



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO - PRPEG
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

JEFFERSON ALMEIDA ROCHA

PLANEJAMENTO RACIONAL, SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO e ESTUDO *IN SILICO* DE COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTÊNIO E ALCALOIDES DE *Pilocarpus microphyllus* CONTRA A ESQUISTOSSOMOSE

TERESINA-PI
2018

JEFFERSON ALMEIDA ROCHA

PLANEJAMENTO RACIONAL, SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO e ESTUDO *IN SILICO* DE COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTÊNIO E ALCALOIDES DE *Pilocarpus microphyllus* CONTRA A ESQUISTOSSOMOSE

Trabalho referente ao exame de defesa de tese apresentado ao Programa de Pós-graduação da rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Piauí, da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

TERESINA - PI
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

R672p Rocha, Jefferson Almeida.
Planejamento racional, síntese, caracterização e estudo *in silico* de complexos metálicos de rutênio e alcaloides de *pilocarpus microphyllus* contra a esquistossomose / Jefferson Almeida Rocha. – 2018.
194 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia, Teresina, 2018.
“Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima”.

1. Biotecnologia. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Docagem molecular. 4. Epiisopiloturina. 5. Complexo de Rutênio. I. Título.

CDD 660.6

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: JEFFERSON ALMEIDA ROCHA

TÍTULO DO PROJETO: “SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, PLANEJAMENTO RACIONAL e ESTUDO IN SILICO DE COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTÊNIO E ALCALOIDES DE *Pilocarpus microphyllus* CONTRA A ESQUISTOSSOMOSE.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Josué de Moraes – USP (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Ricardo Martins Ramos - IFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 13 de março de 2018.

HORÁRIO: 14h00

LOCAL: Auditório do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células - tronco (NUPCelt/UFPI)

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Á **Deus**, pela saúde, coragem, determinação e equilíbrio que me concedeu.

A meus familiares, minha esposa **Letícia Nara Rocha**, por total amor, apoio e motivação durante toda a trajetória do curso. A meus pais **Jose Rocha** e **Deusa Rocha**, por todo o amor envolvido, e a minha irmã **Jessica Rocha** pelas boas vibrações.

A meu orientador e amigo, prof. **Francisco Lima**, que foi um grande mestre, sempre disposto a colaborar qual hora do dia ou da noite, sempre perseverante e motivador com cada resultado alcançado durante todo o processo.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí - UFPI, e a Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO por possibilitar a realização do Curso de Doutorado.

À Universidade Estadual do Piauí – UESPI, em especial ao grupo de pesquisa em química quântica computacional e planejamento de fármaco – GPQQCPF por conceder apoio às atividades experimentais.

À Universidade Federal do Maranhão – UFMA, A secretaria do estado do Maranhão e a Fundação de Amparo e Pesquisa do Maranhão – FAPEMA, por conceder a bolsa de estudos tão fundamental para a realização do projeto e grande incentivo a qualificação de seus docentes.

À Universidade Federal do Ceará – UFC, na pessoa do prof. Dr. Luiz Gonzaga e o aluno Edinilton Muniz que foram nossos grandes colaboradores para o processo de síntese dos complexos do trabalho.

Ào Instituto Federal do Piauí – IFPI e ao grupo de pesquisa LAPESI, coordenador pelo prof. Dr. Ricardo Ramos que nos auxiliou nos testes *in silico* de docagem e dinâmica molecular.

À Universidade de Guarulhos – UNG, em especial ao núcleo de pesquisa em doenças negligenciadas – NPDN coordenados pelo prof. Dr. Josué de Moraes e ao aluno Marcos Paulo, no qual foram nossos colaboradores para os testes experimentais contra a esquistossomose.

Aos professores e incentivadores na orientação sempre dispostos a ajudar, prof. Dr. Jose Roberto Leite e prof^a. Dra. Ionara Passos.

Aos professores colaboradores na qualificação e na defesa, prof. Dr. Benedito Borges, Prof. Dr. Fernando Aécio Carvalho, Prof. Dr. Daniel Arcanjo e Prof. Dr. Anderson Mendes.

Aos amigos que fizemos durante essa caminhada no laboratório de química computacional, Nayra Rego, Ivan Silva, Antônio Sousa, Rayla, Rudielson, Mayrla, Kayo, Penina e todos os outros.

Aos amigos do curso do doutorado, Alessandra Ribeiro, Everton, Karla, Lucio, Suzana, Carla, Marcelo, Torequi e todos os outros.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

Resumo

ROCHA, J. A. **Planejamento racional, síntese, caracterização e estudo *in silico* de complexos metálicos de rutênio e alcaloides de *Pilocarpus microphyllus* contra a esquistossomose**. Orientador: Professor Doutor Francisco da Chagas Alves Lima. 2018. 194p. Tese - Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença causada pelo parasita *Schistosoma mansoni* que tem acometido milhares de pessoas em todo o mundo. Além disso, o único medicamento utilizado como tratamento não tem eficácia contra as formas jovens do parasita. A química computacional tem trazido novas ferramentas que predizem propriedades moleculares relacionadas a um potencial farmacológico. Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo químico computacional e planejamento racional de complexos metálicos de rutênio e alcaloides de *Pilocarpus microphyllus* contra *Schistosoma mansoni*. Inicialmente realizou-se uma prospecção tecnológica e científica nas bases de patentes INPI, EPO, USPTO e DII, e artigos científicos nas bases *Scielo*, *Pubmed*, *Bireme*, *Scopus*, *Web of Science* e *Science Direct*, até o ano de 2016. Para os cálculos computacionais foram avaliadas as propriedades geométricas, eletrônicas, cargas atômicas, bem como as propriedades vibracionais e termodinâmicas das moléculas epiisopiloturina (EPI), epiisopilosina (EPIIS), isopilosina (ISOP), pilosina (PILO) e macaubina (MAC), utilizando os modelos teóricos (B3lyp/sdd, B3lyp/6-31+g**, B3lyp/6-311++g**). As mesmas propriedades computacionais foram aplicadas aos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl], *trans*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl], *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂], *trans*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂] bem como suas possíveis variações utilizando o modelo B3lyp/sdd. As predições de ADMET foram aplicadas para obtenção das propriedades farmacocinéticas dos alcaloides e dos complexos de rutênio. Após a “otimização”, as moléculas foram submetidas a cálculos de docagem molecular com as enzimas PNP, MTAP, ARG, UP, HDAC8, TGR e 2CB1 com os respectivos códigos PDB: 3qsd, 4q3p, 4cqf, 4l5a, 1tcu, 2v6o, 4txh, possíveis alvo de *S. mansoni*. Após esse prévio estudo computacional, duas variações do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl] (EPIRUCLN e EPIRUCLO) e o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂] (EPIRUNO₂) foram sintetizados para a realização da atividade anti-schistosoma *ex vivo*. Para o estudo prospectivo não se encontrou publicações com os termos “ruthenium complex and epiisopiloturine” e não se encontrou nenhuma patente relacionada aos termos “ruthenium complex and *S. mansoni*”. Foi possível confirmar a isomeria ótica entre EPIIS, ISOP e PILO e seu rearranjo através dos ângulos diedros. Os resultados termodinâmicos mostraram que a EPI e EPIIS são os isômeros mais estáveis, entretanto o ligante EPIIS obteve melhor interação com as enzimas estudadas na docagem molecular corroborando com os estudos experimentais contra esquistossomose. A mistura do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl] eliminou 100% dos vermes machos e fêmeas a uma concentração de 50 µM em 72 horas, além de reduzir atividade motora logo nas primeiras 24 horas. O complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂] eliminou 60% dos vermes machos a 50 µM em 72 horas. A formação do complexo metálico aumentou a atividade biológica anti-helmíntica em 10 vezes a partir do alcaloide EPI, mostrando que esse complexo poderá ser novo candidato a fármaco contra a esquistossomose.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, epiisopiloturina, complexo de rutênio, cálculos DFT, Docagem molecular.

Abstract

ROCHA, J. A. **Rational planning, synthesis, characterization and study *in silico* of ruthenium metal complexes and alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* against schistosomiasis.** Advisor: Professor Francisco da Chagas Alves Lima. 2018. 194p. Thesis - Post-graduation in Biotechnology, Northeast Network of Biotechnology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí.

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is a disease caused by the parasite *Schistosoma mansoni* that has affected thousands of people around the world, moreover, the unique medicine used as treatment has resistance. Computational chemistry has brought new tools that predict molecular properties related to a pharmacological potential. This work aimed at a computational chemical study and rational planning of ruthenium metal complexes and alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* against schistosomiasis. Initially, a research and research in the patent bases INPI, EPO, USPTO and DII, and scientific articles in the databases *Scielo*, *Pubmed*, *Bireme*, *Scopus*, *Web of Science* and *Science Direct*, will be carried out until 2016. The alkaloids epiisopiloturina (EPI), epiisopilosine (EPIIS), isopilosine (ISOP), pilosine (PILO) and macaubine (MAC), using theoretical models computational (B3lyp/Sdd, B3lyp/6-31+g**, B3lyp/6-311++g**). As a computational property for the complex *cis*-Ru(bpy)₂(Epi)Cl], *trans*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl], *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂], *trans*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂]. The ADMET predictions were applied to obtain pharmacological and pharmacological properties of alkaloids and ruthenium complexes. After an "optimization", the molecules were submitted to molecular docking calculations with PNP, MTAP, ARG, UP, HDAC8, TGR and 2CB1 enzymes with the main PDB codes: 3qsd, 4q3p, 4cqf, 4l5a, 1tcu, 2v6o, 4txh, possible target of *S. mansoni*. After this previous computational study, two variations of the *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl] complex and *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂] complex were synthesized for *ex vivo* anti-schistosome activity. For the prospective study no publications were found with the terms "ruthenium complex and epiisopiloturine" and no patent was found relating to the terms "ruthenium complex and *S. mansoni*". It was possible to confirm an optical isomerism between EPIIS, ISOP and PILO and their rearrangement through the dihedral angles. The results are modified as an EPI and EPIIS are the most diverse as well as the EPIIS get better interaction with the enzymes studied in molecular docking corroborating with the experimental studies against schistosomiasis. The synergism of the *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl] (EPIRUCLN and EPIRUCLN) complex eliminated 100% of male and female worms at a concentration of 50 µM in 72 hours, as well as the second motor activity in the first 24 hours. The *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂] (EPIRUNO2) complex removes 60% of male worms at 50 µM in 72 hours. The formation of the metal complex from the EPI alkaloid increased its biological activity by 10-fold, showing that this complex may be a new drug candidate against schistosomiasis.

Key words: *Schistosoma mansoni*, epiisopiloturine, ruthenium complex, DFT calculations, Molecular docking.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1:** Fêmea e macho adultos de *Schistosoma mansoni*.....31
- Figura 2:** Ciclo de vida do gênero *Schistosoma*.....32
- Figura 3:** Países no mundo que requerem a implementação da quimioterapia preventiva contra a esquistossomose até o ano de 2015.....34
- Figura 4:** Número de pessoas tratadas globalmente para infecções de esquistossomose em crianças de idade escolar por região da OMS, 2008-2015.....35
- Figura 5:** Quantidade de praziquantel doada à OMS ou prometida por parceiros, 2012-2017.....35
- Figura 6:** Distribuição da esquistossomose (a), de acordo com a faixa de positividade e distribuição espacial dos hospedeiros intermediários (b) da esquistossomose por município no Brasil de 2010 a 2015.....37
- Figura 7:** *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew (Rutaceae)39
- Figura 8:** 2,2'-bipiridina de Ru (II). a) cis-Ru(bpy)₂Cl₂, b) cis-Ru(bpy)₂NO₂, c) trans-Ru(bpy)₂Cl₂ e d) trans-Ru(bpy)₂NO₂.....43

CAPÍTULO I

- Figura 1:** Artigos publicados com o termo “ruthenium complex” e “*Schistosoma mansoni*” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.....56
- Figura 2:** Maiores afiliações no ranking de artigos publicados com o termo “ruthenium complex” e “*Schistosoma mansoni*” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.....57
- Figura 3:** Países com maior ranking de publicações com o termo “ruthenium complex” e “*Schistosoma mansoni*” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.....58
- Figura 4:** Áreas de publicação com o termo a) “ruthenium complex” e b) “*Schistosoma mansoni*” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.....58

Figura 5: Artigos publicados com os termos “epiisopiloturine” e “*Schistosoma mansoni* and epiisopiloturine” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.....59

Figura 6: Países com maior ranking de publicações com o termo “epiisopiloturine” e “*Schistosoma mansoni* and epiisopiloturine” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.....60

Figura 7: Quantidade de enzimas depositadas no banco de dados do Prontein Data Bank (PDB) com o termo *Schistosoma mansoni* até o ano de 2016.....62

Figura 8: Resolução da difração de raios-X das enzimas no banco de dados do Prontein Data Bank (PDB) com o termo *Schistosoma mansoni* até o ano de 2016..64

Figura 9: Anos de publicação das enzimas no banco de dados do Prontein Data Bank (PDB) com o termo *Schistosoma mansoni* até o ano de 2016.....65

Figura 10: Classificação das Enzimas no banco de dados do Prontein Data Bank (PDB) com o termo *Schistosoma mansoni* até o ano de 2016.....65

CAPÍTULO II

Figura 1: Estruturas químicas “otimizadas” dos alcaloides. a) EPI, b) EPIIS, c) ISOP, d) PILO e e) MAC.....77

Figura 2: Energias relativas em (kcal mol⁻¹) dos alcaloides isômeros da epiisopiloturina pelos modelos teóricos B3lyp/sdd, B3lyp/6-31+G** B3lyp/6-311++G**. a) EPI, b) EPIIS, c) ISOP e d) PILO.....81

Figura 3: Gráfico dos Orbitais Moleculares HOMO e LUMO dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++G**82

Figura 4: Orbital Molecular HOMO e LUMO em (eV) dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC, utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++g**. Vermelho é mais negativo e o verde mais positivo.....83

Figura 5: Espectro de UV-Vis dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++G**84

Figura 6: Espectro de Infravermelho e Raman dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando o modelo teórico b3lyp/6-311++G**. a) IR dos cinco alcaloides, b) Zoom do maior pico de IR, c) Raman dos cinco alcaloides e d) Zoom do maior pico de Raman.....85

Figura 7: Densidade eletrônica dos alcaloides. a) EPI, b) EPIIS, c) ISOP, d) PILO e e) MAC, utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++G**. As cores representam as cargas eletrônicas: vermelha (negativo) e azul (positivo).....88

Figura 8: Docagem molecular do alcaloide EPIIS com a enzima UP de *S. mansoni*. a) Diagrama Ligplot 2D que mostra as pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas no complexo EPIIS-UP. b) Estrutura global representado em ribbons as interações por pontes de hidrogênio (Gln201, Met231 e Arg203) em EPIIS. c) Estrutura global do complexo UP/EPIIS. UP representado em superfície e EPIIS em varetas na região do sítio ativo.....97

Figura 9: Docagem molecular mostrando o sítio ativo da enzima TGR com os alcaloides e suas interações por ponte de hidrogênio a) EPI, b) EPIIS, c) ISOP, d) PILO e e) MAC.....98

CAPÍTULO III

Figura 1: Formas moleculares de ligação do complexo EPIRUCCL-*cis*. a) I - EPIRUCCLNC, b) II - EPIRUCLO1C, c) III - EPIRUCLO2C, d) IV – EPIRUCLOO2C e do complexo EPIRUCCL-*trans* e) V – EPIRUCLO1T, f) VI - EPIRUCCLNT, g) VII – EPIRUCLO2T e h) VIII – EPIRUCLO3T.....114

Figura 2: Gráfico dos Orbitais Moleculares HOMO e LUMO das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCCL-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCCL-*trans*.....119

Figura 3: Espectro de UV-Vis das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCCL-*cis* (a) e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCCL-*trans* (b).....120

Figura 4: Orbitais Moleculares HOMO e LUMO das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCCL-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCCL-*trans*.....123

Figura 5: Espectro de Infravermelho (IR) das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCCL-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCCL-*trans*.....124

Figura 6: Densidade eletrônica das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCCL-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCCL-*trans*.....128

Figura 7: Formas moleculares de ligação do complexo EPIRUCCL-*cis* e EPIRUCCL-*trans* a) IX – EPIRUCCL2NC, b) X - EPIRUCCL2NT, c) XI – EPIRUCCL2O1C, d) XII – EPIRUCCL2O1T, e) XIII – EPIRUCCL2O2C, e f) XIV - EPIRUCCL2O2T.....129

CAPÍTULO IV

- Figura 1:** Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl] (PF₆).....138
- Figura 2:** Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)(NO₂)] (PF₆).....139
- Figura 3:** Estruturas químicas tridimensionais do alcaloide EPI (a) e dos complexos metálicos EPIRUCLO (b), EPIRUCLN (c) e EPIRUNO₂ (d).....143
- Figura 4:** Gráfico dos Orbitais Moleculares E_{HOMO} e E_{LUMO} do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLN, EPIRUCLO e EPIRUNO₂.....146
- Figura 5:** Espectro de UV-vis (em nm) teórico (T) e experimental (E) do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO₂.....147
- Figura 6:** Orbitais Moleculares E_{HOMO} e E_{LUMO} dos complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO₂.....149
- Figura 7:** Espectro de Infravermelho (IR) experimental (E) e teórico (T) dos compostos EPIRUCLO (a), EPIRUCLN (a), EPIRUNO₂ (b) e EPI (c).....150
- Figura 8:** Densidade eletrônica dos compostos EPI (a), BIPY (b) EPIRUCLO (c), EPIRUCLN (d) e EPIRUNO₂ (e).....152
- Figura 9:** Docagem molecular em 3D do complexo enzima-ligante com a proteína PNP com os ligantes: EPI (a), EPIRUCLN (b), EPIRUCLO (c) e EPIRUNO₂ (d), ilustrando o sítio ativo de ligação com as respectivas interações por ponte de hidrogênio.....161
- Figura 10:** MEV mostrando o tegumento dorsal dos vermes *S. mansoni*. a) Controle; seguindo com os vermes tratados com b) 100 μM de EPI; c) 100 μM de EPIRUCLsineg e d) 100 μM de EPIRUNO₂. As barras de escalas nas imagens principais representam 20 μm e nas inseridas 5 μm.....164

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Tabela 1:** Prevalência global e mortalidade de doenças negligenciadas.....33
- Tabela 2:** Número de casos de esquistossomose na área não endêmica, por UF no Brasil de 2006 a 2015.....38
- Tabela 3:** Sumário de estruturas avaliadas e informações biológicas dos alcaloides imidazólicos de *P. microphyllus*41

CAPÍTULO I

- Tabela 1:** Artigos Científicos publicados nos bancos de dados *Scielo*, *Bireme*, *Pubmed*, *Science direct*, *Scopus* e *Web of Science*, com os termos “ruthenium complex”, “*Schistosoma mansoni*” e “epiisopiloturine” até o ano de 2016.....55
- Tabela 2:** Patentes registradas nas bases de dados INPI, USPTO, EPO e DII, utilizando os termos “ruthenium complex”, “*Schistosoma mansoni*” e epiisopiloturine até o ano de 2016.....61
- Tabela 3:** Código das enzimas depositadas no banco de dados do Prontein Data Bank (PDB) com o termo *Schistosoma mansoni* até o ano de 2016.....63

CAPÍTULO II

- Tabela 1:** Cargas atômicas (em unidades atômicas, a.u) pelos métodos Mulliken, Chelpg e NBO dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC. utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++g**.....72
- Tabela 2:** Distâncias das ligações atômicas (em Angstroms, Å), ângulos atômicos e ângulos diedros (Graus) dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando o modelo teórico b3lyp/6-311++g**.....80
- Tabela 3:** Principais atribuições de picos do espectro eletrônico, energia e tipos. Calculados pelo Swizard, das formas moleculares EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC. Legenda: TC=Transferência de carga, I=Imizadol, D=dihydrofurano, B=Benzeno....83
- Tabela 4:** Frequências espectroscópicas de Infravermelho (cm^{-1}) dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC e suas atribuições utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++G**87
- Tabela 5:** Perfil ADMET dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC.....91

Tabela 6: Parâmetros de afinidade de docagem molecular dos alcaloides epiisopiloturina (EPI), epiisopilosina (EPIIS), isopilosina (ISOP), pilosina (PILO) e macaubina (MAC) com enzimas do <i>Schistosoma mansoni</i>	95
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1: Densidade de cargas atômicas calculadas pelo método NBO do alcaloide EPI e das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCL-cis e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCL-trans.....	109
---	-----

Tabela 2: Distâncias (em Å) e ângulos (em graus) das ligações atômicas das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCL-cis e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCL-trans.....	117
---	-----

Tabela 3: Orbitais Moleculares HOMO e LUMO das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCL-cis e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCL-trans.....	118
---	-----

Tabela 4: Principais atribuições de picos do espectro eletrônico, energia e tipos. Calculados pelo Swizard, das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCL-cis e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCL-trans.....	121
--	-----

Tabela 5: Frequências espectroscópicas de Infravermelho das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCL-cis e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCL-trans.....	125
--	-----

Tabela 06: Energias eletrostáticas em (Hartree) Energia ponto zero (HF), Térmica (ΔT), Entalpia (ΔH), Energia livre de Gibbs (ΔG), Momento dipolo (μ -debye), Entropia - S (Cal/Mol Kelvin) das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCL-cis e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCL-trans.....	126
---	-----

CAPÍTULO IV

Tabela 1: Densidade de cargas atômicas em (u.a e^-) pelo método NBO do alcaloide EPI e dos complexos metálicos EPIRUCLN, EPIRUCLO e EPIRUNO ₂ utilizando o modelo teórico B3lyp/sdd.....	137
---	-----

Tabela 2: Distâncias das ligações atômicas (em Å), ângulos atômicos e ângulos diedros (em Graus) do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLN, EPIRUCLO e EPIRUNO ₂	145
--	-----

Tabela 3: Principais atribuições de bandas do espectro eletrônico UV-Vis, energia e tipos. Calculados pelo Swizard, do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLN, EPIRUCLO e EPIRUNO ₂	141
Tabela 4: Frequências espectroscópicas de Infravermelho (cm ⁻¹) do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO ₂	151
Tabela 5: Energias eletrostáticas em (Hartree) Energia ponto zero (HF), Térmica (ΔT), Entalpia (ΔH), Energia livre de Gibbs (ΔG), Momento dipolo (μ-debye), Entropia - S (Cal/Mol Kelvin) do alcaloide EPI, Bupiridina e dos complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO ₂	153
Tabela 6: Perfil ADME-Tox do alcaloide EPI e complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO ₂	155
Tabela 7: Parâmetros de afinidade molecular dos ligantes EPI, EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO ₂ com enzimas do <i>S. mansoni</i>	159
Tabela 8: Efeito dos complexos EPIRUCLsineg e EPIRUNO ₂ contra vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni ex vivo</i>	163

Lista de Abreviaturas e Síglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2CB1	Cathepsin B1 Isotype 1
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
ARG	Arginase
BBB	Barreira hematoencefálica
<i>BIREME</i>	Biblioteca Virtual em Saúde
BPY	Bipiridina
CENAPAD	Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho
CNS	Central Nervous System
CYP	Proteína citocromo P450
DFT	<i>Density functional theory</i>
DII	<i>Derwent Innovations Index</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPI	Epiisopiloturina
EPIIS	Epiisopilosina
EPO	<i>European Patent Office</i>
FAA	Solução de formalinacética de ácido-álcool
FAPEMA	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Maranhão
GAP	Espaço de energia
HDAC8	Histone Deacetylase 8
HIA	Absorção intestinal humana
HOMO	Highest occupied molecular orbital
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
IR	Espectroscopia no infravermelho
ISOP	Isopilosina
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
MAC	Macaubina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MO	Molecular Orbitals
MTAP	Methylthioadenosine Phosphorylase
NBO	<i>Natural bond orbital</i>
OMS	Organização mundial da saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PILO	Pilosina
PNP	Purine Nucleoside Phosphorylase
RAMAN	Espectroscopia por efeito RAMAN
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
<i>SCIELO</i>	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
TC	Transferência de carga
TD-DFT	Time dependent density functional theory
TGR	Thioredoxin Glutathione Reductase
UESPI	Universidade Estadual do Piauí
UF	Unidade federativa
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UNG	Universidade de Guarulhos

UP	Puntative Uridine Phosphorylase
USP	Universidade de São Paulo
USPTO	United States Patent and Trademark Office
UV-VIS	Espectrofotometria da luz Ultravioleta-Visível
WDI	Índice mundial de drogas
WHO	<i>World Health Organization</i>

Sumário

SUMÁRIO

i.	RESUMO.....	08
ii.	ABSTRACT.....	10
iii.	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	12
iv.	LISTA DE TABELAS.....	17
v.	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	21
1.	INTRODUÇÃO.....	27
2.	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1.	A Esquistossomose.....	31
2.2.	O Jaborandi (<i>Pilocarpus microphyllus</i>).....	39
2.3.	Os Alcaloides de <i>P. microphyllus</i>	40
2.4.	Os complexos metálicos de rutênio.....	42
3.	REFERÊNCIAS.....	44
4.	CAPITULO I: Prospecção científica e tecnológica de complexos metálicos de rutênio e epiisopiloturina contra a esquistossomose.....	51
4.1.	Resumo.....	52
4.2.	Introdução.....	53
4.3.	Materiais e Métodos.....	54
4.4.	Resultados e Discussão.....	55
4.5.	Conclusão.....	66
4.6.	Referências.....	66
5.	CAPITULO II: Química quântica computacional, docagem molecular e perfil ADMET de alcaloides imidazólicos de <i>Pilocarpus microphyllus</i> com propriedades esquistossomicidas.....	70
5.1.	Resumo.....	71
5.2.	Introdução.....	72
5.3.	Materiais e Métodos.....	74
5.4.	Resultados e Discussão.....	76
5.5.	Conclusão.....	98
5.6.	Referências.....	99

6. CAPITULO III: Planejamento racional por química quântica computacional de complexos metálicos de rutênio coordenados nas formas <i>cis</i> e <i>trans</i> com epiisopiloturina, cloro e óxido nítrico.....	109
6.1. Resumo.....	110
6.2. Introdução.....	111
6.3. Materiais e Métodos.....	112
6.4. Resultados e Discussão.....	113
6.5. Conclusão.....	130
6.6. Referências.....	130
7. CAPITULO IV: Síntese, Caracterização <i>in silico</i> e avaliação da atividade anti-helmíntica de complexos metálicos de rutênio e epiisopiloturina.....	134
7.1. Resumo.....	135
7.2. Introdução.....	136
7.3. Materiais e Métodos.....	137
7.4. Resultados e Discussão.....	142
7.5. Conclusão.....	164
7.6. Referências.....	165
8. CAPITULO V: Patente: Processo de síntese e aplicação do complexo biperidimico de rutênio com epiisopiloturina contra doenças negligenciadas.....	174
9. CONCLUSÃO.....	176
10. APÊNCIDES.....	178
11. ANEXOS.....	191

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Pilocarpus microphyllus, comumente conhecida como jaborandi, é uma planta nativa da família *Rutacea*, com ocorrência nos estados do Pará, Maranhão e Piauí (PIRANI; GROppo, 2012). A partir das espécies deste gênero *Pilocarpus* já foram identificados 15 alcaloides (SANTOS; MORENO, 2004) e a maioria deles com propriedades farmacológicas ainda desconhecidas. Dentre esses alcaloides, a pilocarpina, extraída das folhas, movimentou o mercado econômico nesses três estados, onde é utilizado para produção de colírios importante em procedimentos cirúrgicos oculares e tratamento do glaucoma (BANDEIRA et al., 2010). Identificado como segundo alcaloide majoritário nesta espécie, a epiisopiloturina tem demonstrado grande potencial biotecnológico nos últimos anos, com aplicações contra a esquistossomose (VERAS et al., 2012; VERAS et al., 2013; GUIMARAES et al., 2015; CAMPELO et al., 2017), anti-inflamatória e antinociceptiva (SILVA et al., 2013) e efeito gastroprotetor (NICOLAU et al., 2017).

A esquistossomose é uma doença negligenciada causada pelo parasita trematódeo do gênero *Schistosoma*. Esta doença está registrada em 78 países afetando aproximadamente 218,2 milhões de pessoas (WHO, 2017). A infecção é prevalente em comunidades mais pobres abrangendo áreas tropicais e subtropicais. No Brasil, estima-se que 1,5 milhões de pessoas vivem em área de risco em todo o país com prevalência no Nordeste e Sudeste (SUS, 2017). O praziquantel, criado na década de 1970, é o único medicamento utilizado no controle da doença, além disso, tem demonstrado que é ineficaz contra o estágio larval do parasita e tem demonstrado resistência devido a altas concentrações profiláticas da droga, pois seu uso é feito sem um diagnóstico do estágio do verme no acometido (MORAES, 2012).

Desta forma, a química quântica computacional vem sendo utilizada como nova ferramenta, trazendo avanços na química medicinal, como o planejamento racional de fármacos, no qual os estudos em nível molecular teórico demonstram propriedades que podem evidenciar seu modo de ação e efeito biológico previamente ao desenvolvimento de novos fármacos (VIEGAS JUNIOR et al., 2006).

Aliando a criação de novas drogas, um candidato promissor seria a formação de complexos metálicos de rutênio hexacoordenados, no qual sua estrutura tridimensional permite um ajuste cinético de compostos influenciando suas propriedades químicas e farmacológicas (SOUTHAM, 2017). Os complexos de

rutênio são desenvolvidos particularmente com ligantes de relevância biológica em que o metal atua como um transportador e estabilizador para a droga atingir o seu alvo, além disso, possuem solubilidade e estabilidade em água além de baixa toxicidade (TFOUNI et al., 2012; SANTOS, 2012).

As principais justificativas que motivaram a realização deste trabalho foram devido à esquistossomose ser uma doença negligenciada que tem acometido mais de 200 milhões de pessoas em 78 países. Além disso, possui um único medicamento para o tratamento que não é totalmente eficaz contra outras formas do verme e apresenta restrições ao uso pediátrico. Alguns alcaloides de *P. microphyllus* tem demonstrado ação contra esquistossomose na literatura, e entre eles a EPI. Além disso, a formação de complexos hexacoordenado com rutênio tem sido descrita na literatura por melhorar a função biológica, diminuindo a toxicidade e aumentando a solubilidade. Nesse contexto, buscar complexar esses dois compostos com a possibilidade de obter um produto de maior eficácia contra a esquistossomose, motivou a realização deste trabalho, onde objetivou-se realizar o planejamento racional, síntese, caracterização e estudo *in silico* de complexos metálicos de rutênio e alcaloides de *P. microphyllus* contra a esquistossomose.

Os resultados são apresentados em cinco capítulos: capítulo I - Prospecção científica e tecnológica de complexos metálicos de rutênio e epiisopiloturina contra a esquistossomose, capítulo II - Química quântica computacional, docagem molecular e perfil ADMET de alcaloides imidazólicos de *P. microphyllus* com propriedades esquistossomicidas, capítulo III – Planejamento racional por química quântica computacional de complexos metálicos de rutênio coordenados nas formas *cis* e *trans* com epiisopiloturina, cloro e óxido nítrico, capítulo IV - Síntese, caracterização *in silico* e avaliação da atividade anti-helmíntica de complexos metálicos de rutênio e epiisopiloturina e o capítulo V – Patente: Processo de síntese e aplicação do complexo bipyridimico de rutênio com epiisopiloturina contra doenças negligenciadas.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Esquistossomose

A esquistossomose (também conhecida como barriga d'água ou "febre do caramujo") é uma doença parasitária causada pela infecção do verme do gênero *Schistosoma* (Figura 1). A doença é prevalente em regiões tropicais e subtropicais do mundo onde as infecções são obtidas através do contato com caramujos infectados de água doce, que servem como hospedeiros intermediários entre os hospedeiros humanos. Clinicamente, esquistossomose apresenta seis espécies que podem ser *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. guineenses*, *S. hematobium* e *S. intercalatum* (WHO 2017).

Figura 1: Fêmea e macho adultos de *Schistosoma mansoni*.

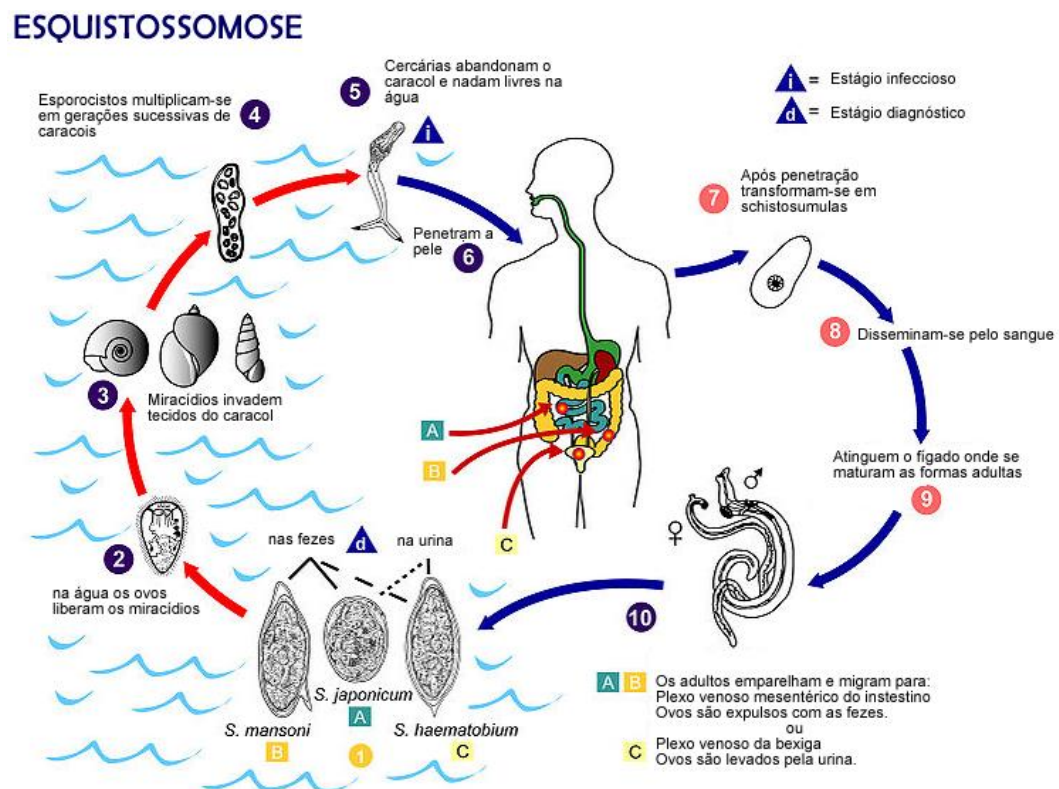


Fonte: © Dr Peter Darben, Coleção de parasitologia clínica da UTQ.

Os principais sintomas da esquistossomose intestinal são dores abdominais, diarreia e fezes sangrentas. O alargamento do fígado é comum nos casos avançados e é frequentemente associado a uma acumulação de líquido na cavidade peritoneal e hipertensão do sangue abdominal, ascite e esplenomegalia. Esquistossomose urogenital resulta em fibrose da bexiga e do ureter. O dano renal às vezes é diagnosticado em avançado casos. (CDC, 2017).

O ciclo de transmissão começa quando excrementos humanos contendo ovos com parasitas encontram habitats de água doce, e as larvas incubadas infectam hospedeiros intermediários (Caramujos) susceptíveis. Os parasitas se multiplicam assexualmente nos caramujos e liberam na água outro estágio larval (cercárias) que é infectivo para os seres humanos. A infecção é transmitida através do contato doméstico, ocupacional e recreacional com a água. Dentro do corpo, as larvas evoluem para esquistossômulos que coexistem nos vasos sanguíneos há anos. Os vermes fêmeas liberam milhares de ovos que são evacuados nas fezes perpetuando o ciclo de transmissão (Figura 2) (WHO, 2017).

Figura 2: Ciclo de vida do gênero *Schistosoma*.



Fonte: Wikimedia Commons, 2017.

A esquistossomose é uma doença negligenciada que se refere a um grupo de doenças infecciosas, que embora tratáveis e evitáveis, continuam a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre as populações mais pobres do mundo (NJOROGÉ et al., 2014). Apesar disso, pouco se tem investido pela indústria farmacêutica para a criação de novos medicamentos contras as doenças negligenciadas. Nos últimos anos apenas 1% das novas drogas introduzidas foram

para aplicação em doenças negligenciadas (TROULIER et al., 2002). Entre essas doenças negligenciadas mais acometidas no mundo, a esquistossomose está em primeiro lugar com uma prevalência 200 milhões de pessoas e aproximadamente 280.000 mortes anuais (Tabela 1) (NJOROGÉ et al., 2014).

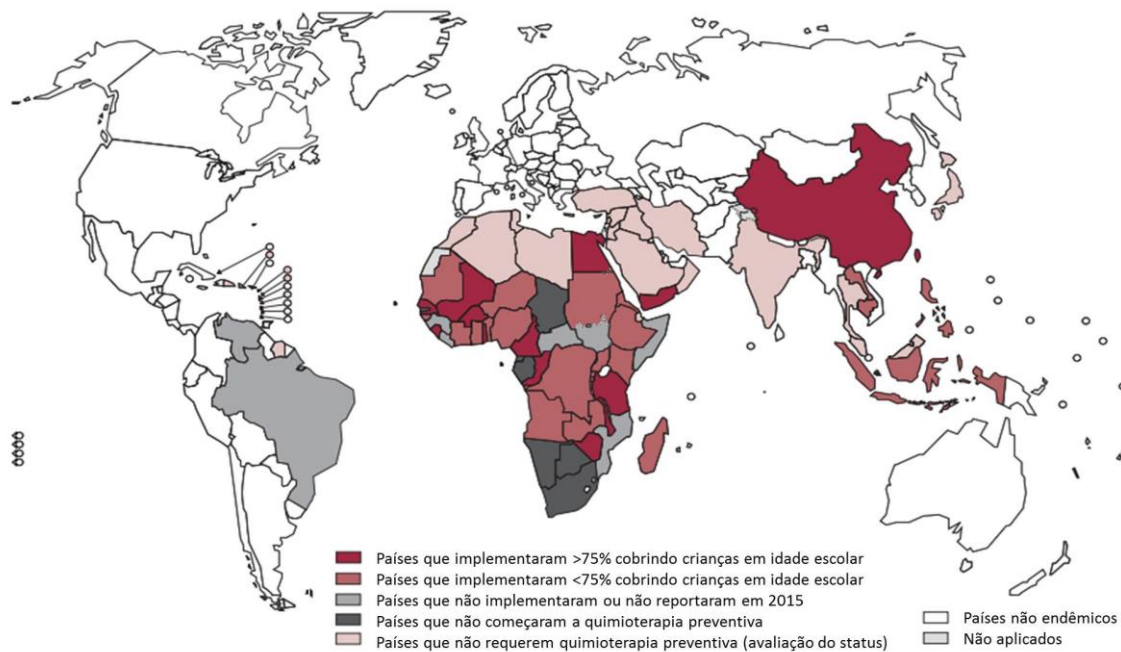
Tabela 1: Prevalência global e mortalidade de doenças negligenciadas.

	Aprox. prevalencia global (milhões)	Aprox. mortes anuais
Filariose linfática	120	<500
Esquistossomose	200	15 000–280 000
Tracoma	84	<500
Oncocercose	37	<500
Dengue	50	19 000
Leishmaniose	12	51 000
Doença de Chagas	8–9	14 000
Trypanossomíase africana	<0.1	48 000
Malaria	207	627 000

Fonte: NJOROGÉ et al., (2014).

Um total de 78 países é endêmico para esquistossomose, das quais populações em 52 países exigem quimioterapia preventiva. Em 2015, estima-se que 218,2 milhões as pessoas precisavam de tratamento, das quais crianças em idade escolar (5 a 15 anos) representavam mais da metade (54,4%) desse total (Figura 3). A África, região mais afetada, abriga 92% das pessoas que necessitam de tratamento preventivo.

Figura 3: Países no mundo que requerem a implementação da quimioterapia preventiva contra a esquistossomose até o ano de 2015.

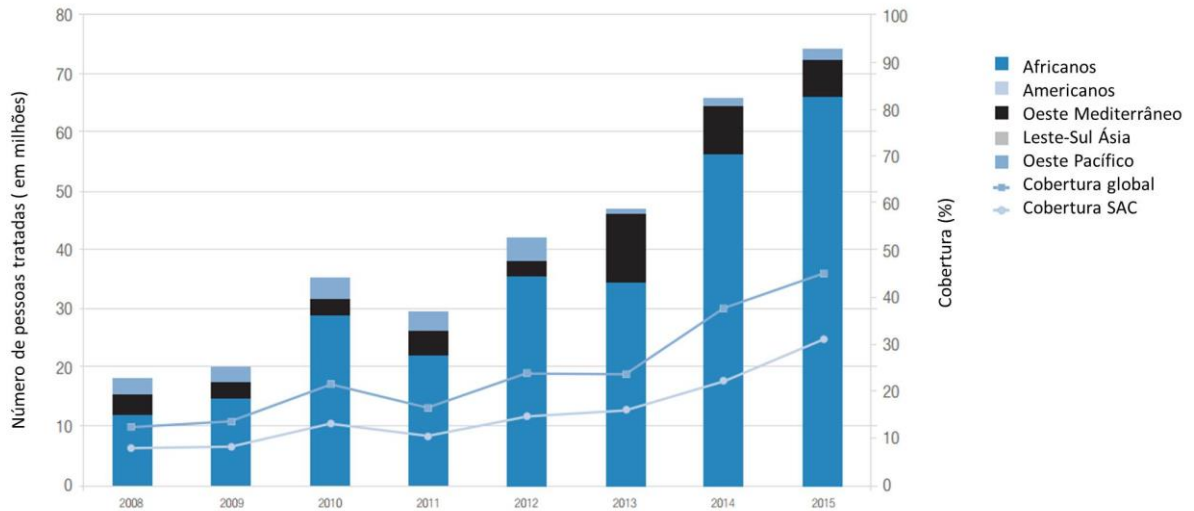


Fonte: WHO, 2017 (Modificado).

O Praziquantel é a droga de escolha para o tratamento de todas as formas de esquistossomose e está incluído na lista modelo de medicamentos da OMS para o controle desta doença a nível internacional. Atualmente, o tratamento é direcionado para crianças em idade escolar e adultos em risco. As crianças em idade pré-escolar também correm o risco de infecção, mas a falta de uma formulação pediátrica adequada de praziquantel atualmente os impede de tratamento. Mulheres grávidas e lactantes também estão em risco em áreas endêmicas e devem ser incluídas no tratamento (WHO, 2017).

A cobertura de tratamento para crianças em idade escolar aumentou significativamente em 2015 (44,9%) em comparação com 2008 (14%), representando mais de dois terços do objetivo para 2020 de 75% (Figura 4). Isto sugere claramente que, com o melhor fornecimento de praziquantel, o tratamento para a esquistossomose pode ser expandido. Dos 35 países que relataram níveis de tratamento alcançado em 2015, apenas 13 (37,1%) atingiram 75% de cobertura de todas as crianças em idade escolar. No entanto, 58,6% das unidades de implementação que realizaram quimioterapia preventiva em 2015 atingiu o objetivo de cobertura de 75% (Figura 3 e 4) (WHO, 2017).

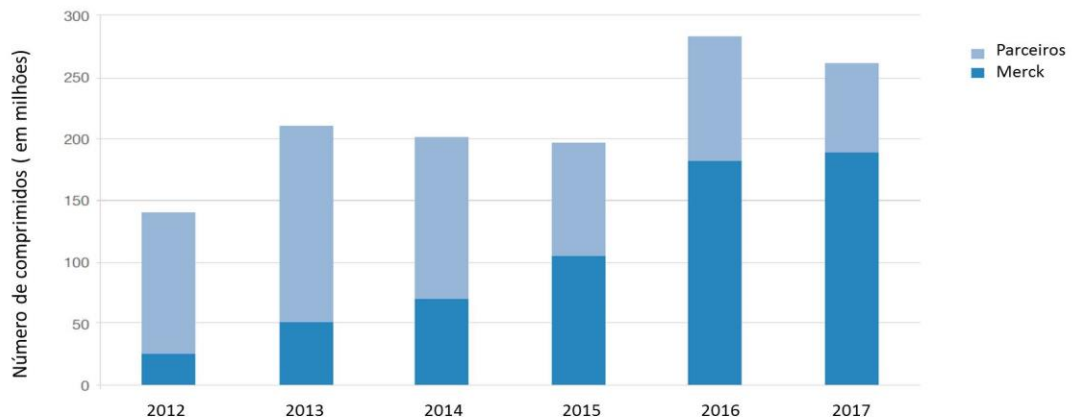
Figura 4: Número de pessoas tratadas globalmente para infecções de esquistossomose em crianças de idade escolar por região da OMS, 2008-2015.



Fonte: WHO, 2017 (Modificado).

Além da escassez de financiamento para implementação e erradicação desta doença, um dos principais obstáculos para expandir a quimioterapia preventiva é a chamada falta do praziquantel. Dos 597 milhões de comprimidos necessários globalmente para quimioterapia preventiva em 2015, apenas 198 milhões (33%) estavam disponíveis. Cerca de 285 milhões de comprimidos estavam disponíveis em 2016; para 2017 o número é provável que seja 263 milhões, ou menos de 50% da quantidade necessária para tratar todas as pessoas que necessitam de quimioterapia preventiva para esquistossomose em todo o mundo (Figura 5) (WHO, 2017).

Figura 5: Quantidade de praziquantel doada à OMS ou prometida por parceiros, 2012-2017.



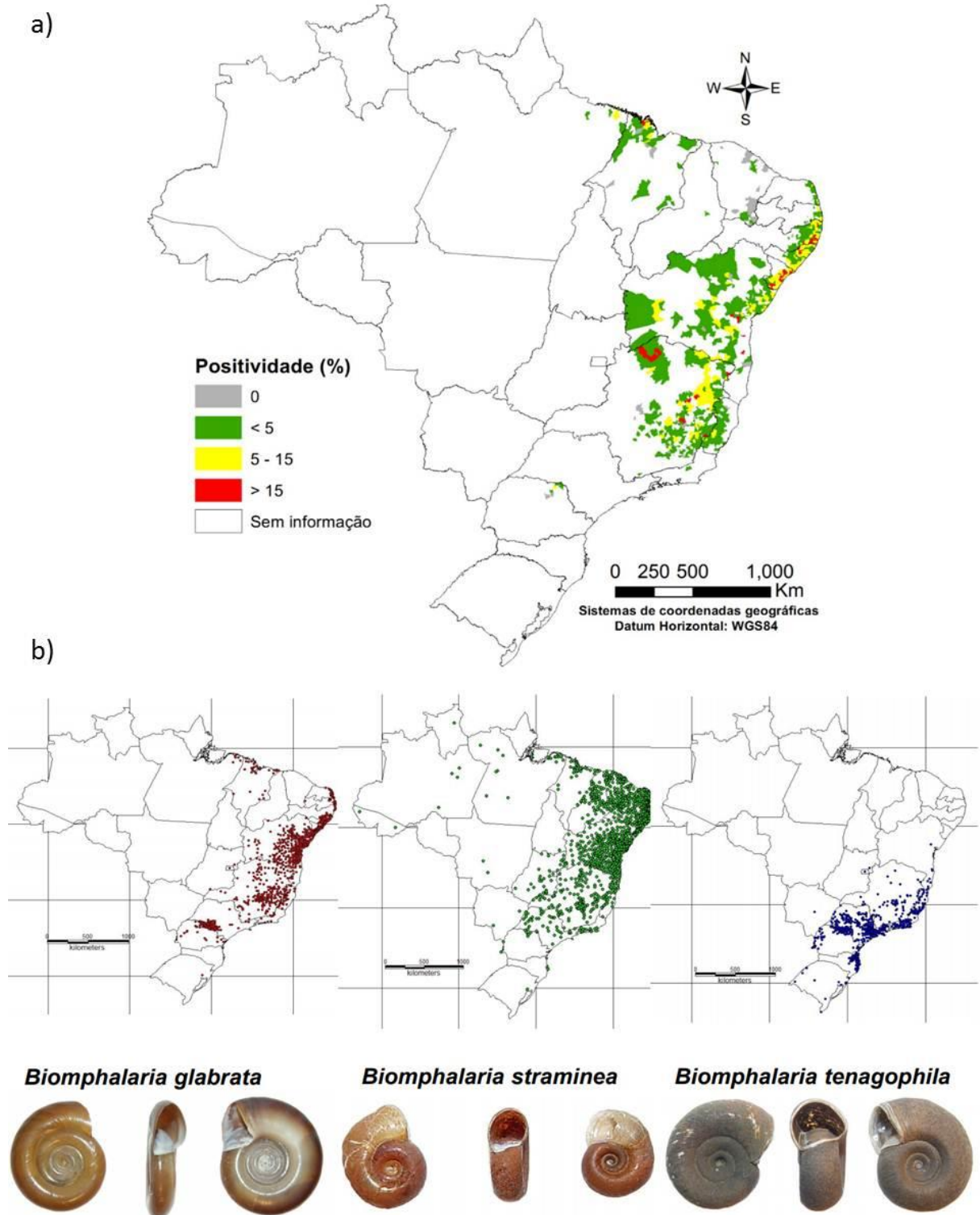
Fonte: WHO, 2017 (Modificado).

A distribuição da esquistossomose é altamente focal porque a transmissão depende da especificidade dos hospedeiros intermediários que são os caramujos e atividades que expõem os humanos à infecção. Intervenções de controle e distribuição de caramujos seria uma forma mais trabalhosa de controle da doença devido a grande quantidade e facilidade reprodutiva desse gênero *Biomphalaria*. Existem três espécies desse gênero no Brasil, que ocorrem em toda a faixa litorânea entre o nordeste e sudeste, sendo elas *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (Figura 6) (WHO, 2017).

No Brasil, as áreas endêmicas de distribuição da esquistossomose abrangem os estados do Maranhão, Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe, Minas Gerais e Espírito Santo. E nas áreas com transmissão focal está Pará, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Rio Grande do Sul (Figura 06). Observa-se uma maior presença de notificações na região litorânea brasileira. Entre 2006 a 2015 as federações brasileiras, Minas Gerais (65,866) e Bahia (49,095) estão no topo com maiores casos notificado, e com pouco ou nenhuma notificação estão os estados do Amazonas (3), Amapá (3) e Roraima (0) (Tabela 2).

A distribuição espacial dos hospedeiros intermediários da esquistossomose no Brasil até o ano de 2004 mostram a presença das três espécies do gênero *Biomphalaria* na faixa litorânea brasileira se estendendo do Amapá ao Rio grande do Sul (Figura 6), corroborando com os dados de notificações do Ministério da Saúde (SUS, 2017) (Tabela 2; Figura 6) onde a presença do caramujo favorece como os pontos focais da esquistossomose.

Figura 6: Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade (a) e distribuição espacial dos hospedeiros intermediários (b) da esquistossomose por município no Brasil de 2010 a 2015.



Fonte: Sinan/SVS/MS; SUS, (2017).

Tabela 2: Número de casos de esquistossomose na área não endêmica, por UF no Brasil de 2006 a 2015.

UF	ANO									
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
PR	340	302	160	262	66	41	50	34	32	6
RS	0	4	7	1	3	1	1	1	3	1
SC	9	8	6	5	7	4	5	5	13	7
ES	3,374	3,167	2,370	1,941	1,599	738	508	452	353	177
MG	444	1,372	3,242	11,727	22,431	11,817	4,876	4,152	3,507	2,239
RJ	88	83	88	110	91	70	67	74	81	54
SP	1,536	1,493	1,376	1,347	1,091	1,114	1,061	842	650	218
AL	330	190	102	50	97	67	58	37	26	24
BA	20,951	21,014	2,425	779	710	755	606	689	807	359
CE	89	36	60	73	73	28	23	20	25	23
MA	19	3	28	85	79	65	60	10	19	10
PB	66	139	118	66	71	164	168	33	97	37
PE	5,315	4,027	2,647	1,302	457	348	279	275	256	223
PI	2	6	1	2	1	6	3	2	1	0
RN	195	224	74	88	49	22	26	31	14	12
SE	16,804	997	76	97	61	93	79	95	92	73
DF	28	18	10	11	5	3	5	3	12	4
GO	32	23	6	24	13	11	4	11	18	11
MS	7	5	4	4	8	9	4	3	8	8
MT	16	21	16	5	10	35	19	53	24	13
AC	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0
AM	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
AP	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
PA	11	3	10	39	5	26	6	13	27	8
RO	105	65	64	64	73	19	26	23	32	14
RR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO	0	2	2	1	0	1	0	5	7	0

Fonte: Sinan/SVS/MS; SUS, (2017).

Devido à dependência exclusiva com o praziquantel para o tratamento de esquistossomíases, o desenvolvimento de resistência aos fármacos pelos parasitas causadores continua a ser uma preocupação principal, além disso, o praziquantel é eficaz somente contra formas adultas dos esquistossomos. Intervenções complementares tais como a necessidade de se desenvolver novas drogas, mas igualmente eficazes e acessíveis como substituto para o praziquantel (MORAES et al., 2011; MORAES, 2012; MORAES et al., 2009).

2.2 O Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)

Pilocarpus microphyllus Stapf ex Wardlew (Figura 7) é uma planta nativa, da família *Rutacea*, não endêmica, originária do Norte e Nordeste do Brasil, ocorrendo a leste do Estado do Pará, oeste e norte do Maranhão e norte do Piauí. É uma planta arbustiva, ocorrendo em matas menos densas e são frequentes em afloramentos rochosos denominados “canga”. No centro da mata é encontrada em ambientes mais iluminados (PINHEIRO, 2002; PIRANI & GROPPPO, 2012).

Pilocarpus microphyllus apresenta grande quantidade de metabólitos secundários com ampla propriedade farmacológica, tais como estimulante do sistema secretor (sialogogo) e diurético (TAVEIRA et al., 2003). A presença do alcaloide pilocarpina confere as propriedades de estimulação da salivação e da transpiração, além de ser o princípio ativo usado em alguns colírios (PINHEIRO, 2002). Entretanto, o grande extrativismo do jaborandi por conta da coleta e venda das folhas que beneficiavam as populações humanas tradicionais (ROCHA et al., 2014) causou uma grande mortalidade de plantas. Tal fato ocorreu, em parte, devido à perda de vigor dos indivíduos, alterando a altura e o tamanho das folhas que rebrotava, o que levou o jaborandi a compor a lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (IBAMA, 2008).

Figura 7: *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew (Rutaceae).



(Foto: ROCHA et al., 2014).

2.3 Os Alcaloides de *P. microphyllus*

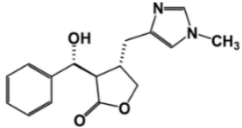
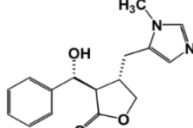
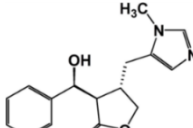
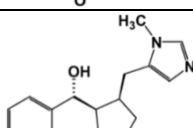
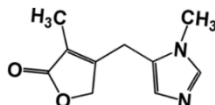
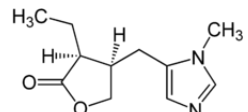
Alcaloides são metabólitos secundários que apresentam em sua estrutura química, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e compostos de carbono. São estruturalmente diversos e derivados do ácido mevalônico ou de diferentes aminoácidos, a partir de diversas rotas biosintéticas. São encontrados principalmente em plantas, a maioria funcionando na defesa contra predadores e patógenos (atividade antimicrobiana), como agentes alopáticos ou como elementos atrativos na polinização e na dispersão de frutos. Também correspondem aos principais agentes terapêuticos naturais com ação anestésica, analgésica, psicoestimulantes, neurodepressores, entre outras atividades farmacológicas (HENRIQUES, 2000; JUDD et al., 2009).

A partir das espécies de *Pilocarpus* sp., foram identificados 15 alcaloides (SANTOS; MORENO, 2004) e entre eles alguns tem demonstrado propriedades anti-helmínticas (GUIMARAES et al., 2015; ROCHA et al., 2017; VERAS et al., 2012) (Tabela 3). O primeiro a ser identificado e o que gerou grande interesse econômico foi a pilocarpina, principalmente por proporcionar a contração da pupila, importante em procedimentos cirúrgicos oculares, e no tratamento do glaucoma. A pilocarpina também é um poderoso estimulante da transpiração e salivação, usado para o tratamento da xerostomia de pós-irradiação (boca seca) em pacientes que apresentam câncer de pescoço e cabeça (PINHEIRO, 2002).

Além da pilocarpina, o alcaloide epiisopiloturina (Tabela 3), tem sido descrito na literatura por possuir ação farmacológica contra esquistossomose (GUIMARAES et al., 2015; ROCHA et al., 2017; VERAS et al., 2012). O alcaloide pilosina, é descrita por Lorenzi (2002) e Romero (2005) como majoritário nas folhas de jaborandi, eficaz no tratamento da acne, queda de cabelos, seborreia e outras afecções do couro cabeludo, com preparações de uso local. Já o alcaloide epiisopilosina teve sua atividade *in vitro* determinada contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania chagasi* (ALBUQUERQUE et al., 2010) e atividade anti-helmíntica *in vitro* descrita por ROCHA et al., (2017) além do alcaloide isopilosina. As formas moleculares semelhantes entre esses alcaloides (Tabela 3) podem sugerir um potencial antiparasitário entre seus isômeros.

Tabela 3: Sumário de estruturas avaliadas e informações biológicas dos alcaloides imidazólicos de *P. microphyllus*.

Fonte: Modificado de Rocha et al., (2017).

Nome	Estrutura	Dados espectrais	Atividade biológica
Episiopiloturina (EPI)		Raio X e RMN em estudos prévios (VERAS et al., 2013).	<i>In vitro</i> (VERAS et al., 2012) e <i>in vivo</i> (GUIMARAES et al., 2015) anti- <i>S. mansoni</i> em estudos prévios. Atividade antibacteriana (ROCHA et al, 2017).
Epiisopilosina (EPIIS)		Estudos de RMN para confirmar a estrutura de outros ensaios biológicos (ROCHA et al, 2017).	<i>In vitro</i> anti- <i>S. mansoni</i> e atividade antibacteriana (ROCHA et al, 2017).
Isopilosina (ISO)		Estudos de RMN para confirmar a estrutura de outros ensaios biológicos (ROCHA et al, 2017).	<i>In vitro</i> anti- <i>S. mansoni</i> e atividade antibacteriana (ROCHA et al, 2017).
Pilosina (PILO)		Estudos de RMN para confirmar a estrutura de outros ensaios biológicos (ROCHA et al, 2017).	<i>In vitro</i> anti- <i>S. mansoni</i> e atividade antibacteriana (ROCHA et al, 2017).
Macaubina (MAC)		Estudos de Raio X e RMN para determinar a estrutura (ROCHA et al, 2017).	<i>In vitro</i> anti- <i>S. mansoni</i> e atividade antibacteriana (ROCHA et al, 2017).
Pilocarpina		Dados estruturais e caracterizações (MERCK 1996)	Atividade sialogoga e diurética (MERCK 1996)

2.4 Os Complexos Metálicos de Rutênio

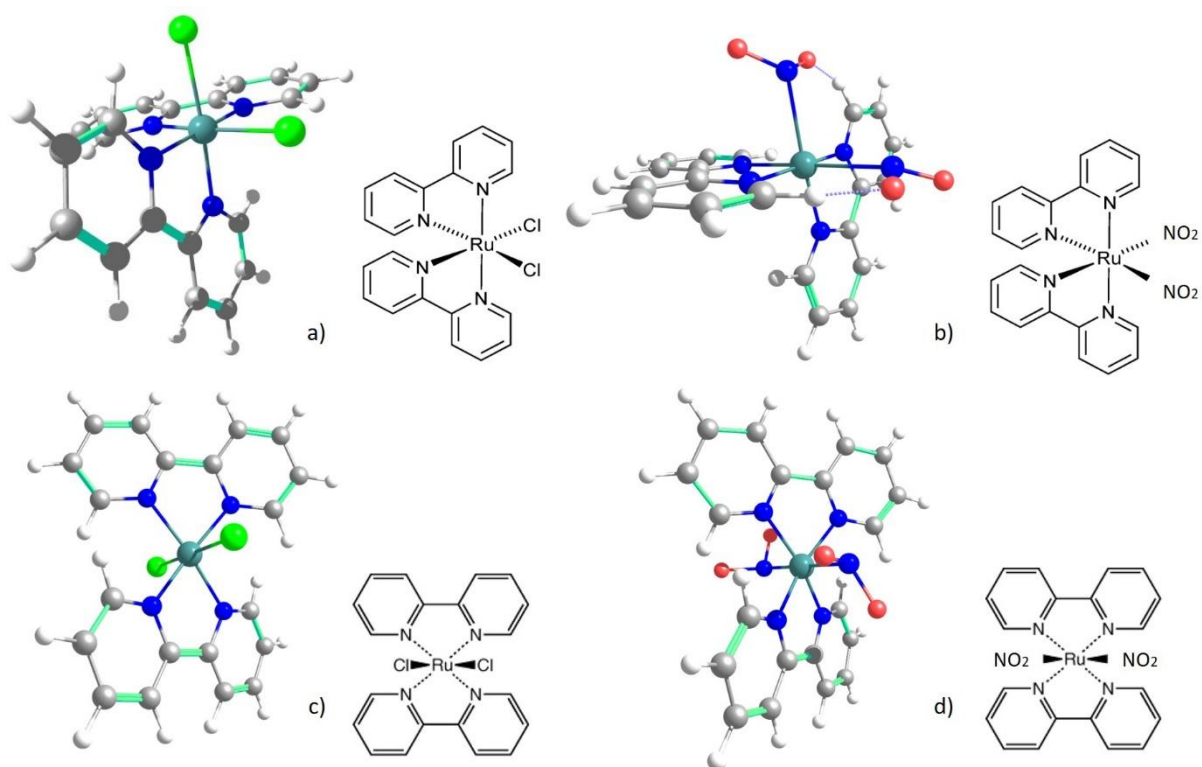
A presença de metais de transição como o rutênio em macromoléculas pode beneficiar a fotoquímica, eletroquímica e reatividade química. Isso se deve à versatilidade desses metais apresentar orbitais atômicos na camada de valência, que podem atuar como doadores ou receptores de elétrons quando coordenados a ligantes orgânicos ou inorgânicos (FERREIRA, 2012). Dentre eles, o ligante 2,2'-bipiridina (2,2'-bpy), que é um típico exemplo de ligante coordenado ao íon metálico Ru (II) (Figura 8), é uma molécula bidentada muito versátil, e a aplicação dos complexos resultantes tem sido demonstrada numa variedade de materiais poliméricos (PAUTZCH et al., 2004) e com atividade anti-metástase (TFOUNI et al., 2012).

Os complexos de rutênio são desenvolvidos particularmente com ligantes de relevância biológica, e o estado de oxidação mais comum é o Ru (II) e Ru (III) em solução aquosa. Os centros de Ru (II) são mais reativos que Ru (III) em reações de substituição e coordenam rapidamente com átomos de nitrogênio. Esses compostos são bastante interessantes para a química medicinal, pois possui solubilidade e estabilidade em água além de baixa toxicidade (TFOUNI et al., 2012).

A grande vantagem dos metalofármacos envolve a ligação de um composto orgânico de conhecida ação farmacêutica a um fragmento contendo metal. Isto resulta em um sinergismo de metal-fármaco em que o metal atua como um transportador e estabilizador para a droga atingir o seu alvo, enquanto que a droga orgânica carrega e protege o metal e impede reações secundárias no seu trânsito para um segundo alvo de ação biológica (SANTOS, 2012).

Os complexos do tipo *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] (bipiridina) onde Cl⁻ é um ligante doador π, apresentam potenciais mais negativos (CURTIS, 1983). Os ligantes doadores do tipo π são carregados negativamente estabilizando o estado de oxidação mais elevado, Ru (III). Grupos cloretos possuem a propriedade de transferir elétrons por meio dos orbitais do tipo π do Ru (II), aumentando a densidade eletrônica no centro metálico (MATSUBARA; FORD, 1976). O Ru (II) é especialmente um bom retro-doador quando complexado a ligantes insaturados, saturados monodentados ou bidentados, enquanto que o estado Ru (III) é um bom π acceptor de elétrons (DE ALMEIDA et al., 2005).

Figura 8: 2,2'-bipiridina de Ru (II). a) *cis*-Ru(bpy)₂Cl₂, b) *cis*-Ru(bpy)₂NO₂, c) *trans*-Ru(bpy)₂Cl₂ e d) *trans*-Ru(bpy)₂NO₂.



Fonte: Rocha, (2018).

Os dados desta pesquisa foram divididos em cinco capítulos subsequentes, onde no primeiro capítulo, foi realizada uma prospecção científica e tecnológica sobre os complexos de rutênio, o alcaloide epiisopiloturina e a esquistossomose para trazer as principais publicações relacionadas a esses descritores, e também mostrar no campo inventivo de patentes se existe algo relacionado ao tema proposto neste trabalho. No segundo capítulo, é realizado um estudo teórico por química quântica computacional dos principais alcaloides de *P. microphyllus* citados na literatura por possuírem alguma atividade contra a esquistossomose para demonstrar quais destes poderiam ser melhor avaliados contra esta doença e possíveis candidatos a estudos de complexação. No terceiro capítulo, é realizado um planejamento racional por química quântica computacional de um alcaloide selecionado no capítulo anterior (epiisopiloturina) para a complexação hexacoordenada com macrociclos de rutênio II, onde foi realizado vários cálculos computacionais em diversas posições de ancoragem da EPI com o metal, bem como as possíveis variações do macrociclo nas formas *cis* e *trans*, e a ligação do contra-

íon cloro (Cl) ou óxido nítrico (NO₂) para selecionar os principais complexos candidatos. No quarto capítulo, é feita a síntese orgânica de dois complexos metálicos selecionadas no capítulo anterior, sendo um deles com óxido nítrico (EPIRUNO₂) e os outros com o cloro (EPIRUCLN e EPIRUCLO). A ação anti-helmíntica experimental destes complexos foi realizada para comprovar e confirmar os dados teóricos obtidos nos capítulos anteriores. E por fim, no capítulo cinco, é realizada a patente dos complexos metálicos de rutênio e epiisopiloturina.

3. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. C. **Atividade In vitro de Extratos e Frações de *Peschiera Affinis*, *Pithecellobium Dulce* e *Pilocarpus Microphyllus* sobre *Leishmania Chagasi***. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Coordenadoria de Pós-graduação, Universidade Estadual do Ceará, 2010.

BANDEIRA, A. J.; DEIMLING, L. I.; GEORG-KRAEMER, J. E. Variabilidade genética do jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lemaire; Rutaceae) em populações naturais da região Noroeste do Rio grande do Sul. **Revista de Iniciação Científica da Ulbra**, p.43-52, 2010.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em Fármacos Antifúngicos: Uma Revisão New Antifungic Drugs: A Review. **Visão Acadêmica**, v. 2, p.159-172, 2004.

CAMPELO, Y. D. M.; MAFUD, A.; VÉRAS, L.; GUIMARÃES, M. A.; YAMAGUCHI, L.; LIMA, D.; ARCANJO, D.; KATO, M.; MENDONÇA, R.; PINTO, P. L. S.; MASCARENHAS, Y.; SILVA, M. P. N.; MORAES, J.; EATON, P.; LEITE, J. Synergistic effects of in vitro combinations of piplartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/gen_info/faqs.html. Acesso em 26 de dezembro de 2017.

CHAKRABORTY, A.; BRANTNER, A. H. Antibacterial steroid alkaloids from the stem bark of *Holarrhena pubescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 339-344, 1999.

CURTIS, J. C.; SULLIVAN, B.P.; MEYER, T. J. Calculation of electron-transfer rate constants from the properties of charge-transfer absorption bands. The $PQ_2^+, Fe(CN)_6^{4-}$ system. **Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 3833–3839, 1980.

DE ALMEIDA, R. L. Correlação entre medidas espectroscópicas e eletroquímicas do complexo metálico. *cis-Ru(bpy)₂(Cl)₂*. **Revista UNINGÁ**, v. 4, p. 91-99, 2005.

FERREIRA, D. M. **Coordenação a centros e rutênio e polimerização via metátase de um novo monômero-ligante do tipo norboneno-piridina**. Dissertação de mestrado. Instituto de química de São Paulo, Universidade de São Paulo, 2012.

FEWELL, A. M.; RODDICK, J. G. Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids, solanine, and chaconine. **Phytochemistry**, v. 33, p.323-328, 1993.

GUERREIRO, G.; LIMA, J. E. S.; FERNANDES, J. B. SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C., MAGALHÃES, C. M. I.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PIRANI, J. R. Sesquiterpenos do caule de *Pilocarpus riedelianus* e atividades sobre microorganismos. **Química Nova**, v. 28, p. 986-990, 2005.

PIRANI, J. R. Sesquiterpenos do caule de *Pilocarpus riedelianus* e atividades sobre micro-organismos. **Química Nova**, v. 28, p.986-990, 2005.

GUIMARÃES, M. A.; DE OLIVEIRA, R. N.; VÉRAS, L. M. C.; LIMA, D. F.; CAMPELO, Y. D. M.; CAMPOS, A. S.; et al. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n. 3, 2015.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: UFSC, p.641-656, 2000.

IBAMA. 1992. (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). **Portaria Nº. 37**. 15 de abril. Diário Oficial, Brasília, 1992.

IBAMA. 2008. (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). **Portaria Nº. 06**. 15 de janeiro. Diário Oficial, Brasília. p. 870-872, 2008.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHU, M. J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3ªed. Artmed, Porto Alegre, 2009.

LORENZI, H. A.; MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 2002.

MATSUBARA, T.; FORD, P. C. Some applications of cyclic voltammetry to the reactions and properties of ruthenium ammine complexes. Reduction potentials and rate studies. **Inorganic Chemistry**, v. 15, p. 1107 -1110, 1976.

MELTZER, E.; SCHWARTZ, E. Schistosomiasis: current epidemiology and management in travelers. **Current Infectious Disease Rep**, v. 15, 2013.

Ministerio da Saúde (SUS). Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/11240-descricao-da-doenca>. Acesso em 26 de dezembro de 2017.

MORAES, J. **Antischistosomal natural compounds**: Present challenges for new drug screens. In: RODRIGUEZ-MORALES, A. J, editor. Current topics in tropical medicine. Rijeka: InTech. p. 333–358, 2012.

MORAES, J. ; NASCIMENTO, C. ; LOPES, P. O. ; NAKANO, E. ; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**, v.127, p.357-364, 2011.

MORAES, J.; SILVA, M. P.; OHLWEILER, F. P.; KAWANO T. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v 51, p.77-82, 2009.

NENAAH, G. Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. **Fitoterapia**. v. 81, p.779-782, 2010.

NICOLAU, L. A. D.; CARVALHO, N. S.; PACÍFICO, D. M.; LUCETTI, L. T.; ARAGÃO, K. S.; VÉRAS, L. M. C.; SOUZA, M. H. L. P.; LEITE, J. R. S. A.; MEDEIROS, J. V. R. Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. In **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p.188-195, 2017.

NJOROGE, M.; NJUGUNA, N. M.; MUTAI, P.; ONGARORA, D. S. B.; SMITH, P. W.; CHIBALE, K. Recent Approaches to Chemical Discovery and Development Against Malaria and the Neglected Tropical Diseases Human African Trypanosomiasis and Schistosomiasis. **Chemistry Review**, v. 114, p.11138–11163, 2014.

PAUTZSCH, T.; BLANKENBURG, L.; KLEMM, E. Design and synthesis of Ru (II)-bipyridyl-containing conjugated polymers. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, p.722–732, 2004.

PINHEIRO, C. U. B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, p.141-150, 2002.

PIRANI, J.R.; GROppo, M. Rutaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000212>), 2012.

ROCHA, J. A., VASCONCELOS, S., SILVA, F. M. M. D. A., MELO, A. J., SILVA, M. F. S. ISSR Primer Selection for Genetic Variability Analyses with Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew., Rutaceae). **Forest Research**, v. 3, p. 1-5, 2014.

ROMERO, N. R. **Contribuição ao Conhecimento Químico do Gênero *Pilocarpus*: *Pilocarpus microphyllus* Stapf. e *Pilocarpus carajaensis* Skorupa.** Fortaleza, Tese (Doutorado em Química) Coordenadoria de Pós-graduação, Universidade Federal do Ceará, 2005.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p.115-137, 2004.

SANTOS, M. **Síntese e caracterização de complexos híbridos de rutênio e medida da atividade biológica contra *Trypanosoma cruzi*.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2012.

SAWAYA, A. C. H. F.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, M. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 58, p.471-480, 2011.

SILVA, V. G.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; CARVALHO, N. S.; PRUDÊNCIO, R. S.; ARAGÃO, K. S.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPOS, S. A.; VÉRAS, L. M. C.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J. R. S. A.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p.1071-1077, 2013.

SOUTHAM, H. M.; BUTLER, J. A.; CHAPMAN, J.A.; POOLE, R. K. The microbiology of ruthenium complexes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 71, p. 1–96, 2017.

STEVENS, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012." will do. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

TAVEIRA, F. S. N.; ANDRADE, E. H. A.; LIMA, W. N.; MAIA, J. G. S. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, p.27-31, 2003.

TFOUNI, E.; TRUZZI, D. R.; TAVARES, A.; GOMES, A. J.; FIGUEIREDO, L. E.; FRANCO, D. W. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes, **Nitric Oxide**, v. 26, n. 1, p. 38-53, 2012.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, v. 359, p.2188–2194, 2002

VERAS, L. M. C.; CUNHA, V. R. R.; LIMA, F. C. D. A.; GUIMARÃES, M. A.; VIEIRA, M. M.; CAMPELO, Y. D. M.; SAKAI, V. Y.; LIMA, D. F.; CARVALHO JUNIOR, P. S.; ELLENA, J. A.; SILVA, P. R. P.; VASCONCELOS, L. C.; GODEJOHANN, M.; PETRILLI, H. M.; CONSTANTINO, V. R. L.; MASCARENHAS, Y. P.; LEITE, J. R. S. A. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **Plos One**, v. 8, p.1-11, 2013.

VERAS, L. M., GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R.; MORAES, J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p.2051-2058, 2012.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p.326-337, 2006.

Wikimedia Commons. Schistosomiasis. Disponível em:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schistosomiasis_Life_Cycle.png. Acesso em
em 14 de dezembro de 2017.

World Health Organization (WHO). Disponível em:
<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acesso em 26 de dezembro de 2017.

**Prospecção científica e tecnológica de complexos metálicos de rutênio e
epiisopiloturina contra a esquistossomose**

Artigo submetido à revista *Cadernos de Prospecção* (02/12/2017)

ISSN: 2317-0026

Qualis Capes: Biotecnologia (B5)

Fator de impacto:

Capítulo I

PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DE COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTÊNIO E EPIISOPILOTURINA CONTRA A ESQUISTOSSOMOSE.

Jefferson Almeida Rocha ^{a,b}; Nayra da Costa e Silva Rego ^a; Gleidiany da Costa Moreira ^b; Ionara Nayana Gomes Passos ^b, Jose Roberto de Sousa Almeida Leite ^d; Francisco da Chagas Alves Lima ^c

^a Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, RENORBIO, Ponto focal UFPI, Teresina, Piauí, Brasil;

^b Grupo de Pesquisa em Ciências Naturais e Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Grajaú, MA, Brasil;

^c Grupo de Pesquisa em Química Quântica Computacional e Planejamento de Fármacos, Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, PI, Brasil;

^d Área Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brasil.

RESUMO

A esquistossomose é causada pelo *Schistosoma mansoni*. A prospecção de novos fármacos que tenham ação contra vermes jovens e adultos ainda é um desafio. Objetivou-se com esse trabalho realizar uma prospecção científica e tecnológica de complexos metálicos de rutênio e epiisopiloturina contra esquistossomose. Buscou-se patentes nas bases INPI, EPO, USPTO e *Derwent Innovations Index*, e artigos científicos nas bases *Scielo*, *Pubmed*, *Bireme*, *Scopus*, *Web of Science* e *Science Direct*, até o ano de 2016. A base *Scopus* apresentou maiores resultados de artigos, porém não se encontrou publicações com os termos juntos “ruthenium complex and epiisopiloturine” já entre as patentes, o banco de dados americano USPTO, apresentou maior quantidade de depósitos e não se encontrou nenhuma patente relacionada ao cruzamento dos termos “ruthenium complex and *Schistosoma mansoni*”. Portanto, o estudo de complexos metálicos de rutênio apesar de ser bem difundido na área científica, ainda se mostra escasso em estudos aliando a sua aplicação com epiisopiloturina contra a esquistossomose.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; Prospecção científica; Proteínas; Complexos de rutênio; Epiisopiloturina.

INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma doença de origem parasitária causada pelo *Schistosoma mansoni* e está incluída no rol das principais doenças negligenciadas como uma patologia endêmica presente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (SOUZA et al., 2011; WHO, 2017).

Estudos apontam que no Brasil há cerca de seis milhões de infectados, principalmente em regiões de pobreza e miséria, sendo considerado um problema de saúde pública, pois o perfil de morbidade e mortalidade desta doença afeta principalmente jovens e adultos na faixa etária mais produtiva (BRASIL, 2014).

Um dos grandes desafios ligados ao controle da doença está na prospecção de novos fármacos, que possam destruir as formas jovens e adultas dos vermes. Estes são responsáveis pela produção dos ovos que ao penetrar na corrente sanguínea do hospedeiro definitivo, produzem uma resposta inflamatória principalmente no fígado, levando a destruição do órgão e a morte do indivíduo. (BAPTISTA, 2005).

A partir da biomassa obtida do processo extração da pilocarpina, um alcaloide denominado epiisopiloturina (EPI), apresentou um potencial de atividade biológica contra o *Schistosoma mansoni*, tanto para vermes adultos como para vermes jovens. Outro fator importante é que essa substância não apresenta toxicidade em células mamárias e macrófagos, permitindo, assim futuros testes *in vivo*, novas formulações e diferentes vias de administração. (GUIMARÃES et al., 2015; VERAS et al., 2013)

De acordo com Southam (2017), o rutênio constitui um candidato promissor na prospecção de novas drogas em virtude da sua configuração eletrônica oportunizando que propicia a coordenação de diversos ligantes, além disso, permite o ajuste cinético dos compostos e intervalos de estados de oxidação acessíveis influenciando na dose e na biodisponibilidade. A sua classificação (Ru^{II} , Ru^{III} , Ru^{IV}), as condições fisiológicas e o sinergismo semelhante aos complexos de Platina são características que o tornam um complexo bioativo promissor.

Com base na sua atividade biológica, na ausência de toxicidade e através do suporte químico em técnicas analíticas, através de modificações da estrutura da EPI com complexos de rutênio, seria possível obter um produto de maior eficácia no controle e tratamento de doenças negligenciadas, em especial contra a

esquistossomose. Além disso, essa pode ser uma opção viável na prospecção de um novo fármaco. Diante do exposto, o objetivo do referente trabalho foi à realização de uma prospecção tecnológica para identificar as aplicações já existentes através das patentes depositadas dos complexos de rutênio com epiisopiloturina contra a esquistossomose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização da pesquisa foram feitas buscas em bancos de dados de patentes para o estudo prospectivo tecnológico e um levantamento de produções científicas em bases de dados nacionais e internacionais para uma prospecção científica de acordo com metodologia de Araújo et al. (2016).

Na prospecção tecnológica, foram realizadas buscas de patentes nos bancos de dados: *European Patent Office* (EPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), *Derwent Innovations Index* (DII) e no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Já a prospecção científica foi realizada nas bases de dados: Scientific Electronic Library Online (*Scielo*), Portal Regional da Biblioteca Virtual em Saúde (*Bireme*), National Center for Biotechnology information (*Pubmed*), Thomson Reuters (*Web of Science*), Elsevier group (*Scopus*) e (*Science Direct*).

Os descritores utilizados na busca foram: “ruthenium complex”, “*Schistosoma mansoni*” e “epiisopiloturine”, considerando todos os documentos que apresentaram esse termo no título e/ou resumo. É importante ressaltar que os termos foram descritos em português nas bases nacionais.

Os dados foram prospectados no ano de 2017, tendo sido analisados os pedidos de patentes depositados e os trabalhos científicos publicados até o ano de 2016. Mediante todos os resultados das buscas foi realizada uma análise comparativa entre as bases de dados a fim de avaliar o desenvolvimento das pesquisas e publicações sobre o tema proposto.

Além disso, realizou-se uma busca de enzimas em banco de dados *do Protein Data Bank* (PDB) utilizadas em estudos com *Schistosoma mansoni*, no ano de 2017. Estas enzimas vêm cada vez mais sendo utilizadas para estudos *in silico* onde é possível determinar a interação com substâncias bioativas antecedentes a testes experimentais. As informações foram tabeladas de forma que as proteínas foram selecionadas para futuros teste de docagem e dinâmica molecular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PROSPECÇÃO CIENTÍFICA

As publicações científicas realizadas até o ano de 2016 com o termo “ruthenium complex” evidenciam um resultado maior na base *Scopus* (10.990) seguindo bem distante pelas bases *Web of Science* (3.350), *Science Direct* (1.104), *Bireme* (934), *Pubmed* (927) e menor na base, *Scielo* (15). Já aquelas com o termo “*Schistosoma mansoni*” apresentou maior resultado na base científica *Bireme* (15.613), seguindo das bases, *Scopus* (14.966), *Pubmed* (11.069), *Web of Science* (10.976), *Scielo* (1.168) e menor valor na base *Science Direct* (791) (Tabela 1).

Usando o descritor “epiisopiloturine” foram encontradas maiores publicações nas bases *Scopus* (8) e *Web of Science* (8), seguindo de *Pubmed* (5) e *Bireme* (5), já nas bases *Science Direct* e *Scielo* não se encontrou publicações até o ano de 2016. Porém, ao analisar os dados onde os descritores eram simultaneamente empregados. Nos termos “*Schistosoma mansoni*” and “epiisopiloturine” encontraram-se 21 publicações para a base *Scopus*, seguida de apenas 3 artigos para as bases, *Web of Science*, *Pubmed* e *Bireme*. Usando os descritores “ruthenium complex” and “*Schistosoma mansoni*” apresentou 5 publicações na base *Scopus*. E para o descritor “ruthenium complex” and “epiisopiloturine” não houve publicações até a data estudada (Tabela 1).

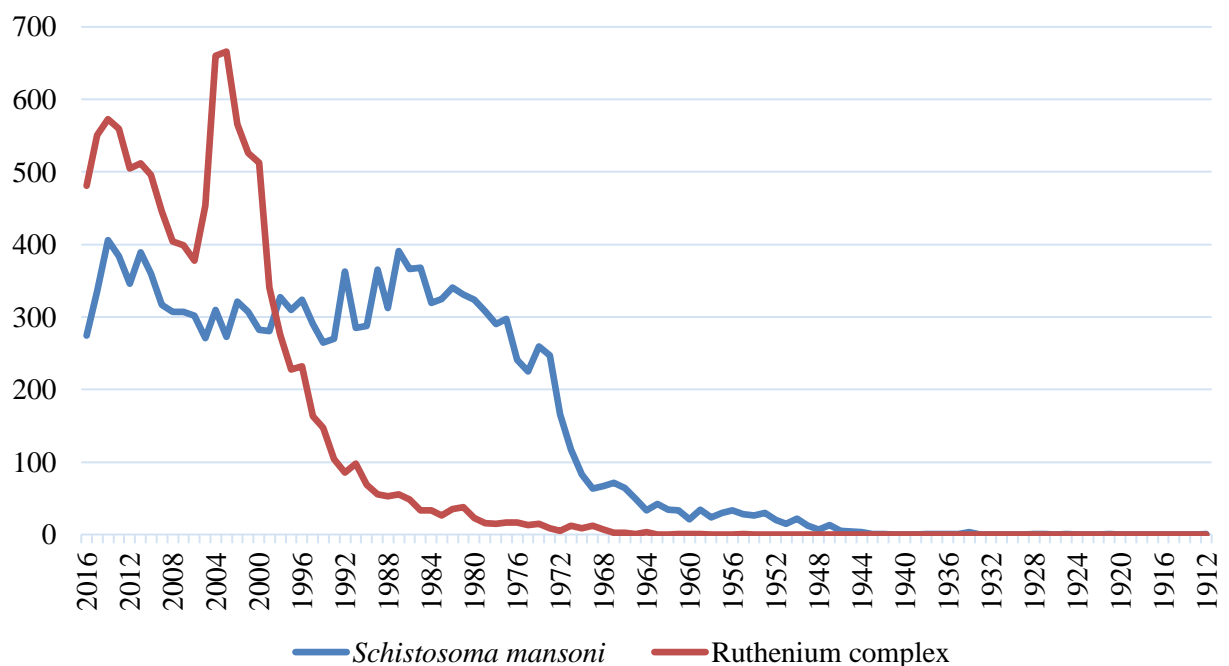
Tabela 1: Artigos Científicos publicados nos bancos de dados *Scielo*, *Bireme*, *Pubmed*, *Science direct*, *Scopus* e *Web of Science*, com os termos “ruthenium complex”, “*Schistosoma mansoni*” e “epiisopiloturine” até o ano de 2016.

Palavras-chave	<i>Scielo</i>	<i>Bireme</i>	<i>Pubmed</i>	<i>Science Direct</i>	<i>Scopus</i>	<i>Web of Science</i>
“ruthenium complex”	15	934	927	1.104	10.990	3.350
“ <i>Schistosoma mansoni</i> ”	1.168	15.613	11.069	791	14.966	10.976
epiisopiloturine	0	5	5	0	8	8
“ <i>S. mansoni</i> ” and epi	0	3	3	0	21	3
“Ru complex” and “ <i>S. mansoni</i> ”	0	0	0	0	5	0
“Ru complex” and epi	0	0	0	0	0	0

Fonte: Rocha (2017).

Os maiores resultados de artigos científicos publicados foram evidentes na base de dados *Scopus*, já número de publicações com o termo “*Schistosoma mansoni*”, iniciaram nas primeiras décadas do último século (CORREIA, 1953), observando que esta é uma doença bem antiga e conhecida pela ciência, com o decorrer dos anos e o crescimento da tecnologia e desenvolvimento científico os estudos da esquistossomose tiveram um grande aumento na década de 70 e se manteve com 300 a 400 publicações anualmente até o ano de 2016. Já o número de publicações com o termo “ruthenium complex” que iniciou por entre as décadas de 50 e 60, aumentou exponencialmente na década de 90, e teve um máximo no início dos anos 2000, com quase 700 artigos publicados (Figura 1). Esse crescimento se deu devido às descobertas do potencial efeito desses complexos metálicos na medicina (DELGADO et al., 2007) e de agentes terapêuticos (SEVDIC et al., 1981).

Figura 1: Artigos publicados com o termo “ruthenium complex” e “*Schistosoma mansoni*” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.

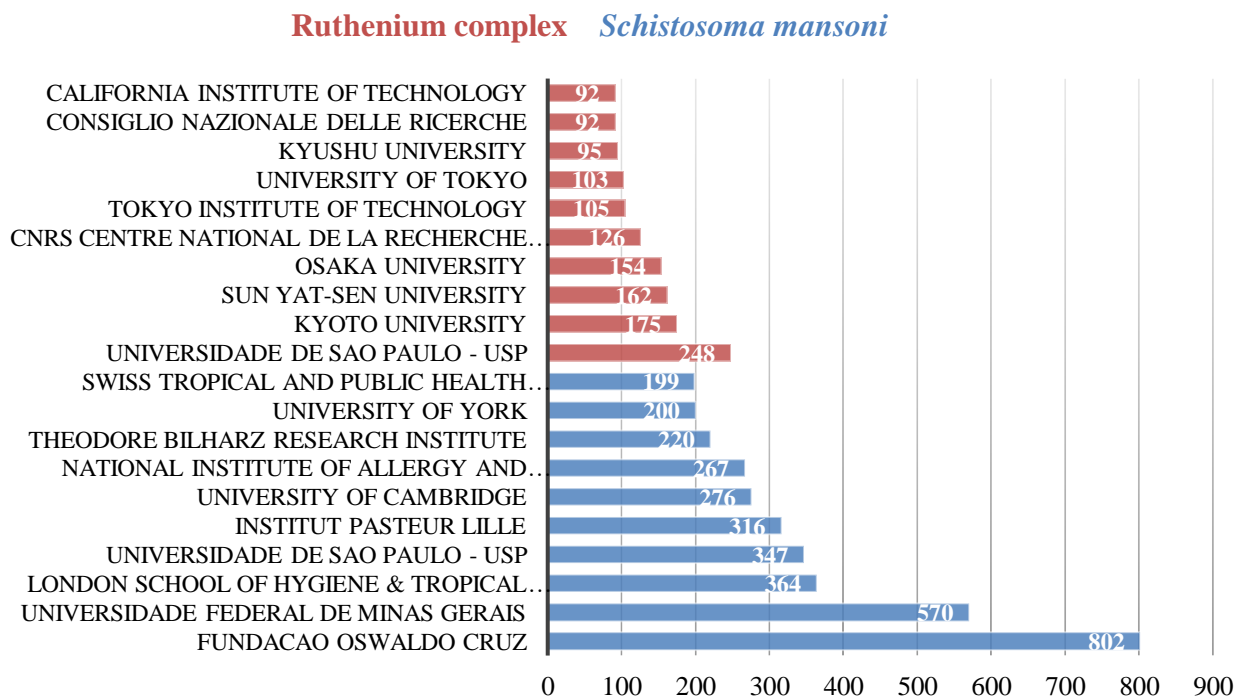


Fonte: Rocha (2017).

As dez afiliações mundiais que mais se destacaram no ranking de artigos publicados com o termo “ruthenium complex” são: a Universidade de São Paulo – USP que lidera o ranking com 248 publicações, seguido de várias instituições japonesas. Já para o descritor “*Schistosoma mansoni*”, três instituições brasileiras se

destacam entre as quatro maiores do ranking sendo elas, a maior Fundação Oswaldo Cruz (802), seguida da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (570), London School of Hygiene & Tropical Medicine (364) e Universidade de São Paulo – USP (347) (Figura 2). Essa liderança brasileira em estudos contra a esquistossomose se deve ao fato de que ela é uma doença negligenciada e acomete grande parte o Brasil desde a década de 50.

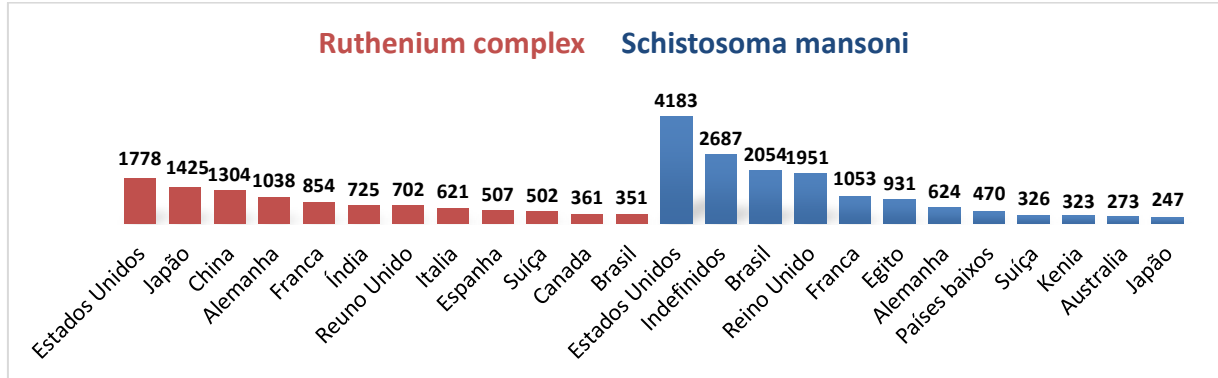
Figura 2: Maiores afiliações no ranking de artigos publicados com o termo “ruthenium complex” e “*Schistosoma mansoni*” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.



Fonte: Rocha (2017).

Em relação aos países com maior ranking de publicações com o termo “*Schistosoma mansoni*”, os Estados Unidos lideram com 4.183 publicações, seguida do Brasil 2.054 artigos publicados, já com o descritor “ruthenium complex” novamente os Estados Unidos está no topo do ranking com 1.778 artigos descritos para esse país, seguido do Japão (1.425) e a China (1.304), o Brasil aparece em 12º com apenas 351 publicações (Figura 3). Isso mostra que apesar do Brasil ter as principais instituições de pesquisa contra a esquistossomose no ranking de publicações, de modo geral, os Estados Unidos publicam mais que o Brasil, pois tem mais instituições de pesquisa.

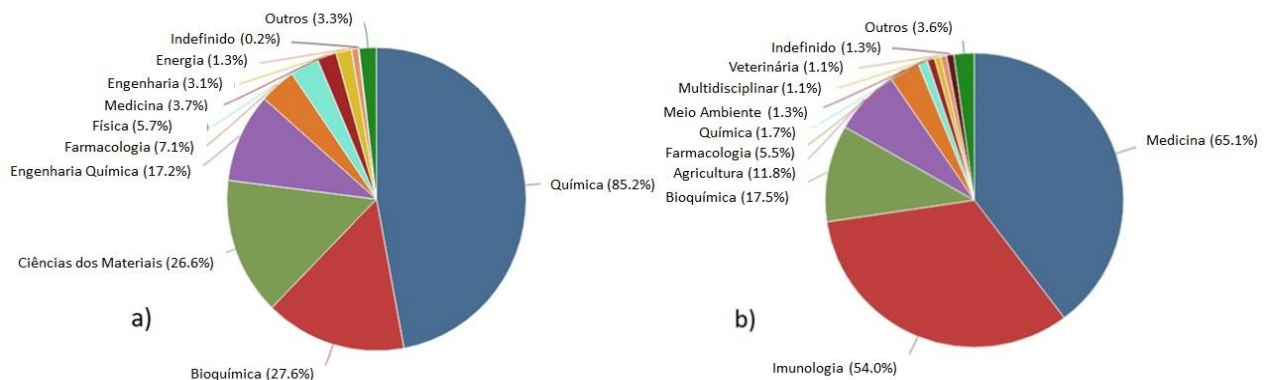
Figura 3: Países com maior ranking de publicações com o termo “ruthenium complex” e “*Schistosoma mansoni*” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.



Fonte: Rocha (2017).

As áreas dessas pesquisas com o termo “ruthenium complex”, evidenciam com 85,2% publicações na área de química, seguido de bioquímica (27,6%) e ciências dos materiais (26,6%) (Figura 4-a). Já quando se usa “*Schistosoma mansoni*” 65,1% das publicações encontram-se na área de medicina, seguidos de imunologia (54,0%) e bioquímica (17,5%) (Figura 4-b). Isso mostra, que a aplicação biotecnológica de complexos de rutênio com aplicação em áreas da saúde ainda tem pouco campo nas publicações científicas. Ao mesmo tempo, no estudo da esquistossomose, o campo da pesquisa farmacológica e química que estuda possíveis novas drogas contra a doença ainda é pouco explorado, isso mostra porque atualmente existe apenas um único medicamento no mundo para tratar a esquistossomose que é o praziquantel (MORAES, 2012).

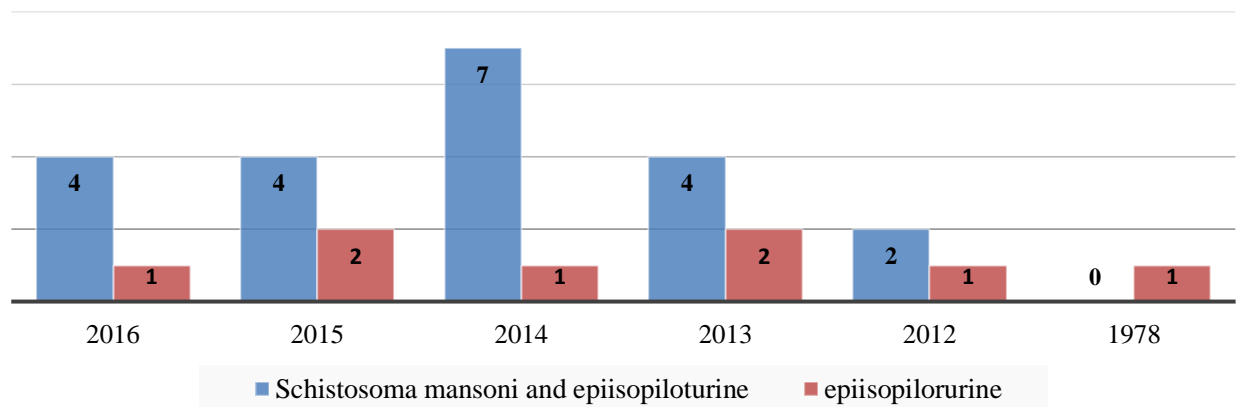
Figura 4: Áreas de publicação com o termo a) “ruthenium complex” e b) “*Schistosoma mansoni*” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.



Fonte: Rocha (2017).

Ao analisar os artigos publicados com termo “epiisopiloturine” e de forma cruzada “*Schistosoma mansoni* and epiisopiloturine”, observa-se que a primeira publicação sobre esse alcaloide epiisopiloturina é de Voightnder et al., (1978), três décadas depois a partir de 2012, o número de publicações para esse mesmo alcaloide tem se mantendo constante principalmente aliado a seu potencial contra a esquistossomose, publicado por Veras et al., (2012), e vem cada vez mais sendo demonstrando nos últimos anos como um possível novo fármaco contra esta doença (Figura 5).

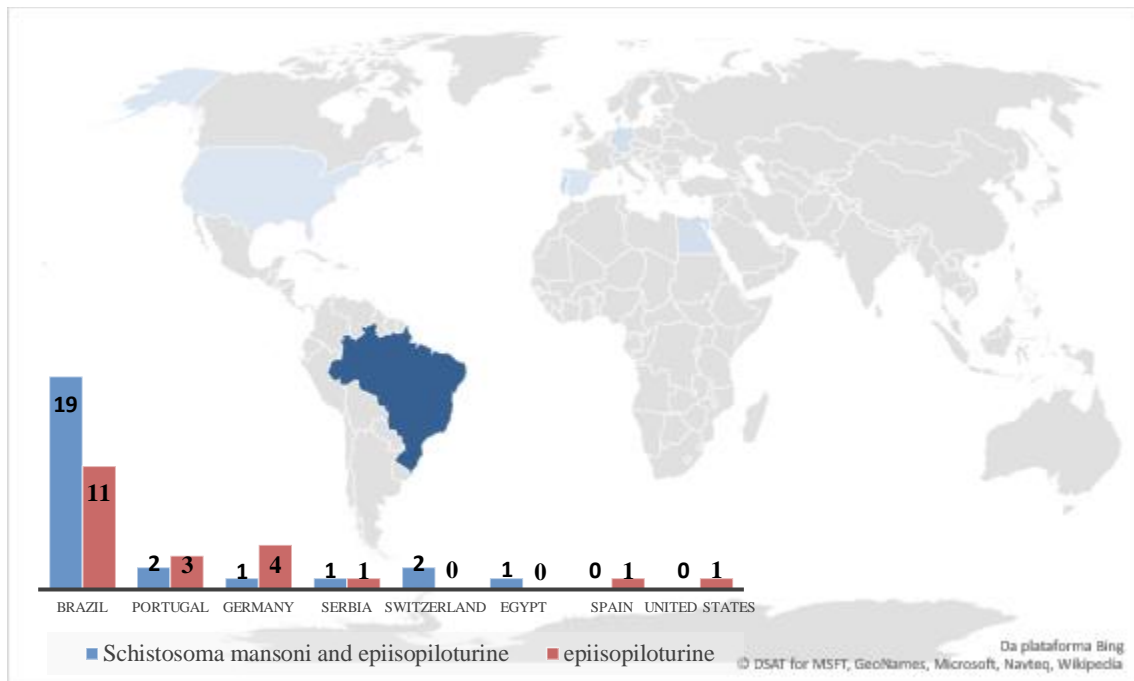
Figura 5: Artigos publicados com os termos “epiisopiloturine” e “*Schistosoma mansoni* and epiisopiloturine” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.



Fonte: Rocha (2017).

Entre os países com o maior ranking de publicações com o termo “epiisopiloturine” e o termo cruzado “*Schistosoma mansoni* and epiisopiloturine”, observa-se que o Brasil com maior quantidade de publicações que se aplica o estudo da epiisopiloturina contra a esquistossomose (Figura 6).

Figura 6: Países com maior ranking de publicações com o termo “epiisopiloturine” e “*Schistosoma mansoni* and epiisopiloturine” na base de pesquisa *Scopus* até o ano de 2016.



Fonte: Rocha (2017).

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

Analisando a prospecção tecnológica das patentes depositadas nas bases de dados INPI, USPTO, EPO e DII, utilizando os termos “ruthenium complex”, “*Schistosoma mansoni*” e epiisopiloturine até o ano de 2016, observa-se para o descritor “ruthenium complex” uma maior quantidade de depósitos de patentes com 1.977 na base americana USPTO, seguido de 1.535 em *Web of Science* (DII), 1.131 na base europeia (EPO) e apenas 7 patentes depositadas na base nacional INPI. Da mesma forma acontece com o descritor “*Schistosoma mansoni*”, onde maior número de patentes também é evidente na base americana USPTO com 1.701, seguido de DII com 229, EPO com 48 e novamente a base brasileira INPI com apenas 25 depósitos de patentes. Para o descritor “epiisopiloturine”, apenas na base INPI encontrou-se uma patente. E quando se cruzaram os descritores “ruthenium complex” and “*Schistosoma mansoni*”, não se observou nenhum depósito de patente com estes termos nas bases de dados estudadas até o ano de 2016 (Tabela 2).

Tabela 2: Patentes registradas nas bases de dados INPI, USPTO, EPO e DII, utilizando os termos “ruthenium complex”, “*Schistosoma mansoni*” e epiisopiloturine até o ano de 2016.

	INPI	USPTO	EPO	DII
“ruthenium complex”	7	1977	1131	1535
“ <i>Schistosoma mansoni</i> ”	25	1701	48	229
epiisopiloturine	1	0	0	0
“Ru complex” and “ <i>S. mansoni</i> ”	0	0	0	0

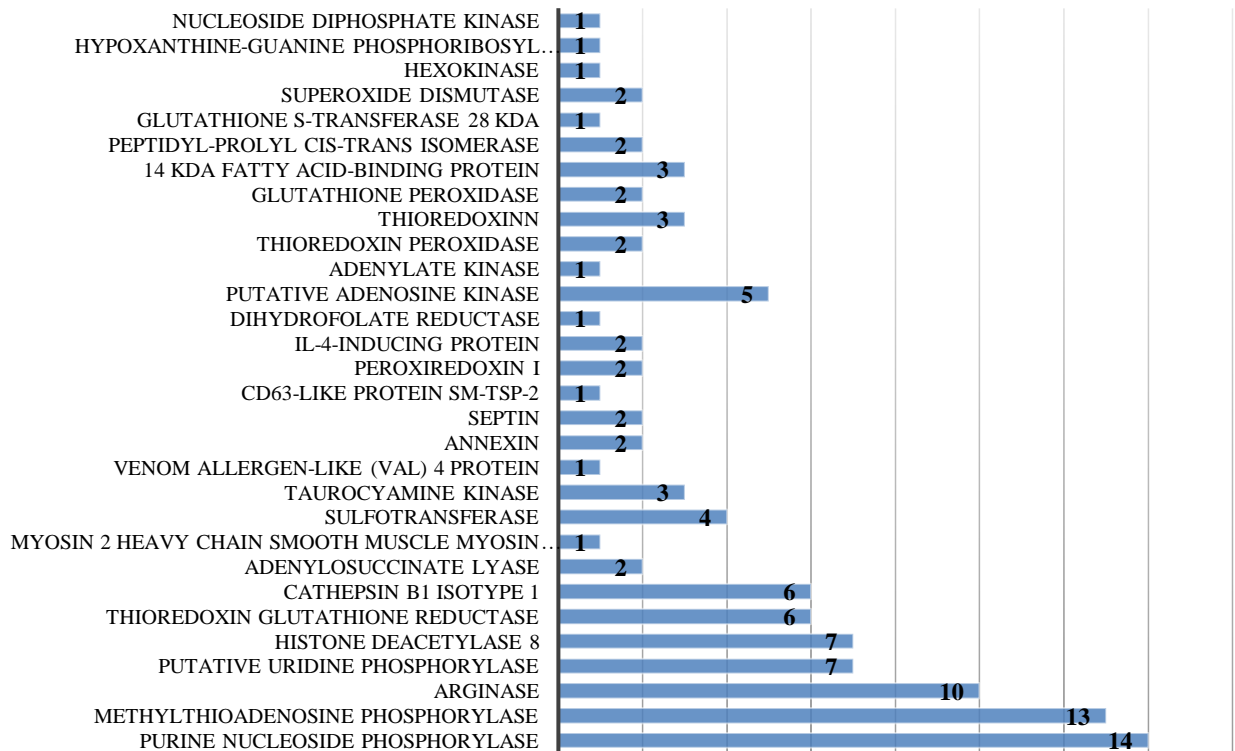
Fonte: Rocha (2017).

Estes resultados evidenciam que o Brasil ainda produz pouca tecnologia de patentes em relação aos complexos metálicos de rutênio e a esquistossomose. Com isso, percebe-se que a produção de patentes pelas instituições brasileiras ainda é uma grande barreira, uma vez que a falta de incentivo à pesquisa devido ao baixo investimento em ciência e tecnologia limita bastante as produções tecnológicas. No entanto, com a patente da epiisopiloturina, o Brasil poderá produzir futuramente um novo potencial fármaco contra a esquistossomose.

PROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS DO PROTEIN DATA BANK

Foram encontrados 108 códigos de estruturas proteicas relacionadas a 30 enzimas do organismo *S. mansoni* depositadas no Protein Data Bank (PDB) até o ano de 2016 (Figura 7; Tabela 3).

Figura 7: Quantidade de enzimas depositadas no banco de dados do Protein Data Bank (PDB) com o termo *Schistosoma mansoni* até o ano de 2016.



Fonte: Rocha (2017).

As enzimas mais estudadas no banco de dados até a presente data foram Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP-14), Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP-13), Arginase (ARG-10), Putative Uridine Phosphorylase (UP-7), Histone Deacetylase 8 (HDAC8-7), Thioredoxin Glutathione Reductase (TGR-6) e Cathepsin B1 Isotype 1 (2CB1-6) (Tabela 3).

Tabela 3: Código das enzimas depositadas no banco de dados do Protein Data Bank (PDB) com o termo *Schistosoma mansoni* até o ano de 2016.

Enzimas	Identificação PDB das enzimas
Purine nucleoside phosphorylase	5CXQ, 5CXS, 3IEX, 3F8W, 3FAZ, 3FB1, 3E9R, 3E9Z, 3E0Q, 3DJF, 3FNQ, 1TCU, 1TCV, 1TD1
Methylthioadenosine phosphorylase	5F78, 5F7Z, 5F73, 5F76, 5F77, 5F7J, 5F7O, 5F7X, 5FAK, 4L6I, 4L5A, 4L5C, 4L5Y
Arginase	4Q3P, 4Q3Q, 4Q3R, 4Q3S, 4Q3T, 4Q3U, 4Q3V, 4Q40, 4Q41, 4Q42
Putative uridine phosphorylase	5CYF, 5CYG, 4TXH, 4TXM, 4TXN, 4TXJ, 4TXL
Histone deacetylase 8	5FUE, 4CQF, 4BZ5, 4BZ6, 4BZ7, 4BZ8, 4BZ9
Thioredoxin glutathione reductase	2X8C, 2X8G, 2X8H, 2X99, 3H4K, 2V6O
Cathepsin B1 isotype 1	4I04, 4I05, 4I07, 3QSD, 3S3Q, 3S3R
Adenylosuccinate lyase	5EYT, 5EYV
Myosin 2 heavy chain smooth muscle myosin essential chain	3JAX
Sulfotransferase	5BYJ, 5BYK, 4MUA, 4MUB
Taurocyamine kinase	4WO8, 4WOD, 4WOE
Venom allergen-like (VAL) 4 protein	4P27
Annexin	4MDU, 4MDV
Septin	4KV9, 4KVA
CD63-like protein Sm-TSP-2	2M7Z
Peroxiredoxin I	3ZL5, 3ZLP
IL-4-inducing protein	4EL6, 4AKA
Dihydrofolate reductase	3VCO
Putative adenosine kinase	4DC3, 3VAQ, 3VAS, 3UQ6, 3UQ9
Adenylate kinase	3UMF
Thioredoxin Peroxidase	3ZTL, 3ZVJ
Thioredoxin	2XC2, 2XBI, 2XBQ
Glutathione Peroxidase	2V1M, 2WGR,
14 kDa fatty acid-binding protein	2POA, 1VYF, 1VYG
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2CK1, 2CMT
Glutathione S-transferase 28 kDa	1U3I
Superoxide dismutase	1TO4, 1TO5
Hexokinase	1BDG
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase	5IPF
Nucleoside diphosphate kinase	5IOL

Fonte: Rocha (2017).

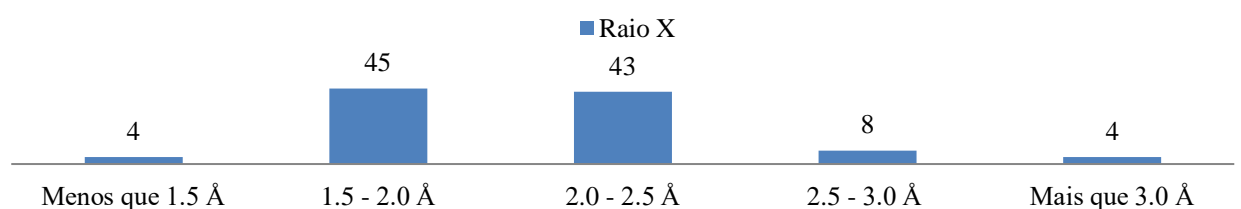
Todas as proteínas têm uma função importante no metabolismo do *S. mansoni*. A proteína Purine nucleoside phosphorylase (PNP) de *S. mansoni* é essencial para a recuperação de bases de purina e nucleosídeos nos esquistossomos (PEREIRA et al, 2005). A proteína Methylthioadenosine

phosphorylase (MTAP) é capaz de usar a adenosina como substrato para a produção de adenina. Provavelmente a única via para a produção da purina, sendo alvo promissor para terapias contra esquistossomose (TORINI et al., 2016). A proteína arginase (ARG) é uma loenzima de metal manganês binuclear que catalisa a hidrólise da L-arginina para formar L-ornitina e ureia. Esta enzima regula todas as formas do parasita que interagem com o hospedeiro humano. Atualmente acredita-se que esta enzima desempenhe um papel na resposta imune parasitária onde decompondo a L-arginina afeta os processos de biossíntese do NO (HAI et al., 2014).

A proteína Putative uridine phosphorylase (UP) é um membro da família do nucleosídeo fosforilase 1 que catalisa a fosforilase da ligação N-ribossídica de uridina/timidina, para produzir ribose-1-fosfato e uracila/timina. Essa capacidade confere a enzima UP um importante papel metabólico intracelular, o que inclui proteção contra isquemia, metabolismo lipídico e acetilação de proteínas (SILVA-NETO et al, 2016). A proteína Histone deacetylase 8 (HDAC8) de *S. mansoni* é uma acetil-L-lisina desacetilase que desempenha um papel fundamental na infecciosidade do parasita (STOLFA et al., 2014). Já a proteína Thioredoxin glutathione reductase (TGR) é uma flavoenzima quimérica com um domínio Glutaredoxina (GRX) ligado a Thioredoxina redutase (TR) expressa no *S. mansoni* relacionada à desintoxicação e sobrevivência do parasita no organismo do hospedeiro (ANGELUCCI et al, 2008). A proteína Cathepsin B1 isotype 1 (2CB1) é uma peptidase associada aos inibidores de proteases na fonte de nutrientes. E atualmente é investigada como alvo de fármacos (JILKOVA et al, 2011).

Grande parte das proteínas apresenta um tamanho na resolução das difrações de raios-X de 1,5 a 2,0 Å com 45 enzimas e de 2,0 a 2,5 com 43 enzimas (Figura 8).

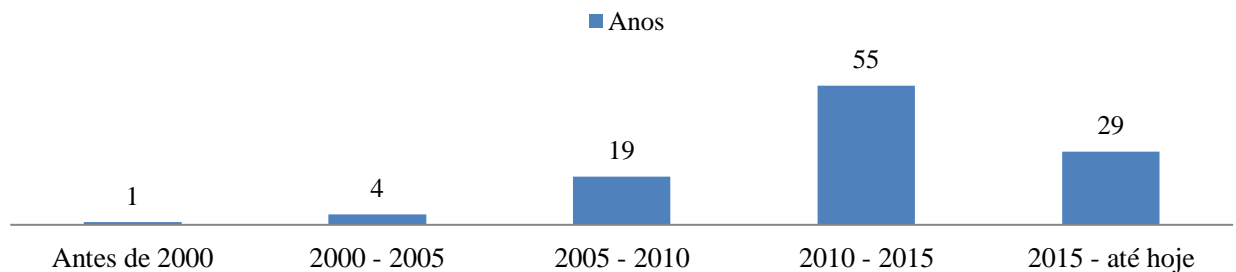
Figura 8: Resolução da difração de raios-X das enzimas no banco de dados do Protein Data Bank (PDB) com o termo *Schistosoma mansoni* até o ano de 2016.



Fonte: Rocha (2017).

A quantidade de publicações que depositaram as proteínas no banco de dados do PDB com o termo *S. mansoni* tiveram início crescente no começo dos anos 2000 e teve o auge de publicações entre 2010 e 2015 com 55 enzimas depositadas. No entanto, após 2015 essa quantidade reduziu quase metade comparada aos anos de 2010-2015 nos quais obtiveram os maiores índices. Isso mostra o crescente aumento das pesquisas na área de bioinformática e química quântica computacional que tem trazido essas novas ferramentas de pesquisa para o estudo das doenças negligenciadas (EWING et al., 2001) (Figura 9).

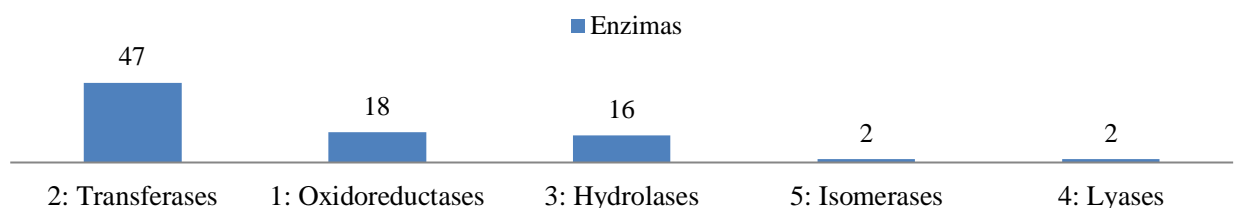
Figura 9: Anos de publicação das enzimas no banco de dados do Protein Data Bank (PDB) com o termo *Schistosoma mansoni* até o ano de 2016.



Fonte: Rocha (2017).

Em relação os tipos de reação que catalisam, as enzimas foram classificadas no banco de dados do PDB onde 47 delas são transferases (enzimas que catalisam a transferência de grupos entre duas moléculas), 18 são oxireductases (enzimas que catalisam reação de oxidação-redução), 16 são hidrolases (catalisam a reação de hidrólise de várias ligações covalentes), 2 são isomerases (catalisam a modificação de uma única molécula, sem participação de outra) e 2 são liases (catalisam a clivagem de ligações C-C, C-O, C-N, entre outras, através de hidrólise ou oxidação). (NC-IUBMB, 1992) (Figura 10).

Figura 10: Classificação das Enzimas no banco de dados do Protein Data Bank (PDB) com o termo *Schistosoma mansoni* até o ano de 2016.



Fonte: Rocha (2017).

CONCLUSÕES

As pesquisas com *Schistosoma mansoni* e complexo de rutênio estão bem avançadas no que diz respeito às publicações de artigos e patentes, mas quando foca-se o uso em conjunto, os trabalhos se mostraram bastante escassos.

Quando relacionadas à esquistossomose é necessário focar na descoberta de novas drogas mais eficazes para o seu tratamento, pois ela acomete os países mais pobres de todo o planeta, e para isso, o uso de complexos metálicos de rutênio que é um carreador, poderá ser um promissor aliando tanto o seu uso como o ligante epiisopiloturina como um possível novo fármaco sendo este mais eficaz contra a esquistossomose.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, e ao Governo do Estado do Maranhão e a Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação – SECTI pelo apoio com a bolsa estudo, como também a Universidade Federal do Maranhão – UFMA, pelo incentivo.

REFERÊNCIAS

ANGELUCCI, F.; MIELE A. E.; BOUMIS G.; DIMASTROGIOVANNI D.; BRUNORI M.; BELLELLI A. Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad: The structure of *Schistosoma mansoni* thioredoxin glutathione reductase. **Proteins**, v. 72, p. 936–945, 2008.

ARAÚJO, K. S.; SOUSA S. F.; SOUSA A. A. A.; SILVA J. S.; ROCHA J. A. Prospecção científica e tecnológica da dengue no Brasil e no Maranhão no período de 1994 a 2014. **Caderno de Prospecção**, v. 9, n. 3, p. 337-346, 2016.

BAPTISTA, A. P.; ANDRADE Z. A. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 183-185, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf>.

Acesso em: 24 nov. 2017.

CORREA, M. O. Incidence of schistosomiasis mansoni in immigrants from other states. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 13, n. 2, p. 91-98, 1953.

DELGADO, R.; FÉLIX, V.; LIMA, L. M. P.; PRICE, D. W. Metal complexes of cyclen and cyclam derivatives useful for medical applications: a discussion based on thermodynamic stability constants and structural data. **Dalton Transactions**, v. 26, p. 2734-2745, 2007.

EWING, T. J.; MAKINO, S.; SKILLMAN, A. G.; KUNTZ, I. D. DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 15, n. 5, p. 411-421, 2001.

GUIMARÃES, M. A.; OLIVEIRA, R. N.; VÉRAS, L. M. C.; LIMA, D. F.; CAMPELO, Y. D. M.; CAMPOS, S. A.; KUCKELHAUS, S. A. S.; PINTO, P. L. S.; EATON, P.; MAFUD, A. C.; MASCARENHAS, Y. P.; ALLEGRETTI, S. M.; MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. 1-18, 2015.

HAI, Y.; EDWARDS, J. E.; VAN ZANDT, M. C.; HOFFMANN, K. F.; CHRISTIANSON, D. W. Crystal Structure of *Schistosoma mansoni* Arginase, a Potential Drug Target for the Treatment of Schistosomiasis. **Biochemistry**, v. 53, p. 4671- 4684, 2014.

JÍLKOVÁ, A.; REZÁCOVÁ, P.; LEPSÍK, M.; HORN, M.; VÁCHOVÁ, J.; FANFRLÍK, J.; BRYNDA, J.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C.; MARES, M. Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 41, p. 35770–35781, 2011.

MORAES, J. Antischistosomal natural compounds: Present challenges for new drug screens. In: RODRIGUEZ-MORALES, A. J, editor. Current topics in tropical medicine. **Rijeka: InTech**. p. 333–358, 2012.

NC-IUBMB- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. [Base de dados – Internet]. Enzyme Nomenclature 1992. Disponível em: <<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em : 24 nov. 2017.

PEREIRA, H. D.; FRANCO, G. R.; CLEASBY, A.; GARRATT, R. C. Structures for the Potential Drug Target Purine Nucleoside Phosphorylase from *Schistosoma mansoni* Causal Agent of Schistosomiasis. **Journal of Molecular Biology**. v. 353, n. 3, p. 584–599, 2005.

SEVDIC, D.; MEIDER, H. Macrocyclic polythiaethers as solvent extraction reagents—IV Ag(I) and Hg(II) complexes with 1,4,7,10,13,16-hexathiacyclooctadecane. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 153-157, 1981.

SILVA NETO, A. M.; SOUZA, J. R. T.; ROMANELLO, L.; CASSAGO, A.; SERRAO, V. H. B.; DEMARCO, R.; BRANDAO-NETO, J.; GARRATT, R. C.; PEREIRA, H. D. Analysis of two *Schistosoma mansoni* uridine phosphorylases isoforms suggests the emergence of a protein with a non-canonical function. **Biochimie**, v. 125, p. 12-22, 2016.

SOUTHAM, H. M.; BUTLER, J. A.; CHAPMAN, J.A.; POOLE, R. K. The microbiology of ruthenium complexes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 71, p. 1–96, 2017.

SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; FARIA, J. R. F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínicas Médicas**. v. 9, p. 300-307, 2011.

STOLFA, D. A.; MAREK, M.; LANCELOT, J.; HAUSER, A. T.; WALTER, A.; LEPROULT, E.; MELESINA, J.; RUMPF, T.; WURTZ, J. M.; CAVARELLI, J.; SIPPL, W.; PIERCE, R. J.; ROMIER, C.; JUNG, M. Molecular Basis for the Antiparasitic Activity of a Mercaptoacetamide Derivative That Inhibits Histone Deacetylase 8 (HDAC8) from the Human Pathogen *Schistosoma mansoni*. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 20, p. 3442–3445, 2014.

TORINI, J. R.; BRANDÃO-NETO, J.; DEMARCO, R.; PEREIRA, H. D. Crystal Structure of *Schistosoma mansoni* Adenosine Phosphorylase/ 5'-Methylthioadenosine Phosphorylase and Its Importance on Adenosine Salvage Pathway. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 10, n. 12, p. 1-25, 2016.

VERAS, L. M.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R.; MORAES, J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**. v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

VERAS, L. M. C.; CUNHA, V. R. R.; LIMA, F. C. D. A.; GUIMARÃES, M. A.; VIEIRA, M. M.; CAMPELO, Y. D. M.; SAKAI, V. Y.; LIMA, D. F.; CARVALHO JUNIOR, P. S.; ELLENA, J. A.; SILVA, P. R. P.; VASCONCELOS, L. C.; GODEJOHANN, M.; PETRILLI, H. M.; CONSTANTINO, V. R. L.; MASCARENHAS, Y. P.; LEITE, J. R. S. A. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **Plos One**, v. 8, p. 1-11, 2013.

VOIGTLANDER, H. W.; BALSAM, G.; ENGELHARDT, M.; POHL, L. 1978. Epiisopiloturin, ein neues Pilocarpus-Alkaloid. **Archivies Pharmacal Research**, v. 311, n. 11, p. 927 – 935, 1978.

World Health Organization (WHO). Schistosomiasis. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

**Química quântica computacional, modelagem molecular e predições por
ADMET de alcaloides imidazólicos de *Pilocarpus microphyllus* com
propriedades esquitossomicidas**

Artigo submetido à revista *The Journal of Physical Chemistry A* (12/01/2018)
ISSN: 1089-5639
Qualis Capes: Biotecnologia (A2)
Fator de impacto: 2.84

Capítulo II

**QUÍMICA QUÂNTICA COMPUTACIONAL, MODELAGEM MOLECULAR E
PREDIÇÕES POR ADMET DE ALCALOIDES IMIDAZÓLICOS DE *Pilocarpus
microphyllus* COM PROPRIEDADES ESQUITOSSOMICIDAS**

Jefferson Almeida Rocha ^{a,b}; Nayra da Costa e Silva Rego ^a; Francisco Ivan da Silva ^c; Jose Antonio de Sousa ^c; Ricardo Martins Ramos ^d; Ionara Nayana Gomes Passos ^b, Josue de Moraes ^e, Jose Roberto de Sousa Almeida Leite ^f; Francisco da Chagas Alves Lima ^c

^a Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, RENORBIO, Ponto focal UFPI, Teresina, Piauí, Brasil;

^b Grupo de Pesquisa em Ciências Naturais e Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Grajaú, MA, Brasil;

^c Grupo de Pesquisa em Química Quântica Computacional e Planejamento de Fármacos, Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, PI, Brasil;

^d Laboratório de Pesquisa em Sistemas de Informação, Departamento de informação, Ambiente, Saúde e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil;

^e Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade Guarulhos, NPDN/UNG, Guarulhos, SP, Brasil;

^f Área Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brasil.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença que tem acometido 200 milhões de pessoas em todo o mundo, além disso, possui um único medicamento utilizado como tratamento. A química computacional tem trazido novas ferramentas que predizem propriedades moleculares relacionadas a um potencial farmacológico. Esse trabalho teve como objetivo realizar um estudo teórico, em nível de Teoria do Funcional da Densidade (DFT), dos alcaloides imizadolicos de *Pilocarpus microphyllus* com propriedades esquistossomicidas. Foram avaliadas as propriedades geométricas, eletrônicas, cargas atômicas, bem como as propriedades

vibracionais e termodinâmicas das moléculas epiisopiloturina (EPI), epiisopilosina (EPIIS), isopilosina (ISOP), pilosina (PILO) e macaubina (MAC), utilizando os modelos (B3lyp/sdd, B3lyp/6-31+g**, B3lyp/6-311++g**). O perfil de ADMET (administração, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) foi aplicado para obtenção das propriedades farmacocinética e farmacodinâmica dos alcaloides. Após a “otimização”, as moléculas foram submetidas a cálculos de docagem molecular com as enzimas purina nucleósideo fosforilase, tiredoxina glutationa redutase, metiladenosina fosforilase, arginase, uridina fosforilase, catepsina B1 e histona desacetilase 8, possíveis alvos de *S. mansoni*. Os resultados mostraram que o modelo B3lyp/6-311++g** foi o mais satisfatório ao descrever todas as propriedades geométricas, eletrônicas e vibracionais estudadas. Foi possível confirmar a isomeria ótica entre epiisopilosina, isopilosina e pilosina e seu rearranjo através dos ângulos diedros. Os resultados termodinâmicos mostraram que a epiisopiloturina e epiisopilosina são os isômeros mais estáveis, entretanto o ligante EPIIS obteve melhor interação com as enzimas estudadas na docagem molecular corroborando com os estudos experimentais contra esquistossomose.

Palavras-chave: alcaloides imidazólicos, *Pilocarpus microphyllus*, *Schistosoma mansoni*, cálculos DFT.

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença negligenciada causada pelo parasita trematódeo do gênero *Schistosoma*. Essa doença está registrada em 54 países afetando aproximadamente 240 milhões de pessoas e mais de 700 milhões pessoas vivem em áreas endêmicas (WHO, 2017). A infecção é prevalente em comunidades mais pobres abrangendo áreas tropicais e subtropicais. O praziquantel é o único medicamento utilizado no controle da doença criado na década de 70. Além disso, tem demonstrado que é ineficaz contra o estágio larval do parasita e tem trazido resistência devido a altas concentrações profiláticas da droga sem diagnóstico do estágio de maturidade do verme (MORAES, 2015; LAGO et al., 2017).

Aliando a interdisciplinaridade no estudo das doenças negligenciadas, a química medicinal é uma nova área da pesquisa que envolve o planejamento racional, avaliação e síntese de novos fármacos com a interpretação de seu modo

de ação em nível molecular e a comparação do seu efeito biológico a partir da estrutura molecular (MAFUD et al., 2016). Como complemento a essa área de estudo, a química quântica computacional trouxe novas ferramentas que possibilitaram estudos de modelagem e dinâmica molecular que simulam testes biológicos e criam novas possibilidades de modelos de drogas, sem a necessidade de desperdício de solventes e reagentes (EWING et al., 2001).

Entre os candidatos a novos fármacos existem os alcaloides imidazólicos presentes na espécie *Pilocarpus microphyllus* que têm sido descritos na literatura por possuir atividade esquistossomicida (VERAS et al., 2013; ROCHA et al., 2017; GUIMARAES et al., 2015). Os alcaloides são metabólitos secundários encontrados principalmente em plantas, onde a maioria funciona na defesa contra predadores e patógenos (HENRIQUES et al., 2000).

Os alcaloides utilizados nesse estudo mostram que a epiisopiloturina (EPI) é a mais caracterizada. A EPI identificada inicialmente na década de 70 (VOIGHTNDER et al., 1978), foi isolada e caracterizada quimicamente onde evidenciou seu potencial farmacológico contra *S. mansoni* (VERAS et al., 2012; VERAS et al., 2013; GUIMARAES et al., 2015; CAMPELO et al., 2017). Posteriormente outras funções biológicas foram descritas como anti-inflamatória e anticoncepcional (SILVA et al., 2013) e efeito *gastroprotetor* (NICOLAU et al., 2017). O alcaloide epiisopilosina (EPIIS) e isopilosina (ISOP) também foi descrito por possuir ação farmacológica contra *S. mansoni* (ROCHA et al., 2017). Macaubina (MAC) foi o único alcaloide que não apresentou efeito contra esquistossomose (ROCHA, 2013). E pilosina (PILO) ainda não foi testado contra esquistossomose.

Entre esses alcaloides em estudo, pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação contra *S. mansoni*, como essas moléculas interagem com as possíveis enzimas do verme, que reações farmacológicas poderiam desencadear, e como a sua estrutura química pode viabilizar o efeito biológico efetivo contra esta doença. Deste modo, aliar o uso das ferramentas em química quântica computacional ao estudo desta doença negligenciada que tem matado 280.000 pessoas em todo o mundo, por possuir um único medicamento utilizado como tratamento que tem causado sua resistência, motivou o desenvolvimento deste trabalho que tem como objetivo realizar um estudo teórico com propriedades geométricas, eletrônicas e vibracionais, docagem molecular e predições de ADMET dos alcaloides imizadolicos de *P. microphyllus* com propriedades esquistossomicidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Detalhes computacionais

A geometria dos alcaloides, propriedades eletrônicas e vibracionais foram estudadas usando o programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). O programa Gaussview 5.0.8 (DENNINGTON et al., 2008) foi utilizado para obter modelos estruturais em 3D. Os cálculos de otimização geométrica foram realizados de acordo com o método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) (KOHN et al., 1965), combinando a base B3LYP (LEE et al., 1998; BECKE et al., 1993) e os conjuntos funcionais híbridos *sdd*, *6-31+g*** e *6-311++g*** (MCLEAN; CHANDLER, 1980; RAGHAVACHARI et al., 1980). Os cálculos de frequência foram realizados para obter propriedades termodinâmicas e para verificar se cada “otimização” atingiu um mínimo de energia.

Os descritores químicos quânticos extraídos diretamente do arquivo de saída Gaussian foram: Mulliken, Natural Bond Orbitais (NBO) e Chelpg, densidade eletrônica, momento dipolo, energia do orbital molecular ocupado mais alto (E_{HOMO}) e energia do menor orbital molecular desocupado (E_{LUMO}). (PARR et al., 1999; ZHAN et al., 2003). Todos os cálculos foram realizados na fase gasosa. A teoria funcional da densidade dependente do tempo (TDDFT) foi utilizada para calcular as energias e intensidades das transições eletrônicas (CASIDA et al., 1995; STRATMANN et al., 1998). As transições eletrônicas calculadas, infravermelho e Raman foram computadas usando funções gaussianas com meia largura de 25.000 cm^{-1} com o programa Swizard (GORELSKY, 2009).

Predições de ADMET

A farmacocinética teórica *in silico* é uma abordagem atualmente muito utilizada no estudo inicial das propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) que tem como objetivo diminuir o gasto desnecessário em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos futuros, economizando tempo e investimento (KADAN; ROY, 2007). Foi realizada a predição computacional de parâmetros farmacêuticos através dos softwares gratuitos *on line* Pre-ADMET® e FAF-Drugs4®.

Foi utilizada a metodologia *in silico* com as moléculas EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC incluindo: parâmetros físico-químicos, perfil drug-likeness, perfil farmacocinético (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção) e toxicidade.

Docagem Molecular

As estruturas 3D de todos os possíveis alvos de *S. mansoni* foram obtidas no banco de dados de proteínas (PDB) (Protein Data Bank, 2017) com os códigos (3QSD, 4Q3P, 4CQF, 4L5A, 1TCU, 2V6O, 4TXH). Os cálculos de docagem molecular foram realizados com o programa Autodock 4.2 (GOODSELL; MORRIS, 1996; GOODSELL, 2005; MORRIS et al., 2008). As proteínas e ligantes foram preparados as para docagem molecular utilizando o programa com Autodock Tools (ADT), versão 1.5.6 (SANNER, 1999). O receptor foi considerado rígido enquanto que cada ligante foi considerado flexível. As cargas parciais Gasteiger (GASTEIGER & MARSILI, 1980) foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Os átomos de hidrogênio não polares de proteínas e ligantes foram subsequentemente mesclados. Foi gerada uma caixa cúbica de 60 x 60 x 60 pontos com resolução de 0,35 Å entre os pontos do grid para todo o alvo da proteína. Os centros dos grids de afinidade foram definidos a partir das coordenadas dos átomos dos resíduos Asp158 para ARG, Ala118 para PNP, Asp230 para MTAP, Tyr341 para HDAC8, Gln201 para UP, Tyr296 para TGR e Cys100 para 2CB1. O algoritmo genético Lamarckiano (LGA) com busca global (MORRIS et al., 1998) e pseudo-Solis e Wets com busca local (SOLIS, 1981) foram os métodos utilizados na docagem molecular. Cada simulação consistiu de 100 corridas independentes (RAMOS et al., 2012). O resto dos parâmetros de docagem foi definido com os valores padrão. As análises da docagem molecular foram concentradas nos clusters de menor energia. A conformação de menor energia combinada com inspeção visual foi escolhida para uma análise mais detalhada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detalhes computacionais

Os alcaloides imidazólicos utilizados nesse estudo têm estrutura química ilustrados na Figura 1. É possível observar quatro formas isômeras entre os alcaloides EPI, EPIIS, ISOP e PILO ($C_{16}H_{18}N_2O_3$), ocorrendo ainda à presença de uma isomeria óptica entre os alcaloides EPIIS, ISOP e PILO expressamente observada na rotação dos átomos do C4 e C9 (confômeros), e nos carbonos quirais C5, C7 e C8 corroborando com os dados apresentados em estudos experimentais (ROCHA et al., 2017).

As cargas atômicas dos alcaloides em estudo estão representadas na Tabela 01 pelo modelo teórico B3lyp/6-311++g**. A ligação entre o C2-N1 é covalente, portanto existe o compartilhamento de elétrons entre eles. Contudo, o átomo de nitrogênio é mais eletronegativo e, portanto, atrai para si mais densidade eletrônica, devendo concentrar maior densidade eletrônica. As cargas NBO (*Natural Bond Orbital*) em todos os ligantes (EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC) apresentaram valores de cargas negativas, enquanto que para os métodos Chelpg e Mulliken as cargas foram preditas positivas (Tabela 1). (Todos os outros modelos teóricos são mostrados nas Tabelas A1 e A2 nos apêndices)

Ao observar a ligação entre o O2=C6-O1, verifica-se que as cargas descritas utilizando como método as cargas de Mulliken não descreveram bem, uma vez que existe coerência entre essas cargas por apresentar valores negativos para todos os átomos na ligação incluindo o C7. A natureza do tipo de ligação pode ser o fator determinante nestas cargas que o método Mulliken não consegue descrever com precisão (Tabela 1). O método NBO novamente melhor descreveu a carga nessa ligação.

A ligação C8-O3 apresentou valores negativos em todos os ligantes para o átomo de O3 nos três tipos de cargas testadas. Já o C8 apresentou com NBO sempre carga positiva independente do isômero. Porém nos isômeros ISOP e PILO com os métodos Chelpg e Mulliken, apresentaram cargas negativas o que não corrobora com o NBO e com as próprias eletronegatividade dos átomos (Tabela 1).

Figura 1: Estruturas químicas “otimizadas” dos alcaloides. a) EPI, b) EPIIS, c) ISOP, d) PILO e e) MAC.

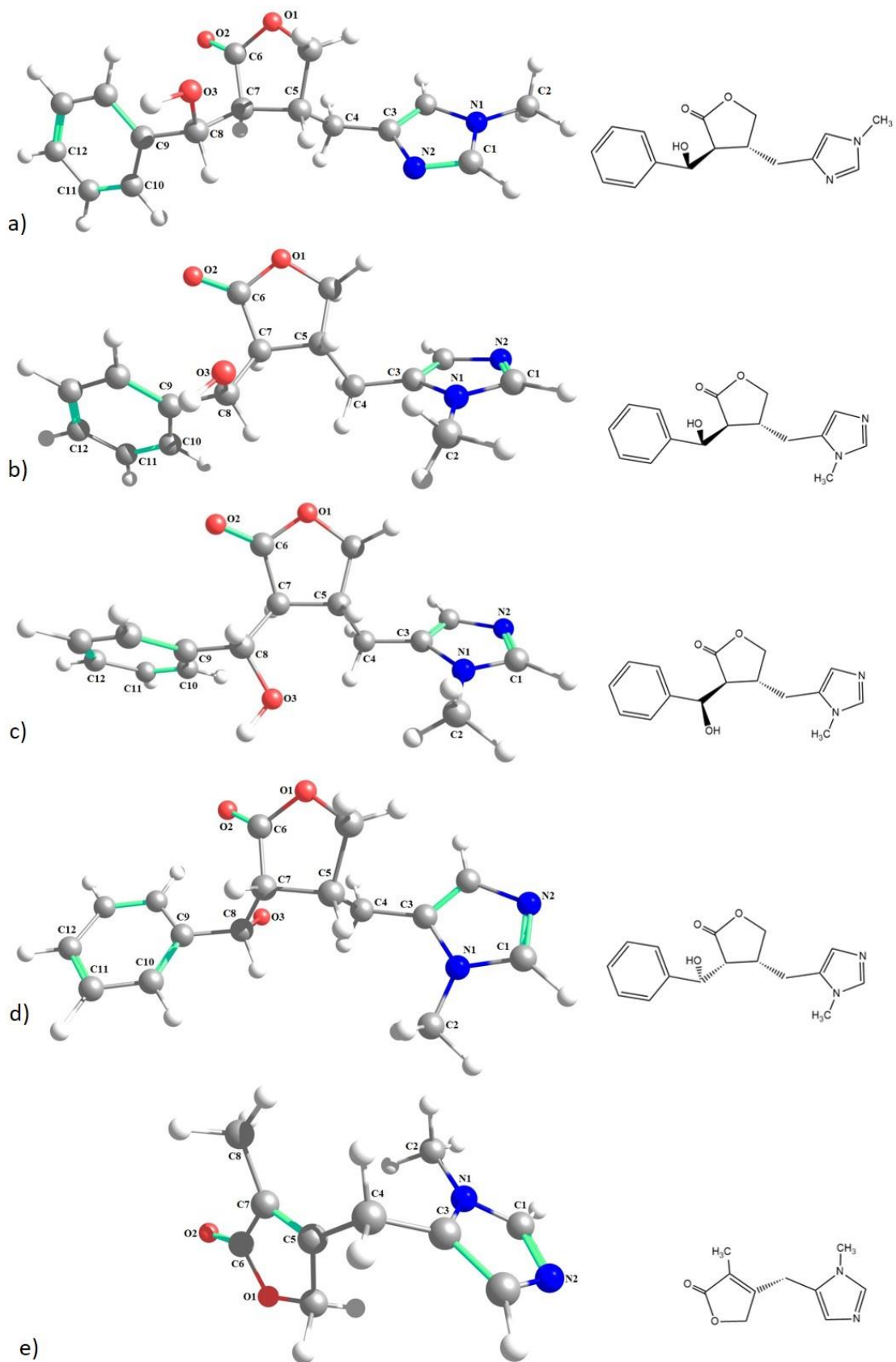


Tabela 1: Cargas atômicas (em unidades atômicas, a.u) pelos métodos Mulliken, Chelpg e NBO dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC. utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++g**.

	EPI			EPIIS			ISOP			PILO			MAC		
	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull
N1	0,105	-0,406	0,017	0,063	-0,415	0,005	0,115	-0,415	0,014	0,113	-0,417	0,005	0,098	-0,414	-0,003
N2	-0,577	-0,513	0,096	-0,562	-0,492	-0,104	-0,572	-0,493	-0,099	-0,592	-0,492	-0,110	-0,543	-0,490	-0,107
O1	-0,456	-0,547	-0,009	-0,429	-0,544	-0,016	-0,414	-0,543	-0,023	-0,441	-0,547	-0,025	-0,452	-0,543	-0,088
O2	-0,572	-0,576	-0,256	-0,526	-0,564	-0,291	-0,522	-0,565	-0,284	-0,545	-0,566	-0,275	-0,548	-0,570	-0,307
O3	-0,564	-0,746	-0,207	-0,593	-0,741	-0,210	-0,541	-0,751	-0,142	-0,568	-0,735	-0,177	-	-	-
C1	0,115	0,218	0,259	0,188	0,211	0,081	0,197	0,208	0,113	0,190	0,208	0,077	0,174	0,214	0,085
C2	-0,163	-0,347	-0,316	-0,276	-0,352	-0,303	-0,371	-0,352	-0,325	-0,370	-0,350	-0,293	-0,277	-0,353	-0,389
C3	0,439	0,108	0,175	-0,062	0,109	0,467	-0,153	0,112	0,592	-0,182	0,114	0,178	-0,130	0,109	0,481
C4	-0,377	-0,401	-0,984	-0,234	-0,410	-0,694	-0,056	-0,417	-0,792	-0,010	-0,428	-0,341	0,068	-0,447	-1,043
C5	0,223	-0,242	0,079	0,237	-0,240	0,005	0,187	-0,231	-0,095	0,099	-0,223	0,164	0,015	0,024	0,607
C6	0,695	0,817	-0,221	0,639	0,828	-0,060	0,614	0,818	-0,206	0,667	0,822	-0,002	0,741	0,775	-0,071
C7	0,114	-0,319	-0,182	0,123	-0,318	0,082	0,067	-0,318	0,285	0,221	-0,325	-0,463	-0,169	-0,129	0,335
C8	0,145	0,139	0,298	0,108	0,132	0,152	-0,073	0,133	-0,284	-0,014	0,130	0,183	-0,102	-0,600	-0,545
C9	0,091	-0,075	0,767	0,104	-0,075	0,515	0,192	-0,075	1,016	0,156	-0,077	0,706	-	-	-
C10	-0,177	-0,199	-0,319	-0,163	-0,202	-0,034	-0,158	-0,201	-0,231	-0,161	-0,202	-0,110	-	-	-
C11	-0,051	-0,200	-0,311	-0,058	-0,200	-0,432	-0,076	-0,198	-0,511	-0,083	-0,200	-0,451	-	-	-
C12	-0,118	-0,200	-0,446	-0,114	-0,199	-0,339	-0,106	-0,196	-0,382	-0,100	-0,199	-0,351	-	-	-

Os comprimentos de ligação e ângulos de ligação calculados nos três modelos teóricos demonstraram uma pequena diminuição dos valores com o aumento do número de funções de base (Tabela A3, em apêndices), com exceção para o alcaloide EPI que permaneceu com os mesmos valores entre B3lyp/6-31+g** e B3lyp/6-311++g** (Tabela 2).

Entre os alcaloides estudados observa-se que existe uma estrutura química bem regular no anel imidazólico em todos os alcaloides com as distâncias (N1-C2 e N2-C1) e ângulos (N1-C1-N2 e C1-N1-C2) atômicos semelhantes, com uma pequena variação de 1 grau para EPI.

No anel dihidrofurano os ângulos atômicos entre O2=C6-O1 apresentam valores semelhantes em EPI, ISOP e MAC com (122,2°), e entre EPIIS e PILO com (121,9°). A distância da dupla ligação atômica entre O2=C6, foi maior em EPI com (1,207 Å) e menor em EPIIS com (1,196 Å). E a distância da ligação O1-C6 apresentou valores semelhantes em EPIIS e PILO, com (1,360 Å) e EPI e ISOP, com (1,356 Å).

No anel benzênico os ângulos internos apresentaram valores bem similares com uma pequena variação de 1 grau em ISOP.

Observando o C8 quiral que liga o anel benzênico ao anel dihidrofurano, observa-se que a distância O3-C8, foi maior em ISOP (1,440 Å) e menor em PILO (1,427 Å). O ângulo entre O3 – C8 – C7, foi maior também em PILO (108,0°) e semelhantes nos demais alcaloides com (106,3°) EPI e ISOP e (106,5°) EPIIS. Além disso, é possível observar uma expressiva variação no ângulo diedro nos átomos C4 – C5 – C7 – C8 entre os alcaloides com simetria ótica EPIIS (82,4°), ISOP (88,2°) e PILO (41,2°) e entre os átomos C5 – C7 – C8 – O3 com EPIIS (62,2°), ISOP (-45,0°) e PILO (-75,1°) (Tabela 2).

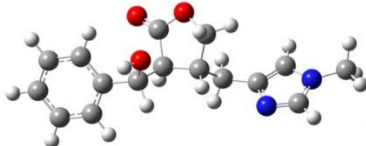
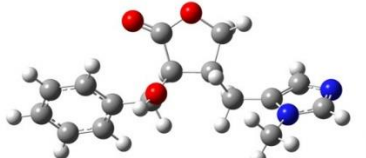
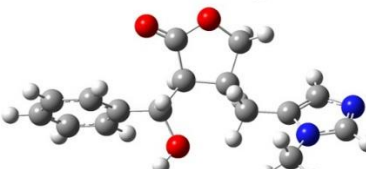
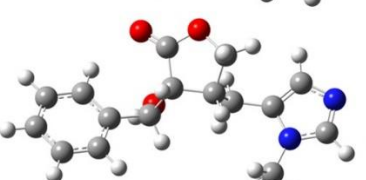
Os resultados experimentais por criatolografia de raios X do alcaloide MAC foi definido por Rocha et al., (2017), onde se observa semelhanças nas distâncias das ligações químicas apresentadas em nossos cálculos teóricos, demonstrado em N1-C2 (1,448 Å), N2-C1 (1,318 Å), O2=C6 (1,210 Å), C6-O1 (1,350 Å), N1 – C1 – N2 (108,3°).

Tabela 2: Distâncias das ligações atômicas (em Angstroms, Å), ângulos atômicos e ângulos diedros (Graus) dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando o modelo teórico b3lyp/6-311++g**.

B3lyp/6-311++G**	EPI	EPIIS	ISOP	PILO	MAC
N1 – C2	1,454	1,454	1,455	1,453	1,455
N2 – C1	1,317	1,311	1,312	1,311	1,312
O2 = C6	1,207	1,196	1,198	1,197	1,201
O1 – C6	1,356	1,360	1,356	1,360	1,371
O3 – C8	1,432	1,429	1,440	1,427	-
N1 – C1 – N2	112,2	112,3	112,3	112,3	112,3
C1 – N1 – C2	126,9	125,7	125,8	125,7	126,0
C3 – C4 – C5	113,3	114,5	114,3	113,7	114,3
O2 = C6 - O1	122,2	121,9	122,1	121,9	122,7
O3 – C8 – C7	106,3	106,5	106,3	108,0	-
C7 – C8 – C9	115,1	115,4	114,1	114,3	-
C8 – C9 – C10	119,2	119,0	120,4	119,1	-
C4 – C5 – C7 – C8	140,7	82,4	88,2	41,2	-
C5 – C7 – C8 – O3	63,3	62,2	-45,0	-75,1	-

As energias relativas entre os alcaloides isômeros demonstraram maior estabilidade para o alcaloide EPI e em relação às outras (Figura 2) (complementada em apêndices, Tabela A4). Nos três modelos teóricos o ranking energético foi semelhante. Entretanto, como já esperado, o modelo B3lyp/6-311++g** mostra que a EPI é mais estável entre os isômeros em comparação a ISOP com cerca de 1,79 kcal mol⁻¹, seguidos da EPIIS com 3,29 Kcal mol⁻¹ e a PILO com 6,16 kcal mol⁻¹. A estabilidade pode sugerir uma maior quantidade de alcaloides entre os isômeros em estudo. A estrutura química desses alcaloides isômeros evidencia a diferença em seu padrão de estabilidade através dos ângulos diedros (Tabela 2), onde o alcaloide PILO por adquirir uma conformação cis, tende a ser menos estáveis em comparação a EPI que é a mais estável por ser trans. Desta forma, alguma reação química provocada pela luz, temperatura ou eletricidade (ATKINS et al., 2012) poderia facilmente converter esses modelos menos estáveis alterando sua conformação para modelos mais trans como a ISOP que é isômera de PILO.

Figura 2: Energias relativas em (kcal mol^{-1}) dos alcaloides isômeros da episopiloturina pelos modelos teóricos B3lyp/sdd, B3lyp/6-31+g** B3lyp/6-311++G**. a) EPI, b) EPIIS, c) ISOP e d) PILO.

	B3lyp/sdd	B3lyp/6-31+G**	B3lyp/6-311++G**
 (a)	0	0	0
 (b)	2,50	3,24	3,29
 (c)	1,59	1,69	1,79
 (d)	4,40	6,20	6,16

A análise dos orbitais moleculares demonstrou um padrão nos valores entre os alcaloides nos três modelos estudados, com uma pequena diminuição dos valores em relação ao aumento das funções de base (Tabela S5). Analisando os resultados obtidos no modelo B3lyp/6-311++g**, observa-se que os GAPs de energia são muito próximos com valores de maior GAP de energia em EPI com 5,85 eV e menor em MAC com 5,13 eV. Os isômeros óticos EPIIS, ISOP e PILO apresentaram GAPs de 5,61 eV, 5,38 eV e 5,46 eV, respectivamente (Figura 3).

Na Figura 3, observa-se que existe uma tendência ao aumento da distância entre o LUMO+1 e o HOMO-1, em relação à diminuição do GAP, de EPI a MAC. A proximidade entre os orbitais facilita a interação entre os elétrons como observado em EPI (6,24 eV), EPIIS (6,26 eV), PILO (6,26 eV), ISOP (6,43 eV) e MAC (6,93 eV). Os orbitais moleculares de fronteira HOMO e LUMO são responsáveis pelas interações biológicas entre ligantes e proteínas (SILVA et al., 2006; PEREIRA et al., 2016).

Os saltos quânticos energéticos entre os orbitais moleculares dos alcaloides foram quantificados (Tabela 3; Figura 4). Para o alcaloide EPI o maior valor da força do oscilador com 0,0229 no comprimento de onda na faixa de 230nm, evidencia um

salto entre 73 (HOMO -3) → 77 (LUMO) com gap de 6,66 eV. No alcaloide EPIIS o maior valor da força do oscilador com 0,0150 em 237nm, evidencia um salto entre 75 (HOMO -1) → 77 (LUMO) com gap de 6,17 eV. Para o alcaloide ISOP o maior valor da força do oscilador com 0,0203 em 249nm, evidencia um salto entre 76 (HOMO) → 77 (LUMO) com gap de 5,38 eV. Para o alcaloide PILO o maior valor da força do oscilador com 0,0034 em 236nm, evidencia um salto entre 76 (HOMO) → 79 (LUMO +2) com gap de 5,62 eV. E MAC o maior valor da força do oscilador com 0,0139, evidencia um salto entre 51 (HOMO) → 52 (LUMO) com gap de 5,13 eV (Tabela 3; Figura 4). Esta abordagem TD-DFT é confiável para descrever as geometrias e propriedades espectrais (LU et al., 2010).

Esses resultados obtidos através dos saltos energéticos corroboram com os resultados obtidos a partir do UV-Vis (Figura 5), onde as bandas do Gráfico representam os mesmos valores dos orbitais moleculares. Os dados espectroscópicos de UV-Vis mostram uma banda de absorção na frequência de aproximadamente 230 nm para EPI, 237 nm (EPIIS), 249 nm (ISOP), 243 nm (PILO) e 281 nm (MAC) (Figure 5). O modelo teórico B3lyp/6-311++G** foi muito semelhante a B3lyp/6-31++G** e o modelo B3lyp/Sdd indicou um comprimento de onda mais distante do que esses dois modelos evidenciados na figura A3, em apêndices.

Figura 3: Gráfico dos orbitais moleculares HOMO e LUMO dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++G**.

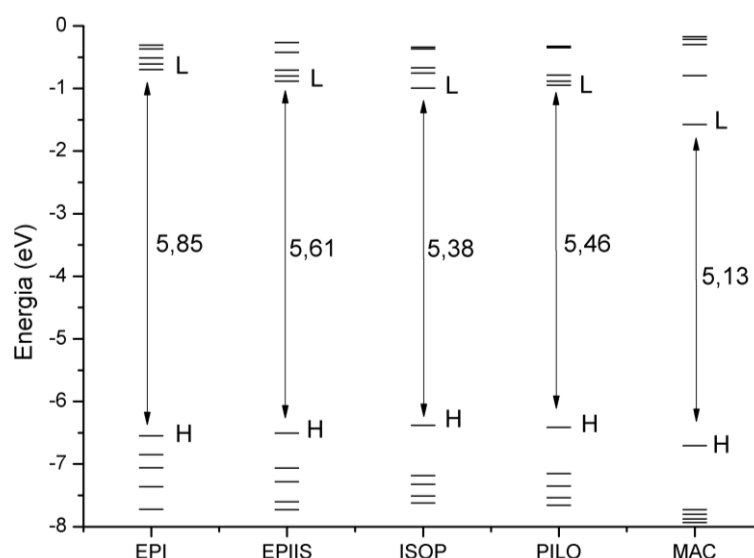


Figura 4: Orbital Molecular HOMO e LUMO em (eV) dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC, utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++g**. Vermelho é mais negativo e o verde mais positivo.

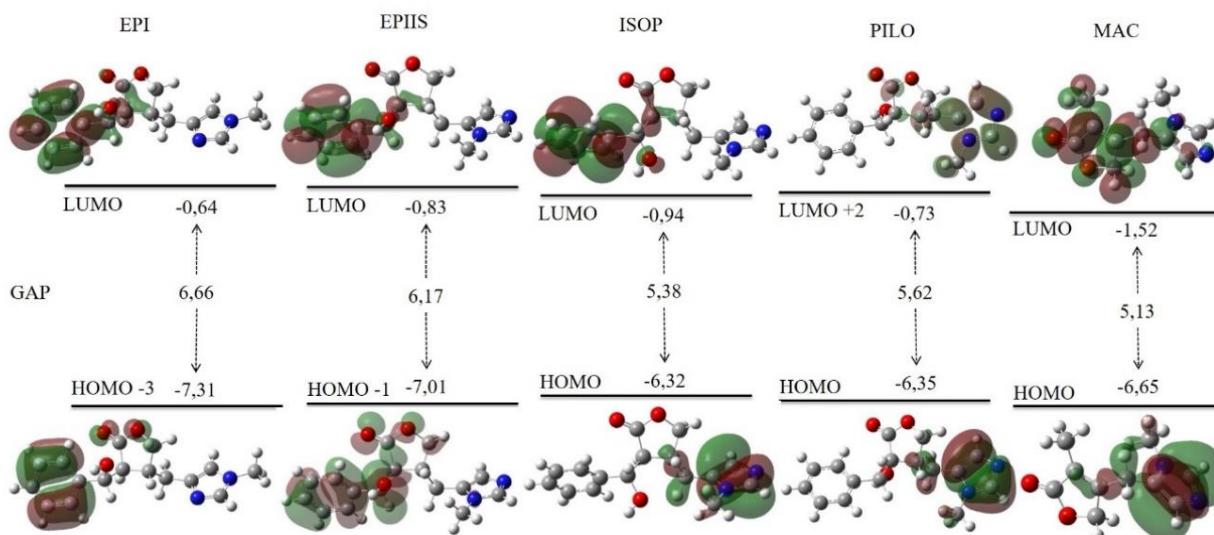
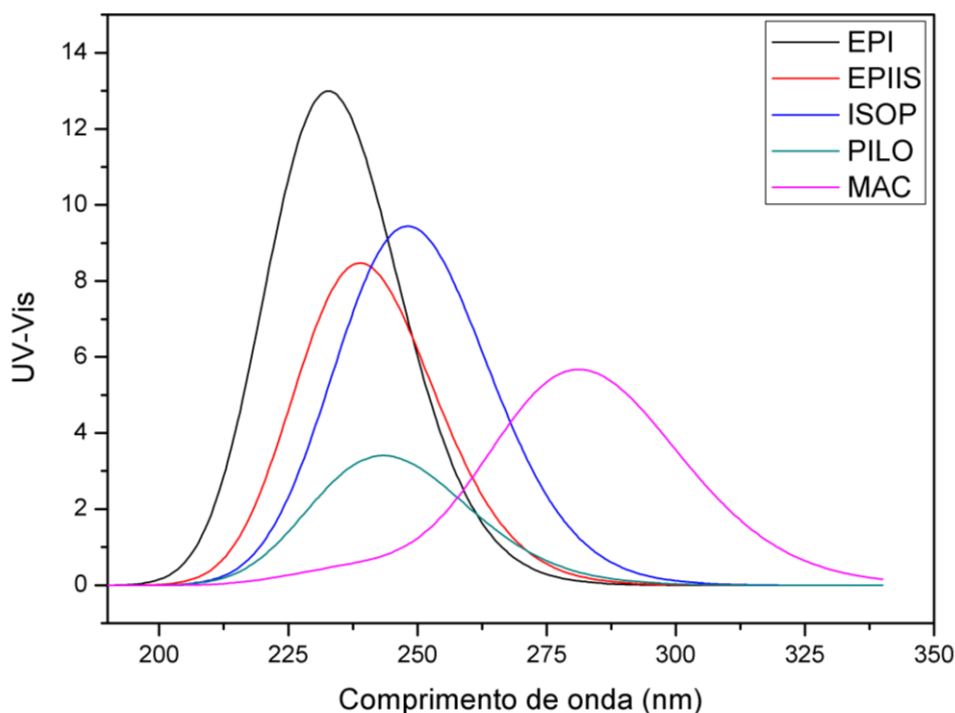


Tabela 3: Principais atribuições de picos do espectro eletrônico, energia e tipos. Calculados pelo Swizard, das formas moleculares EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC. Legenda: TC=Transferência de carga, I=Imizadol, D=dihydrofurano, B=Benzeno.

Comprimento de Onda (nm) / Força do oscilador [f]	Composição	Energia (eV)	Tipo de Transferência de Carga
EPI			
238 [0,0084]	75→79 (28%)	5,20	TC BD-I
237 [0,0021]	76→78 (95%)	5,23	TC I-B
230 [0,0229]	73→77 (18%)	5,38	TC BD-BD
EPIIS			
244 [0,0057]	76→78 (91%)	5,08	TC I-B
238 [0,0008]	76→77 (57%)	5,20	TC I-B
237 [0,0150]	75→77 (37%)	5,23	TC BD-B
ISOP			
249 [0,0203]	76→77 (91%)	4,96	TC I-B
243 [0,0002]	76→79 (62%)	5,10	TC I-I
237 [0,0042]	74→77 (37%)	5,23	TC I-B
PILO			
253 [0,0026]	76→77 (49%)	4,89	TC I-B
243 [0,0034]	76→78 (49%)	5,09	TC I-B
236 [0,0034]	76→79 (24%)	5,23	TC I-I
MAC			
281 [0,0139]	51→52 (98%)	4,40	TC I-D
253 [0,0004]	49→52 (38%)	4,90	TC I-D
237 [0,0010]	51→53 (97%)	5,23	TC I-I

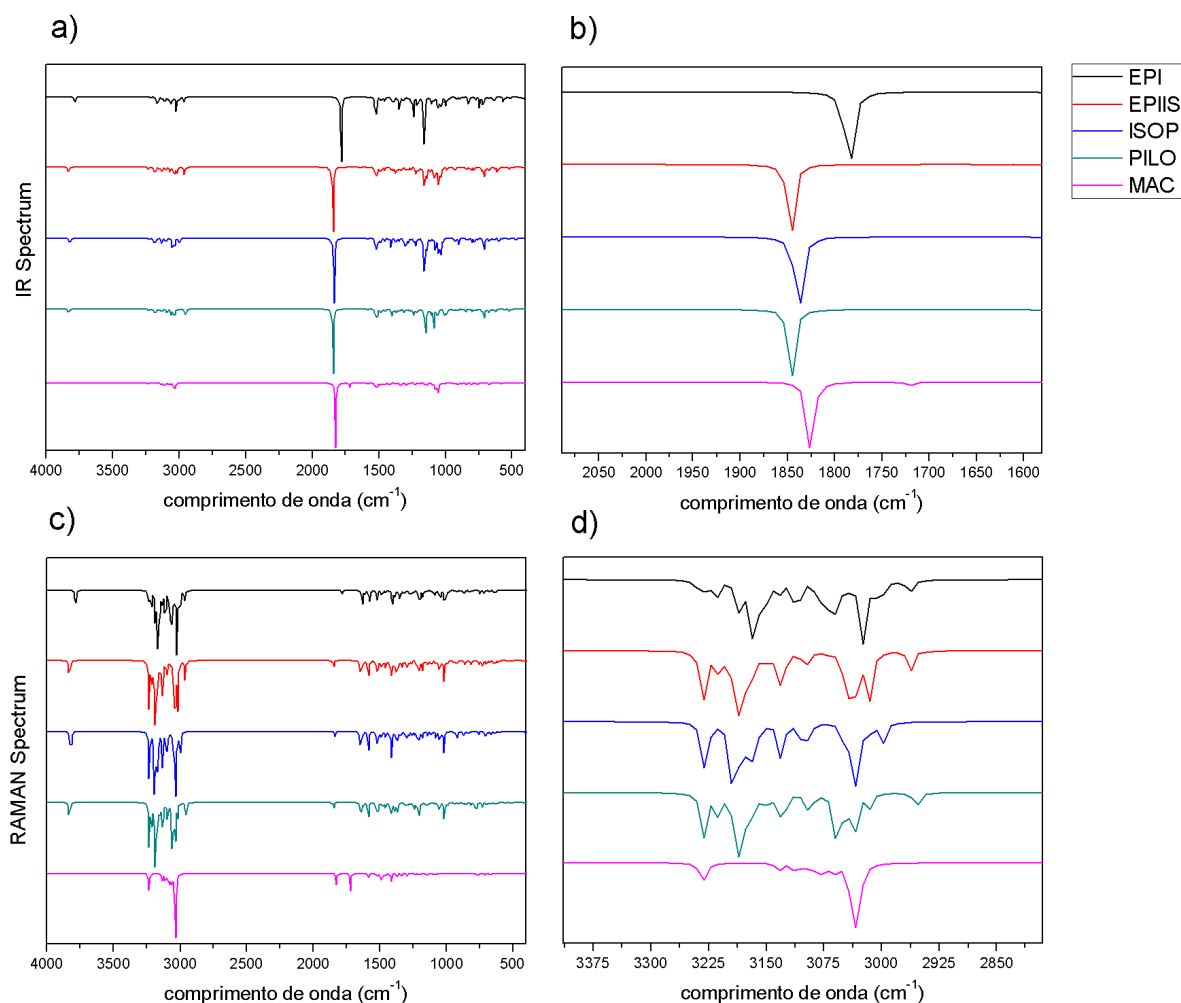
Figura 5: Espectro de UV-Vis dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++G**.



Os espectros de infravermelho são mostrados na Figura 6 (b). Pode ser observada uma similaridade nas frequências vibracionais entre os alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, e PILO o que evidencia suas conformações isoméricas. O estiramento simétrico da carbonila (C=O) apresenta um pico forte na região de 1785 cm^{-1} , 1846 cm^{-1} , 1838 cm^{-1} e 1845 cm^{-1} , para a EPI, EPIIS, ISOP e PILO, respectivamente (Figura 6-a). Uma deformação no anel dihidrofurano representa a segunda maior intensidade em uma frequência entre 1075 cm^{-1} a 1162 cm^{-1} em todos os alcaloides. Seguidos de um estiramento do C-N e deformação do grupo C-H nas frequências entre 1404 cm^{-1} e 1455 cm^{-1} também em todos os alcaloides. O estiramento do grupo OH apresenta um forte pico na região de 3783 cm^{-1} a 3830 cm^{-1} . Esse pico é ausente na MAC, por não possuir esse grupo em sua estrutura (Tabela 4, Figura 6-b). Os menores valores de frequências vibracionais por IR foram identificados em PILO, em comparação aos outros alcaloides, corroborando com os resultados apresentados na Figura 02, que demonstram uma menor estabilidade para este alcaloide (Tabela 4). Para os parâmetros IR e Raman, o modelo teórico B3lyp/6-311++G** foi muito semelhante ao B3lyp/6-311++G**, já o modelo B3lyp/Sdd indicou dados de número de onda mais distantes do que esses dois modelos (Figura A1 e A2).

Os dados experimentais de IR para o alcaloide EPI foram descritos por Veras et al., (2013), sendo alguns destes, alongamento do C=O no dihidrofurano (1769 cm^{-1}), alongamento C-C no imidazol (1568 cm^{-1}), alongamento simétrico N-C-N no imidazol (1524 cm^{-1}), alongamento C-C no benzeno (1472 cm^{-1}) evidenciando uma maior similaridade dos nossos parâmetros teóricos em comparação a usada pelo autor, apesar de usar o mesmo modelo teórico. Esta diferença poderia ser devido à “otimização” da estrutura química da EPI utilizada de forma diferente em ambos os trabalhos.

Figura 6: Espectro de Infravermelho e Raman dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando o modelo teórico b3lyp/6-311++G**. a) IR dos cinco alcaloides, b) Zoom do maior pico de IR, c) Raman dos cinco alcaloides e d) Zoom do maior pico de Raman.



Os espectros teóricos de ^{13}C RMN dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC são apresentados na figura A4, bem como os padrões de deslocamento químico (Tabela A7) nos apêndices deste trabalho.

O espectro de RMN ^{13}C do EPI apresenta os picos relacionados aos grupos CH_3 e CH_2 (C2 e C4) a 33-37 ppm e CH (C8) a 85 ppm, onde este último apresenta o grupo hidroxila em comparação com o C4. Os C1 e C3 (143-151 ppm) do anel de imidazol são deslocados devido à ressonância do anel aromático. Além disso, observam-se os picos de ressonância a 131-134 ppm relacionados ao CH (C10, C11, C12, C13 e C14) do anel de benzeno são ligeiramente menos deslocados do que os C1 e C3 do anel aromático de imidazol. Finalmente, observa-se o deslocamento para o C6, no anel didrofurano, que é deslocado devido à ligação ao átomo de oxigênio, enquanto o CH_2 (C15) diretamente unido ao CO (grupo carbonila) e C7 (CH) é protegido pelo anel. Como os alcaloides EPI, EPIIS, ISOP e PILO, apresentam isomeria observa-se uma similaridade nos valores dos padrões de deslocamentos (Figura S4; Tabela S7).

Os resultados experimentais de ^{13}C RMN de EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC apresentados por Veras et al., (2013) e Rocha et al., (2017), descrevem padrões de deslocamento semelhante ao obtido em nossos cálculos, onde os picos do C6, C1, C2, C10 a C14 obtiveram (179, 137, 32, 125-128 ppm) para EPI, (180, 139, 31, 126-129 ppm) para EPIIS, (179, 139, 31, 127-129 ppm) para ISOP, (179, 139, 31, 127-129 ppm) para PILO e (178, 135, 33 ppm) para MAC.

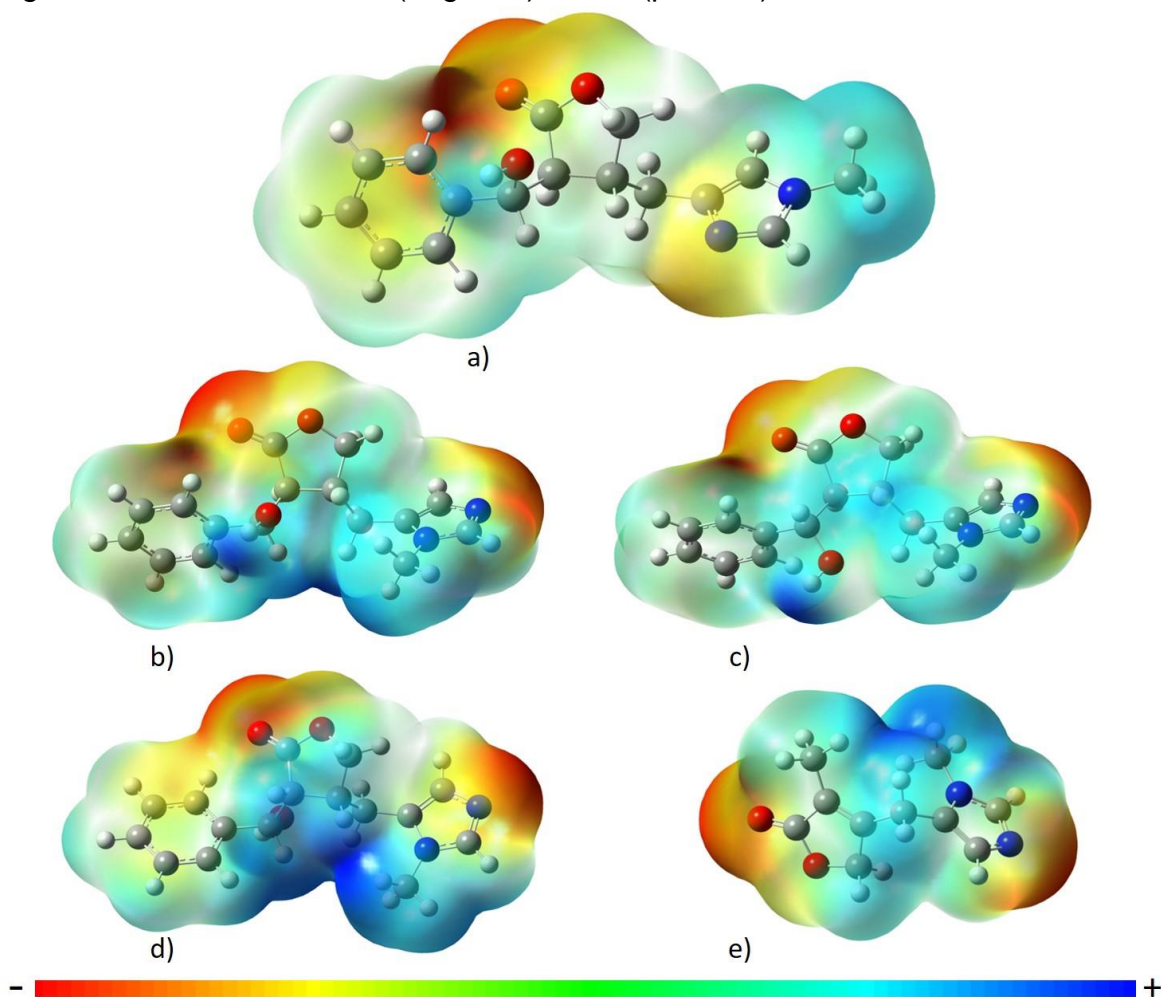
Tabela 4: Frequências espectroscópicas de Infravermelho (cm^{-1}) dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC e suas atribuições utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++G**.

EPI	EPIIS	ISOP	PILO	MAC	Atribuição
390	281	317	261	-	rotação no H-O
1162	1159	1037	1154	1075	Estiramento no plano no dihidrofurano
1303	1308	1312	1306	-	Estiramento C-C no benzeno
1318	1364	1368	1371	1369	Estiramento C-N no imidazol
1408	1416	1414	1417	1413	Estiramento simétrico N1-C1-N2 no imidazol
1455	1456	1455	1455	1454	Estiramento no CH_3 (C2-N1) no imidazol
1480	1484	1485	1485	-	Estiramento C-C no benzeno
1488	1492	1484	1490	1489	Rotação no CH_3 (C2) no imidazol
1525	1524	1523	1523	1523	Estiramento simétrico no N-C-N no Imidazol
1578	1586	1585	1585	1584	Estiramento C-C no imidazol
1612	1624	1625	1623	-	Estiramento C-C no benzeno
1631	1643	1643	1641	-	Estiramento C-C no benzeno
1785	1846	1838	1845	1825	Estiramento simétrico C=O
2963	2961	2998	2954	-	Estiramento no H-C8
3022	3039	3035	3035	3039	Estiramento no H-C2
3783	3830	3820	3830	-	Estiramento no H-O3

Os cálculos de momento dipolo apresentados nos três modelos teóricos analisados evidenciaram valores mais próximos entre os modelos B3lyp/6-311++G** e B3lyp/6-31+G**. Os dados apresentados em todos os alcaloides usando o modelo B3lyp/6-311++G** não apresentaram uma diferença significativa entre eles por possuir valores bem próximos, com diferença na casa de 0,2 debye, PILO (7,3 debye), EPI (5,8 debye), EPIIS, (5,7 debye), ISOP (5,3 debye) e MAC (4,5 debye) (Tabela A6, em apêndices). Esses valores também sugerem proximidade de potencial de solubilidade.

Analisando a densidade eletrônica em cada molécula observa-se que as regiões mais vermelhas, são mais negativas e, portanto, mais polares, sendo representadas no anel imidazólico pelo átomo de N1 e no grupo O=C do anel dihidrofurano em todos os alcaloides. (Figura 7). Essas regiões com maior densidade eletrônica representam também os locais com maior probabilidade de interações químicas que foram descritas na docagem molecular (Tabela 6). Todos os alcaloides apresentam grandes regiões negativas, entretanto a EPI apresenta regiões como maior densidade eletrônica em sua estrutura.

Figura 7: Densidade eletrônica dos alcaloides. a) EPI, b) EPIIS, c) ISOP, d) PILO e e) MAC, utilizando o modelo teórico B3lyp/6-311++G**. As cores representam as cargas eletrônicas: vermelha (negativo) e azul (positivo).



Predições de ADMET

Os resultados do ADMET para os alcaloides analisados mostraram valores iguais para os três isômeros óticos EPIIS, ISOP e PILO assim os resultados a eles foram iguais (Tabela 5). Analisando a propriedade de ligação a proteína plasmática (PPB), verificou-se valores semelhantes aos isômeros de posição EPI, EPIIS, ISOP e PILO com (63%), sendo menos provável o alcaloide MAC com apenas (37%), essa falta de interação de MAC a proteína plasmática pode influenciar sua ausência de atividade biológica contra *S. mansoni*. Os resultados do potencial de penetração na barreira hematoencefálica (BBB), os compostos têm baixo potencial de passar a barreira hematoencefálica com valores abaixo de 0,1, segundo MA et al (2005), sendo 0,011 (EPI), 0,016 (EPIIS) e assim tem menos chance de causar efeitos colaterais ao sistema nervoso central. Já MAC com 0,992 poderia ultrapassar essa barreira.

Em relação à permeabilidade da pele humana os valores foram -3,863 cm/hour (EPI), -3,897 cm/hour (EPIIS) e -3,045 cm/hour (MAC) de acordo com SINGH et al. (1993), não tem facilidade de absorção na pele humana. Na análise de absorção intestinal humana (HIA) que é um dos principais parâmetros para os candidatos a novas drogas, os alcaloides analisados tiveram valores de 96,0% (EPI e EPIIS), e 97,5% (MAC). Segundo, ZHAO et al. (2001) e YEE (1997), entre 70% e 100%, sendo considerados como bem absorvidos pelo intestino.

Os parâmetros recomendados para a predição de absorção oral de drogas usam dois modelos de permeabilidade, células CaCo-2 e MDCK. Os alcaloides apresentaram valores considerados intermediários (YAMASHITA et al., 2000), com 27,28 nm/sec (MAC), 22,86 nm/sec (EPIIS) e 21,83 nm/sec (EPI) em células CaCo-2. E 15,79 nm/sec (MAC), 16,04 nm/sec (EPI) e 9,63 nm/sec (EPIIS) em células MDCK.

Nenhum dos alcaloides causou inibição da glicoproteína P, que é uma proteína responsável pela absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diferentes fármacos (AZEVEDO et al., 2009). Em relação à solubilidade em água e água pura, os alcaloides EPIIS, ISOP e PILO obtiveram maior valor com 78158,6 mg/L e 21880 mg/L, respectivamente.

Os dados referentes à interação com a proteína citocromo P450 (CYP), todos os alcaloides foram inibidores da CYP 2C19, CYP 2C9, e CYP 3A4, esse fator reduz

a capacidade dessas proteínas de metabolizar outros fármacos no organismo, acumulando assim seus metabólitos que potencializam o efeito farmacológico desses medicamentos. Para a proteína CYP AD6, todos os alcaloides não foram inibidores para essa enzima.

A caracterização de mutagenicidade pelo teste de Ames apresentou dados mutagênicos para todos os alcaloides testados. Porém no teste específico com células TA100 e TA1535, os resultados foram negativos entre os isômeros (AMES et al., 1972). Os resultados de carcinogenicidade em ratos e camundongos também foram negativos em todos os alcaloides.

Todos os alcaloides estão adequados à classificação de drogas pela regra de Lipinski (regra dos cinco) e pelo índice mundial de drogas (WDI) com mais de 90% de probabilidade de possuir boa solubilidade e permeabilidade (LIPINSKI et al., 1997). POSTIGO et al., (2010) também usou a regra de Lipinski para avaliar ligantes que seriam usados na formação de complexos com enzima PNP. Os alcaloides isômeros foram classificados com maior afinidade de ligação a $0,1\mu\text{M}$ pela regra lead-like, com exceção para MAC que violou a regra (TEAGUE et al., 1999). Em relação à regra CMC-like todos os alcaloides foram classificados como qualificados (GHOSE et al., 1999) e, para a regra MDDR-like foi classificado como intermediário entre uma droga potencial e não potencial (OPREA, 2000).

Propriedades farmacocinéticas pobres são importantes causas de falhas dispendiosas em estágio final no desenvolvimento de fármacos, assim reduzindo essas falhas e utilizando ferramentas *in silício* como o ADME obtêm-se uma previsão precoce pela “otimização” dessas propriedades (MELO-FILHO et al., 2016).

Tabela 5: Perfil ADMET dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC.

ADMET	EPI	EPIIS/ISOP/PILO	MAC
Ligação proteína plasmática (PPB) (%)	63,140757	63,940875	37,146972
Penetração na barreira hematoencefálica (BBB)	0,011675	0,0167958	0,992212
Permeabilidade da pele (logKp, cm/hour)	-3,86369	-3,89764	-3,0451
Absorção intestinal humana (HIA, %)	96,050121	96,050121	97,523105
Permeabilidade em células CaCo-2 (nm/sec)	21,8393	22,8681	27,2895
Permeabilidade em células MDCK (nm/sec)	16,0498	9,63097	15,7929
Inibição da glicoproteína P	Não	Não	Não
Solubilidade em água (mg/L)	23332,8	78158,6	3810,15
Solubilidade em água pura (mg/L)	8525,04	21880	110732
Teste de Ames	mutagênico	mutagênico	mutagênico
Ames TA100 (+S9)	negativo	negativo	positivo
Ames TA100 (-S9)	negativo	negativo	positivo
Ames TA1535 (+S9)	negativo	negativo	positivo
Ames TA1535 (-S9)	negativo	negativo	positivo
Carcinogenicidade em camundongos	negativo	negativo	negativo
Carcinogenicidade em ratos	negativo	negativo	negativo
Inibição da CYP 2C19	Inibidor	Inibidor	Inibidor
Inibição da CYP 2C9	Inibidor	Inibidor	Inibidor
Inibição da CYP 2D6	Não	Não	Não
Inibição da CYP 2D6	Não	Não	Fraco
Inibição da CYP 3A4	Inibidor	Inibidor	Inibidor
Inibição da CYP 3A4	Substrato	Substrato	Substrato
Regra de Lipinski	adequado	adequado	adequado
Regra WDI-like	fora de corte em 90%	fora de corte em 90%	corte em 90%
Regra Lead-like	afinidade > 0,1uM	afinidade > 0,1uM	Violado
Regra CMC-like	Qualificado	Qualificado	Qualificado
Regra MDDR-like	Mid-structure	Mid-structure	Mid-structure

Os resultados referentes à docagem molecular dos alcaloides com as enzimas do verme *S. mansoni* são apresentados na Tabela 6.

O complexo composto pela enzima Puntativa uridina fosforilase (UP) e o ligante EPIIS, obteve os melhores parâmetros de afinidade molecular com energia de ligação igual a $-7,68 \text{ kcal mol}^{-1}$ e constante de inibição igual a $2,36 \mu\text{M}$. Na formação desse complexo observaram-se três interações por ponte de hidrogênio com os resíduos Arg203, Gln201 e Met231 (Figura 8). Observa-se também que todos os ligantes que interagiram com essa enzima tiveram contato por ponte de hidrogênio ou hidrofóbicos com o aminoácido Gln201 do sitio ativo da proteína. A

proteína UP é uma nucleosídeo fosforilase que catalisa a ligação N-ribossídica de uridina e timidina, para produzir ribose-1-fosfato, uracila e timina. Conferindo a essa enzima um importante papel metabólico incluindo proteção contra isquemia, metabolismo lipídico e acetilação de proteínas (SILVA-NETO et al., 2016).

A interação da enzima Thioredoxina glutathiona redutase (TGR) com o ligante EPIIS apresentou valor de energia de ligação igual a $-7,46 \text{ kcal mol}^{-1}$ e constante de inibição igual a $3,4 \text{ }\mu\text{M}$. Nesse complexo houve a formação de apenas três pontes de hidrogênio nos resíduos Glu300 (O3) e Lys162 (O2 e O3) (Tabela 6; Figura 9). Observou-se que o alcaloide de ISOP também interage com os aminoácidos Glu300 e Lys162 de EPIIS, além do resíduo de Thr472, embora não seja suficiente para obter maior energia do que EPIIS. Nesta mesma enzima TGR, os alcaloides EPI e PILO também interage com os aminoácidos Lys162 e Thr442, porém a posição no sítio ativo da enzima com a EPI formou de quatro interações por pontes de hidrogênio, que poderiam oferecer maior energia de afinidade para este ligante (Figura 9). O aminoácido do sítio ativo Tyr296 desta enzima interagiu com todos os ligantes, com exceção de MAC (Figura 9). Esse mesmo resíduo Tyr296 também foi identificado por MELO-FILHO et al., (2016) ao estudar a interação da enzima TGR com moléculas anti-schistosomas. A TGR é uma flavoenzima quimérica relacionada à desintoxicação e sobrevivência do parasita no organismo do hospedeiro (ANGELUCCI et al., 2008), além disso, essa enzima que participa diretamente da homeostase do parasita, onde atuam na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes nos vasos sanguíneos do hospedeiro definitivo, permitindo assim a sobrevivência do verme (MELO-FILHO et al., 2016).

A enzima Purina nucleosídeo fosforilase (PNP) apresentou melhor afinidade ao se ligar com os ligantes EPI e EPIIS, com energia de ligação igual a $-7,18 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-7,11 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente, e constante de inibição igual a $5,46 \text{ }\mu\text{M}$ e $6,19 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente. Em todos os ligantes foi possível observar a interação com o aminoácido Ala118 do sítio ativo por ponte de hidrogênio ou interação hidrofóbica. POSTIGO et al., (2010) também observou esse resíduo de aminoácido Ala118, ao testar drogas inibidoras de *S. mansoni* com a enzima PNP. Além disso, o mesmo autor observou a interação com os resíduos Met221 e His259, que foram também observadas interagindo com EPIIS e EPI (Tabela 6). A enzima (PNP) de *S. mansoni* é essencial para a recuperação de bases de purina e nucleosídeos nos esquistossomos, ela catalisa a fosforilase reversível de purina (2'-desoxi)

ribonucleosídeos, na presença de ortofosfato inorgânico (Pi) como um segundo substrato, para dar a correspondente base purina e (2'-desoxi) ribose-1-fosfato como produtos. (PEREIRA et al., 2005; POSTIGO et al., 2010).

A enzima Metiltioadenosina fosforilase (MTAP) apresentou melhor afinidade com os ligantes ISOP (-6,91 kcal mol⁻¹; 8,55 µM) e EPIIS (-6,63 kcal mol⁻¹; 13,72 µM). Todos os ligantes apresentaram contato com o aminoácido Asp230 do sítio ativo da enzima MTAP (Tabela 6). Esta enzima usa a adenosina como substrato para a produção de adenina. Provavelmente a única via para a produção da purina, sendo alvo promissor para terapias contra esquistossomose (TORINI et al., 2016).

Os parâmetros de afinidade para a enzima Arginase (ARG) demonstraram que o ligante PILO (-6,64 kcal mol⁻¹; 13,47 µM) e a EPI (-6,48 kcal mol⁻¹; 17,71 µM) foram melhores. Observa-se também que em todos os ligantes tiveram contato por ponte de hidrogênio ou hidrofóbicos com o aminoácido Asp158 do sítio ativo desta enzima (Tabela 6). A ARG é uma loenzima binuclear que catalisa a hidrólise da L-arginina para formar L-ornitina e ureia afetando os processos de biossíntese do NO. Ela regula todas as formas do parasita que interagem com o hospedeiro humano e acredita-se que esta enzima desempenhe um papel na resposta imune do hospedeiro ao parasita (HAI et al., 2014).

A formação do complexo enzimático com Catepsina B1 (2CB1) e o ligante EPIIS novamente obteve maior afinidade com energia de ligação de -6,52 kcal mol⁻¹ e constante de inibição com 16,65 µM. O complexo proteína-ligante apresentou quatro ligações de hidrogênio (Gln94, Gly144, Gly269 e His270) e foi possível observar o contato do aminoácido Cys100 do sítio ativo em todos os ligantes, com exceção do MAC (Tabela 6). Os resíduos Cys100 e His270 também foram observados no sítio ativo de smCB1 complexados com heparina (HORN et al., 2011). Os *S. mansoni* adultos que vivem no sistema cardiovascular humano necessitam de nutrientes provenientes do sangue para o seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, assim a SmCB1 é uma protease associada ao intestino dos vermes que digerem proteínas do sangue do hospedeiro como fonte de nutrientes (JILKOVA et al., 2011; HORN et al., 2011).

A enzima Histona desacetilase 8 (HDAC8), deteve melhor parâmetro de afinidade com os ligantes EPI (-6,43 kcal mol⁻¹; 19,44 µM) e EPIIS (-6,14 kcal mol⁻¹; 31,78 µM). Apesar de o ligante EPI ter obtido melhor energia para essa enzima, não foi possível verificar a presença de pontes de hidrogênio, apenas interações

hidrofóbicas. O resíduo de Tyr341 do sítio ativo da enzima HDAC8 foi observado na interação com os ligantes EPI e EPIIS (Tabela 6). KANNAN et al., (2014) também identificou os resíduos Tyr341, His292 e His141, presentes neste complexo além da importância do íon de zinco. A proteína HDAC8 de *S. mansoni* é uma acetil-L-lisina desacetilase que desempenha um papel fundamental na infecciosidade do parasita, elas controlam a acetilação e desacetilação pos-transcricionais no DNA na regulação do gene. Essas enzimas estão ligadas a potenciais alvos anticâncer, antivirais, antiparasitários e anti-inflamatórios (STOLFA et al., 2014; KANNAN et al., 2014).

Os dados apresentados na docagem dos cinco alcaloides corroboram com os estudos experimentais publicados, onde o alcaloide EPIIS obteve atividade contra *S. mansoni* in vitro de 10,9 μM (ROCHA et al., 2017), seguido os alcaloides EPI com 1048 μM (VERAS et al., 2012), ISOP com 1746 μM (ROCHA et al., 2017) e MAC sem atividade até a concentração testada de 1746 μM (ROCHA et al., 2017).

Tabela 6: Parâmetros de afinidade de docagem molecular dos alcaloides epiisopiloturina (EPI), epiisopilosina (EPIIS), isopilosina (ISOP), pilosina (PILO) e macaubina (MAC) com enzimas do *Schistosoma mansoni*.

Complexo (Proteína-ligante)	ΔG_{bind}^a (kcal/mol)	K_i^b (μM)	Número corridas	Número de conformações no cluster de energia	Aminoácidos que interagem por ponte de hidrogênio ^c	Aminoácidos que fazem interação hidrofóbica ^c
Up/epiis	-7,68	2,36 μM	100	73	Arg203(2), Gln201, Met231	Arg121, Gly126, Glu234, Glu232, Ile265, Met233, Phe197, Phe272, Ser125, Thr124
Tgr/epiis	-7,46	3,4 μM	100	11	Glu300, Lys162	Ala470, Cys159, Leu441, Phe324, Phe474, Pro443, Thr471, Thr472, Tyr296, Val473
Tgr/isop	-7,37	3,97 μM	100	22	Glu300, Lys162(2), Thr472	Ala470, Cys159, Leu441, Phe324, Phe474, Pro443, Thr471, Tyr296, Val473
Tgr/epi	-7,25	4,89 μM	100	27	Lys162(2), Thr442	Cys159, Gly158, Glu300, Leu441, Phe280, Phe474, Pro443, Thr472, Tyr296, Val157, Val297, Val473
Up/isop	-7,19	5,37 μM	100	64	Arg50 (2), Arg121, Gln201, Thr124 (2)	Arg121, Gly123, Glu232, Met93, Met231, Met233, Phe197, Phe272
Pnp/epi	-7,18	5,46 μM	100	40	Ala118(2), His88	Asn117, Asn245, Ala119, Gly120, Gly220, Glu203, His259, Met221, Pro200, Tyr90, Tyr202, Val219
Up/epi	-7,16	5,68 μM	100	33	Arg50, Arg121(2), Thr124, Glu234, Gly46	Gly92, Gly123, Glu232, His91, Met93, Met231, Phe197, Phe272, Ser125
Tgr/pilo	-7,13	5,95 μM	100	20	Lys162, Thr442	Ala470, Cys159, Glu300, Leu441, Phe474, Pro443, Thr471, Thr472, Tyr296
Pnp/epiis	-7,11	6,19 μM	100	75	Ala118(2), Met221, Ser222	Asn117, Asn245, Gly120, Gly220, His88, His259, Tyr90, Tyr202, Thr244, Val219
Pnp/pilo	-7,08	6,47 μM	100	41	Ala118, Arg86, Met221	Ala119, Asn245, Gly34, Gly120, Gly220, Glu203, His88, Ser222, Tyr90, Tyr202, Val219
Mtap/isop	-6,91	8,55 μM	100	8	Ala88, Asn205, Met206	Ile182, Val204, Ser12, Phe187, Asp232, Gly90, Asp230, Thr229, Cys89, Thr207, His55
Pnp/isop	-6,83	9,84 μM	100	8	Ala118, Met221	Asn117, Asn245, Ala119, Arg86, Gly34, Gly120, Gly220, Glu203, His88, Ser35, Ser222, Tyr90, Tyr202, Val219
Up/pilo	-6,74	11,54 μM	100	99	Arg203 (2), Gln201, Met231	Arg121, Gly126, Glu232, Glu234, Ile265, Met233, Phe197, Phe272, Ser125, Thr124
Arg/pilo	-6,64	13,47 μM	100	1	Asn169, His171(2), Gly157	Glu307, Thr276, Asp158, Asp262, Asp264, His156, Asp211, Glu216, Asn160, Asp213, Gly172
Mtap/epiis	-6,63	13,72 μM	100	1	Asp230, Ser188	Ala88, Asn205, Ile182, Val204, Phe187, Met206, Gly90, Thr229, Cys89, Asp232
Mtap/epi	-6,54	15,97 μM	100	33	Ala88, His55, Met206, Ser12	Thr229, Pro63, Phe187, Asp320, Cys89, Val204, Gly90, Thr207, Asn205
2cb1/epiis	-6,52	16,65 μM	100	2	Gln94, Gly144, Gly269, His270	Cys100, Gly98, Gly143, Leu252, Leu267, Ser99, Trp101, Trp292, Val247
Mtap/pilo	-6,51	16,97 μM	100	84	Ala88, Asn205, Met206, Val204	Thr229, Cys89, Ile182, Phe187, Asp232, Gly90, Asp230

Arg/epi	-6,48	17,71 μ M	100	54	Ala166, Ser165	Met173, Asn169, Gly172, His171, Asp158, Asp262, Asp264, Thr276, Asn160, Asp213, Ser167
Arg/epiis	-6,44	19,07 μ M	100	16	Asn169 (2)	Gly172, Ser167, His171, Thr276, Gly157, His156, Glu216, Asp 158, Asp213, Asn160, Asp211, Ser165, Ala166
Hdac8/epi	-6,43	19,44 μ M	100	54	-	Tyr99, Asp100, Phe151, Pro19, Tyr153, Lys20, Phe21, Pro102, Phe104, Tyr110, Ser18
Arg/isop	-6,4	20,34 μ M	100	72	Ala166, Asp158, Ser165, Ser167	Asp213, Glu216, Asp211, His156, Gly157, His171, Met173, Asn160, Gly172, Asn169
2cb1/isop	-6,23	27,3 μ M	100	8	Gln94, Gly269, Cys100, His270, Gly269	Gly98, Gly143, Gly144, Gly268, His181, Leu252, Leu267, Trp292, Val247
2cb1/pilo	-6,18	29,35 μ M	100	10	Gly144(2), Gln94	Ala271, Cys100, Gly98, Gly143, Gly244, Gly269, Glu316, His270, Leu146, Trp101
Up/mac	-6,15	31,19 μ M	100	97	Arg50, Gly46, Thr124	Arg121, Gly92, Gly123, Gln201, Glu232, Glu234, His91, Met93, Met233, Phe197
Hdac8/epiis	-6,14	31,78 μ M	100	7	His141, His292,	Asp184, His142, Gly338, Asp186, Phe216, Gly150, Asp100, Asp285, Tyr140, Phe21, Tyr341, His188, Phe151, Asp290
2cb1/epi	-6,09	34,36 μ M	100	10	Gly144(2), Trp101	Ala271, Cys100, Gln94, Gly98, Gly143, Gly269, Glu316, His270, Leu146
2cb1/mac	-6,09	34,09 μ M	100	2	Ala127, Phe175	Asp93, Arg92, Gly161, Glu124, Glu165, Lys164, Lys177, Ser126, Ser162, Ser163, Phe103, Tyr173
Arg/mac	-5,6	78,59 μ M	100	100	Asp158, Gly157	Ser165, Asn169, Asn160, Ser167, Gly172, Ala166, His156, Glu216, Asp211
Mtap/mac	-5,54	87,42 μ M	100	100	Ser188	Thr229, Cys89, Gly90, Asp230, Asp232, Phe187, Ala88, Asn205, Val204, Met206, Ile182
Hdac8/pilo	-5,54	87,15 μ M	100	2	Tyr99	Phe104, Pro102, Tyr153, Asp100, Ser18, Pro19, Lys20, Phe151
Hdac8/isop	-5,41	108,27 μ M	100	14	Asp186, Asp285, His188, Phe216	His292, Phe215, Asp100, Gly150, Tyr341, Phe151, His142
Hdac8/mac	-5,38	113,26 μ M	100	61	-	Asp100, Pro102, Tyr153, Phe104, Tyr110, Lys20, Tyr99, Phe151, Ser18, Pro19
Tgr/mac	-5,36	117,12 μ M	100	1	Cys154, Thr153	Ala256, Ala445, Asp433, Gly118, Gly258, Gly432, Ile431, Ile434, Leu441, Ser117, Thr442
Pnp/mac	-5,36	118,65 μ M	100	13	Asn245, Tyr90	Asn117, Ala118, Ala119, Gly120, Gly220, His88, Met221, Ser222, Tyr194, Tyr202, Thr244, Val219, Val262

^a Ligação de energia na melhor conformação; ^b Constante de inibição da melhor conformação; ^c Obtido com programa Ligplot

Figura 8: Docagem molecular do alcaloide EPIIS com a enzima UP de *S. mansoni*. a) Diagrama Ligplot 2D que mostra as pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas no complexo EPIIS-UP. b) Estrutura global representado em ribbons as interações por pontes de hidrogênio (Gln201, Met231 e Arg203) em EPIIS. c) Estrutura global do complexo UP/EPIIS. UP representado em superfície e EPIIS em varetas na região do sítio ativo.

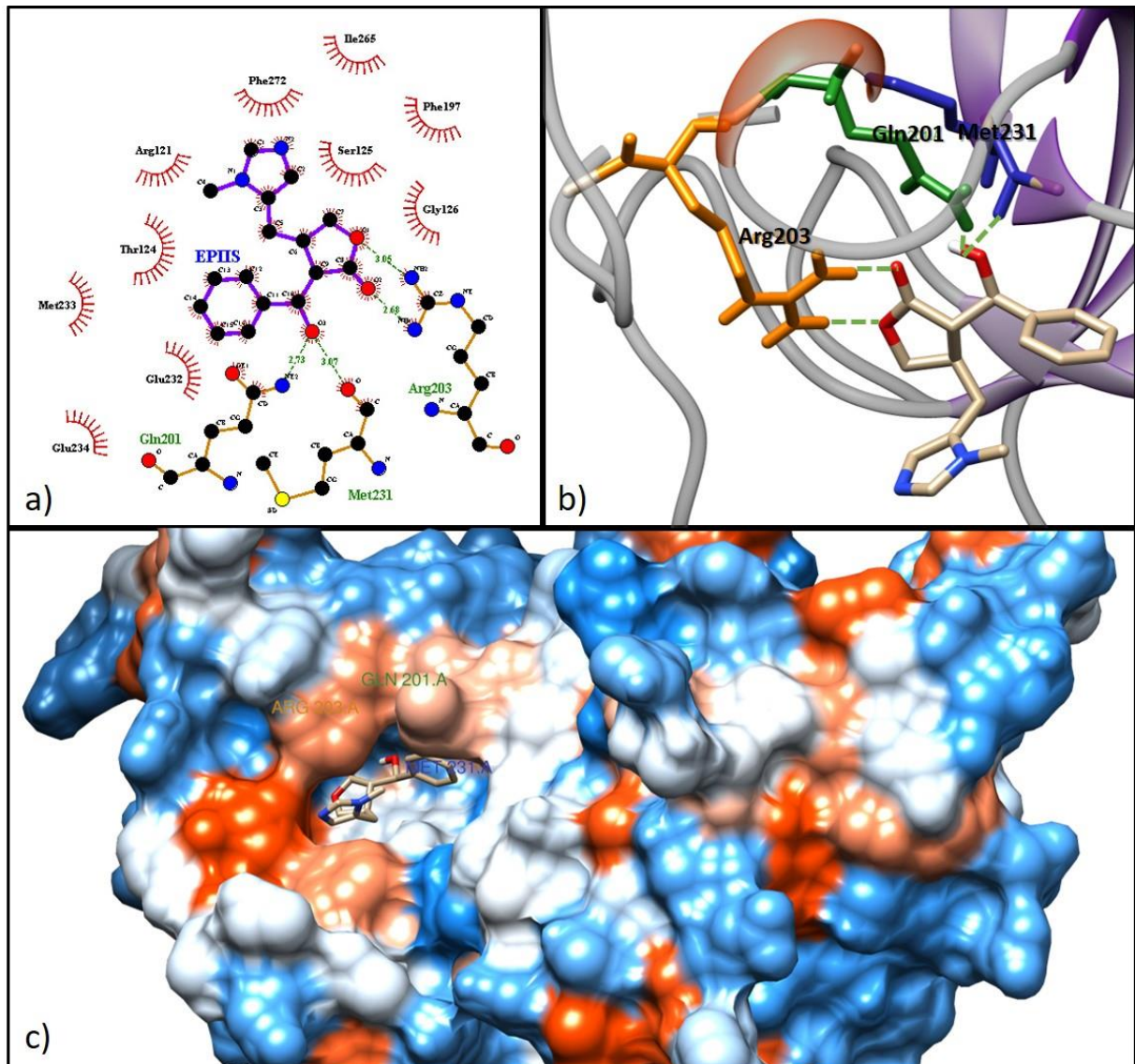
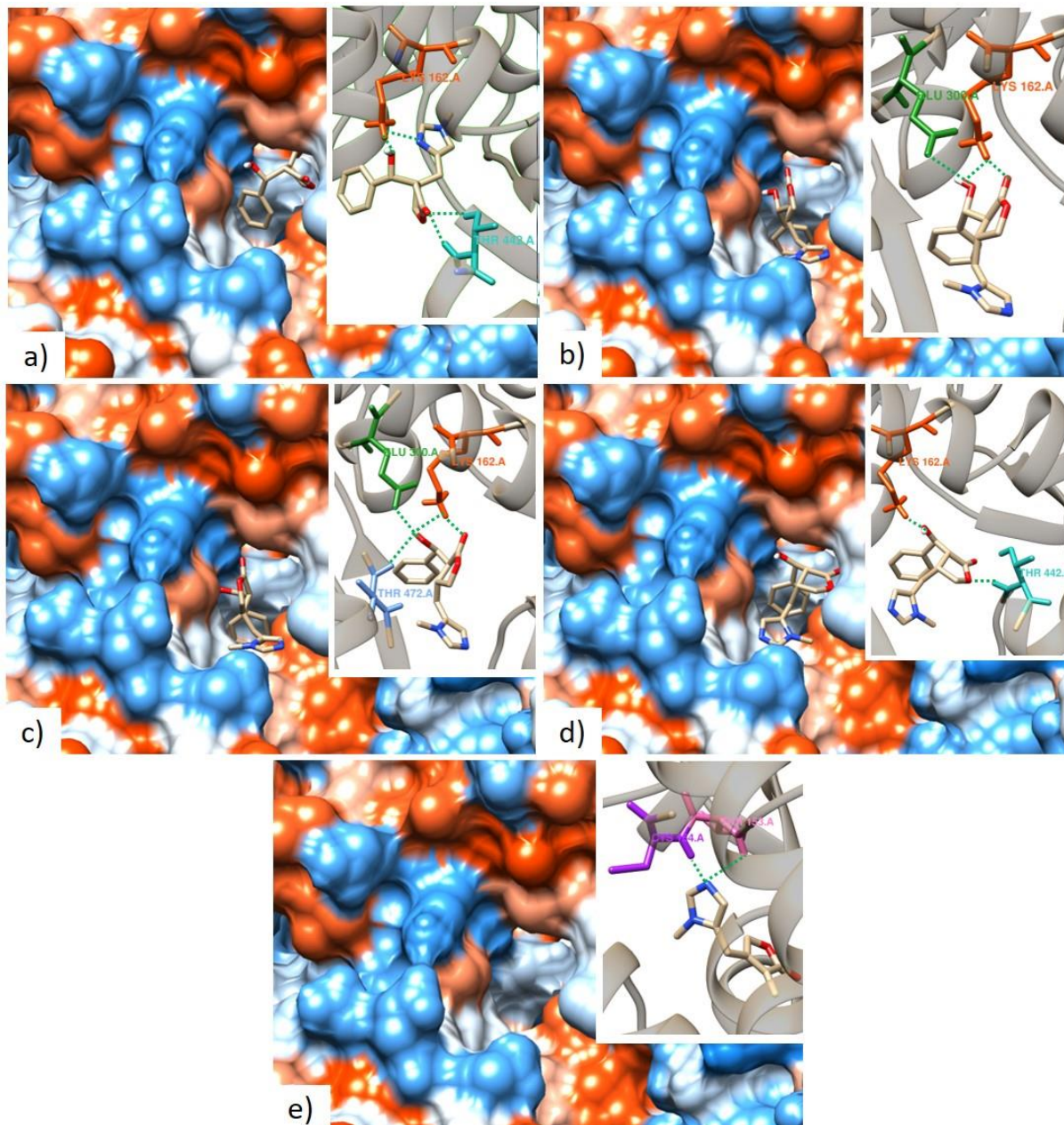


Figura 9: Docagem molecular mostrando o sítio ativo da enzima TGR com os alcaloides e suas interações por ponte de hidrogênio a) EPI, b) EPIIS, c) ISOP, d) PILO e e) MAC.



CONCLUSÕES

As geometrias moleculares, as estruturas eletrônicas, os descritores químicos quânticos, o infravermelho, o Raman, o RMN e os espectros UV-Vis dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC foram estudados por cálculos DFT. O modelo teórico B3lyp/6-311++G** foi o que descreveu melhor as propriedades geométricas,

eletrônicas e vibracionais estudadas e é adequado para uso como referência para estruturas similares que abordam essa atividade farmacológica. O perfil ADMET apresentado nos leva a concluir que o alcaloide EPI e seus isômeros são adequados para a classificação padrão de drogas de Lipinski, com parâmetros positivos em PPB, BBB, HIA e inibidores de CYP, além de ter baixa toxicidade e carcinogenicidade com mais de 90% de probabilidade de ter boa solubilidade e permeabilidade.

A docagem molecular evidenciou que o alcaloide EPIIS foi o ligante com melhores parâmetros de afinidade para proteínas UP e TGR indicando um possível candidato a fármaco para esta doença. Este trabalho fornece uma nova visão do potencial dessas moléculas como candidatos a fármacos contra a esquistossomose, através da identificação de propriedades anteriormente desconhecidas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, e ao Governo do Estado do Maranhão e a Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação – SECTI pelo apoio com a bolsa estudo. A universidade Federal do Maranhão – UFMA, pelo incentivo. Agradecemos ao CENAPAD-UFC pelo ambiente de realização dos cálculos. E a universidade Estadual do Piauí – UESPI pela estrutura física para realização da pesquisa. E a Universidade Estadual do Piauí – UESPI pela estrutura física para realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

AMES, B.N.; GURNEY, E. G.; MILLER, J. A.; BARTSCH, H. Carcinogens as Frameshift Mutagens: Metabolites and Derivatives of 2-Acetylaminofluorene and other Aromatic Amine Carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, p. 3128-3132, 1972.

ANGELUCCI, F.; MIELE A. E.; BOUMIS G.; DIMASTROGIOVANNI D.; BRUNORI M.; BELLELLI A. Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad:

The structure of *Schistosoma mansoni* thioredoxin glutathione reductase. **Proteins**, v. 72, p. 936–945, 2008.

ATKINS, P; JONES, L. **Princípios De Química**: Questionando A Vida Moderna e o Meio Ambiente: Porto Alegre: Bookman, 2012.

AZEREDO, F. J.; UCHÔA, F. T.; COSTA, T. D. P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, p. 321-326, 2009.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry.III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 5648-5652, 1993.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235–242, 2000.

CAMPELO, Y. D. M.; MAFUD, A.; VÉRAS, L.; GUIMARÃES, M. A.; YAMAGUCHI, L.; LIMA, D.; ARCANJO, D.; KATO, M.; MENDONÇA, R.; PINTO, P. L. S.; MASCARENHAS, Y.; SILVA, M. P. N.; MORAES, J.; EATON, P.; LEITE, J. Synergistic effects of in vitro combinations of pipartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, 2017.

CASIDA, M. E. **In Recent Advances in Density Functional Methods**; Chong, D. P., Ed.; World Scientific: Singapore, 1995.

DA SILVA, R. R.; RAMALHO, T. C.; SANTOS, J. M.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. On the Limits of Highest-Occupied Molecular Orbital Driven Reactions: The Frontier Effective-for-Reaction Molecular Orbital Concept. **Journal of Physical Chemistry**, v. 110, p. 1031-1040, 2006.

DENNINGTON, R. D.; KEITH, T. A.; MILLAN, J. M. **GaussView**, v. 5.0.8, Semicchem, Inc.: Shawnee KS, 2008.

EWING, T. J.; MAKINO, S.; SKILLMAN, A. G.; KUNTZ, I. D. DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 15, n. 5, p. 411-421, 2001.

FRISCH, M. J; G. W. TRUCKS; H. B. SCHLEGEL; G. E. SCUSERIA; M. A. ROBB; J. R. CHEESEMAN; G. SCALMANI; V. BARONE; B. MENNUCCI; G. A. PETERSSON; H. NAKATSUJI; M. CARICATO; X. LI, H. P. HRATCHIAN; A. F. IZMAYLOV; J. BLOINO; G. ZHENG; J. L. SONNENBERG; M. HADA; M. EHARA; K. TOYOTA; R. FUKUDA; J.-Y. HASEGAWA; M. ISHIDA; T. NAKAJIMA; Y. HONDA; O. KITAO; H. NAKAI; T. VREVEN; J. A. MONTGOMERY; JR., J. E. PERALTA; F. OGLIARO; M. BEARPARK; J. J. HEYD; E. BROTHERS; K. N. KUDIN; V. N. STAROVEROV; R. KOBAYASHI; J. NORMAND; K. RAGHAVACHARI; A. RENDELL; J. C. BURANT; S. S. IYENGAR; J. TOMASI; M. COSSI; N. REGA; J. M. MILLAM; M. KLENE; J. E. KNOX; J. B. CROSS; V. BAKKEN; C. ADAMO; J. JARAMILLO; R. GOMPERTS; R. E. STRATMANN; O. YAZYEV; A. J. AUSTIN; R. CAMMI, C. POMELLI; J. W. OCHTERSKI; R. L. MARTIN; K. MOROKUMA; V. G. ZAKRZEWSKI; G. A. VOTH; P. SALVADOR; J. J. DANNENBERG; S. DAPPRICH; A. D. DANIELS; E. FARKAS; J. B. FORESMAN; J. VINCENT ORTIZ; J. CIOSLOWSKI; D. J. FOX. **Gaussian 09 revision D.01**, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2009.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity da rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v, 36, p. 3219-3228, 1980.

GHOSE, A. K; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, p. 55-68, 1999.

GOODSELL, D. S. **Computational docking of biomolecular complexes with Auto-Dock**, in: E.A. Golemis, P.D. Adams (Eds.), Protein-protein Interact. A Mol. Cloning Man, Second, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2005.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of autodock. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, p. 1-5, 1996.

GORELSKY, S. I. **Swizard**. Department of Chemistry, York University: Toronto, ON, 1999.

GUIMARÃES, M. A.; OLIVEIRA, R. N.; VÉRAS, L. M. C.; LIMA, D. F.; CAMPELO, Y. D. M.; CAMPOS, S. A.; KUCKELHAUS, S. A. S.; PINTO, P. L. S.; EATON, P.; MAFUD, A. C.; MASCARENHAS, Y. P.; ALLEGRETTI, S. M.; MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. 1-18, 2015.

HAI, Y.; EDWARDS, J. E.; VAN ZANDT, M. C.; HOFFMANN, K. F.; CHRISTIANSON, D. W. Crystal Structure of *Schistosoma mansoni* Arginase, a Potential Drug Target for the Treatment of Schistosomiasis. **Biochemistry**. v. 53, p. 4671- 4684, 2014.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: UFSC, p.641-656, 2000.

HORN, M.; JÍLKOVÁ, A.; VONDRÁŠEK, J.; MAREŠOVÁ, L.; CAFFREY, C. R.; MAREŠ, M. Mapping the Pro-Peptide of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Modulation of Inhibition by Heparin and Design of Mimetic Inhibitors. **ACS Chemical Biology**, v. 6, p. 609-617, 2011.

KADAN, R.U.; Roy, N. Recent trends in drug likeness prediction: a comprehensive review of in silico methods. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, p. 609-615, 2007.

KANNAN, S.; MELESINA, J.; HAUSER, A.; CHAKRABARTI, A.; HEIMBURG, T.; SCHMIDTKUNZ, K.; WALTER, A.; MAREK, M.; PIERCE, R.; ROMIER, C.; JUNG, M.; SIPPL, W. Discovery of Inhibitors of *Schistosoma Mansoni* HDAC8 by Combining Homology Modeling, Virtual Screening and In Vitro Validation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 54, 2014.

KOHN, W.; SHAM, L. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Journal of Physical Review**, v. 140, p.1133-1138, 1965.

LAGO, E. M.; XAVIER, R. P.; TEIXEIRA, T. R.; SILVA, L. M.; FILHO, A. A. S.; MORAES, J. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, 2017.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. **Journal of Physical Review**, v. 37, p. 785-789, 1998.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-26, 2001.

LU, X.; WU, C. L.; WEI, S.; GUO, W. DFT/TD-DFT Investigation of Electronic Structures and Spectra Properties of Cu-Based Dye Sensitizers. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 114, p. 1178–1184, 2010.

MA, X. L.; CHEN, C.; YANG, J. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 26, p. 500-512, 2005.

MAFUD, A. C.; FERREIRA, L. G.; MASCARENHAS, Y. P.; ANDRICOPULO, A. D.; MORAES, J. Discovery of Novel Antischistosomal Agents by Molecular Modeling Approaches. **Trends in Parasitology**, v. 32, p. 874 – 886, 2016.

MCLEAN, A. D.; CHANDLER, G. S. "Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11-18." **Journal of Chemical Physics**, v. 72, p. 5639-5648, 1980.

MELO-FILHO, C. C.; DANTAS, R. F.; BRAGA, R. C.; NEVES, B. J.; SENGER, M. R.; VALENTE, W. C. G.; REZENDE-NETO, J. M.; CHAVES, W. T.; MURATOV, E. N.; PAVELEY, R. A.; FURNHAM, N.; KAMENSKY, L.; CARPENTER, A. E.; SILVA-

JUNIOR, F. P.; ANDRADE, C. H. QSAR-Driven Discovery of Novel Chemical Scaffolds Active against *Schistosoma mansoni*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, 1357-1372, 2016.

MORAES, J. Natural products with antischistosomal activity. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 801–820, 2015.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. **Using AutoDock for ligand-receptor docking**, in: Curr. Protoc. Bioinforma., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2008.

NICOLAU, L. A. D.; CARVALHO, N. S.; PACÍFICO, D. M.; LUCETTI, L. T.; ARAGÃO, K. S.; VÉRAS, L. M. C.; SOUZA, M. H. L. P.; LEITE, J. R. S. A.; MEDEIROS, J. V. R. Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 188-195, 2017.

OPREA, T. I. Property distribution of drug-related chemical databases. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 14, p. 251-26, 2000.

PARR, R. G.; VON SZENTPÁLY, L.; LIU, S. Electrophilicity Index. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 1922-1924, 1999.

PEREIRA, D. H.; LA PORTA, F. A.; SANTIAGO, R. T.; GARCIA, D. R.; RAMALHO, T. C. Novas Perspectivas sobre o Papel dos Orbitais Moleculares de Fronteira no Estudo Da Reatividade Química: Uma Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 8, p. 425-453, 2016.

PEREIRA, H. D.; FRANCO, G. R.; CLEASBY, A.; GARRATT, R. C. Structures for the Potential Drug Target Purine Nucleoside Phosphorylase from *Schistosoma mansoni* Causal Agent of Schistosomiasis. **Journal of Molecular Biology**. v. 353, n. 3, p. 584–599, 2005.

POSTIGO, M. P.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; CASTILHO, M. S.; PITTA, I. R.; DE ALBUQUERQUE, J. F. C.; ANDRICOPULO, A. D. Discovery of New Inhibitors of *Schistosoma mansoni* PNP by Pharmacophore-Based Virtual Screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, p. 1693–1705, 2010.

RAGHAVACHARI, J. S.; BINKLEY, R.; SEEGER, J. A. Pople, “Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions.” **Journal of Chemical Physics**, v. 72, p. 650-654, 1980.

RAMOS, R. M.; PEREZ, J. M.; BAPTISTA, L. A.; DE AMORIM, H. L. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* with isoniazid: a computational study on a new possible mechanism of resistance. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, p. 4013-4024, 2012.

ROCHA, J. A.; ANDRADE, I. M.; VÉRAS, L. M. C.; QUELEMES, P. V.; LIMA, D. F.; SOARES, M. J. S.; PINTO, P. L. S.; MAYO, S. J.; IVANOVA, G.; RANGEL, M.; CORREIA, M.; MAFUD, A. C.; MASCARENHAS, Y. P.; DELERUE-MATOS, C.; DE MORAES, J.; EATON, P.; LEITE, J. R. S. A. Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxicity Activity of Imidazole Alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* Leaves. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 624–630, 2017.

SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 17, p. 57-61, 1999.

SILVA NETO, A. M.; SOUZA, J. R. T.; ROMANELLO, L.; CASSAGO, A.; SERRAO, V. H. B.; DEMARCO, R.; BRANDAO-NETO, J.; GARRATT, R. C.; PEREIRA, H. D. Analysis of two *Schistosoma mansoni* uridine phosphorylases isoforms suggests the

emergence of a protein with a non-canonical function. **Biochimie**, v. 125, p. 12-22, 2016.

SILVA, V. G.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; CARVALHO, N. S.; PRUDÊNCIO, R. S.; ARAGÃO, K. S.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPOS, S. A.; VÉRAS, L. M. C.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J. R. S. A.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1071-1077, 2013.

SINGH, S.; SINGH, J. Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: A review. **Medicinal Research Reviews**, v. 13, p. 569–621, 1993.

SOLIS, F. J.; WETS, R. J. B. Minimization by Random Search Techniques. **Mathematics of Operations Research**, v. 6, p. 19-30, 1981.

STOLFA, D. A.; MAREK, M.; LANCELOT, J.; HAUSER, A. T.; WALTER, A.; LEPROULT, E.; MELESINA, J.; RUMPF, T.; WURTZ, J. M.; CAVARELLI, J.; SIPPL, W.; PIERCE, R. J.; ROMIER, C.; JUNG, M. Molecular Basis for the Antiparasitic Activity of a Mercaptoacetamide Derivative That Inhibits Histone Deacetylase 8 (HDAC8) from the Human Pathogen *Schistosoma mansoni*. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 20, p. 3442–3445, 2014.

STRATMANN, R. E.; SCUSERIA, G. E.; FRISCH, M. J. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. **Journal of Chemical Physics**, v. 109, p. 8218-8224, 1998.

TEAGUE, S. J.; DAVIS, A. M.; LEESON, P. D.; OPREA, T. The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 3743-3748, 1999.

TORINI, J. R.; BRANDÃO-NETO, J.; DEMARCO, R.; PEREIRA, H. D. Crystal Structure of *Schistosoma mansoni* Adenosine Phosphorylase/ 5'-

Methylthioadenosine Phosphorylase and Its Importance on Adenosine Salvage Pathway. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 10, n. 12, p. 1-25, 2016.

VERAS, L. M. C.; CUNHA, V. R. R.; LIMA, F. C. D. A.; GUIMARÃES, M. A.; VIEIRA, M. M.; CAMPELO, Y. D. M.; SAKAI, V. Y.; LIMA, D. F.; CARVALHO JUNIOR, P. S.; ELLENA, J. A.; SILVA, P. R. P.; VASCONCELOS, L. C.; GODEJOHANN, M.; PETRILLI, H. M.; CONSTANTINO, V. R. L.; MASCARENHAS, Y. P.; LEITE, J. R. S. A. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **Plos One**, v. 8, p. 1-11, 2013.

VERAS, L. M.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R.; MORAES, J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**. v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

VOIGTLANDER, H. W.; BALSAM, G.; ENGELHARDT, M.; POHL, L. 1978. Epiisopiloturin, ein neues Pilocarpus-Alkaloid. **Archivies Pharmacal Research**, v. 311, n. 11, p. 927 – 935, 1978.

World Health Organization (WHO). Schistosomiasis. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

YAMASHITA, S.; FURUBAYASHI, T.; KATAOKA, M.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; TOKUDA, H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 195-204, 2000.

YEE S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man-fact or myth. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 763-766, 1997.

ZHAN, C. G.; NICHOLS, J. A.; DIXON, D. A. Ionization Potential, Electron Affinity, Electronegativity, Hardness, and Electron Excitation Energy: Molecular Properties from Density Functional Theory Orbital Energies. **Journal Physical Chemistry A**, v. 107, p. 4184–4195, 2003.

ZHAO, Y. H.; LE, J.; ABRAHAM, M. H.; HERSEY, A.; EDDERSHAW, P. J.; LUSCOMBE, C. N.; BUTINA, D.; BECK, G.; SHERBORNE, B.; COOPER, I.; PLATTS, J. A. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 749-784, 2001.

Planejamento racional por química quântica computacional de complexos metálicos de rutênio coordenados nas formas *cis* e *trans* com epiisopiloturina, cloro e óxido nítrico

Artigo submetido à revista *Journal of Molecular Structure* (17/02/2018)

ISSN: 0022-2860

Qualis Capes: Biotecnologia (B1)

Fator de impacto: 1.75

Capítulo III

PLANEJAMENTO RACIONAL POR QUÍMICA QUÂNTICA COMPUTACIONAL DE COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTÊNIO COORDENADOS NAS FORMAS *CIS* E *TRANS* COM EPIISOPILOTURINA, CLORO E ÓXIDO NÍTRICO

Jefferson Almeida Rocha ^{a,b}; Nayra da Costa e Silva Rego ^a; Francisco Ivan da Silva ^c; Jose Antonio de Sousa ^c; Ionara Nayana Gomes Passos ^b; Jose Roberto de Sousa de Almeida Leite ^f; Francisco da Chagas Alves Lima ^c

^a Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, RENORBIO, Ponto focal UFPI, Teresina, Piauí, Brasil;

^b Grupo de Pesquisa em Ciências Naturais e Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Grajaú, MA, Brasil;

^c Grupo de Pesquisa em Química Quântica Computacional e Planejamento de Fármacos, Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, PI, Brasil;

^f Area Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brasil.

RESUMO

A química medicinal e o planejamento racional de fármacos através de estudos computacionais têm contribuído tornando-se uma ferramenta indispensável na prospecção de drogas, no desvendamento de teorias e modelos complexos para a prospecção de compostos bioativos, partindo do conhecimento da ação farmacológica de um determinado composto. Os complexos de rutênio são desenvolvidos particularmente com ligantes de relevância biológica, pois possui solubilidade e estabilidade em água além de baixa toxicidade. A epiisopiloturina nos últimos anos tem-se mostrado um potencial fármaco contra a esquistossomose, com ação anti-inflamatória, anticonceptiva e efeito gastroprotetor. Assim, objetivou-se com este trabalho realizar o planejamento racional por química quântica computacional de complexos metálicos de rutênio coordenados nas formas *cis* e *trans* com epiisopiloturina, cloro e óxido nítrico para aplicações biotecnológicas. Foram avaliadas as propriedades geométricas, eletrônicas, cargas atômicas, bem como as propriedades vibracionais e termodinâmicas dos complexos metálicos, utilizando o modelo B3lyp/sdd. Todos os complexos uma diminuição nos GAPs de

energia HOMO e LUMO em comparação ao alcaloide epiisopiloturina. Entre as formas *cis*, complexo EPIRUCLN-*cis* apresentou o melhor GAP de energia, e entre os complexos na forma *trans*, o EPIRUCLO2. De um modo geral os complexos *cis* apresentaram valores satisfatórios para esse parâmetro. Além disso, as energias mostram valores mais estáveis também para *cis*, sendo o complexo EPIRUCLO2-*cis* e EPIRUCLN-*cis* mais estáveis.

INTRODUÇÃO

A química medicinal moderna através de estudos computacionais tem contribuído com problemas muitos emblemáticos, tornando-se uma ferramenta indispensável na prospecção de drogas, no desvendamento de teorias e modelos complexos (ROY; KAR; DAS, 2015). Assim, o planejamento racional de fármacos, utiliza esses métodos computacionais para a prospecção de compostos bioativos, partindo do conhecimento da ação farmacológica de um determinado composto (SANT'ANA, 2009).

A presença de metais de transição como o rutênio em macromoléculas pode beneficiar a fotoquímica, eletroquímica e reatividade química. Isso se deve à versatilidade desses metais apresentar orbitais atômicos na camada de valência, que podem atuar como doadores ou receptores de elétrons quando coordenados a ligantes orgânicos ou inorgânicos (FERREIRA, 2012).

O ligante 2,2'-bipiridina (2,2'-bpy), que é um típico exemplo de ligante coordenado ao íon metálico Ru (II) é uma molécula bi dentada muito versátil, e a aplicação dos complexos resultantes tem sido demonstrada numa variedade de materiais poliméricos (PAUTZSCH et al., 2004) e atividade anti-metástase (TFOUNI et al., 2012).

Os complexos de rutênio são desenvolvidos particularmente com ligantes de relevância biológica, e o estado de oxidação mais comum é o Ru (II) e Ru (III) em solução aquosa. Os centros de Ru (II) são mais reativos que Ru (III) em reações de substituição e coordenam rapidamente com átomos de nitrogênio. Esses compostos são bastante interessantes para a química medicinal, pois possui solubilidade e estabilidade em água além de baixa toxicidade (TFOUNI et al., 2012).

A grande vantagem dos metalofármacos envolve a ligação de um composto orgânico de conhecida ação farmacológica a um fragmento contendo metal. Isto

resulta em um sinergismo de metal-fármaco em que o metal atua como um transportador e estabilizador para a droga atingir o seu alvo, enquanto que a droga orgânica carrega e protege o metal e impede reações secundárias no seu trânsito para um segundo alvo de ação biológica (SANTOS, 2012).

Os complexos do tipo $\text{cis-Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ onde Cl^- é um ligante doador π , apresentam potenciais mais negativos (CURTIS, 1980). Os ligantes doadores do tipo π são carregados negativamente estabilizando o estado de oxidação mais elevado, Ru (III). Grupos cloretos possuem a propriedade de transferir elétrons por meio dos orbitais do tipo π do Ru (II), aumentando a densidade eletrônica no centro metálico (MATSUBARA; FORD, 1976). O Ru (II) é especialmente um bom retro-doador quando complexado a ligantes insaturados, saturados monodentados ou bidentados, enquanto que o estado Ru (III) é um bom π acceptor de elétrons (DE ALMEIDA et al., 2005).

Portanto o complexo de rutênio constitui um candidato promissor na prospecção de novas drogas em virtude da configuração tridimensional oportunizando a coordenação com os mais diversos ligantes, permitindo o ajuste cinético dos compostos, influenciando na dose e na biodisponibilidade (Southam et al., 2017). Além de possuir condições fisiológicas semelhantes aos complexos de platina que o tornam um complexo bioativo promissor

Objetivou-se com este trabalho realizar o planejamento racional por química quântica computacional de complexos metálicos de rutênio coordenados nas formas *cis* e *trans* com epiisopiloturina, cloro e óxido nítrico para aplicações biotecnológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Detalhes computacionais

A geometria dos alcaloides, propriedades eletrônicas e vibracionais foram estudadas usando o programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). O programa Gaussview 5.0.8 (DENNINGTON et al., 2008) foi utilizado para obter modelos estruturais em 3D. Os cálculos de “otimização” geométrica foram realizados de acordo com o método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) (KOHN et al., 1965), combinando a base B3LYP (LEE et al., 1998; BECKE et al., 1993) conjuntos funcionais híbridos e baseados em *sdd* (MCLEAN; CHANDLER, 1980;

RAGHAVACHARI et al., 1980). Os cálculos de frequência foram realizados para obter propriedades termodinâmicas e para verificar se cada otimização atingiu um mínimo de energia.

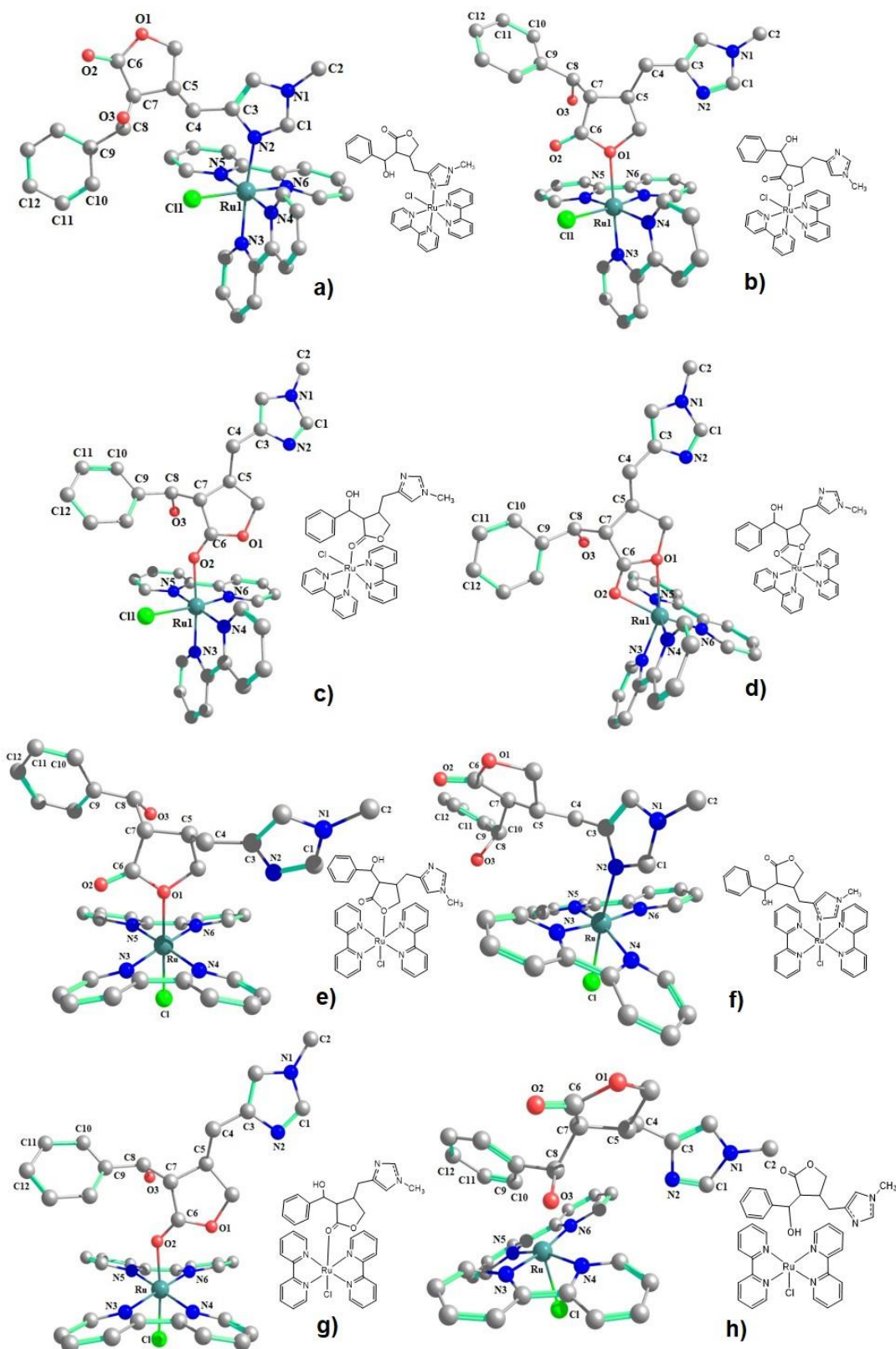
Os descritores químicos quânticos extraídos diretamente do arquivo de saída Gaussian foram: Mulliken, Natural Bond Orbitais (NBO) e Chelpg, densidade eletrônica, momento dipolo, energia do orbital molecular ocupado mais alto (E_{HOMO}) e energia do menor orbital molecular desocupado (E_{LUMO}). (PARR et al., 1999; ZHAN et., 2003). Todos os cálculos foram realizados na fase gasosa. A teoria funcional da densidade dependente do tempo (TDDFT) foi utilizada para calcular as energias e intensidades das transições eletrônicas (CASIDA et al., 1995; STRATMANN et al., 1998). As transições eletrônicas calculadas, infravermelho e Raman foram computadas usando funções gaussianas com meia largura de 25.000 cm^{-1} com o programa Swizard (GORELSKY, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Planejamento racional do complexo *cis*-[Ru(byp)₂(Epi)Cl] (EPIRUCL-*cis*) e *trans*-[Ru(byp)₂(Epi)Cl] (EPIRUCL-*trans*)

Para o planejamento racional do complexo metálico EPIRUCL ($\text{C}_{36}\text{H}_{34}\text{ClN}_6\text{O}_3\text{Ru}$) nas formas *cis* e *trans*, observaram-se as seguintes possíveis formas moleculares do complexo metálico na forma *cis*, sendo I - EPIRUCLN (ligação do centro metálico da Byp com o N2 do alcaloide EPI), II - EPIRUCLO1 (ligação do centro metálico da Byp com o O1 do alcaloide EPI), III - EPIRUCLO2 (ligação do centro metálico da Byp com o O2 do alcaloide EPI) e IV – EPIRUCLOO2 (ligação do centro metálico da bipyridina com o O1 e O2 do alcaloide EPI) e na forma *trans* V – EPIRUCLO1T (ligação do centro metálico da Byp com o O1 do alcaloide EPI), VI – EPIRUCLNT (ligação do centro metálico da Byp com o N2 do alcaloide EPI), VII – EPIRUCLO2T (ligação do centro metálico da Byp com o O2 do alcaloide EPI) e VIII – EPIRUCLO3T (ligação do centro metálico da Byp com o O3 do alcaloide EPI). (Figura 1).

Figura 1: Formas moleculares de ligação do complexo EPIRUCL-*cis*. a) I - EPIRUCLNC, b) II - EPIRUCLO1C, c) III - EPIRUCLO2C, d) IV – EPIRUCLOO2C e do complexo EPIRUCL-*trans* e) V – EPIRUCLO1T, f) VI - EPIRUCLNT, g) VII – EPIRUCLO2T e h) VIII – EPIRUCLO3T.



A densidade de cargas atômicas computadas com a metodologia NBO para EPI foi calculada de forma isolada, fora do complexo, para efeito de comparação dela quando inserida no complexo (Tabela 1). Analisando o anel imidazólico na estrutura I, observa-se que houve uma pequena variação das cargas em N1 (-0,398 e^-) e N2 (-0,479 e^-) em comparação as demais estruturas. O N2 por se comportar como uma base de Lewis e por estar interagindo diretamente como metal na estrutura I, doa maior densidade eletrônica do que a observada nas demais estruturas onde o N2 não interage diretamente com o Ru (ácido de Lewis). Desta forma é comum a carga em N2 haver redução quando comparada as demais. Conseqüentemente essa maior doação por parte do N2, reduz também as cargas de N1 que está no mesmo anel imidazólico.

Quanto às cargas do O1 no anel do dihidrofurano, verificou-se que nas cinco estruturas não houve grandes alterações, mesmo a estrutura II na qual o O1 interage diretamente com o centro metálico a interação da densidade de cargas foi pequena não ultrapassando 0,029 e^- . Observa-se ainda que no complexo III do anel do dihidrofurano, onde o O2 interage diretamente com o Ru, existe uma leve redução na sua densidade de cargas com 0,045 e^- .

Analisando o Ru por ser ácido de Lewis capta densidade eletrônica dos ligantes que se comportam como base de Lewis. Na estrutura I, onde o ligante EPI está coordenado ao Ru pelo átomo N2, observa-se uma carga natural de +0,095 e^- , que é menor em relação à carga observada nos demais compostos. Esta aparente redução na carga do metal é principalmente devido ao anel imidazólico que se comporta melhor como base de Lewis em relação ao anel dihidrofurano.

Tabela 1: Densidade de cargas atômicas calculadas pelo método NBO do alcaloide EPI e das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCL-cis e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCL-trans.

	EPI	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
N1	-0,430	-0,398	-0,421	-0,422	-0,414	-0,421	-0,400	-0,421	-0,418
N2	-0,556	-0,479	-0,589	-0,584	-0,602	-0,591	-0,467	-0,584	-0,604
O1	-0,576	-0,562	-0,547	-0,565	-0,561	-0,539	-0,562	-0,554	-0,551
O2	-0,593	-0,594	-0,565	-0,549	-0,541	-0,574	-0,591	-0,557	-0,615
O3	-0,809	-0,794	-0,800	-0,798	-0,826	-0,817	-0,822	-0,792	-0,800
C1	0,230	0,259	0,241	0,244	0,254	0,243	0,267	0,245	0,237
C2	-0,403	-0,402	-0,404	-0,404	-0,405	-0,404	-0,403	-0,404	-0,405
C3	0,133	0,201	0,130	0,128	0,118	0,128	0,182	0,127	0,135
C4	-0,456	-0,462	-0,450	-0,449	-0,447	0,454	-0,450	-0,449	-0,454
C5	-0,229	-0,228	-0,215	-0,226	-0,224	-0,218	-0,214	-0,225	-0,224
C6	0,835	0,845	0,878	0,904	0,900	0,871	0,843	0,902	0,848
C7	-0,343	-0,351	-0,349	-0,340	-0,333	-0,330	-0,354	-0,342	-0,355
C8	0,146	0,132	0,138	0,140	0,151	0,151	0,141	0,133	0,142
C9	-0,081	-0,079	-0,088	-0,093	-0,104	-0,085	-0,083	-0,082	-0,034
C10	-0,217	-0,207	-0,201	-0,207	-0,211	-0,216	-0,215	-0,197	-0,209
C11	-0,210	-0,210	-0,202	-0,204	-0,192	-0,198	-0,205	-0,200	-0,193
C12	-0,212	-0,211	-0,202	-0,204	-0,191	-0,202	-0,201	-0,204	-0,209
Ru1	-	0,095	0,164	0,142	0,409	0,123	0,072	0,107	0,100
N3	-	-0,388	-0,366	-0,372	-0,414	-0,396	-0,399	-0,395	-0,416
N4	-	-0,413	-0,417	-0,408	-0,459	-0,407	-0,418	-0,396	-0,433
N5	-	-0,415	-0,430	-0,427	-0,444	-0,410	-0,428	-0,409	-0,421
N6	-	-0,402	-0,416	-0,402	-0,375	-0,415	-0,400	-0,409	-0,434
Cl1	-	-0,420	-0,392	-0,413	-	-0,333	-0,374	-0,347	-0,278

Observando a tabela 2, que representa alguns parâmetros geométricos verifica-se que os comprimentos de ligação entre o Ru – Cl são diferentes nas estruturas I, II e III, em que a distância da ligação Ru – Cl na estrutura I é a maior (2,491 Å). Considerando que os átomos da EPI que se ligam ao metal são diferentes, e os demais ligantes são iguais, considera-se que a densidade de cargas doada ao metal influencia no comprimento da ligação Ru-Cl onde se verificou que quanto maior a doação da base oriunda da EPI, maior o comprimento da ligação Ru-Cl. A estrutura I tem-se o N2 – Ru do anel imidazólico, nesta se verifica que comporta melhor como base de Lewis em comparação a ligação O2- Ru do anel dihidrofurano, aumentando a densidade eletrônica sobre Ru e conseqüentemente afastando mais o átomo de cloro.

Tabela 2: Distâncias (em Å) e ângulos (em graus) das ligações atômicas das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCL-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCL-*trans*.

EPIRUCL-<i>cis</i>	EPI	I	II	III	IV
N1 – C2	1,465	1,470	1,468	1,468	1,471
N2 – C1	1,337	1,351	1,339	1,338	1,340
O2 = C6	1,233	1,232	1,223	1,247	1,260
O1 – C6	1,390	1,393	1,422	1,362	1,372
O3 – C8	1,469	1,469	1,477	1,477	1,475
N1 – C1 – N2	111,6	111,2	111,5	111,5	111,4
C1 – N1 – C2	126,8	126,6	126,8	126,7	126,6
C3 – C4 – C5	112,6	115,3	114,0	113,4	112,5
O2 = C6 - O1	121,9	121,4	121,7	121,7	114,3
O3 – C8 – C7	105,3	109,3	109,3	109,1	104,6
C7 – C8 – C9	116,0	115,7	116,4	116,0	116,5
C8 – C9 – C10	119,0	118,5	118,1	118,7	118,6
Ru – Cl	-	2,491	2,454	2,471	-
Ru – N2	-	2,176	-	-	-
Ru – O1	-	-	2,283	-	2,454
Ru – O2	-	-	-	2,153	2,188
EPIRUCL-<i>trans</i>	EPI	V	VI	VII	VIII
N1 – C2	1,465	1,469	1,471	1,468	1,470
N2 – C1	1,337	1,339	1,351	1,338	1,342
O2 = C6	1,233	1,227	1,231	1,254	1,238
O1 – C6	1,390	1,412	1,394	1,355	1,380
O3 – C8	1,469	1,467	1,477	1,475	1,466
N1 – C1 – N2	111,6	111,6	111,3	111,5	111,5
C1 – N1 – C2	126,8	126,7	126,4	126,7	126,7
C3 – C4 – C5	112,6	113,8	111,8	113,3	114,2
O2 = C6 - O1	121,9	121,1	121,6	122,2	122,7
O3 – C8 – C7	105,3	104,7	109,3	109,3	111,4
C7 – C8 – C9	116,0	115,6	116,4	117,0	114,8
C8 – C9 – C10	119,0	119,0	118,3	117,6	119,4
Ru – Cl	-	2,425	2,472	2,429	2,412
Ru – N2	-	-	2,165	-	-
Ru – O1	-	2,221	-	-	-
Ru – O2	-	-	-	2,150	-

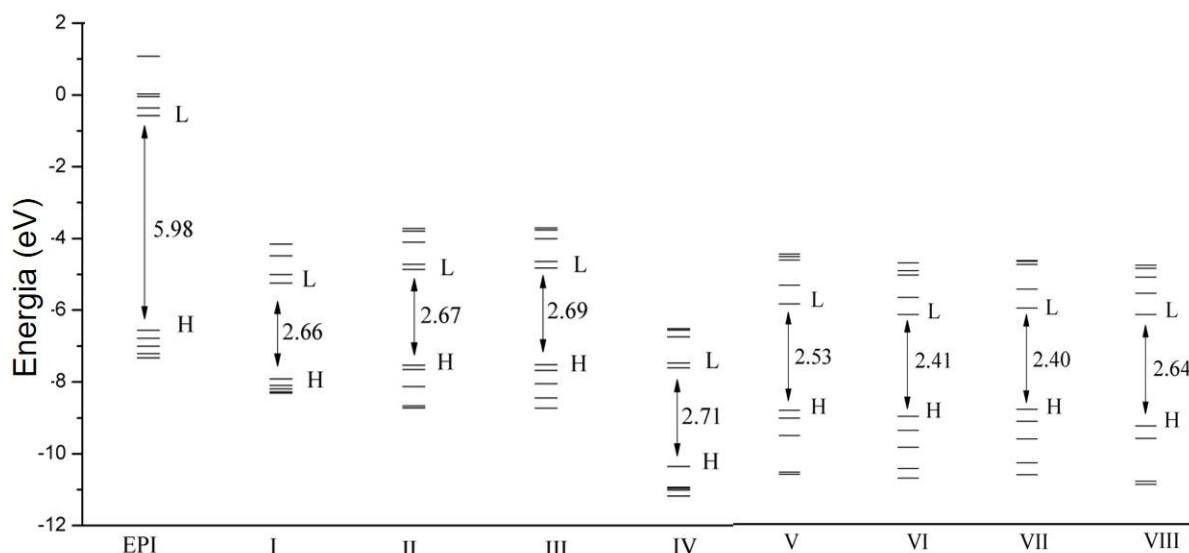
Os cálculos de orbitais moleculares evidenciaram o gap de energia para EPI pura é de 5,98 eV, e após a formação do complexo deste alcaloide foi possível verificar uma expressiva diminuição dos gaps de energias nos quatro complexos *cis* e *trans* (Figura 2, Tabela 3).

Tabela 3: Orbitais Moleculares HOMO e LUMO das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCI-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCI-*trans*.

		EPI	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
LUMO	+4	1,158	-4,026	-3,644	-3,631	-6,438	-3,518	-3,727	-3,666	-3,779
	+3	0,103	-4,086	-3,719	-3,688	-6,477	-3,579	-3,911	-3,689	-3,851
	+2	0,029	-4,406	-4,026	-3,933	-6,672	-3,658	-4,019	-3,760	-4,065
	+1	-0,281	-4,937	-4,640	-4,573	-7,402	-4,250	-4,549	-4,350	-4,449
	0	-0,502	-5,173	-4,790	-4,750	-7,528	-4,696	-4,952	-4,796	-4,951
GAP		5,984	2,666	2,673	2,695	2,752	2,531	2,413	2,403	2,644
HOMO	0	-6,486	-7,839	-7,463	-7,445	-10,281	-7,227	-7,366	-7,200	-7,596
	-1	-6,709	-8,022	-7,577	-7,599	-10,860	-7,411	-7,700	-7,484	-7,887
	-2	-6,932	-8,122	-8,058	-7,976	-10,886	-7,826	-8,100	-7,905	-8,139
	-3	-7,129	-8,192	-8,591	-8,368	-10,937	-8,691	-8,602	-8,474	-8,904
	-4	-7,249	-8,232	-8,646	-8,650	-11,104	-8,740	-8,835	-8,752	-8,987

Nos isômeros (I, II e III) podemos perceber uma semelhança nos gaps calculados, no qual o composto I é aquele com menor energia de gap (2,66 eV) e composto III (2,69 eV), o maior, indicando uma maior facilidade nas transições eletrônicas no composto I (Figura 2). Como era de esperar as energias HOMO e LUMO presente nos isômeros I, II e III também são semelhantes, contudo a degenerescência observada no isômero I diverge ao observar nos isômeros II e III, no qual estes dois últimos apresentando uma quebra da degenerescência maior do que a observada no isômero I, quando se tratando do HOMO. No complexo IV que se trata de uma molécula alternativa observa-se que o gap computado é mais elevado (2,71 eV) do que os isômeros, apontando com base nos gaps que a retirada de um íon Cl (comporta-se como uma base de Lewis) e a predição da EPI interagindo de forma bidentada no composto não é favorável (Figura 2, Tabela 3). A diminuição das energias de gap observada nos oito compostos complexados com EPI poderia favorecer a potencialização da atividade biológica deste alcaloide como a atividade esquistossomicida.

Figura 2: Gráfico dos Orbitais Moleculares HOMO e LUMO das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCI-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCI-*trans*.



Os resultados espectroscópicos de UV-Vis, evidenciados na figura 3, é perceptível uma semelhança no perfil das bandas encontradas nos complexos, onde o comprimento de onda na presença do metal tornou perceptível a presença de duas bandas, tanto para as formas *cis* como *trans*. O perfil das atribuições e o tipo de transferência de carga apresentados na tabela 4 e figura 4 corroboram com esses dados espectroscópicos. Entre os complexos *cis*, o composto I apresentou uma força do oscilador de 0,0829 em 533 nm onde ocorreu uma transferência de carga do ligante para o metal de 170→175. No complexo II, a força do oscilador de 0,0197 em 620 nm indicou que ocorreu uma transferência de carga do metal para o metal entre 173→175. Para o complexo III, a força do oscilador de 0,0903 em 523 nm indicou que também ocorreu uma transferência de carga do metal para o metal entre 173→176. E no composto IV, obteve uma força do oscilador de 0,0568 em 415 nm indicou que ocorreu uma transferência de carga do metal para o metal entre 164→166 (Tabela 4).

Entre os complexos *trans*, o composto V apresentou uma força do oscilador de 0,1191 em 293 nm onde ocorreu uma transferência de carga do ligante para o metal de 165→175. No complexo VI, a força do oscilador de 0,1216 em 298 nm indicou que ocorreu uma transferência de carga do ligante para o metal entre

165→175. Para o complexo VII, a força do oscilador de 0,0891 em 296 nm indicou que também ocorreu uma transferência de carga do ligante para o metal entre 164→175. E no composto VIII, obteve uma força do oscilador de 0,1181 em 294 nm indicou que ocorreu uma transferência de carga também do ligante para o metal entre 165→175 (Tabela 4).

Evidentemente os complexos *trans* obtiveram em suas quatro formas total transferência de cargas na maior energia entre o ligante para o metal. Sendo mais favorável quando se tem apenas transferências de metal para metal. Porém os gaps de energia de forma geral favoreceram a forma *cis*, tendo destaque as formas I, II e III com gaps de 3,05 eV, 2,78 eV e 3,02 eV, respectivamente (Figura 4).

Figura 3: Espectro de UV-Vis das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCI-*cis* (a) e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCI-*trans* (b).

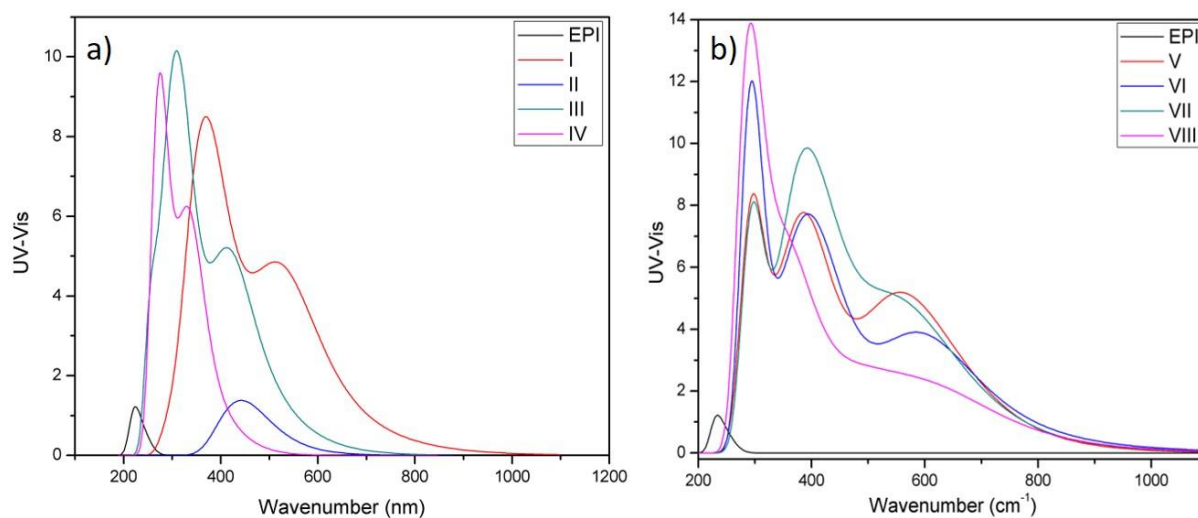
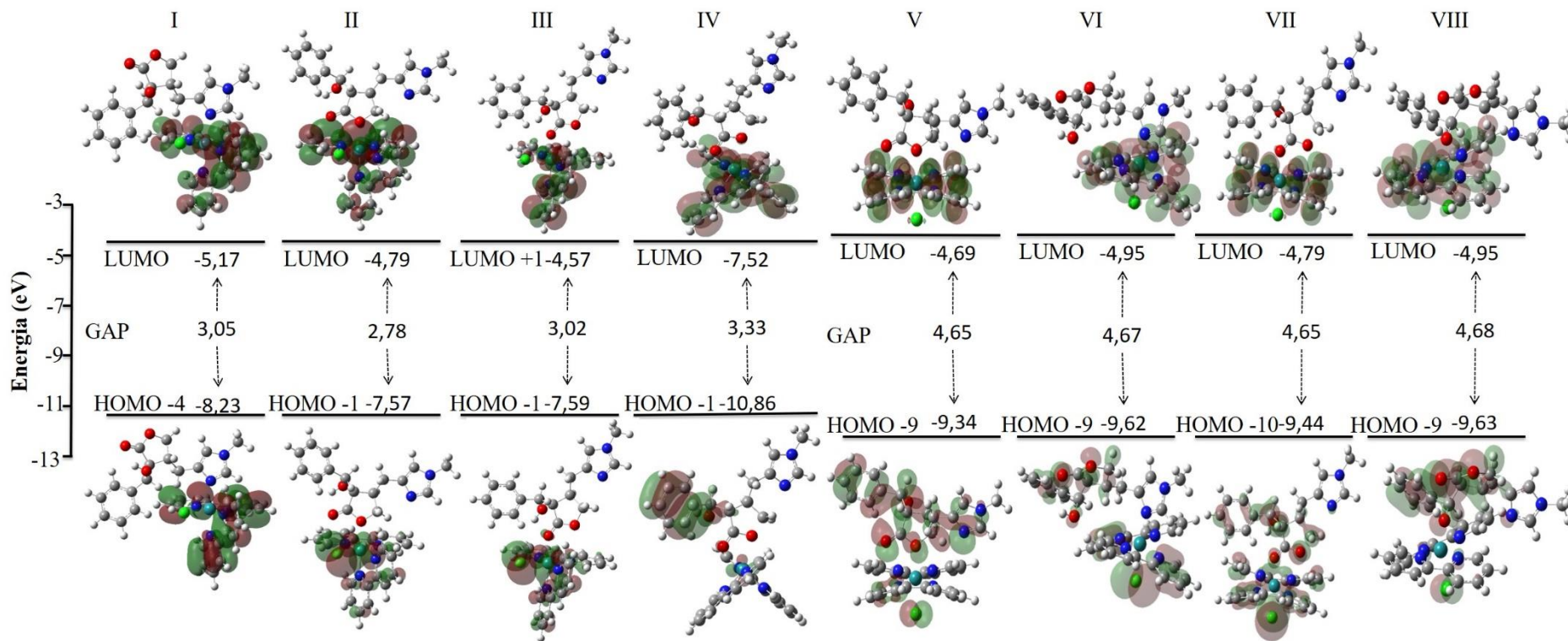


Tabela 4: Principais atribuições de picos do espectro eletrônico, energia e tipos. Calculados pelo Swizard, das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCI-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCI-*trans*.

Comprimento de Onda (nm) / Força do oscilador [f]	Composição	Energia (eV)	Tipo de Transferência de Carga
I			
533 [0,0829]	170→175 (47%)	2,33	TCLM
391 [0,0305]	173→178 (56%)	3,16	TCML
373 [0,0267]	174→185 (34%)	3,32	TCLM
334 [0,0265]	166→176 (29%)	3,71	TCLM
350 [0,0248]	167→176 (34%)	3,54	TCLM
368 [0,0232]	173→180 (70%)	3,36	TCMM
411 [0,0224]	174→178 (59%)	3,02	TCML
447 [0,0223]	174→177 (80%)	2,77	TC M-M
II			
620 [0,0197]	173→175 (53%)	2,00	TC M-M
653 [0,0137]	174→175(69%)	1,90	TC M-M
646 [0,0012]	174→176(63%)	1,92	TC M-M
III			
523 [0,0903]	173→176 (74%)	2,37	TC M-M
345 [0,0609]	167→176 (38%)	3,59	TC M-M
389 [0,0468]	173→178 (27%)	3,19	TC M-M
335 [0,0396]	170→176 (22%)	3,70	TC LE-M
448 [0,0252]	172→175 (59%)	2,54	TC M-M
380 [0,0203]	173→180 (41%)	3,26	TC M-M
IV			
415 [0,0568]	164→166 (33%)	2,98	TC M-M
421 [0,0436]	164→166 (58%)	2,94	TC M-M
314 [0,0283]	160→170 (30%)	3,95	TC M-M
324 [0,0279]	163→171(25%)	3,82	TC M-M
295 [0,0274]	157→166 (59%)	4,19	TC M-M
334 [0,0263]	163→170(41%)	3,70	TC M-M
323 [0,0201]	162→168 (25%)	3,83	TC M-M
V			
293 [0,1191]	165→175 (36%)	4,23	TCLM
600 [0,0815]	173→175 (93%)	2,07	TCLM
289 [0,0433]	168→178 (52%)	4,29	TCLL
415 [0,0389]	173→177 (59%)	2,98	TCLL
495 [0,0345]	174→178 (69%)	2,70	TCML
379 [0,0314]	168→175 (60%)	3,27	TCLL
292 [0,0299]	168→177 (49%)	4,24	TCLL
420 [0,0288]	171→175 (36%)	2,95	TCLM
399 [0,0284]	173→178 (57%)	3,11	TCLL
297 [0,0204]	164→175 (38%)	4,16	TCLL
VI			
298 [0,1216]	165→175 (52%)	4,15	TCLM
420 [0,0737]	172→175 (77%)	2,29	TCMM
366 [0,0562]	169→175 (53%)	3,38	TCLM
615 [0,0534]	173→175 (82%)	2,01	TCLM
419 [0,0415]	174→179 (70%)	2,96	TCML

394 [0,0235]	173→179 (51%)	3,15	TCLL
301 [0,0229]	166→175 (73%)	4,11	TCLM
405 [0,0216]	174→180 (38%)	3,06	TCMM
VII			
296 [0,0891]	164→175 (56%)	4,18	TCLM
373 [0,0764]	169→175 (86%)	3,32	TCLM
543 [0,0656]	172→175 (81%)	2,28	TCMM
440 [0,0532]	174→179 (61%)	2,84	TCML
623 [0,0475]	173→175 (86%)	1,99	TCLM
391 [0,0404]	173→178 (50%)	3,17	TCLL
348 [0,0397]	173→180 (35%)	3,56	TCLM
302 [0,0338]	166→175 (42%)	4,10	TCLM
400 [0,0251]	173→179 (30%)	3,10	TCLL
290 [0,0241]	170→177 (78%)	4,27	TCLL
429 [0,0227]	174→180 (59%)	2,89	TCMM
VIII			
294 [0,1181]	165→175 (75%)	4,20	TCLM
279 [0,0970]	167→176(31%)	4,44	TCLM
339 [0,0548]	169→175 (59%)	3,65	TCLM
315 [0,0435]	167→175 (69%)	3,93	TCLM
504 [0,0420]	173→175 (42%)	2,46	TCMM
367 [0,0395]	174→181 (62%)	3,38	TCMM
305 [0,0389]	166→175 (57%)	4,05	TCLM
404 [0,0358]	174→179 (89%)	3,07	TCML
634 [0,0341]	173→175 (52%)	1,95	TCMM
374 [0,0265]	170→175 (63%)	3,31	TCLM
280 [0,0262]	173→189 (27%)	4,42	TCMM

Figura 4: Orbitais Moleculares HOMO e LUMO das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCI-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCI-*trans*.



Os espectros de infravermelho dos complexos *cis* e *trans* e do alcaloide EPI são ilustrados na figura 5 e tabela 5. Pode ser observada uma similaridade nas frequências vibracionais dos compostos alterando de acordo com a sua posição de acoplamento do alcaloide EPI. O estiramento simétrico da carbonila (C=O), apresenta uma banda na região de 1785 cm^{-1} (EPI), 1741 cm^{-1} (I), 1770 cm^{-1} (II), 1686 (III) cm^{-1} , 11630 cm^{-1} (IV), 1750 cm^{-1} (V), 1745 (VI) cm^{-1} , 1656 cm^{-1} (VII) e 1716 (VIII) cm^{-1} . Observa-se que no composto III-*cis* e VII-*trans* obtiveram um menor valor no comprimento de onda, justificado pela sua conformação de coordenação com o metal que se dá pelo O2 do ligante EPI. (Tabela 5).

Figura 5: Espectro de Infravermelho (IR) das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCI-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCI-*trans*.

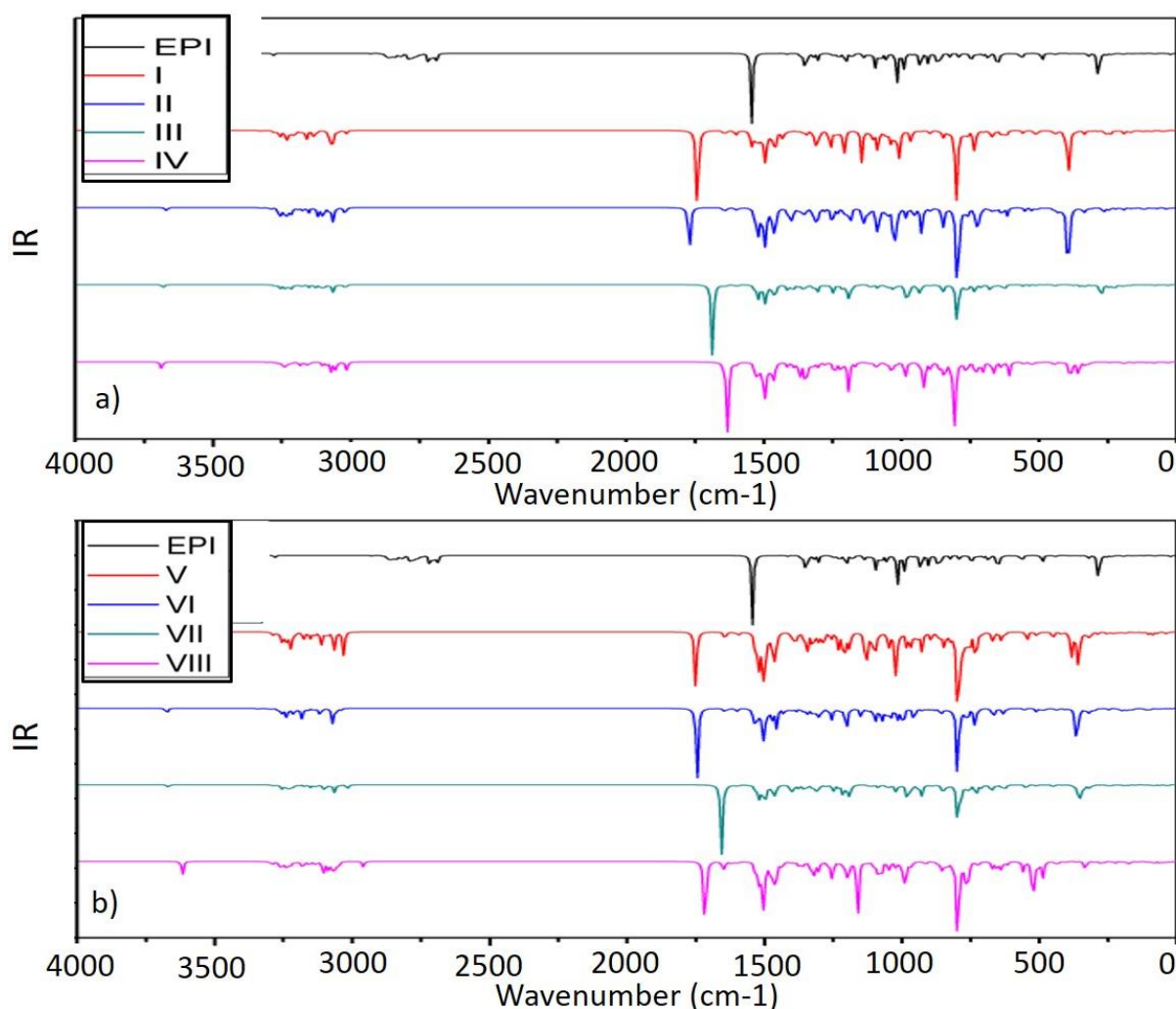


Tabela 5: Frequências espectroscópicas de Infravermelho das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCL-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCL-*trans*.

EPI	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Atribuição
390	394	396	274	388	361	364	363	488	Rotação do H-O
-	803	800	800	806	800	798	800	800	Deformação dos H no anel Bipirimidimico
1162	1010	-	-	918	929	926	929	928	Deformação no anel dihidrofurano
1455	1475	1467	1468	1468	1467	1472	1467	1466	Estiramento do C2-N1 Deformação do H-C8*
1785	1741	1770	1686	1630	1750	1745	1656	1716	Estiramento simétrico C=O
2963	3124	3105	3107	3056	3031	3119	3105	3132	Estiramento do H-C8
3022	3071	3065	3064	3071	3065	3071	3065	3067	Estiramento do H-C2
3783	3664	3669	3682	3686	3688	3674	3669	3617	Estiramento do H – O3

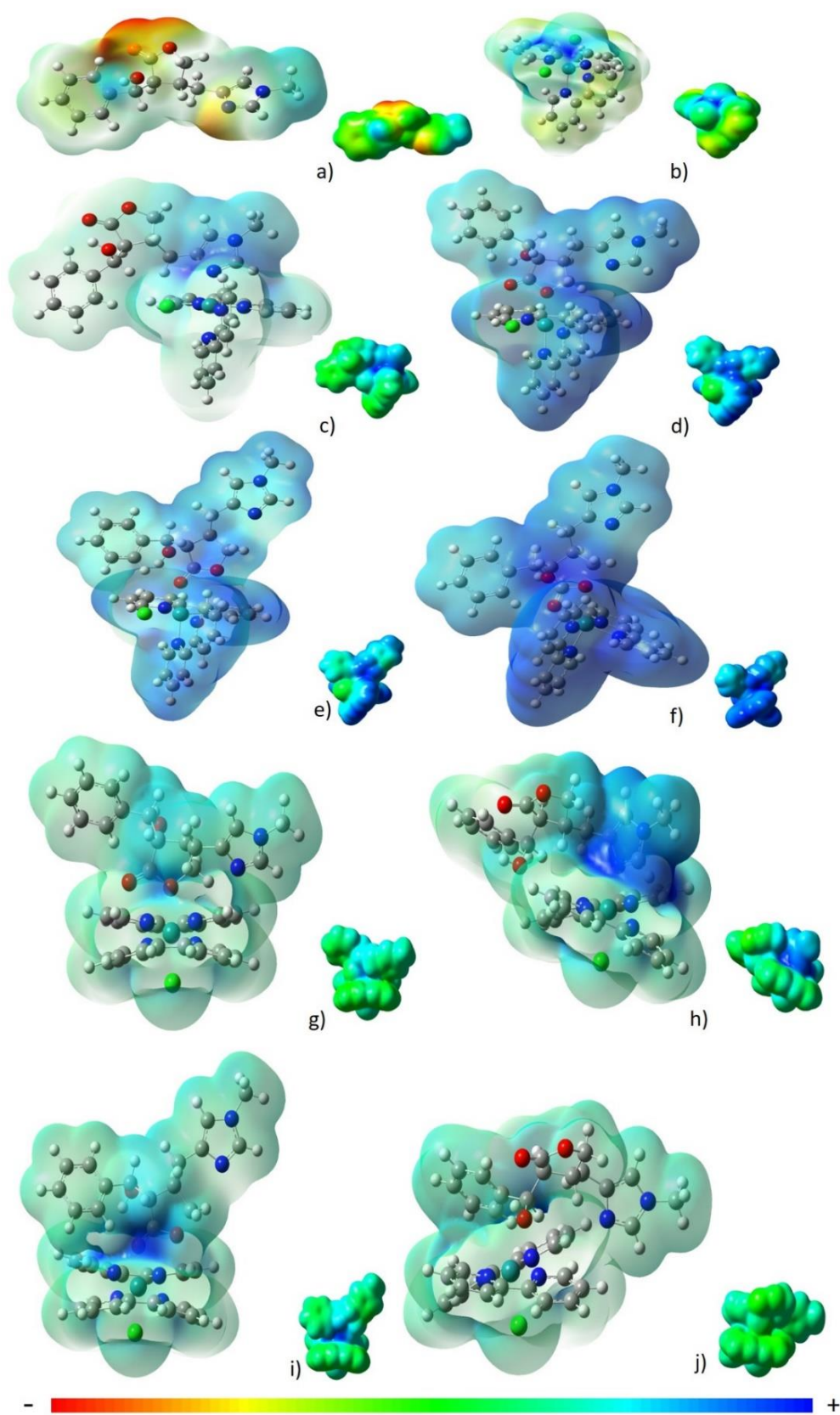
Tabela 6: Energias eletrostáticas em (Hartree) Energia ponto zero (HF), Térmica (ΔT), Entalpia (ΔH), Energia livre de Gibbs (ΔG), Momento dipolo (μ -debye), Entropia - S (Cal/Mol Kelvin) das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCI-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCI-*trans*.

	EPI	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
HF	-955,243343	-2500,646394	-2500,630518	-2500,648723	-2040,135072	-2500,6201	-2500,6261	-2500,6263	-2500,5915
ΔT	-955,224312	-2500,605403	-2500,589117	-2500,607171	-2040,095692	-2500,5788	-2500,5851	-2500,5849	-2500,5499
ΔH	-955,223368	-2500,604458	-2500,588172	-2500,606227	-2040,094748	-2500,5778	-2500,5841	-2500,5840	-2500,5489
ΔG	-955,294028	-2500,724028	-2500,709993	-2500,728647	-2040,211970	-2500,6990	-2500,7023	-2500,7057	-2500,6710
S	148,718	251,655	256,393	257,654	246,715	254,992	248,792	256,145	256,832
μ	6,2965	21,4175	11,4813	8,6544	5,8887	9,459278	12,175835	8,246023	6,539603

Os resultados de densidade eletrônica observados na figura 6, nos da ideia da polaridade de cada molécula. A princípio é identificado que a EPI isolada possui regiões com polaridade mais negativa em torno dos O e N2 como era de se esperar. No Byp observa-se uma densidade eletrônica mais neutra. Quando complexados observa-se uma tendência da polaridade ser mais positiva, contudo, no composto I, onde a interação da EPI com o metal ocorre pelo átomo de N2, é verificada uma polaridade menos positiva do que nos demais isômeros, uma vez que nesse composto os átomos de O estão mais livres e possui uma elevada eletronegatividade, algo que cria regiões mais polares. Nos isômeros II e III, onde a interação da EPI ocorre por meio de átomos de O1 e O2, respectivamente, deixando livres os átomos de N. O momento dipolo apresentou maior polaridade para a estrutura I com 21,4175 debyes, isso confere a esse sistema maior capacidade de interação biológica em comparação com EPI que apresentou polaridade de 6,2965 debyes (Tabela 6).

A energia livre de Gibbs presente na estrutura III foi a menor -2500,728647 Hartree conferindo mais estabilidade entre as quatro estruturas e também conferindo maior grau de desordem com entropia de 257,654 Cal mol.kelvin⁻¹, isso poderia oferecer maior reatividade a esse sistema. A estrutura I apresentou uma diferença na energia livre de Gibbs de 0,004619 Hartree entre o complexo III, conferindo a ela também boa estabilidade, porém a entropia com 251,655 Cal mol⁻¹Kelvin⁻¹ foi menor (Tabela 6).

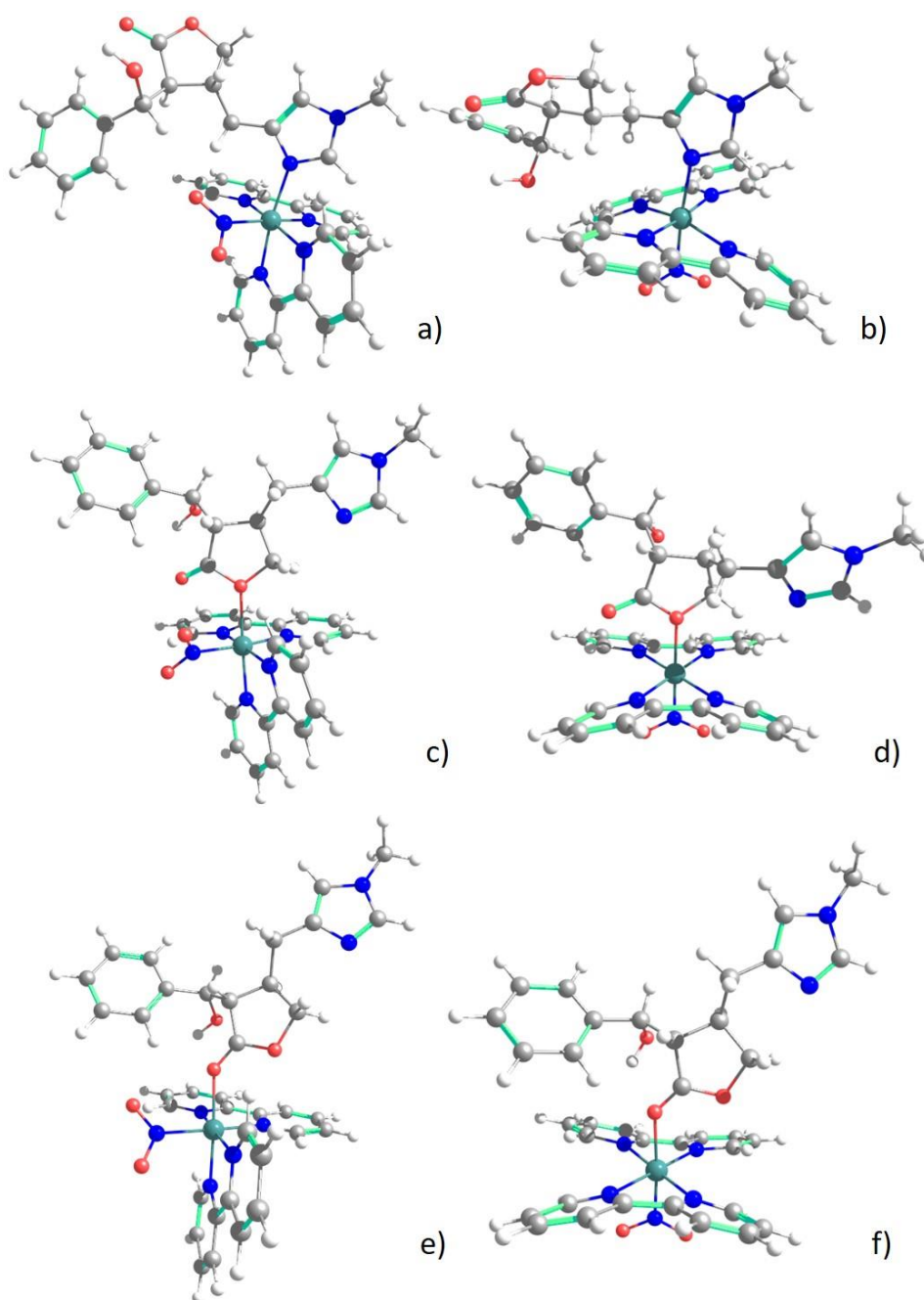
Figura 6: Densidade eletrônica das formas moleculares I, II, III e IV do complexo EPIRUCI-*cis* e V, VI, VII e VIII do complexo EPIRUCI-*trans*.



Planejamento racional do complexo *cis*-[Ru(byp)₂(Epi)NO₂] (EPIRUNO₂-*cis*) e *trans*-[Ru(byp)₂(Epi)NO₂] (EPIRUNO₂-*trans*)

Os resultados do planejamento racional pela “otimização” dos complexos EPIRUNO₂-*cis* e EPIRUNO₂-*trans* estão representados figura 7.

Figura 7: Formas moleculares de ligação do complexo EPIRUNO₂-*cis* e EPIRUNO₂-*trans* a) IX – EPIRUNO2NC, b) X - EPIRUNO2NT, c) XI – EPIRUNO2O1C, d) XII – EPIRUNO2O1T, e) XIII – EPIRUNO2O2C, e f) XIV - EPIRUNO2O2T.



CONCLUSÕES

Através da química quântica computacional foi possível verificar que em todos os complexos (*cis* e *trans*) houve uma diminuição nos gaps de energia HOMO e LUMO em comparação ao alcaloide epiisopiloturina. Entre as formas *cis*, complexo EPIRUCLN-*cis* apresentou o melhor gap de energia, e entre os complexos na forma *trans*, o EPIRUCLO2. De um modo geral os complexos *cis* apresentaram valores satisfatórios para esse parâmetro. Além disso, as energias mostram valores mais estáveis também para *cis*, sendo o complexo EPIRUCLO2-*cis* e EPIRUCLN-*cis* mais estáveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, e ao Governo do Estado do Maranhão e a Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação – SECTI pelo apoio com a bolsa estudo. A universidade Federal do Maranhão – UFMA, pelo incentivo. Agradecemos ao CENAPAD-UFC pelo ambiente de realização dos cálculos. E a universidade Estadual do Piauí – UESPI pela estrutura física para realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry.III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 5648-5652, 1993.

CASIDA, M. E. In **Recent Advances in Density Functional Methods**; Chong, D. P., Ed.; World Scientific: Singapore, 1995.

CURTIS, J. C.; SULLIVAN, B.P.; MEYER, T. J. Calculation of electron-transfer rate constants from the properties of charge-transfer absorption bands. The PQ2+,Fe(CN)64- system. **Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 3833–3839, 1980.

DE ALMEIDA, R. L. Correlação entre medidas espectroscópicas e eletroquímicas do complexo metálico. *cis*-Ru(bpy)₂(Cl)₂. **Revista UNINGÁ**, v. 4, p. 91-99, 2005.

DENNINGTON, R. D.; KEITH, T. A.; MILLAN, J. M. **GaussView**, v. 5.0.8, Semicchem, Inc.: Shawnee KS, 2008.

FERREIRA, D. M. **Coordenação a centros e rutênio e polimerização via metátase de um novo monômero-ligante do tipo norboneno-piridina**. Dissertação de mestrado. Instituto de química de São Paulo, Universidade de São Paulo, 2012.

FRISCH, M. J; G. W. TRUCKS; H. B. SCHLEGEL; G. E. SCUSERIA; M. A. ROBB; J. R. CHEESEMAN; G. SCALMANI; V. BARONE; B. MENNUCCI; G. A. PETERSSON; H. NAKATSUJI; M. CARICATO; X. LI, H. P. HRATCHIAN; A. F. IZMAYLOV; J. BLOINO; G. ZHENG; J. L. SONNENBERG; M. HADA; M. EHARA; K. TOYOTA; R. FUKUDA; J.-Y. HASEGAWA; M. ISHIDA; T. NAKAJIMA; Y. HONDA; O. KITAO; H. NAKAI; T. VREVEN; J.A. MONTGOMERY; JR., J. E. PERALTA; F. OGLIARO; M. BEARPARK; J. J. HEYD; E. BROTHERS; K. N. KUDIN; V. N. STAROVEROV; R. KOBAYASHI; J. NORMAND; K. RAGHAVACHARI; A. RENDELL; J. C. BURANT; S. S. IYENGAR; J. TOMASI; M. COSSI; N. REGA; J. M. MILLAM; M. KLENE; J. E. KNOX; J. B. CROSS; V. BAKKEN; C. ADAMO; J. JARAMILLO; R. GOMPERS; R. E. STRATMANN; O. YAZYEV; A. J. AUSTIN; R. CAMMI, C. POMELLI; J. W. OCHTERSKI; R. L. MARTIN; K. MOROKUMA; V. G. ZAKRZEWSKI; G.A. VOTH; P. SALVADOR; J. J. DANNENBERG; S. DAPPRICH; A. D. DANIELS; O. FARKAS; J. B. FORESMAN; J. VINCENT ORTIZ; J. CIOSLOWSKI; D. J. FOX. **Gaussian 09 revision D.01**, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2009.

GORELSKY, S. I. **Swizard**. Department of Chemistry, York University: Toronto, ON, 1999.

KOHN, W.; SHAM, L. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Journal of Physical Review**, v. 140, p.1133-1138, 1965.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. **Journal of Physical Review**, v. 37, p. 785-789, 1998.

MATSUBARA, T.; FORD, P. C. Some applications of cyclic voltammetry to the reactions and properties of ruthenium ammine complexes. Reduction potentials and rate studies. **Inorganic Chemistry**, v. 15, p. 1107 -1110, 1976.

MCLEAN, A. D.; CHANDLER, G. S. "Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11-18." **Journal of Chemical Physics**, v. 72, p. 5639-5648, 1980.

MINISTERIO DA SAÚDE (SUS). Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/11240-descricao-da-doenca>. Acesso em 26 de dezembro de 2017.

PARR, R. G.; VON SZENTPÁLY, L.; LIU, S. Electrophilicity Index. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 1922-1924, 1999.

PAUTZSCH, T.; BLANKENBURG, L.; KLEMM, E. Design and synthesis of Ru (II)-bipyridyl-containing conjugated polymers. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, p.722–732, 2004.

RAGHAVACHARI, J. S; BINKLEY, R; SEEGER, J. A. Pople, "Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions." **Journal of Chemical Physics**, v. 72, p. 650-654, 1980.

ROY, K.; KAR, S.; DAS, R.N. **Understanding the basics of Qsar for applications in pharmaceutical sciences and risk assessment**. 484p, 2015.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

SANTOS, M. **Síntese e caracterização de complexos híbridos de rutênio e medida da atividade biológica contra *Trypanosoma cruzi***. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2012.

SOUTHAM, H. M.; BUTLER, J. A.; CHAPMAN, J.A.; POOLE, R. K. The microbiology of ruthenium complexes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 71, p. 1–96, 2017.

STRATMANN, R. E.; SCUSERIA, G. E.; FRISCH, M. J. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. **Journal of Chemical Physics**, v. 109, p. 8218-8224, 1998.

ZHAN, C. G.; NICHOLS, J. A.; DIXON, D. A. Ionization Potential, Electron Affinity, Electronegativity, Hardness, and Electron Excitation Energy: Molecular Properties from Density Functional Theory Orbital Energies. **Journal Physical Chemistry A**, v. 107, p. 4184–4195, 2003.

Síntese, caracterização *in silico* e avaliação da atividade anti-helmíntica de complexos metálicos de rutênio e episopiloturina

Artigo será submetido à revista *Journal of Medicinal Chemistry*

ISSN: 0022-2823

Qualis Capes: Biotecnologia (A1)

Fator de impacto: 6.25

Capítulo IV

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMINTICA DE COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTÊNIO E EPIISOPILOTURINA

Jefferson Almeida Rocha ^{a,b}; Nayra da Costa e Silva Rego ^a; Francisco Ivan da Silva ^c; Ricardo Martins Ramos ^d; Ionara Nayana Gomes Passos ^b; Edinilton Carvalho Muniz ^g; Luiz Gonzaga de França Lopes ^g; Peter Eaton ^h; Marcos Paulo Nascimento da Silva ^e; Josue de Moraes ^e; Jose Roberto de Sousa de Almeida Leite ^f; Francisco da Chagas Alves Lima ^c

^a Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, RENORBIO, Ponto focal UFPI, Teresina, Piauí, Brasil;

^b Grupo de Pesquisa em Ciências Naturais e Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Grajaú, MA, Brasil;

^c Grupo de Pesquisa em Química Quântica Computacional e Planejamento de Fármacos, Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, PI, Brasil;

^d Laboratório de Pesquisa em Sistemas de Informação, Departamento de informação, Ambiente, Saúde e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil;

^e Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade Guarulhos, NPDN/UNG, Guarulhos, SP, Brasil;

^f Área Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brasil.

^g Química, Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, CE, Brasil.

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença negligenciada causada pelo parasita *Schistosoma mansoni* registrada em 54 países afetando aproximadamente 240 milhões de pessoas. Novas drogas contra a esquistossomose como o alcaloide epiisopiloturina tem sido cada vez mais estudada e demonstrada seu potencial farmacológico. Ao mesmo tempo, o uso do complexo metálico de rutênio como carreador de drogas tem influenciado propriedades químicas e farmacológicas potencializando o efeito biológico. Objetivou-se com este trabalho realizar a síntese, caracterização *in silico* e avaliação da atividade anti-helmíntica de complexos metálicos de rutênio e epiisopiloturina. Estudos a nível computacional avaliando as

propriedades geométricas, eletrônicas, cargas atômicas, bem como as propriedades vibracionais e termodinâmicas dos compostos epiisopiloturina, *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl] (EPIRUCLN e EPIRUCLO), *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂], utilizando os modelos teóricos B3lyp/Sdd. O perfil ADMET foi aplicado para obtenção das propriedades farmacocinéticas. Após a “otimização”, os compostos foram submetidos a cálculos de docagem molecular com as enzimas purina nucleósideo fosforilase (PNP), tireoxina glutationa redutase (TGR), metiladenosina fosforilase (MTAP), arginase (ARG), uridina fosforilase (UP), catepsina B1 (2CB1) e histona desacetilase 8 (HDAC8) e respectivos códigos do PDB (3qsd, 4q3p, 4cqf, 4l5a, 1tcu, 2v6o, 4txh), possíveis alvo de *S. mansoni*. A melhor afinidade molecular foi obtida com a enzima PNP e os ligantes EPIRUCLO e EPIRUCLN com -10,99 kcal mol⁻¹ e -10,1 kcal mol⁻¹, respectivamente. Após esse prévio estudo computacional, os dois isômeros do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl] e o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂] foram sintetizados para a realização da atividade anti-schistosoma *ex vivo* e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl]sineg eliminou 100% dos vermes machos e fêmeas a uma concentração de 50 µM em 72 horas, além de reduzir atividade motora logo nas primeiras 24 horas. O complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂] eliminou 60% dos vermes machos a 50 µM em 72 horas. A complexação da epiisopiloturina com macrociclo de rutênio aumentou a atividade biológica contra *S. mansoni* em 10 vezes em relação à EPI livre, mostrando que esse complexo poderá ser um novo candidato a fármaco contra a esquistossomose.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, complexo metálico, epiisopiloturina.

INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma doença negligenciada causada pelo parasita trematódeo *Schistosoma mansoni*. Esta doença possui distribuição em 54 países afetando aproximadamente 240 milhões de pessoas e mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (WHO, 2017). A infecção é prevalente em comunidades mais pobres abrangendo áreas tropicais e subtropicais. O praziquantel é o único medicamento utilizado no controle da doença criado na década de 70, além disso, tem demonstrado que é ineficaz contra o estágio larval do parasita e tem

demonstrado resistência devido ao uso profilático da droga sem diagnóstico do estágio de maturidade do verme (MORAES, 2012).

Na busca de novas drogas contra a esquistossomose, pesquisas têm demonstram que o alcaloide epiisopiloturina (EPI), identificado inicialmente na década de 70 (VOIGHTNDER et al., 1978), foi isolado e caracterizado quimicamente onde evidenciou seu potencial farmacológico contra *S. mansoni* (VERAS et al., 2012; VERAS et al., 2013; GUIMARAES et al., 2015; CAMPELO et al., 2017). Ao mesmo tempo, complexos metálicos de rutênio hexacoordenados tem influenciado propriedades químicas e farmacológicas (SOUTHAM, 2017), além de possuir solubilidade, estabilidade em água e baixa toxicidade (TFOUNI et al., 2012), sendo um forte candidato a complexação de substancias bioativas.

Desta forma, o planejamento racional de fármacos tem utilizado novas ferramentas que estão trazendo avanços na química medicinal, onde os estudos em nível molecular teórico demonstram propriedades que podem evidenciar seu modo de ação e efeito biológico previamente ao desenvolvimento de novos fármacos (VIEGAS JÚNIOR et al., 2006).

Portanto, aliando o uso das ferramentas em química quântica computacional ao estudo desta doença negligenciada que mata milhões de pessoas em todo o mundo e a motivação em desenvolver novas drogas candidatas que tenham atividade contra *S. mansoni*, motivou o desenvolvimento deste trabalho objetiva realizar avaliação da atividade anti-helmíntica de complexos metálicos de rutênio e epiisopiloturina.

MATERIAIS E METODOS

Material Vegetal

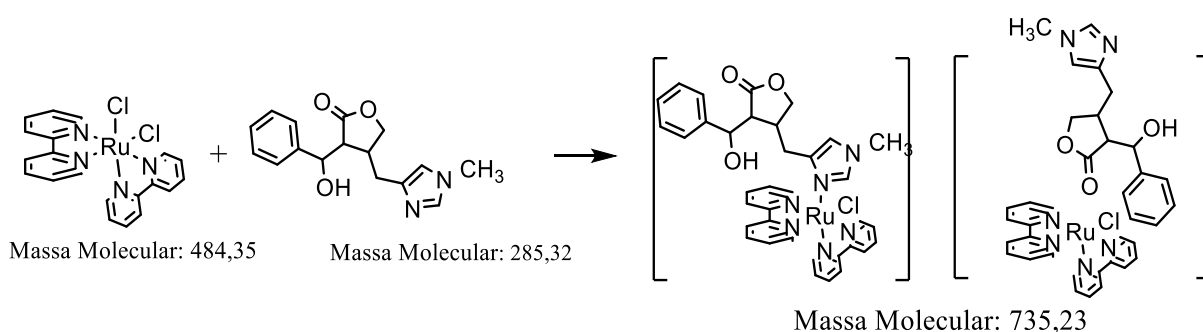
O alcaloide epiisopiloturina foi obtido de folhas de jaborandi. Foi usada a espécie *Pilocarpus microphyllus* nativo de Matias Olímpio – PI identificado e depositado no Herbário Graziela Barroso (Teresina, Piauí, Brasil) com o número de tomo TEPB 27.152. A purificação foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Performance – HPLC de acordo com Veras et al (2012), e a identificação foi comparada com padrões externos (Merck, Darmstadt, Germany).

Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl] (PF₆) (EPIRUClsineg)

100 mg do precursor *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] ($2,06 \times 10^{-4}$ mol), foram dissolvidos em cerca de 30 mL de etanol/água (3:1). Após 30 minutos de refluxo foi adicionado 59 mg ($2,304 \times 10^{-4}$ mol) do ligante epiisopiloturina dissolvido em 5 mL de uma solução etanol/água (3:1). A mistura ficou sob refluxo e agitação por 48 horas. Em seguida foram adicionados 202 mg do sal KPF₆. A mistura continuou sob-refluxo e agitação por 1 hora. Após esse tempo, a agitação e o aquecimento foram desligados. A solução atingiu a temperatura ambiente. Em seguida a mistura foi rotoevaporada até restar cerca de 10% de volume. O sólido vermelho foi filtrado, lavado com água gelada e estocado a vácuo. Observa-se no final do processo de síntese a formação de dois complexos, onde a EPI se liga ao metal pelo nitrogênio (EPIRUCLN), e no outro complexo, ocorre a ligação pelo oxigênio (EPIRUCLO) (Figura 1).

Rendimento: 85%.

Figura 1: Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl] (PF₆)



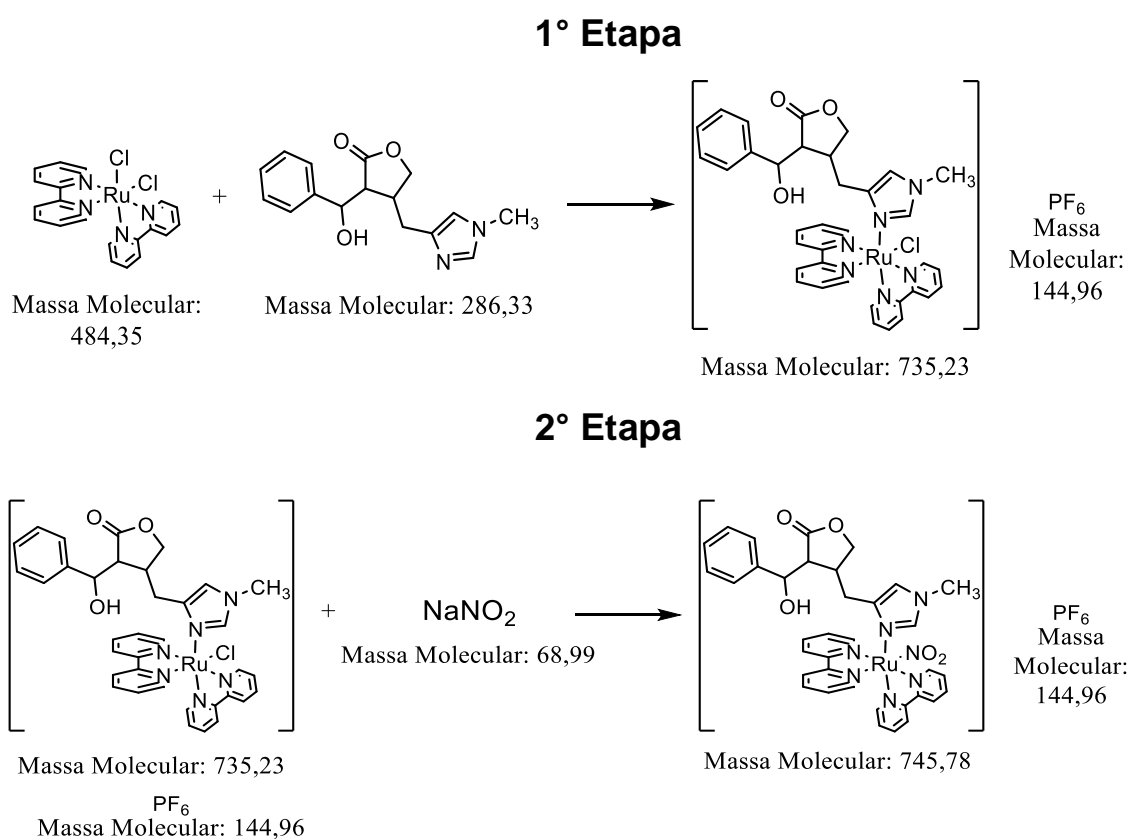
Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)(NO₂)] (PF₆) (EPIRUNO₂)

100,0 mg do precursor *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] ($2,06 \times 10^{-4}$ mol), foram dissolvidos em cerca de 30 mL de etanol/água (3:1). Após 30 minutos de refluxo foram adicionados 59,0 mg ($2,304 \times 10^{-4}$ mol) do ligante epiisopiloturina dissolvido em 5 mL de uma solução etanol/água (3:1). A mistura ficou sob-refluxo e agitação por 48 horas. Em seguida foram adicionados 14,5 mg ($2,10 \times 10^{-4}$ mol) de NaNO₂. A

mistura continuou sob-refluxo e agitação por 10 horas. Após esse tempo de reação a agitação e o aquecimento foram desligados. Quando a mistura atingiu a temperatura ambiente, a mesma foi rotoevaporada até *secura*. Foram adicionados 5 mL de uma solução aquosa contendo cerca de 202 mg do sal NH_4PF_6 solubilizados. O sólido de coloração laranja foi filtrado, lavado com água gelada e estocado a vácuo. (Figura 2).

Rendimento: 70%.

Figura 2: Síntese do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Epi})(\text{NO}_2)] (\text{PF}_6)$



Detalhes computacionais

A geometria dos alcaloides, propriedades eletrônicas e vibracionais foram estudadas usando o programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). O programa Gaussview 5.0.8 (DENNINGTON et al., 2008) foi utilizado para obter modelos estruturais em 3D. Os cálculos de “otimização” geométrica foram realizados de

acordo com o método da Teoria Funcional da Densidade (DFT) (KOHN et al., 1965), combinando o B3LYP (LEE et al., 1998; BECKE et al., 1993) conjuntos funcionais híbridos e baseados sdd (MCLEAN; CHANDLER, 1980; RAGHAVACHARI et al., 1980). Os cálculos de frequência foram realizados para obter propriedades termodinâmicas e para verificar se cada otimização atingiu um mínimo de energia.

Os descritores químicos quânticos extraídos diretamente do arquivo de saída Gaussian foram: Mulliken, Natural Bond Orbitais (NBO) e Chelpg, densidade eletrônica, momento dipolo, energia do orbital molecular ocupado mais alto (E_{HOMO}) e energia do menor orbital molecular desocupado (E_{LUMO}). (PARR et al., 1999; ZHAN et al., 2003). Todos os cálculos foram realizados na fase gasosa. A teoria funcional da densidade dependente do tempo (TDDFT) foi utilizada para calcular as energias e intensidades das transições eletrônicas (CASIDA et al., 1995; STRATMANN et al., 1998). As transições eletrônicas calculadas, infravermelho e Raman foram computadas usando funções gaussianas com meia largura de 25.000 cm^{-1} com o programa Swizard (GORELSKY, 1999).

Perfil ADMET

A farmacocinética teórica *in silico* é uma abordagem atualmente muito utilizada no estudo inicial das propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) que tem como objetivo diminuir o gasto desnecessário em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos futuros, economizando tempo e investimento (KADAN; ROY, 2007). Foi realizada a predição computacional de parâmetros farmacêuticos através dos softwares gratuitos *on line* Pre-ADMET® e FAF-Drugs4®. Foi utilizada a metodologia *in silico* com as moléculas *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl₂] e *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂], incluindo: parâmetros físico-químicos, perfil drug-likeness, perfil farmacocinético (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção) e toxicidade.

Docagem Molecular

As estruturas 3D de todos os possíveis alvos de *S. mansoni* foram obtidas no banco de dados de proteínas (PDB) (BERGMAN et al., 2000) com os códigos (3QSD, 4Q3P, 4CQF, 4L5A, 1TCU, 2V6O, 4TXH). Os cálculos de docagem

molecular foram realizados com o programa Autodock 4.2 (GOODSELL; MORRIS, 1996; GOODSELL, 2005; MORRIS et al., 2008). As proteínas e ligantes foram preparados para a docagem molecular utilizando o programa com Autodock Tools (ADT), versão 1.5.6 (SANNER, 1999). O receptor foi considerado rígido enquanto que cada ligante foi considerado flexível. As cargas parciais Gasteiger (GASTEIGER & MARSILI, 1980) foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Os átomos de hidrogênio não polares de proteínas e ligantes foram subsequentemente mesclados. Foi gerada uma caixa cúbica de 60 x 60 x 60 pontos com 0,35 Å entre os pontos do grid para todo o alvo da proteína. Os centros dos grids de afinidade foram definidos a partir das coordenadas dos átomos dos resíduos Asp158 para ARG, Ala118 para PNP, Asp230 para MTAP, Tyr341 para HDAC8, Gln201 para UP, Tyr296 para TGR e Cys100 para 2CB1. O algoritmo genético Lamarckiano (LGA) com busca global (MORRIS et al., 1998) e pseudo-Solis e Wets com busca local (SOLIS, 1981) foram os métodos utilizados na docagem molecular. Cada simulação consistiu de 100 corridas independentes (RAMOS et al., 2012). O resto dos parâmetros de docagem foi definido com os valores padrão. As análises da docagem molecular foram concentradas nos clusters de menor energia. A conformação de menor energia combinada com inspeção visual foi escolhida para uma análise mais detalhada.

Ensaio Antischistosoma

Manutenção do ciclo de vida de *S. mansoni*

Schistosoma mansoni Sambon, 1907, linhagem BH (Belo Horizonte, MG) foram mantidos em caramujos *Biomphalaria glabrata* Sav 1818 (hospedeiro intermediário) e hamsters *Mesocricetus auratus* como hospedeiros definitivos no Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP). Camundongos sexo feminino (idade = 3 semanas, peso ~25 g) foram infectados por injeção subcutânea de 150 cercarias. Após 9 semanas, espécies adultas de *S. mansoni* foram recuperadas a partir de cada hamster por perfusão com meio 1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Invitrogen, São Paulo, Brasil) suplementado com heparina.

Estudo de adultos de *S. mansoni* ex vivo

Esquistossomos adultos foram lavados em meio RPMI 1640 suplementado com 200 µg/mL de estreptomicina, 200 IU/mL de penicilina (Invitrogen), e 25 mM de HEPES. Pares adultos de parasitas (macho e fêmea) foram incubados em uma placa de cultura de 24 poços (Plastic Techno Produtos, TPP, St. Louis, MO, EUA) contendo o mesmo meio suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 ° C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após 1 a 2 h, os complexos metálicos [EPIRUCLsineg (EPIRUCLN e EPIRUCLCLO) e EPIRUONO₂] e o alcaloide EPI foram adicionados à cultura, obtendo-se uma concentração de droga final de 12,5-1000 µM. A droga foi adicionada à cultura a partir de 4000 µg/mL de uma solução de reserva em meio RPMI 1640 contendo dimetilsulfóxido (DMSO). O volume final em cada poço foi de 2 mL. O controle foi feito com os vermes em meio RPMI 1640 e RPMI 1640 com 0,5% de DMSO como grupo de controle negativo e 5 µg/mL de praziquantel como grupo controle positivo. Todas as experiências foram realizadas em triplicata e foram repetidas pelo menos três vezes. Os parasitas foram mantidos durante 72 horas e monitorados a cada 24 h utilizando microscópio de luz para avaliar seu estado geral: atividade motora e taxa de mortalidade.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

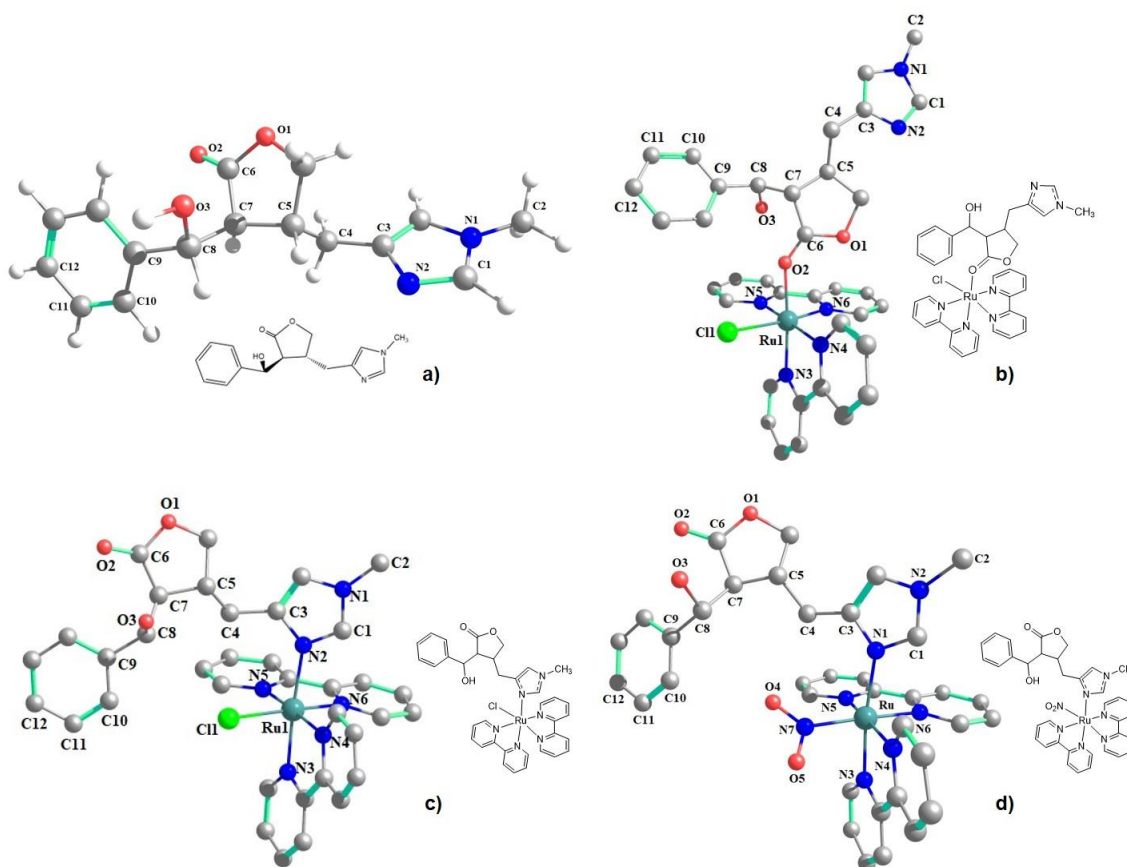
Para observar mudanças morfológicas no tegumento do parasita adulto de *S. mansoni*, foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV). Onde os parasitas foram inicialmente fixados na solução formalinacética de ácido-álcool (FAA). Posteriormente, a solução foi removida e substituída duas vezes com um fixador secundário, tetróxido de ósmio (OsO₄) em Tampão de cacodilato 100 mM, pH 7,3, seguido de incubação durante 2 h com tremores suaves. O tampão de cacodilato foi então substituído duas vezes com água ultrapura. As amostras foram então secas ao ar da água para fita adesiva de carbono, revestida com ouro-paládio para condutividade, e a imagem obtida no MEV. Operando em modo elétron secundário. As amostras foram fotografadas com uma distância de trabalho de 10-15 mm e uma tensão de aceleração de 15 kV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detalhes computacionais

As estruturas tridimensionais dos complexos metálicos apresentados nesse trabalho estão descritas na figura 3, onde o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)Cl₂] (C₃₆H₃₄ClN₆O₃Ru) apresenta 2 isômeros com ligação do centro metálico da Byp com o N2 (EPIRUCLN) ou O2 (EPIRUCLO) do alcaloide EPI e o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Epi)NO₂] (C₃₆H₃₄N₇O₅Ru) (EPIRUNO₂).

Figura 3: Estruturas químicas tridimensionais do alcaloide EPI (a) e dos complexos metálicos EPIRUCLO (b), EPIRUCLN (c) e EPIRUNO₂ (d).



A densidade de cargas atômicas (NBO) para EPI (a) foi calculada isoladamente, fora do complexo metálico, para efeito de comparação (Tabela 1; Figura 3). Analisando o anel imidazólico no complexo EPIRUCLN (c), observa-se que houve uma pequena variação das cargas em N1 (-0,398 e) e N2 (-0,479 e) em comparação as demais estruturas. O N2 por estar interagindo diretamente como

metal se comporta como uma base de Lewis doando maior densidade eletrônica do que a observada nas demais estruturas. Conseqüentemente essa maior doação por parte do N2, reduz também as cargas de N1 que está no mesmo anel imidazólico do complexo EPIRUCLN. Da mesma forma, observa-se que no complexo EPIRUCLO (b) onde o O2 interage diretamente com o Ru no anel dihidrofurano, existe uma leve redução na sua densidade de cargas com 0,045 e⁻ (Tabela 1; Figura 3).

Analisando o átomo de Ru por ser ácido de Lewis capta densidade eletrônica dos ligantes que se comportam como base de Lewis. Evidenciando no complexo EPIRUCLN onde o ligante EPI que está coordenado ao Ru pelo átomo N2, observa-se uma carga natural de +0,095 e⁻, que é menor em relação à carga observada nos demais compostos. Esta aparente redução na carga do metal é principalmente devido ao anel imidazólico que se comporta melhor como base de Lewis em relação ao anel dihidrofurano.

Tabela 1: Densidade de cargas atômicas em (u.a e⁻) pelo método NBO do alcaloide EPI e dos complexos metálicos EPIRUCLN, EPIRUCLO e EPIRUCLO₂ utilizando o modelo teórico B3lyp/sdd.

	EPI	EPIRUCLN	EPIRUCLO	EPIRUCLO ₂
N1	-0,430	-0,398	-0,422	-0,396
N2	-0,556	-0,479	-0,584	-0,483
O1	-0,576	-0,562	-0,565	-0,565
O2	-0,593	-0,594	-0,549	-0,592
O3	-0,809	-0,794	-0,798	-0,795
C1	+0,230	+0,259	+0,244	+0,256
C2	-0,403	-0,402	-0,404	-0,402
C3	+0,133	+0,201	+0,128	+0,204
C4	-0,456	-0,462	-0,449	-0,469
C5	-0,229	-0,228	-0,226	-0,230
C6	+0,835	+0,845	+0,904	+0,845
C7	-0,343	-0,351	-0,340	-0,349
C8	+0,146	+0,132	+0,140	+0,133
C9	-0,081	-0,079	-0,093	-0,081
C10	-0,217	-0,207	-0,207	-0,208
C11	-0,210	-0,210	-0,204	-0,210
C12	-0,212	-0,211	-0,204	-0,212
Ru	-	+0,095	+0,142	+0,119
N3	-	-0,388	-0,372	-0,393
N4	-	-0,413	-0,408	-0,416
N5	-	-0,415	-0,427	-0,421
N6	-	-0,402	-0,402	-0,419
Cl	-	-0,420	-0,413	-
N7	-	-	-	+0,404
O4	-	-	-	-0,497
O5	-	-	-	-0,418

Os parâmetros geométricos observados na tabela 2 revelam que os comprimentos de ligação entre o Ru-Cl são diferentes nas estruturas EPIRUCLN (2,491 Å) e EPIRUCLO (2,471 Å), sendo maior no complexo EPIRUCLN. Considerando que os átomos da EPI que se ligam ao metal são diferentes, e os demais ligantes são iguais, considera-se que a densidade de cargas doada ao metal influencia no comprimento da ligação Ru-Cl sendo que quanto maior a doação da base oriunda da EPI, maior o comprimento da ligação Ru-Cl. Na estrutura EPIRUCLN, observa-se a ligação N2-Ru do anel imidazólico, que se comporta melhor como base de Lewis em comparação a ligação O2-Ru do anel dihidrofurano em EPIRUCLO, aumentando a densidade eletrônica sobre Ru e conseqüentemente afastando mais o átomo de cloro.

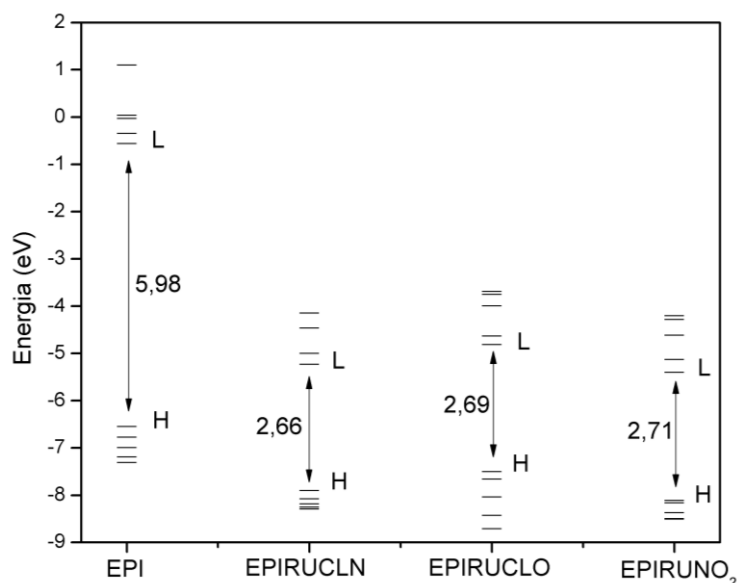
Tabela 2: Distâncias das ligações atômicas (em Å), ângulos atômicos e ângulos diedros (em Graus) do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLN, EPIRUCLO e EPIRUCLO₂.

	EPI	EPIRUCLN	EPIRUCLO	EPIRUCLO ₂
N1 – C2	1,465	1,470	1,468	1,470
N2 – C1	1,337	1,351	1,338	1,351
O2 = C6	1,233	1,232	1,247	1,231
O1 – C6	1,390	1,393	1,362	1,395
O3 – C8	1,469	1,469	1,477	1,469
N1 – C1 – N2	111,6	111,2	111,5	111,3
C1 – N1 – C2	126,8	126,6	126,7	126,7
C3 – C4 – C5	112,6	115,3	113,4	115,3
O2 = C6 - O1	121,9	121,4	121,7	121,4
O3 – C8 – C7	105,3	109,3	109,1	109,1
C7 – C8 – C9	116,0	115,7	116,0	115,7
C8 – C9 – C10	119,0	118,5	118,7	118,4
Ru – Cl/N7	-	2,491	2,471	2,064
Ru – N2	-	2,176	-	2,188
Ru – O2	-	-	2,153	-

Os cálculos de orbitais moleculares demonstram que o gap de energia para o alcaloide EPI é de 5,98 eV, e após a formação do complexo metálico com este alcaloide foi possível verificar uma expressiva diminuição dos gaps de energias nos três compostos EPIRUCLN, EPIRUCLO e EPIRUCLO₂ (Figura 4) e (Tabela A1, em apêndices). Os três complexos apresentaram gaps bem semelhantes, contudo EPIRUCLN apresentou menor valor (2,66 eV), indicando uma maior facilidade nas transições eletrônicas neste composto. Analisando os orbitais E_{HOMO} observa-se

uma quebra da degenerescência maior no complexo EPIRUCLO (Figura 4). A diminuição dos gaps de energia observada nos três complexos metálicos poderia favorecer a potencialização da atividade biológica do alcaloide EPI.

Figura 4: Gráfico dos Orbitais Moleculares E_{HOMO} e E_{LUMO} do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLN, EPIRUCLO e EPIRUCLO₂.



Os padrões de bandas do espectro de UV-Vis teórico e experimental do alcaloide EPI e dos complexos metálicos estão ilustradas na figura 5, onde as bandas do gráfico representam os mesmos valores dos orbitais moleculares (Figura 4). Os dados espectroscópicos de UV-Vis mostram uma banda de absorção na frequência de aproximadamente 230 nm para EPI, tanto no teórico quanto no experimental. Para o complexo EPIRUCLO₂ observa-se nos resultados experimentais duas bandas maiores em 230 nm e 300 nm, já no cálculo teórico houve um pequeno deslocamento para 250 nm e 305 nm. Já para o complexo EPIRUCLO os resultados experimentais apresentaram duas expressivas bandas nos comprimentos de onda 230 nm e 300 nm. Estes resultados evidenciam uma mistura entre EPIRUCLN e EPIRUCLO, onde foram calculados a nível teórico demonstrando os comprimentos de onda em torno de 250 nm e 310 nm (EPIRUCLO) e 300 nm e 390 nm (EPIRUCLN) (Figura 5).

Os saltos quânticos energéticos entre os orbitais moleculares dos complexos metálicos foram quantificados em nível de teoria (Tabela 3; Figura 6). Para o

complexo EPIRUCLN o maior valor da força do oscilador com 0,0229 no comprimento de onda na faixa de 533 nm, evidencia um salto entre 170 (HOMO -4) → 175 (LUMO) com gap de 3,05 eV em uma transferência de carga do ligante para o metal. No complexo EPIRUCLO a maior força do oscilador com 0,0903 no comprimento de onda na faixa de 523 nm, evidencia um salto entre 173 (HOMO -1) → 176 (LUMO +1) com gap de 3,02 eV em uma transferência de carga do metal para o metal. E no complexo EPIRUCLO₂ a maior força do oscilador de 0,0429 no comprimento de onda na faixa de 509 nm, evidencia um salto entre 174 (HOMO -3) → 178 (LUMO) com gap de 3,09 eV em uma transferência de carga do ligante para o metal (Tabela 3; Figura 6).

Figura 5: Espectro de UV-vis (em nm) teórico (T) e experimental (E) do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUCLO₂.

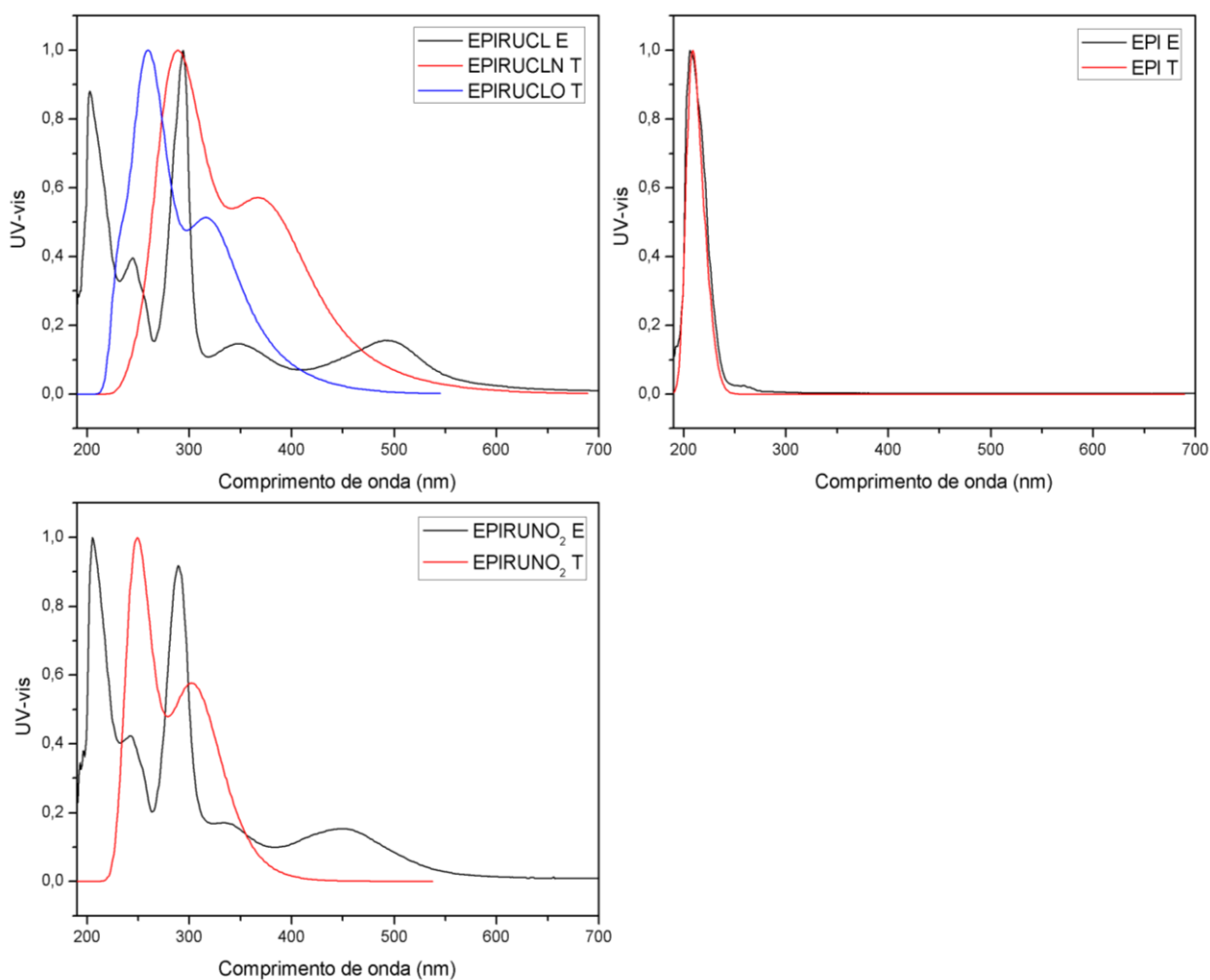
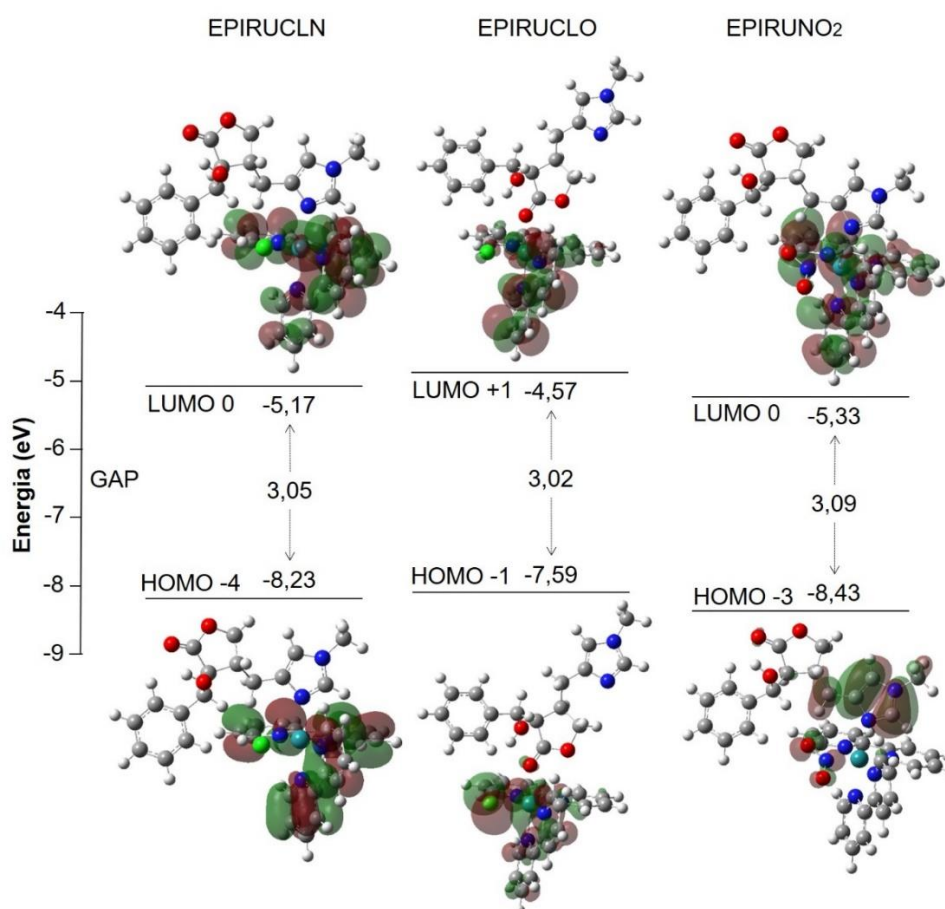


Tabela 3: Principais atribuições de bandas do espectro eletrônico UV-Vis, energia e tipos. Calculados pelo Swizard, do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLN, EPIRUCLO e EPIRUNO₂.

Comprimento de Onda (nm) / Força do oscilador [f]	Composição	Energia (eV)	Tipo de Transferência de Carga
EPIRUCLN			
533 [0,0829]	170→175 (47%)	2,33	TCLM
391 [0,0305]	173→178 (56%)	3,16	TCML
373 [0,0267]	174→185 (34%)	3,32	TCLM
334 [0,0265]	166→176 (29%)	3,71	TCLM
350 [0,0248]	167→176 (34%)	3,54	TCLM
368 [0,0232]	173→180 (70%)	3,36	TCMM
411 [0,0224]	174→178 (59%)	3,02	TCML
447 [0,0223]	174→177 (80%)	2,77	TCMM
EPIRUCLO			
523 [0,0903]	173→176 (74%)	2,37	TCMM
345 [0,0609]	167→176 (38%)	3,59	TCMM
389 [0,0468]	173→178 (27%)	3,19	TCMM
335 [0,0396]	170→176 (22%)	3,70	TCLM
448 [0,0252]	172→175 (59%)	2,54	TCMM
380 [0,0203]	173→180 (41%)	3,26	TCMM
EPIRUNO₂			
509 [0,0429]	174→178 (32%)	2,44	TCLM
463 [0,0350]	173→179 (37%)	2,68	TCLM
349 [0,0335]	175→183 (26%)	3,55	TCML
337 [0,0233]	174→183 (32%)	3,67	TCLL
502 [0,0231]	174→179 (82%)	2,47	TCLM
341 [0,0222]	173→183 (56%)	3,63	TCLL
367 [0,0202]	175→181 (31%)	3,37	TCML

Figura 6: Orbitais Moleculares E_{HOMO} e E_{LUMO} dos complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO₂.



Os espectros de infravermelho teórico e experimental dos complexos EPIRUCL (O e N) e EPIRUNO₂ e do alcaloide EPI são ilustrados na Figura 7. Pode ser observada uma similaridade nas frequências vibracional teórica e experimental entre os compostos analisados. O estiramento simétrico da carbonila (C=O) apresenta um pico forte na região de 1785 cm⁻¹ (EPI), 1741 cm⁻¹ (EPIRUCLN), 1686 cm⁻¹ (EPIRUCLO) e 1743 cm⁻¹ (EPIRUNO₂) (Tabela 4). Uma deformação no anel dihidrofurano representa a segunda maior intensidade em uma frequência entre 1007 cm⁻¹ a 1162 cm⁻¹ em todos os compostos. Seguidos de um estiramento do C-N nas frequências entre 1318 cm⁻¹ a 1363 cm⁻¹ também em todos os compostos. O estiramento do grupo OH apresenta um forte pico na região de 3664 cm⁻¹ a 3783 cm⁻¹. Em relação aos complexos isômeros EPIRUCLN e EPIRUCLO, os valores das frequências vibracionais por IR foram bem equiparadas, corroborando com os resultados apresentados na tabela 5, que demonstra uma estabilidade muito próxima para os dois complexos. Interessante notar também que os dados em

EPIRUCLO₂ foram bastante similares a EPIRUCLO, foi os dois complexos apresentam estruturas químicas moleculares bem semelhantes.

Figura 7: Espectro de Infravermelho (IR) experimental (E) e teórico (T) dos compostos EPIRUCLO (a), EPIRUCLO (a), EPIRUCLO₂ (b) e EPI (c).

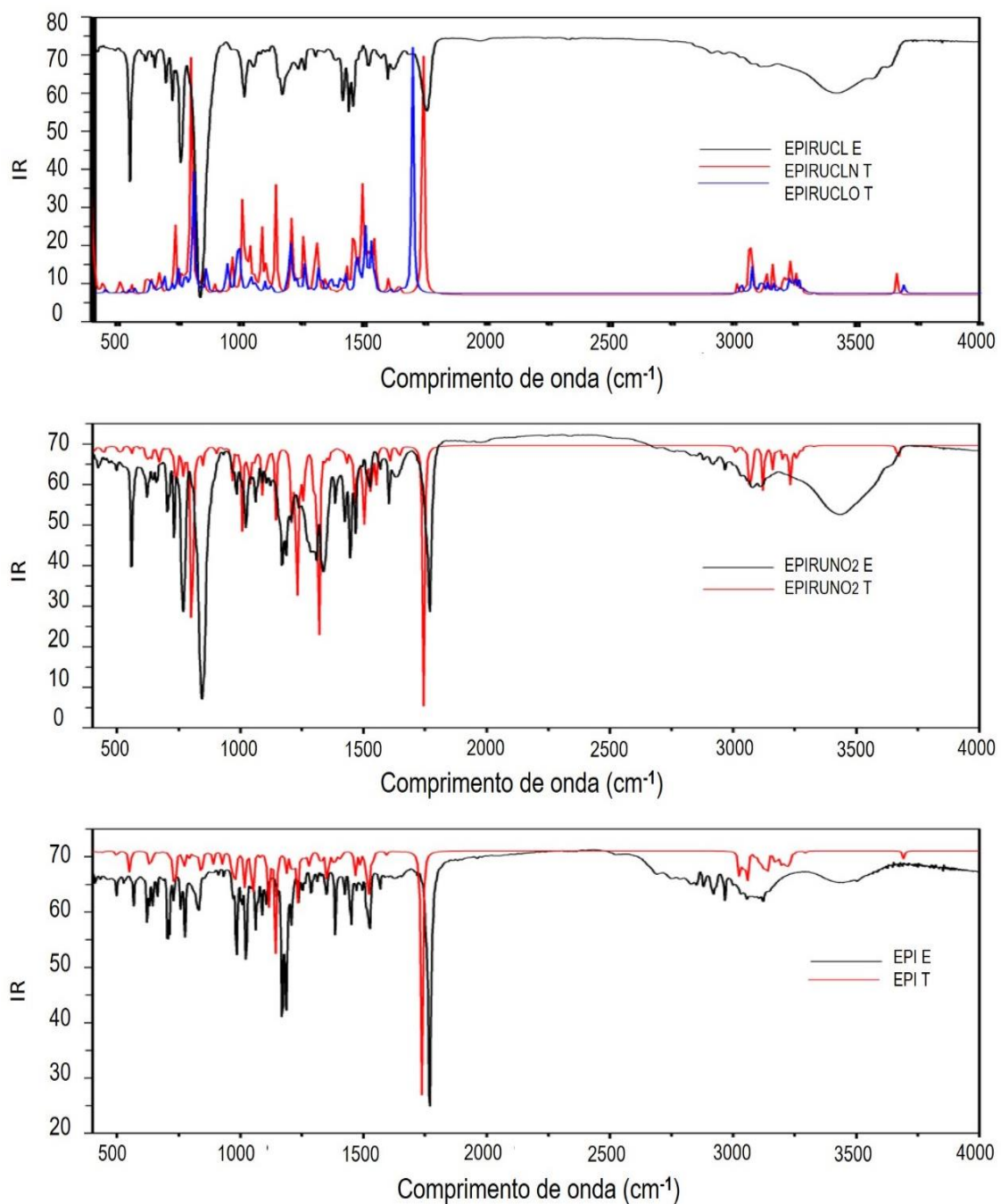


Tabela 4: Frequências espectroscópicas de Infravermelho (cm^{-1}) do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO₂.

EPI	EPIRUCLN	EPIRUCLO	EPIRUNO ₂	Atribuição
390	394	274	378	Rotação no H-O
-	803	800	800	Deformação dos H no anel Bpirimidimico
1162	1010	1040	1007	Deformação no plano no dihidrofurano
1303	1345	1350	1345	Alongamento C-C no benzeno
1318	1363	1359	1362	Alongamento C-N no imidazol
1408	1404	1406	1408	Alongamento simétrico N1-C1-N2 no imidazol
1455	1475	1468	1476	Estiramento do CH ₃ (C2- N1) no imidazol
1480	1489	1485	1491	Alongamento C-C no benzeno
1488	1513	1514	1512	Rotação no CH ₃ (C2) no imidazol
1525	1545	1522	1550	Alongamento simétrico no N-C-N no Imidazol
1578	1601	1595	1606	Alongamento C-C no imidazol
1612	1629	1630	1630	Alongamento C-C no benzeno
1631	1653	1651	1654	Alongamento C-C no benzeno
1785	1741	1686	1743	Estiramento simétrico C=O
2963	3124	3107	3131	Estiramento no H-C8
3022	3071	3064	3071	Estiramento do H-C2
3783	3664	3682	3668	Estiramento do H – O3

Os resultados de densidade eletrônica ilustrados na figura 8 evidencia a polaridade de cada molécula. O alcaloide EPI (a) possui regiões com polaridade mais negativa em torno dos O2 e N2 como era de se esperar, pois esses átomos possuem elétrons livres ao seu redor. No composto BYP (b) observa-se uma densidade eletrônica mais neutra, sendo, portanto, favorável para ser usada como carreadora da EPI. Assim, quando complexados (a) e (b) observa-se uma tendência da polaridade ser mais positiva, contudo, no complexo EPIRUCLN e EPIRUNO₂, onde a interação da EPI com o metal ocorre pelo átomo de N2, é verificada uma polaridade menos positiva do que no complexo EPIRUCLO, uma vez que nesses

complexos os átomos de O estão livres e possui uma elevada eletronegatividade, algo que cria regiões mais polares. Diferente do complexo EPIRUCLO, onde a interação da EPI ocorre por meio de átomos de O₂, deixando livre o átomo de N.

Os resultados do momento dipolo apresentam maior polaridade para o complexo EPIRUCLO com 23,4549 debye seguido do complexo EPIRUCLO com 21,4175 debye, isso confere a esse sistema maior capacidade de interação biológica em comparação com EPI que apresentou polaridade de 6,2965 debye (Tabela 5).

A energia livre de Gibbs presente no complexo EPIRUCLO foi a menor - 2500,728647 Hartree conferindo mais estabilidade em comparação a EPIRUCLO e também conferindo maior grau de desordem com entropia de 257,654 Cal mol.kelvin⁻¹, isso poderia oferecer maior reatividade a esse sistema. O complexo EPIRUCLO apresentou uma diferença na energia livre de Gibbs de 0,004619 Hartree entre o complexo EPIRUCLO, conferindo a ela também boa estabilidade (Tabela 5).

Figura 8: Densidade eletrônica dos compostos EPI (a), BIPY (b) EPIRUCLO (c), EPIRUCLO (d) e EPIRUCLO₂ (e).

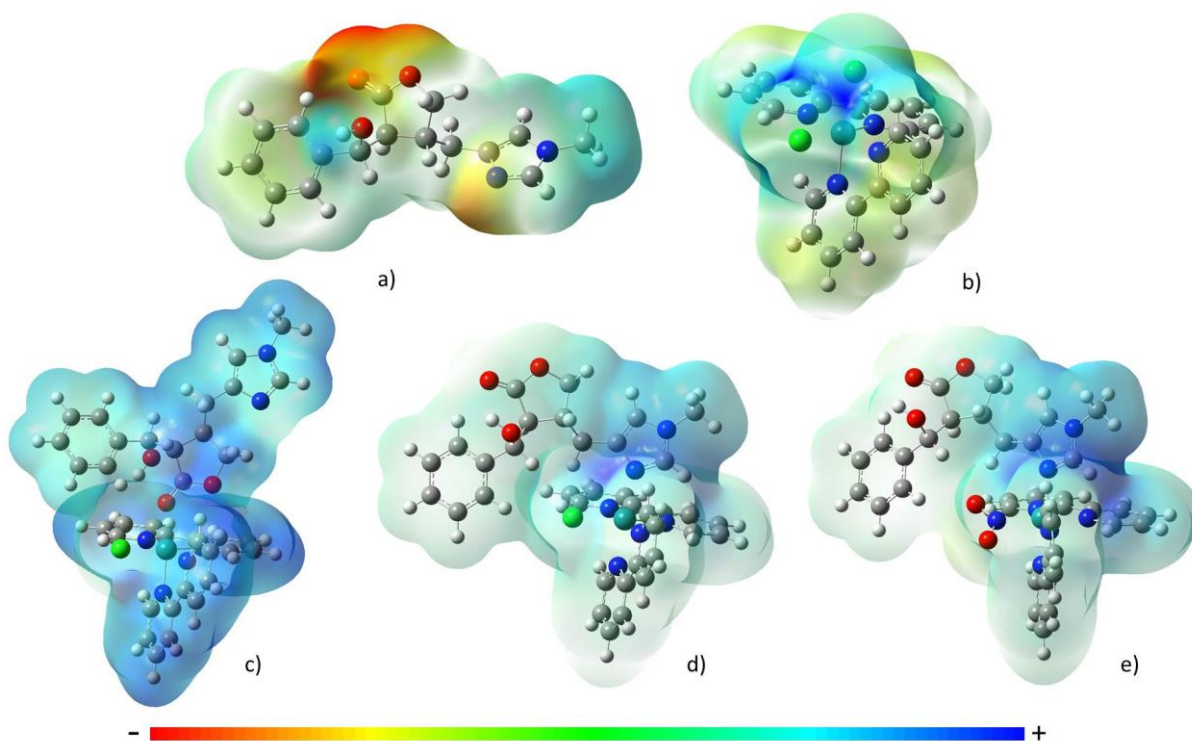


Tabela 5: Energias eletrostáticas em (Hartree) Energia ponto zero (HF), Térmica (ΔT), Entalpia (ΔH), Energia livre de Gibbs (ΔG), Momento dipolo (μ -debye), Entropia - S (Cal/Mol Kelvin) do alcaloide EPI, Bpiridina e dos complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO₂.

	EPI	EPIRUCLN	EPIRUCLO	EPIRUNO ₂
HF	-955,243343	-2500,646394	-2500,648723	-2245,520614
ΔT	-955,224312	-2500,605403	-2500,607171	-2245,478154
ΔH	-955,223368	-2500,604458	-2500,606227	-2245,477210
ΔG	-955,294028	-2500,724028	-2500,728647	-2245,599495
S	148,718	251,655	257,654	257,371
μ	6,2965	21,4175	8,6544	23,4549

Perfil ADMET

O perfil ADMET dos compostos EPI, EPIRUCLN, EPIRUCLO e EPIRUNO₂ são apresentados na Tabela 6. Analisando a propriedade de ligação a proteína plasmática (PPB), verificou-se valores semelhantes nos complexos EPIRUCLN e EPIRUNO₂ com 100%, os demais compostos apresentaram EPIRUCLO (68%) e EPI (63%) que apesar de serem menores são considerados favoráveis à ligação da proteína plasmática podendo influenciar na atividade biológica contra *S. mansoni*. Os resultados do potencial de penetração na barreira hematoencefálica (BBB), somente o composto EPI (0,011) têm baixo potencial de passar a barreira hematoencefálica com valor abaixo de 0,1 (MA et al., 2005). Os demais complexos apresentaram valores potencialmente maiores a causar efeitos colaterais ao sistema nervoso central ou mesmo possuir algum efeito de neurotoxicidade, sendo o maior deles em EPIRUCLN (0,979).

Em relação à permeabilidade da pele humana os valores variaram entre - 3,863 cm/h (EPI) e -5,007 cm/h (EPIRUNO₂) de acordo com SINGH et al., (1993), não tem facilidade de absorção na pele humana. Na análise de absorção intestinal humana (HIA) que é um dos principais parâmetros para os candidatos a novas drogas, os compostos analisados apresentaram valores entre 96,0% (EPI) a 99,7% (EPIRUCLO), sendo todos considerados de fácil absorção pelo intestino (ZHAO et al., 2001 e YEE, 1997) (Tabela 6).

Os parâmetros recomendados para a predição de absorção oral de drogas usam dois modelos de permeabilidade, células CaCo-2 e MDCK. Os compostos apresentaram valores considerados intermediários em células CaCo-2 (YAMASHITA

et al., 2000), que variaram entre 12,00 nm/sec (EPIRUNO₂) a 32,19 nm/sec (EPIRUCLO) e baixos valores para permeabilidade em células MDCK onde variaram entre 0,02 nm/sec (EPIRUNO₂) a 16,04 nm/sec (EPI) (Tabela 6).

Nenhuns dos compostos analisados causaram inibição da glicoproteína P, que é uma proteína responsável pela absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diferentes fármacos (AZEREDO et al., 2009). Em relação à solubilidade em água e água pura, os compostos obtiveram valores entre 5,377 mg/L (EPIRUCLN) a 23332,8 mg/L (EPI) e 0,069 mg/L (EPIRUCLN) a 8525,0 mg/L (EPI), respectivamente (Tabela 6).

Os dados referentes à interação com a proteína citocromo P450 (CYP), observa-se resultados semelhantes aos complexos EPIRUCLN e EPIRUNO₂ onde não inibiram a ação das proteínas CYP (2C19, 2C9, 2D6 E 3A4) formando substrato apenas com CYP 3A4. Esse fator pode prejudicar a ação do fármaco uma vez que as CYPs ficam livres para metabolizar as drogas diminuindo a biodisponibilidade no organismo. Os outros dois compostos apresentaram valores razoavelmente melhor sendo o complexo EPIRUCLO não inibidor apenas da CYP 2C9 (Tabela 6).

A caracterização de mutagenicidade pelo teste de ames apresentou dados mutagênicos para todos os compostos analisados (AMES et al., 1972). Os resultados de carcinogenicidade em ratos e camundongos foram negativos em EPI e fora de alcance para os complexos metálicos.

O alcaloide EPI está adequado à classificação de drogas pela regra de lipinski (regra dos cinco) e pelo índice mundial de drogas (WDI) com mais de 90% de probabilidade de possuir boa solubilidade e permeabilidade (LIPINSKI et al., 2001). Os demais complexos falharam ao uso da regra. POSTIGO et al., (2010) também usou a regra de lipinski para avaliar ligantes que seriam usados na formação de complexos com enzima PNP. Além disso, a EPI apresentou afinidade de ligação a 0,1µM pela regra lead-like (TEAGUE et al., 1999). Em relação à regra CMC-like apenas EPI também foi classificada como qualificada (GHOSE et al., 1999) e, para a regra MDDR-like os compostos foram classificados como intermediário entre uma droga potencial e não potencial, com exceção de EPIRUCLO que foi classificada como droga modelo (OPREA, 2000).

Observa-se que em alguns parâmetros de ADMET analisados, os resultados apresentados pelos complexos metálicos, foram satisfatórios do que os apresentados pelo alcaloide EPI, com exceção do BBB, perfil druglikeness e

toxicidade. A utilização de ferramentas *in silício* como o ADME obtém-se uma previsão precoce pela “otimização” dessas propriedades farmacocinéticas que são importantes para evitar falhas dispendiosas em estágio final no desenvolvimento de fármacos (MELO-FILHO et al., 2016).

Tabela 6: Perfil ADMET do alcaloide EPI e complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO₂.

ADMET	EPI	EPIRUCLN	EPIRUCLO	EPIRUNO ₂
Ligação proteína plasmática (PPB) (%)	63,140757	100,000000	68,497249	100,000000
Penetração na barreira hematoencefálica (BBB)	0,011675	0,979212	0,541822	0,31364
Permeabilidade da pele (logKp, cm/hour)	-3,86369	-4,85092	-4,88629	-5,00746
Absorção intestinal humana (HIA, %)	96,050121	98,326124	99,767283	98,112934
Permeabilidade em células CaCo-2 (nm/sec)	21,8393	19,5633	32,1954	12,0088
Permeabilidade em células MDCK (nm/sec)	16,0498	0,0721906	0,493485	0,0236054
Inibição da glicoproteína P	Não	Não	Não	Não
Solubilidade em água (mg/L)	23332,8	5,37732	130,627	28,3346
Solubilidade em água pura (mg/L)	8525,04	0,0693307	8065,74	0,0704996
Inibição da CYP 2C19	Inibidor	Não	Inibidor	Não
Inibição da CYP 2C9	Inibidor	Não	Não	Não
Inibição da CYP 2D6	Não	Não	Inibidor	Não
Substrato da CYP 2D6	Não	Não	Substrato	Não
Inibição da CYP 3A4	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor
Substrato da CYP 3A4	Substrato	Substrato	Substrato	Substrato
Teste de Ames	mutagênico	mutagênico	mutagênico	mutagênico
Carc. em camundongos	negativo	fora da taxa	fora da taxa	fora da taxa
Carc. em ratos	negativo	fora da taxa	fora da taxa	fora da taxa
Regra de Lipinskis	adequado	falhou	falhou	falhou
Regra WDI-like	fora de corte em 90%	falhou	falhou	falhou
Regra Lead-like	afinidade > 0,1uM	falhou	falhou	falhou
Regra CMC-like	Qualificado	falhou	falhou	falhou
Regra MDDR-like	Mid-structure	Mid-structure	Drug-like	Mid-structure

Os resultados referentes à docagem molecular dos complexos metálicos com as enzimas do parasita *S. mansoni* são apresentados na Tabela 7.

Os melhores parâmetros de afinidade molecular foram obtidos com a interação dos ligantes com a enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) onde apresentou maior afinidade ao se ligar com EPIRULO₂ e EPIRULCLN, com energia de ligação igual a -10,99 kcal mol⁻¹ e -10,1 kcal mol⁻¹, respectivamente, e constante de inibição igual a 8,83 nM e 39,3 nM, respectivamente (Tabela 7). A afinidade do alcaloide EPI com a enzima PNP apresentou valor de -7,18 kcal mol⁻¹ e constante de inibição igual a 5,46 μM mostrando que a ação deste alcaloide junto ao complexo metálico melhorou a interação com esta enzima. A enzima (PNP) de *S. mansoni* é essencial para a recuperação de bases de purina e nucleosídeos nos esquistossomos, ela catalisa a fosforilação reversível de purina (2'-desoxi) ribonucleosídeos, para dar a correspondente base purina e (2'-desoxi) ribose-1-fosfato como produtos. (PEREIRA et al, 2005; POSTIGO et al., 2010).

Em todos os ligantes foi possível observar a interação com o aminoácido Ala118 do sítio ativo de PNP por ponte de hidrogênio, além do resíduo Met221. O aminoácido Ser222 também interagiu por ponte de hidrogênio com os três complexos metálicos, com exceção de EPI que apresentou interação com His88 (Figura 9). A forma semelhante como os complexos EPIRULCLN e EPIRULO₂ interage no sítio ativo da enzima, poderia indicar a aproximação dos seus valores de afinidade (Figura 9; Tabela 7). POSTIGO et al., (2010) ao testar drogas inibidoras da enzima PNP contra *S. mansoni* também observou a interação com os resíduos de aminoácido Ala118 e Met221.

A interação da enzima Thioredoxina Glutathiona Redutase (TGR) apresentou melhor afinidade com os ligantes EPIRULO₂ (-9,08 kcal mol⁻¹; 222,32 nM) e EPIRULCLN (-9,08 mol⁻¹; 219 nM). A interação com EPI foi apenas de -7,25 kcal mol⁻¹ e constante de inibição de 4,89 μM, mostrando uma melhor afinidade para TGR após a formação do complexo metálico (Tabela 7). O aminoácido do sítio ativo Tyr296 desta enzima interagiu com todos os ligantes. Esse mesmo resíduo Tyr296 também foi identificado por MELO-FILHO et al, (2016) ao estudar a interação da enzima TGR com moléculas contra *Schistosomas sp.* A TGR é uma flavoenzima quimérica relacionada à desintoxicação e sobrevivência do parasita no organismo do hospedeiro, participando diretamente da homeostase no parasita, nos processos de desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes nos vasos

sanguíneos do hospedeiro humano e permitindo assim a sobrevivência do parasita (MELO-FILHO et al., 2016; ANGELUCCI et al., 2008).

A interação com a enzima Puntativa Uridina Fosforilase (UP) do verme *S. mansoni* foi melhor com os ligantes EPIRUCLN e EPIRULO₂, onde os parâmetros de afinidade molecular apresentaram energia de ligação igual a -8,6 kcal mol⁻¹ e -8,55 kcal mol⁻¹ e constante de inibição igual a 454,52 nM e 542,56 nM, respectivamente. O ligante EPI apresentou energia de ligação de -7,16 kcal mol⁻¹ e constante de inibição de 5,68 μM, valores de afinidade menores em comparação aos apresentados nos complexos EPIRUCLN e EPIRULO₂ (Tabela 7). Observa-se que todos os ligantes que interagiram com essa enzima tiveram contato por interação hidrofóbica com o aminoácido Gln201 do sitio ativo da proteína e formou ponte de hidrogênio o aminoácido Arg121. A proteína UP é uma nucleosídeo fosforilase que catalisa a ligação N-ribossídica de uridina e timidina, para produzir ribose-1-fosfato, uracila e timina. Sendo essencial no metabolismo e atuando na proteção contra isquemia, acetilação de proteínas e metabolismo lipídico (SILVA-NETO et al., 2016).

A enzima Metiltioadenosina Fosforilase (MTAP) apresentou melhor afinidade com o ligante EPIRUCLO (-8,19 kcal mol⁻¹; 997 nM) o ligante EPI apresentou menor valor de afinidade para essa enzima (-6,54 kcal mol⁻¹; 15,97 μM). Todos os ligantes apresentaram contato com o aminoácido Asp230 do sitio ativo da enzima MTAP e o aminoácidos Ala88 e Val204 foram observados interagindo por ponte de hidrogênio no ligante de maior energia (Tabela 7). A proteína MTAP utiliza a adenosina como substrato para a produção de adenina e participa como via para a produção da purina, sendo promissor alvo contra esquistossomose (TORINI et al., 2016).

A afinidade molecular com a enzima Catepsina B1 (2CB1) apresentou melhores parâmetros para o ligante EPIRUCLN com energia de ligação igual a -7,61 kcal mol⁻¹ e constante de inibição igual a 2,62 μM. A interação do ligante EPI novamente foi menor relação aos complexos metálicos EPIRUCLN e EPIRULO₂ (Tabela 7). Foi possível observar a interação do aminoácido Cys100 por contato hidrofóbico do sitio ativo em todos os ligantes. Os resíduos Cys100 e His270 também foram observados no sítio ativo de smCB1 complexados com heparina (HORN et al., 2011). A SmCB1 é uma protease associada ao sistema digestivo dos vermes que digerem proteínas do sangue do hospedeiro como fonte de nutrientes (JILKOVA et al., 2011; HORN et al., 2011).

A enzima Histona Desacetilase 8 (HDAC8), obteve melhor parâmetro de afinidade com o ligante EPIRUCLO (-7,23 kcal mol⁻¹; 4,98 µM). Apesar de o ligante EPIRUCLO ter obtido melhor energia para essa enzima, não foi possível verificar a presença de ligações de hidrogênio, apenas ligações hidrofóbicas. Entre os ligantes analisados EPI apresentou o menor valor de afinidade igual à (-6,43 kcal mol⁻¹; 19,44 µM). O resíduo de Tyr341 do sitio ativo da enzima HDAC8 foi observado apenas na interação com o ligante EPIRUCLN (Tabela 7). KANNAN et al., (2014) também identificou os resíduos Tyr341, His292 e His141, presentes neste complexo além da importância do íon de zinco. A proteína HDAC8 de *S. mansoni* desempenha um papel fundamental na infecciosidade do verme controlando a acetilação e desacetilação após a transcrição no DNA na regulação dos genes. Além disso, elas estão ligadas a potenciais alvos antiparasitários e anti-inflamatórios (STOLFA et al., 2014; KANNAN et al., 2014).

Entre as enzimas analisadas a Arginase (ARG), foi à única que não apresentou interação com os complexos metálicos, tendo afinidade somente com o ligante EPI (-6,48 kcal mol⁻¹; 17,71 µM). Observa-se também que em o ligante EPI foi o único que apresentou contato com o aminoácido Asp158 do sitio ativo desta enzima (Tabela 7). A proteína ARG é uma loenzima que catalisa a hidrólise da L-arginina para formar L-ornitina e ureia relacionada aos processos de biossíntese do NO. Além disso, ela regula todas as formas do verme que interagem com o hospedeiro definitivo desempenhando um papel na resposta imune parasitária (HAI et al., 2014).

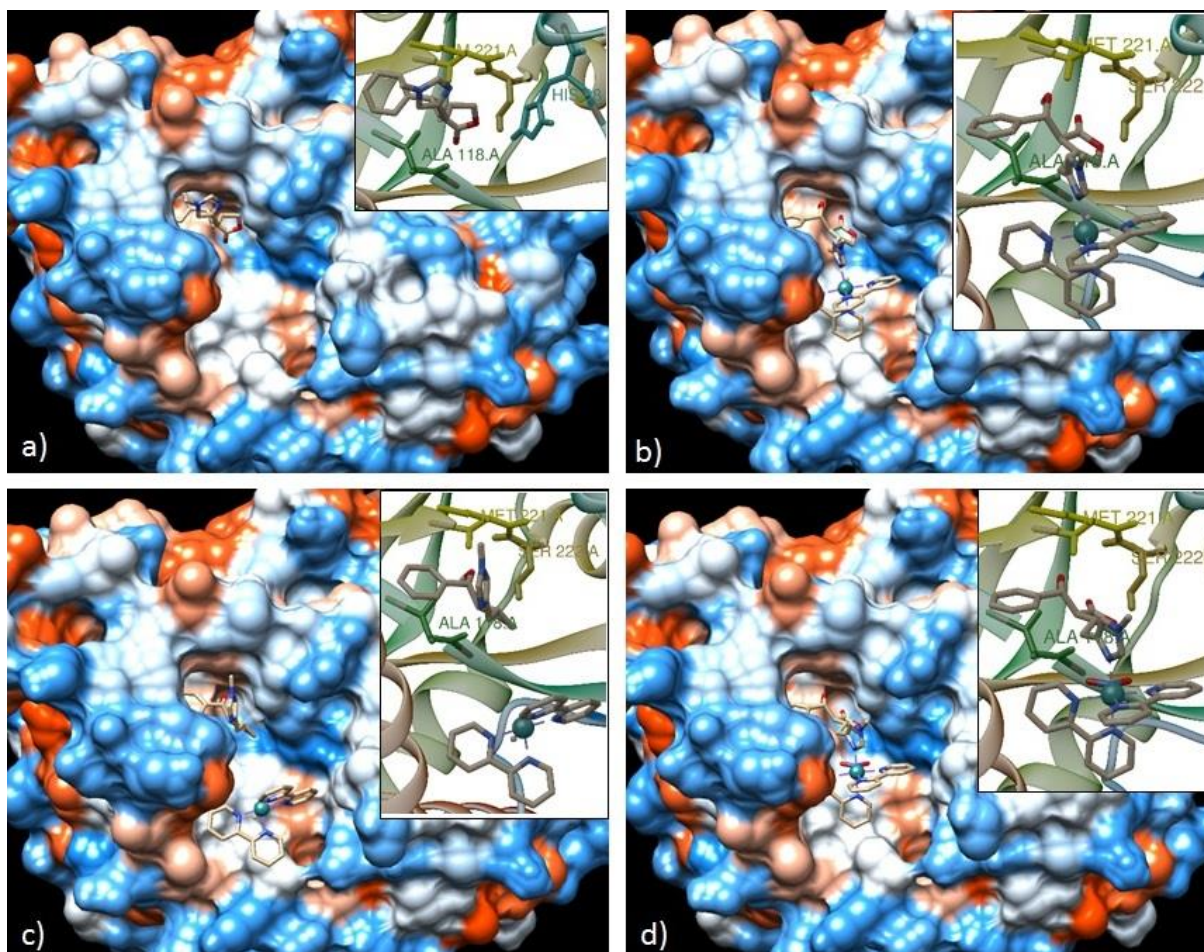
Tabela 7: Parâmetros de afinidade molecular dos ligantes EPI, EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUCLO₂ com enzimas do *S. mansoni*.

Complexo (Proteína-ligante)	ΔG_{bind}^a (kcal/mol)	K_i^b (μM)	Número corridas	Número de conformações no cluster de energia	Aminoácidos que interagem por ponte de hidrogênio ^c	Aminoácidos que fazem interação hidrofóbica ^c
PNP/ EPIRUCLO ₂	-10,99	0.00883	100	83	Ala118, Met221, Ser222	
PNP/ EPIRUCLN	-10,1	0.0393	100	91	Met221, Ser222, Ala118	Ala119, Asn117, Asn245, His88, His259, Gly220, Tyr90, Tyr202, Thr244, Val262
PNP/ EPIRUCLO	-9,37	0.13642	100	18	Met221, Ser222, Ala118	Asn117, Asn245, Gly220, His88, His259, Tyr90, Val262
TGR/ EPIRUCLN	-9,08	0.219	100	3	Glu259, Arg393	Asp433, Gln440, Leu441, Phe324, Tyr153, Tyr296, Val297
TGR/ EPIRUCLO ₂	-9,08	0.22232	100	6	Gln440	
UP/ EPIRUCLN	-8,6	0.49452	100	39	Arg121(2), Thr124 (2)	Gln201, Gly126, Glu232, Met93, Met231, Met233, Phe197, Ser125
UP/ EPIRUCLO ₂	-8,55	0.54256	100	20	Arg50, Arg121 (2), Glu234	
TGR/ EPIRUCLO	-8,3	0.82789	100	23	Gln440	Arg393, Leu441, Phe324, Pro439, Thr296, Thr471, Val469
MTAP/ EPIRUCLO	-8,19	0.997	100	1	Ala88, Val204	Asn205, Asp203, Asp232, Cys89, Gly90, Met206, Phe187, Pro63, Ser12, Thr207, Thr229
2CB1/ EPIRUCLN	-7,61	2.62	100	35	Gly144, Trp101	Ala271, Cys100, Gly98, Gly143, Gly244, Gly268, Gly269, Glu316, His270, Leu267
TGR/EPI	-7,25	4.89	100	27	Lys162 (2), Thr442	Cys159, Gly158, Glu300, Leu441, Phe280, Phe474, Pro443, Thr472, Tyr296, Val157, Val297, Val473
HDAC8/ EPIRUCLO	-7,23	4.98	100	31	-	Asp100, Phe151, Phe216, Pro19, Tyr99
MTAP/ EPIRUCLO ₂	-7,2	5.31	100	3	Phe231(2)	
PNP/EPI	-7,18	5.46	100	40	Ala118, Met221, His88	Asn117, Gly220, Tyr90, His259, Pro200, Ala119, Gly120, Tyr202, Asn245, Val219, Glu203
UP/EPI	-7,16	5.68	100	33	Arg50, Arg121(2), Thr124, Glu234, Gly46	Gly92, Gly123, Glu232, His91, Met93, Met231, Phe197, Phe272, Ser125
2CB1/ EPIRUCLO ₂	-7,16	2.05	100	35	Gly144	
HDAC8/ EPIRUCLO ₂	-7,12	6.08	100	5	His188, Phe216	
UP/ EPIRUCLO	-6,9	8.78	100	8	Arg50, Arg121, Thr124	Ala256, Met93, Met231, Met233, Glu232, Gln201,

					(2)	Phe197, Phe272, Ser125
HDAC8/ EPIRUCLN	-6,87	9.15	100	12	His188, Phe216	Asp100, Asp285, Asp186, Gly150, Gly214, His292, Phe151, Phe215, Phe216, Tyr341
MTAP/ EPIRUCLN	-6,76	11.18	100	7	-	Asp230, Cys242, Gln249, Pro98, Thr229, Val246
MTAP/EPI	-6,54	15.97	100	33	Ser12, Met206, Ala88, His55	Thr229, Pro63, Phe187, Asp320, Cys89, Val204, Gly90, Thr207, Asn205
ARG/EPI	-6,48	17.71	100	54	Ser165, Ala166	Met173, Asn169, Gly172, His171, Asp158, Asp262, Asp264, Thr276, Asn160, Asp213, Ser167
HDAC8/EPI	-6,43	19.44	100	54	-	Tyr99, Asp100, Phe151, Pro19, Tyr153, Lys20, Phe21, Pro102, Phe104, Tyr110, Ser18
2CB1/EPI	-6,09	34.36	100	10	Gly144 (2), Trp101	Ala271, Cys100, Gln94, Gly98, Gly143, Gly269, Glu316, His270, Leu146
2CB1/ EPIRUCLO	-5,33	123.13	100	50	-	Ala271, Cys100, Gly143, Gly144, Gly268, Gly269, His270, Leu146, Trp101
ARG/EPIRUCLO	42,0	-	100	30	Asp213	Ala166, Asn160, Asn164, His215
ARG/EPIRUCLN	45,3	-	100	16	Asn164, Ala166, Asp213	Asp211, His215, Ser165
ARG/EPIRUCLO ₂	45,57	-	100	21	Asp213, ala166	

^a Ligação de energia na melhor conformação; ^b Constante de inibição da melhor conformação; ^c Obtido com programa Ligplot

Figura 9: Docagem molecular em 3D do complexo enzima-ligante com a proteína PNP com os ligantes: EPI (a), EPIRUCLN (b), EPIRUCLO (c) e EPIRUNO₂ (d), ilustrando o sítio ativo de ligação com as respectivas interações por ponte de hidrogênio.



A atividade antischistosoma *ex vivo* são apresentados na Tabela 8, onde verifica-se que a ação da mistura do complexo EPIRUCLsineg (EPIRUCLN e EPIRUCLO) a mortalidade (100% do total de vermes) foi observada na concentração de 100 μM a partir de 72 horas de incubação, além da redução da atividade motora dos vermes machos e fêmeas logo nas primeiras 24 horas. Na concentração de 50 μM foi observada a mortalidade em 60% dos vermes machos e redução da atividade motora em até 100% dos vermes machos e 40% das fêmeas. Não se observou ovoposição dos vermes quando expostas nestas concentrações da droga.

A ação antihelmintica do complexo EPIRUNO₂ mostraram uma mortalidade de 60% dos vermes machos em até 48h (100 μM) e 72h (50 μM) e redução significativa da atividade motora em 100% dos vermes machos em até 72h. Não se observou

ovoposição dos vermes quando expostas nestas concentrações da droga (Tabela 08).

Para o alcaloide EPI na sua forma livre os resultados da atividade anti-helmíntica foram favoráveis na concentração de 1000 μM , com mortalidade de 100% dos vermes machos e fêmeas em até 72 h, e redução da atividade motora logo nas primeiras 24h. Na concentração de 500 μM , houve apenas leve redução da atividade motora dos vermes (Tabela 8). Veras et al., (2012) encontrou uma atividade anti-schistosoma *ex vivo* para EPI de 1048 μL .

As alterações morfológicas no tegumento dos vermes foram avaliadas por MEV (Figura 10), onde observou-se um dano menos expressivo na morfologia dos tubérculos provocadas por EPI (b) em comparação ao grupo controle (a). O dano no tegumento provocado pelo complexo EPIRUCLsineg (c) foi bem evidente alterando a morfologia, deixando a superfície mais lisa e com redução expressiva das espinhas nos tubérculos. Já o dano provocado pelo complexo EPIRUNO₂ (d) foi observado o rompimento dos tubérculos.

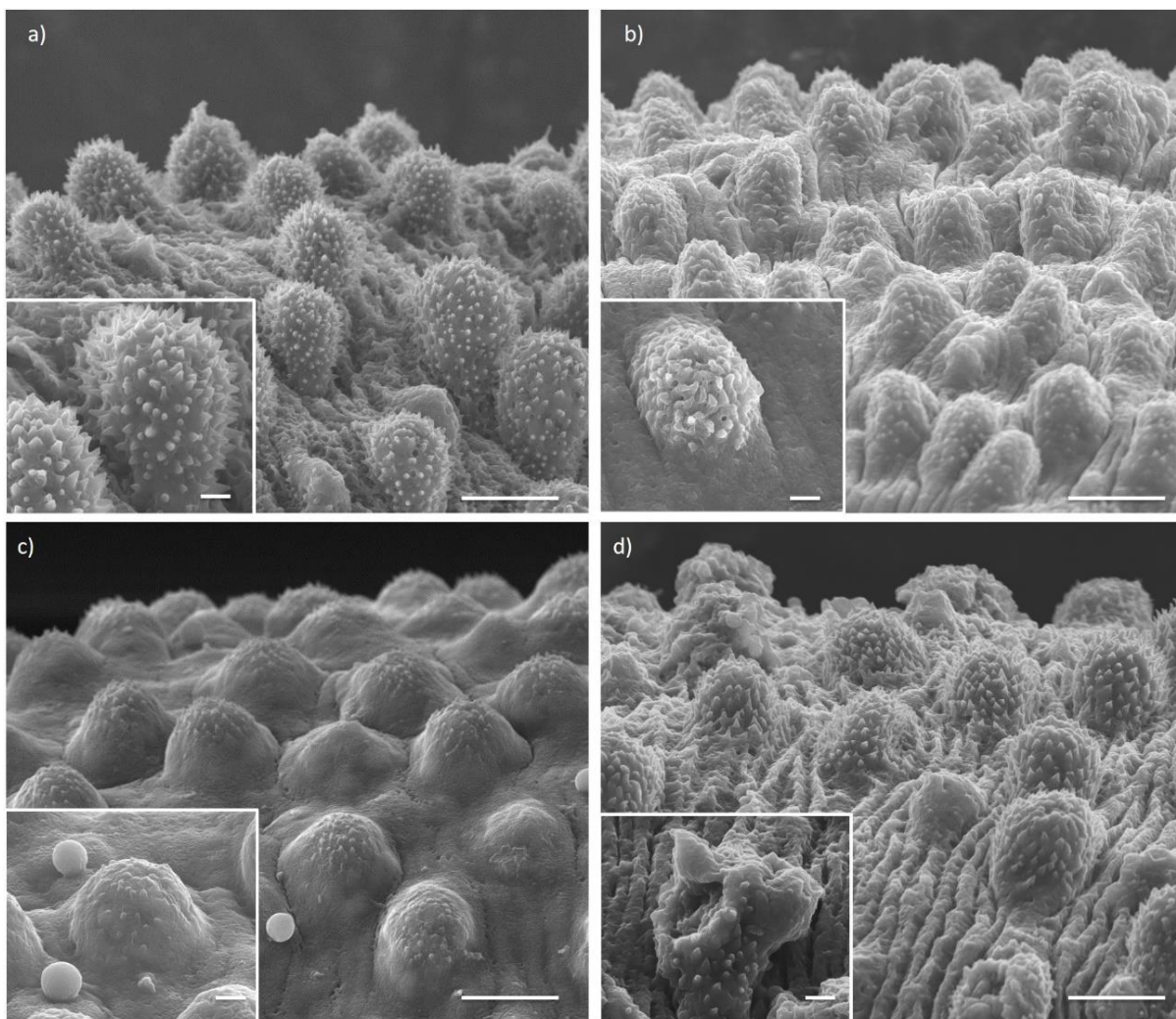
A atividade contra *S. Mansoni* apresentada pelos dois complexos metálicos (EPIRUCL e EPIRUNO₂) foram de dez vezes maiores que a forma EPI livre (Tabela 8), confirmando os dados apresentados no estudo prévio teórico computacional apresentado nesse trabalho com docagem molecular (Tabela 8), ADME (Tabela 6), densidade eletrônica (Tabela 5) e orbital molecular (Figura 4). E mostrando que esse alcaloide obteve uma melhora significativa da sua atividade biológica ao atuar em complexação com o rutênio concordando com TFOUNI et al., (2012) e SANTOS, (2012).

Tabela 8: Efeito dos complexos EPIRUCLsineg e EPIRUNO₂ contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* ex vivo.

Grupo	Período de incubação (h)	Vermes mortos (%) ^a		Redução da atividade motora (%) ^a			
		M	F	Leve		Significante	
				M	F	M	F
Controle	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Praziquantel 2 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Epiisopiloturina (EPI) 1000 µM	24	0	0	100	100	0	0
	48	10	10	90	90	10	10
	72	100	100	0	0	100	100
500 µM	24	0	0	100	100	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	0	0	100	100	0	0
EPIRUCLsineg 1000 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
500 µM	24	0	0	100	100	0	0
	48	30	30	60	90	40	10
	72	100	100	0	0	100	100
200 µM	24	0	0	100	100	0	0
	48	0	0	0	80	100	20
	72	100	100	0	0	100	100
100 µM	24	0	0	100	100	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	100	100	0	0	100	100
50 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	20	40	0	0
	72	60	0	0	40	100	0
EPIRUNO ₂ 100 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	60	0	0	0	60	0
	72	60	0	0	0	100	0
50 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	60	0	0	0	100	0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

Figura 10: MEV mostrando o tegumento dorsal dos vermes *S. mansoni*. a) Controle; seguindo com os vermes tratados com b) 100 μM de EPI; c) 100 μM de EPIRUClsineg e d) 100 μM de EPIRUNO₂. As barras de escalas nas imagens principais representam 20 μm e nas inseridas 5 μm .



CONCLUSÕES

Foi possível observar o efeito anti-schistosoma dos complexos metálicos utilizados neste trabalho, demonstrando a intensificação do efeito biológico do alcaloide epiisopiloturina, através da formação desses complexos hexacoordenados de rutênio. Além disso, o estudo prévio a formação dos complexos por química quântica computacional apresentou parâmetros que foram confirmados após a realização das atividades experimentais, mostrando que a importância desse estudo prévio pode direcionar o caminho para a síntese de novas drogas.

A melhor afinidade molecular foi obtida com a enzima PNP e os ligantes EPIRUNO2 e EPIRUCLN com $-10,99 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-10,1 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente.

O complexo EPIRUCLsineg foi o que obteve melhor atividade anti-helmíntica entre os demais, com mortalidade de 100% dos vermes na concentração de $100 \mu\text{M}$ a partir de 72 horas de incubação, e redução total da atividade motora.

O resultado *ex vivo* apresentado neste estudo, abrem caminho para estudos *in vivo*, e em outras espécies do gênero *Schistosoma*. Sendo também o complexo bipyrimídico de rutênio um bom agente complexante para ser utilizado em outras drogas que já tenham ação anti-helmíntica comprovada, para a intensificação do seu biológico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, e ao Governo do Estado do Maranhão e a Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação – SECTI pelo apoio com a bolsa estudo. A universidade Federal do Maranhão – UFMA, pelo incentivo. Agradecemos ao CENAPAD-UFC pelo ambiente de realização dos cálculos. E a universidade Estadual do Piauí – UESPI pela estrutura física para realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

AMES, B.N.; GURNEY, E. G.; MILLER, J. A.; BARTSCH, H. Carcinogens as Frameshift Mutagens: Metabolites and Derivatives of 2-Acetylaminofluorene and other Aromatic Amine Carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, p. 3128-3132, 1972.

ANGELUCCI, F.; MIELE A. E.; BOUMIS G.; DIMASTROGIOVANNI D.; BRUNORI M.; BELLELLI A. Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad: The structure of *Schistosoma mansoni* thioredoxin glutathione reductase. **Proteins**, v, 72, p. 936–945, 2008.

AZEREDO, F. J.; UCHÔA, F. T.; COSTA, T. D. P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, p. 321-326, 2009.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry.III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 5648-5652, 1993.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235–242, 2000.

CAMPELO, Y. D. M.; MAFUD, A.; VÉRAS, L.; GUIMARÃES, M. A.; YAMAGUCHI, L.; LIMA, D.; ARCANJO, D.; KATO, M.; MENDONÇA, R.; PINTO, P. L. S.; MASCARENHAS, Y.; SILVA, M. P. N.; MORAES, J.; EATON, P.; LEITE, J. Synergistic effects of in vitro combinations of piplartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, 2017.

CASIDA, M. E. **In Recent Advances in Density Functional Methods**; Chong, D. P., Ed.; World Scientific: Singapore, 1995.

DENNINGTON, R. D.; KEITH, T. A.; MILLAN, J. M. **GaussView**, v. 5.0.8, Semicchem, Inc.: Shawnee KS, 2008.

FRISCH, M. J; G. W. TRUCKS; H. B. SCHLEGEL; G. E. SCUSERIA; M. A. ROBB; J. R.CHEESEMAN; G. SCALMANI; V. BARONE; B. MENNUCCI; G. A. PETERSSON; H.NAKATSUJI; M. CARICATO; X. LI, H. P. HRATCHIAN; A. F. IZMAYLOV; J. BLOINO; G.ZHENG; J. L. SONNENBERG; M. HADA; M. EHARA; K. TOYOTA; R. FUKUDA; J.-Y.HASEGAWA; M. ISHIDA; T. NAKAJIMA; Y. HONDA; O. KITAO; H. NAKAI; T. VREVEN; J.A. MONTGOMERY; JR., J. E. PERALTA; F. OGLIARO; M. BEARPARK; J. J. HEYD; E.BROTHERS; K. N. KUDIN; V. N. STAROVEROV; R. KOBAYASHI; J. NORMAND; K.RAGHAVACHARI; A. RENDELL; J. C. BURANT; S. S. IYENGAR; J. TOMASI; M. COSSI; N.REGA; J. M. MILLAM; M. KLENE; J. E. KNOX; J. B. CROSS; V. BAKKEN; C. ADAMO; J.JARAMILLO; R. GOMPERTS; R. E.

STRATMANN; O. YAZYEV; A. J. AUSTIN; R. CAMMI, C. POMELLI; J. W. OCHTERSKI; R. L. MARTIN; K. MOROKUMA; V. G. ZAKRZEWSKI; G.A. VOTH; P. SALVADOR; J. J. DANNENBERG; S. DAPPRICH; A. D. DANIELS; O FARKAS; J. B. FORESMAN; J. VINCENT ORTIZ; J. CIOSLOWSKI; D. J. FOX. **Gaussian 09** revision D.01, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2009.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity da rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v, 36, p. 3219-3228, 1980.

GHOSE, A. K; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, p. 55-68, 1999.

GOODSELL, D. S. **Computational docking of biomolecular complexes with Auto-Dock**, in: E.A. Golemis, P.D. Adams (Eds.), Protein-protein Interact. A Mol. Cloning Man, Second, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2005.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of autodock. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, p. 1-5, 1996.

GORELSKY, S. I. **Swizard**. Department of Chemistry, York University: Toronto, ON, 1999.

GUIMARÃES, M. A.; OLIVEIRA, R. N.; VÉRAS, L. M. C.; LIMA, D. F.; CAMPELO, Y. D. M.; CAMPOS, S. A.; KUCKELHAUS, S. A. S.; PINTO, P. L. S.; EATON, P.; MAFUD, A. C.; MASCARENHAS, Y. P.; ALLEGRETTI, S. M.; MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. 1-18, 2015.

HAI, Y.; EDWARDS, J. E.; VAN ZANDT, M. C.; HOFFMANN, K. F.; CHRISTIANSON, D. W. Crystal Structure of *Schistosoma mansoni* Arginase, a Potential Drug Target for the Treatment of Schistosomiasis. **Biochemistry**, v. 53, p. 4671- 4684, 2014.

HORN, M.; JÍLKOVÁ, A.; VONDRÁŠEK, J.; MAREŠOVÁ, L.; CAFFREY, C. R.; MAREŠ, M. Mapping the Pro-Peptide of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Modulation of Inhibition by Heparin and Design of Mimetic Inhibitors. **ACS Chemical Biology**, v. 6, p. 609-617, 2011.

JÍLKOVÁ, A.; REZÁCOVÁ, P.; LEPSIK, M.; HORN, M.; VÁCHOVÁ, J.; FANFRLIK, J.; BRYNDA, J.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C.; MAREŠ, M. Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 41, p. 35770–35781, 2011.

KADAN, R.U.; Roy, N. Recent trends in drug likeness prediction: a comprehensive review of in silico methods. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, p. 609-615, 2007.

KANNAN, S.; MELESINA, J.; HAUSER, A.; CHAKRABARTI, A.; HEIMBURG, T.; SCHMIDTKUNZ, K.; WALTER, A.; MAREK, M.; PIERCE, R.; ROMIER, C.; JUNG, M.; SIPPL, W. Discovery of Inhibitors of *Schistosoma Mansoni* HDAC8 by Combining Homology Modeling, Virtual Screening and In Vitro Validation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 54, 2014.

KOHN, W.; SHAM, L. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Journal of Physical Review**, v. 140, p.1133-1138, 1965.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. **Journal of Physical Review**, v. 37, p. 785-789, 1998.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-26, 2001.

MA, X. L.; CHEN, C.; YANG, J. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 26, p. 500-512, 2005.

MCLEAN, A. D.; CHANDLER, G. S. "Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11-18." **Journal of Chemical Physics**, v. 72, p. 5639-5648, 1980.

MELO-FILHO, C. C.; DANTAS, R. F.; BRAGA, R. C.; NEVES, B. J.; SENGER, M. R.; VALENTE, W. C. G.; REZENDE-NETO, J. M.; CHAVES, W. T.; MURATOV, E. N.; PAVELEY, R. A.; FURNHAM, N.; KAMENTSKY, L.; CARPENTER, A. E.; SILVA-JUNIOR, F. P.; ANDRADE, C. H. QSAR-Driven Discovery of Novel Chemical Scaffolds Active against *Schistosoma mansoni*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, 1357-1372, 2016.

MORAES J. **Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens**. In: RODRIGUEZ-MORALES, A J. ed. Current Topics in Tropical Medicine. InTech. Rijeka: p. 333-358, 2012.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. **Using AutoDock for ligand-receptor docking**, in: Curr. Protoc. Bioinforma., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2008.

OPREA, T. I. Property distribution of drug-related chemical databases. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 14, p. 251-26, 2000.

PARR, R. G.; VON SZENTPÁLY, L.; LIU, S. Electrophilicity Index. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 1922-1924, 1999.

PEREIRA, H. D.; FRANCO, G. R.; CLEASBY, A.; GARRATT, R. C. Structures for the Potential Drug Target Purine Nucleoside Phosphorylase from *Schistosoma mansoni* Causal Agent of Schistosomiasis. **Journal of Molecular Biology**. v. 353, n. 3, p. 584–599, 2005.

POSTIGO, M. P.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; CASTILHO, M. S.; PITTA, I. R.; DE ALBUQUERQUE, J. F. C.; ANDRICOPULO, A. D. Discovery of New Inhibitors of *Schistosoma mansoni* PNP by Pharmacophore-Based Virtual Screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, p. 1693–1705, 2010.

RAGHAVACHARI, J. S.; BINKLEY, R.; SEEGER, J. A. Pople, “Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions.” **Journal of Chemical Physics**, v. 72, p. 650-654, 1980.

RAMOS, R. M.; PEREZ, J. M.; BAPTISTA, L. A.; DE AMORIM, H. L. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* with isoniazid: a computational study on a new possible mechanism of resistance. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, p. 4013-4024, 2012.

SANTOS, M. **Síntese e caracterização de complexos híbridos de rutênio e medida da atividade biológica contra *Trypanosoma cruzi***. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2012.

SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 17, p. 57-61, 1999.

SILVA NETO, A. M.; SOUZA, J. R. T.; ROMANELLO, L.; CASSAGO, A.; SERRAO, V. H. B.; DEMARCO, R.; BRANDAO-NETO, J.; GARRATT, R. C.; PEREIRA, H. D. Analysis of two *Schistosoma mansoni* uridine phosphorylases isoforms suggests the

emergence of a protein with a non-canonical function. **Biochimie**, v. 125, p. 12-22, 2016.

SINGH, S.; SINGH, J. Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: A review. **Medicinal Research Reviews**, v. 13, p. 569–621, 1993.

SOLIS, F. J.; WETS, R. J. B. Minimization by Random Search Techniques. **Mathematics of Operations Research**, v. 6, p. 19-30, 1981.

SOUTHAM, H. M.; BUTLER, J. A.; CHAPMAN, J.A.; POOLE, R. K. The microbiology of ruthenium complexes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 71, p. 1–96, 2017.

STOLFA, D. A.; MAREK, M.; LANCELOT, J.; HAUSER, A. T.; WALTER, A.; LEPROULT, E.; MELESINA, J.; RUMPF, T.; WURTZ, J. M.; CAVARELLI, J.; SIPPL, W.; PIERCE, R. J.; ROMIER, C.; JUNG, M. Molecular Basis for the Antiparasitic Activity of a Mercaptoacetamide Derivative That Inhibits Histone Deacetylase 8 (HDAC8) from the Human Pathogen *Schistosoma mansoni*. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 20, p. 3442–3445, 2014.

STRATMANN, R. E.; SCUSERIA, G. E.; FRISCH, M. J. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. **Journal of Chemical Physics**, v. 109, p. 8218-8224, 1998.

TEAGUE, S. J; DAVIS, A. M.; LEESON, P. D.; OPREA, T. The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 3743-3748, 1999.

TFOUNI, E.; TRUZZI, D. R.; TAVARES, A.; GOMES, A. J.; FIGUEIREDO, L. E.; FRANCO, D. W. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes, **Nitric Oxide**, v. 26, n. 1, p. 38-53, 2012.

TORINI, J. R.; BRANDÃO-NETO, J.; DEMARCO, R.; PEREIRA, H. D. Crystal Structure of *Schistosoma mansoni* Adenosine Phosphorylase/ 5'-

Methylthioadenosine Phosphorylase and Its Importance on Adenosine Salvage Pathway. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 10, n. 12, p. 1-25, 2016.

VERAS, L. M. C.; CUNHA, V. R. R.; LIMA, F. C. D. A.; GUIMARÃES, M. A.; VIEIRA, M. M.; CAMPELO, Y. D. M.; SAKAI, V. Y.; LIMA, D. F.; CARVALHO JUNIOR, P. S.; ELLENA, J. A.; SILVA, P. R. P.; VASCONCELOS, L. C.; GODEJOHANN, M.; PETRILLI, H. M.; CONSTANTINO, V. R. L.; MASCARENHAS, Y. P.; LEITE, J. R. S. A. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **Plos One**, v. 8, p. 1-11, 2013.

VERAS, L. M.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R.; MORAES, J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**. v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VOIGTLANDER, H. W.; BALSAM, G.; ENGELHARDT, M.; POHL, L. 1978. Epiisopiloturin, ein neues Pilocarpus-Alkaloid. **Archives Pharmacal Research**, v. 311, n. 11, p. 927 – 935, 1978.

World Health Organization (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acesso em 26 de dezembro de 2017.

YAMASHITA, S.; FURUBAYASHI, T.; KATAOKA, M.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; TOKUDA, H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 195-204, 2000.

YEE S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man-fact or myth. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 763-766, 1997.

ZHAN, C. G.; NICHOLS, J. A.; DIXON, D. A. Ionization Potential, Electron Affinity, Electronegativity, Hardness, and Electron Excitation Energy: Molecular Properties from Density Functional Theory Orbital Energies. **Journal Physical Chemistry A**, v. 107, p. 4184–4195, 2003.

ZHAO, Y. H.; LE, J.; ABRAHAM, M. H.; HERSEY, A.; EDDERSHAW, P. J.; LUSCOMBE, C. N.; BUTINA, D.; BECK, G.; SHERBORNE, B.; COOPER, I.; PLATTS, J. A. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 749-784, 2001.

**Processo de síntese e aplicação do complexo biperidimico de rutenio com
epiisopiloturina contra doenças negligenciadas**

Patente submetida ao NINTEC- UFPI (14/12/2017)
Depositada ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI)

Capítulo V

RESUMO

“PROCESSO DE SÍNTESE E APLICAÇÃO DO COMPLEXO BIPÍRIDIMICO DE RUTÊNIO COM EPIISOPILOTURINA CONTRA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS”

A presente invenção trata de um processo de síntese do complexo bipyridimico de rutênio com epiisopiloturina (cis -[Ru(byp)₂(Epi)Cl]) e (cis -[Ru(byp)₂(Epi)NO₂]), obtida da reação entre o precursor cis -[Ru(bpy)₂Cl₂] com a episopiloturina, e sua aplicação contra doenças negligenciadas, tais como esquistossomose e doença de chagas. Mais particularmente, a invenção refere-se à aplicação deste complexo no combate a infecções por parasitas patogênicos de importância à saúde humana e veterinária, como a esquistossomose e doença de chagas, podendo ser indicado como opção de tratamento, bem como apresenta elucidação das interações dos complexos com os receptores transialidase, proteína cinase, tripanotona, arginina kinase e CYP51 (doença de Chagas) e os receptores 1TCU, 4L5A, 4TXH, 3Q3P, 4CQF, 2V6O e 3QSD (esquistossomose) mediante estudos de química computacional de Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e docagem molecular.

Conclusão

9. CONCLUSÃO

- As pesquisas relacionadas à *Schistosoma mansoni* e complexo de rutênio se mostraram bastante escassos no que diz respeito às publicações de artigos e patentes.
- O modelo teórico B3lyp/6-311++G** foi o que melhor descreveu as propriedades geométricas, eletrônicas, vibracionais e termodinâmicas estudadas dos alcaloides e é adequado para uso como referência para estruturas similares que abordam essa atividade farmacológica.
- O perfil ADMET concluiu que o alcaloide EPI e seus isômeros são adequados para a classificação padrão de drogas de Lipinski, com parâmetros positivos em PPB, BBB, HIA e inibidores de CYP, além de ter baixa toxicidade e carcinogenicidade com mais de 90% de probabilidade de ter boa solubilidade e permeabilidade. Em relação aos complexos esses dados são se mostraram bem satisfatórios.
- A docagem molecular evidenciou que o alcaloide EPIIS foi o ligante que apresentou melhor parâmetro de afinidade para proteínas UP e TGR indicando um possível candidato a fármaco para esta doença. E a formação dos complexos metálicos intensificou a energia de afinidade dos ligantes em comparação a EPI isolada.
- Todos os complexos (*cis* e *trans*) houve uma diminuição nos gaps de energia HOMO e LUMO em comparação ao alcaloide epiisopiloturina, as energias mostram valores mais estáveis também para *cis*, sendo o complexo EPIRUCLO2-*cis* e EPIRUCLN-*cis* mais estáveis.
- Foi possível observar o efeito antischistosoma de 100 uM dos complexos metálicos EPIRUCLSineg utilizados neste trabalho, demonstrando a intensificação do efeito biológico do alcaloide epiisopiloturina que após a formação do complexo.

Apêndices

CAPITULO II

Tabela A1: Cargas atômicas pelos métodos Mulliken, Chelpg e NBO dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando o modelo teórico B3lyp/Sdd.

	EPI			EPIIS			ISOP			PILO			MAC		
	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull
N1	0,129	-0,430	-0,800	0,138	-0,442	-0,171	0,098	-0,442	-0,177	0,119	-0,443	-0,168	0,101	-0,441	-0,172
N2	-0,629	-0,556	-0,137	-0,597	-0,522	-0,088	-0,613	-0,525	-0,093	-0,635	-0,523	-0,090	-0,586	-0,522	-0,085
O1	-0,529	-0,576	-0,240	-0,537	-0,561	-0,240	-0,497	-0,570	-0,243	-0,527	-0,565	-0,235	-0,540	-0,569	-0,258
O2	-0,605	-0,593	-0,255	-0,595	-0,610	-0,269	-0,559	-0,584	-0,232	-0,601	-0,613	-0,272	-0,570	-0,581	-0,239
O3	-0,599	-0,809	-0,503	-0,685	-0,795	-0,469	-0,561	-0,819	-0,522	-0,692	-0,794	-0,473	-	-	-
C1	0,119	0,230	-0,252	0,176	0,219	-0,250	0,187	0,215	-0,243	0,211	0,217	-0,258	0,184	0,221	-0,248
C2	-0,283	-0,403	-0,554	-0,435	-0,407	-0,567	-0,330	-0,414	-0,606	-0,448	-0,407	-0,571	-0,352	-0,408	-0,566
C3	0,534	0,133	0,235	-0,133	0,127	0,387	-0,090	0,131	0,392	-0,160	0,132	0,370	-0,090	0,126	0,398
C4	-0,578	-0,456	-0,502	-0,140	-0,463	-0,527	-0,289	-0,466	-0,565	-0,092	-0,480	-0,476	-0,064	-0,490	-0,603
C5	0,313	-0,229	-0,077	0,184	-0,223	-0,067	0,227	-0,224	-0,028	0,157	-0,217	-0,138	0,086	0,024	0,338
C6	0,788	0,835	0,231	0,855	0,845	0,236	0,702	0,838	0,207	0,851	0,838	0,244	0,824	0,794	0,183
C7	0,053	-0,343	-0,195	-0,065	-0,358	-0,232	0,069	-0,342	-0,237	-0,015	-0,362	-0,227	-0,191	-0,121	-0,004
C8	-0,053	0,146	-0,202	-0,109	0,135	-0,244	-0,181	0,144	-0,210	-0,124	0,128	-0,229	-0,209	-0,659	-0,714
C9	0,221	-0,081	0,411	0,257	-0,073	0,468	0,224	-0,082	0,412	0,309	-0,066	0,475	-	-	-
C10	-0,223	-0,217	-0,449	-0,233	-0,207	-0,443	-0,182	-0,229	-0,389	-0,247	-0,210	-0,458	-	-	-
C11	-0,071	-0,210	-0,214	-0,066	-0,207	-0,213	-0,101	-0,207	-0,215	-0,071	-0,206	-0,211	-	-	-
C12	-0,143	-0,212	-0,229	-0,126	-0,211	-0,227	-0,121	-0,209	-0,226	-0,130	-0,212	-0,228	-	-	-

Tabela A2: Cargas atômicas pelos métodos Mulliken, Chelpg e NBO dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando o modelo teórico B3lyp/6-31+G**.

	EPI			EPIIS			ISOP			PILO			MAC		
	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull	Chelp	NBO	Mull
N1	0,072	-0,408	-0,111	0,030	-0,410	-0,037	0,082	-0,410	-0,053	0,083	-0,412	-0,056	0,069	-0,409	-0,044
N2	-0,586	-0,507	-0,270	-0,565	-0,492	-0,228	-0,580	-0,493	-0,232	-0,599	-0,492	-0,241	-0,549	-0,490	-0,244
O1	-0,458	-0,544	-0,263	-0,421	-0,540	-0,226	-0,409	-0,538	-0,290	-0,438	-0,543	-0,281	-0,458	-0,540	-0,308
O2	-0,572	-0,583	-0,404	-0,525	-0,573	-0,448	-0,524	-0,573	-0,438	-0,547	-0,575	-0,440	-0,549	-0,579	-0,498
O3	-0,578	-0,784	-0,541	-0,604	-0,778	-0,541	-0,555	-0,788	-0,491	-0,558	-0,774	-0,587	-	-	-
C1	0,136	0,180	0,275	0,200	0,172	0,232	0,215	0,169	0,233	0,206	0,170	0,213	0,183	0,176	0,218
C2	-0,117	-0,479	-0,254	-0,241	-0,480	-0,206	-0,323	-0,481	-0,208	-0,330	-0,478	-0,221	-0,224	-0,482	-0,239
C3	0,425	0,095	0,661	-0,033	0,087	0,362	-0,152	0,090	0,653	-0,186	0,092	0,765	-0,119	0,085	0,237
C4	-0,334	-0,484	-1,445	-0,262	-0,490	-0,620	-0,026	-0,496	-0,755	0,044	-0,507	-1,292	0,053	-0,520	-0,647
C5	0,219	-0,303	0,114	0,224	-0,302	0,290	0,020	-0,291	0,225	0,112	-0,285	0,662	0,011	0,003	0,322
C6	0,690	0,825	0,088	0,609	0,834	0,463	0,606	0,824	0,359	0,664	0,832	0,404	0,732	0,786	0,356
C7	0,116	-0,369	-0,294	0,168	-0,370	-0,948	0,066	-0,368	-0,733	0,234	-0,378	-1,082	-0,165	-0,139	0,436
C8	0,116	0,084	0,455	0,127	0,079	0,977	-0,054	0,076	0,092	-0,101	0,078	0,524	-0,081	-0,717	-0,729
C9	0,082	-0,087	-0,018	0,087	-0,086	-0,297	0,178	-0,086	0,151	0,205	-0,091	0,335	-	-	-
C10	-0,167	-0,235	0,280	-0,146	-0,238	0,127	-0,151	-0,236	-0,103	-0,160	-0,237	0,249	-	-	-
C11	-0,052	-0,243	-0,282	-0,076	-0,242	-0,329	-0,079	-0,241	-0,266	-0,064	-0,243	-0,148	-	-	-
C12	-0,112	-0,241	-0,050	-0,095	-0,240	-0,057	-0,103	-0,238	-0,073	-0,114	-0,239	-0,130	-	-	-

Tabela A3: Distâncias das ligações atômicas e ângulos atômicos dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando os modelos teóricos B3lyp/sdd e B3lyp/6-31+G**.

B3lyp/Sdd	EPI	EPIIS	ISOP	PILO	MAC
N1 – C2	1,465	1,465	1,468	1,464	1,466
N2 – C1	1,337	1,336	1,336	1,335	1,336
O2 = C6	1,233	1,235	1,231	1,236	1,233
O1 – C6	1,390	1,386	1,392	1,386	1,412
O3 – C8	1,469	1,470	1,477	1,467	
N1 – C1 – N2	111,6	111,7	111,8	111,7	111,8
C1 – N1 – C2	126,8	125,7	125,6	125,8	125,9
C3 – C4 – C5	112,6	113,9	113,8	113,1	114,2
O2 = C6 - O1	121,9	121,9	122,0	122,2	122,7
O3 – C8 – C7	105,3	110,0	105,9	111,0	
C7 – C8 – C9	116,0	115,9	113,8	114,5	
C8 – C9 – C10	119,0	118,6	120,0	119,0	
B3lyp/6-31+G**	EPI	EPIIS	ISOP	PILO	MAC
N1 – C2	1,454	1,455	1,455	1,453	1,455
N2 – C1	1,317	1,315	1,316	1,315	1,316
O2 = C6	1,207	1,204	1,206	1,204	1,209
O1 – C6	1,356	1,361	1,358	1,362	1,373
O3 – C8	1,432	1,430	1,440	1,428	-
N1 – C1 – N2	112,2	112,4	112,4	112,3	112,4
C1 – N1 – C2	126,9	125,7	125,8	125,7	126,0
C3 – C4 – C5	113,3	114,5	114,4	113,7	114,4
O2 = C6 - O1	122,2	121,8	122,0	121,8	122,6
O3 – C8 – C7	106,3	106,5	106,2	107,9	-
C7 – C8 – C9	115,1	115,6	114,2	114,7	-
C8 – C9 – C10	119,2	118,9	120,4	119,1	-

Tabela A4: Energias eletrostáticas em (Hartree) dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando os modelos teóricos B3lyp/sdd, B3lyp/6-31+G** e B3lyp/6-311++G**. ^aEnergia livre de Gibbs, ^bEntalpia, ^cTérmica, ^dEnergia ponto zero.

	Energias	EPI	EPIIS	ISOP	PILO	MAC
B3lyp/Sdd	HF ^d	-955,243343	-955,239355	-955,240796	-955,236328	-647,912618
	ΔT^c	-955,224312	-955,220546	-955,221980	-955,217580	-647,899228
	ΔH^b	-955,223368	-955,219601	-955,221036	-955,216636	-647,898284
	ΔG^a	-955,294028	-955,289314	-955,290474	-955,286155	-647,954685
B3lyp/6-31+G**	HF	-955,461254	-955,456083	-955,458547	-955,451371	-648,068900
	ΔT	-955,442202	-955,437099	-955,439469	-955,432451	-648,055645
	ΔH	-955,441258	-955,436155	-955,438524	-955,431507	-648,054701
	ΔG	-955,511751	-955,506116	-955,509287	-955,501034	-648,110318
B3lyp/6-311++G**	HF	-955,663191	-955,657935	-955,660326	-955,653363	-648,207347
	ΔT	-955,644630	-955,638914	-955,641184	-955,634424	-648,194075
	ΔH	-955,643686	-955,637970	-955,640239	-955,633480	-648,193131
	ΔG	-955,711130	-955,708003	-955,711291	-955,703143	-648,248798

Table A5: Valores dos Orbitais Moleculares HOMO/LUMO em eV dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando os modelos teóricos B3lyp/Sdd, B3lyp/6-31+g** e B3lyp/6-311++G**.

		EPI	EPIIS	ISOP	PILO	MAC	
B3lyp/Sdd	HOMO	-4	-7,249	-7,634	-7,368	-7,542	-7,755
		-3	-7,129	-7,190	-7,219	-7,207	-7,722
		-2	-6,932	-7,187	-7,096	-7,091	-7,662
		-1	-6,709	-7,096	-6,946	-7,086	-7,280
		0	-6,486	-6,558	-6,269	-6,439	-6,702
	GAP		5,984	5,700	5,399	5,565	5,028
		0	-0,502	-0,858	-0,870	-0,873	-1,673
	LUMO	+1	-0,281	-0,709	-0,623	-0,698	-0,022
		+2	0,029	-0,549	-0,478	-0,562	1,019
		+3	0,103	0,083	0,297	0,167	1,391
+4		1,158	1,120	1,362	1,233	1,721	
B3lyp/6-31+G**	HOMO	-4	-7,625	-7,637	-7,530	-7,565	-7,839
		-3	-7,271	-7,525	-7,440	-7,464	-7,791
		-2	-6,959	-7,174	-7,214	-7,255	-7,695
		-1	-6,752	-6,960	-7,080	-7,067	-7,645
		0	-6,450	-6,409	-6,282	-6,313	-6,613
	GAP		5,877	5,621	5,390	5,471	5,103
		0	-0,573	-0,788	-0,891	-0,841	-1,510
	LUMO	+1	-0,382	-0,603	-0,645	-0,717	-0,562
		+2	-0,288	-0,589	-0,423	-0,673	-0,139
		+3	-0,181	-0,235	-0,273	-0,153	0,024
+4		-0,160	-0,030	-0,068	-0,085	0,090	
B3lyp/6-311++G**	HOMO	-4	-7,670	-7,673	-7,568	-7,607	-7,881
		-3	-7,311	-7,548	-7,457	-7,485	-7,825
		-2	-7,006	-7,230	-7,271	-7,302	-7,750
		-1	-6,798	-7,011	-7,134	-7,100	-7,673
		0	-6,493	-6,453	-6,326	-6,359	-6,654
	GAP		5,851	5,619	5,382	5,462	5,133
		0	-0,641	-0,833	-0,943	-0,897	-1,520
	LUMO	+1	-0,555	-0,746	-0,700	-0,832	-0,739
		+2	-0,457	-0,651	-0,614	-0,730	-0,247
		+3	-0,313	-0,372	-0,314	-0,296	-0,160
+4		-0,256	-0,213	-0,285	-0,272	-0,118	

Tabela A6: Momento dipolo (em debye) dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando os modelos teóricos B3lyp/Sdd, B3lyp/6-31+G** e B3lyp/6-311++G**.

	B3lyp/Sdd	B3lyp/6-31+G**	B3lyp/6-311++G**
EPI	6,296453	5,863899	5,866797
EPIIS	4,706137	5,761462	5,717937
ISOP	6,158533	5,347280	5,317699
PILO	7,217896	7,437599	7,371430
MAC	4,953716	4,558397	4,523608

Tabela A7: Descolamentos químicos do ^{13}C NMR dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO and MAC. Valores dos átomos de acordo com a figura S4.

Atom	EPI	EPIIS	ISOP	PILO	MAC
C6	181,55	177,41	179,13	176,69	177,56
C3	151,08	132,76	134,34	134,76	132,15
C9	149,65	148,26	149,71	150,43	-
C1	143,13	142,83	142,51	142,36	143,21
C13	134,45	133,63	133,02	134,56	-
C14	134,30	134,99	136,43	135,56	-
C12	133,89	133,10	133,43	133,22	-
C11	133,20	132,32	133,26	132,20	-
C10	131,14	129,78	130,08	130,30	-
C16	122,08	135,82	134,94	136,72	135,64
C8	85,56	77,69	83,10	79,14	9,85
C15	73,29	72,73	73,78	69,57	74,13
C7	57,65	54,70	55,32	53,35	131,01
C5	47,76	42,15	46,13	45,54	162,38
C4	37,39	29,67	32,16	26,81	26,07
C2	33,04	31,51	31,30	31,41	31,47

Figura A1: Espectro de Infravermelho dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando os modelos teóricos B3lyp/Sdd, B3lyp/6-31+G** e B3lyp/6-311++G**.

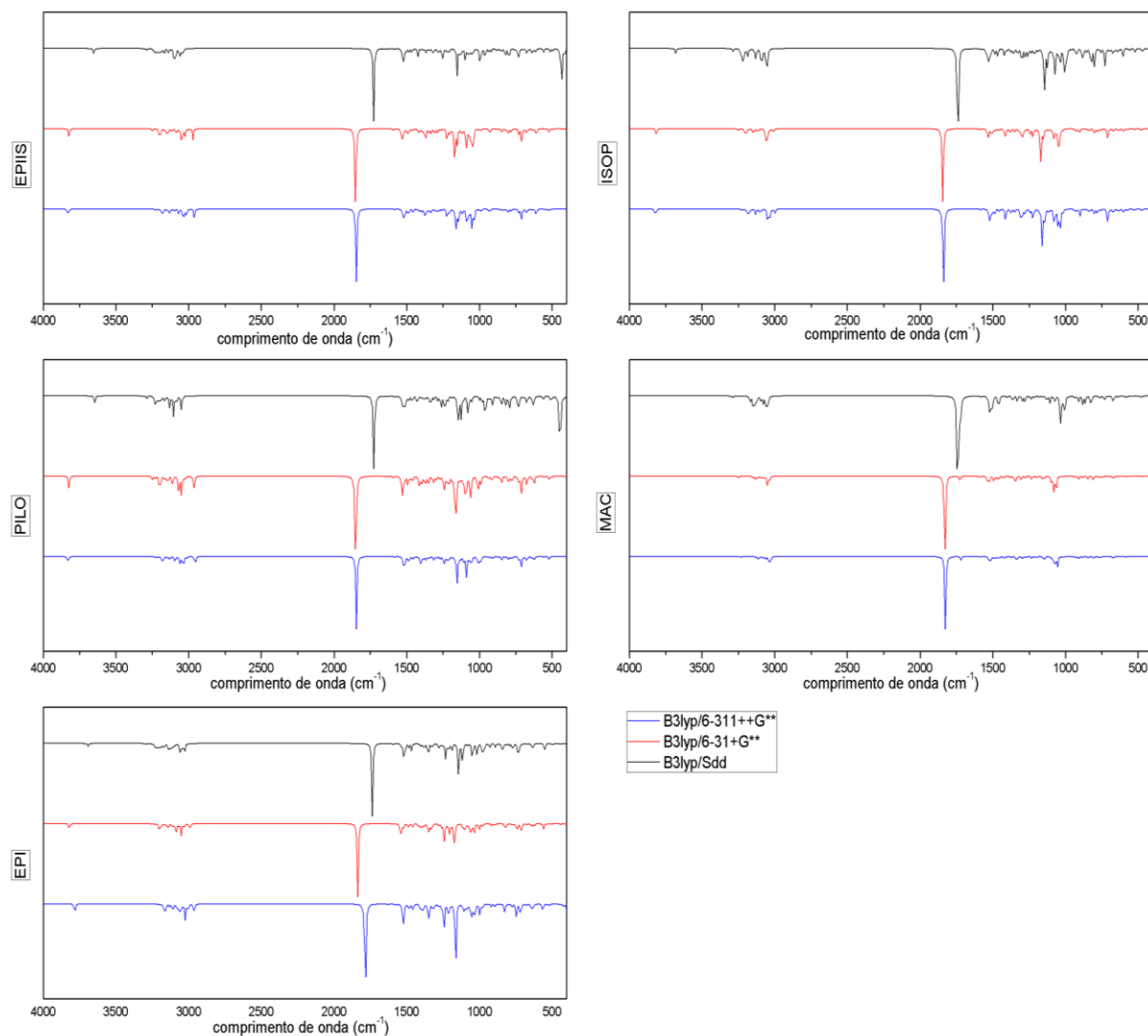


Figura A2: Espectro de Raman dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando os modelos teóricos B3lyp/Sdd, B3lyp/6-31+G** e B3lyp/6-311++G**.

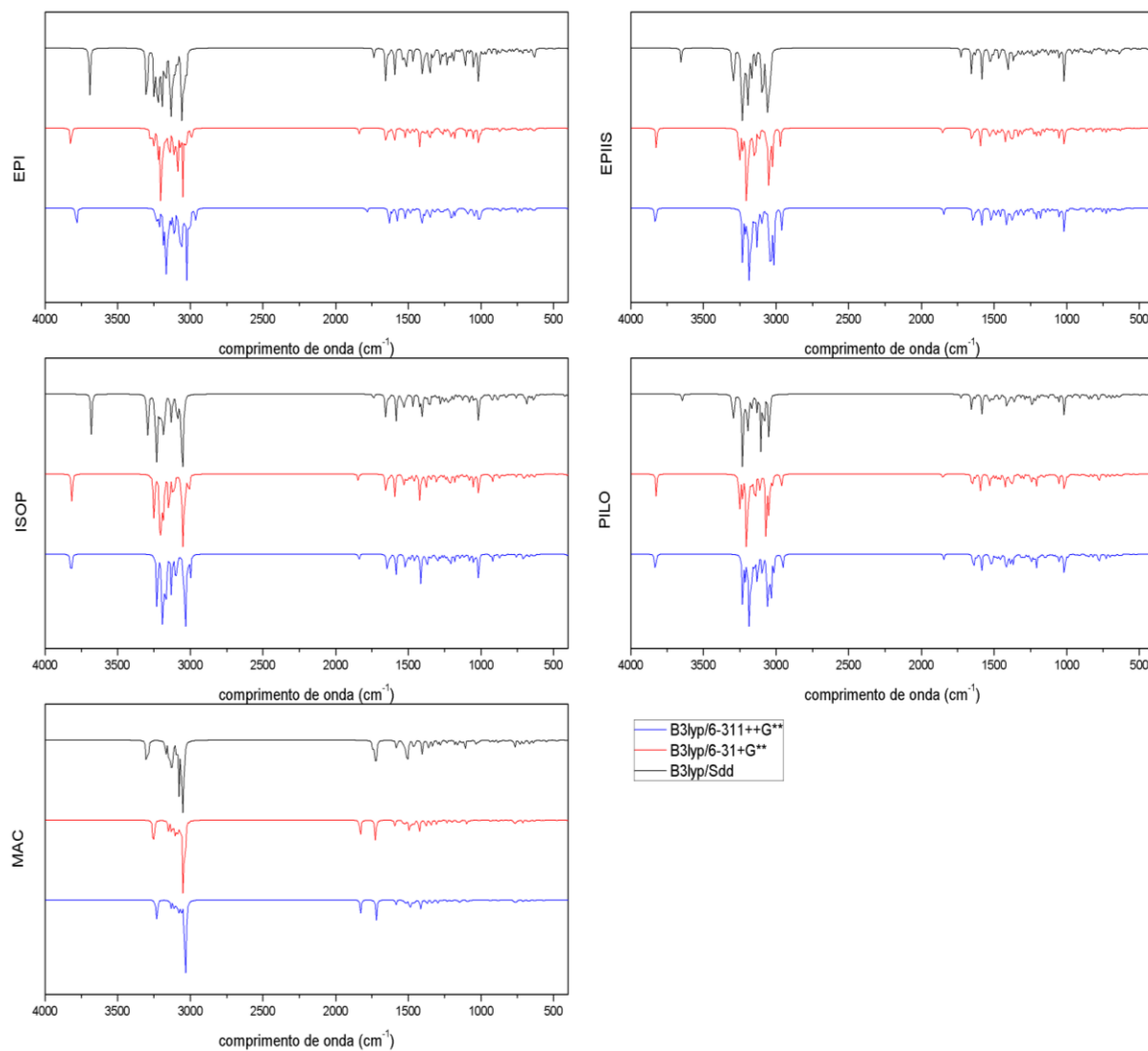


Figura A3: Espectro de UV-Vis dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO e MAC utilizando os modelos teóricos B3lyp/Sdd e B3lyp/6-31+g**.

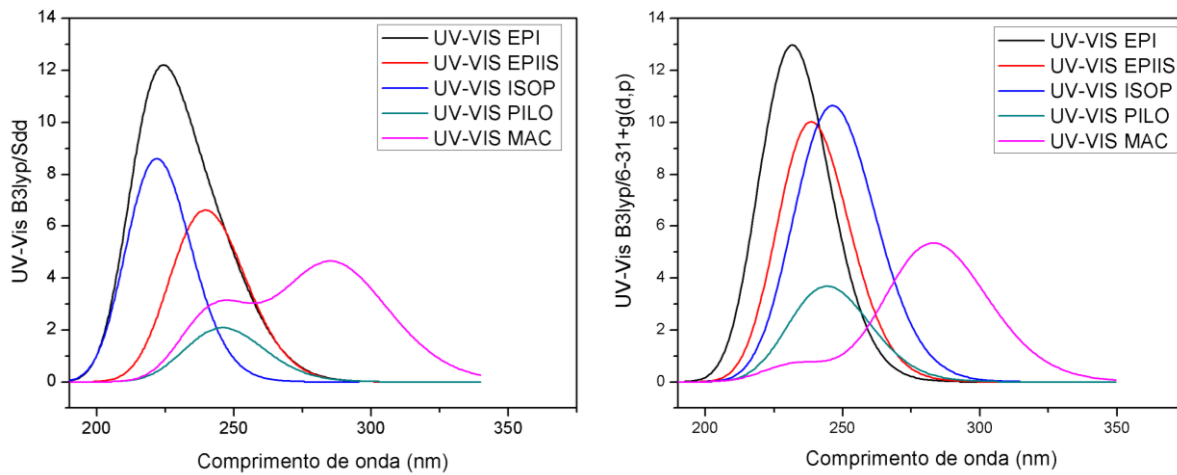
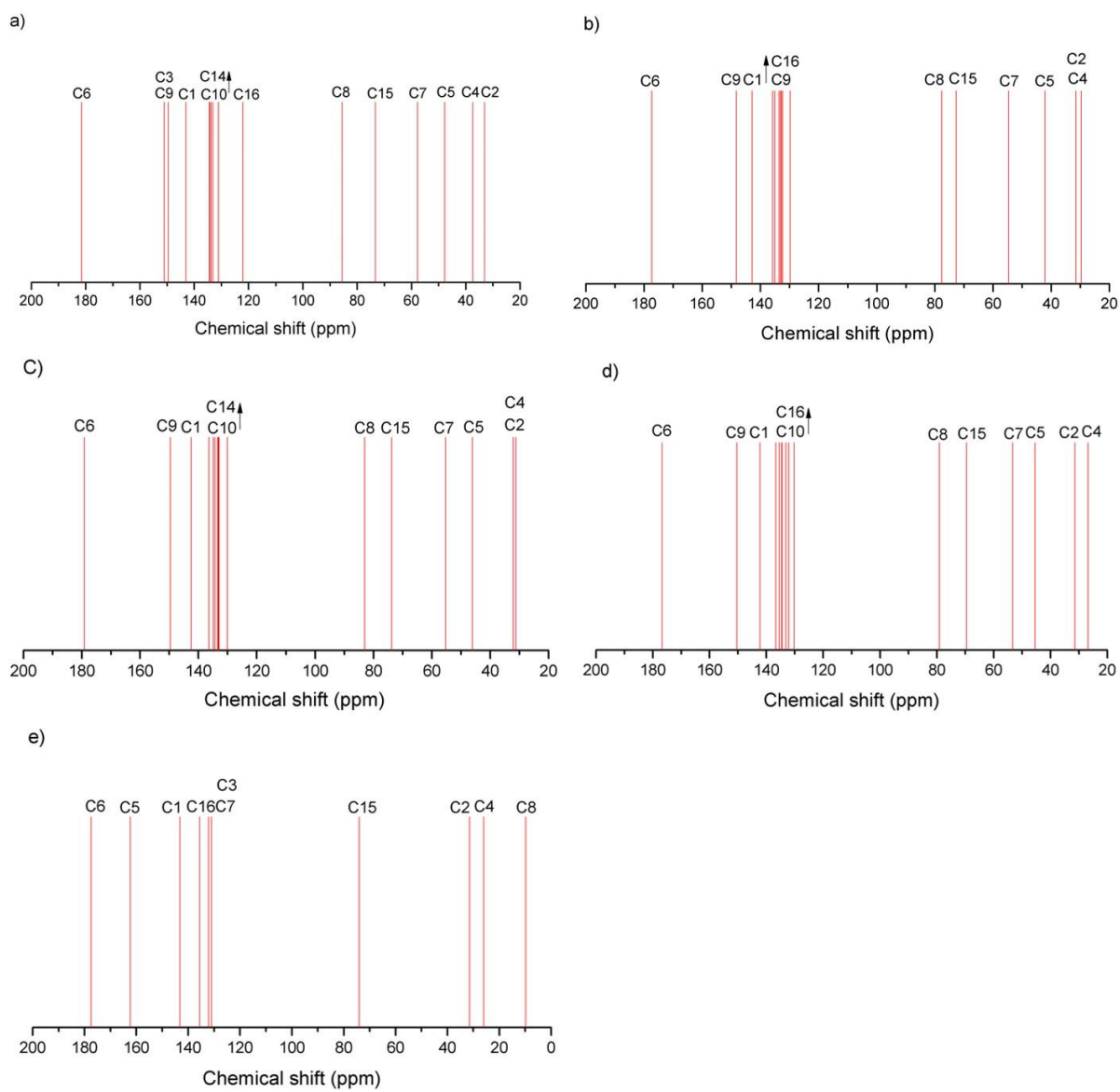


Figura A4: Descolamento químicos de ^{13}C NMR dos alcaloides EPI, EPIIS, ISOP, PILO and MAC, usando o modelo teórico B3lyp/6-311++G**.



CAPITULO IV

Tabela A1: Orbitais Moleculares E_{HOMO} e E_{LUMO} do alcaloide EPI e dos complexos EPIRUCLO, EPIRUCLN e EPIRUNO₂.

		EPI	EPIRUCLN	EPIRUCLO	EPIRUNO ₂
HOMO	-4	-7,249	-8,232	-8,650	-8,446
	-3	-7,129	-8,192	-8,368	-8,434
	-2	-6,932	-8,122	-7,976	-8,312
	-1	-6,709	-8,022	-7,599	-8,107
	0	-6,486	-7,839	-7,445	-8,051
GAP		5,984	2,666	2,695	2,711
LUMO	0	-0,502	-5,173	-4,750	-5,339
	+1	-0,281	-4,937	-4,573	-5,070
	+2	0,029	-4,406	-3,933	-4,557
	+3	0,103	-4,086	-3,688	-4,224
	+4	1,158	-4,026	-3,631	-4,147

Anexos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA - PROPESQ
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, DECLARA para as finalidades de direito, a requerimento de JEFFERSON ALMEIDA ROCHA – Doutorando (nome e qualificação do (a) Requerente), que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE, com data de entrada neste órgão em 14/12/2017, cujo título denomina-se “**PROCESSO DE SÍNTESE E APLICAÇÃO DO COMPLEXO BIPYRIDIMICO DE RUTENIO COM EPIISOPLOTURINA CONTRA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS**”, do qual a solicitante participa como inventor (a), e que está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (IN 031/13 e LPI 9.279/96 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 14/12/2017.

Prof.ª ~~Dr.~~ Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI



Jefferson Rocha <jeffersonbiotec@gmail.com>

[CP] Agradecimento pela Submissão

1 mensagem

Ricardo Carvalho Rodrigues <cadernosdeprospeccao@gmail.com>

2 de dezembro de 2017 19:17

Para: Prof Rocha <jeffersonbiotec@gmail.com>

Prof Rocha,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DE COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTÊNIO E EPIISOPILOTURINA CONTRA A ESQUISTOSSOMOSE" para Cadernos de Prospecção. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<https://portalseer.ufba.br/index.php/nit/author/submission/24957>

Login: rochaja

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Ricardo Carvalho Rodrigues

Cadernos de Prospecção



Jefferson Rocha <jeffersonbiotec@gmail.com>

The Journal of Physical Chemistry - Manuscript ID jp-2018-00402m

The Journal of Physical Chemistry

12 de janeiro de 2018

<onbehalfof+support+services.acs.org@manuscriptcentral.com>

19:41

Responder a: support@services.acs.org

Para: jeffersonbiotec@gmail.com

Cc: eic@jpc.acs.org

12-Jan-2018

Your manuscript has been successfully submitted to The Journal of Physical Chemistry.

Part: Part A: Isolated Molecules, Clusters, Radicals, and Ions; Environmental Chemistry, Geochemistry, and Astrochemistry; Theory

Section: A: Molecular Structure, Quantum Chemistry, and General Theory

Please note that the final decision on journal Part and Section remains with the journal Editors.

Title: "Computational quantum chemistry, molecular docking and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties"

Authors: Rocha, Jefferson; Rego, Nayra; Sousa, Jose; Silva, Francisco; Ramos, Ricardo; Passos, Ionara; Moraes, Josué de; Leite, Jose; Lima, Francisco

Manuscript ID: jp-2018-00402m.

Dear Dr. Rocha:

Please reference the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your contact information, please log in to ACS Paragon Plus with your ACS ID at <http://paragonplus.acs.org/login> and select "Edit Your Profile" to update that information.

You can view the status of your manuscript by checking your "Authoring Activity" tab on ACS Paragon Plus after logging in to <http://paragonplus.acs.org/login>.

Thank you for submitting your manuscript to The Journal of Physical Chemistry.

Sincerely,

The Journal of Physical Chemistry Editorial Office

PLEASE NOTE: This email message, including any attachments, contains confidential information related to peer review and is intended solely for the personal use of the recipient(s) named above. No part of this communication or any related attachments may be shared with or disclosed to any third party or organization without the explicit prior written consent of the journal Editor and ACS. If the reader of this message is not the intended recipient or is not responsible for delivering it to the intended recipient, you have received this communication in error. Please notify the sender immediately by e-mail, and delete the original message. Thank you.