, tratadas  
6 com sulfato de sódio anidro e evaporada a pressão reduzida, fornecendo o  
7 intermediário fosforilado.

8 A um balão de 50,0 mL foi adicionado o intermediário fosforilado obtido  
9 na primeira etapa, solubilizado em piridina ( $0,13 \text{ molL}^{-1}$ ), sob atmosfera de  
10 argônio. A mistura ficou sob agitação, à 55 °C por 3 h. Após esse tempo, a  
11 reação foi resfriada para temperatura ambiente e a piridina foi posteriormente  
12 evaporada à pressão reduzida. Foram realizados dois ciclos de adição de  
13 piridina (1,5 mL) e evaporação do solvente à pressão reduzida, para formação  
14 do sal de piridínio. A seguir foi adicionado a piridina sob atmosfera de argônio  
15 e o sistema ficou sob agitação por 10 min. Após esse tempo, mantendo-se a  
16 atmosfera de argônio e à temperatura de 0 °C, foi adicionado o tosilato de  
17 colina (1,4 eq), e posteriormente o MSNT (1-(2-mesitilenosulfonil)-3-nitro-1*H*-  
18 1,2,4-triazola); 1,5 eq), lentamente, com pequenas porções a cada 40  
19 segundos. O sistema reacional ficou sob agitação magnética à temperatura  
20 ambiente por 36 h, acompanhando por CCD. Após esse período foi  
21 adicionado, à 0°C, a solução de 2-propanol/água (7:3). A mistura ficou sob  
22 agitação magnética por 30 min e após esse tempo evaporou-se o solvente à  
23 vácuo e o resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel,  
24 utilizando a mistura de diclorometano, metanol e solução de hidróxido de  
25 amônia 25%, nos seguintes gradientes, respectivamente (90:10:1%),  
26 (80:20:1%), (70:30:1%), (60:40:1%), (50:50:1%), (40:60:1%), fornecendo os  
27 derivados fosfocolina.

28

29

1 3-Pentadecilfenil(2-(trimetilamonio)etilfosfato (LDT301, **21**)

Sólido branco

Rendimento: 52 %

Rf: 0,6 (MeOH)

Ponto de fusão: baixo pf

Fórmula Molecular: C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>4</sub>P

Massa molar: 469,65 g/mol

2

3

4 **RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 0,92 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, H15'); 1,30-1,35 (m,  
5 24H, 3'-14'); 1,61-1,64 (m, 2H, 2'); 2,60 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 1'); 3,19 (s, 9H, c),  
6 3,64 (m, 2H, b); 4,36 (m, 2H, a); 6,93 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5); 7,06 (d, *J* = 8,1  
7 Hz, 1H, 4); 7,09 (s, 1H, 2); 7,21 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, 6).

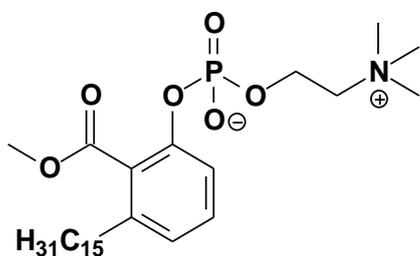
8 **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 14,5 (CH<sub>3</sub>, 15'); 23,8 (CH<sub>2</sub>, 14'); 30,5-30,6-  
9 30,8 (CH<sub>2</sub>, 3'-12'); 32,2 (CH<sub>2</sub>, 2'); 33,1 (CH<sub>2</sub>, 13'); 36,0 (CH<sub>2</sub>, 1'); 54,6 (CH<sub>3</sub>, c)  
10 60,9 (CH<sub>2</sub>, b); 67,3 (CH<sub>2</sub>, a); 118,4 (CH, 6); 121,1 (CH, 2); 124,7 (CH, 4); 130,1  
11 (CH, 5); 145,7 (C, 3), 154,0 (C, 1).

12 **RMN de <sup>31</sup>P (121 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ -5,64

13 **MS (ESI) m/z:** 470,40 [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>, 492,25 [M<sup>+</sup>Na]<sup>+</sup>, 939,27 [2M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>,  
14 961,41[2M<sup>+</sup>Na]<sup>+</sup>.

15 **HRMS (m/z):** [M<sup>+</sup>Na]<sup>+</sup> Calculado C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>NNaO<sub>4</sub>P 492,32; Encontrado 492,32.

16

17 2-(Carbometóxi)-5-pentadecilfenil(2-(trimetilamonio)etilfosfato (LDT302, **22**)

Sólido branco

Rendimento: 28 %

Rf: 0,45 (MeOH)

Ponto de fusão: baixo pf

Fórmula Molecular: C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>6</sub>P

Massa molar: 527,68 g/mol

18

19 **RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 0,85 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H, H15'); 1,23 (sl, 24H,  
20 3'-14'); 1,50 (m, 2H, 2'); 2,50 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, 1'); 3,09 (s, 9H, c); 3,54-3,57

1 (m, 2H, b); 3,65 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4,25 (m, 2H, a); 6,93 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H, 4);  
 2 7,24 (t,  $J = 7,8$  Hz, 1H, 5); 7,38 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, 6).

3 **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  14,5 (CH<sub>3</sub>, 15'); 23,8 (CH<sub>2</sub>, 14'); 30,5-30,7-  
 4 30,8 (CH<sub>2</sub>, 3'-12'); 32,5 (CH<sub>2</sub>, 2'); 34,4 (CH<sub>2</sub>, 13'); 36,9 (CH<sub>2</sub>, 1'); 54,6 (CH<sub>3</sub>, c)  
 5 60,9 (CH<sub>2</sub>, b); 67,4 (CH<sub>2</sub>, a); 118,2 (CH, 6); 125,17 (CH, 2); 127,2 (CH, 4);  
 6 131,3 (CH, 5); 142,6 (CH, 3), 150,8 (C, 1); 170,1 (C, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

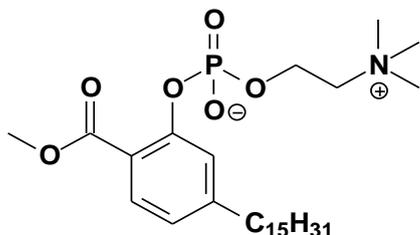
7 **RMN de <sup>31</sup>P (121 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  -6.42

8 **MS (ESI) m/z:** 550,24 [M<sup>+</sup>Na]<sup>+</sup>.

9 **HRMS (m/z):** [M<sup>+</sup>Na]<sup>+</sup> calculado C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>NNaO<sub>6</sub>P 550,32; encontrado 550,32.

10

11 2-(Carbometóxi)-5-pentadecil(fenil(2-(trimetilamonio)etilfosfato (LDT303, **23**)



Sólido branco

Rendimento: 48 %

Rf: 0,45 (MeOH)

Ponto de fusão: baixo pf

Fórmula Molecular: C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>6</sub>P

Massa molar: 527,68 g/mol

12

13 **RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  0,91 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H, 15'); 1,30-1,35 (m,  
 14 24H, 3'-14'); 1,65-1,67 (m, 2H, 2'); 2,65 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H, 1'), 3,26 (s, 9H, c);  
 15 3,74 (m, 2H, b); 3,86 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4,50 (m, 2H, a); 6,99 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H,  
 16 4), 7,46 (s, 1H, 2), 7,74 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, 5).

17 **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  14,5 (CH<sub>3</sub>, 15'); 23,7 (CH<sub>2</sub>, 14'); 30,5-30,6-  
 18 30,7-30,8 (CH<sub>2</sub>, 3'-12'); 32,1 (CH<sub>2</sub>, 2'); 33,1 (CH<sub>2</sub>, 13'); 36,9 (CH<sub>2</sub>, 1'); 54,6  
 19 (CH<sub>3</sub>, c) 61,1 (CH<sub>2</sub>, b); 67,5 (CH<sub>2</sub>, a); 120,8 (CH, 6); 122,3 (CH, 2); 124,2 (CH,  
 20 4); 132,2 (CH, 5); 150,7 (CH, 3), 153,6 (C, 1); 167,5 (C, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

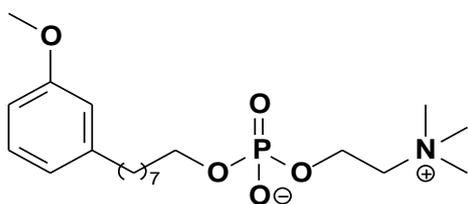
21 **RMN de <sup>31</sup>P (121 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  -6.02

22 **MS (ESI) m/z:** 550,32 [M<sup>+</sup>Na]<sup>+</sup>.

23 **HRMS (m/z):** [M<sup>+</sup>Na]<sup>+</sup> calculado C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>NNaO<sub>6</sub>P 550,33; encontrado 550,33.

24

25

1 8-(3-Metóxiifenil)octil (2-trimetilamonio)etil fosfato (LDT304, **24**)

Óleo

Rendimento: 67 %

RF: 0,3 (MeOH)

Fórmula Molecular: C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>5</sub>P

Massa molar: 401,48 g/mol

2

3 **RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ: 1,30-1,39 (m, 8H, 3'-6'); 1,45-1,70 (m, 4H,  
4 2'-4'); 2,57 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 1'); 3,22 (s, 9H, c); 3,32-3,33 (m, 2H, 8'); 3,63  
5 (sl, 2H, b); 3,77 (s, 3H, 1''); 4,25 (sl, 2H, a); 6,71-6,75 (m, 3H, 4,5,6); 7,16 (t,  
6 *J* = 7,5 Hz, 1H, 2).

7 **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ: δ 26,9 (CH<sub>2</sub>, 3'); 30,3 (CH<sub>2</sub>, 6'); 30,4 (CH<sub>2</sub>,  
8 4'); 30,6 (CH<sub>2</sub>, 5'); 31,8 (CH<sub>2</sub>, 2'); 32,6 (CH<sub>2</sub>, 7'); 36,9 (CH<sub>2</sub>, 1'); 54,7 (CH<sub>3</sub>, c);  
9 55,3 (CH<sub>3</sub>, 1''); 60,2 (CH<sub>2</sub>, b); 66,9 (CH<sub>2</sub>, a), 67,5 (CH<sub>2</sub>, 8'); 111,9 (CH, 4);  
10 115,1 (CH, 5); 121,8 (CH, 3); 130,2 (CH, 2); 145,6 (C, 6); 161,1 (C, 1).

11 **RMN de <sup>31</sup>P (121 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ -0.04

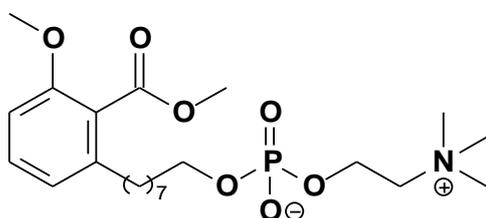
12 **MS (ESI) m/z:** 402,24 [M+H]<sup>+</sup>, 424,22 [M+Na]<sup>+</sup>, 440,19 [M+K]<sup>+</sup>.

13 **ESI-HRMS (m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> calculado C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>NNaO<sub>5</sub>P 424,22; encontrado  
14 424,22, [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub>P 402,24; encontrado 402,24.

15

16

17 8-(3-Metóxi-2((metoxicarbonil)fenil)octil(2-(trimetilamonio)etilfosfato (LDT305,  
18 **25**)



Líquido altamente viscoso

Rendimento: 47 %

RF: 0,25 (MeOH)

Fórmula Molecular: C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>7</sub>P

Massa molar: 459,52 g/mol

19

20 **RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ: 1,34-1,40 (m, 8H, 3'-6'); 1,56-1,66 (m, 4H,  
21 2'-4'); 2,53 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 1'); 3,32 (s, 9H, c); 3,33 (m, 2H, 8'); 3,63 (sl, 2H,  
22 b); 3,81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,88 (s, 3H, 1''); 4,26 (sl, 2H, a); 6,85-6,90 (m, 2H, 4 e  
23 6); 7,32 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, 5).

1 **RMN de  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  26,9 ( $\text{CH}_2$ , 3'); 30,3 ( $\text{CH}_2$ , 6'); 30,4  
2 ( $\text{CH}_2$ , 4'); 30,4 ( $\text{CH}_2$ , 5'); 31,8 ( $\text{CH}_2$ , 2'); 31,9 ( $\text{CH}_2$ , 7'); 34,3 ( $\text{CH}_2$ , 1'); 54,7  
3 ( $\text{CH}_3$ , c); 56,4 ( $\text{CH}_3$ , 1''); 60,2 ( $\text{CH}_2$ , b); 66,9 ( $\text{CH}_2$ , a), 67,5 ( $\text{CH}_2$ , 8'); 109,7  
4 ( $\text{CH}$ , 6); 122,6 ( $\text{CH}$ , 4); 131,6 ( $\text{CH}$ , 5); 142,2 (C, 3); 157,8 (C, 1); 170,7 (C,  
5  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ).

6 **RMN de  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):** -0.06

7 **MS (ESI) m/z:** 460,24 [ $\text{M}^+\text{H}$ ] $^+$ , 482,22 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ] $^+$ , 498,20 [ $\text{M}^+\text{K}$ ] $^+$ .

8 **HRMS (m/z):** [ $\text{M}^+\text{Na}$ ] $^+$  calculado  $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{NNaO}_7\text{P}$  482,23; encontrado 482,23.

9

10

### 11 8.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO FRENTE A 12 *TRYPANOSOMA CRUZI*, ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E 13 ULTRAESTRUTURAIS EM EPIMASTIGOTAS E CITOTOXICIDADE DOS 14 ANÁLOGOS LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS

15

16

17 Após sintetizados e caracterizados por RMN de hidrogênio e carbono-  
18 13 e por espectroscopia de massas os fosfolipídeos LDT301 (**21**), LDT302  
19 (**22**), LDT303 (**23**), LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) foram submetidos a ensaios  
20 de atividade sobre *T. cruzi*. Inicialmente realizou-se triagem dos compostos  
21 por meio do ensaio de viabilidade celular sobre células epimastigotas.  
22 Posteriormente, os compostos que apresentaram redução da viabilidade  
23 celular foram avaliados frente a atividade antiproliferativa no estágio  
24 epimastigota, assim com o efeito sobre a integridade da membrana plasmática  
25 de tripomastigotas, efeito sobre a proliferação de amastigotas, avaliação de  
26 alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e  
27 avaliação de alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura  
28 (MEV). Para os compostos que apresentaram melhor perfil realizou-se  
29 também a avaliação da citotoxicidade em células da linhagem LLC-MK<sub>2</sub> e  
30 células da linhagem HEPG2.

31

32

### 1 **8.3.1 Local do estudo**

2

3 Os ensaios biológicos frente ao *T. cruzi* foram realizados no Laboratório  
4 de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas  
5 Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

6

### 7 **8.3.2 Cepas do parasito e células utilizadas**

8

9 Utilizou-se da cepa Y de *T. cruzi* nos três estágios de desenvolvimento  
10 (epimastigota, tripomastigota e amastigota intracelular) e as linhagens de  
11 células LLC-MK<sub>2</sub> (ATCC, CCL-7), oriunda de rim de macaco-Rhesus (*Macaca*  
12 *mulatta*), utilizado para cultivo da forma tripomastigota em amastigotas; HFF-  
13 1 (ATCC SCRC-1041) de fibroblasto de pele humana e HEPG2 (ATCC  
14 HB8065) de hepatocarcinoma humano para avaliação da toxicidade hepática.

15 As células LLC-MK<sub>2</sub> e HEPG2 foram cultivadas em garrafas de cultura  
16 celular (25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup>) em meio RPMI 1640 acrescido de penicilina (100  
17 U/mL), estreptomicina (130 mg/L) e suplementado com 10 % de soro fetal  
18 bovino (SFB). As culturas foram mantidas em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a  
19 37°C, com visualização diária do crescimento em microscópio óptico invertido.  
20 O mesmo protocolo foi usado para a linhagem HFF-1, no entanto, esta foi  
21 cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* com 4mM de L-  
22 glutamina e 4500 mg/L de glicose (DMEM *High*).

23 Epimastigotas foram cultivados a temperatura de 28 °C, com meio LIT  
24 ("*Liver infusion tryptose*") suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB).  
25 As formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em células da linhagem  
26 LLC-MK<sub>2</sub>. Essas células foram cultivadas em garrafas de cultivo a 37 °C sob  
27 atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Em intervalos de 48 h, realizava-se a lavagem das  
28 células, adição do meio RPMI 1640 e suplementação com 10 % de SFB. Após  
29 o tempo supracitado observava-se a formação de monocamada confluenta.  
30 As células são desprendidas da garrafa utilizando tripsina (0,1 %) por 3  
31 minutos a 37 °C e redistribuídas em novas garrafas (2x10<sup>3</sup> células) com  
32 renovação do meio de cultura suplementado com 10 % de SFB. Após a

1 incubação de 24 h, as novas culturas são infectadas com tripomastigotas de  
2 *T. cruzi*. Essas células são incubadas por 2 h, lavadas com RPMI 1640, e  
3 reincubadas por 120 a 168 h até a liberação de tripomastigotas no  
4 sobrenadante. As tripomastigotas foram obtidas a partir do recolhimento do  
5 sobrenadante das culturas, utilizadas para novos cultivos ou para  
6 experimentos de avaliação de integridade de membrana plasmática após  
7 tratamento com os compostos alvo. Não foram utilizados parasitos liberados  
8 após 10 dias de infecção para evitar culturas mistas.

9

### 10 **8.3.3 Composto teste**

11

12 Os análogos de fosfolípidos LDT301 (**21**), LDT302 (**22**), LDT303 (**23**),  
13 LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) foram solubilizados em DMSO e submetidos a  
14 diferentes avaliações.

15

### 16 **8.3.4 Ensaios de viabilidade para triagem inicial dos compostos em** 17 **epimastigotas de *T. cruzi***

18

19 Foi realizado o teste de viabilidade por meio do método de redução do  
20 tetrazol MTS/PMS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-  
21 sulfofenil)-2H-tetrazolium] metossulfato de fenazina), padronizado por  
22 Henriques e colaboradores (2011) [80]. Utilizou-se da cultura de células com  
23 densidade de  $1 \times 10^6$  epimastigotas, cultivadas em meio LIT, suplementado  
24 com 10 % de SFB. Os compostos foram adicionados em duas concentrações  
25 finais diferentes - 5,0  $\mu\text{M}$  e 20,0  $\mu\text{M}$ . As placas foram incubadas em estufa por  
26 72 h, a 28 °C. Após esse período, as células foram centrifugadas a 450 g (10  
27 min) e lavadas com PBS-G (PBS suplementado com 6 mM de glicose, pH  
28 7,4). Para realizar o teste de viabilidade, 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra preparada  
29 foram transferidos para placas de 96 poços transparentes (TPP), em triplicata.  
30 Células não tratadas também foram transferidas para a placa como controle,  
31 assim como células previamente fixadas com paraformaldeído 0,4 % (controle  
32 negativo - obtenção de células inviáveis), diluído em PBS, por 10 minutos. Em

1 seguida adicionou-se 20 µL da solução de MTS/PMS em cada poço. As placas  
2 foram incubadas a 28°C por 2-3 h, na ausência de luz. Em seguida, realizou-  
3 se a análise em leitor de microplacas Spectra Max Molecular Devices M2  
4 (Molecular Devices, EUA) a 490 nm.

5

### 6 **8.3.5 Avaliação da atividade antiproliferativa dos compostos no estágio** 7 **epimastigota de *T. cruzi***

8

9 Realizou-se a avaliação do efeito antiproliferativo dos compostos  
10 LDT301 (**21**), LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) sobre formas epimastigotas,  
11 considerando os resultados obtidos no teste de viabilidade celular. Diferentes  
12 concentrações dos compostos (0,1 µM; 1,0 µM; 3,0 µM; 5,0 µM e 10,0 µM)  
13 foram adicionadas em placas contendo  $3 \times 10^6$  epimastigotas, em meio LIT  
14 suplementado com 10 % de SFB, incubadas por 72 h, a 28 °C. A densidade  
15 de células foi mensurada utilizando citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus –  
16 contagem limite de 10000 eventos por segundo (máximo de 20 µL, com taxa  
17 de fluidos na opção “slow”). O experimento foi realizado em triplicata. O IC<sub>50</sub>  
18 (concentração mínima necessária para inibir 50 % da proliferação) foi  
19 determinado utilizando os resultados do controle e das diferentes  
20 concentrações dos meios tratados.

21

### 22 **8.3.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática de** 23 **tripomastigota de *T. cruzi* tratados com os análogos fosfolipídeos**

24

25 Para avaliar a integridade da membrana plasmática de tripomastigotas  
26 de *T. cruzi* as células foram coletadas do sobrenadante da cultura de LLC-  
27 MK<sub>2</sub> infectada conforme descrito no item 8.2.2. A cultura de tripomastigota foi  
28 plaqueada em meio RPMI 1640, suplementadas com 10 % de SFB, na  
29 densidade  $1 \times 10^7$  célula/mL, na presença dos compostos LDT304 (**24**) e  
30 LDT305 (**25**), utilizando as diferentes concentrações 1,0 µM; 3,0 µM; 5,0 µM  
31 e 10,0 µM, incubados por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>. Como

1 controle positivo, os tripomastigotas foram incubados com 0,1 % de saponina.  
2 Após esse tempo as células foram incubadas com iodeto de propídeo (PI)  
3 para posterior análise em citometria de fluxo. O experimento foi realizado em  
4 triplicata.

5

### 6 **8.3.7 Avaliação da proliferação de amastigota de *T. cruzi* tratados com** 7 **os análogos fosfolipídeos**

8

9 Amastigotas intracelulares foram obtidos por meio do cultivo em células  
10 HFF-1 infectadas com tripomastigotas (1:10) por 24h. Após a diferenciação  
11 em amastigotas os análogos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) foram adicionados,  
12 isoladamente, nas concentrações 0,05  $\mu\text{M}$ ; 0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 1,0  $\mu\text{M}$  e 1,5  $\mu\text{M}$   
13 ao meio. A avaliação foi realizada após 24, 48 e 72 h, as células hospedeiras  
14 e amastigotas foram marcadas com *Hoescht* 33342 (1:5000), fotografadas em  
15 microscópio óptico Leica 6000B e a proliferação celular de amastigotas  
16 intracelulares foi avaliada por contagem de núcleos, com os resultados  
17 expressos como número de amastigotas por células hospedeiras infectadas  
18 em comparação com controles incubados sem tratamento.

19

### 20 **8.3.8 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células da linhagem** 21 **LLC-MK<sub>2</sub>**

22

23 A toxicidade dos compostos lipídeos fosfolínicos foi avaliada frente a  
24 células LLC-MK<sub>2</sub> utilizando o ensaio de MTS. A densidade de células de  $2 \times 10^3$   
25 célula/mL de LLC-MK<sub>2</sub> foi cultivada em placas de 96 poços contendo meio  
26 RPMI, suplementado com 10 % FBS e mantidas a 37 °C, com atmosfera de  
27 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 h de cultivo os compostos foram adicionados em diferentes  
28 concentrações LDT304 (**24**) e LDT301 (**21**) a 0,001  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ ,  
29 0,5 $\mu\text{M}$  e 1, 0  $\mu\text{M}$  e o LDT305 (**25**) a 0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 1,0  $\mu\text{M}$  e 5,0  
30  $\mu\text{M}$ , mantidas por 72 h a 37 °C, com atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>. A viabilidade

1 celular foi avaliada pelo método MTS/PMS conforme protocolo descrito no  
2 item **8.3.4**. O experimento foi realizado em triplicata e a concentração  
3 citotóxica para reduzir 50 % da viabilidade (CC50) de células LLC-MK2 foi  
4 determinada.

5

### 6 **8.3.9 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células da** 7 **linhagem HEPG2**

8

9 O potencial hepatotóxico *in vitro* dos compostos LDT304 (**24**) e LDT305  
10 (**25**) foi realizado utilizando com base linhagens de células hepáticas HEPG2  
11 por meio do ensaio de viabilidade celular de redução da resazurina (10mg/ml),  
12 um corante azul não fluorescente que funciona como indicador redox  
13 permeável. A biorredução desse indicador por células viáveis em cultura leva  
14 a formação de um compostos pink fluorescente que permite a quantificação  
15 de células viáveis [72]. A densidade de células utilizada foi de  $1 \times 10^4$  HEPG2,  
16 cultivadas em placas de 96 poços, em meio RPMI suplementado com FBS e  
17 incubado a 37 °C, a atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>. Após 24 h de cultivo foram  
18 adicionados os compostos em diferentes concentrações, variando de 0,5 µM;  
19 1,0 µM; 3,0 µM; 5,0 µM; 10,0 µM e 20,0 µM, considerando os testes de  
20 viabilidade celular e proliferação de epimastigotas. Como controle, utilizou-se  
21 células não tratadas (controle positivo) e células previamente fixadas com 0,4  
22 % de formaldeído (controle negativo – células não viáveis). Após 24, 48 e 72  
23 h, 20 µL da solução de resazurina foram adicionados e as placas incubadas a  
24 37 °C, a atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> por 4 h. Após esse tempo foram realizadas  
25 leituras de absorbância a 570 nm e 600 nm. O experimento foi realizado em  
26 triplicata.

27

28

29

### 1 **8.3.10 Avaliação de alterações ultraestruturais por microscopia** 2 **eletrônica de transmissão (MET)**

3

4 Epimastigotas e células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas com amastigotas foram  
5 cultivadas conforme descrito anteriormente. Após 72 h de tratamento as  
6 células foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5 %, em tampão  
7 cacodilato 0,1 M, pH 7,2, e formaldeído 4 %, pH 7,4. Após a fixação, as  
8 amostras foram lavadas três vezes sequenciais com tampão cacodilato de  
9 sódio 0,1 M, e pós-fixadas por 40 minutos em 1 % de tetróxido de ósmio e 1  
10 % de ferrocianeto de potássio, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M na  
11 ausência de luz. Em seguida realizou-se nova lavagem e as amostras foram  
12 desidratadas em acetona com série de 10 minutos cada, na concentração de  
13 30 %, 50 %, 70 %, 90 % e, por fim, 2 vezes a 100 %. Após esta etapa, as  
14 amostras foram incluídas em resina epóxi (Polybed 812®) seguindo o  
15 protocolo: (1<sup>a</sup> etapa) inclusão em solução contendo acetona absoluta e resina  
16 epóxi (proporção de 2:1) por 8 h; (2<sup>a</sup> etapa) inclusão em solução contendo  
17 acetona absoluta e resina (1:1) por 8 h; (3<sup>a</sup> etapa) acetona pura e resina epóxi  
18 (1:2) por 8 h; (4<sup>a</sup> etapa) resina pura por 6 h. Após as etapas descritas as  
19 amostras foram distribuídas em suportes contendo a resina epóxi e levadas a  
20 estufa a 60°C por 48 h, para polimerização. Posteriormente as amostras foram  
21 “trimadas”, cortadas em ultramicróto (Leica UC6), coletando cortes  
22 ultrafinos de 50-70 nm, montados em grades de cobre de 300 mesh e  
23 contrastados com 5 % de acetato de uranila em água destilada por 40, seguido  
24 de citrato de chumbo por 5 minutos. Os cortes foram analisados e fotografados  
25 em microscópio eletrônico de transmissão FEI Spirit, operando em 80 KV.

26

27

28

### 1 **8.3.11 Avaliação de alterações morfológicas por microscopia eletrônica** 2 **de varredura (MEV)**

3

4 Epimastigotas foram cultivadas conforme descrito anteriormente, na  
5 presença e ausência de tratamento (controle). Após 72 h as células foram  
6 lavadas com PBS e fixadas com solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão  
7 cacodilato 0,1 M, e sacarose 0,5 %. Após a fixação, as amostras foram  
8 transferidas para lamínulas tratadas com Poli-L-lisina (0,1mg/ml) para adesão,  
9 durante 20 minutos. Após esse tempo foram lavadas três vezes com PBS, e  
10 pós-fixadas por 40 minutos em 1 % de tetróxido de ósmio e 1 % de  
11 ferrocianeto de potássio, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, com proteção  
12 da luz. Em seguida, após 3 novas lavagens, as amostras foram desidratadas  
13 em séries crescentes de etanol (tempo de 10 minutos cada série) a 30 %, 50  
14 %, 70 %, 90 % e, por fim, duas vezes a 100 %. Após a desidratação, as  
15 amostras foram secas no equipamento de ponto crítico (Leica em CPD030),  
16 metalizadas com 5-10 nm de platina (Leica em SCD 500) e levadas para  
17 análise no Microscópio eletrônico de varredura, operando a 80kv.

18

### 19 **8.3.12 Análises estatísticas**

20

21 Análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad*  
22 *Prism 7* (GraphPad Software Inc., USA), aplicando teste de Análise de  
23 Variância (ANOVA). Valores de  $p \leq 0.05$  foram considerados como  
24 significativos. A média e o desvio padrão foram determinados a partir de três  
25 ensaios realizados de forma independente.

26

27

## 1 8.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* FRENTE AO *LEISHMANIA* 2 *AMAZONENSIS*, CITOTOXICIDADE, PERFIL HEMOLÍTICO E ANÁLISE DE 3 FLUIDEZ DE MEMBRANA POR RPE (RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA 4 ELETRÔNICA) DOS ANÁLOGOS LIPÍDEOS FOSFOCOLÍNICOS

5  
6 Os análogos de fosfolipídeos LDT301 (**21**), LDT302 (**22**), LDT303 (**23**),  
7 LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) foram submetidos a ensaios de atividade sobre  
8 *Leishmania amazonensis*, perfil hemolítico, citotoxicidade de macrófagos e  
9 RPE. Inicialmente realizou-se triagem dos compostos por meio do ensaio de  
10 viabilidade celular sobre células promastigotas em ensaios independentes  
11 realizados na UFRJ e Universidade Federal de Goiás. Posteriormente, os  
12 compostos foram também avaliados quanto ao perfil hemolítico e perturbação  
13 da fluidez de membrana por RPE.

14

### 15 **8.4.1 Local do estudo**

16

17 Os ensaios biológicos de viabilidade celular frente a *L. amazonensis*  
18 foram realizados de forma independente no Laboratório de Ultraestrutura  
19 Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na  
20 Universidade Federal do Rio de Janeiro e no laboratório. Os ensaios de  
21 viabilidade celular e antiproliferativo de *L. amazonensis*, perfil hemolítico e  
22 capacidade perturbadora da membrana por meio de EPR foram realizados no  
23 laboratório de Biofísica do Instituto de Física da Universidade Federal de  
24 Goiás.

25

### 26 **8.4.2 Cepas do parasito e células utilizadas**

27

28 Para os ensaios realizados no laboratório de Ultraestrutura Celular  
29 Hertha Meyer da UFRJ foram utilizadas cepas MHOM/BR/75/Josefa de *L.*  
30 *amazonensis* provinda da coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz  
31 (code IOCL 0071-FIOCRUZ). As células foram mantidas por meio de

1 inoculação na base da cauda de camundongo BALB/c. Para os ensaios  
2 realizados no laboratório de biofísica da UFG foram utilizadas as cepas de  
3 referência da OMS, *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) e cepas *L.*  
4 *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) expressando a proteína verde fluorescente  
5 (“*green fluorescent protein*”- GFP). Os isolados encontram-se estocados,  
6 congelados em nitrogênio líquido na forma promastigota procíclica, no  
7 Leishbank (Banco de leishmanias do Laboratório de Imunobiologia das  
8 Leishmanioses, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública,  
9 Universidade Federal de Goiás (UFG)). Os parasitos na forma promastigota  
10 foram mantidos a 26 °C em meio de cultura Grace (Sigma-Aldrich),  
11 suplementado com 20 % de SFB inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL  
12 de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). No 6º dia de  
13 cultivo, com maior número de promastigotas metacíclicos infectantes, os  
14 parasitos foram concentrados e a concentração de células foi estimada por  
15 meio de contagens em câmara de Neubauer para utilização nos  
16 experimentos. Linhagens de macrófagos de murinos J774.A1 foram obtidas  
17 do banco de células do Rio de Janeiro (NCE/UFRJ). Os macrófagos foram  
18 cultivados em meio RPMI-1640 suplementado com SFB 10 %, 2 mM de L-  
19 glutamina, 11 mM de bicarbonato de sódio, 10 U/mL de penicilina e 10 µg/mL  
20 estreptomicina a 36,5 °C com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

21

#### 22 **8.4.3 Ensaio de citotoxicidade sobre promastigotas de *Leishmania*** 23 ***amazonensis* utilizando método MTS/PMS**

24

25 O teste foi realizado no laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha  
26 Meyer da UFRJ para avaliação da citotoxicidade dos análogos fosfolípidos em  
27 cultura de células promastigotas por meio do ensaio MTS/PMS [81].  
28 Utilizou-se cultura de células com densidade de  $1 \times 10^6$  em meio Warren,  
29 suplementado com 10 % de SFB. Após 24 h de cultivo adicionou-se as  
30 concentrações de 5,0 µM e 20,0 µM dos análogos ao meio de cultura. A

1 viabilidade celular foi avaliada após 48 h do tratamento, quando todos os  
2 grupos, incluindo os não tratados, foram transferidos para placa de 96 poços,  
3 conforme descrito no item **8.3.2**. Como controle negativo os parasitos foram  
4 fixados com 0,4 % de formaldeído por 10 min a temperature ambiente, antes  
5 da incubação. A quantificação da reação do ensaio de MTS/PMS foi  
6 mensurada a 490 nm, em leitor de microplaca SpectraMax M2/M2  
7 espectrofluorometer (Molecular Devices, United States). Esse ensaio é  
8 utilizado no laboratório para triagem e classificação dos análogos e seleção  
9 dos melhores candidatos para as próximas etapas (avaliação da citotoxicidade  
10 em amastigotas, macrófagos e alteração morfológica), devendo para isso  
11 apresentar inibição da viabilidade celular maior que 50% nas  
12 concentrações testadas.

13

#### 14 **8.4.4 Ensaio de atividade antiproliferativa in vitro de promastigotas de *L.*** 15 ***amazonensis***

16

17 O ensaio de atividade antiproliferativa foi realizado no laboratório de  
18 biofísica da UFG utilizando o ensaio com MTT ((brometo de 3-(4,5-  
19 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol)) conforme procedimento descrito por  
20 Moreira e colaboradores (2014) [26]. As promastigotas foram incubadas em  
21 placa de cultura de 96 poços, utilizando 100 µL de parasitos por amostra, na  
22 concentração  $1 \times 10^7$  parasitos/mL, suplementada com 20 % de SFB, por 24  
23 h a 26 °C, na presença ou ausência dos análogos lipídeos fosfocolínicos e da  
24 miltefosina (controle positivo). As amostras e a miltefosina foram previamente  
25 diluídas em etanol, na concentração estoque de 5 mg/mL e transferidas para  
26 as placas em 6 concentrações diferentes. Após incubação foi adicionado à  
27 placa solução de MTT e as células foram incubadas por 4 h. Após esse  
28 tempo, para solubilizar os cristais de formazan formados pela redução do  
29 MTT, foi adicionado SDS (duodecil sulfato de sódio) a 10 % na placa e a leitura  
30 da absorbância foi realizada a 550 nm em um espectrofotômetro de placas

1 (Bio Tek – Power Wave XS). A percentagem de células viáveis foi calculada  
2 em relação ao controle e a concentração que inibe o crescimento dos  
3 parasitos em 50 % (IC<sub>50</sub>) foi determinada ajustando as respostas das  
4 diferentes concentrações das moléculas teste com uma curva sigmoide. Com  
5 o objetivo de avaliar a relação de concentração célula dependente (aumento  
6 do número de parasitos x atividade antiproliferativa), o ensaio foi repetido nas  
7 concentrações de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  parasitos/mL.

8

#### 9 **8.4.5 Ensaio *in vitro* da citotoxicidade em macrófagos**

10

11 Macrófagos J774.A1 na densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL, foram  
12 tratados com diferentes concentrações da miltefosina (**8**) e LDT304 (**24**) e  
13 LDT305 (**25**), compostos que apresentaram maior atividade antiproliferativa.  
14 Os compostos foram inicialmente dissolvidos/diluídos na mistura de  
15 etanol/DMSO (1:1, v/v) a 25 mg/mL e então diluídos no meio de cultura  
16 suplementado com SFB 10 %. As culturas de macrófagos (100 µL) contendo  
17 6 diferentes concentrações dos compostos foram preparadas em placas de  
18 96 poços e incubadas por 24 h a 36,5 °C. A viabilidade celular foi quantificada  
19 pela redução do MTT a formazan, conforme descrito no item **8.3.4**, alterando  
20 a temperatura de incubação para 36,5 °C. A absorbância foi mensurada a 550  
21 nm conforme descrito anteriormente e a concentração citotóxica em 50 %  
22 (CC<sub>50</sub>) foi determinada ajustando as respostas das diferentes concentrações  
23 dos compostos teste com uma curva sigmoide.

24

25

26

27

#### 1 **8.4.6 Citotoxicidade da miltefosina e dos analogos frente a amastigotas** 2 **intracelulares**

3  
4 O teste foi realizado no laboratório de biofísica da UFG. Utilizando  
5 linhagens de macrófagos de murinos J774.A1 infectadas com cepas de  
6 promastigostas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) expressando a proteína  
7 verde fluorescente (GFP). As promastigotas foram cultivadas em meio grace,  
8 conforme descrito anteriormente. Os parasitos foram selecionados usando 30  
9  $\mu\text{g/mL}$  de higromicina B [82]. As linhagens de macrófago de murino J774.A1  
10 foram cultivadas conform descrito no item **8.3.2**. Os macrófagos foram  
11 plaqueados na densidade de  $4 \times 10^6$  células/mL (cel/mL) e posteriormente  
12 infectados com GFP-*L. amazonensis* (proporção de 5 parasitos para um  
13 macrófago), tendo como padrão o 6º dia de crescimento. Depois desse tempo,  
14 as células foram lavadas com PBS (1 x) para remover os parasitos não  
15 internalizados e as amostras foram novamente incubadas por 24 h, na  
16 presença de diferentes concentrações de miltefosina ou dos análogos lipídeos  
17 fosfocolínicos, conforme condições do meio de cultura descritas  
18 anteriormente. Após esse tempo as amostras foram resfriadas a  
19 aproximadamente  $4^\circ\text{C}$ . As células aderidas foram removidas mecanicamente,  
20 lavadas duas vezes com PBS, incubadas com paraformaldeído 1% e  
21 posteriormente analisadas por citometria de fluxo no citômetro de fluxo BD  
22 Accuri™ C6 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Os macrófagos foram  
23 selecionados por dispersão frontal versus lateral (FSC vs SSC). Os dados  
24 foram analisados usando o software FCS express (De Novo Software™,  
25 Glendale, CA, USA). A porcentagem de células expressando GFP+ (% de  
26 células infectadas) e a intensidade media de fluorescência (estimateda pela  
27 quantidade de parasitos internalizados) foi avaliada.

28

#### 1 **8.4.7 Análise de fluidez da membrana de promastigotas de *Leishmania*** 2 ***amazonensis* por RPE (Ressonância Paramagnética Eletrônica)**

3  
4 A avaliação da fluidez de membrana por RPE foi realizada no  
5 laboratório de biofísica da UFG. As promastigotas foram inicialmente tratadas,  
6 isoladamente, com os compostos alvo, miltefosina (controle positivo) e etanol  
7 (controle negativo). Para isso, as células foram inicialmente suspensas em  
8 1,60 mL de meio Grace na concentração de  $6,25 \times 10^7$  parasitos/mL, seguida  
9 da adição de 9,6  $\mu$ L da solução estoque dos derivados alvo ou a miltefosina  
10 em etanol, na razão de 25 mg/mL e em nova avaliação 50 mg/mL. Após 1 h  
11 de incubação à temperatura de 26 °C, o meio foi centrifugado a 18.600xg por  
12 20 min, descartando-se o sobrenadante no volume de 1,55 mL. O precipitado  
13 foi homogeneizada em um volume de 50  $\mu$ L, fornecendo a suspensão para  
14 incorporação do marcador de spin.

15 O marcador de spin 5-DSA foi incorporado na membrana de  
16 promastigotas de *Leishmania amazonensis* conforme descrito por Moreira e  
17 colaboradores (2014) [39]. Inicialmente foi transferida uma alíquota de 1,0  $\mu$ L  
18 de uma solução estoque de 5-DSA em etanol (5 mg/mL) para um tubo de  
19 ensaio, com posterior evaporação do solvente, formando um fino filme do  
20 marcador na parede do tubo. Ao tubo foi adicionado 50,0  $\mu$ L da suspensão de  
21 parasitos, contendo  $1,0 \times 10^8$  células em meio Grace (Sigma), previamente  
22 submetidas ao tratamento com cada um dos compostos alvo, com a  
23 miltefosina ou controle negativo (etanol), separadamente, em diferentes  
24 concentrações ( $1 \times 10^9$  moléculas/célula,  $3 \times 10^9$  moléculas/célula e  $5 \times 10^9$   
25 moléculas/célula – ajuste realizado dependendo do composto e do resultado  
26 observado na concentração anterior no RPE). Após a adição das  
27 promastigotas foi realizada agitação suave no tubo para facilitar a  
28 incorporação do marcador. Para as medidas de RPE, as amostras foram  
29 transferidas para tubos capilares com 1 mm de diâmetro interno e os capilares  
30 foram selados usando chama.

1 Os espectros de RPE foram realizados em espectrômetro Bruker ESP  
 2 300 (Rheinstetten, Alemanha) equipado com uma cavidade ER4102ST. Os  
 3 espectros foram adquiridos nas seguintes configurações experimentais:  
 4 potência de micro-ondas, 2 mW; frequência de modulação, 100 kHz;  
 5 amplitude de modulação, 1,0 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo  
 6 de varredura, 168 s; e temperatura da amostra, 26 ° C. Os espectros de RPE  
 7 foram simulados usando o software de mínimos quadrados não linear  
 8 (*nonlinear least-squares* – NLLS) desenvolvido por Freed JH e colaboradores  
 9 [83; 84]. Um dos principais parâmetros do NLLS após o processo de *best-fit* é  
 10 o Rbar, a taxa de difusão rotacional Browniana do spin [84; 85]. O Rbar foi  
 11 convertido para o tempo de correlação rotacional  $\tau_c$ , usando a Equação 1:

12 Equação 1: Correlação rotacional  $\tau_c$  - Rbar

$$13 \quad \tau_c = \frac{1}{6Rbar} .$$

14 No estudo o espectro *best-fit* foi usado para gerar o modelo de espectro  
 15 de dois componentes, que considera duas populações de spin labels com  
 16 diferentes estados de mobilidade. Em todas as simulações os principais  
 17 valores dos tensores g e A usados como components 1 e 2 foram os  
 18 seguintes:  $g_{xx} (1) = g_{xx} (2) = 2,0078$ ,  $g_{yy} (1) = g_{yy} (2) = 2,0058$ ,  $g_{zz} (1) = g_{zz} (2)$   
 19  $= 2,0028$ ,  $A_{xx} (1) = 6,6$  G,  $A_{yy} (1) = 7,0$  G,  $A_{zz} (1) = 31,5$  G,  $A_{xx} (2) = 5,5$  G,  $A_{yy}$   
 20  $(2) = 5,5$  G and  $A_{zz} (2) = 31,0$  G. O NLSL permite o ajuste de mínimos  
 21 quadrados para o programa de espectro de dois componentes experimentais,  
 22 produzindo os parâmetros  $\tau_{c1}$  e  $\tau_{c2}$  dos menores (1) e maiores (2)  
 23 components, assim como a relative fração  $f_1$  e  $f_2$  no espectro. Esses  
 24 parâmetros permitiram calcular o valor médio do parâmetro de movimento  
 25 usando a Equação 2 [86].

26

27 Equação 2: Componentes experimentais

$$28 \quad \tau_c = f_1 \tau_{c1} + f_2 \tau_{c2} .$$

29

1 De maneira similar, foi avaliado o efeitos dos compostos e da  
2 miltefosina sobre a membrane de eritrócitos por meio do espectro de RPE e  
3 com o spin label 5-DSA para os compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**). A  
4 incorporação dos compostos e o método foi realizado conforme descrito  
5 anteriormente, utilizando em substituição às promastigotas de leishmania a  
6 suspensão contendo  $1 \times 10^8$  eritrócitos. Os eritrócitos foram tratados com a  
7 miltefosina e os compostos alvo nas concentrações de  $1 \times 10^9$   
8 moléculas/célula,  $3 \times 10^9$  moléculas/célula e  $4 \times 10^9$  moléculas/célula  
9 (dependendo do composto e do resultado observado na concentração anterior  
10 no RPE).

11

#### 12 **8.4.8 Ensaio de hemólise**

13

14 O ensaio de potencial hemolítico foi realizado no laboratório de biofísica  
15 da UFG. O sangue foi coletado em tubos EDTA a vácuo. O volume de sangue  
16 foi diluído em PBS (5 mM de fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,4) e centrifugado a  
17  $800 \times g$  por 10 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e o sobrenadante removido por aspiração. Repetiu-  
18 se o mesmo procedimento mais três vezes, removendo o plasma e os  
19 leucócitos. Os análogos lipídeos fosfolínicos e a miltefosina foram  
20 inicialmente dissolvidos em etanol:DMSO (1:1 v/v) a  $25 \text{ } \mu\text{g/mL}$  e  
21 posteriormente diluídos em PBS em diferentes concentrações finais. Ao meio  
22 foi adicionado a suspensão de eritrócitos (hematócrito final de 2 %). As  
23 amostras foram incubadas por 2 h a  $36,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  e, após centrifugação, as  
24 percentagens de hemólise foram determinadas com base na absorbância da  
25 hemoglobina no sobrenadante a 540 nm, ajustando curvas sigmóides sobre  
26 os dados de concentração-resposta. A concentração hemolítica em 50%  
27 ( $\text{HC}_{50}$ ) foi determinada pela percentual de hemólises versus a concentração  
28 de cada composto analisado em uma curva sigmoide.

29 Diante do perfil observado, nova avaliação do perfil hemolítico foi  
30 realizada para os compostos LDT304 (**24**) e LDT305 (**25**) foi repetido

1 conforme procedimento acima, utilizando concentrações maiores, e em  
2 sangue total. Para avaliação em sangue total o plasma foi primeiro separado  
3 do sangue por centrifugação a 1800 x g por 10 min a 4 °C. Depois, 58 µL da  
4 amostra do plasma contendo diferentes concentrações dos compostos foi  
5 preparada e 42 µL de células sanguíneas (100 %) foi adicionado a cada  
6 amostra para reconstituir o sangue total. As amostras foram incubadas por 24  
7 h, com agitação periódica durante o período. Após incubação, 1,4 mL de PBS  
8 foi adicionado a cada amostra e os ependorffs foram centrifugados (3500 x g  
9 for 10 min). O percentual de hemólise foi determinado pela absorbancia da  
10 hemoglobina livre no sobrenadante a 540 nm, conforme descrito acima,  
11 permitindo a determinação do HC<sub>50</sub>.

12

#### 13 **8.4.9 Análise estatística**

14

15 Os dados foram expressos em medias e o desvio padrão ( $\pm$  DP) de três  
16 experimentos independentes. Comparação entre os diferentes grupos foi  
17 realizada usando análise de variancia (ANOVA) e teste Turkey's,  
18 considerando a diferença significativa entre os tratamentos de  $P < 0,05$ .

19

20

21

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

---

---

# CAPÍTULO 9

---

---



## ***Referências Bibliográficas***



## 1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2

3

- 4 [1] who.int/neglected\_diseases/diseases/en/ [Internet]. Neglected Tropical  
5 Diseases; [Acessado 2019 jan 06]. Disponível em  
6 [https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)
- 7 [2] Cheuka PM, Mayoka, G, Mutai, P, Chibale, K. The Role of Natural  
8 Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical  
9 Diseases. *Molecules*. 2017 Dec 27; 1:41
- 10 [3] Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis  
11 and leishmaniasis. WHO Technical Report Series, No. 975. 2012; 1:100
- 12 [4] Souza, W. Godinho, J. Barrias, E. Roussaki, M. Rodrigues, JCFF,  
13 Calogeropoulou, T. Effects of Phospholipid Analogues on  
14 Trypanosomatids. *Medical Microbiology*. 2018 Jan; 221:242
- 15 [5] who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-  
16 trypanosomiasis) [Internet], Chagas disease (also known as American  
17 trypanosomiasis); [Acessado 2019 jan 06]. Disponível em  
18 [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))  
19 [american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- 20 [6] Pérez-Molina, JA, Molina, I. Chagas disease. *Seminars*. 2018 Jan 06; 82:94
- 21 [7] Leite, TOC. Developments on treatment of Chagas disease – from  
22 discovery to current times. *European Review for Medical and*  
23 *Pharmacological Sciences*. 2019; 2576:2586
- 24 [8] Center for Disease Control and Prevention (CDC) [Internet], American  
25 Trypanosomiasis; [Acessado 2019 jan 26]. Disponível em  
26 <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.htm>
- 27 [9] Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol. Serv.*  
28 *Saúde*. 2016. 7:86.
- 29 [10] Mansoldo, FRP, Carta, F, Angeli, A, Cardoso, VS, Supuran, CT,  
30 Vermelho, AB. Chagas Disease: Perspectives on the Past and Present and  
31 Challenges in Drug Discovery. *Molecules*. 2020 Nov 23; 2:15
- 32 [11] Kratz, JM. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. *Acta*  
33 *Tropica*. 2019 Jul 24; 1:5
- 34 [12] World Health Organization (WHO). Investing to Overcome the Global  
35 Impact of Neglected Tropical Diseases, Third WHO Report on Neglected  
36 Tropical Diseases, Geneva, Switzerland, 2015
- 37 [13] Paho.org [internet]. Información general: Leishmaniasis; [Acessado  
38 2018 Set 18]. Disponível em  
39 [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9417:](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417:2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40250&lang=en)  
40 [2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40250&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417:2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40250&lang=en)
- 41 [14] www.who.int.[internet]. Brazil. [Acessado 2018 Set 18]. Disponível em  
42 <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/BRAZIL.pdf>
- 43 [15] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.  
44 Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços.  
45 Guia de Vigilância em Saúde : volume 2 / Ministério da Saúde, Secretaria

- 1 de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da  
2 Epidemiologia em Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília : Ministério da Saúde,  
3 2017
- 4 [16] Paho.org [internet]. Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis; [Acessado  
5 2018 Set 24]. Disponível em  
6 [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=en)  
7 [=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=en)
- 8 [17] Paho.org [internet]. Visceral Leishmaniasis; [Acessado 2018 Set 24].  
9 Disponível em  
10 [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=en)  
11 [=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=en)
- 12 [18] Center for Disease Control and Prevention (CDC) [internet].  
13 Leishmaniasis; [Acessado 2018 Set 25]. Disponível em  
14 <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
- 15 [19] David, P. Leishmaniasis. *Journal of Infection*. 2014; 69, 10:18.
- 16 [20] Scott, P, Novais, FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in  
17 protection and pathogenesis. *Nature Reviews, Immunology*. 2016; 581:592
- 18 [21] Gollob, KJ, Viana, AG, Dutra, WO. Immunoregulation in Human  
19 American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. *Parasite*  
20 *Immunol*. 2014; 367:376.
- 21 [22] Paho.org [internet]. Información general: Leishmaniasis. ; [Acessado  
22 2018 Set 18]. Disponível em  
23 [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9417:](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417:2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40250&lang=en)  
24 [2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40250&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417:2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40250&lang=en)
- 25 [23] Nagle, AS, Khare, S, Kumar, AB, Supek, F, Buchynskyy, A, Mathison,  
26 CJN, Chennamaneni, NK, Pendem, N, Buckner, FS, Gelb, MH, Molteni, V.  
27 Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human  
28 African Trypanosomiasis. *Chem. Rev*. 2014; 114, 11305:11347
- 29 [24] Menezes, JPB, Guedes, CES, Pertersen, ALOA, Fraga, DBMF, Veras,  
30 PST. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis.  
31 *BioMed Research International*. 2015; 1:11
- 32 [25] Ponte, CB, Alves, EAR, Sampaio, NR, Urdapilleta, AAA, Kückelhaus,  
33 CS, Muniz-Junqueira, MI, Kückelhaus, SAS. Miltefosine enhances  
34 phagocytosis by decreases nitric oxide production by peritoneal  
35 macrophages of C57BL/6 mice. *International Immunopharmacology*. 2012;  
36 13, 114:119
- 37 [26] Moreira, RA, Mendanha, AS, Fernandes, KS, Matos, GG, Alonso, L,  
38 Dorta, ML, Alonso, A. Miltefosine Increases Lipid and Protein Dynamics in  
39 *Leishmania amazonensis* Membranes at Concentrations Similar to Those  
40 Needed for Cytotoxicity Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.  
41 2014; 58, 3021:3028
- 42 [27] Calogeropoulou, T, Angelou, P, Detsi, A, Fragiadaki, I, Scoulica, E.  
43 Design and Synthesis of Potent Antileishmanial Cycloalkylidene-  
44 Substituted Ether Phospholipid Derivatives. *J. Med. Chem*. 2008; 51,  
45 897:908

- 1 [28] Dorlo, TPC, Balasegaram, M, Beijnen, JH, Vries, PJ. Miltefosine: a  
2 review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of  
3 leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67, 2576:2597
- 4 [29] Pignatello, R, Musumeci, T, Basile, L, Carbone, C, Puglisi, G.  
5 Biomembrane models and drug-biomembrane interaction studies:  
6 Involvement in drug design and development. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;  
7 3(1), 4:14.
- 8 [30] Escribá, PV, González-Rosb, JM, Goñi, FM, Kinnunen, PKJ, Vigh, L,  
9 Sánchez-Magraner, L, Fernández, AM, Busquets, X, Horváth, I, Barceló-  
10 Coblijn, G. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapie. *J.*  
11 *Cell. Mol. Med.* 2008; 12(3), 829:875.
- 12 [31] Zhang, K, Beverley, SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in  
13 *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 2010; 170(2), 1:22.
- 14 [32] Zhang K, Bangs, JD, Beverley, SM. Sphingolipids in parasitic protozoa.  
15 *Adv Exp Med Biol.* 2010; 688, 238:248.
- 16 [33] Gomide, AB, Thomé, CH, Santos, GA, Ferreira, GA, Faça, VM, Rego,  
17 EM, Greene, LJ, Stabeli, RG, Ciancaglini, P. Itri, R. Disrupting membrane  
18 raft domains by alkylphospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013;  
19 1828, 1384:1389.
- 20 [34] Booth, L-A; Smith, TK. Lipid metabolism in *Trypanosoma cruzi*: A  
21 review. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 2020 Set 02. 1:19.
- 22 [35] Ramakrishnan S, Serricchio M, Striepen B, Bütikofer P. Lipid synthesis  
23 in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and  
24 apicomplexans. *Prog Lipid Res.* 2013; 488:512
- 25 [36] Oliveira MM, Timm SL, Costa SC. Lipid composition of *Trypanosoma*  
26 *cruzi*. *Comp Biochem Physiol B.* 1977. 58:195.
- 27 [37] Suzuki, E, Tanaka, AK, Toledo, MS, Levery, SB, Straus, AH, Takahashi,  
28 HK. Trypanosomatid and fungal glycolipids and sphingolipids as infetivity  
29 factors and potential targets for development of new therapeutic strategies.  
30 *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008; 1780, 362:269.
- 31 [38] Menna-Barreto, RFS, Salomão, K. Dantas, AP, Santa-Rita, RM,  
32 Soares, MJ, Barbosa, HS, Castro, SL. Different cell death pathways  
33 induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. / *Micron.*  
34 2009; 157:168
- 35 [39] Moreira, RA, Mendanha, AS, Fernandes, KS, Matos, GG, Alonso, L,  
36 Dorta, ML, Alonso, A. Miltefosine Increases Lipid and Protein Dynamics in  
37 *Leishmania amazonensis* Membranes at Concentrations Similar to Those  
38 Needed for Cytotoxicity Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*  
39 2014; 58, 3021:3028
- 40 [40] Ríos-Marco, P, Marco, C, Gálvez, X, Jiménez-López, JM, Carrasco,  
41 MP. Alkylphospholipids: Na update on molecular mechanisms and clinical  
42 relevance. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2017; 1859, 1657:1667.
- 43 [41] [Villa-Pulgarí, JA, Gajate, C, Botet, J, Jimenez, A, Justies, N, Varela,  
44 RE, Cuesta-Marbán, A, Müller, I, Modolell, M, Revuelta, JL, Mollinedo, F.  
45 Mitochondria and lipid raft-located FOF1-ATP synthase as major  
46 therapeutic targets in the antileishmanial and anticancer activities of ether  
47 lipid edelfosine. *PLOS Neglected Tropical Diseases,* 2017; 1:31.

- 1 [42] Varela-M, RE, Villa-Pulgarin, JA, Yepes, E, Müller, I, Modolell, M,  
2 Muñoz, DL, Robledo, SM, Muskus, CE, López-Abán, J, Muro, A, Vélez, ID,  
3 Mollinedo, F. In Vitro and In Vivo Efficacy of Ether Lipid Edelfosine against  
4 *Leishmania* spp and SbV-Resistant Parasites. PLOS Neglected Tropical  
5 Disease. 2012; 6(4), 1:14.
- 6 [43] López-Arencibia, A, Martín-Navarro, C, Sifaoui, I, Reyes-Batlle, M,  
7 Wagner, C, Lorenzo-Morales, J, Maciver, SK, Piñero, JE. Perifosine  
8 Mechanisms of Action in *Leishmania* Species. Antimicrobial Agents and  
9 Chemotherapy, 2017; 61, 1:6.
- 10 [44] Gómez-Caravaca, AM, Verardo, V, Caboni, MF. Chromatographic  
11 techniques for the determination of alkyl-phenols, tocopherols and other  
12 minor polar compounds in raw and roasted cold pressed cashew nut oils. J.  
13 Chromatogr. A, 2010; 1217, 7411:7417.
- 14 [45] Mazzetto, SE, Lomonaco, D, Mele, G. Óleo da castanha de caju:  
15 Oportunidades e Desafios no Contexto do Desenvolvimento e  
16 Sustentabilidade Industrial. Quim. Nova, 2009; 32(3), 732:741.
- 17 [46] Trevisan, MTS, Pfundstein, B, Haubner, R, Würtele, G, Spiegelhalder,  
18 B, Bartsch, H, Owen, RW. Characterization of alkyl phenols in cashew  
19 (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidante  
20 capacity. Food and Chemical Toxicology. 2006; 44, 188:197.
- 21 [47] Morais, SM, Silva, KA, Araujo, H, Vieira, IGP, Alves, DR, Fontenelle,  
22 ROS, Silva, AMS. Anacardic Acid Constituents from Cashew Nut Shell  
23 Liquid: NMR Characterization and the Effect of Unsaturation on Its  
24 Biological Activities. Pharmaceuticals 2017; 10(31), 1:10.
- 25 [48] Mubofu, EB, Mgaya, JE. Chemical Valorization of Cashew Nut Shell  
26 Waste. Top Curr Chem. 2018; 376(8), 1:15.
- 27 [49] Stasiuk M, Bartosiewicz KA. Inhibitory effect of some natural and  
28 semisynthetic phenolic lipids upon acetylcholinesterase activity. Food  
29 Chem. 2008, 108, 996:1001
- 30 [50] Freitas RF, Prokipczyk IM, Zottis A, Oliva G, Andricopulo AD, Trevisan  
31 MT, et al. Discovery of novel Trypanosoma cruzi glyceraldehyde-3-  
32 phosphate dehydrogenase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. 2009, 17,  
33 2476:2482
- 34 [51] Pereira JM, Severino RP, Vieira PC, Fernandes JB, da Silva MF Zottis  
35 A, et al. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-  
36 phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi. Bioorg. Med. Chem.  
37 2008, 16, 8889:8895
- 38 [52] Chandregowda V, Kush A, Reddy GC. Synthesis of benzamide  
39 derivatives of anacardic acid and their cytotoxic activity. Eur. J. Med. Chem.  
40 2009, 44, 2711:2719.
- 41 [53] Cui L, Miao J, Furuya T, Fan Q, Li X, Rathod PK, et al. Histone  
42 acetyltransferase inhibitor anacardic acid causes changes in global gene  
43 expression during in vitro Plasmodium falciparum development. Eukaryot  
44 Cell. 2008, 7, 1200:1210
- 45 [54] Hemshekhar M, Santhosh MS, Kemparaju K, Girish KS. Emerging  
46 Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview.  
47 Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 110, 122:132

- 1 [55] Araújo, EM, Romeiro, LAS, Rodrigues, APC, Alves, OS, Silva, VC,  
2 Logrado, LPL, et al. Novel Ultraviolet Absorbres Derived from Cashew Nut  
3 Shell liquid: Spectrophotometric, in Silico and in Vitro Assay. Drug  
4 Analytical Research, 2020, 40:49.
- 5 [56] Romeiro, LAS, Nunes, JLC, Miranda, CO, Cardoso, GSHR, Oliveira,  
6 AS, G, A. Novel Sustainable-by-Design HDAC Inhibitors for the Treatment  
7 of Alzheimer's Disease. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2019, 671:676
- 8 [57] Cerone, M. Uliassi, E. Prati, F. Ebiloma, GU, Lemgruber, L, Bergamini,  
9 C. et al. Discovery of sustainable drugs for neglected tropical diseases:  
10 cashew nut shell liquid (CNSL)-based hybrids target mitochondrial function  
11 and ATP production in *Trypanosoma brucei*. ChemMedChem. 2019,  
12 621:635
- 13 [58] De Souza, MQ, Teotônio, IMSN, De Almeida, FC, Heyn, GS, Alves,  
14 OS, Romeiro, LAS, et al. Molecular evaluation of anti-inflammatory activity  
15 of phenolic lipid extracted from cashew nut shell liquid (CNSL). BMC  
16 Complementary and Alternative Medicine, 2018, 1:11
- 17 [59] Cardoso, GSHR. Síntese e avaliação de novos compostos  
18 antiproliferativos planejados a partir do ácido anacárdico saturado.  
19 (Dissertação de Mestrado). Brasília, Universidade de Brasília, 2017
- 20 [60] Alves, PS. Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Agentes Anti-  
21 inflamatórios Planejados a partir do Ácido Anacárdico. (Dissertação de  
22 Mestrado). Brasília, Universidade de Brasília, 2015
- 23 [61] Oliveira, AS. Síntese e avaliação do perfil citotóxico de novas chalconas  
24 planejadas a partir do cardanol. (Dissertação de Mestrado) Brasília,  
25 Universidade de Brasília, 2016.
- 26 [62] Queiroz, FJG. Síntese e avaliação de inibidores de histona  
27 acetiltransferases planejados a partir do ácido isoanacárdico (Dissertação  
28 de Mestrado). Brasília, Universidade de Brasília, 2015
- 29 [63] Lemes, LFN. Síntese e avaliação de novos agentes inibidores de  
30 acetilcolinesterase planejados a partir do cardanol candidatos ao  
31 tratamento da doença de Alzheimer. (Dissertação de Mestrado), Brasília,  
32 Universidade de Brasília, 2013.
- 33 [64] Barrias, E, Reignaul, LC, Calogeropouloub, T, Souza, W. In vitro  
34 activities of adamantylidene-substituted alkylphosphocholine TCAN26  
35 against *Trypanosoma cruzi*: Antiproliferative and ultrastructural effects.  
36 Experimental Parasitology. 2019. 1:7
- 37 [65] Tyman, JHP, Johnson, RA, Muir, M. The extraction of natural cashew  
38 nut-shell liquid from the cashew nut (*Anacardium*  
39 *occidentale*). JAOCS, 1989. 553–557
- 40 [66] Santa-Rita, RM, Barbosa, HS, Meirelles, MNLS, Castro, SL. Effect of  
41 the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of  
42 *Trypanosoma cruzi*, Acta Tropica. 2000, 219:228
- 43 [67] Gomide, AB, Thomé, CH, Santos, GA, Ferreira, GA, Faça, VM, Rego,  
44 EM, et al. Disrupting membrane raft domains by alkylphospholipids.  
45 Biochimica et Biophysica Acta. 2013, 1384:1389

- 1 [68] Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G,  
2 Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and  
3 Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016,
- 4 [69] Kohl, L, Robinson, D, Bastin, P. Novel roles for the flagellum in cell  
5 morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *The EMBO Journal.*  
6 2003, 5336:5346
- 7 [70] Menna-Barreto, RFS, Salomão, K, Dantas, AP, Santa-Rita, RM,  
8 Soares, JS, Barbosa, HS. et al. Different cell death pathways induced by  
9 drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. *Micron.* 2009,  
10 157:168
- 11 [71] Santa-Rita, RM, Barbosa, HS, de Castro, SL. Ultrastructural analysis of  
12 edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma*  
13 *cruzi*. *Parasitol Res.* 2006, 187:190
- 14 [72] Riss, TL, Moravec, RA, Niles, AL, Duellman, S, Benink, HA, Worzella,  
15 TJ, Minor, L. *Cell Viability Assays.* Eli Lilly & Company and the National  
16 Center for Advancing Translational Sciences. 2004, 1:25
- 17 [73] Berridge, MV, Herst, PM, Tan, AS. Tetrazolium dyes as tools in cell  
18 biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual*  
19 *Review, Elsevier.* 2005, 127:152
- 20 [74] Fernandes KS, de Souza, PE, Dorta, ML. Alonso, A. The cytotoxic  
21 activity of miltefosine against *Leishmania* and macrophages is associated  
22 with dynamic changes in plasma membrane proteins. *Biochim. Biophys.*  
23 *Acta.* 2017, 1:9
- 24 [75] Jiménez-López, JM, Ríos-Marco, P, Marco, C. Alterations in the  
25 homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor  
26 alkylphospholipids. *Lipids Health Dis.* 2010, 9:33
- 27 [76] Alonso L, Cardoso ÉJS, Gomes RS, Mendanha SA, Dorta ML, Alonso  
28 A. Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared  
29 to those of miltefosine. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019.
- 30 [77] Scariot DB, Britta EA, Moreira AL, Falzirolli H, Silva CC, Ueda-  
31 Nakamura T, Dias-Filho BP, Nakamura CV. Induction of Early  
32 Autophagic Process on *Leishmania amazonensis* by Synergistic Effect  
33 of Miltefosine and Innovative Semi-synthetic Thiosemicarbazone. *Front*  
34 *Microbiol.* 2017.
- 35 [78] Alonso, L, Alonso, A. Hemolytic potencial of miltefosine is dependente  
36 on cell concentration: Implications for in vitro cell cytotoxicity assay and  
37 pharmacokinetic data. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2016, 1160:1164.
- 38 [79] Alonso, L. Cardoso, EJS. Mendanha, SA, Alonso, A. Interactions of  
39 miltefosine with erythrocyte membrane proteins compared to those of  
40 ionic surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2019, 23:30
- 41 [80] Henriques, C, Moreira, TLB, Maia-Brigagão, C, Henriques-Pons, A,  
42 Carvalho, TMU, Souza, W. Tetrazolium salt based methods for high-  
43 throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy. *Anal. Methods.*  
44 2011, 2148:2155
- 45 [81] Godinho JL, Georgikopoulou K, Calogeropoulou T, de Souza W,  
46 Rodrigues JC. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid

- 1 molecule exhibits biological activity in vitro against *Leishmania*  
2 *amazonensis*. Experimental parasitology. 2013, 153:165
- 3 [82] Okuda K, Tong M, Dempsey B, Moore KJ, Gazzinelli RT, Silverman N.  
4 *Leishmania amazonensis* Engages CD36 to Drive Parasitophorous  
5 Vacuole Maturation. PLoS Pathog. 2016
- 6 [83] Schneider, DJ.; Freed, JH. Biological magnetic resonance. In: Berliner, L.J.,  
7 Reuben, J. (Eds.), Spin labeling: Theory and Application. Plenum Press, New  
8 York, 1989. 1:76
- 9 [84] Alonso, A, Vasques da Silva, J, Tabak, M. Hydration effects on the  
10 protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR  
11 spectroscopy, Biochim. Biophys. Acta. 2003. 32:41
- 12 [85] Mendanha, SA, Dos Anjos, JLV, Maione-Silva, L, Silva, HCB, Lima, EM,  
13 Alonso, A. An EPR spin probe study of the interactions between PC  
14 liposomes and stratum corneum membranes, Int. J. Pharm. 2018,  
15 93:100
- 16 [86] Alonso, L, Mendanha, SA, Marquezin, CA, Berardi, M, Ito, AS, Acuña,  
17 AU, Alonso, A. Interaction of miltefosine with intercellular membranes  
18 of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles, Int. J. Pharm. 2012,  
19 391:398
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

---

---

# CAPÍTULO 10

---

---

---

---

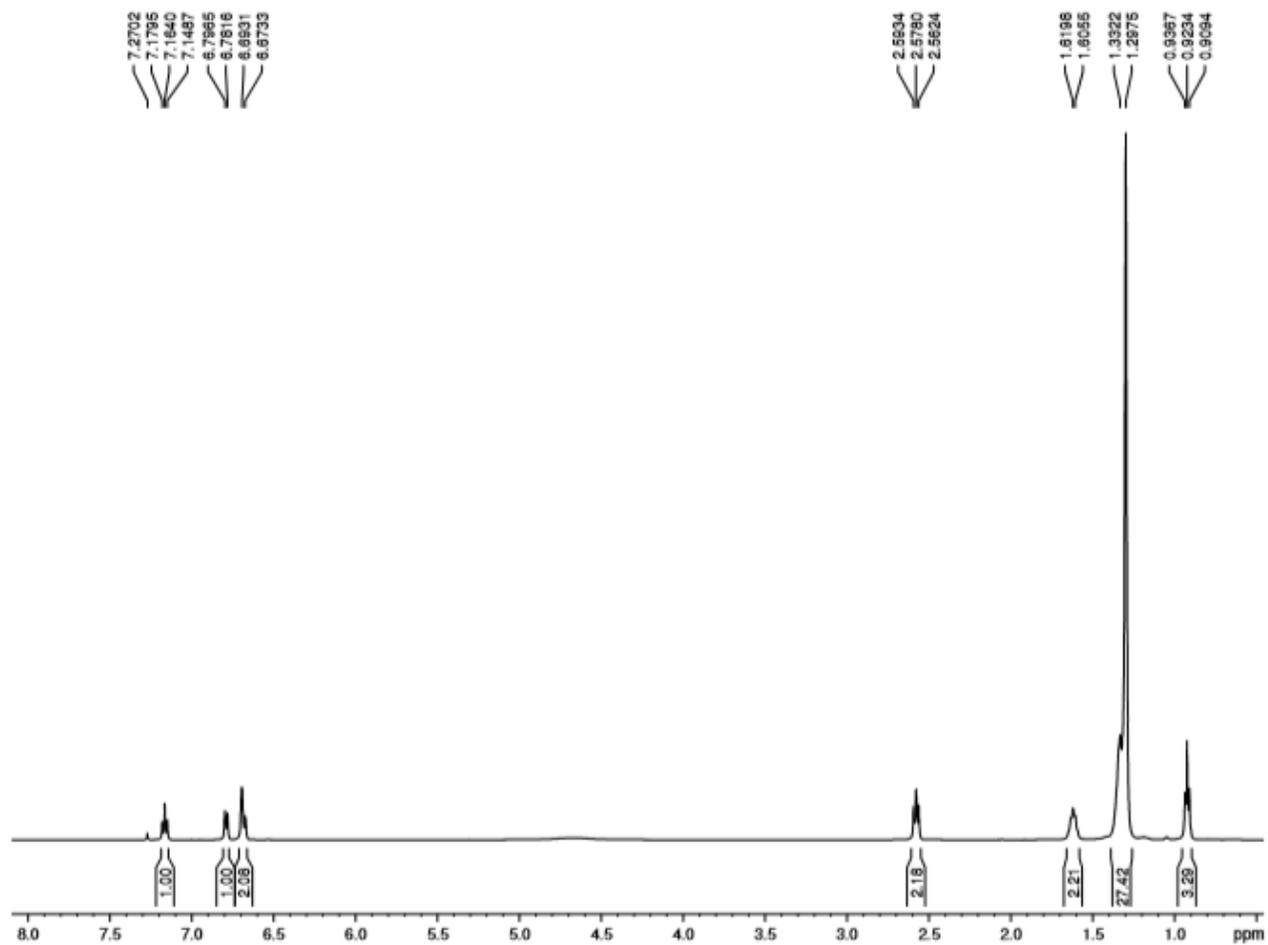
***ANEXO***

---

---

1 ANEXO 1 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT10 (26)

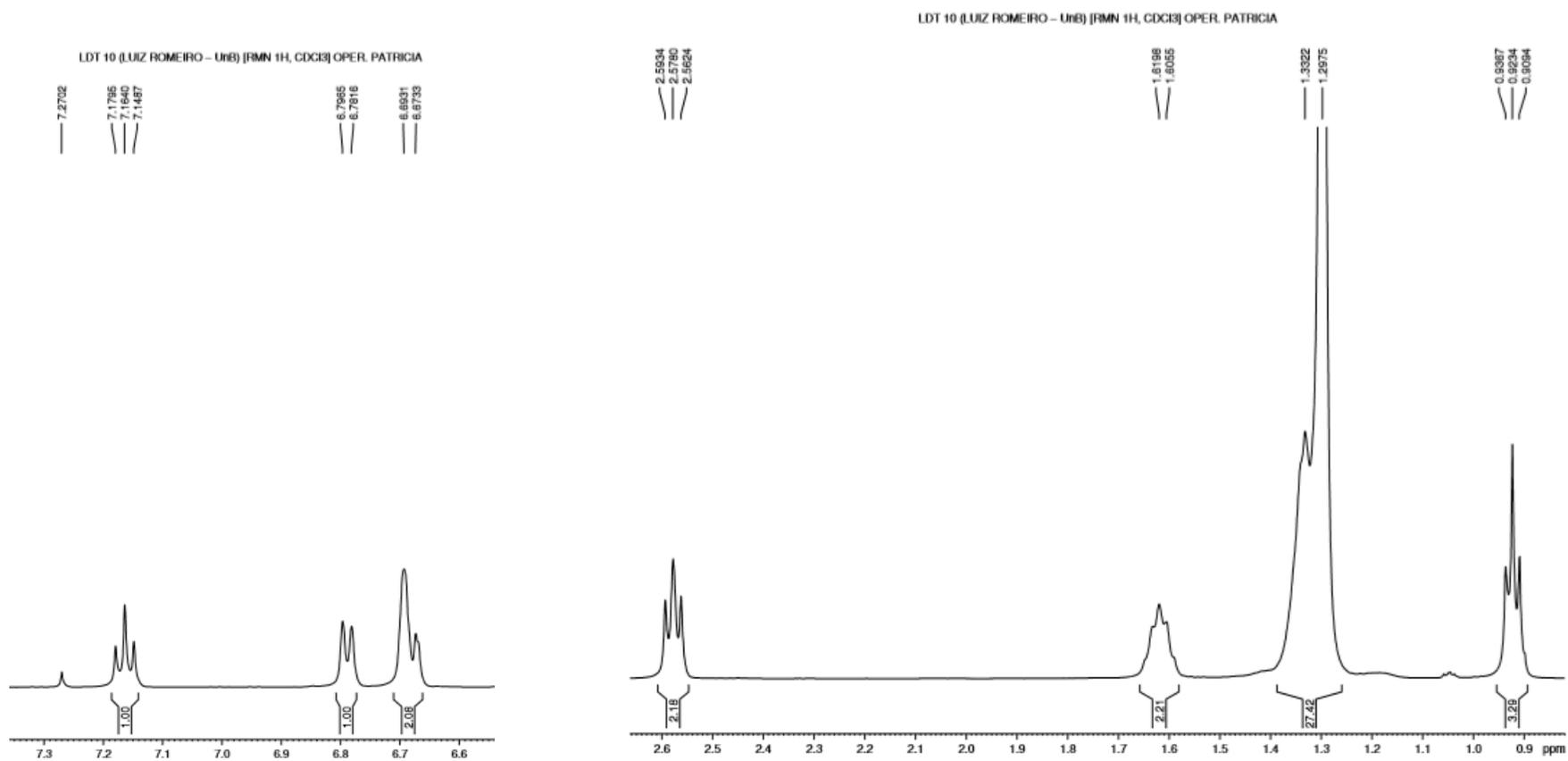
LDT 10 (LUIZ ROMEIRO – UnB) [RMN 1H, CDCl3] OPER. PATRICIA

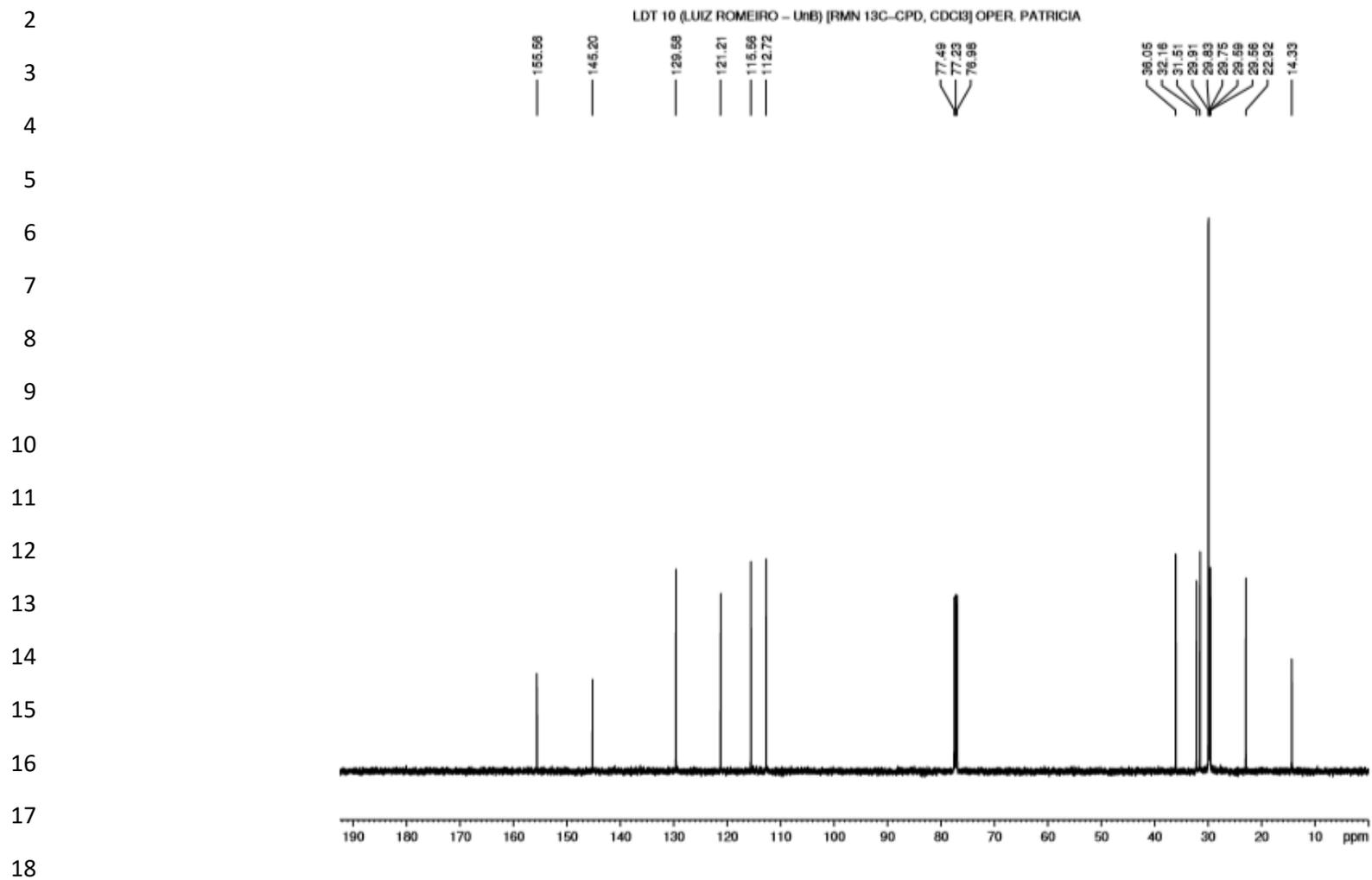
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

1 ANEXO 2 – Expansão espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – LDT10 (26)

2

3



1 ANEXO 3 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT10 (26)

## 1 ANEXO 4 – Espectro de Massas – LDT10 (26)

2

3 LDT-10-NEG\_161219145542 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 6.19E3

4 T: ITMS - c ESI Full ms [170.00-1200.00]

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

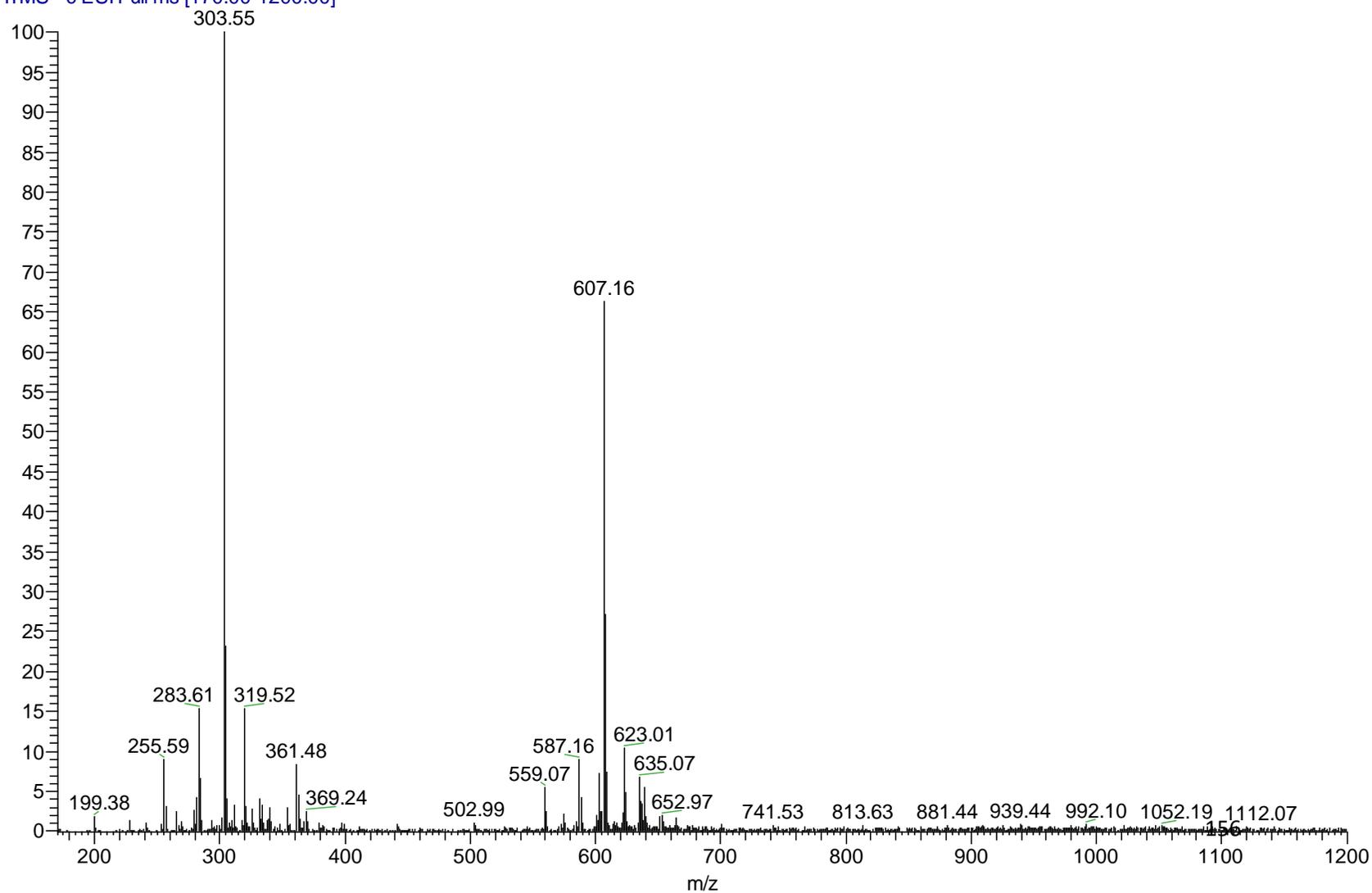
15

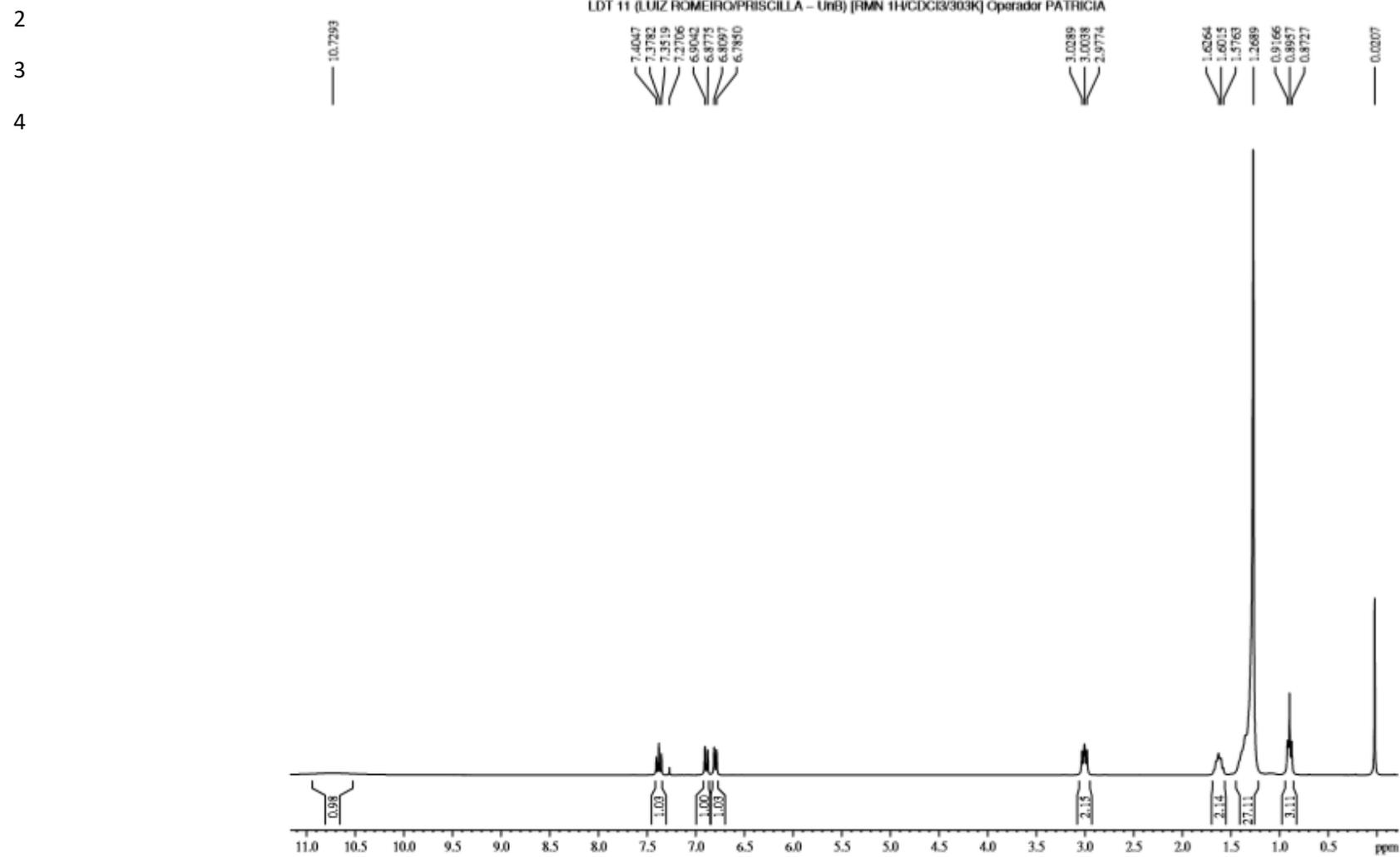
16

17

18

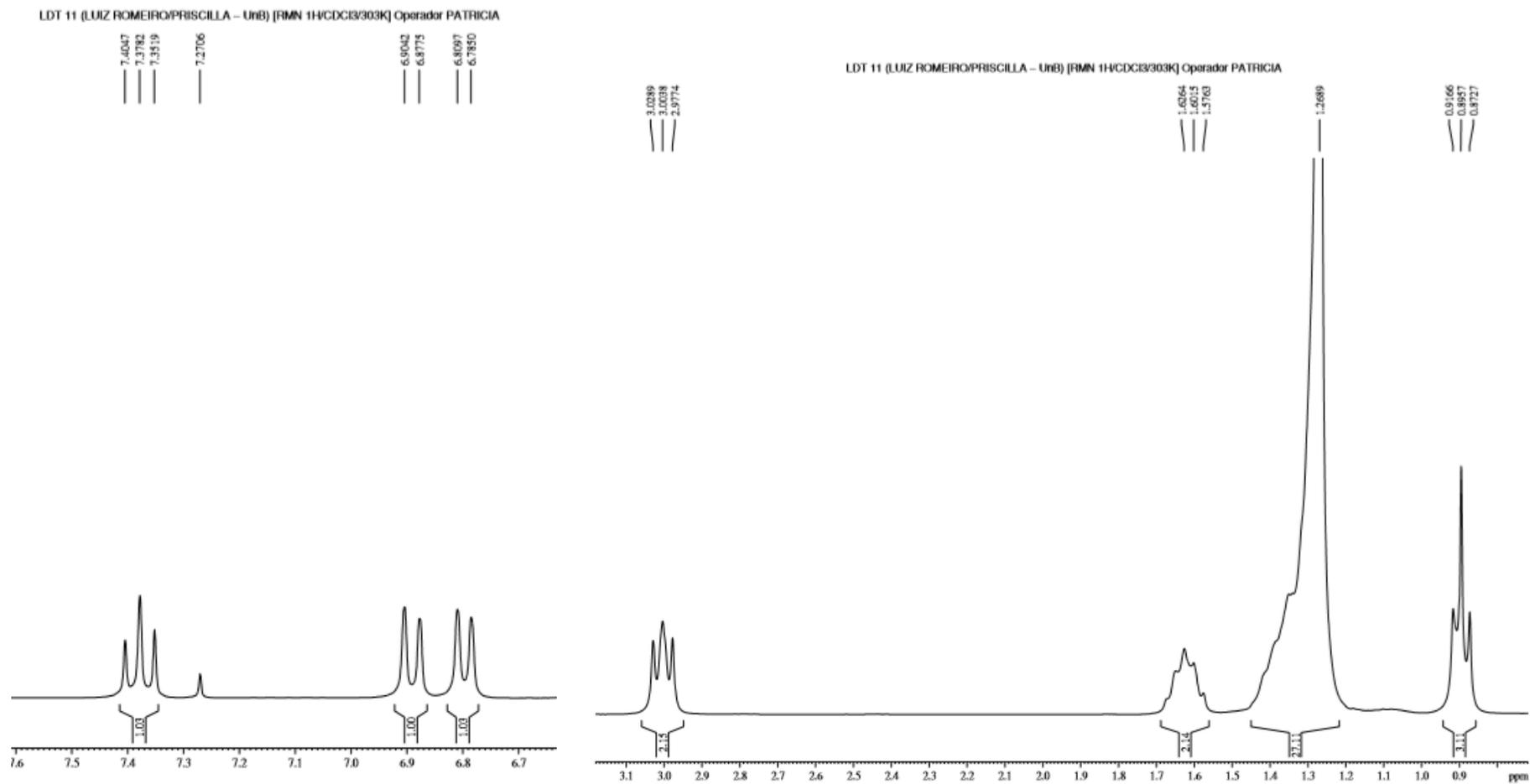
19



1 ANEXO 5 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT11 (27)

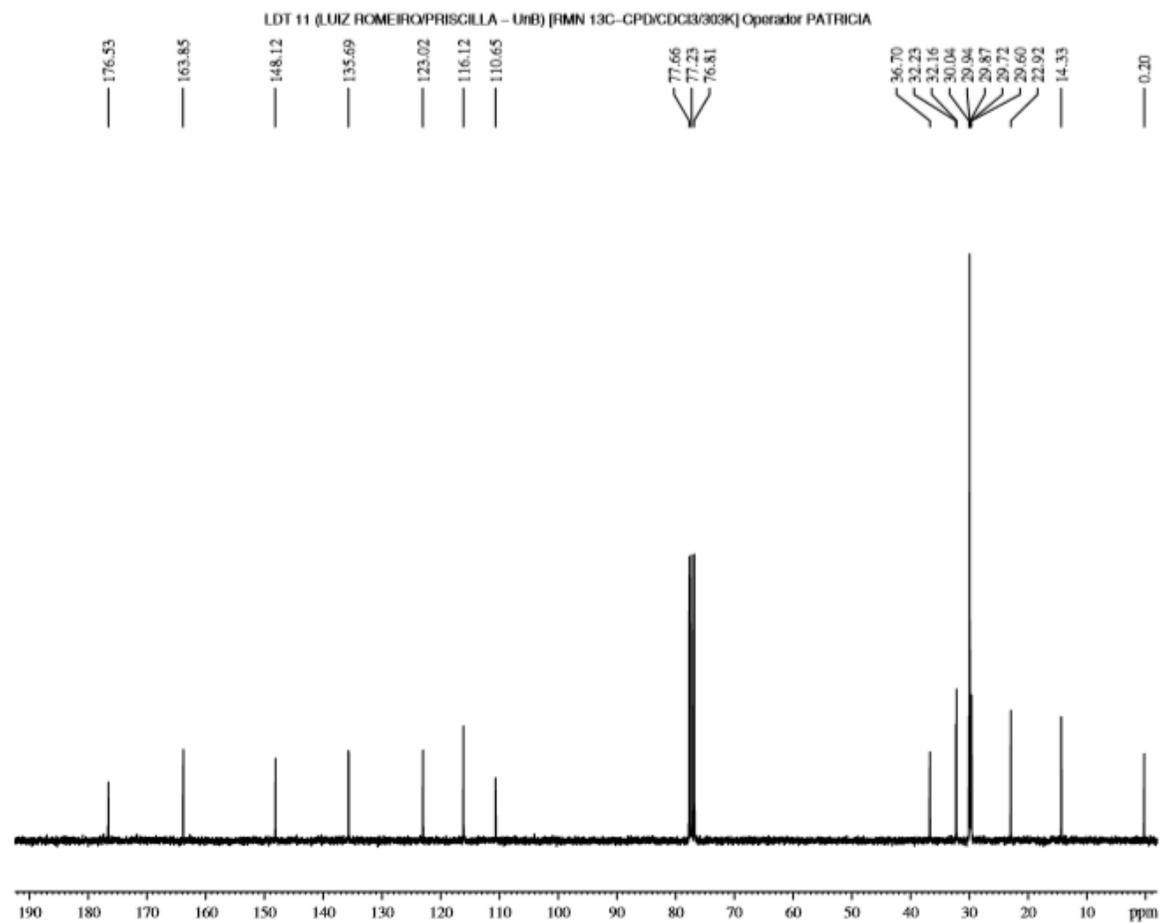
1 ANEXO 6 – Espectro expandido de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT11 (27)

2

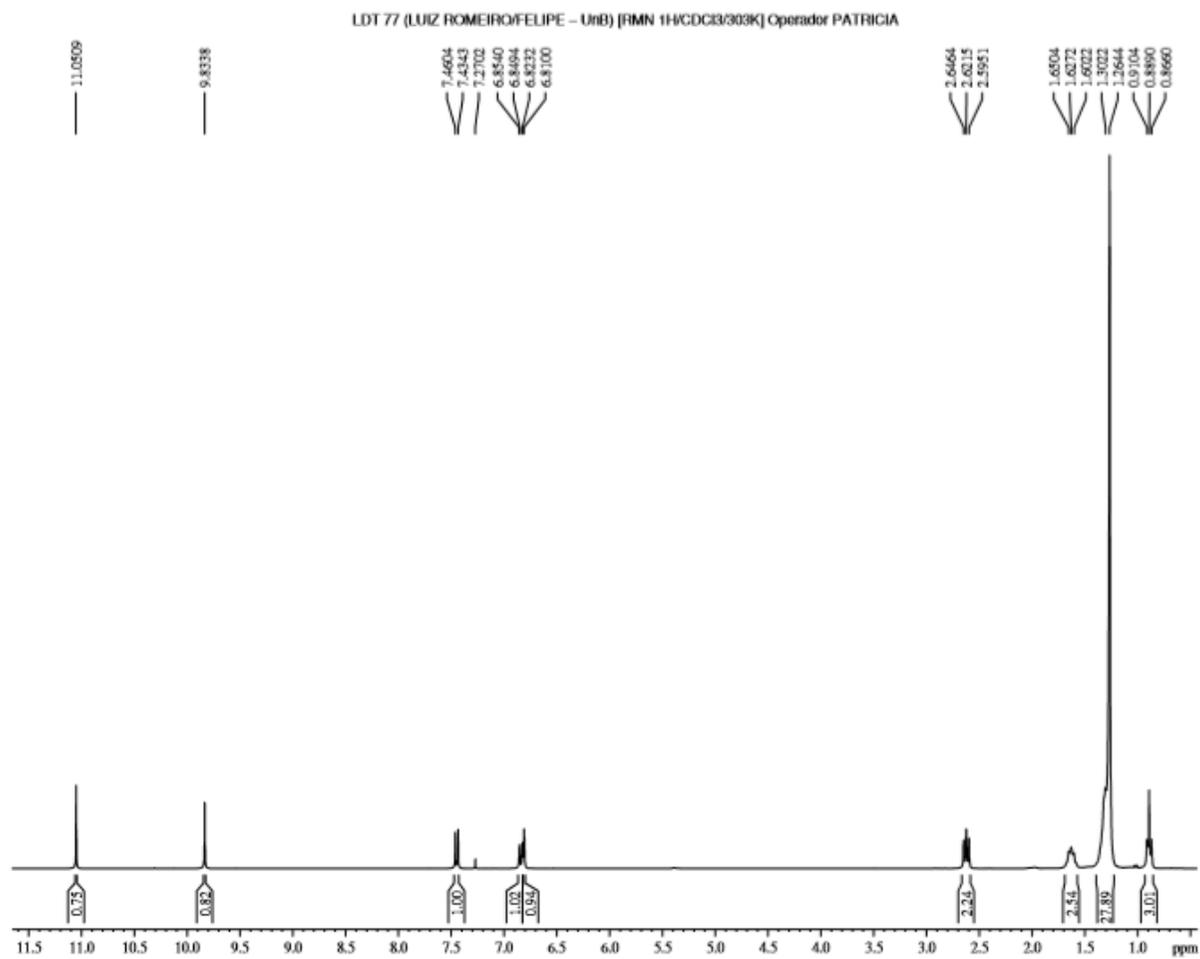


1 ANEXO 7 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT11 (27)

2



3

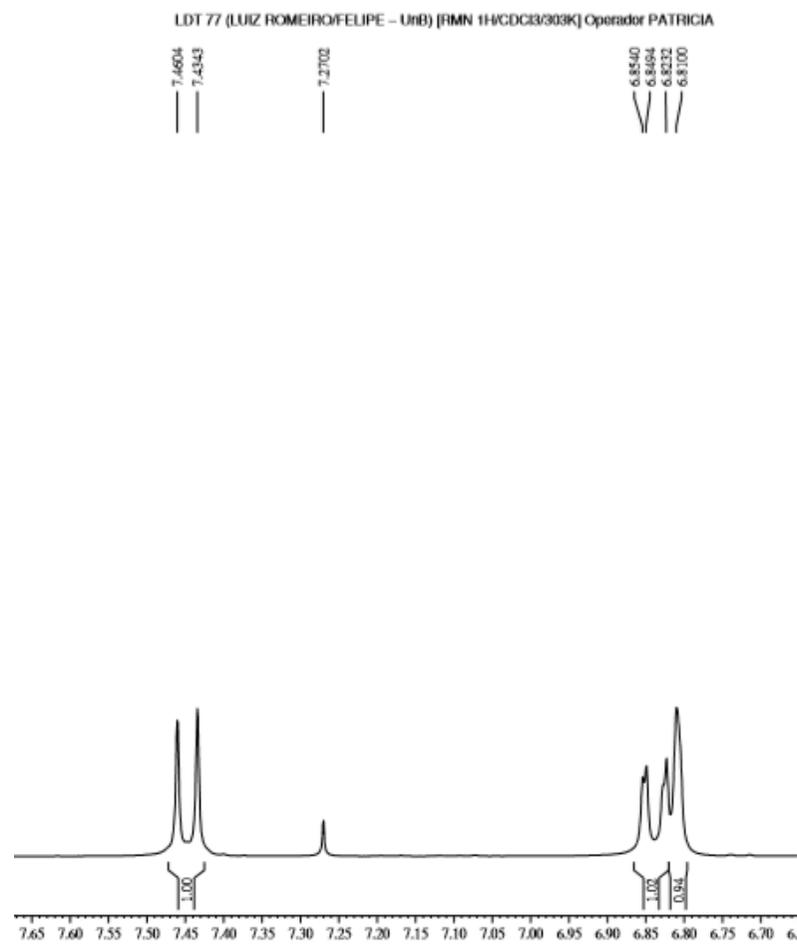
1 ANEXO 8 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT77 (29)

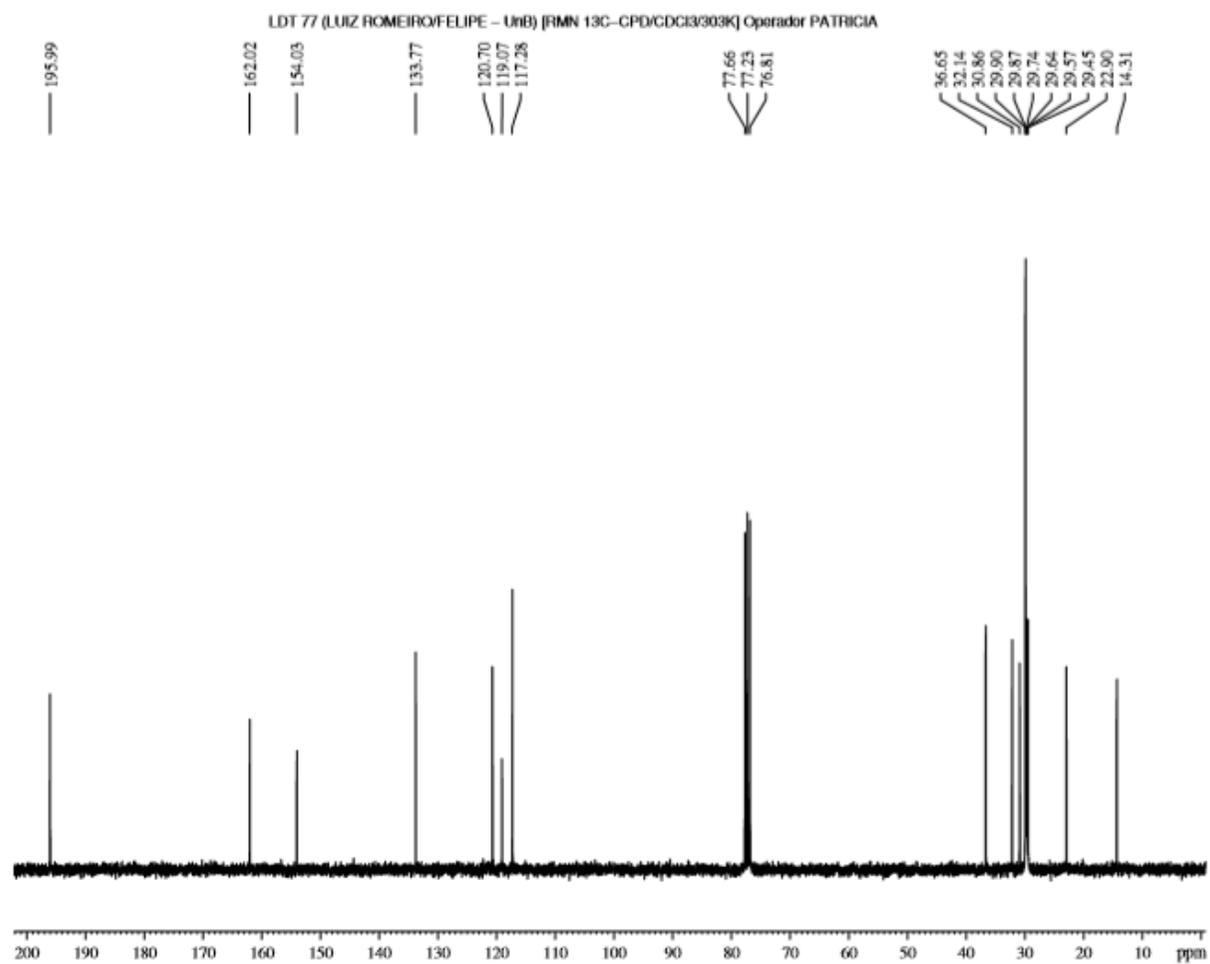
2

1 ANEXO 9 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT77 (29)

2

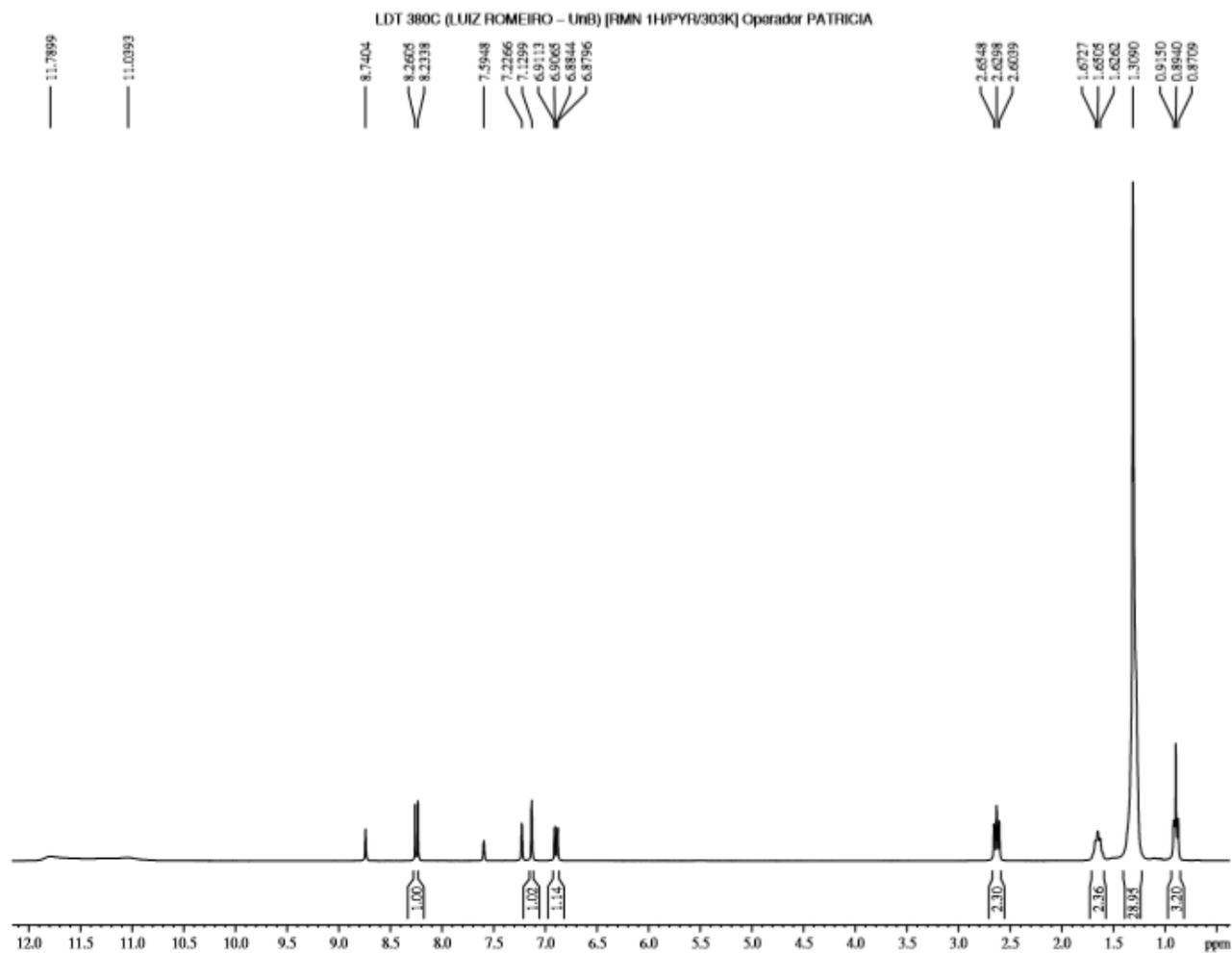
3



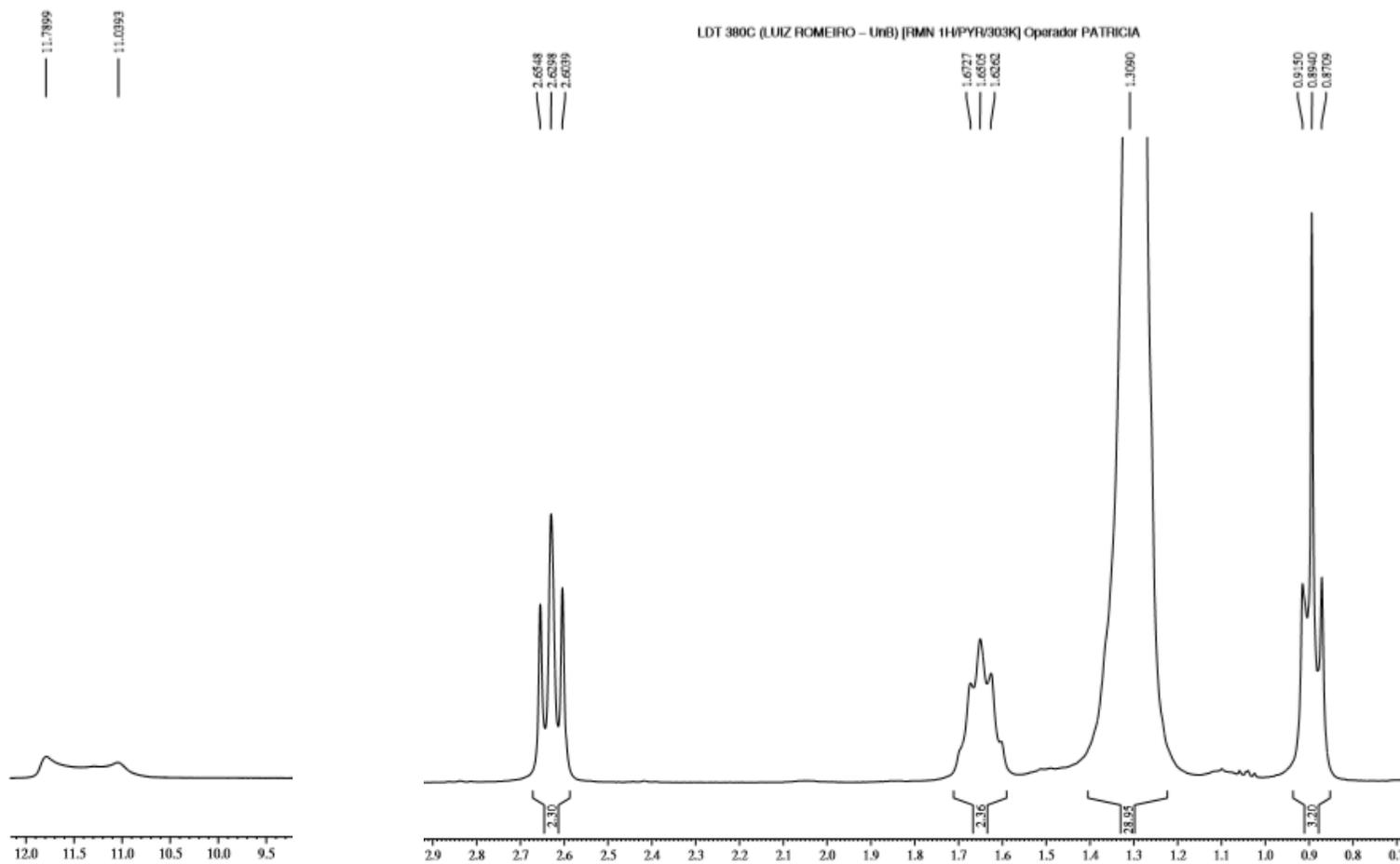
1 ANEXO 10 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT77 (29)

2

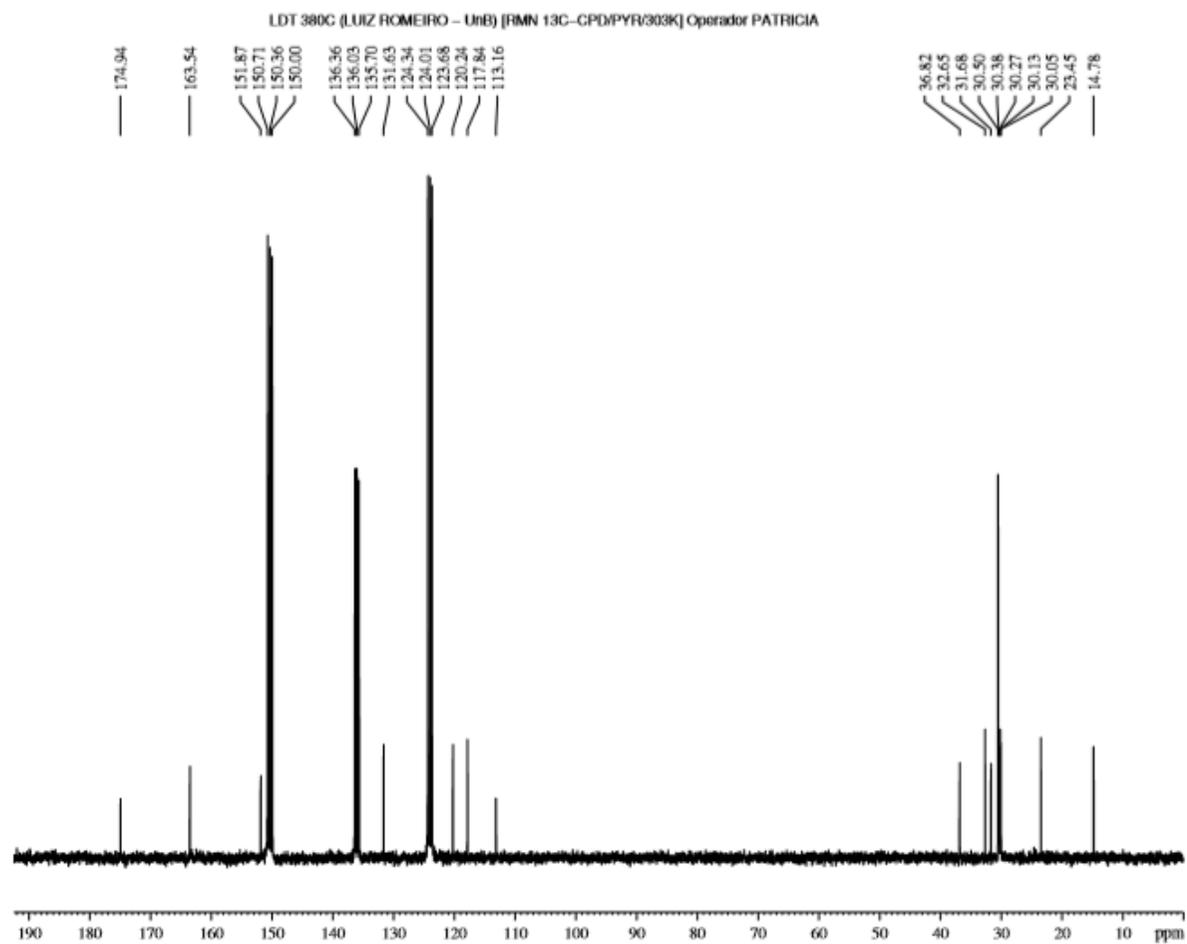
3

1 ANEXO 11 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, Piridina) – LDT380 (28)

2

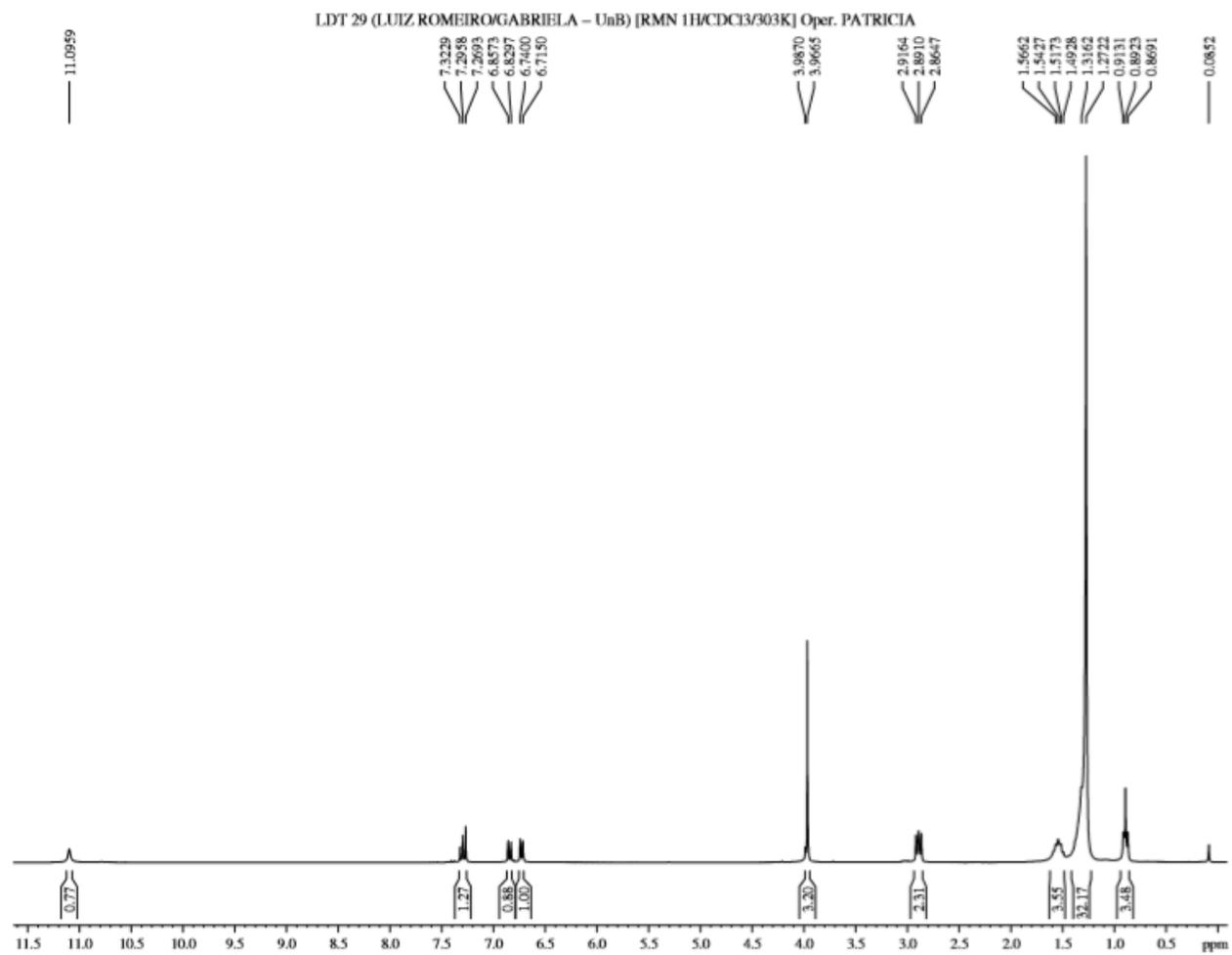
1 ANEXO 12 – Expansão espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, Piridina) – LDT380 (28)

2

1 ANEXO 13 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, Piridina) – LDT380 (29)

2

3

1 ANEXO 14 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT29 (30)

2

1 ANEXO 15 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT29 (30)

2

3

4

5

6

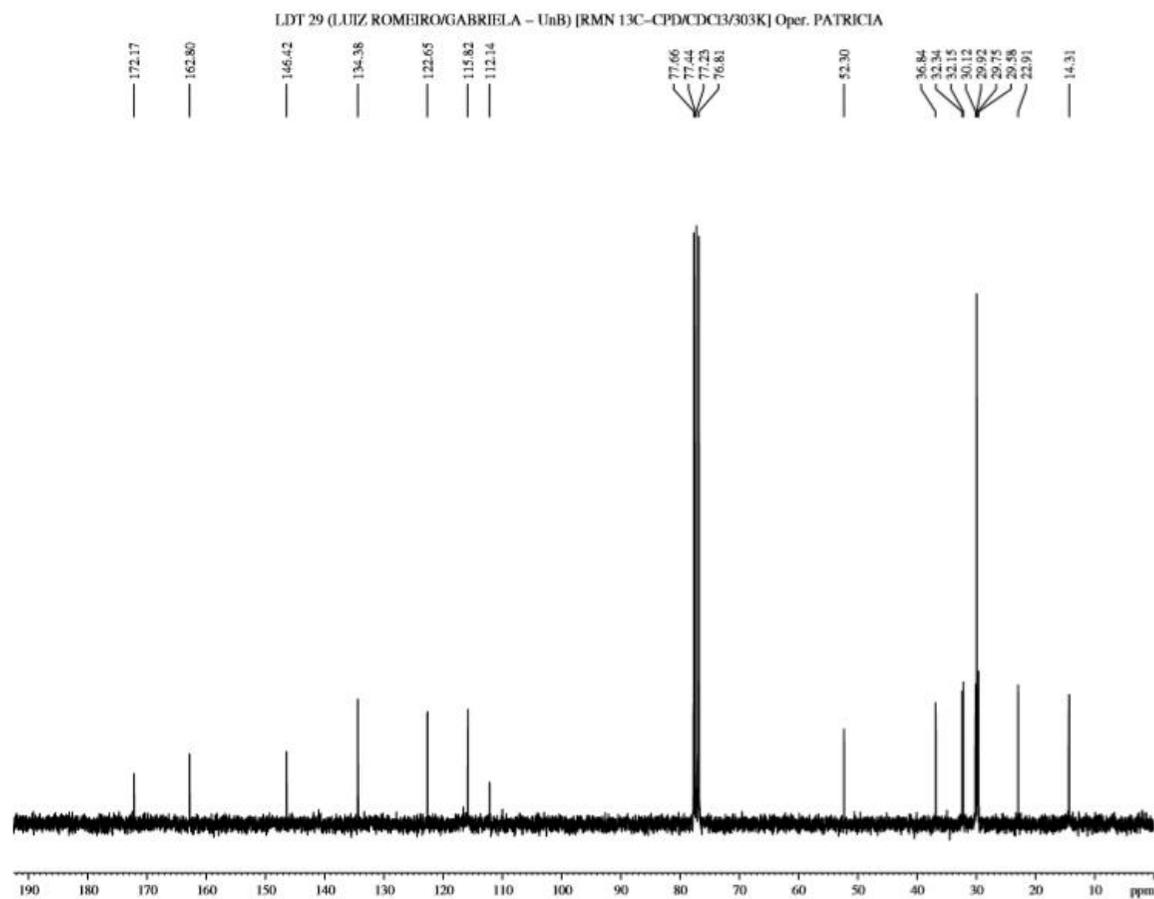
7

8

9

10

11

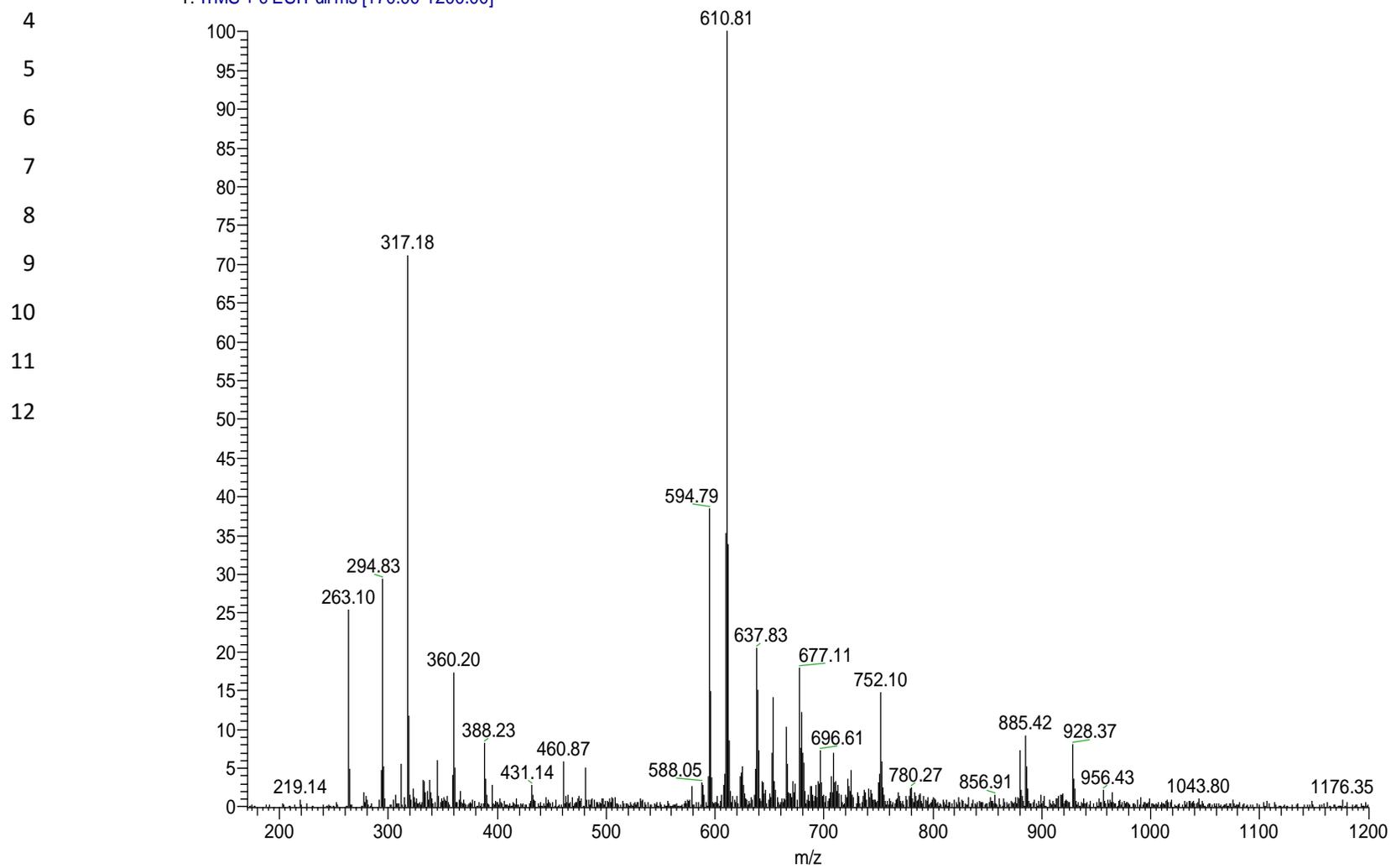


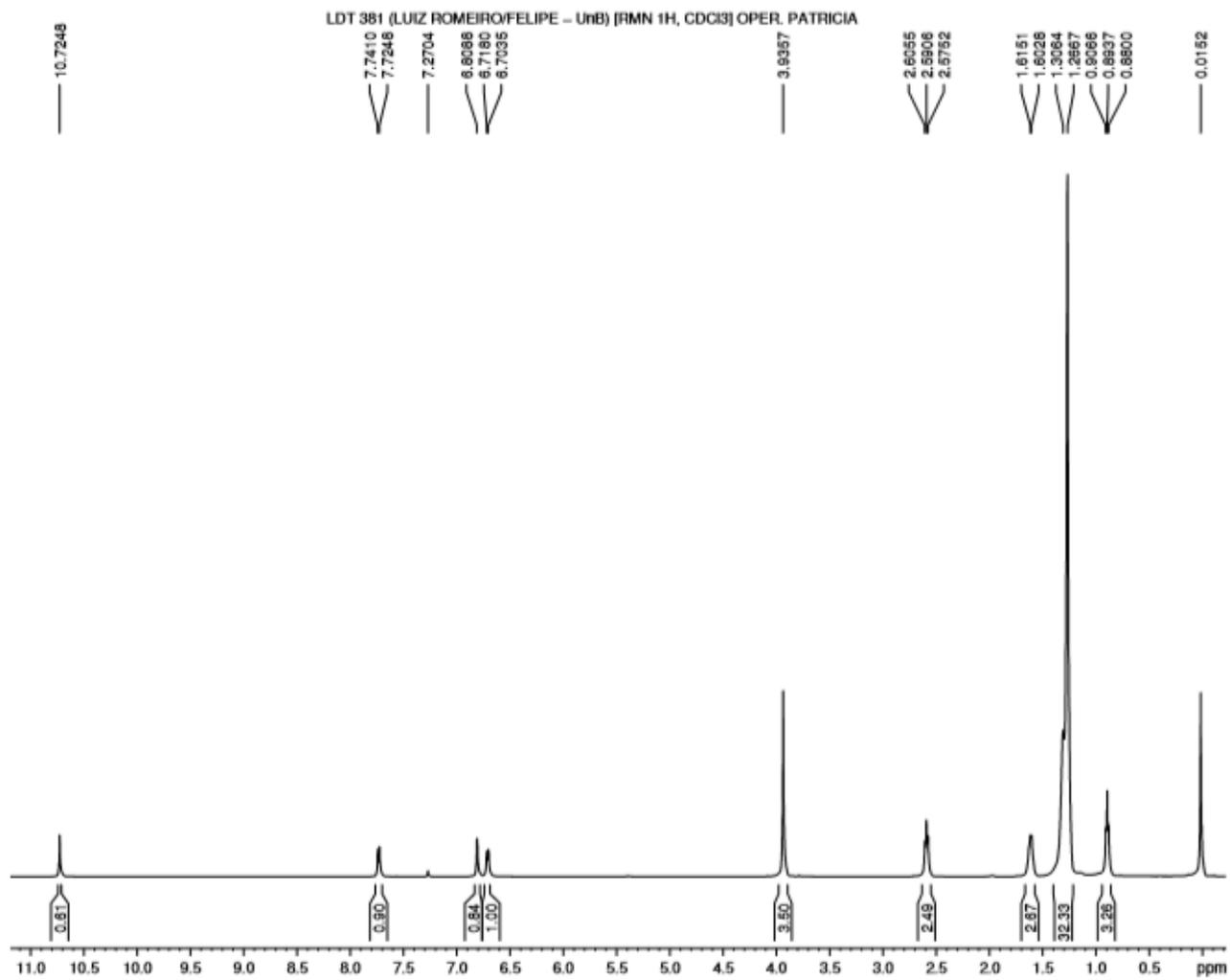
## 1 ANEXO 16 – Espectro de Massas – LDT29 (30)

2

3 LDT-74\_161219143034 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.83E4

4 T: ITMS + c ESI Full ms [170.00-1200.00]

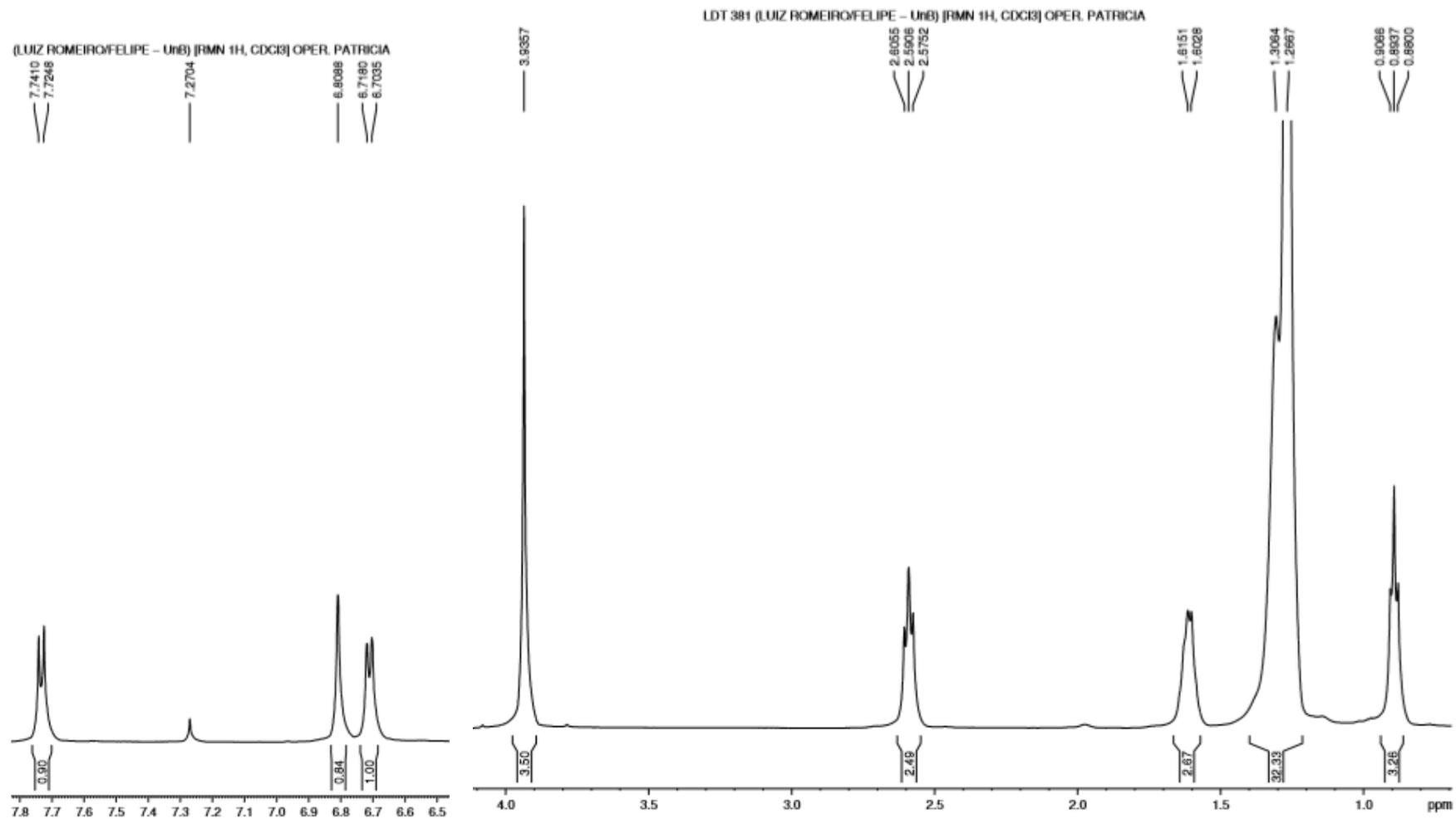


1 ANEXO 17 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT381 (31)

2

1 ANEXO 18 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT381 (31)

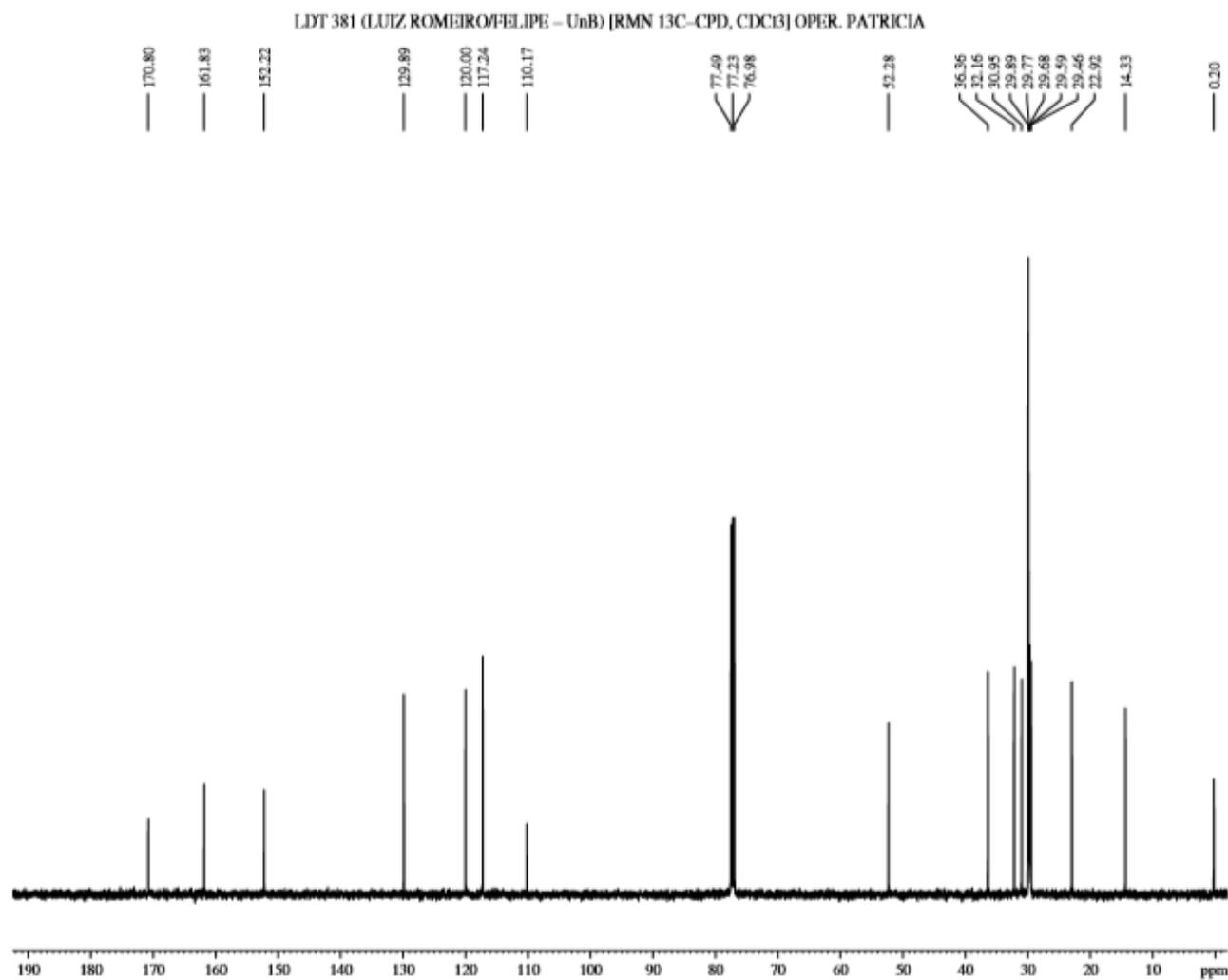
2



1 ANEXO 19 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT381 (31)

2

3

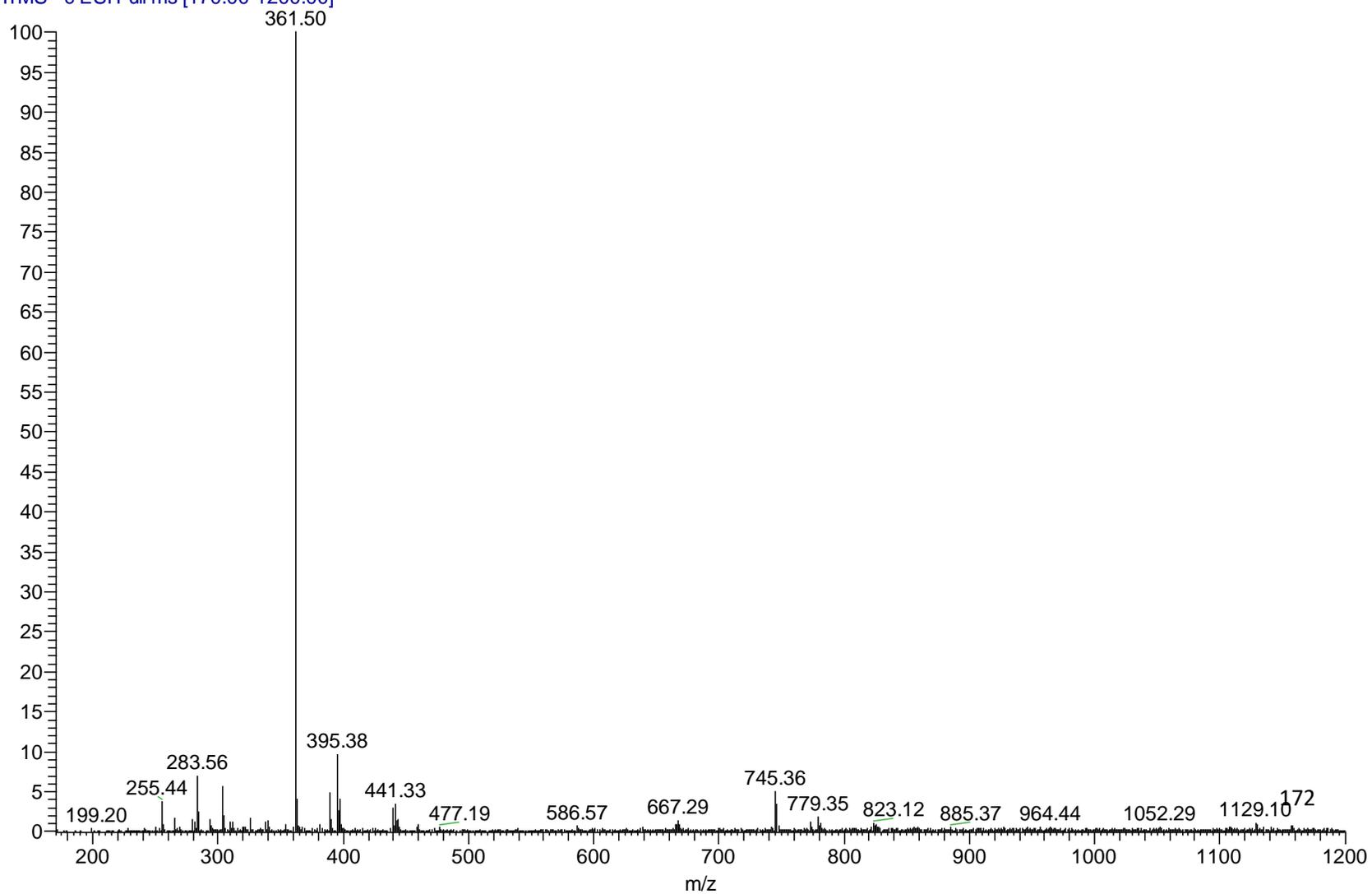


## 1 ANEXO 20 – Espectro de Massas – LDT381 (31)

2

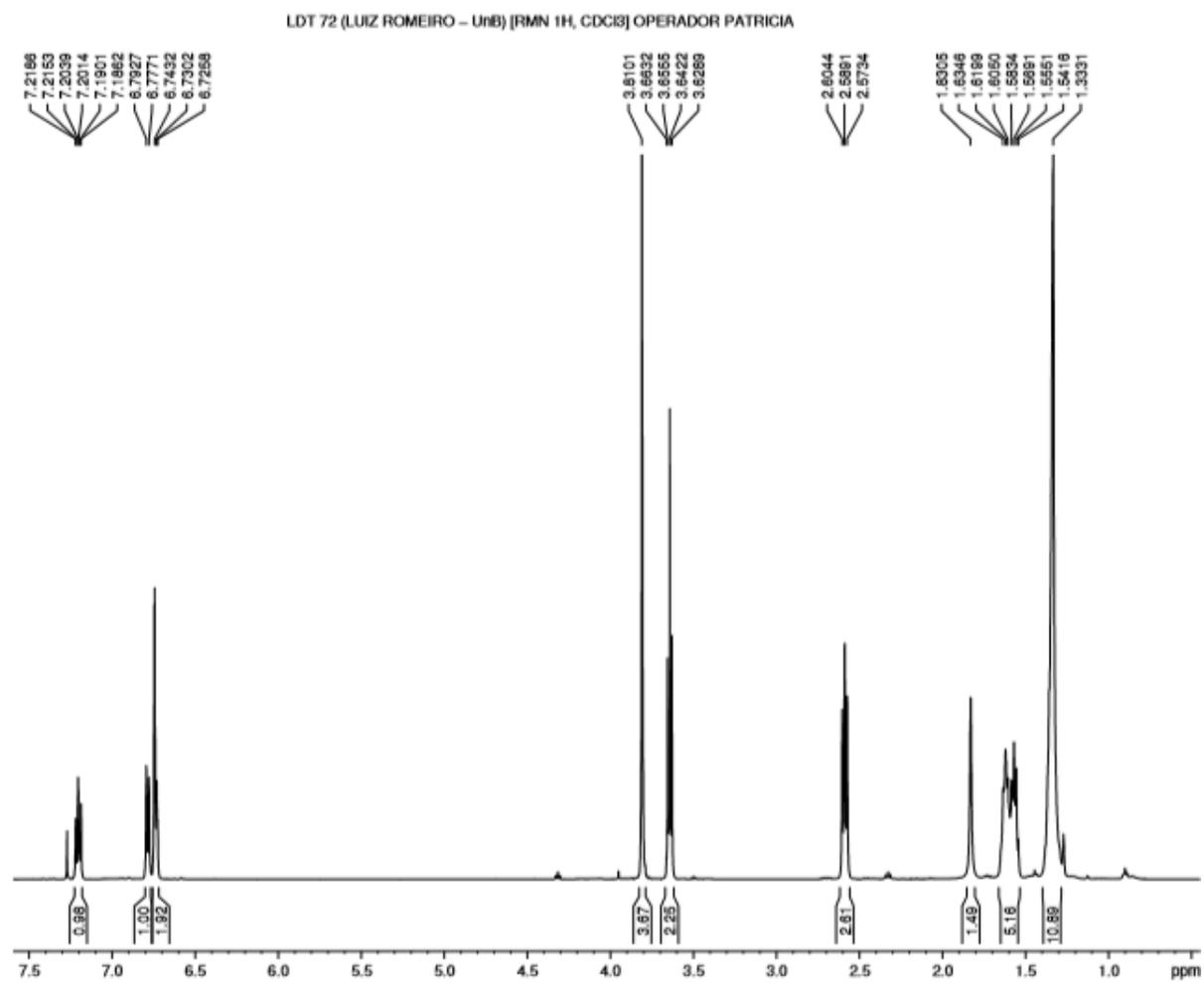
3

LDT-381-NEG\_161219151335 #3-4 RT: 0.04-0.06 AV: 2 NL: 4.33E3  
T: ITMS - c ESI Full ms [170.00-1200.00]

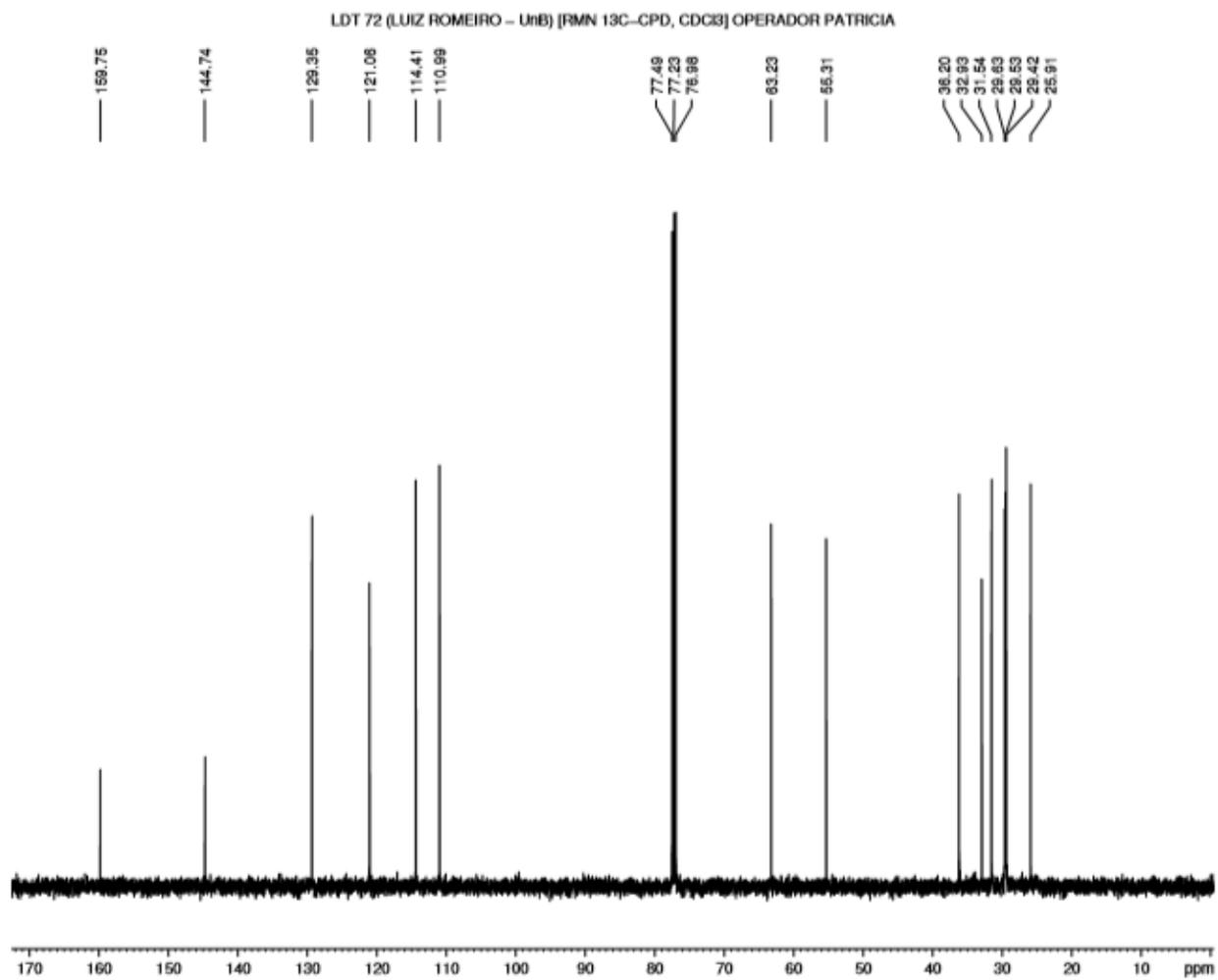


1 ANEXO 21 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT72 (34)

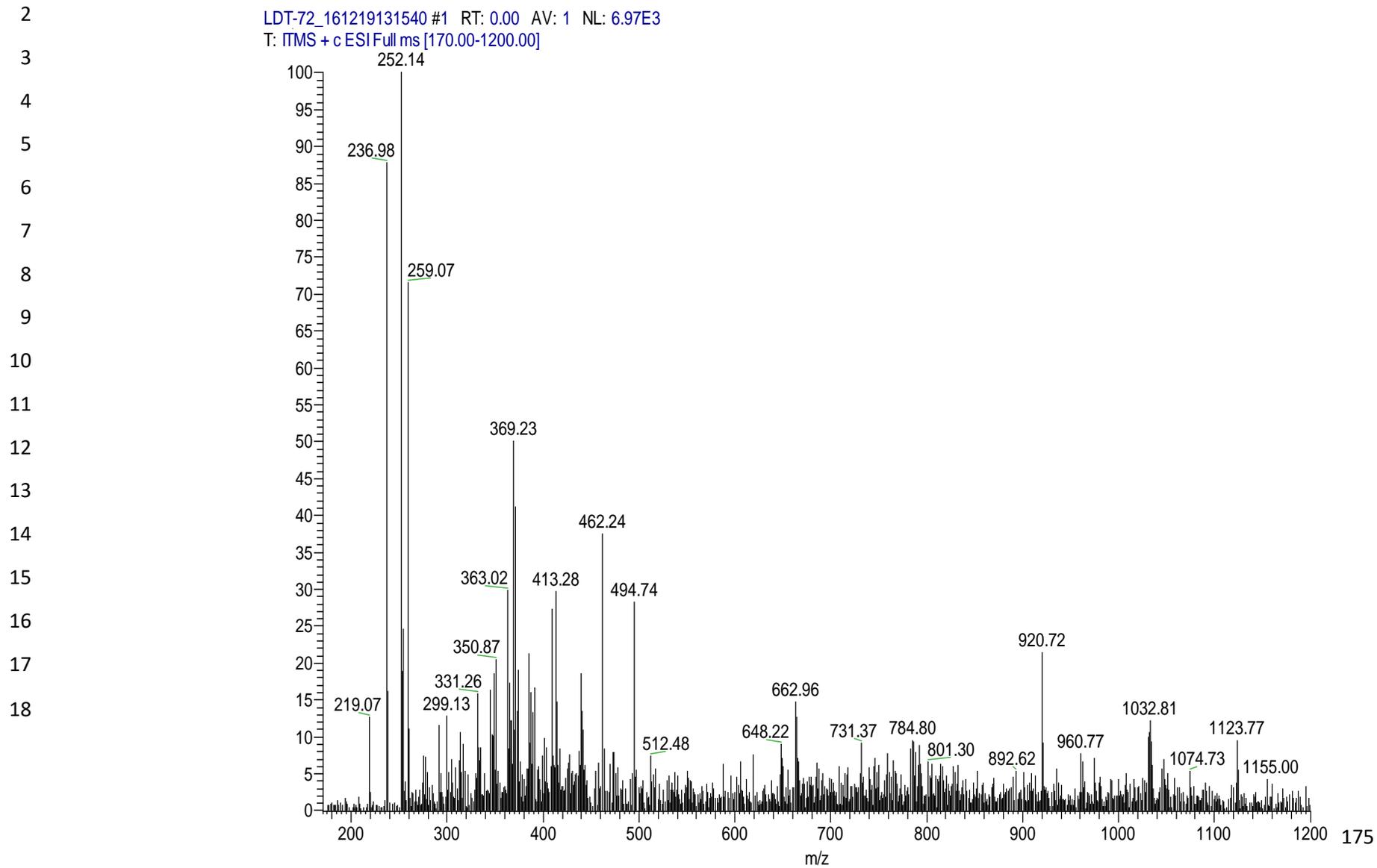
2

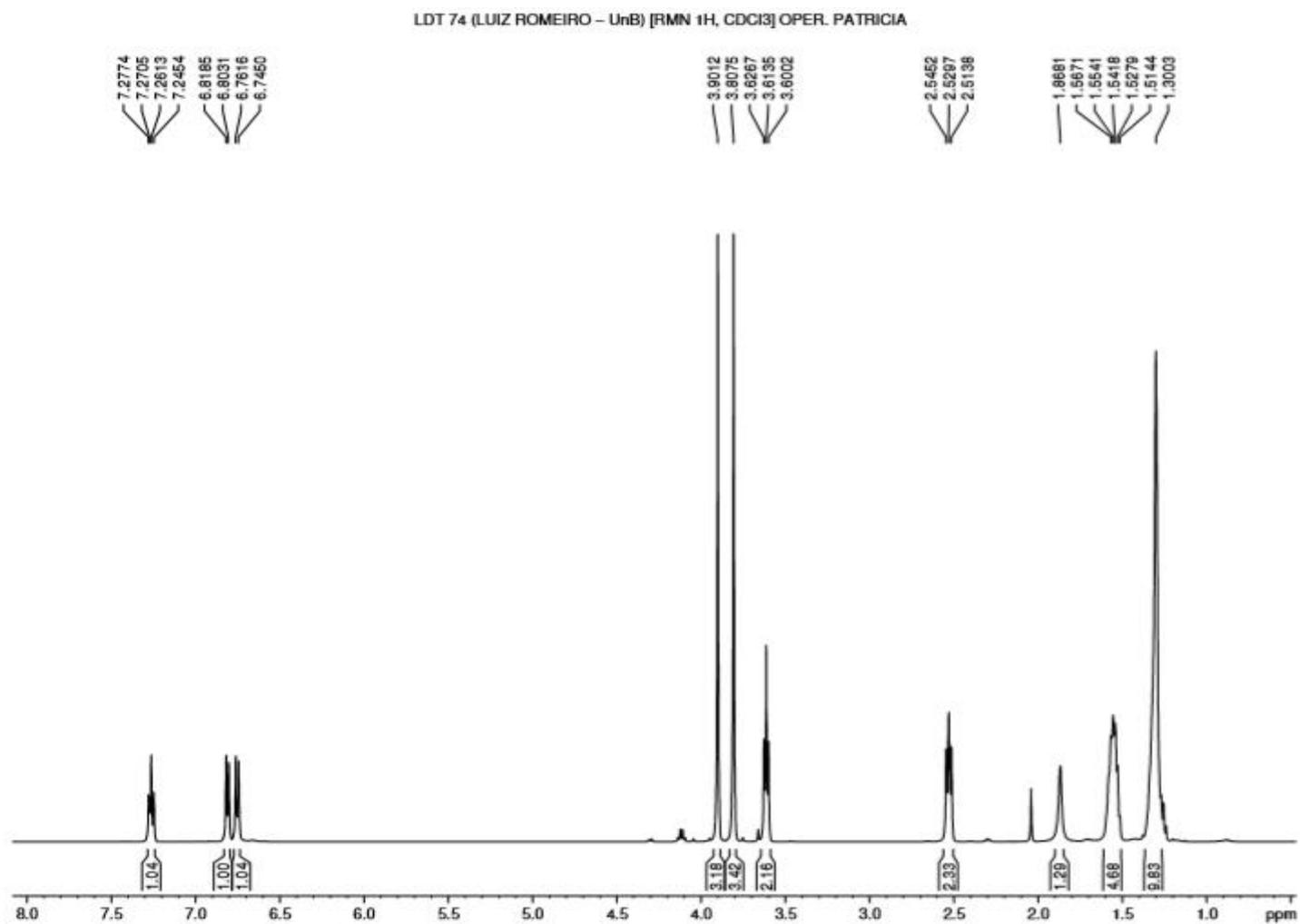


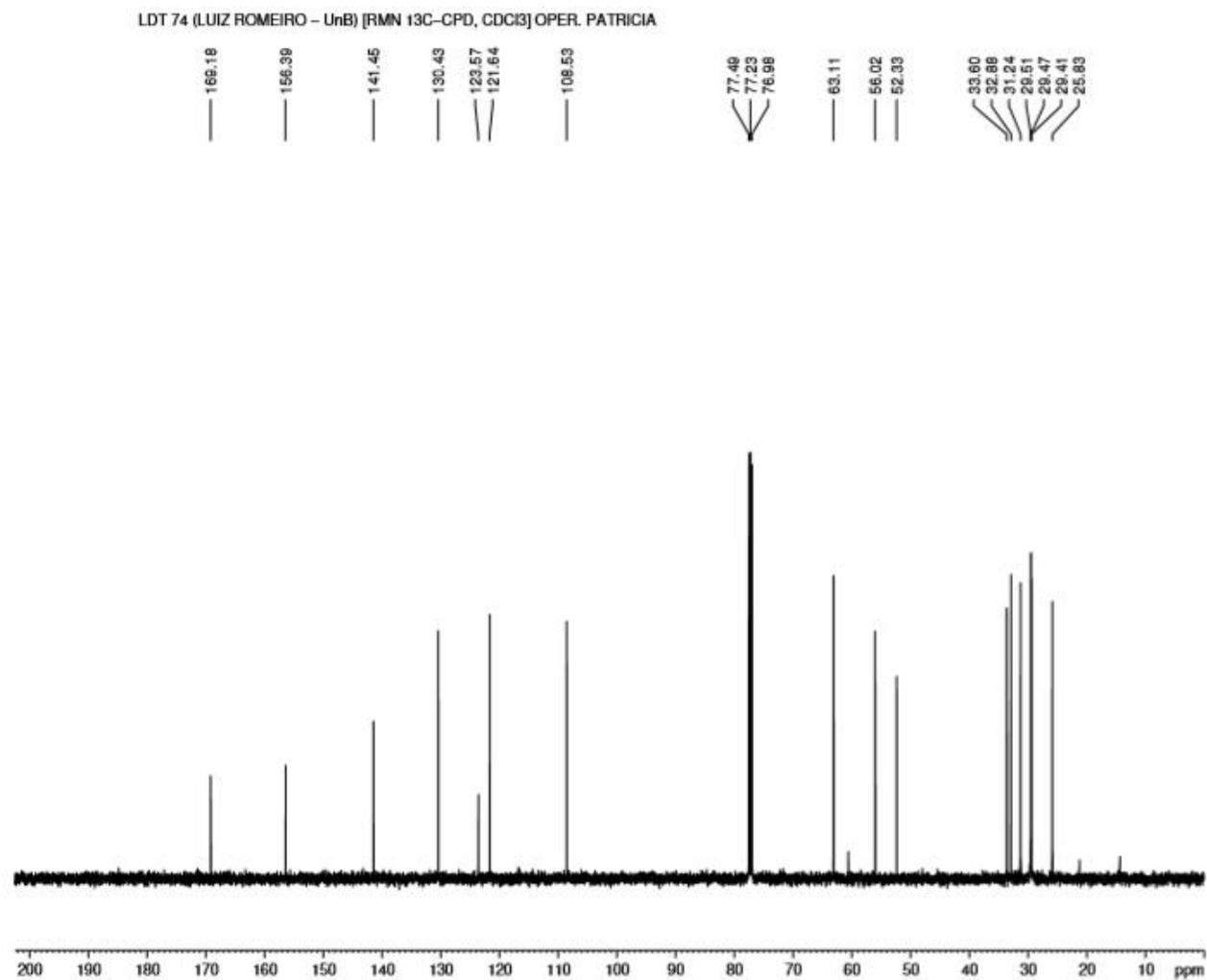
1

**ANEXO 22 – Espectro de RMN 13C (125 MHz, CDCl3) – LDT72 (34)**

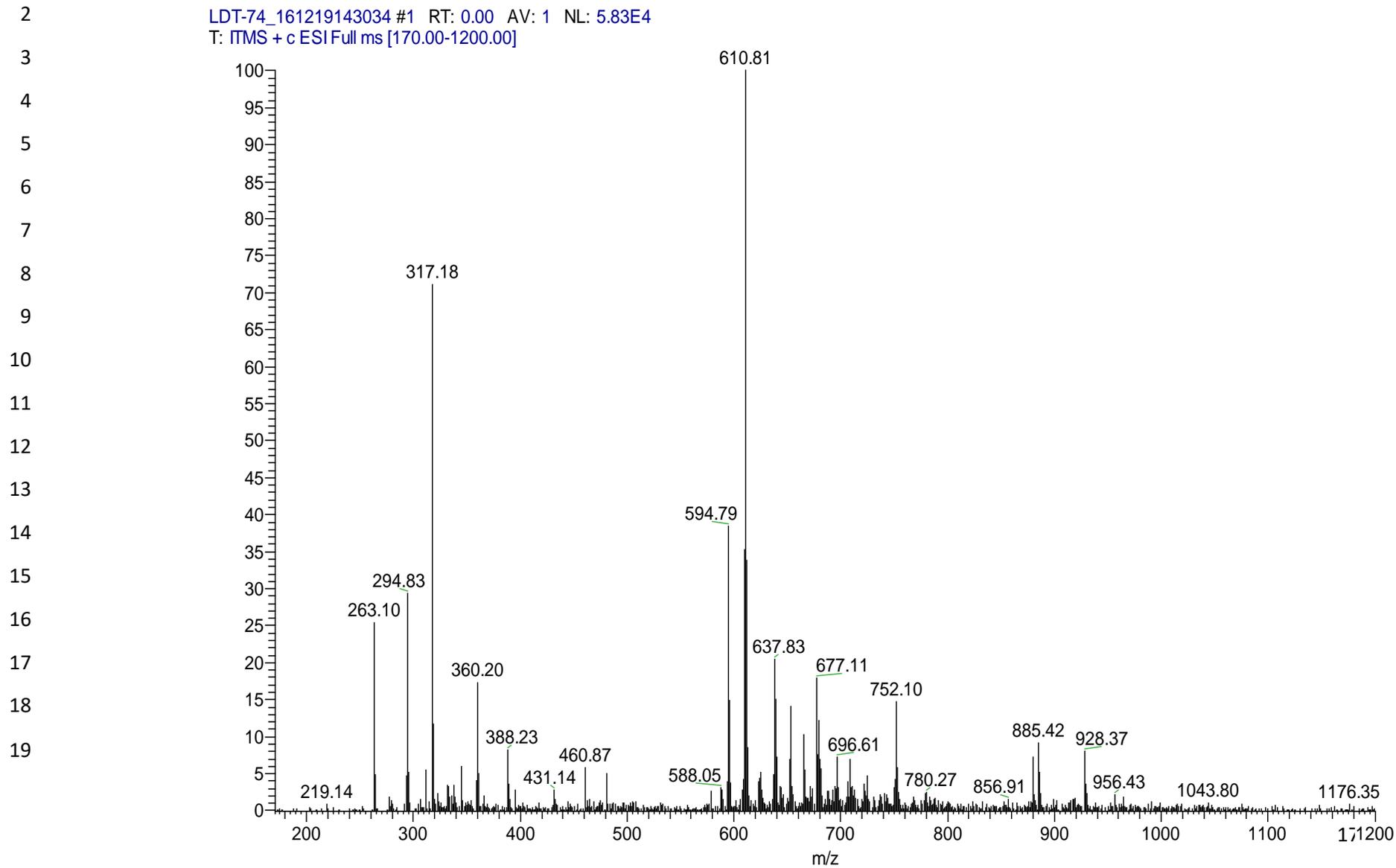
2

1 **ANEXO 23 – Espectro de Massas – LDT72 (34)**

1 ANEXO 24 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT74 (35)2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9

1 ANEXO 25 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – LDT74 (35)2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11

## 1 ANEXO 26 – Espectro de Massas – LDT74 (35)



1 ANEXO 27 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LDT301 (21)

2

3 NA.1.115.TT23

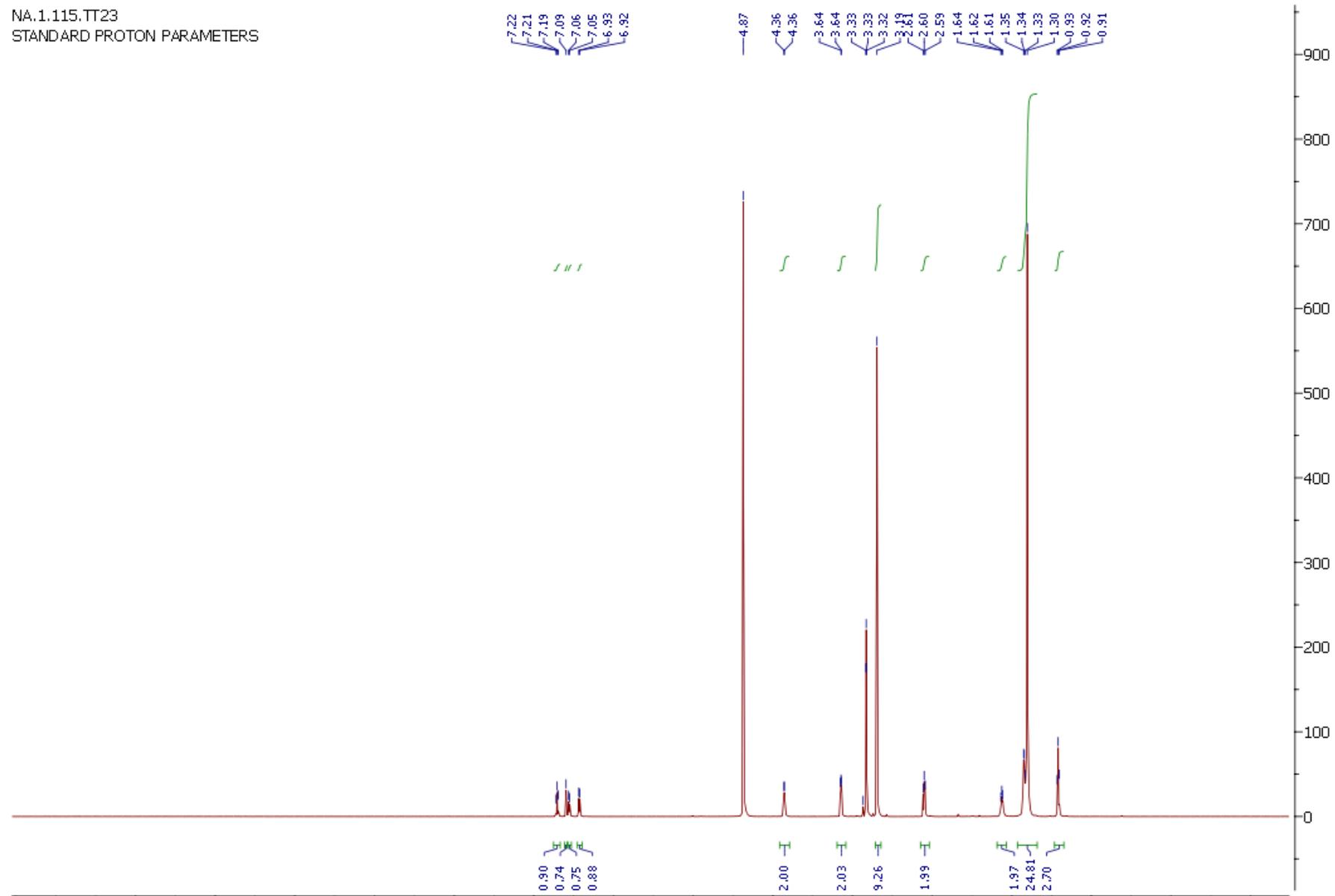
STANDARD PROTON PARAMETERS

4

5

6

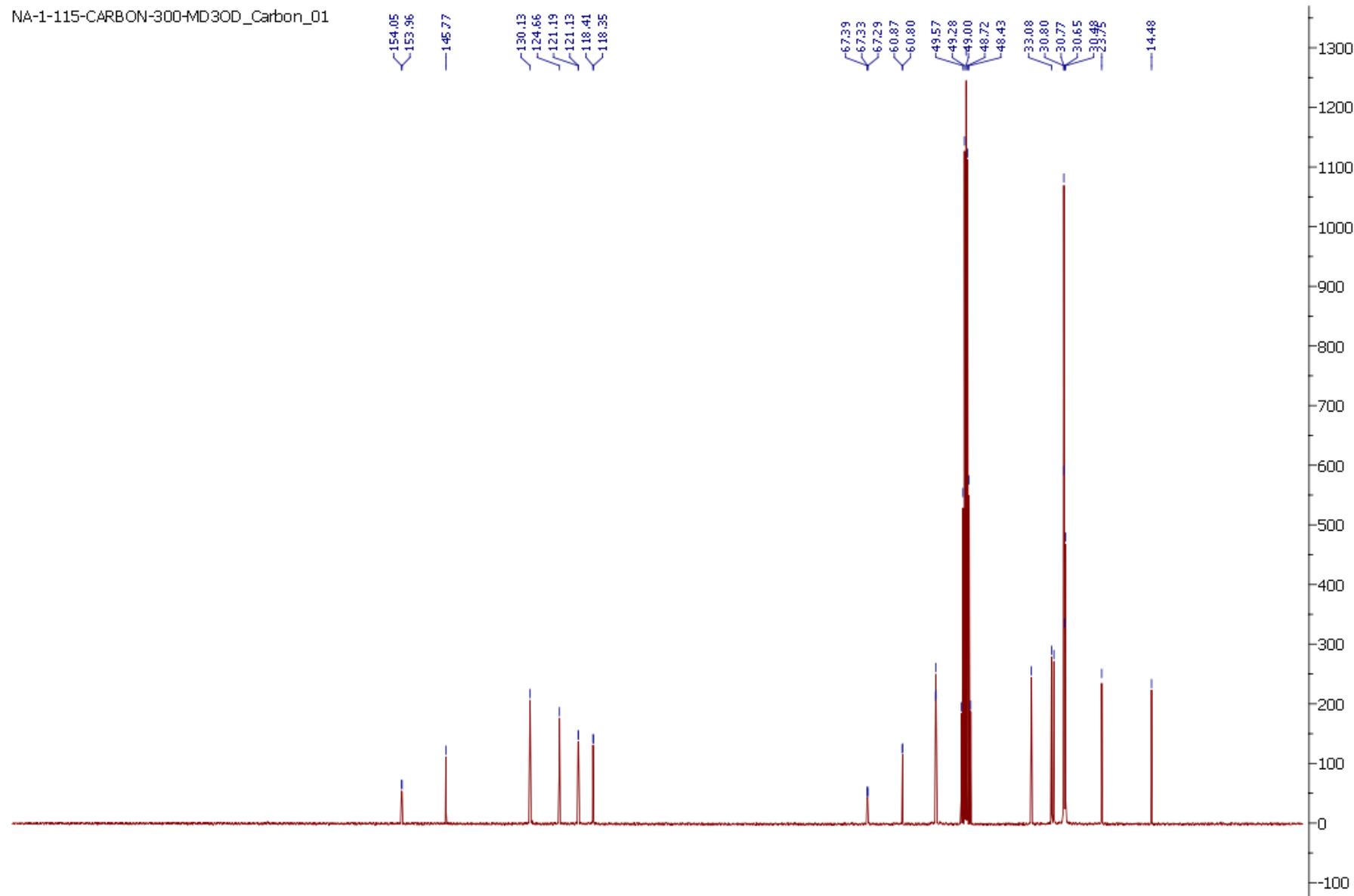
7



1 ANEXO 28 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LD301 (21)

2

3

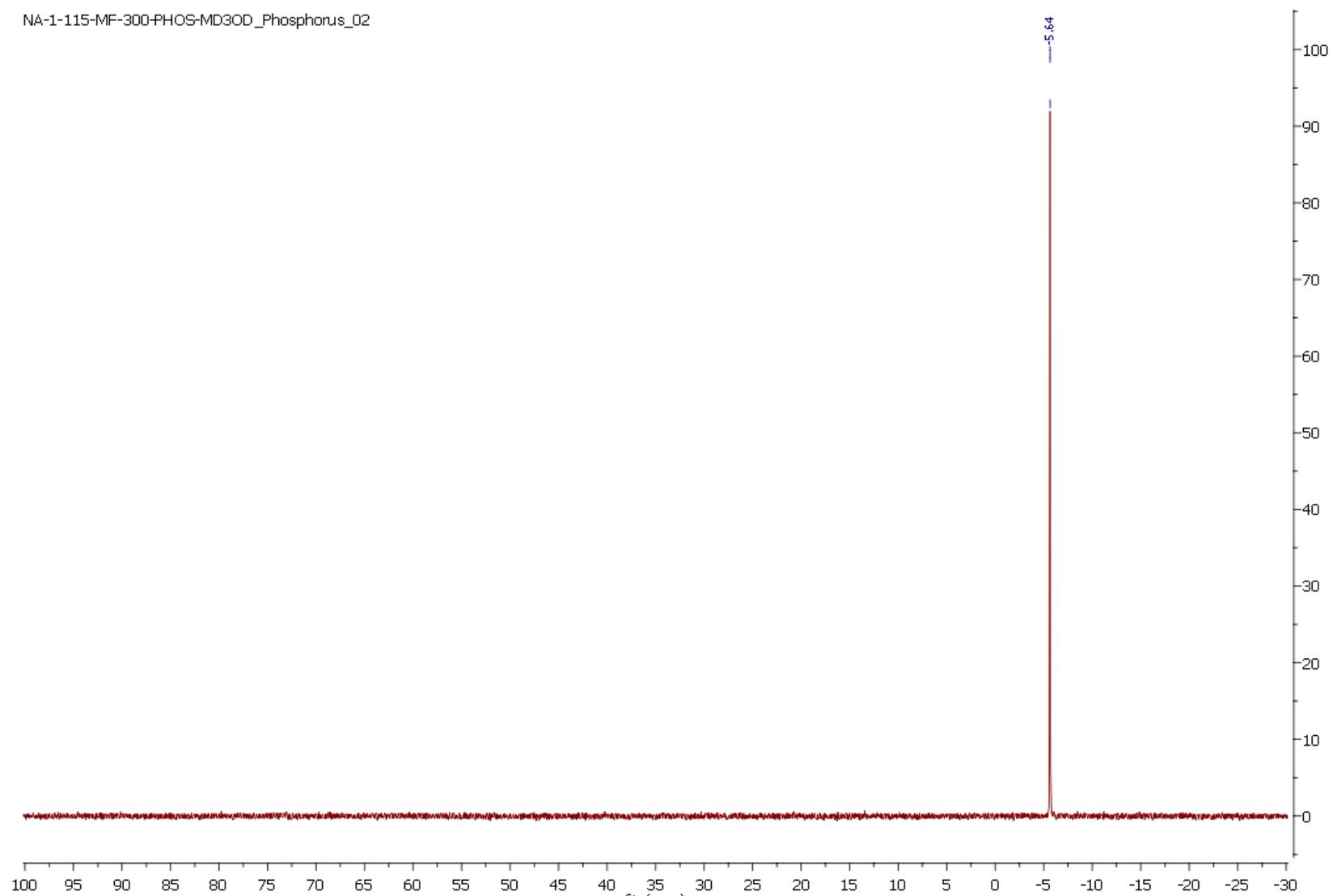


1 ANEXO 29 – Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  (121 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LD301 (21)

2

3

NA-1-115-MF-300-PHOS-MD3OD\_Phosphorus\_02



## 1 ANEXO 30 – Espectro de Massas - ESI-MS – LDT301 (21)

2

NA\_1\_103 #21 RT: 0.20 AV: 1 NL: 6.76E7

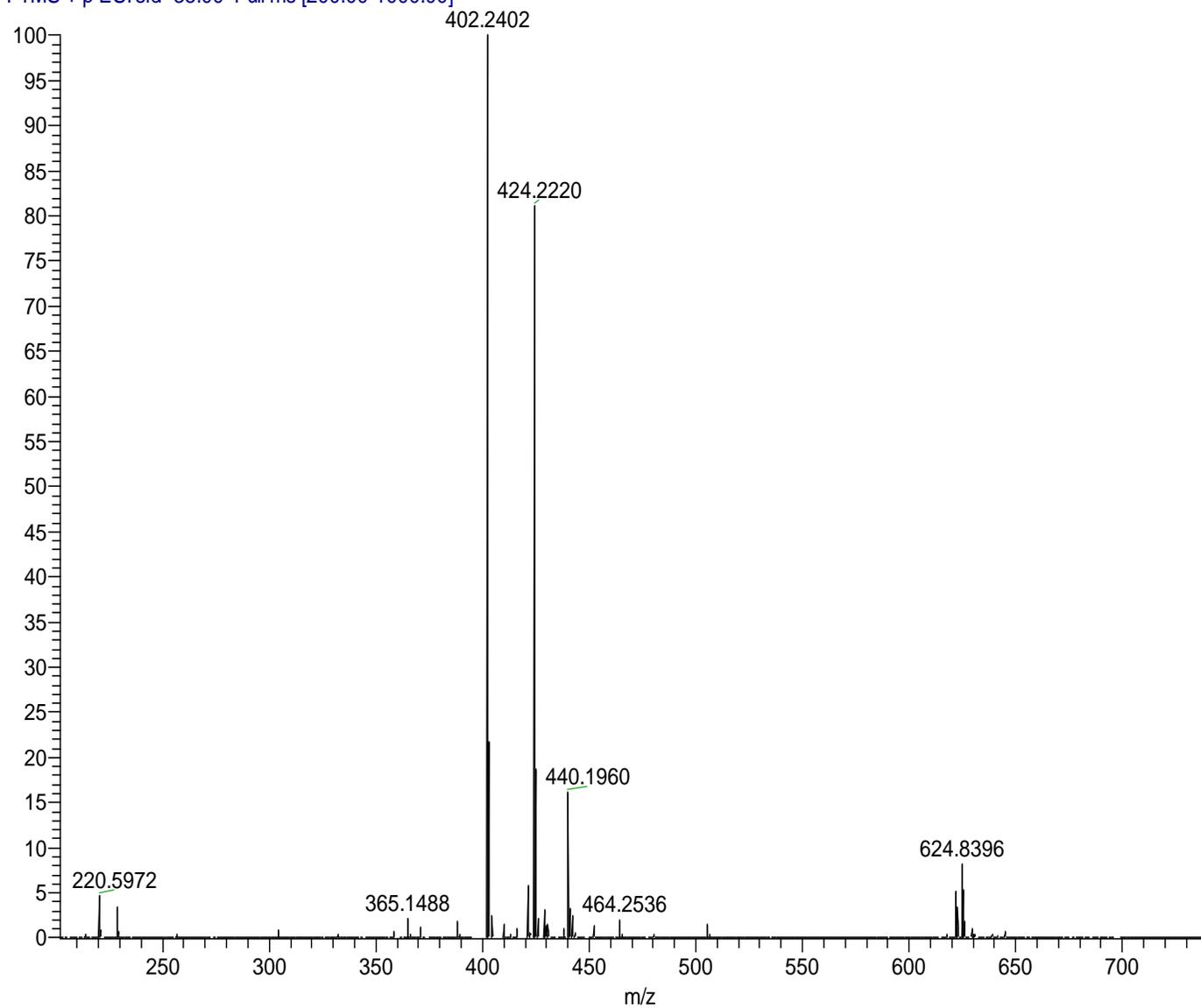
3

T: FTMS + p ESI sid=35.00 Full ms [200.00-1000.00]

4

5

6



## 1 ANEXO 31 – Espectro de Massas - ESI-HRMS – LDT301 (21)

2

3

NA\_1\_103 #21 RT: 0.20 AV: 1 NL: 6.76E7  
T: FTMS + p ESI sid=35.00 Full ms [200.00-1000.00]

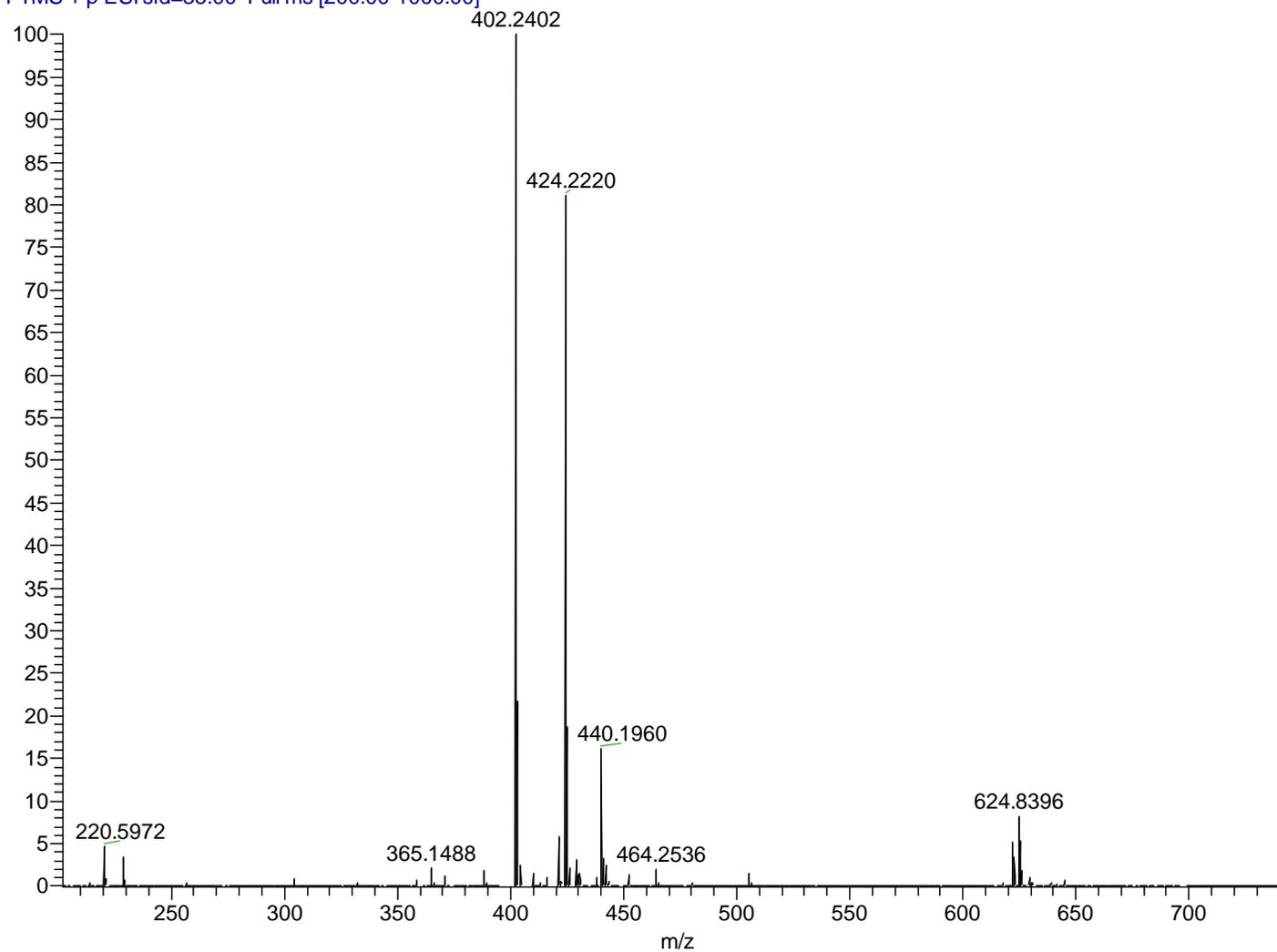
4

5

6

7

8



1 ANEXO 32 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LDT302 (22)

2

3

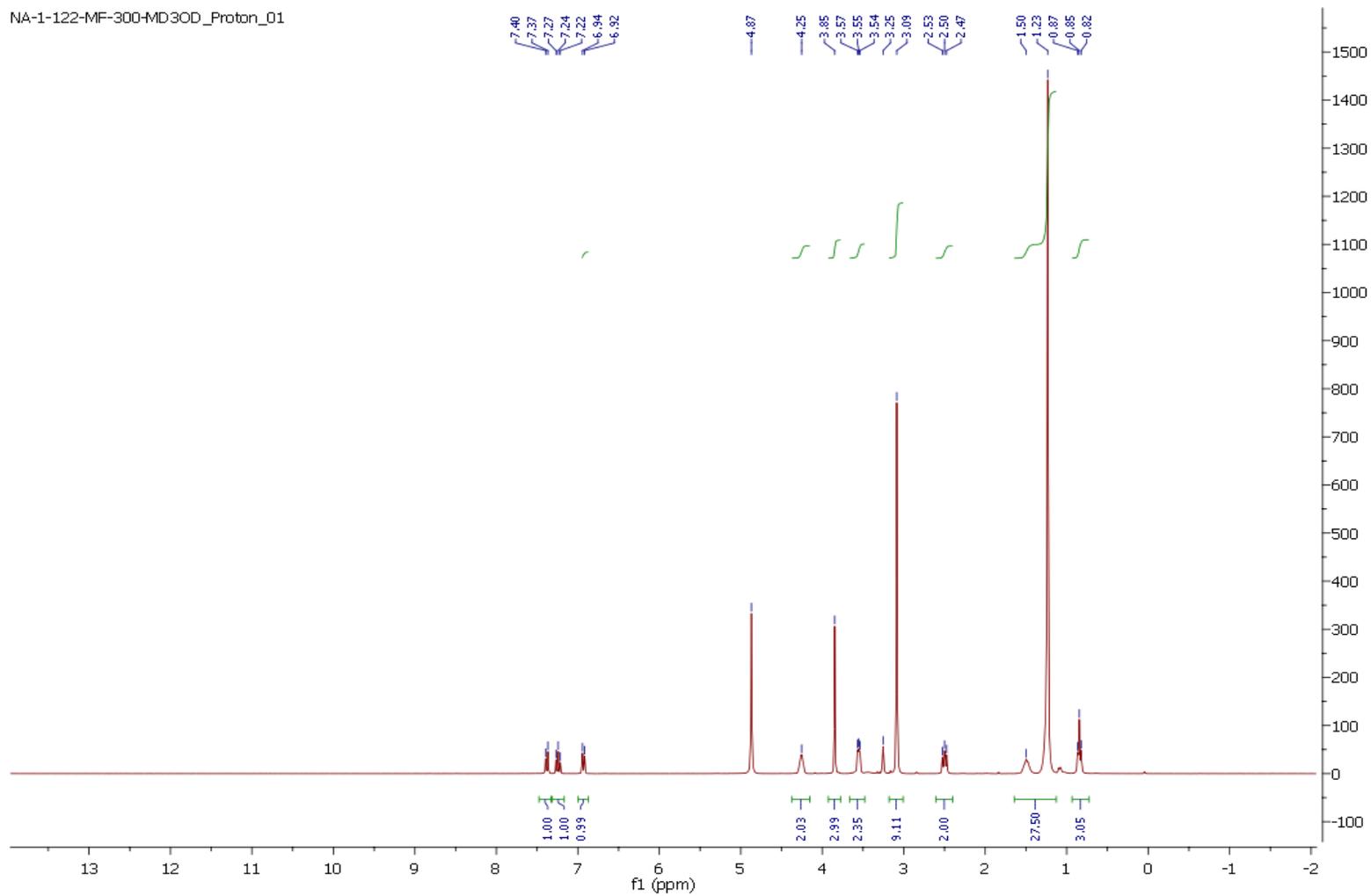
4

5

6

7

8



1 ANEXO 33 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LD302 (22)

2

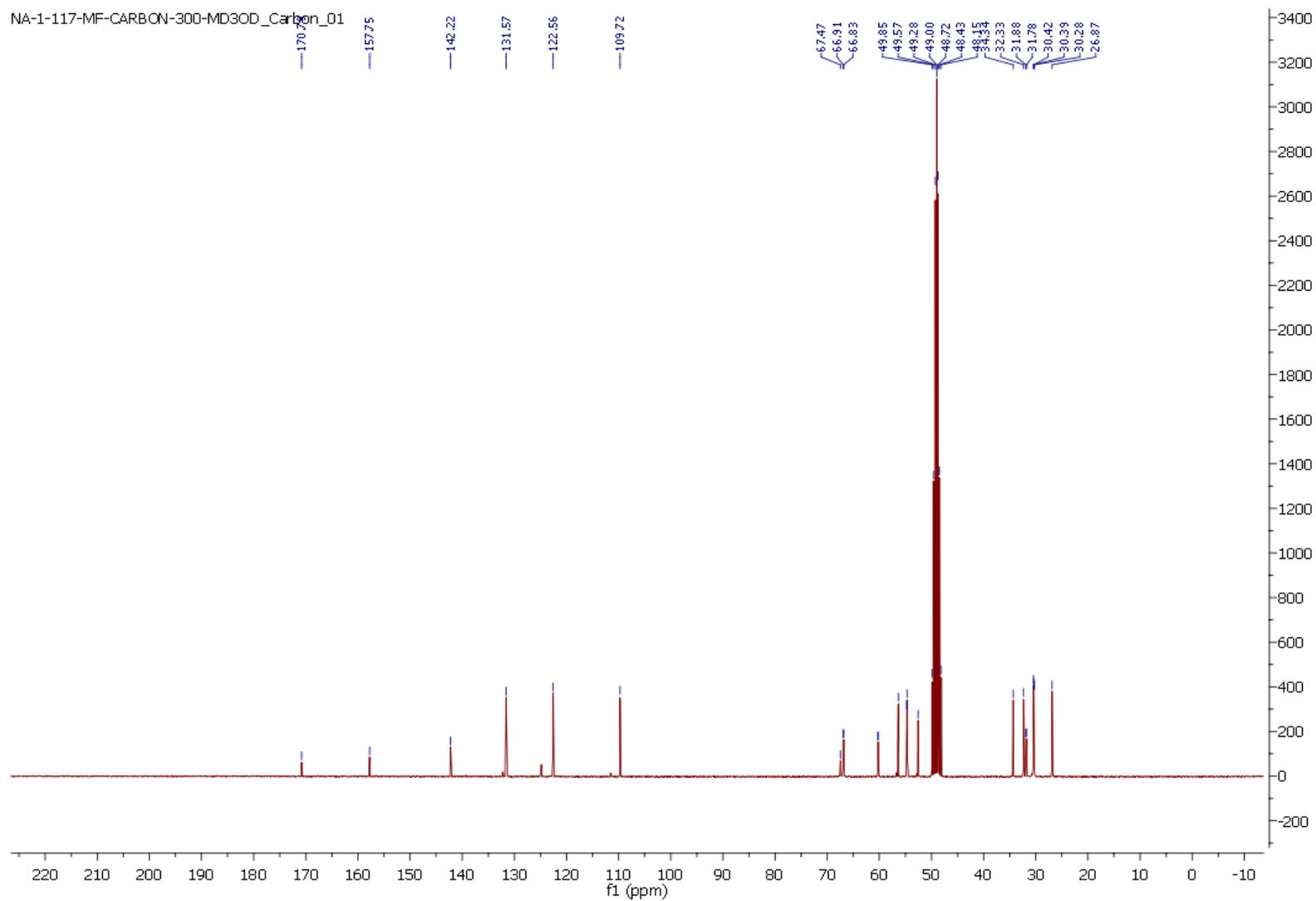
3

4

5

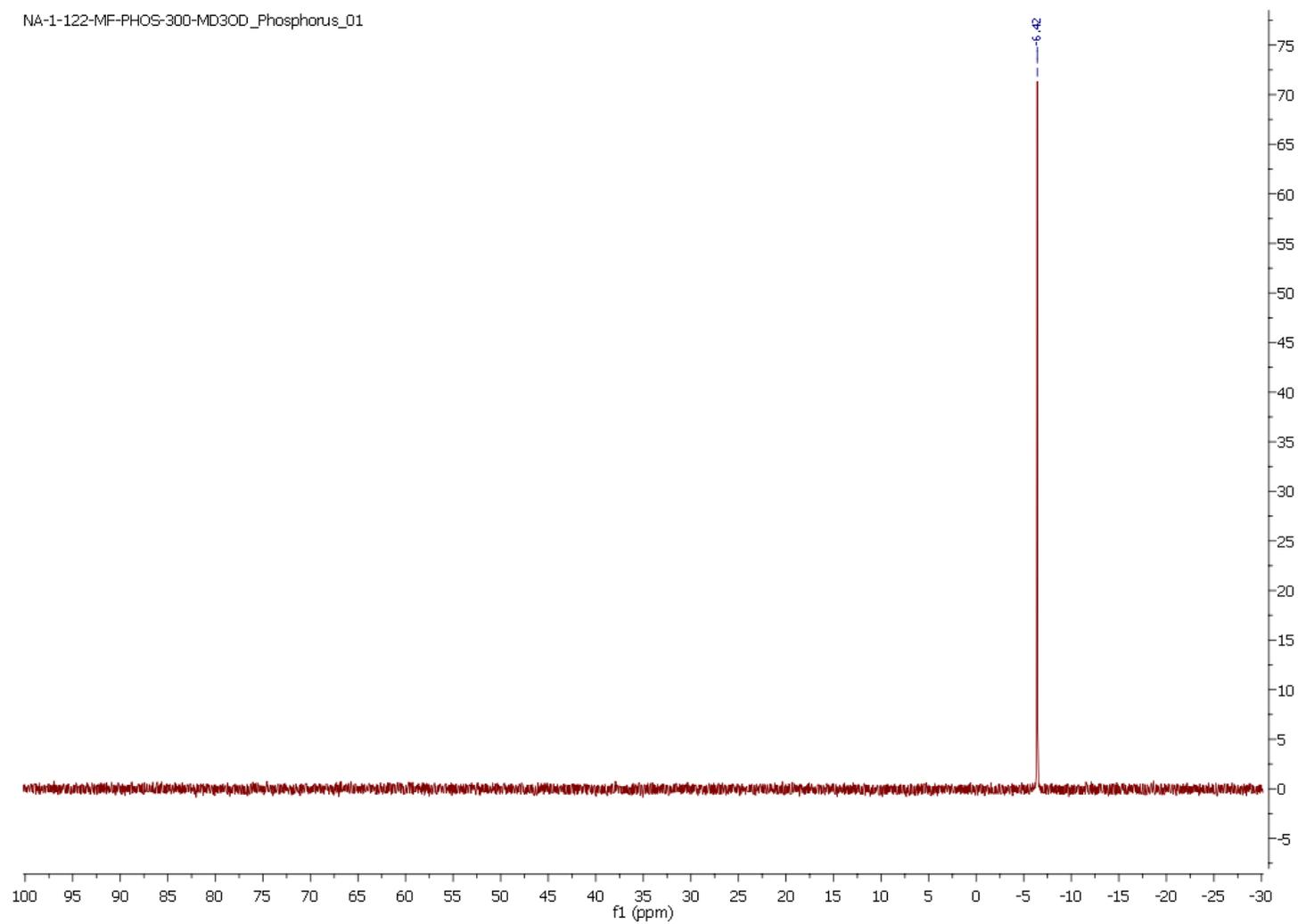
6

7



# 1 ANEXO 34 – Espectro de RMN de $^{31}\text{P}$ (121 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LD302 (22)

NA-1-122-MF-PHOS-300-MD3OD\_Phosphorus\_01



## 1 ANEXO 35 – Espectro de Massas - ESI-MS – LDT302 (22)

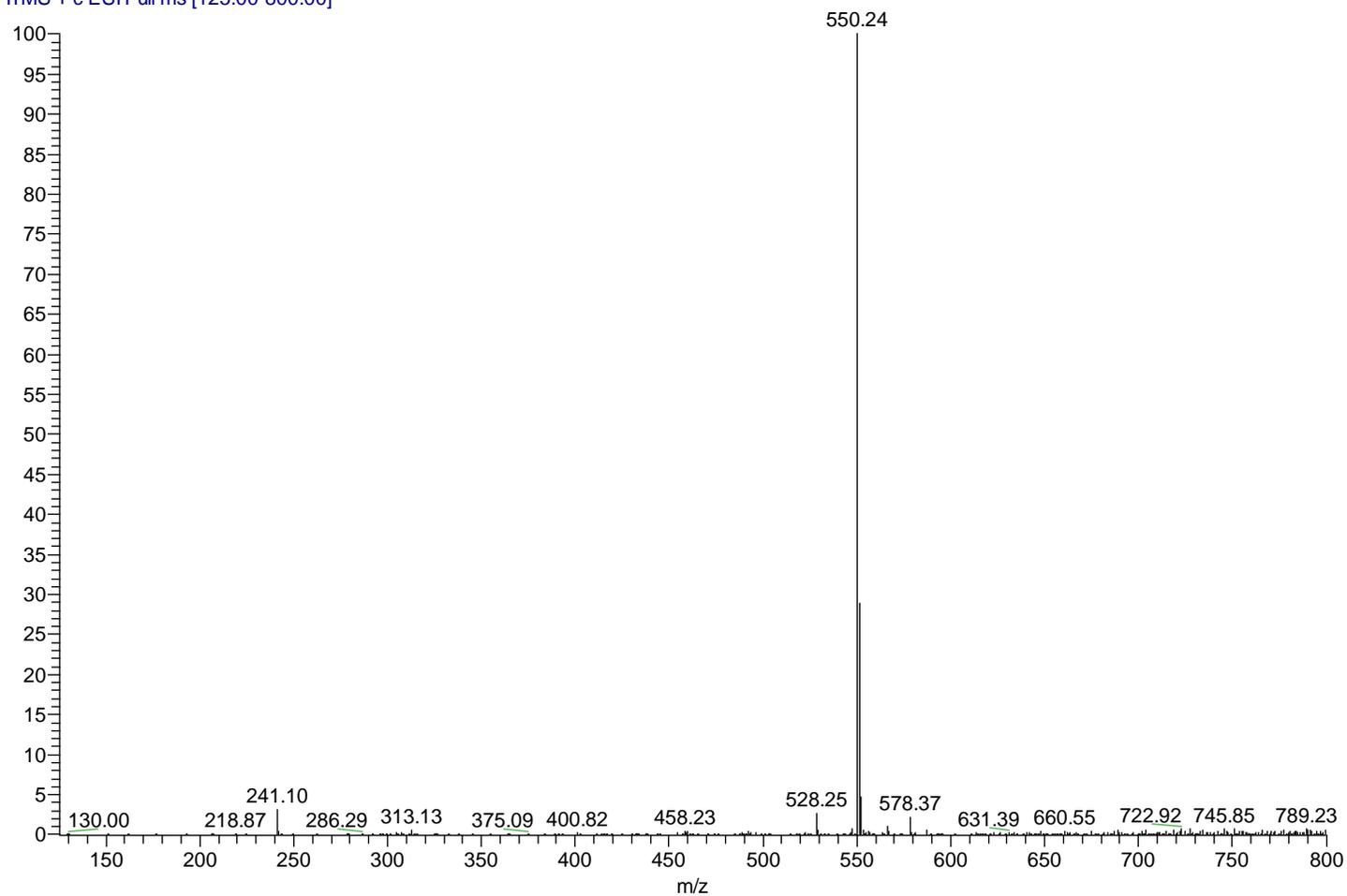
2

NA-1-122-MF\_170209175541 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 4.94E4  
T: ITMS + c ESI Full ms [125.00-800.00]

3

4

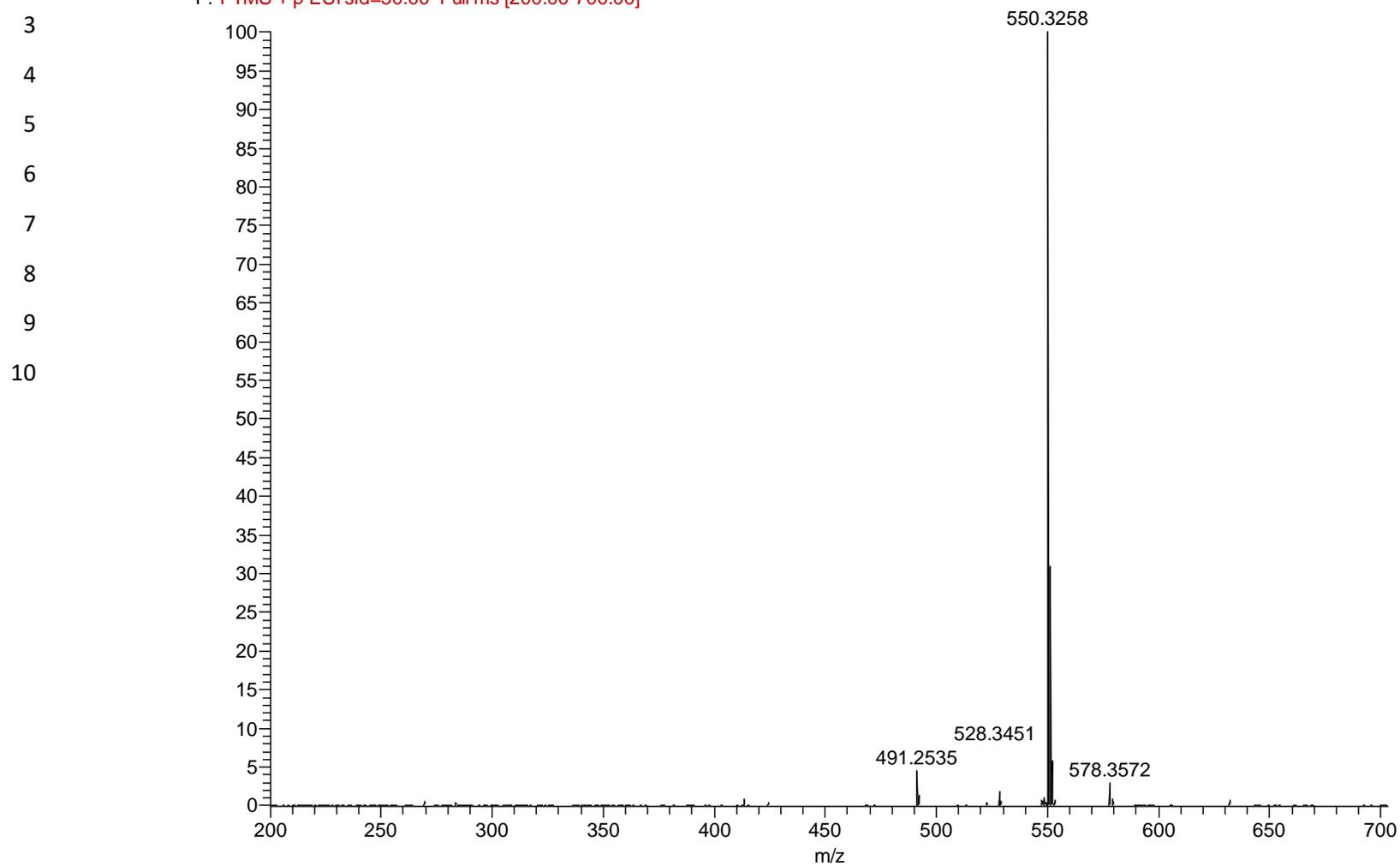
5



## 1 ANEXO 36 – Espectro de Massas - ESI-HRMS – LDT302 (22)

2 NA\_1\_113 #348-397 RT: 4.03-4.16 AV: 14 NL: 1.20E8

3 F: FTMS + p ESI sid=50.00 Full ms [200.00-700.00]



1 ANEXO 37 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LDT303 (23)

2

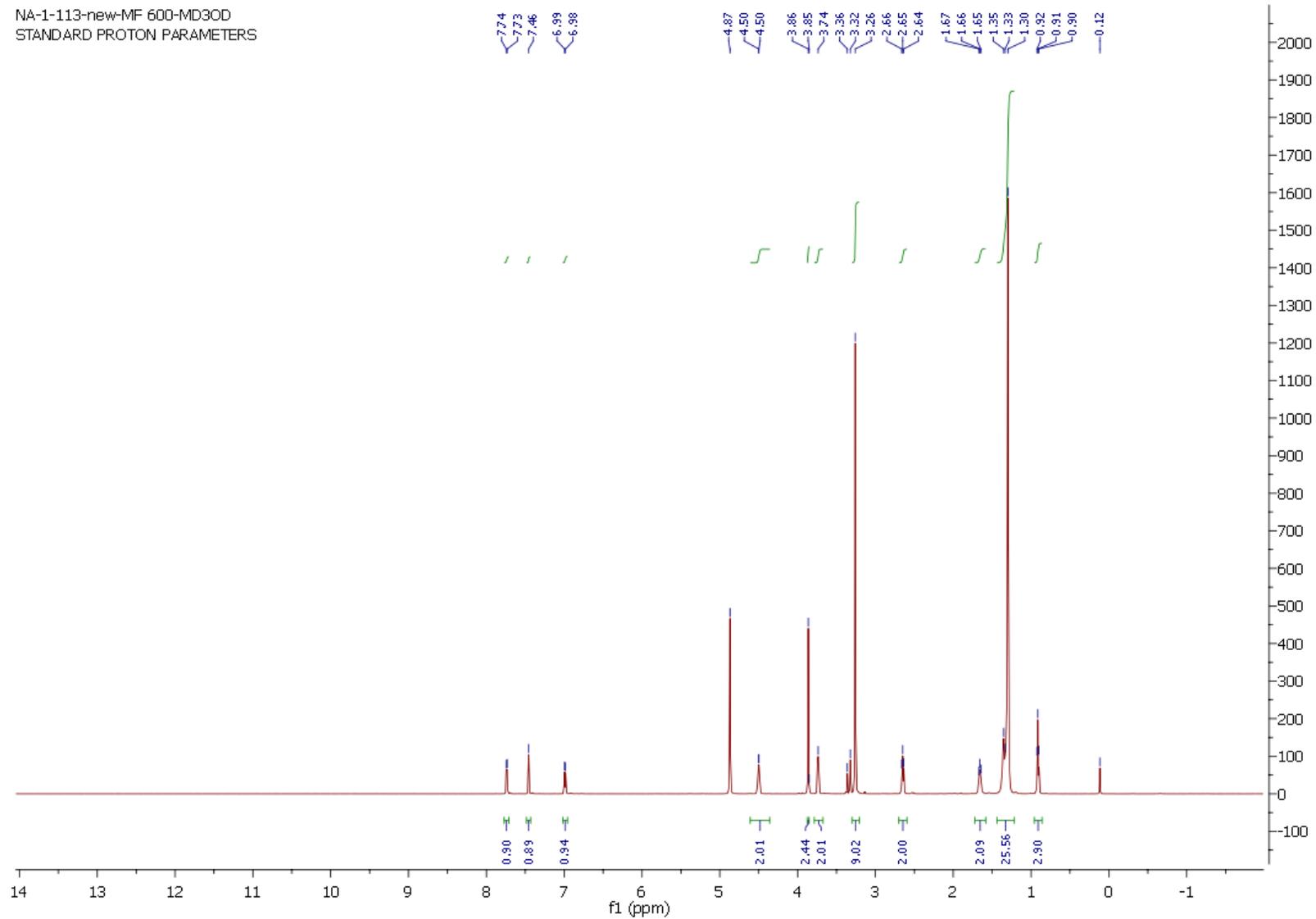
3

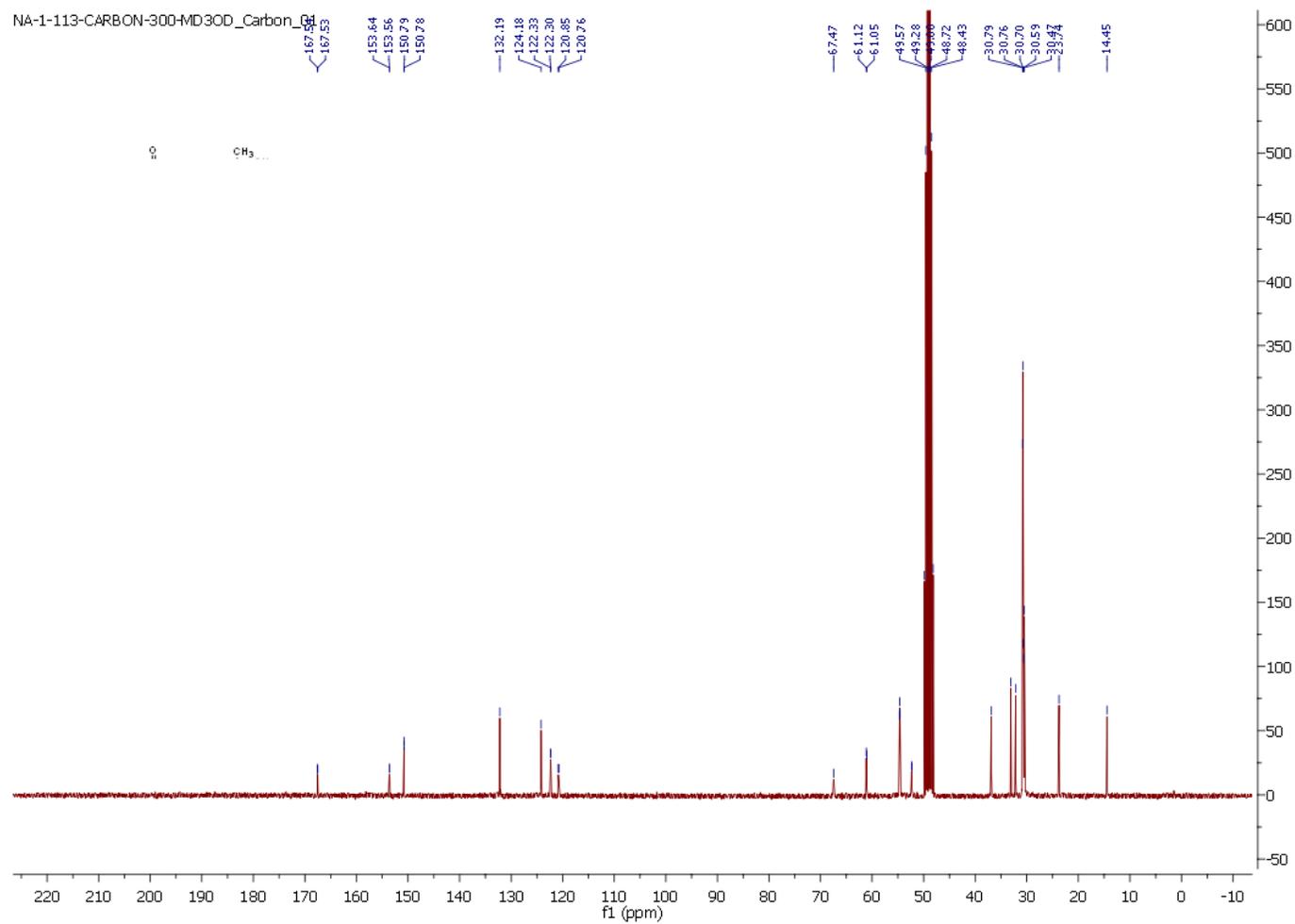
NA-1-113-new-MF 600-MD3OD  
STANDARD PROTON PARAMETERS

4

5

6

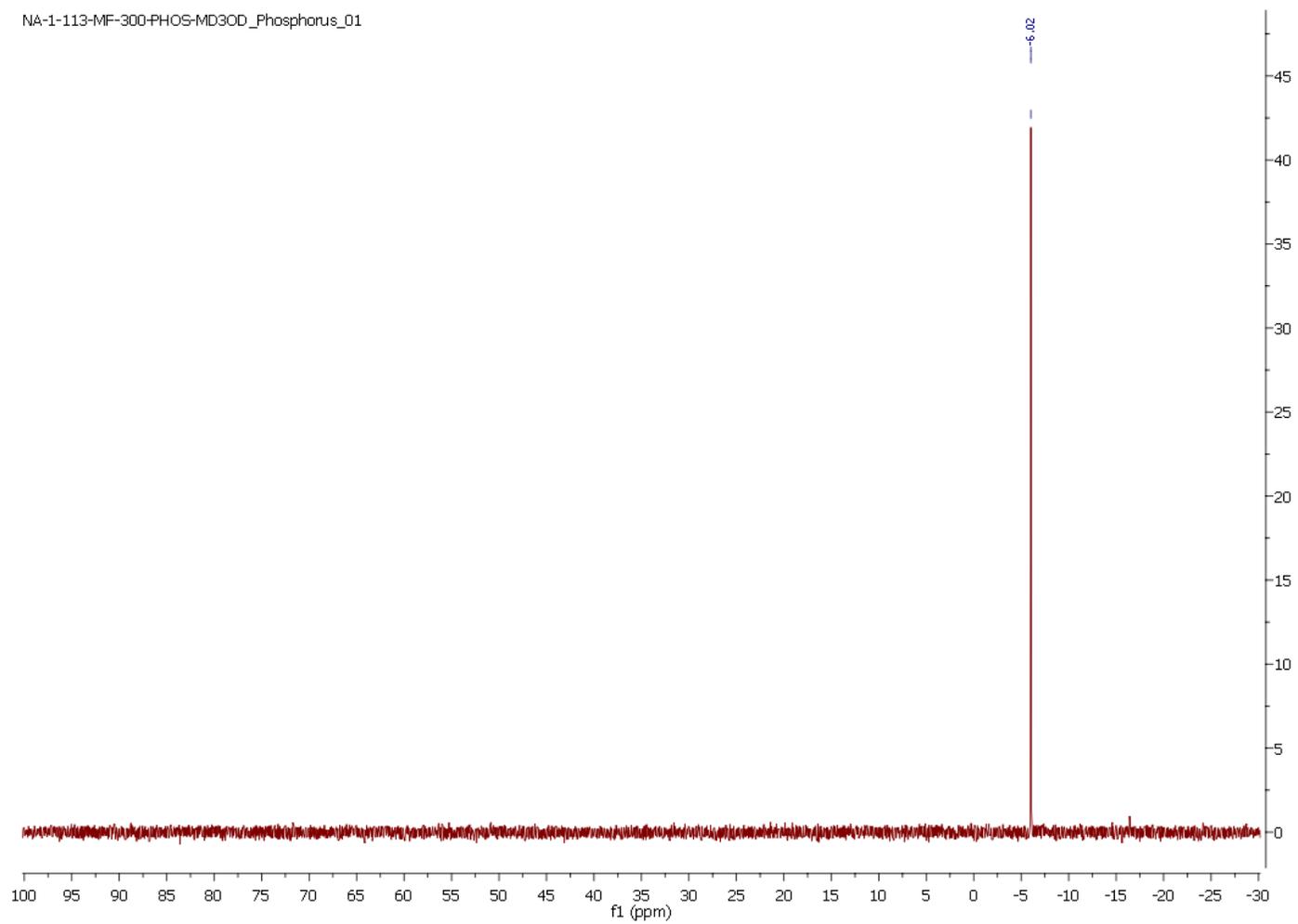


1 ANEXO 38 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LD303 (23)

2

# 1 ANEXO 39 – Espectro de RMN de $^{31}\text{P}$ (121 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LD303 (24)

NA-1-113-MF-300-PHOS-MD3OD\_Phosphorus\_01



2

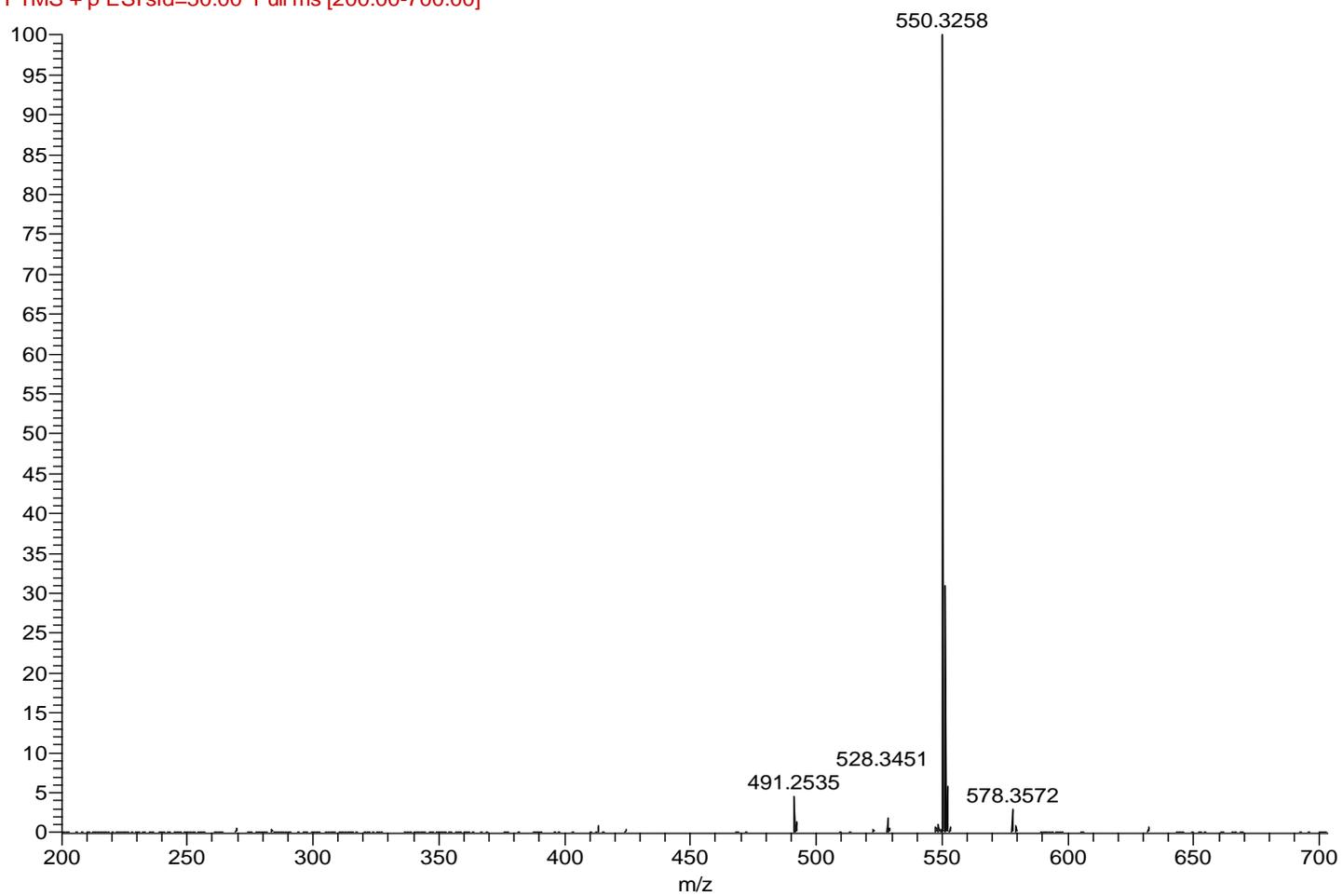
3

## 1 ANEXO 40 – Espectro de Massas - ESI-MS – LDT303 (24)

2

3

NA\_1\_113 #348-397 RT: 4.03-4.16 AV: 14 NL: 1.20E8  
F: FTMS + p ESI sid=50.00 Full ms [200.00-700.00]



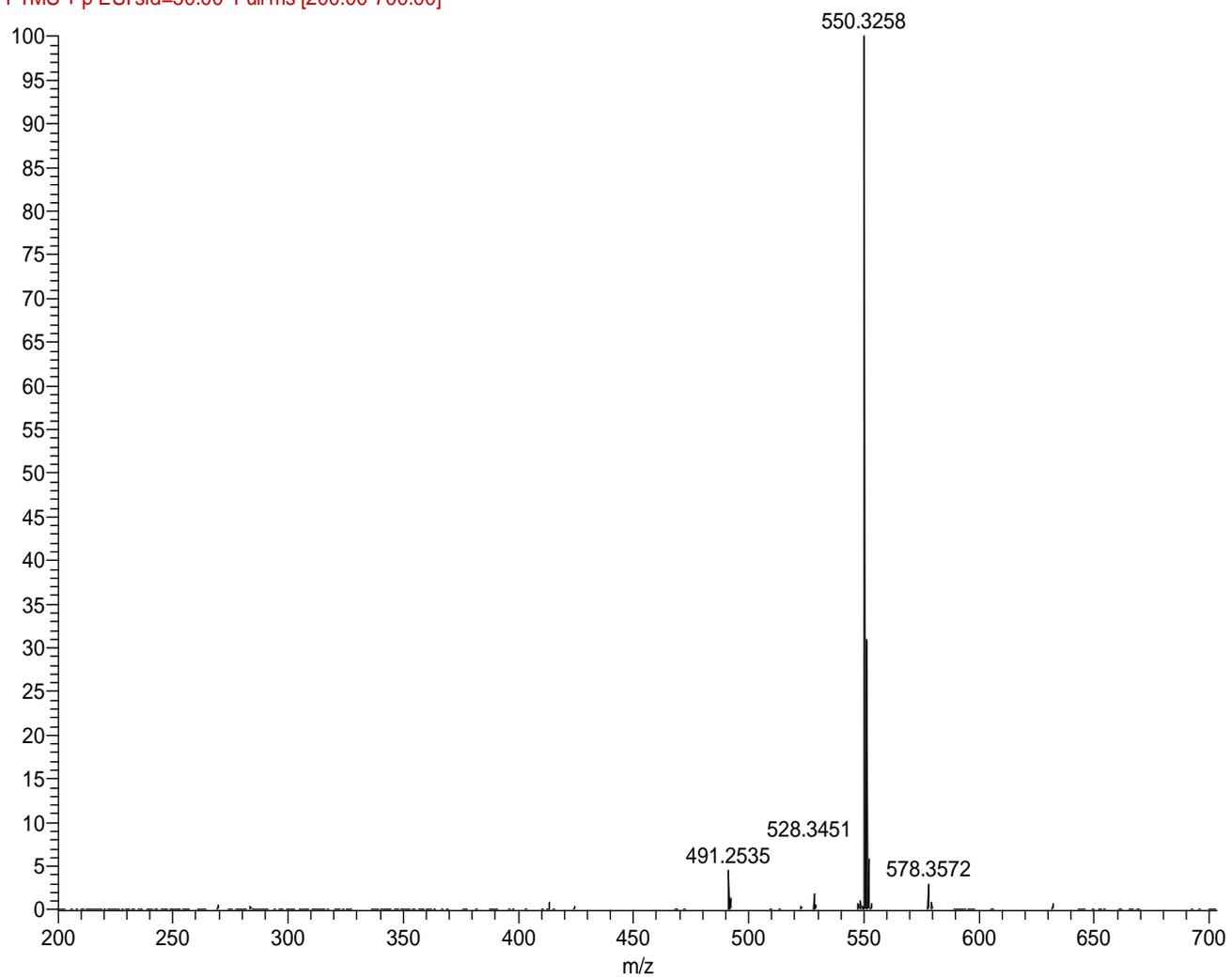
## 1 ANEXO 41 – Espectro de Massas - ESI-HRMS – LDT303 (23)

2

NA\_1\_113 #348-397 RT: 4.03-4.16 AV: 14 NL: 1.20E8

3

F: FTMS + p ESI sid=50.00 Full ms [200.00-700.00]

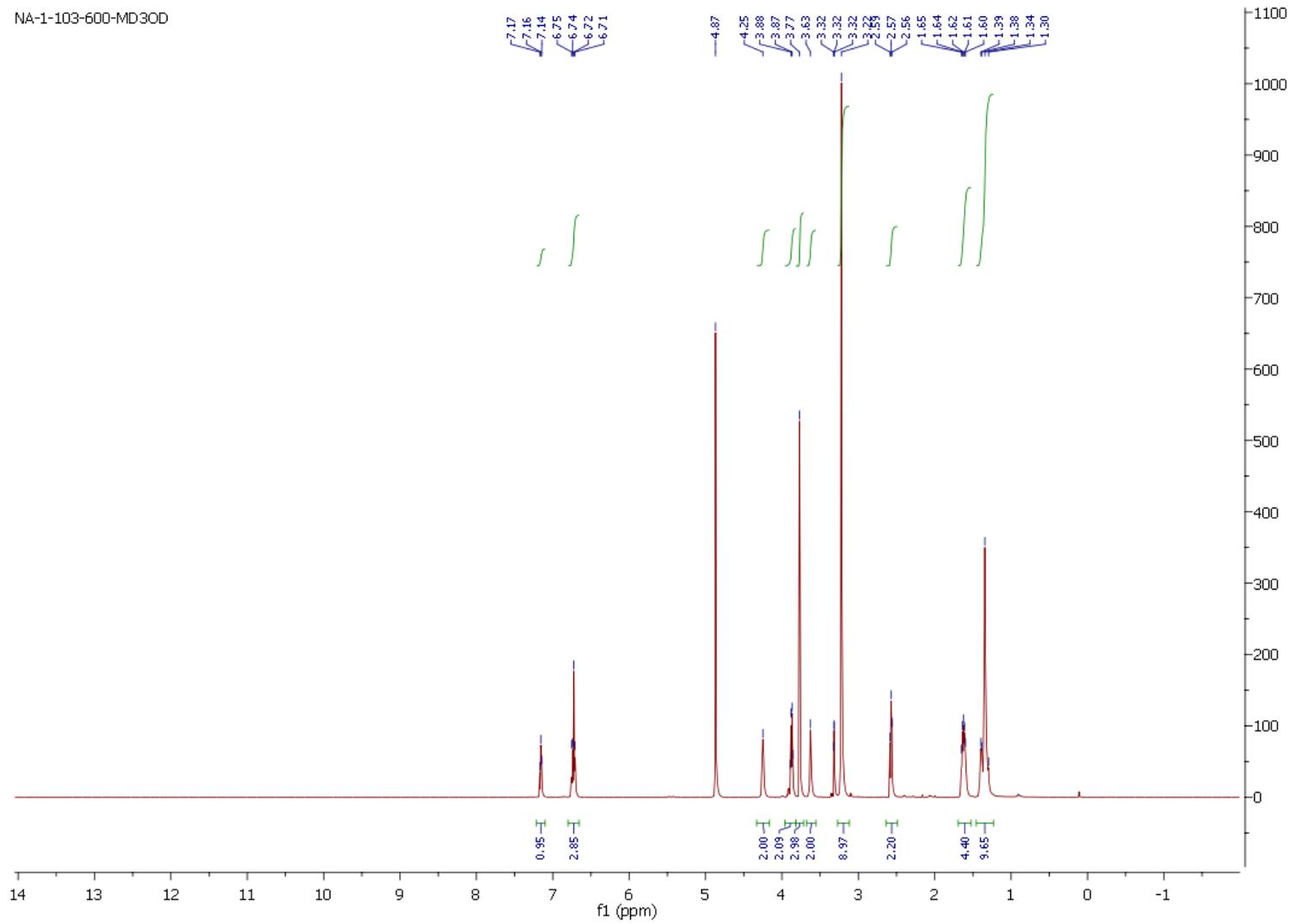


1 ANEXO 42 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LDT304 (24)

2

3

4

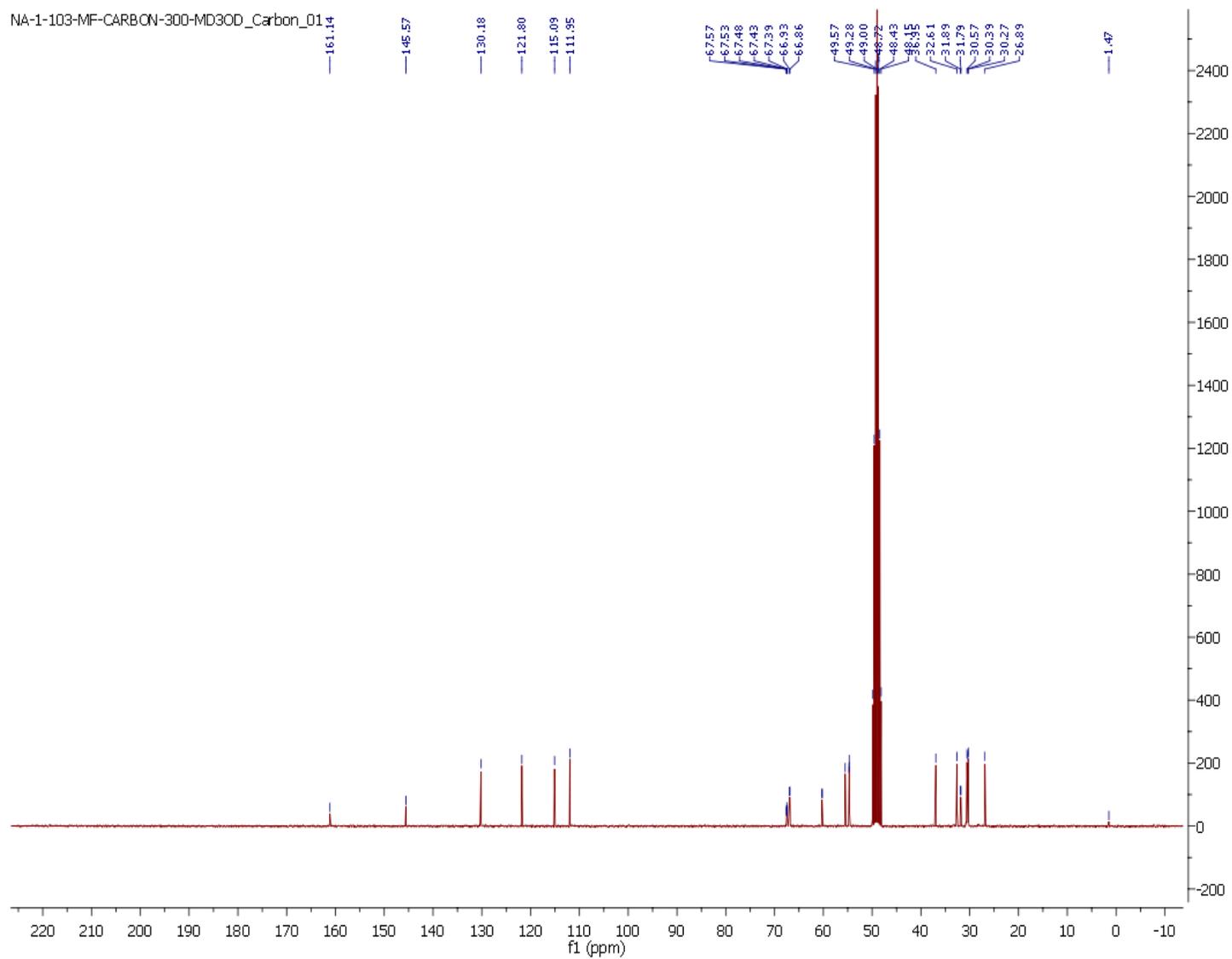


1 ANEXO 43 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LD304 (24)

2

3

4



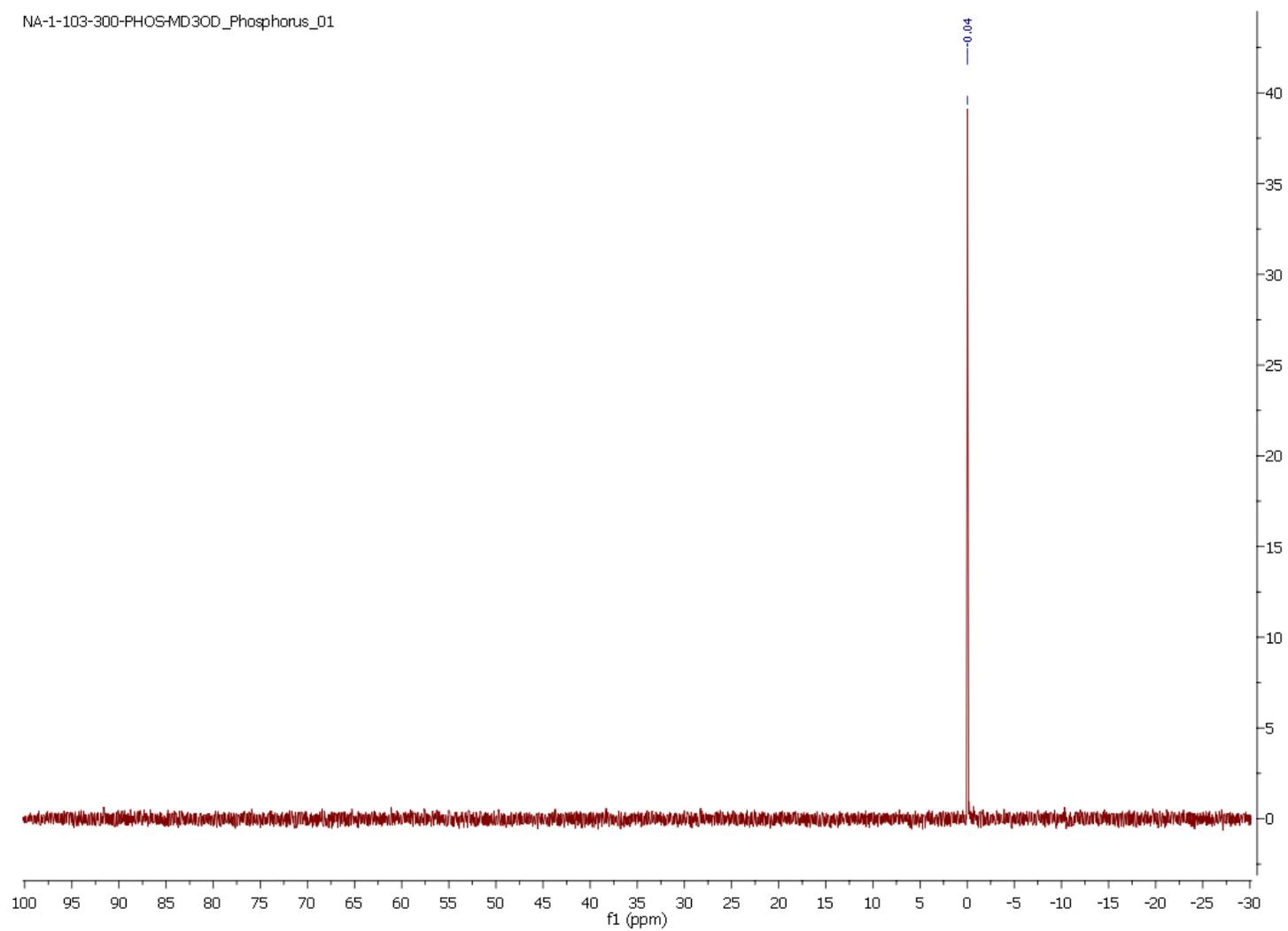
1 **ANEXO 44 – Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  (121 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LD304 (24)**

2

NA-1-103-300-PHOS-MD3OD\_Phosphorus\_01

3

4



1

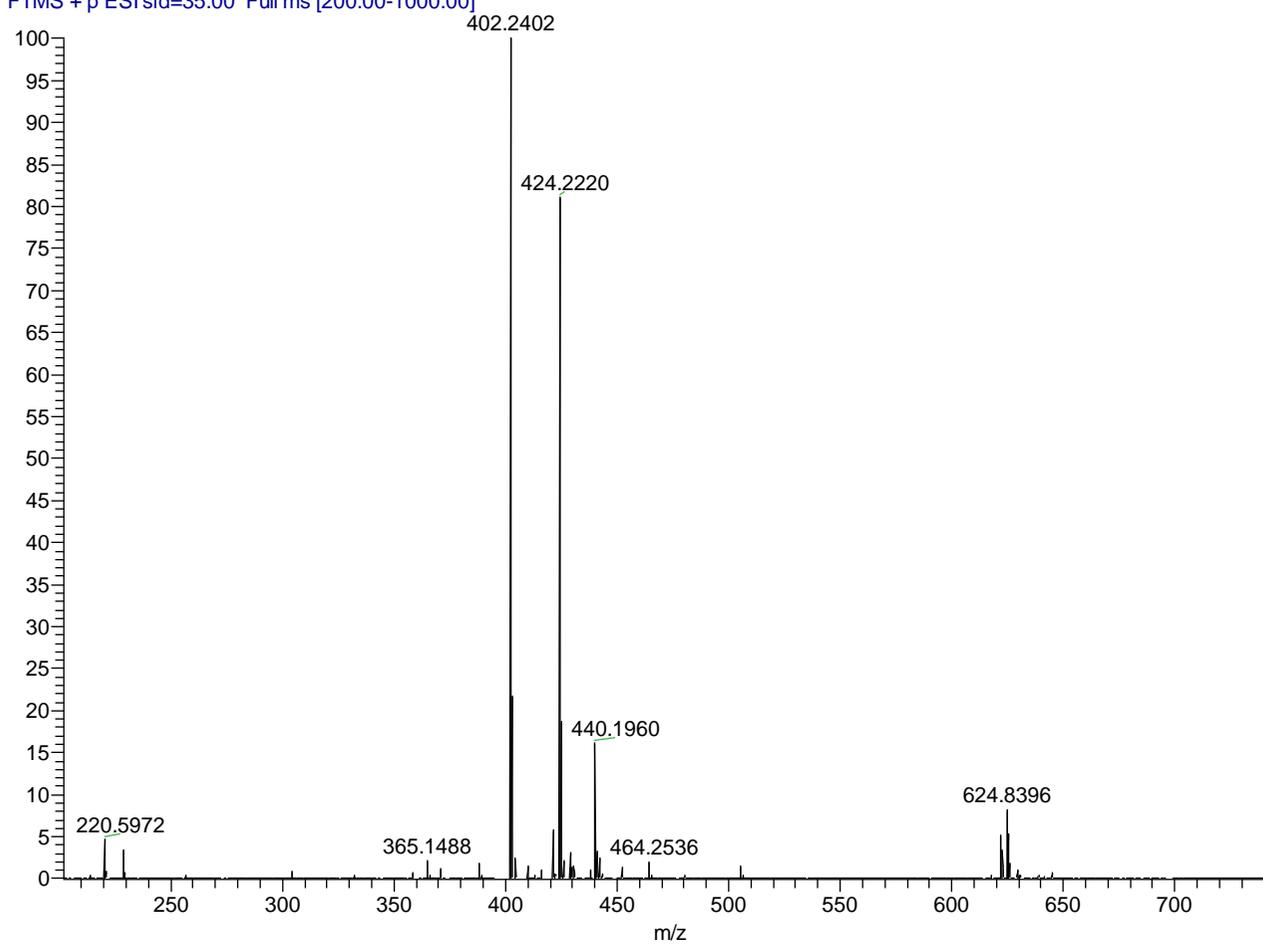
2 **ANEXO 45 – Espectro de Massas - ESI-HRMS – LDT304 (24)**

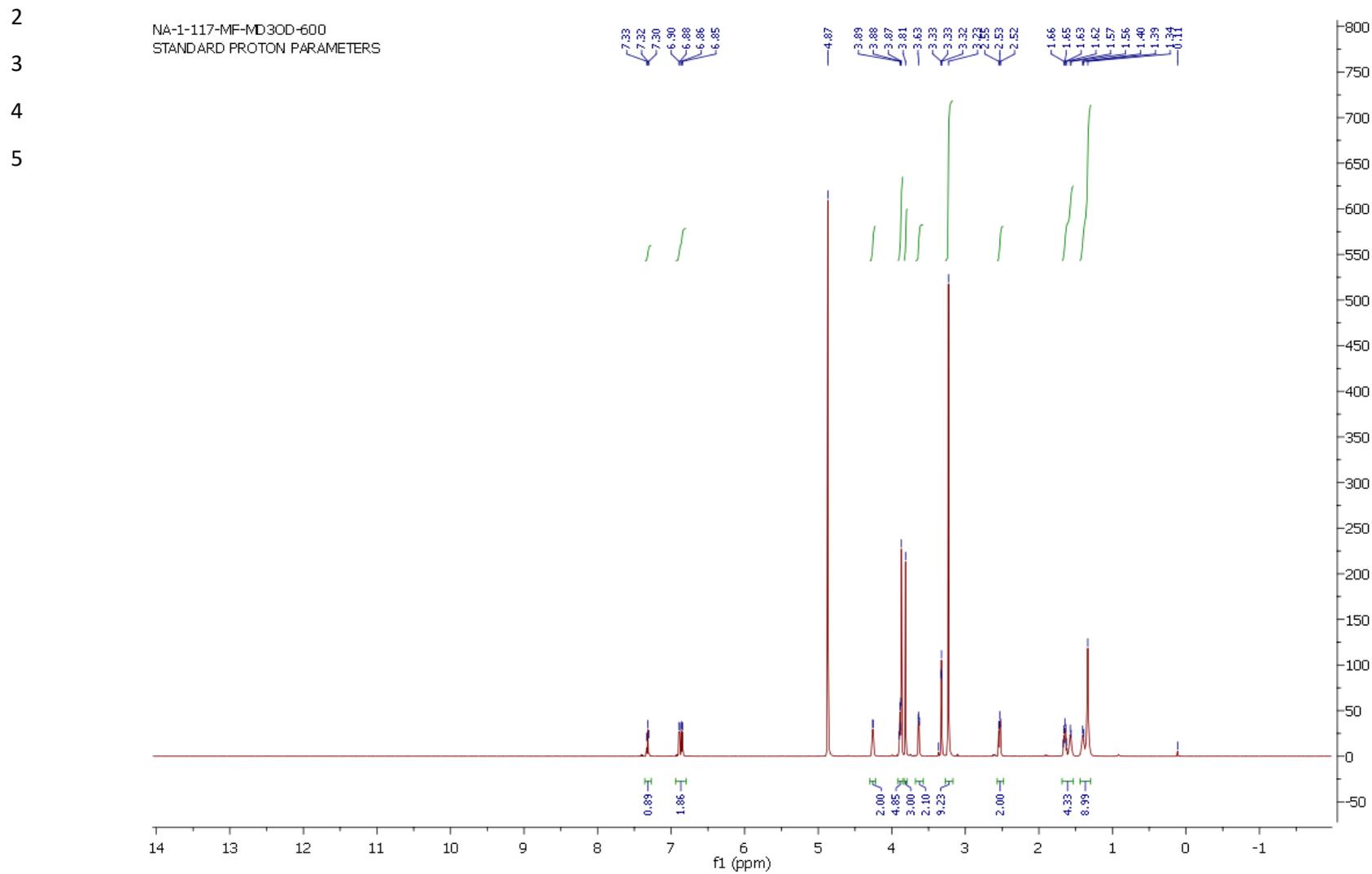
3

NA\_1\_103 #21 RT: 0.20 AV: 1 NL: 6.76E7  
T: FTMS + p ESI sid=35.00 Full ms [200.00-1000.00]

4

5



1 ANEXO 46 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LDT305 (25)

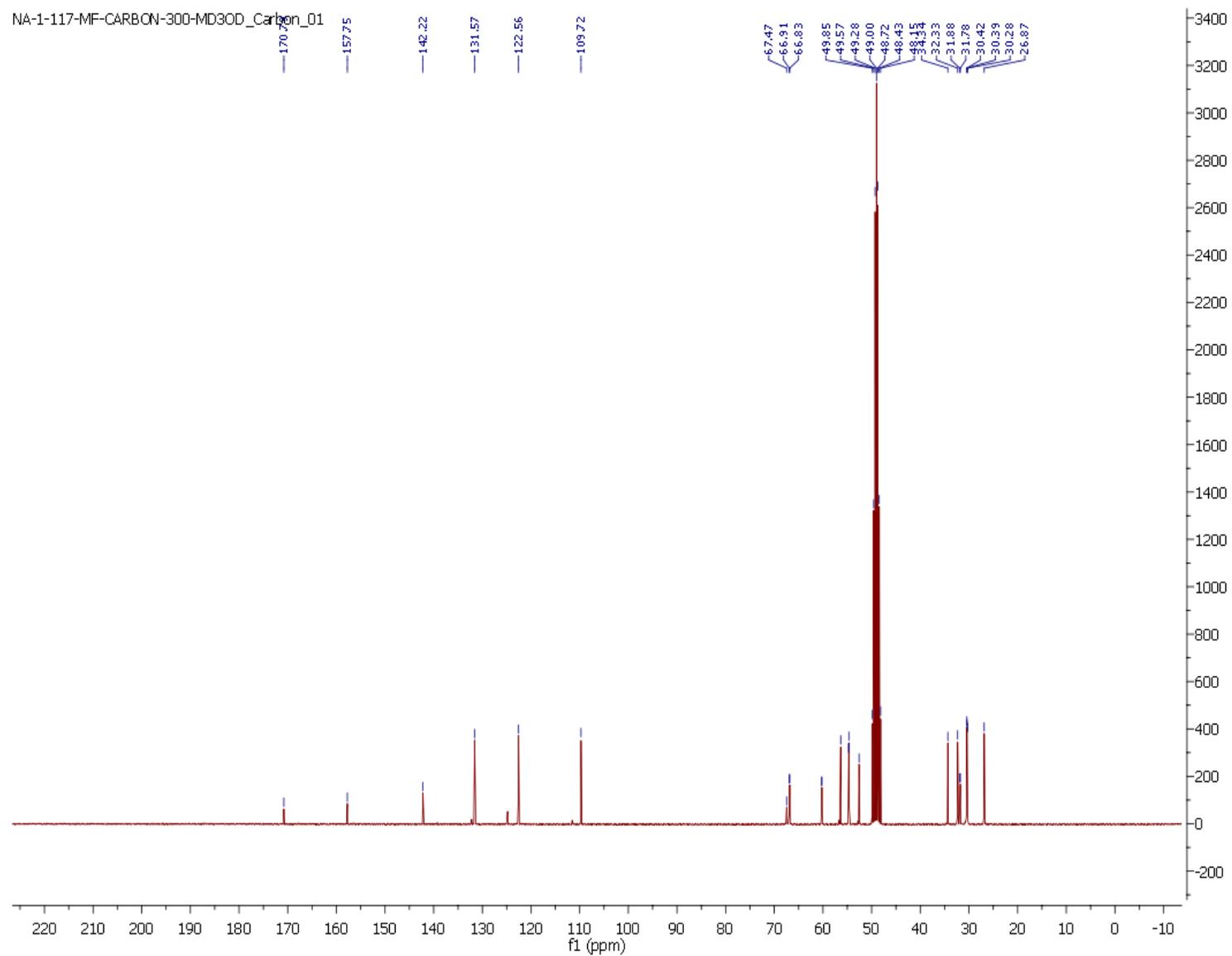
1 ANEXO 47 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LD305 (25)

2

3

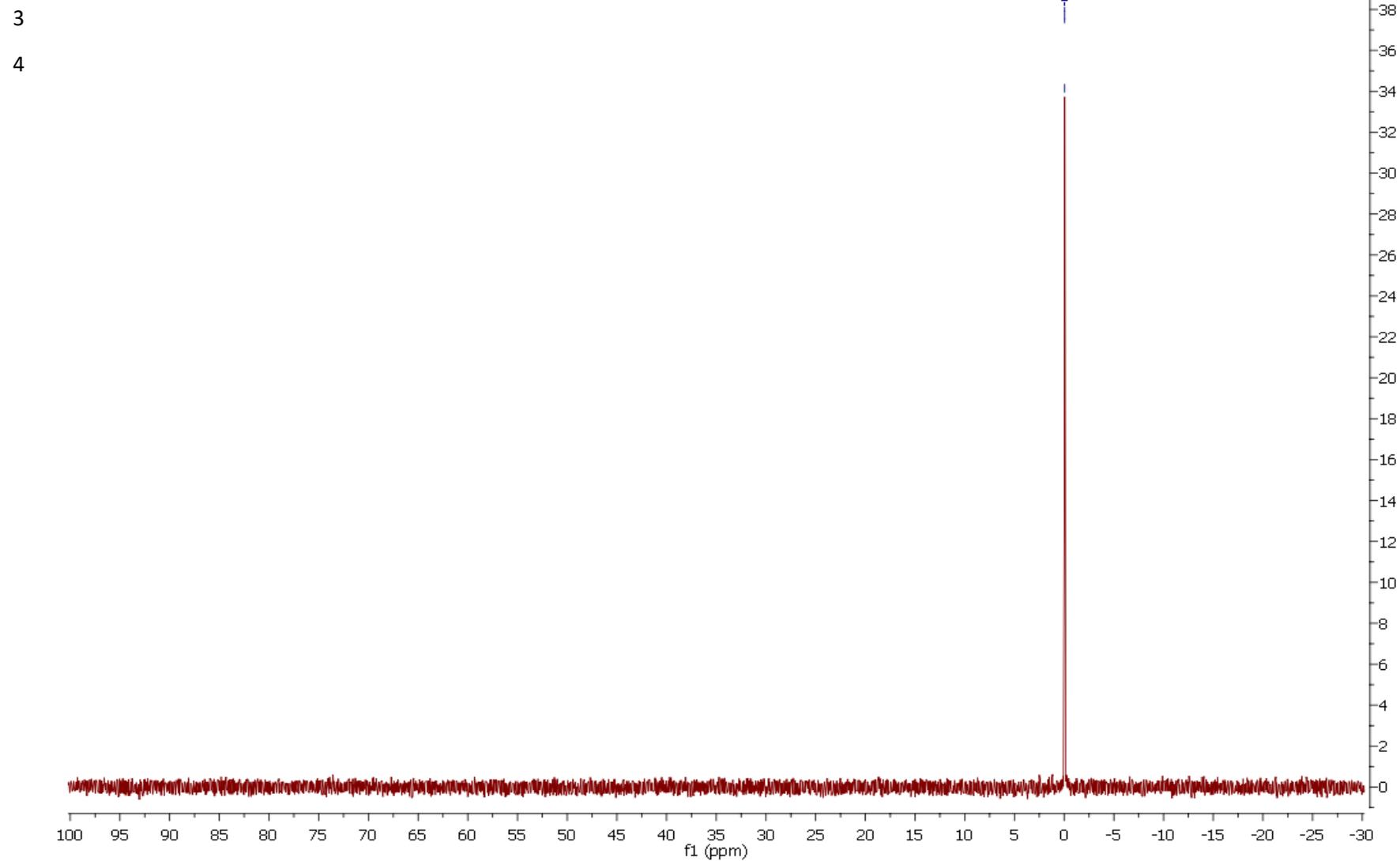
4

5



1 **ANEXO 48 – Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  (121 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – LD305 (25)**

2 NA-1-117-MF-300-PHOS-MD3OD\_Phosphorus\_01



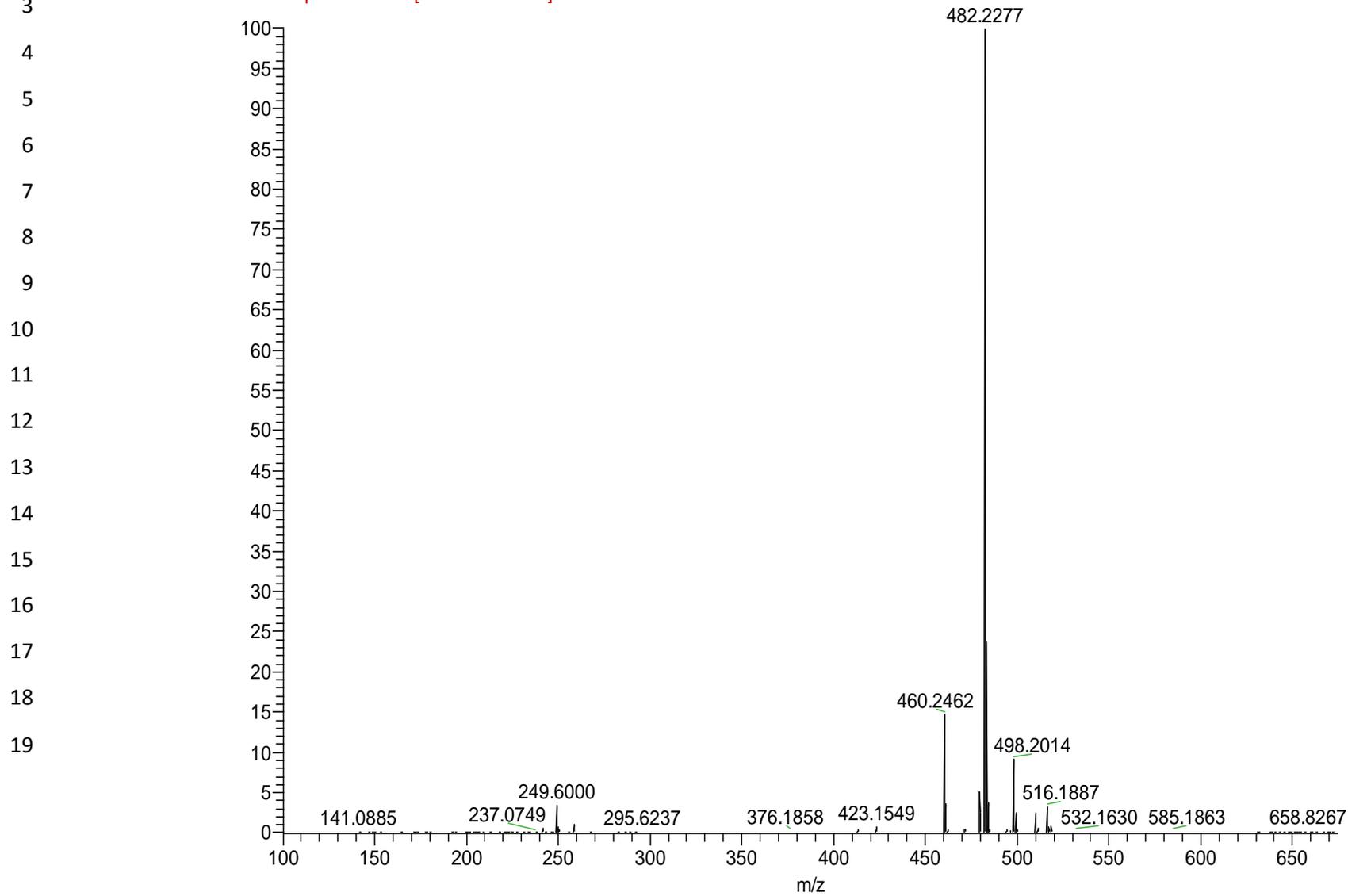
## 1 ANEXO 49 – Espectro de Massas - ESI-MS – LDT305 (25)

2

NA\_1\_117 #22-76 RT: 0.20-0.47 AV: 30 NL: 3.99E7

3

F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]



19

1