

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE FRAGMENTOS  
MOLECULARES COMO INIBIDORES DA ENZIMA  
CRUZAÍNA**

**Karen Cristina Rangel\***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química para a obtenção do título de Mestre em Química com área de concentração em Química Orgânica

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari**  
**\*Bolsista CNPq**

**São Carlos-SP**  
**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R196pa Rangel, Karen Cristina.  
Planejamento e avaliação de fragmentos moleculares  
como inibidores da enzima cruzaina / Karen Cristina Rangel.  
-- São Carlos : UFSCar, 2015.  
96 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2015.

1. Química orgânica. 2. Química medicinal. 3. Chagas,  
Doença de. 4. Cruzaina. 5. Fragmentos. 6. Inibidores. I.  
Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Karen Cristina Rangel, realizada em 24/08/2015:

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari  
USP

---

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza  
UFSCar

---

Prof. Dr. Andre Luiz Meleiro Porto  
IQSC/USP

## DEDICATÓRIA

À minha família, meu amor e aos amigos que me apoiaram durante esta etapa da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, meus pais, Márcio Aparecido Rangel e Marlene Inácio da Silva, meu irmão, Juan Felipe da Silva Rangel, por seu incentivo e apoio.

Ao meu namorado, Aurélio Daniel Moura, por sua compreensão e companheirismo durante esta etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Carlos Alberto Montanari, pela oportunidade e confiança para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Grupo de Química Medicinal do IQSC / USP (Nequimed), Cristian, Erika, Josmar, Jean, Nádia, Igor, Geraldo, William, Daniel, Fabiana e Peter Kenny pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pela companhia durante estes anos.

Aos amigos que fiz aqui em São Carlos no Instituto de Química de São Carlos (IQSC) e na UFSCar, por sua amizade e pelos momentos de descontração.

Ao IQSC e a Universidade de São Paulo (USP) pela autorização para o desenvolvimento do trabalho em suas dependências.

A CNPq pela bolsa de auxílio concedida e a FAPESP (projetos temático 13/18009-4) pelo apoio financeiro na compra de materiais, reagentes e equipamentos utilizados no laboratório.

## EPÍGRAFE

“Nada é impossível. Se puder ser sonhado, então pode ser feito.”

Theodore Roosevelt

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

Å	Angstrom
ADMET	Administração, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>Asn</i>	Asparagina
<i>Asp</i>	Aspartato
CAQI	Central de Análises Químicas Instrumentais de São Carlos
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
clogP	Coeficiente de partição octanol/água
C25S	Cruzaína mutante
Cys	Cisteína
DAD	Arranjo de diodos
DCM	Diclorometano
<i>DCC</i>	Diciclo-hexilcarbodiimida
<i>DCU</i>	<i>N,N</i> -diciclo-hexiluréia
<i>DDT</i>	Ditiotreitol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
$\text{DMSO-d}_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>EDC</i>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
[EI]	Complexo enzima-inibidor
$\text{Et}_3\text{N}$	Trietilamina
[ES]	Complexo enzima-substrato
<i>FBDD</i>	Planejamento de fármacos baseado em fragmentos
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>Gln</i>	Glutamina

<i>Glu</i>	Glutamato
<i>Gly</i>	Glicina
<i>HAC</i>	Número de átomos pesados
<i>HBA</i>	Aceptores de ligação de hidrogênio
<i>HBD</i>	Doadores de ligação de hidrogênio
<i>His</i>	Histidina
<i>HoBt</i>	Hidroxi-benzotriazol
<i>HPLC</i>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>HTS</i>	Ensaio de triagem em larga escala
Hz	Hertz
<i>IC<sub>50</sub></i>	Concentração inibitória 50%
<i>IUPAC</i>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
I%	Percentual de inibição
<i>k<sub>cat</sub></i>	Constante catalítica
kDa	Quilodaltons
<i>K<sub>d</sub></i>	Constante de dissociação
<i>K<sub>i</sub></i>	Constante de inibição
<i>K<sub>m</sub></i>	Constante de Michaelis-Menten
<i>k<sub>1</sub></i>	Constante de velocidade formação do complexo ES
<i>k<sub>-1</sub></i>	Constante de velocidade dissociação do complexo ES
<i>k<sub>2</sub></i>	Constante de velocidade de formação do produto
<i>LE</i>	Eficiência do ligante
<i>Leu</i>	Leucina
<i>LLE</i>	Eficiência ligante-lipofilidade
LB	<i>Luria Broth</i>
[M+H]	Íon molecular protonado
[M+Na]	Aduto de sódio
mL	Mililitros
mM	Milimolar

<i>Met</i>	Metionina
<i>MOB</i>	Modo de ligação
<i>MW</i>	Massa molecular
NEQUIMED	Grupo de Química Medicinal do IQSC / USP
Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilotriacético
<i>NCE</i>	Nova entidade química
nm	Nanomolar
OD <sub>600</sub>	Densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>PMSF</i>	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
ppm	Partes por milhão
R	Constante universal dos gases
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>ROS</i>	Espécies reativas de oxigênio
[S]	Concentração de substrato
<i>SAR</i>	Relação estrutura-atividade
<i>SD</i>	Desvio padrão
<i>Ser</i>	Serina
t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético
UV	Ultravioleta
V <sub>0</sub>	Velocidade inicial
V <sub>máx</sub>	Velocidade máxima
<i>W.T.</i>	<i>Wild Type</i>
ZFRMCA	<i>N</i> -benzóxicarbonil-L-fenilalanila-L-arginina-7-amido-metil-cumarina
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ΔG	Energia livre de ligação
δ	Deslocamento químico

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1- Composição do meio de auto-indução. ....	41
TABELA 3.2- Composição do tampão de lise. ....	42
TABELA 4.1- Resultados da constante de inibição ( $K_i$ ).....	67
TABELA 4.2- Valores de $K_i$ , $pK_i$ e $LE$ dos compostos <i>orto</i> -substituídos.....	68
TABELA 4.3- Valores de $K_i$ , $pK_i$ e $LE$ dos compostos <i>meta</i> -substituídos.....	70
TABELA 4.4- Valores de $K_i$ , $pK_i$ e $LE$ dos compostos <i>para</i> -substituídos.....	72
TABELA 4.5- Valores de $K_i$ , $pK_i$ e $LE$ dos compostos di-substituídos. ....	75
TABELA 4.6- Valores de $K_i$ , $pK_i$ e $LE$ dos compostos sem substituição no anel aromático.....	77

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Distribuição global de indivíduos infectados com o <i>T. cruzi</i> .....	3
FIGURA 1.2- Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> : a) amastigota; b) epimastigota e c) tripomastigota.....	4
FIGURA 1.3- Ciclo de vida do <i>Trypanosoma Cruzi</i> .....	6
FIGURA 1.4- Estruturas dos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: (A) nifurtimox e (B) benzonidazol.....	8
FIGURA 1.5 – Etapas do processo de descoberta (fase pré-clínica) e desenvolvimento (fase clínica) de novos fármacos.....	11
FIGURA 1.6- Reação de hidrólise de uma ligação peptídica.....	12
FIGURA 1.7- Estrutura cristalográfica da cruzaina, co-cristalizada com a benzoilarginina-alanina-fluorometilcetona, enovelada em dois domínios distintos: domínio L (vermelho) e domínio R (verde), entre esses domínios está a fenda do sítio ativo (amarelo).....	13
FIGURA 1.8- Representação esquemática dos subsítios das cisteíno-proteases, sendo que quatro subsítios estão localizados no lado amino (S4, S3, S2, S1) e três no lado acil (S1', S2', S3') da enzima.....	14
FIGURA 1.9- Estrutura do sítio ativo da cruzaina em complexo com o K777, onde estão representados os subsítios utilizados no planejamento de inibidores de cisteíno-proteases (S3, S2, S1 e S1').....	15
FIGURA 1.10- Mecanismo catalítico das cisteíno-proteases similares à papaína.....	16
FIGURA 1.11- <i>Warheads</i> covalentes irreversíveis.....	17
FIGURA 1.12- Mecanismo de inibição de cisteíno-proteases por vinilsulfonas.....	17
FIGURA 1.13- Estrutura da dipeptidilvinilsulfona K777.....	18
FIGURA 1.14- <i>Warheads</i> covalentes reversíveis.....	18
FIGURA 1.15- Mecanismo de inibição de cisteíno-proteases por nitrilas.....	18
FIGURA 1.16- Estratégias utilizadas na otimização do fragmento.....	21
FIGURA 1.17- Evolução do fragmento 6-propil isocitosina ao potente inibidor não peptídico BACE-1.....	22
FIGURA 1.18- Ciclo planejar- sintetizar e/ou adquirir-testar-analisar.....	23
FIGURA 1.19- Estruturas dos inibidores de cruzaina similares a fragmentos: Neq0147, Neq0205 e Neq0221.....	24
FIGURA 1.20- Estrutura cristalográfica do Neq0147 (PDB: 4KNO).....	25

FIGURA 3.1- Estrutura do Neq0147.....	32
FIGURA 3.2- Estruturas dos compostos comercialmente disponíveis adquiridos.....	33
FIGURA 3.3- Estruturas do Neq0617 e Neq0616. ....	34
FIGURA 3.4- Rota sintética utilizada para síntese do composto Neq0617 e Neq0616..	35
FIGURA 3.5- Sequência proteica codificada pelo gene da pró-cruzaína. Os resíduos da cauda de histidina e o pródomínio N-terminal estão numerados de -112 até -1 e o domínio catalítico de 1 a 215.....	40
FIGURA 3.6- Análise em gel de eletroforese para acompanhar a ativação da cruzaína a partir da auto-proteólise do pró-domínio N-terminal. ....	44
FIGURA 3.7- Curva de progresso da formação do produto durante uma reação enzimática, onde a porção linear corresponde a $V_0$ . ....	45
FIGURA 3.8- Gráfico de Michaelis-Menten ( $V_0 \times [S]$ ). ....	46
FIGURA 3.9- Gráfico duplo-recíproco ( $1/V_0 \times 1/[S]$ ). ....	47
FIGURA 3.10- Gráfico duplo-recíproco obtido com inibidor competitivo. ....	49
FIGURA 3.11- Estrutura do substrato ZFRMCA.....	50
FIGURA 4.1- Síntese de 1,3,4-oxadiazol via diacil-hidrazida. ....	54
FIGURA 4.2- Síntese de acil-hidrazida via: A) hidrazinólise direta de metil ésteres; B) acoplamento com hidrazina Boc-protégida seguido por desproteção com TFA.....	55
FIGURA 4.3- Reação de acoplamento para formação de ligação amida. ....	55
FIGURA 4.4- Estruturas do <i>DCC</i> , <i>EDC</i> e <i>HoBt</i> . ....	56
FIGURA 4.5- Mecanismo da reação de acoplamento com carbodiimida. ....	57
FIGURA 4.6- Mecanismo da ciclodesidratação com <i>p</i> -TsCl e $Et_3N$ . ....	58
FIGURA 4.7- Espectro de RMN $^1H$ (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto 1.....	59
FIGURA 4.8- Espectro de RMN $^1H$ (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto 2.....	60
FIGURA 4.9- Espectro de RMN $^1H$ (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto 3.....	60
FIGURA 4.10 – Espectro de RMN $^1H$ (500 MHz, $CDCl_3$ ) do Neq0617.....	61
FIGURA 4.11- Espectro de RMN $^{13}C$ (125 MHz, $CDCl_3$ ) do Neq0617. ....	62
FIGURA 4.12- Espectro de massas de alta resolução do Neq0617 (ESI/QqTOF-MS).....	63
FIGURA 4.13- Espectro de RMN $^1H$ (500 MHz, $CDCl_3$ ) do Neq0616.....	64
FIGURA 4.14- Espectro de RMN $^{13}C$ (125 MHz, $CDCl_3$ ) do Neq0616. ....	65
FIGURA 4.15- Espectro de massas de baixa resolução do Neq0616 (ESI/QqTOF-MS).....	66

FIGURA 4.16- Ilustração mostrando que os dois nitrogênios do 1,3,4-oxadiazol são melhores aceitadores de ligação de hidrogênio (maiores valores negativos de $V_{\min}$ ) ....	69
FIGURA 4.17- Docagem do composto Neq0600 com a cruzaina .....	70
FIGURA 4.18- Tautomerização do anel triazol.....	71
FIGURA 4.19- Estruturas, $K_i$ e $pK_i$ dos compostos Neq0616 e Neq0617.....	72
FIGURA 4.20- Estruturas, $K_i$ e $pK_i$ dos compostos Neq0602 e Neq0561.....	73
FIGURA 4.21- Sobreposição do mapa de superfície com a estrutura cristalográfica do Neq0147.....	73
FIGURA 4.22- Docagem do Neq0599 com a cruzaina. ....	74
FIGURA 4.23- Docagem do Neq0556 (azul) e Neq0557 (vermelho) com a cruzaina ....	76
FIGURA 4.24- Docagem do Neq0601 com a cruzaina. ....	78

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1- Atribuição das sinais de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância Neq0617.....	62
ESQUEMA 4.2- Atribuição das sinais de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância Neq0616.....	65

## RESUMO

PLANEJAMENTO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE FRAGMENTOS MOLECULARES COMO INIBIDORES DA ENZIMA CRUZAÍNA - Os fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas não são eficazes, portanto é necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. A cruzaina é a principal cisteíno-protease do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença, e é um alvo terapêutico validado para a descoberta de novos agentes tripanossomicidas. Nosso grupo identificou um inibidor de cruzaina com características de fragmento, o ácido [5- (2-clorofenil) -1,3,4-oxadiazol-2-il] acético (Neq0147), e seu modo de ligação foi validado ortogonalmente através da determinação de sua estrutura cristalográfica. No entanto, as interações deste inibidor ainda não estavam otimizadas de maneira adequada. Então este trabalho teve como objetivo a otimização das interações do Neq0147 para identificação de novos fragmentos como inibidores não peptídicos da cruzaina, que foi realizado através de um estudo de relação estrutura-atividade (SAR). Modificações moleculares foram feitas baseadas no Neq0147, sendo que inicialmente o carboxilato foi substituído por uma nitrila para aumentar a afinidade do inibidor e atuar como âncora para explorar outras modificações. Em seguida, foi feita a substituição do anel 1,3,4-oxadiazol por outros anéis heterocíclicos de cinco membros, com a intenção de explorar interações com o Asp161 e a Gly65. A posição do átomo de cloro no anel aromático também foi variada para explorar interações com aminoácidos presentes no subsítio S2. Os compostos foram testados contra a cruzaina para a determinação da sua constante de inibição ( $K_i$ ). A partir do estudo de SAR, pode-se concluir que a modificação que gerou maior ganho de afinidade foi à substituição do grupo carboxilato pela nitrila. Também pode-se observar que a presença do átomo de cloro é essencial para a atividade dos fragmentos, sendo que preferencialmente deve estar presente nas posições *orto* ou *para*. Entre os inibidores avaliados um fragmento, Neq0617, teve uma afinidade 14 vezes maior do que a do fragmento inicial. Além disso, vários inibidores similares a fragmentos com alta afinidade e eficiência de interação foram identificados, portanto estes inibidores são potenciais candidatos para otimização.

## ABSTRACT

MOLECULAR DESIGN AND EVALUATION OF MOLECULAR FRAGMENTS-LIKE CRUZAIN INHIBITORS. The available drugs for treating Chagas disease are not effective, therefore the development of new therapies is needed. Cruzain is the major *Trypanosoma cruzi* cysteine protease, the causative agent of the disease, and is a validated therapeutic target for the discovery of new trypanocidal agents. Our group has identified a cruzain inhibitor with fragment characteristics - [5- (2-chlorophenyl) -1,3,4-oxadiazol-2-yl] acetic acid (Neq0147) and its mode of interaction was validated by determining orthogonally its crystal structure. However, interactions of this inhibitor were not yet appropriately optimized. Therefore, this study aimed to optimize the interactions of Neq0147 to identify new fragments as non-peptide cruzain inhibitors, which was carried out through a structure-activity relationship study (SAR). Molecular modifications have been made based on Neq0147, wherein initially carboxylate was replaced by a nitrile to increase the affinity of the inhibitor and to act as an anchor to explore other modifications. Then it was made the replacement of the 1,3,4-oxadiazole ring for others heterocyclic five-membered rings, with the intention to explore interactions with Asp161 and Gly65. The position of the chlorine atom on the aromatic ring was also varied to explore interactions with amino acids in the S2 subsite. The compounds were tested against cruzain to determine its inhibition constant. From the SAR study it can be concluded that the change that generated higher affinity gain was the replacement of the carboxylate group by nitrile. It can also be seen that the presence of chlorine is essential for the fragments activity, which preferably should be present in the *ortho* or *para* positions. Among the evaluated inhibitors one fragment, Neq0617, has an affinity 14 times greater than the original fragment. Moreover, various inhibitors similar to fragments with high affinity and interaction efficiency have been identified, therefore these inhibitors are potential candidates for optimization.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1- DOENÇA DE CHAGAS .....	2
<b>1.1.1- Epidemiologia</b> .....	3
<b>1.1.2- Agente etiológico</b> .....	4
<b>1.1.3- Vetor</b> .....	4
<b>1.1.4- Transmissão</b> .....	5
<b>1.1.5- Ciclo</b> .....	5
<b>1.1.6- Fases clínicas</b> .....	6
<b>1.1.7- Tratamento</b> .....	7
1.2- A QUÍMICA MEDICINAL E O PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS .....	9
1.3- CRUZAÍNA: ALVO TERAPÊUTICO DA DOENÇA DE CHAGAS .....	12
<b>1.3.1- Inibidores</b> .....	16
1.4- PLAJENAMENTO DE FÁRMACOS BASEADO EM FRAGMENTOS .....	19
1.5- PLANEJAMENTO BASEADO EM HIPÓTESES .....	22
1.6- PRECEDENTES DE PESQUISA .....	23
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	27
2.1- OBJETIVO GERAL .....	28
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	29
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1- MATERIAIS .....	30
<b>3.1.1- Síntese</b> .....	30
<b>3.1.2- Expressão da cruzaina e ensaios cinéticos</b> .....	31
3.2- MÉTODOS .....	32
<b>3.2.1- Planejamento</b> .....	32
<b>3.2.2- Síntese do Neq0617 e Neq0616</b> .....	34
3.2.2.1- Procedimento para a síntese do Neq0617 .....	35
3.2.2.2- Procedimento para a síntese do Neq0616 .....	37

<b>3.2.3- Expressão e purificação da cruzaina <i>Wild Type (W.T.)</i></b> .....	39
3.2.3.1- Transformação da <i>Escherichia coli</i> para expressão da proteína.....	40
3.2.3.2- Pré-inóculo .....	40
3.2.3.3- Inóculo e auto-indução .....	41
3.2.3.4- Lise das células.....	42
3.2.3.5- Purificação em Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado (IMAC).....	42
3.2.3.6- Ativação e estocagem .....	43
<b>3.2.4- Ensaio cinéticos para determinação do <math>K_i</math></b> .....	44
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	53
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
4.1- SÍNTESE .....	54
<b>4.1.1- Caracterização do composto Neq0617</b> .....	58
<b>4.1.2- Caracterização do composto Neq0616</b> .....	63
4.2- ENSAIOS CINÉTICOS .....	66
4.3- AVALIAÇÃO DA SAR.....	68
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	79
<b>5- CONCLUSÃO</b> .....	80
REFERÊNCIAS .....	82
APÊNDICE .....	87

# **CAPÍTULO 1**

## **Introdução**

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1- DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana ou esquizotripanose, tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* e é transmitida aos seres humanos, principalmente, pelas fezes de triatomíneos conhecidos como "barbeiros".<sup>1</sup>

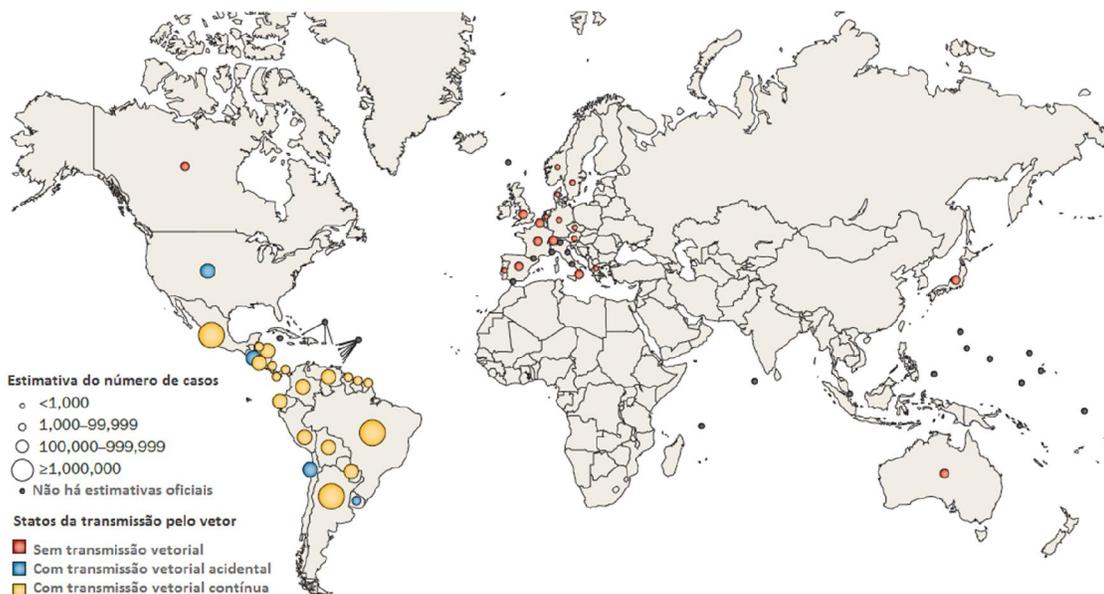
O protozoário e a doença foram descobertos e descritos, em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas, que nomeou o parasita em homenagem a seu mentor Oswaldo Cruz.<sup>2</sup> A doença de Chagas está presente nas Américas como uma doença enzoótica, doença de animais selvagens, há milhões de anos.<sup>3</sup> O incremento das atividades agrícolas e a domesticação de animais, 10.000 anos atrás, provocou a infecção em humanos sendo que há milhares de anos a doença era principalmente uma antropozoonose.<sup>3</sup> Nos últimos 200-300 anos com o desmatamento progressivo para a agricultura, pecuária, e a abertura de vias de transporte terrestres os triatomíneos perderam sua principal fonte de alimento, os animais selvagens, e se adaptaram a áreas circundantes as habitações humanas e as próprias habitações passando a alimentar-se de animais domésticos e humanos.<sup>3</sup> Deste modo foi estabelecido um novo ciclo de infecção e a doença de Chagas tornou-se uma zoonose, uma doença transmitida entre animais e humanos endemicamente.<sup>3</sup>

Até o final do século XX, a doença de Chagas tornou-se amplamente reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e outras autoridades de saúde pública como uma doença tropical negligenciada, pois atinge principalmente as populações de baixa renda e é uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento tropicais. Além, de ter sido historicamente sub-representada na alocação de recursos de promoção a saúde a partir de pesquisas.<sup>4</sup>

### 1.1.1- Epidemiologia

A OMS estima que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas com a doença ao redor do mundo, principalmente na América latina onde a doença é endêmica em 21 países.<sup>1</sup> Apesar da doença de Chagas ocorrer principalmente na América Latina nas últimas décadas tem sido cada vez mais frequentemente detectada nos Estados Unidos, Canadá, países da Europa Ocidental e em alguns países do Pacífico (FIGURA 1.1).<sup>1,5</sup> Isto tem ocorrido principalmente devido à mobilidade entre a população da América Latina de países endêmicos e o restante do mundo.<sup>1</sup> No Brasil, estimativas indicam que cerca de 2 a 3 milhões de pessoas estão infectadas e que ocorrem cerca de 6000 mortes por ano.<sup>6</sup>

**FIGURA 1.1-** Distribuição global de indivíduos infectados com o *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy, *Nature Reviews Cardiology*, **9**: 576, 2012.

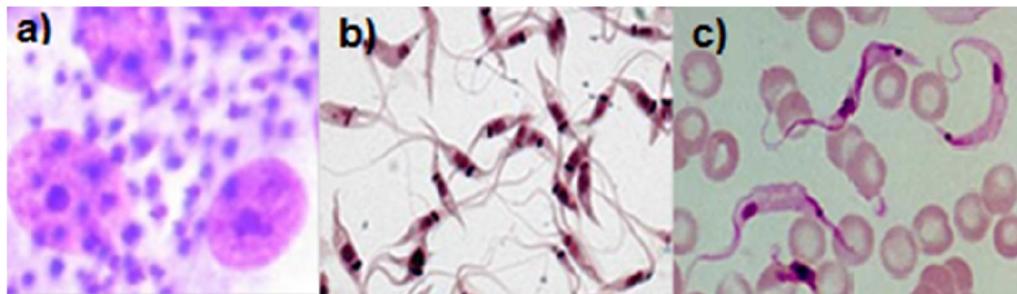
Nos últimos anos, os programas de controle de vetores e a triagem obrigatória nos bancos de sangue têm reduzido substancialmente a incidência de novos casos da doença na América Latina.<sup>7</sup> O número de pessoas infectadas pelo *T. Cruzii* ao redor do mundo foi reduzido em cerca de 50% ou mais nos últimos 25 anos.<sup>4</sup> A doença de Chagas também possui um fator econômico muito importante

devido à mortalidade e morbidade precoce causada por esta doença, que muitas vezes ocorre na população mais produtiva, resultando em uma perda econômica significativa.<sup>3</sup> Complicações cardíacas e digestivas frequentemente levam à necessidade de tratamento a longo prazo e procedimentos cirúrgicos, aumentando ainda mais os custos relacionados com a doença, além da necessidade de aposentadorias precoce.<sup>3</sup> Nos países latino-americanos a doença de Chagas é uma das doenças tropicais negligenciadas mais gera gastos.<sup>1</sup>

### 1.1.2- Agente etiológico

O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo biológico do tipo heteroxênico, no qual o parasito passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado, homem e mamíferos, e extracelular no inseto vetor, hospedeiro invertebrado. Além disso, o parasito apresenta várias formas evolutivas diferentes em seu ciclo (amastigota, epimastigota e tripomastigota; Figura 1.2).<sup>6</sup>

**FIGURA 1.2-** Formas evolutivas do *T. cruzi*: a) amastigota; b) epimastigota e c) tripomastigota.



Fonte: A autoria própria.

### 1.1.3- Vetor

Os insetos, que atuam como vetores, estão presentes na América do Sul e Central, México e sul dos Estados Unidos. Foram identificadas mais de 130 espécies de triatomíneos, mas apenas alguns são vetores competentes para o *T.*

*cruzi*. O *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as três espécies principais de vetores que transmitem o *T. cruzi* aos humanos. O *T. infestans* é o vetor historicamente mais importante e é o principal vetor em regiões endêmicas sub-amazônicas, sul da América do Sul. O *R. prolixus* geralmente é relatado no norte da América do Sul e América Central, e o *T. dimidiata* também é encontrado nestas áreas e no norte do México.<sup>9</sup>

#### **1.1.4- Transmissão**

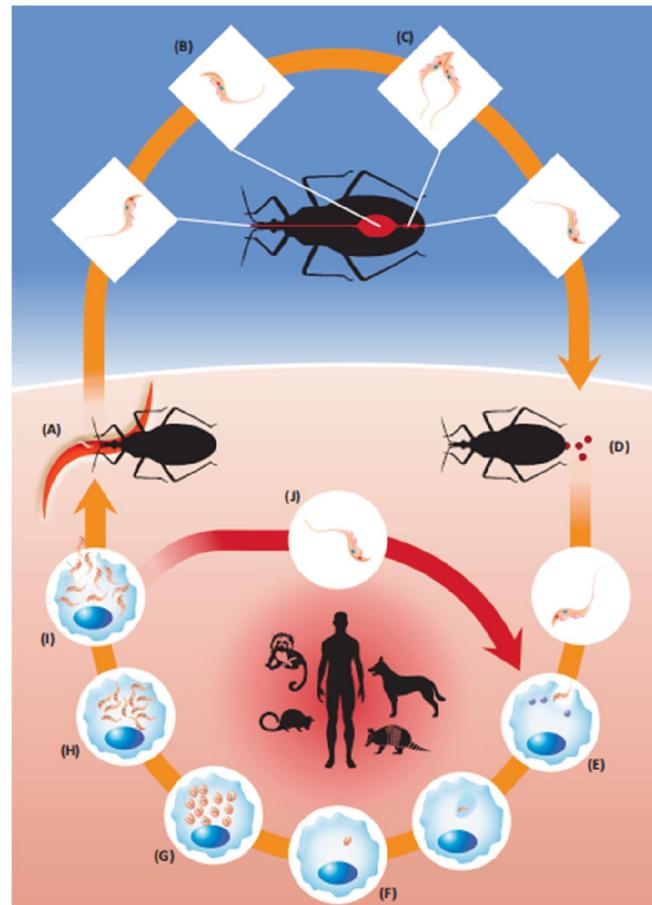
A doença é transmitida ao homem por fezes infectadas de triatomíneos hematofagos através da picada do inseto, em outra ruptura da pele ou através das membranas mucosas, incluindo a conjuntiva e/ou mucosa oral/digestivo, causando surtos com alimentos contaminados. A transmissão também pode ocorrer através de transfusão de sangue, gravidez e parto e, menos freqüentemente, por meio de transplante de órgãos ou acidente de laboratório.<sup>7</sup>

#### **1.1.5- Ciclo**

O ciclo do *T. cruzi* está ilustrado na FIGURA 1.3 e inicia-se com a infecção dos triatomíneos vetores ao ingerir as formas tripomastigotas, presentes na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo (A). No estômago do inseto os tripomastigotas se transformam em formas epimastigotas (B), que se multiplicam por divisão binária simples no intestino médio (C), sendo assim são as formas evolutivas responsáveis pela manutenção da infecção no inseto. No reto os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectantes, sendo eliminados nas fezes ou na urina (D). Os tripomastigotas metacíclicos, eliminados durante ou após o repasto sanguíneo, penetram pelo local da picada e interagem com as células do sistema monócito fagocitário da pele ou mucosas (E), onde os tripomastigotas se transformam em amastigotas (F) que se multiplicam por divisão binária simples (G). Então os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas

(H), que são liberados da célula hospedeira caindo no interstício e atingindo a corrente sanguínea (I), onde irão invadir outras células, de qualquer tecido ou órgão, para passar por novo ciclo celular ou serão destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro.<sup>8,10</sup>

**FIGURA 1.3-** Ciclo de vida do *Trypanosoma Cruzi*.



Fonte: PEREZ, C.J.; LYMBERY, A.J.; ANDREW THOMPSON, R.C. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? Trends in Parasitology, 30 (4):176, 2014.

### 1.1.6- Fases clínicas

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: a aguda e a crônica, que pode ser classificada nas formas indeterminada, cardíaca e digestiva, com diferentes manifestações clínicas.<sup>11</sup> A fase aguda dura por 4 a 8 semanas e a fase crônica persiste por toda a vida do hospedeiro.<sup>9</sup>

A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática, o que ocorre com maior frequência.<sup>8</sup> Inicia-se por manifestações locais provocando o sinal de Romanã, quando o parasita penetra na conjuntiva, e o chagoma de inoculação, quando a penetração ocorre através da pele.<sup>8</sup> Estas lesões aparecem apenas em 50% dos casos, após 4 a 10 dias da picada, e regridem em até 2 meses.<sup>8</sup> Cerca de 10 a 30% dos indivíduos infectados irão apresentar sintomas não específicos incluindo: dor abdominal, anorexia, febre, linfadenopatia, mal-estar, erupção cutânea e inchaço localizado em torno do local da infecção.<sup>4</sup> As manifestações da fase aguda resolvem-se espontaneamente em 90% dos casos, ainda que a infecção não seja tratada com fármacos tripanossidas.<sup>9</sup> A reativação da doença de Chagas pode ocorrer quando o paciente torna-se imunologicamente comprometido, como por exemplo devido à co-infecção com HIV ou a utilização de fármacos imunossupressores.<sup>9</sup>

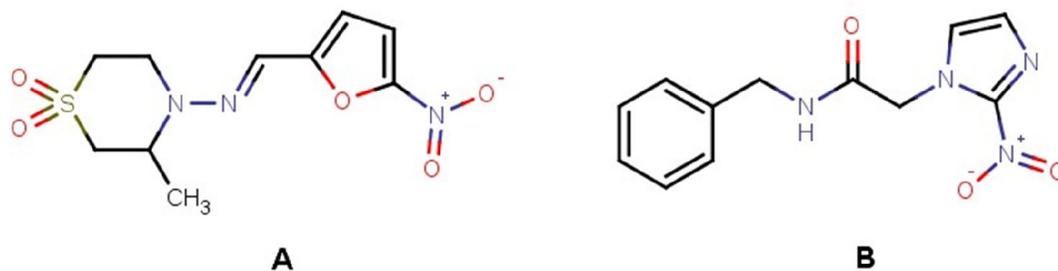
A taxa de mortalidade na fase aguda da doença é de 5 a 10%, usualmente devido à miocardite aguda ou meningoencefalite, sendo que a maioria das mortes ocorre em crianças.<sup>4</sup> Após a fase aguda os indivíduos passam por um longo período assintomático, chamada de forma indeterminada, que se caracteriza por baixa parasitemia.<sup>4</sup> Após permanecerem na fase indeterminada por várias décadas, na qual não há sintomas evidentes clinicamente, aproximadamente 30% desses indivíduos assintomáticos irão apresentar a fase crônica da doença.<sup>4</sup> A sintomatologia observada está relacionada a alterações anatômicas de órgãos dos sistemas: cardiocirculatório (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva), ou em ambos (forma cardiodigestiva ou mista).<sup>8</sup> A dilatação de órgãos desses sistemas levam a essas manifestações clínicas: miocardiopatia dilatada, megaesôfago e megacólon.<sup>8</sup>

### **1.1.7- Tratamento**

Os fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são o nifurtimox (Lampit®) e o benzonidazol (Rochagan®) (FIGURA 1.4). Esses medicamentos foram registrados e utilizados por muito tempo sem um conhecimento claro do seu mecanismo de ação. Nos últimos anos, estudos mostram que a ação

antiparasitária do nifurtimox está associada com a produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) tóxicas, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, resultantes da reação do oxigênio com metabólitos reduzidos do nitrofurano. Enquanto que a citotoxicidade do benzonidazol provavelmente resulta do estresse redutivo, que envolve a modificação covalente de macromoléculas, como o DNA nuclear e mitocondrial do *T. cruzi*, por derivados nitroreduzidos levando a danos letais ao DNA. O nifurtimox e o benzonidazol necessitam ser ativados redutivamente por reações mediadas por flavoproteínas nitrorredutases do tipo I para exercer as suas atividades citotóxicas.<sup>12</sup>

**FIGURA 1.4-** Estruturas dos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: (A) nifurtimox e (B) benzonidazol



Fonte: Autoria própria.

Esses fármacos têm efeitos colaterais indesejáveis, sendo que os mais comumente observados com o nifurtimox incluem: anorexia, náuseas e vômito, causando severa perda de peso, insônia, irritabilidade e, menos frequentemente, polineuropatia periférica. Os efeitos adversos mais comuns do benzonidazol são dermatite alérgica e síndromes gastrointestinais e, menos frequentemente a depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica, agranulocitose, polineuropatia, parestesia e polineurite dos nervos periféricos. Além disso, ambos são genotóxicos devido a sua natureza química e reatividade.<sup>13</sup>

O tratamento tripanossida é recomendado para todos os casos de doença aguda, congênita, infecção reativada, para todas as crianças com a infecção e para pacientes com até 18 anos de idade com doenças crônicas. O tratamento medicamentoso deve ser geralmente oferecido para adultos com idade entre 19 a 50 anos, sem doença cardíaca avançada, e é opcional para aqueles com mais de 50 anos, porque o benefício não foi comprovado nesta população. Por outro lado, é

contraindicado durante a gravidez e em pacientes com severa insuficiência renal ou hepática. As crianças devem ser tratadas com benzonidazol (5-10 mg/ kg por dia), dividido em duas ou três doses, durante 60 dias ou com nifurtimox (15 mg/kg por dia), dividido em três doses, durante 60 a 90 dias. Para os adultos, o tratamento diário utilizado é 5 mg/kg de benzonidazol ou 8-10 mg/kg de nifurtimox com a mesma duração que para as crianças.<sup>9</sup>

O benzonidazol e o nifurtimox são efetivamente curativos em aproximadamente 60% dos casos de infecção aguda e em 10-20% nos casos de doença crônica sintomática.<sup>12</sup> Esses fármacos apresentam custos elevados, tem problemas de resistência, exigem tratamentos prolongados e são mal tolerados pelos pacientes devidos aos severos efeitos colaterais dificultando a adesão do paciente ao tratamento, portanto é necessário o desenvolvimento de novos fármacos tripanossidas.<sup>10</sup>

Para um composto se tornar um candidato a fármaco promissor para o tratamento da doença de Chagas deve apresentar atividade contra os estágios do parasito relevantes em humanos (amastigota intracelular e tripomastigota) e contra as diferentes cepas do *T. cruzi*, para que tenha aplicabilidade em diferentes regiões endêmicas. Além disso, deve possuir baixa toxicidade, genotoxicidade e teratogenicidade, devido sua utilização por pessoas jovens bem como baixo risco de cardiotoxicidade, pois o coração é o primeiro órgão afetado. Também é desejável que tenha baixo risco de interação com as enzimas hepáticas do sistema citocromo P450, para evitar interações medicamentosas e precisa ser administrado via oral, ou seja, biodisponibilidade é uma importante característica. Por último, o composto deve possuir baixo custo para assegurar-se que este poderá estar disponível nas áreas onde é mais necessário.<sup>14</sup>

## 1.2- A QUÍMICA MEDICINAL E O PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

A química medicinal, segundo definição da *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, é uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos

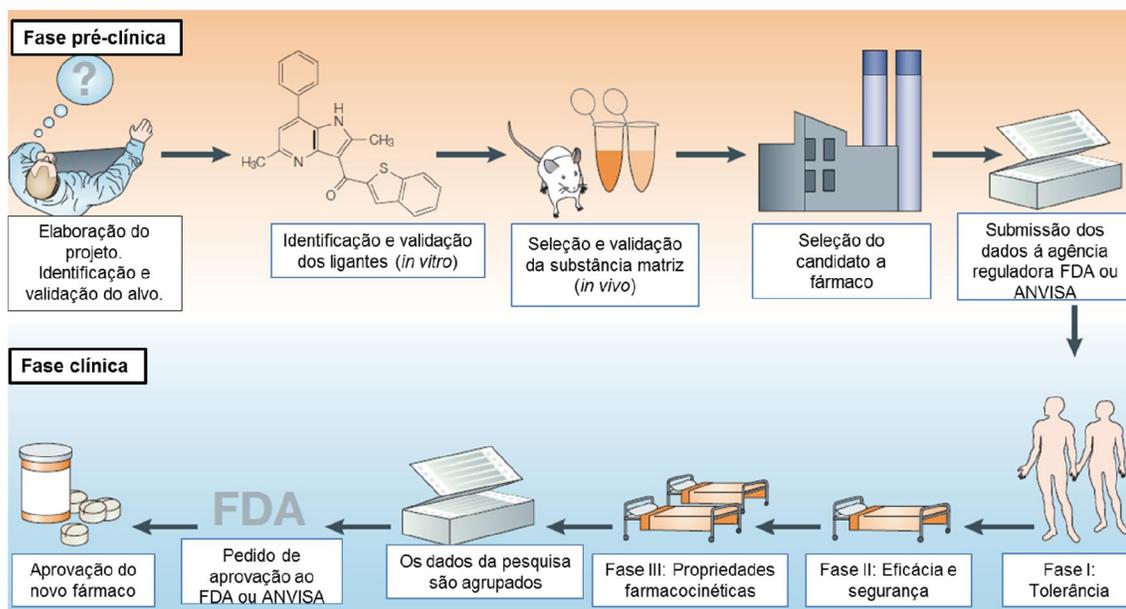
biologicamente ativos, o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica.<sup>15</sup> Desta forma a química medicinal caracteriza-se por seu relevante caráter multidisciplinar abrangendo diversas especialidades, tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia molecular e estrutural, entre outras.<sup>16</sup> O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (FIGURA 1.5) é dividido em duas fases principais: fase pré-clínica (descoberta) e fase clínica (desenvolvimento).<sup>16</sup>

A fase pré-clínica inicia-se com a identificação de uma necessidade terapêutica e uma avaliação sobre os tratamentos já existentes. Em seguida, deve-se selecionar e validar um potencial alvo terapêutico. Subsequentemente é realizada a identificação de substâncias biologicamente ativas *in vitro*, com especificidade para o alvo de estudo, chamados de ligantes (do inglês, *hits*). Uma vez que um ligante é descoberto, a sua atividade deve ser confirmada e validada através da preparação de análogos do ligante, que devem exibir clara relação estrutura-atividade (*SAR*, do inglês *structure activity-relationship*). Depois é selecionado um composto relacionado com atividade em ensaios *in vivo* em modelos animais, chamada de substância matriz (do inglês, *lead compound*), e esta por sua vez precisa ser validada através da síntese de análogos estruturais para maximizar sua atividade e proporcionar propriedades farmacocinéticas adequadas. Finalmente deve-se selecionar um composto como um candidato a fármaco, que será submetido a testes toxicológicos em modelos animais e se esse composto passar por esses testes os dados da pesquisa acumulados são apresentados a uma agência reguladora, *Food and Drug Administration (FDA)*, nos Estados Unidos, e Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil. Após a autorização o candidato a fármaco passa a ser denominado de nova entidade química (*NCE*, do inglês *new chemical entities*) e é sintetizado em larga escala, para a realização dos estudos da fase clínica.<sup>17,18</sup>

Na fase clínica há avaliação sequencial de tolerância em voluntários humanos saudáveis (Fase I), da eficácia e segurança em pacientes (Fase II), seguido por ensaios generalizados, em milhares de pacientes apropriados, para o desenvolvimento de uma ampla base de dados de eficácia e segurança para avaliação das propriedades farmacocinéticas (ADMET, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) (Fase III). Para os poucos candidatos a fármaco (4-7%) que sobrevivem a esta série de ensaios os dados da pesquisa são

agrupados e enviados para pedido de aprovação, para revisão aprofundada pelos especialistas da agência reguladora. Somente com a aprovação o novo fármaco pode ser utilizado pelos pacientes para tratar a doença para a qual foi projetado. Depois de autorizada a comercialização o fármaco passa pela fase IV, que é a fase de farmacovigilância.<sup>17,18</sup>

**FIGURA 1.5** – Etapas do processo de descoberta (fase pré-clínica) e desenvolvimento (fase clínica) de novos fármacos.



Fonte: Adaptado de LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3 (10): 853, 2004.

O químico, especialista em química medicinal, atua nas etapas iniciais da fase de descoberta e desenvolvimento do candidato a fármaco, podendo participar da seleção do alvo terapêutico e no planejamento molecular de ligantes para o alvo. Também pode atuar na preparação, purificação e caracterização das *NCE*. Além de decidir a respeito de quais compostos análogos estruturais devem ser sintetizados para explorar a *SAR* do ligante. Também é de responsabilidade do químico estar presente na otimização da substância matriz, para adquirir propriedades farmacocinéticas adequadas para ter atividade *in vivo* em modelos animais.<sup>17,19</sup>

### 1.3- CRUZAÍNA: ALVO TERAPÊUTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

As proteases são enzimas que catalisam a degradação de proteínas por hidrólise das ligações peptídicas (FIGURA 1.6).<sup>20</sup> As cisteíno-proteases são divididas em 21 famílias (C1-C21) com base em suas sequências ou estruturas terciárias.<sup>21</sup> A maioria das enzimas atualmente conhecidas pertence à superfamília papaína (C1): proteases de protozoários, proteases das plantas, e as catepsinas lisossomais.<sup>21</sup> As famílias C1, C2 e C10 podem ser descritas como similares a papaína e formam o clã A.<sup>21</sup> As cisteíno-proteases de parasitas assim como as de mamíferos que pertencem a este clã são alvos terapêuticos promissores para infecções parasitárias e doenças humanas.<sup>22</sup>

**FIGURA 1.6-** Reação de hidrólise de uma ligação peptídica.

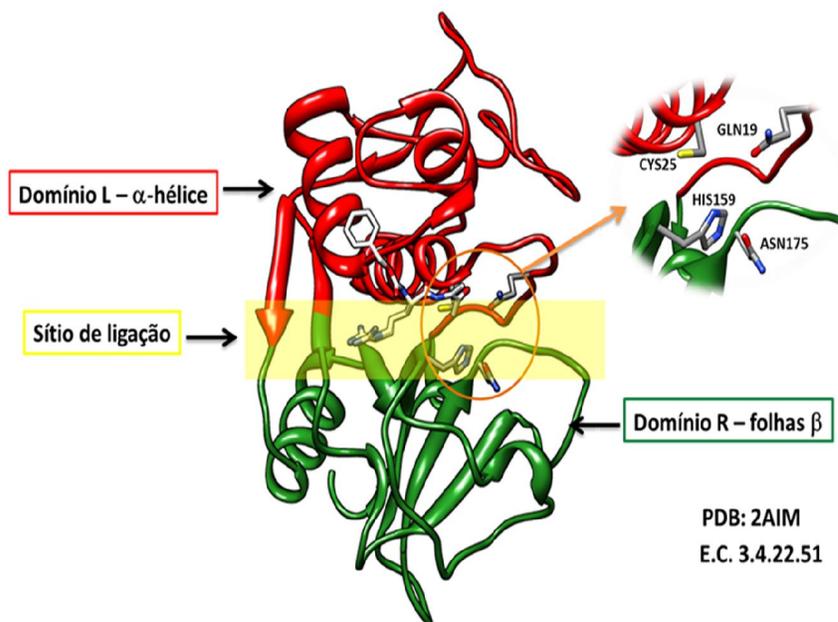


Fonte: Autoria própria.

A cruzaina é a principal cisteíno-protease do *T. cruzi* e tem sido identificada como uma enzima essencial em todas as fases do ciclo de vida do parasita.<sup>23</sup> A cruzaina é responsável pela maior parte da atividade proteolítica do parasita.<sup>24</sup> Acredita-se que a cruzaina desempenhe um papel importante na diferenciação, invasão celular, multiplicação intracelular e evasão do sistema imune do parasito, ou seja, está envolvida na patologia da doença de Chagas.<sup>23</sup> Foi demonstrado que a infecção pelo *T. cruzi* pode ser curada em modelos celulares e em modelos *in vivo*, em camundongos e cães, pelo tratamento com inibidores irreversíveis da cruzaina, portanto a cruzaina é um alvo terapêutico validado para o desenvolvimento de fármacos tripanossidas.<sup>24</sup> A localização do parasita proporciona a inibição preferencial da cruzaina em relação às altamente homologas cisteíno-proteases humanas, as catepsinas (B, L, K, S, F e V), pois o parasita está localizado no citoplasma da célula hospedeira e as catepsinas estão presentes nos lisossomos que são menos acessíveis.<sup>24</sup>

O número de classificação da cruzaina, segundo a *Enzyme Commission*, é EC 3.4.22.51, onde os números 3, 4 e 22 correspondem respectivamente, à classe de hidrolases, à sua atuação em ligação peptídica e ao grupo de cisteíno endopeptidases, enquanto que 51 é o número específico da cruzaina. A cruzaina consiste de uma cadeia polipeptídica de 215 resíduos de aminoácidos enovelados em dois domínios distintos (FIGURA 1.7), sendo que um domínio é principalmente helicoidal (domínio L) e o outro é composto por folhas  $\beta$  antiparalelas (domínio R). Entre esses dois domínios há a fenda do sítio ativo, onde está localizada a tríade catalítica (Cys25, His159 e Asn175).<sup>24,26</sup>

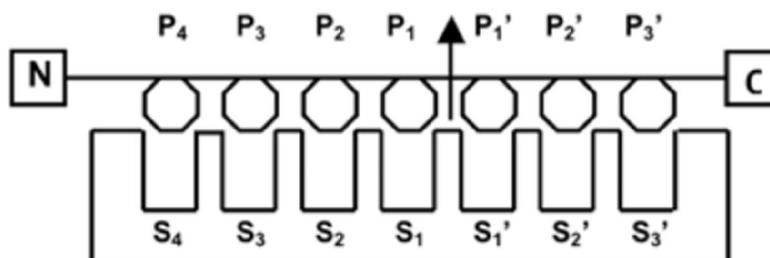
**FIGURA 1.7-** Estrutura cristalográfica da cruzaina, co-cristalizada com a benzoilarginina-alanina-fluorometilcetona, enovelada em dois domínios distintos: domínio L (vermelho) e domínio R (verde), entre esses domínios está a fenda do sítio ativo (amarelo).



Fonte: Protein Data Bank (PDB: 2AIM).

A região do sítio ativo das cisteíno-proteases da superfamília da papaína possui sete subsítios de ligação ao substrato, quatro no lado amino (S4, S3, S2, S1) e três no lado acil (S1', S2', S3') (FIGURA 1.8).<sup>18,20</sup> A nomenclatura usada para descrever as interações entre o substrato e a enzima, de acordo com Schechter & Berger, nomeia os resíduos do substratos de  $\text{NH}_3\text{-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'...COO}^-$  e os subsítios correspondentes na enzima são S4-S3-S2-S1-S1'-S2'-S3'-S4'.<sup>27</sup>

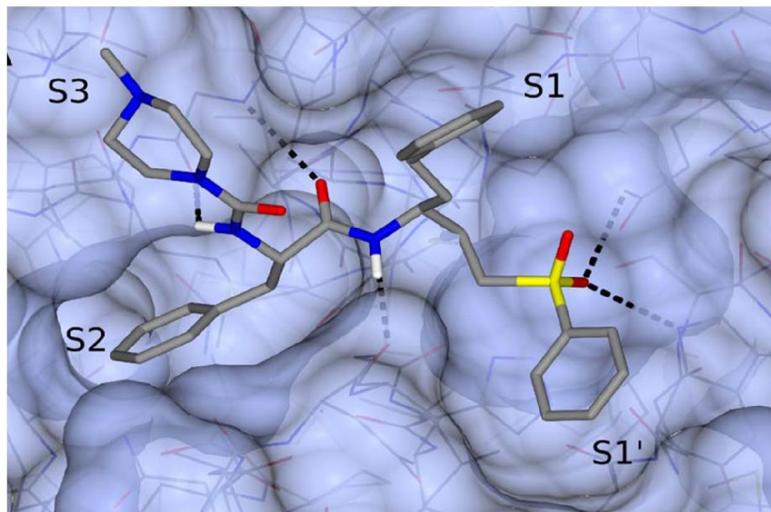
**FIGURA 1.8-** Representação esquemática dos subsítios das cisteíno-proteases, sendo que quatro subsítios estão localizados no lado amino (S4, S3, S2, S1) e três no lado acil (S1', S2', S3') da enzima.



Fonte: DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. *Current Medicinal Chemistry*, 16 (24): 3174, 2009.

Apenas quatro subsítios (S3, S2, S1 e S1') são utilizados (FIGURA 1.9) no planejamento de inibidores de cisteíno-proteases. Entre os subsítios S1 e S1' está localizada a tríade catalítica da enzima. Os subsítios S3 e S1' são mais superficiais e possuem característica hidrofóbica, sendo que apenas o centro do sítio possui característica hidrofílica, onde há o reconhecimento da ligação amídica. O subsítio S2 está localizado em uma região mais profunda e possui uma característica hidrofóbica. Assim como outras cisteíno-proteases similares à papaína a interação com o subsítio S2 da enzima, pelo resíduo complementar P2, é o fator determinante da especificidade da enzima. A cruzaina é capaz de acomodar resíduos hidrofóbicos ou básicos na posição P2 pela rotação do resíduo *Glu205*, que é encontrado no fundo do bolsão deste subsítio. O subsítio S2 ainda é responsável pela seletividade da cruzaina em relação às enzimas homólogas humanas, catepsinas L e S, que ao invés de ter um resíduo de glutamato no fundo do bolsão apresentam uma alanina (Ala214). As interações com os resíduos P1 e P3 parece ser menos discriminatória, pois os subsítios S1 e S3 são menos bem definidos.<sup>27-30</sup>

**FIGURA 1.9-** Estrutura do sítio ativo da cruzaina em complexo com o K777, onde estão representados os subsítios utilizados no planejamento de inibidores de cisteíno-proteases (S3, S2, S1 e S1').



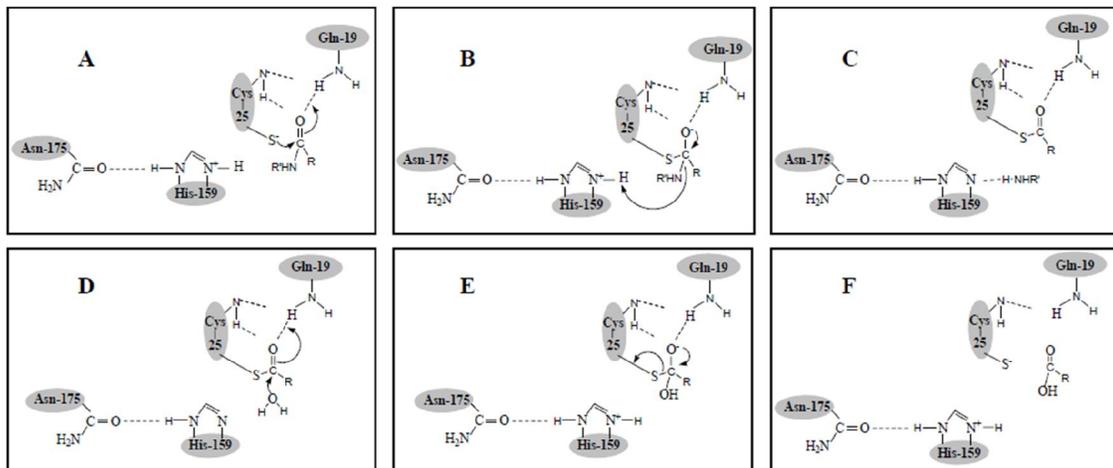
Fonte: WIGGERS, H.J. et al. Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay, PLOS NTD, 7: 2370, 2013

A atividade proteolítica das cisteíno-proteases se deve a presença da *Cys* e *His* em seu sítio ativo, que formam um par iônico tiolato/ imidazolidínico devido a uma transferência de prótons. No caso das cisteíno-proteases similares à papaína, o sítio catalítico é complementado com *Asn* que possibilita uma orientação ideal do anel imidazol da *His* nas etapas de hidrólise. Um quarto resíduo de aminoácido, o *Gln*, atua como parte da cavidade do oxânion, que é uma cavidade presente nessa região capaz de estabilizar intermediários aniônicos próximos ao resíduo de *Asn*.<sup>31</sup>

Na FIGURA 1.10 está ilustrado o mecanismo de hidrólise de peptídeos das cisteíno-proteases. Inicialmente o ânion tiolato ataca o carbono carbonílico do substrato levando a formação de um intermediário tetraédrico (A). O oxianion é estabilizado por ligações de hidrogênio com a *Gln19* e a cadeia principal da *Cys25*. Em seguida, a *His159* gira o anel imidazólico para permitir a transferência de prótons do cátion imidazolidínico ao nitrogênio da ligação peptídica, levando a clivagem da ligação (B). A parte amina do substrato hidrolisado se liga a *His159* através de uma ligação de hidrogênio e a parte carboxílica do substrato se liga a *Cys25* formando o intermediário acil-enzima (C). Depois há a dissociação da parte amina do substrato e sua substituição por uma molécula de água (D), que irá atacar o carbono carbonílico da acil-enzima formando um intermediário tetraédrico (E). Por fim ocorre a

desacilação do tioéster levando a liberação do grupo carboxílico do substrato, que é concertada com a liberação da enzima (F).<sup>22,32</sup>

**FIGURA 1.10-** Mecanismo catalítico das cisteíno-proteases similares à papaína.



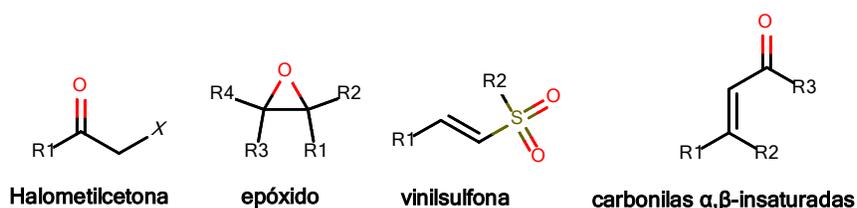
Fonte: DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target.

Current Medicinal Chemistry, 16 (24): 3174, 2009.

### 1.3.1- Inibidores

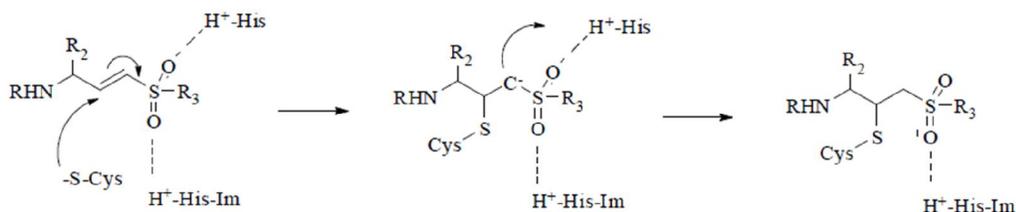
Cisteíno-proteases podem ser inibidas por várias moléculas peptídicas e não peptídicas, que tenham um grupo susceptível a um ataque nucleofílico (*warheads*) pelo tiol da cisteína.<sup>22</sup> Este ataque, dependendo da natureza do *warhead*, pode promover a inibição da enzima de forma covalente irreversível ou reversível. Podem atuar como inibidores covalentes irreversíveis (FIGURA 1.11): halometilcetonas, epóxidos e aceitadores de Michael (vinilsulfonas e carbonilas  $\alpha,\beta$ -insaturadas).<sup>33,34</sup> Os aceitadores de Michael inibem as cisteíno-proteases de maneira similar, primeiramente o sitio ativo sofre uma 1,4-adição de Michael que resulta em uma enzima permanentemente alquilada, ou seja, está inibida de forma covalente irreversível (FIGURA 1.12).<sup>30,34</sup>

**FIGURA 1.11-** Warheads covalentes irreversíveis.



Fonte: Autoria própria.

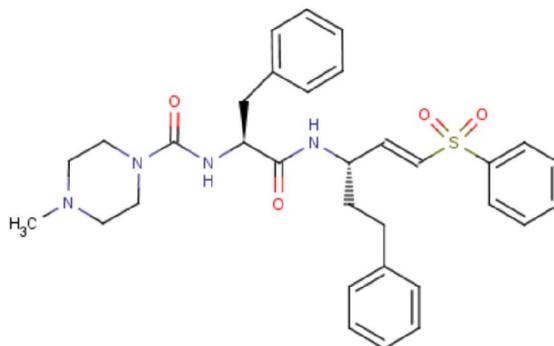
**FIGURA 1.12-** Mecanismo de inibição de cisteíno-proteases por vinilsulfonas.



Fonte: MEHRTENS, J. M. The design, synthesis and biological assay of cysteine protease specific inhibitors, University of Canterbury, 2007.

A dipeptidilvinilsulfona K777, N-metil-piperazina-ureia-F-hF-vinilsulfona-fenil, (FIGURA 1.13) é o inibidor mais avançado da cruzaina e contribuiu para a validação desta enzima como alvo terapêutico.<sup>24</sup> O K777 foi capaz de impedir a proliferação de ambas as formas epimastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares *in vitro*, além de reduzir significativamente os níveis de parasitemia com uma baixa toxicidade.<sup>12</sup> No entanto, este inibidor não foi capaz de curar a doença *in vivo* e ainda apresentou baixa seletividade, portanto não irá prosseguir nas fases clínicas.<sup>12</sup> Os inibidores dipeptídicos, como o K777, apresentam baixa biodisponibilidade oral devido não apresentarem boa estabilidade metabólica, diminuindo assim sua eficácia, portanto é preferível a utilização de inibidores não peptídicos.<sup>24</sup> Além disso, inibidores irreversíveis de cruzaina apresentam efeitos *off-target* e podem provocar severos efeitos colaterais.<sup>30</sup> A toxicidade observada com inibidores reversíveis de cruzaina geralmente é menor do que com inibidores irreversíveis.<sup>30</sup> Sendo assim em nosso grupo temos interesse em desenvolver inibidores covalentes reversíveis e não peptídicos de cruzaina .

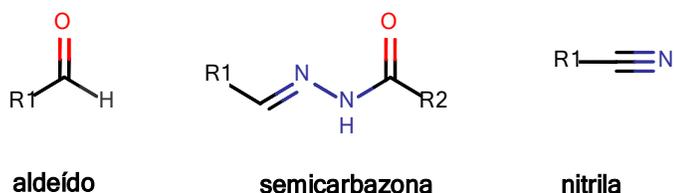
FIGURA 1.13- Estrutura da dipeptidilvinilsulfona K777.



Fonte: Autoria própria

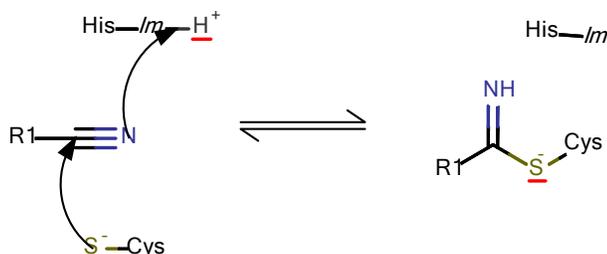
Compostos que atuam como inibidores covalentes reversíveis inibem as cisteíno-proteases através da reação com o tiol levando a formação de um aduto covalente.<sup>33,34</sup> Alguns exemplos de compostos que formam interações reversíveis com o tiol da cisteína são (FIGURA 1.14): aldeídos, semicarbazonas e nitrilas.<sup>33</sup> No caso da nitrila ocorre um ataque nucleofílico pela cisteína levando a formação do imidato (FIGURA 1.15), mas com a desprotonação do nitrogênio a enzima pode voltar a seu estado livre por isso está inibida de forma covalente reversível.<sup>34</sup>

FIGURA 1.14- Warheads covalentes reversíveis.



Fonte: Autoria própria.

FIGURA 1.15- Mecanismo de inibição de cisteíno-proteases por nitrilas.



Fonte: Adaptado de MEHRTENS, J. M. The design, synthesis and biological assay of cysteine protease specific inhibitors, University of Canterbury, 2007.

## 1.4- PLAJENAMENTO DE FÁRMACOS BASEADO EM FRAGMENTOS

O ensaio de triagem em larga escala (*HTS*, do inglês *high-throughput screening*) é um método utilizado na identificação de ligantes e consiste em uma avaliação de milhares de compostos ( $10^6$ ) contra um alvo de interesse.<sup>35</sup> Nos últimos anos um método alternativo ao tradicional, o *HTS*, tem se desenvolvido de forma relevante, que é o chamado planejamento de fármacos baseado em fragmentos (*FBDD*, do inglês *Fragment based drug design*).<sup>35</sup> Os fragmentos geralmente são compostos muito simples com baixa massa molecular (*MW*, do inglês *Molecular Weight*), em torno de 120 a 250 Da, funcionalidade química limitada e baixa afinidade por seu alvo ( $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$ ).<sup>39</sup> O *FBDD* utiliza para a seleção de ligantes uma biblioteca de pequenos fragmentos ( $MW \leq 250$  Da), ao invés de bibliotecas de moléculas maiores ( $MW \approx 500$  Da), como o utilizado no *HTS*.<sup>36</sup> Essa abordagem permite rastrear o espaço químico de forma mais eficiente utilizando uma quantidade menor de compostos.<sup>36</sup> A outra vantagem do *FBDD* é que apesar dos fragmentos serem pequenas moléculas, que se ligam com mais baixa afinidade ao alvo ( $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$ ) do que as moléculas similares a fármacos ( $\text{nM}$  a  $\text{mM}$ ), a eficiência de ligação por átomo dos fragmentos é tão alta quanto à de moléculas maiores, ou seja, possuem interações com mais qualidade.<sup>36</sup>

Além da afinidade pelo alvo também é necessário que um composto apresente propriedades físico-químicas adequadas, para que seja capaz de avançar nas fases do desenvolvimento de fármacos.<sup>35</sup> Alguns pesquisadores analisaram ligantes similares a fragmentos que foram identificados contra vários alvos e observaram que apresentavam determinadas propriedades.<sup>37</sup> A partir desses dados a “regra dos três” foi proposta como um parâmetro para a seleção de ligantes com propriedades físico-químicas adequadas, que consiste em:  $MW < 300$ , coeficiente de partição octanol/ água ( $\text{clogP}$ )  $\leq 3$ , doadores de ligação de hidrogênio (*HBD*, do inglês *hydrogen bond donor*)  $\leq 3$  e aceptores de ligação de hidrogênio (*HBA*, do

inglês *hydrogen bond acceptor*)  $\leq 3$ .<sup>38</sup> Também foi observado que o número de ligações rotacionáveis é  $\leq 3$  e a área de superfície polar foi igual  $60 \text{ \AA}^2$ .<sup>37</sup>

A eficiência do ligante (*LE*, do inglês *Ligand Efficiency*), definido por Kuntz et al., é um conceito que pode ser utilizado para avaliar a qualidade dos ligantes selecionados e acompanhar a otimização da substância matriz. A *LE* é definida como a energia livre de ligação ( $\Delta G$ ) pelo número de átomos pesados (*HAC*, do inglês *Heavy atom count*), que são os átomos diferentes de hidrogênio (Equação 1).

Equação 1: 
$$LE = \frac{-\Delta G}{HAC} = \frac{-RT \ln K_i}{HAC}$$

Onde *R* é a constante universal dos gases, *T* a temperatura absoluta e *K<sub>i</sub>* a constante de inibição. Ou seja, a *LE* permite avaliar qual a contribuição de cada átomo para a interação com o alvo.<sup>39</sup>

Acredita-se que um fragmento deve apresentar uma *LE* de pelo menos  $0,3 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{atom}^{-1}$  para ser selecionado para otimização e a *LE* deve ser mantida durante o processo, para permitir a obtenção de um composto com alta eficiência e afinidade.<sup>40</sup> No entanto, a *LE* não possibilita avaliar outros parâmetros importantes que devem ser considerados no desenvolvimento de fármacos como lipofilicidade, pois compostos altamente lipofílicos tendem a ter uma promiscuidade maior para interagir com vários alvos.<sup>36</sup>

Um conceito que foi introduzido para permitir a otimização da afinidade em relação à lipofilicidade, definido por Leeson e Springthorpe, é a eficiência ligante-lipofilicidade (*LLE*, do inglês *Ligand-lipophilicity efficiency*), que é definida pela Equação 2. Durante a otimização de um fragmento deve-se buscar aumentar a potência sem aumentar a lipofilicidade ao mesmo tempo, acredita-se que uma *LLE* adequada seja entre 5 e 7.<sup>35,36</sup>

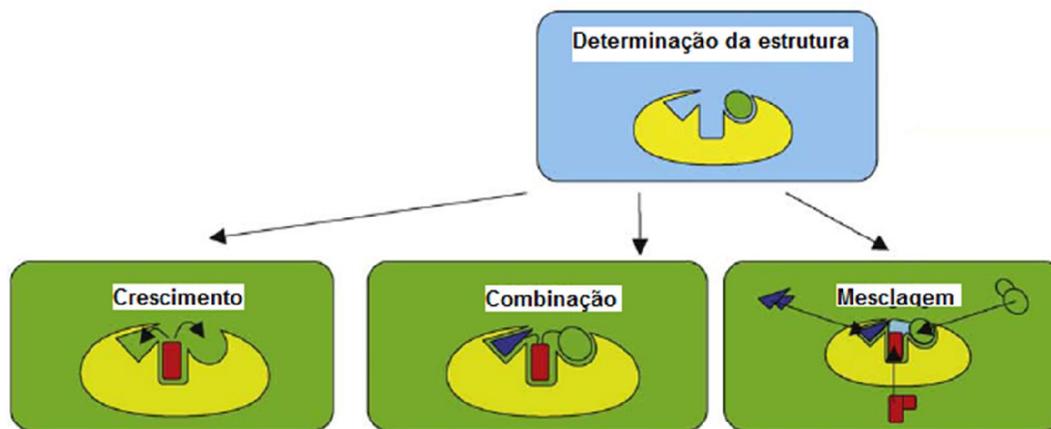
Equação 2: 
$$LLE = pK_i - cLogP$$

Após selecionar um fragmento que tenha afinidade pelo alvo, *LE* e *LLE* adequadas é necessário fazer a sua otimização, para melhorar sua afinidade de ligação.<sup>40</sup> Geralmente o modo de ligação (*MOB*, do inglês *Mode of Binding*) do

fragmento a ser otimizado é determinado por cristalografia de raios-X ou RMN e é utilizado para planejar modificações, que possibilitem ocorrer novas interações do ligante com o alvo, ou seja, a informação estrutural é utilizada para guiar a otimização.<sup>41</sup>

As três estratégias principais que podem ser utilizadas para a otimização do fragmento são: ligação (do inglês, *linking*), crescimento (do inglês, *growing*) e mesclagem (do inglês, *merging*) (FIGURA 1.16). O método que vem sendo mais utilizado é o crescimento do fragmento, no qual a informação estrutural do *MOB* irá guiar o processo que pode ser realizado através da adição de funcionalidades químicas, para que ocorram interações com regiões adjacentes do sítio ativo de forma que não altere o *MOB* inicial. Os fragmentos que se ligam a regiões adjacentes do sítio podem ser combinados através de espaçadores adequados gerando uma molécula com maior afinidade, mas geralmente é difícil encontrar fragmentos que se liguem a sítios adjacentes e também muitas vezes não é possível fazer sua fusão sinteticamente. A última estratégia consiste em mesclar informações estruturais sobre fragmentos, que tenham interações com as mesmas regiões do sítio.<sup>38,42</sup>

**FIGURA 1.16-** Estratégias utilizadas na otimização do fragmento.

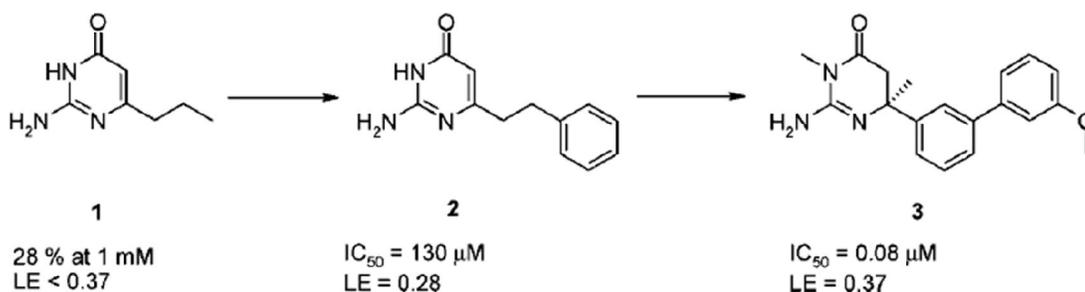


Fonte: HUBBARD, M. N.; SCHULZ, R. E. Recent progress in fragment-based lead discovery, *Current Opinion in Pharmacology*, **9**: 615, 2009.

Um exemplo de otimização bem sucedida é a crescimento do fragmento 6-propil isocitosina (1) ao potente inibidor não peptídico BACE-1 (3) (FIGURA 1.17). A enzima  $\beta$ -secretase é considerada como um alvo para o

tratamento da doença de Alzheimer. Então para selecionar ligantes capazes de inibir esta enzima foi realizado um *screening* com vários fragmentos, o qual permitiu identificar o composto 1 que apresentou afinidade mM. A partir do *MOB* do composto 1, obtido a partir de sua estrutura cristalográfica, foi possível fazer o planejamento do composto 2, que apresentou um ganho de afinidade ( $\mu\text{M}$ ). Em seguida, através de uma maior otimização pode-se obter o composto 3 com afinidade submicromolar.<sup>36</sup>

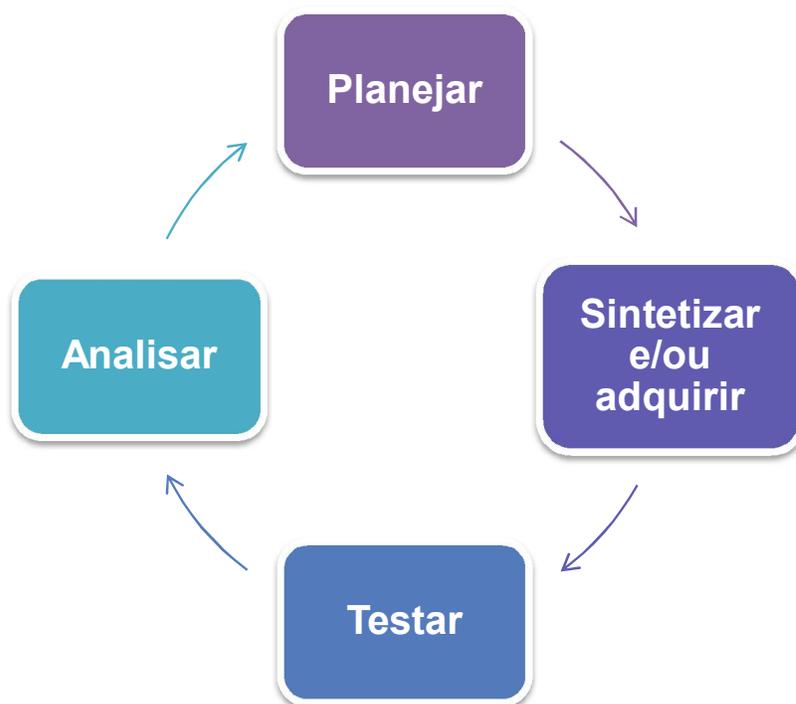
**FIGURA 1.17-** Evolução do fragmento 6-propil isocitosina ao potente inibidor não peptídico BACE-1.



Fonte: CONGREVE, M.; CHESSARI, G.; TISI, D.; WOODHEAD, A. J. "Recent developments in fragment-based drug discovery", *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (13): 3661, 2008.

## 1.5- PLANEJAMENTO BASEADO EM HIPÓTESES

O planejamento baseado em hipóteses (do inglês *Hypothesis driven development*) consiste em inicialmente fazer observações e formular hipóteses, então projetar um experimento que permita testá-las e definir quais parâmetros serão utilizados para avaliar os resultados obtidos. A seguir, são realizados os experimentos e por fim é preciso avaliar os resultados, para aceitar ou rejeitar as hipóteses e se necessário formular e testar novas hipóteses. Este processo é conhecido como ciclo planejar- sintetizar e/ou adquirir-testar-analisar (FIGURA 1.18). Pode-se observar que cada passo depende muito do passo que o precede e dos outros que o seguem, sendo assim para possibilitar uma maior velocidade e qualidade em cada fase deve-se trabalhar com uma equipe multidisciplinar.<sup>43,44</sup>

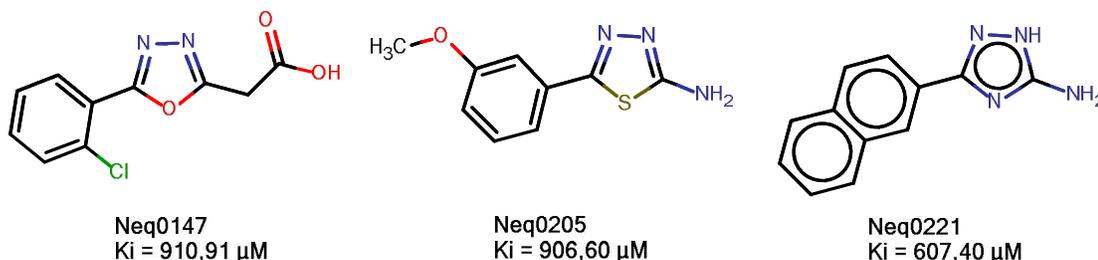
**FIGURA 1.18-** Ciclo planejar- sintetizar e/ou adquirir-testar-analisar.

Fonte: Autoria própria

## 1.6- PRECEDENTES DE PESQUISA

Em um trabalho realizado anteriormente em nosso grupo, pela aluna de mestrado Emanuella Maria Barreto Fonseca, foi realizada a busca por fragmentos que fossem capazes de inibir a cruzaina utilizando métodos virtuais, baseados na estrutura do alvo.<sup>45</sup> Inicialmente foi montada uma biblioteca de fragmentos, a partir de um banco de dados de moléculas comercialmente disponíveis (ZINC), utilizando filtros de seleção baseados em propriedades fragmento-similares. Por meio de estudos *in silico* (docagem, dinâmica molecular e inspeção visual) foi selecionado um conjunto de fragmentos, que foram testados contra a cruzaina. Então inibidores similares a fragmentos foram identificados, sendo que alguns deles apresentaram afinidade na faixa micromolar entre eles o Neq0147 ( $K_i = 910,91 \pm 52,6 \mu\text{M}$ ;  $LE = 0,23 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{atom}^{-1}$ ), Neq0205 ( $K_i = 906,60 \pm 86,43 \mu\text{M}$ ;  $LE = 0,26 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{atom}^{-1}$ ) e Neq0221 ( $K_i = 607,40 \pm 45,74 \mu\text{M}$ ;  $LE = 0,22 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{atom}^{-1}$ ) (FIGURA 1.19).

**FIGURA 1.19-** Estruturas dos inibidores de cruzaina similares a fragmentos: Neq0147, Neq0205 e Neq0221.

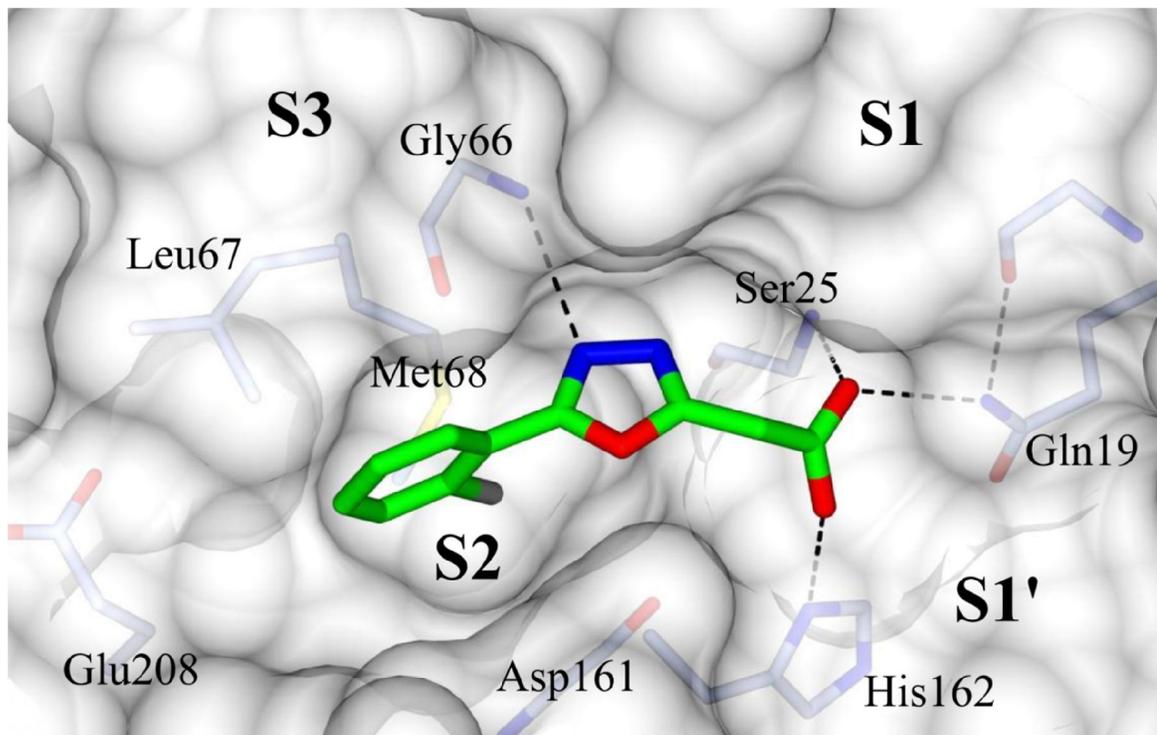


Fonte: Autoria própria.

Os melhores inibidores desta série foram co-cristalizados com a cruzaina para a determinação do *MOB*, através de sua estrutura cristalográfica de raios-X, em um trabalho realizado pelo aluno de doutorado William Borges Fernandes. A estrutura cristalográfica do fragmento Neq0147 (FIGURA 1.20) foi obtida e permitiu validar ortogonalmente o *MOB* do inibidor. Esta estrutura foi obtida com a cruzaina mutante (C25S), que possui uma serina ao invés de uma cisteína na tríade catalítica.

A enzima nativa sofre auto-proteólise logo após ser ativada dificultando sua utilização na cristalografia, a qual requer que a enzima esteja estável. Além disso, a maioria das estruturas cristalográficas com a cruzaina foram obtidas com inibidores covalentes irreversíveis com alta potência, que são capazes de estabilizar o efeito proteolítico da enzima. No entanto, os fragmentos se ligam de forma reversível e tem baixa potência, sendo assim não conseguem evitar que ocorra a auto-proteólise, tornando uma tarefa difícil obter cristais com fragmentos. Uma maneira de contornar esse problema foi à utilização da C25S, que com a substituição da cisteína pela serina se tornou inativa e estável, o que é ideal para a utilização em ensaios de cristalização. A cruzaina C25S foi validada como um modelo cristalográfico representativo para a caracterização do *MOB* de inibidores de baixa potência, com alta probabilidade de que o mesmo *MOB* seja obtido na cruzaina nativa.

FIGURA 1.20- Estrutura cristalográfica do Neq0147 (PDB: 4KNO).



Fonte: William Borges Fernandes.

A estrutura cristalográfica do Neq0147 em complexo com cruzaina (FIGURA 1.17) mostra que o ligante ocupa a porção mais profunda do sítio catalítico, localizado entre a tríade catalítica e o subsítio S2, e que o carboxilato “ancora” o inibidor nesta posição. O Neq0147 interage de forma não covalente estabilizado através de quatro ligações de hidrogênio, com a *Gly66* e com resíduos de aminoácidos da tríade catalítica (cadeia principal da *Ser25* e *His162*), e a *Gln19*. O cloro presente no anel aromático interage com a *Met68*, através de ligação de halogênio, e o anel aromático forma interações  $\pi$ - $\pi$  com a *Leu67*, presentes no subsítio S2. O oxadiazol está localizado na região de reconhecimento da ligação amida interagindo com a *Gly66*, que é responsável por garantir o correto posicionamento do substrato para clivagem. Através da otimização adequada desse anel outras interações poderiam ocorrer com aminoácidos presentes nessa região (*Gly65* e *Asp161*) e este poderia atuar como um bioisómero da ligação peptídica. Então este inibidor poderia se tornar uma alternativa aos inibidores dipeptídicos, que têm sido evitados nos últimos tempos. Inicialmente, é necessário otimizar as interações desse fragmento para posteriormente se fazer o crescimento do

fragmento, através da adição de grupos que interajam com outros subsítios e possibilitem obter um inibidor com alta afinidade (nM) e eficiência.

# **CAPÍTULO 2**

## **Objetivos**

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- OBJETIVO GERAL

Otimização das interações do fragmento Neq0147 através de um estudo de *SAR*, que irá possibilitar a identificação de novos fragmentos como inibidores não peptídicos de cruzafina.

### 2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Planejamento e síntese de fragmentos moleculares como inibidores da cruzafina;
- Determinação da constante de inibição ( $K_i$ );
- Avaliação da relação estrutura-atividade.

# **CAPÍTULO 3**

## **Materiais e Métodos**

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1- MATERIAIS

##### 3.1.1- Síntese

Os solventes utilizados foram adquiridos das empresas Synth, Sigma-Aldrich e Vetec. As reações foram realizadas sob atmosfera de argônio com solventes secos, que foram transferidos por seringa. O diclorometano (DCM) e a trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) foram secos por destilação com cloreto de cálcio. A dimetilformamida (DMF) foi seca por destilação com sulfato de magnésio, sob vácuo e armazenada em peneira molecular 4Å, que foi previamente ativada a 300°C. Os balões e agulhas foram flambados sob vácuo para sua secagem, antes de sua utilização. Os solventes empregados na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) foram adquiridos da empresa Tedia, antes de serem utilizados foram filtrados e degaseificados. Os reagentes utilizados foram adquiridos das empresas Sigma-Aldrich, Combi Blocks e Enamine BB, sendo utilizados sem mais purificações.

As reações foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando placas Fluka com matriz de sílica gel, suporte de alumínio, com indicador fluorescente 254 nm e espessura da camada de 200µm. As placas de CCD foram visualizadas com lâmpada UV de comprimento de onda curta (254nm) e foram reveladas por borrifação de ácido fosfomolibdico e ninidrina, seguida por aquecimento com soprador térmico. A cromatografia por coluna flash foi realizada utilizando sílica gel flash (tamanho de poro 60Å, tamanho de partícula 220-440mesh). A pureza do produto final foi determinada por HPLC. O equipamento HPLC utilizado é um Cromatógrafo Líquido, série Prominence 20AT da Shimadzu, com detecção por arranjo de diodos (DAD) spd-M20A, coletor de frações FRC-10. A coluna utilizada foi Lux 5u Cellulose-2, LC Column 250 x 4.6 mm da Phenomenex, 5 µm, 1000 Å e a fase reversa de eluentes utilizada foi água (solvente A) e acetonitrila

(solvente B). O ponto de fusão foi determinado no aparelho digital de ponto de fusão Química Micro MQAPF-302, Microquímica Equipamentos Ltda.

Para a caracterização dos produtos foram utilizadas as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  no equipamento Agilent Technologies modelos 500/54 Premium Shield e 400/54 Premium Shield na Central de Análises Químicas Instrumentais de São Carlos (CAQI). Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) (2.5 ppm; 3.3 ppm) ou clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) (1.53ppm, 7.26ppm) adquiridos da Sigma-Aldrich. As constantes de acoplamento foram medidas em hertz (Hz) e os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em partes por milhão (ppm).

Os compostos também foram caracterizados pela técnica de espectrometria de massas no Espectrômetro de Massas do tipo Quadrupolo/Tempo de voo (QqTOF) da Bruker Daltonics, do grupo de cromatografia do Instituto de Química de São Carlos, sendo que as amostras foram preparadas com uma concentração de 5-10 ppm em acetonitrila. O íon molecular protonado  $[\text{M}+\text{H}]$  ou os adutos de sódio  $[\text{M}+\text{Na}]$  foram usados para a confirmação da fórmula estrutural.

### 3.1.2- Expressão da cruzaina e ensaios cinéticos

Todos os reagentes utilizados na expressão e purificação foram fornecidos pela Sigma Aldrich. Os equipamentos utilizados foram: shaker da Marconi, centrífuga Eppendorf, espectrofotômetro UV/vis da Shimadzu, desmembrador celular *Sonic Dismembrator Model 500* da Fisher Scientific e *nanodrop DS-11+* da DeNovix.

Os reagentes dimetilsulfóxido (DMSO), triton-X100, acetato de sódio, cloreto de sódio (NaCl), *N*-benzoxicarbonil-L-fenilalanila-L-arginina-7-amido-metil-cumarina (ZFRMCA) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O reagente Ditiotreitól (*DDT*) foi adquirido da empresa USB Corporation com grau de pureza “ultrapuro”. Nenhuma purificação/avaliação da integridade adicional foi realizada. Os compostos adquiridos comercialmente foram obtidos das empresas Enamine e Vitas M Labs.

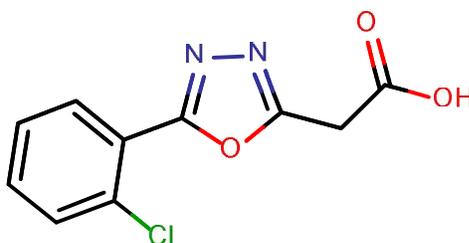
Os ensaios enzimáticos foram realizados no fluorímetro Synergy HT Microplate Nender da Biotek, com software Gen5 1.10 e os filtros de banda de excitação e emissão foram de 360 nm e 460 nm, respectivamente. Os dados de inibição enzimática foram analisados no SigmaPlot 10.0, utilizando modelos de inibição competitiva para determinar o  $K_i$ .

## 3.2- MÉTODOS

### 3.2.1- Planejamento

Foram propostas algumas modificações moleculares, através do planejamento baseado em hipóteses, baseadas no Neq0147 (FIGURA 3.1) para realizar a otimização de suas interações por meio de um estudo de SAR. Os estudos de SAR permitem identificar quais partes da molécula são ou não essenciais para sua atividade biológica, através de modificações moleculares onde um grupo funcional da molécula é removido ou alterado. Se o análogo apresenta atividade menor aquele grupo modificado é importante para a atividade, mas se permanecer igual o grupo não é essencial para a atividade.<sup>46</sup>

FIGURA 3.1- Estrutura do Neq0147.

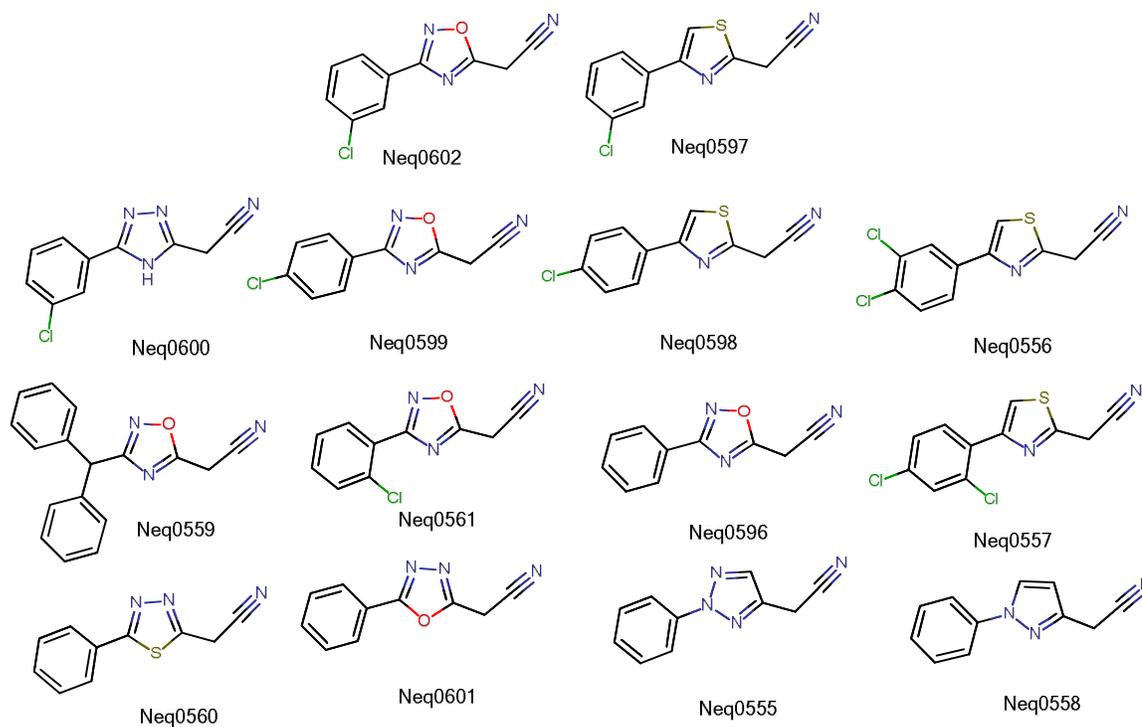


Neq0147

Fonte: Autoria própria.

A primeira hipótese consistiu na substituição do grupo carboxilato por uma nitrila, com a intenção de avaliar se este grupo devido ser um *warhead* que se liga de forma covalente reversível com a enzima iria aumentar a afinidade do inibidor. Além disso, a nitrila foi utilizada como uma âncora para permitir explorar outras modificações no anel heterocíclico e aromático. Posteriormente, outra modificação molecular proposta foi à substituição do anel oxadiazol por outros anéis heterocíclicos de cinco membros (1,2,4-oxadiazol, triazol, pirazol, tiadiazol e tiazol), a fim de explorar interações com o Asp161 e a Gly65. Depois a posição do átomo de cloro também foi variada, para explorar interações hidrofóbicas com aminoácidos presentes no subsítio S2 e interagir de forma mais eficiente com a porção mais profunda do bolsão. No entanto, não era possível saber se com essas modificações as moléculas ainda seriam capazes de inibir a cruzafina, então ao invés de sintetizar todos os compostos optou-se por adquiri-los comercialmente. Essas moléculas foram selecionadas a partir de um banco de dados de substâncias comercialmente disponíveis (ZINC), onde foi feita uma busca por moléculas que apresentassem as modificações propostas, sendo que as disponíveis foram adquiridas (FIGURA 3.2).

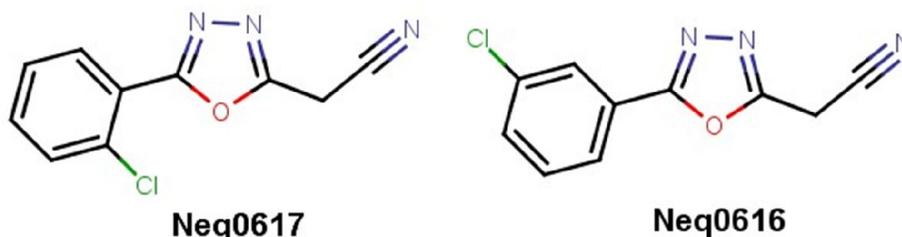
**FIGURA 3.2-** Estruturas dos compostos comercialmente disponíveis adquiridos.



Fonte: Autoria própria.

Este conjunto de fragmentos foi testado contra a cruzaina e vários desses compostos inibiram a enzima com uma afinidade maior do que o Neq0147, estes resultados estão apresentados mais adiante no capítulo 4. Então para avaliar qual foi o efeito da substituição do carboxilato pela nitrila no aumento da afinidade destes inibidores era preciso testar o Neq0147 com a nitrila (Neq0617; FIGURA 3.3), mas este composto não estava comercialmente disponível e foi necessário sintetizá-lo. Além disso, como existiam vários compostos com diferentes anéis heterocíclicos com o átomo de cloro na posição *meta*, o Neq0616 (FIGURA 3.3) também foi sintetizado para permitir avaliar o efeito do anel. Todos os fragmentos foram testados contra a cruzaina, através de ensaios cinéticos, para a determinação do  $K_i$  e com a finalidade de quantificar a contribuição das modificações moleculares na afinidade com a enzima.

**FIGURA 3.3-** Estruturas do Neq0617 e Neq0616.



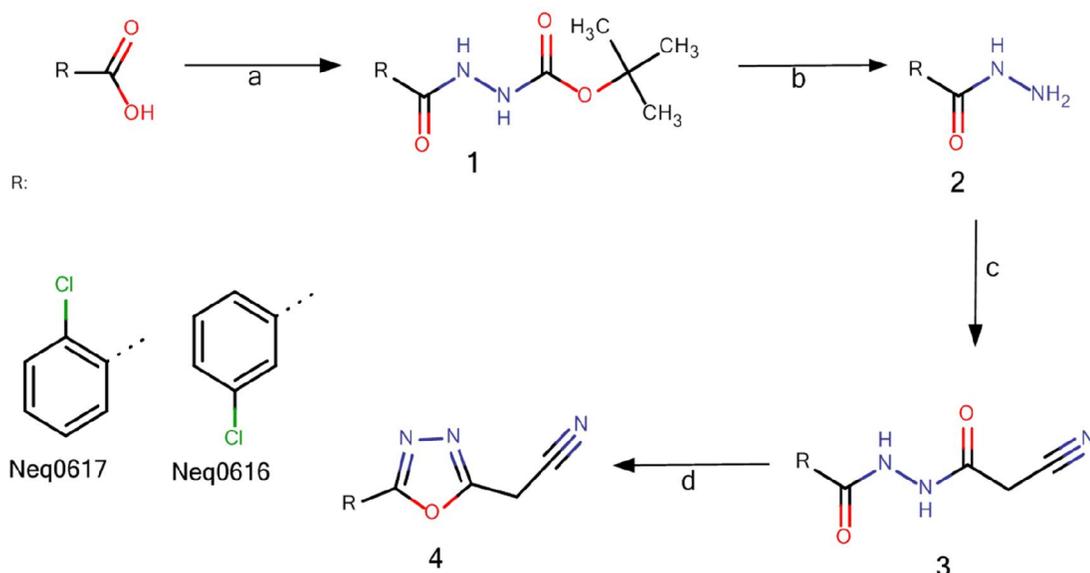
Fonte: Autoria própria.

### 3.2.2- Síntese do Neq0617 e Neq0616

A rota sintética proposta e utilizada para a síntese do Neq0617 e Neq0616 está ilustrada na FIGURA 3.4. Inicialmente o ácido carboxílico foi acoplado com o carbazato de t-butila utilizando o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (*EDC*), seguida pela reação de desproteção com o ácido trifluoroacético (TFA) e este procedimento foi adaptado de BRASLAU et al.<sup>47</sup>. Posteriormente foi realizada uma reação de acoplamento do composto 2 com o ácido cianoacético utilizando *EDC* e hidroxibenzotriazol (*HoBt*), através de um procedimento adaptado de ANDRIANI et

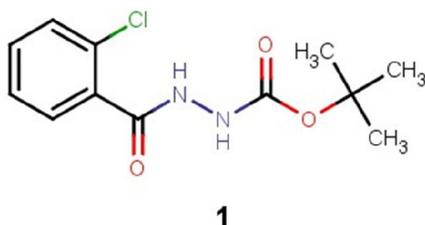
al.<sup>48</sup>. Por fim o composto 3 sofreu a reação de ciclodesidratação, para a formação do anel heterocíclico oxadiazol, com o cloreto de 4-toluenossulfonila (*p*-TsCl) utilizando o procedimento descrito por LAI et al.<sup>49</sup>.

**FIGURA 3.4-** Rota sintética utilizada para síntese do composto Neq0617 e Neq0616.



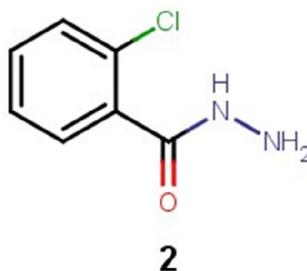
Reagentes e condições: a) carbazato de *t*-butila, *EDC*, DCM, temperatura ambiente (t.a.), 12 h; b) (TFA) : DCM (1:1), 0°C, 2 h; c) ácido cianoacético, *EDC*, hidróxi-benzotriazol (*HoBt*), DMF, 0°C - t.a., 12 h; d) *p*-TsCl, Et<sub>3</sub>N, DCM, t.a., 12 h.

### 3.2.2.1- Procedimento para a síntese do Neq0617

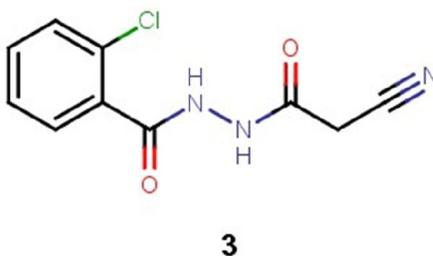


**N'-[(*tert*-butoxi) carbonil]-2-clorobenzo-hidrazida (1).** A uma solução de ácido 2-clorobenzoico (7,55 mmol; 1,18g) em DCM seco (45 mL) foi adicionado carbazato de *t*-butila (7,70 mmol; 1,01 g), seguido por *EDC* (7,75 mmol; 1,48g) e a mistura foi deixada sob agitação por 12 h. O consumo do ácido e a formação do produto foram visualizadas por CCD. Então foi adicionado DCM (15 mL) e a fase orgânica foi

lavada sequencialmente com H<sub>2</sub>O (45 mL), HCl 0,5M (2 x 45 mL), NaHCO<sub>3</sub> aquoso saturado (2 x 45 mL) e NaCl aquoso saturado (45 mL). Depois a fase orgânica foi seca sobre MgSO<sub>4</sub> anidro. O solvente foi removido sob vácuo produzindo um sólido pastoso alaranjado (5,28 mmol; 1,43 g; Rendimento: 70%, <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,03 (s; 1H); 9,01 (s; 1H); 7,66 – 7,26 (m; 4H); 1,43 (s; 9H).



**2-clorobenzo-hidrazida (2).** O composto 1 (3,92 mmol, 1,06 g) foi dissolvido numa mistura 1:1 de TFA em DCM (20 mL) e deixou-se sob agitação por 2 h. Através de CCD observou-se o consumo do composto 1 e a formação do produto. Em seguida o excesso de TFA: DCM foi removido sob vácuo; então adicionou-se 20 mL de éter dietílico e secou-se sob o vácuo obtendo-se um sólido amarelado (Rendimento quantitativo). O sal do composto 2 foi utilizado na próxima reação sem mais purificações. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11,32 (s; 1H); 7,70 – 7,36 (m; 4H).



**2-cloro-N'-(2-cianoacetil)benzo-hidrazida (3).** Em uma solução de ácido cianoacético (2,92 mmol; 248,8 mg) em DMF seca (20 mL) foi adicionada Et<sub>3</sub>N (4,38 mmol; 0,61 mL) e resfriou-se a solução a 0°C. Depois EDC (3,8 mmol; 0,725 g) e *HoBt* (3,8 mmol; 0,515 g) foram adicionados a esta solução. Em outro balão foi feita uma solução do composto 2 (3,8 mmol; 1,07 g) em dimetilformamida (20 mL) com Et<sub>3</sub>N (7,31 mol; 1,01 mL), esta solução foi adicionada a outra e deixou-se agitando a 0°C por 1 hora. Em seguida a reação foi deixada sob agitação por 12 h a t.a.. O solvente foi removido sob vácuo e adicionou 120 mL de acetato de etila, então a fase orgânica foi lavada sequencialmente com H<sub>2</sub>O (60 mL), HCl 0,5M (2 x 60 mL),

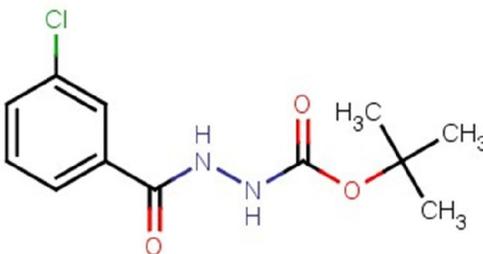
NaHCO<sub>3</sub> aq. saturado (2 x 60 mL), NaCl (60 mL) e secou-se sob MgSO<sub>4</sub> anidro. O solvente foi removido sob vácuo e o produto obtido foi purificado por coluna cromatográfica flash com hexano: acetato (3:7) produzindo um sólido amarelo escuro (0,78 mmol; 187mg; Rendimento: 27%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10,50 (s; 1H); 7,66 – 7,35 (m; 4H); 3,80 (s; 2H).



**Neq0617 (4)**

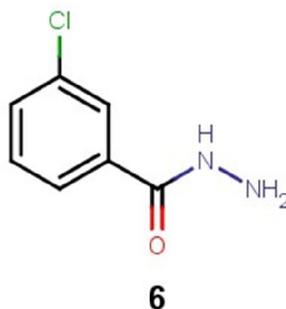
**2-[5-(2-clorofenil)1,3,4-oxadiazol-2-il]acetonitrila (4; Neq0617).** A uma solução do composto 3 (0,78 mmol; 187 mg) em DCM seco (12 mL) foi adicionado *p*-TsCl (0,78 mmol; 169,6 mg), seguido por Et<sub>3</sub>N (1,85 mmol; 0,25 mL) e deixou a reação agitando a t.a. por 16 h. Então foram adicionados 40 mL de DCM e lavou-se com H<sub>2</sub>O (50 mL) e NaCl (50 mL). A fase orgânica foi seca sob vácuo e o composto foi purificado por coluna cromatográfica flash com DCM: éter etílico (1:1). Posteriormente foi purificado via *HPLC* com acetonitrila: água (1:1) resultando em um produto marrom-esverdeado (0,36 mmol; 80 mg; Rendimento: 46,82%). Ponto de fusão: 80°C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, cdcl<sub>3</sub>) δ 7,97 (dd; J<sup>3</sup> = 7,8 Hz; J<sup>4</sup> = 1,7 Hz; 1H); 7,56 (dd; J<sup>3</sup> = 8,1Hz; J<sup>4</sup> = 1,3 Hz; 1H); 7,50 (td; J<sup>3</sup> = 7,7; J<sup>4</sup> = 1,7 Hz; 1H); 7,44 – 7,39 (m; 1H); 4,15 (s; 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164,84; 157,20; 133,54; 133,19; 131,54; 131,46; 127,38; 122,43; 112,12; 16,15. (ESI) massa calculada: [M+H] = 220,0277, [M+Na] = 242,0097; massa encontrada: [M+H]= 220,0275 [M+Na]= 242,0090.

### 3.2.2.2- Procedimento para a síntese do Neq0616

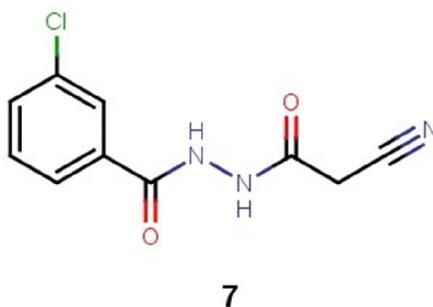


**5**

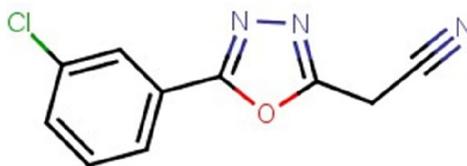
**N'-[(*tert*-butoxi) carbonil]-3-clorobenzo-hidrazida (5).** Sintetizado nas mesmas condições da substância 1. O produto é um sólido branco (rendimento: 51%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,32 (s; 1H); 8,98 (s; 1H); 7,92 – 7,78 (m; 2H); 7,65 (ddd; J<sup>3</sup> = 8,0 Hz; J<sup>4</sup> = 2,1 Hz; J<sup>4</sup> = 1,0 Hz; 1H); 7,54 (t; J<sup>3</sup> = 7,9 Hz; 1H); 1,43 (s; 9H).



**3-clorobenzohidrazida (6).** Sintetizado nas mesmas condições da substância 2. O produto é um sólido pastoso transparente (rendimento qualitativo). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9,68 (s; 1H); 7,90 (t; J = 1,8 Hz; 1H); 7,86 – 7,80 (m; 1H); 7,68 (ddd; J<sup>3</sup> = 8,0 Hz; J<sup>4</sup> = 2,1 Hz; J<sup>4</sup> = 1,0 Hz; 1H); 7,55 (t; J<sup>3</sup> = 7,9 Hz; 1H).



**3-cloro-N'-(2-cianoacetil)benzohidrazida (7).** Sintetizado nas mesmas condições da substância 3. O produto é um sólido amarelo claro (Rendimento: 42%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10,66 (s; 1H); 10,41 (s; 1H); 7,89 (t; J<sup>4</sup> = 1,8 Hz; 1H); 7,84 – 7,81 (m; 1H); 7,67 (ddd; J<sup>3</sup> = 8,0 Hz; J<sup>4</sup> = 2,1 Hz; J<sup>4</sup> = 1,0 Hz; 1H); 7,55 (t; J<sup>4</sup> = 7,9 Hz; 1H); 3,82 (s; 2H).



**Neq0616 (8)**

**2-[5-(3-clorofenil)1,3,4-oxadiazol-2-il]acetoneitrila (8; Neq0616).** Sintetizado nas mesmas condições da substância 4, exceto que foi purificado por coluna cromatográfica flash com hexano: acetato (7:3). O produto é um sólido marrom-esverdeado (Rendimento: 26,20%). Ponto de fusão: 78°C.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,04 (td;  $J^4 = 1,9$  Hz,  $J^5 = 0,4$  Hz; 1H); 7,94 (ddd;  $J^3 = 7,8$ ,  $J^4 = 1,6$ ,  $J^4 = 1,1$  Hz; 1H); 7,55 (ddd;  $J^3 = 8,1$  Hz;  $J^4 = 2,1$  Hz,  $J^4 = 1,1$  Hz; 1H); 7,50 – 7,44 (m; 1H); 4,16 (s; 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165,06; 157,05; 135,35; 132,43; 130,60; 126,98; 125,12; 124,47; 112,19; 16,02. (ESI) massa calculada:  $[\text{M}+\text{H}] = 220,03$ , massa encontrada:  $[\text{M}+\text{H}] = 220,08$ .

### 3.2.3-Expressão e purificação da cruzaina *Wild Type* (*W.T.*)

A cruzaina *W.T.* foi preparada por um protocolo utilizado em nosso grupo através do plasmídeo pET21a, que contém o gene da pró-cruzaina com cauda de histidina constituída por seis resíduos consecutivos de histidina ( $\text{His}_6$ -tag) (FIGURA 3.5).

**FIGURA 3.5-** Sequência proteica codificada pelo gene da pró-cruzaína. Os resíduos da cauda de histidina e o pródomínio N-terminal estão numerados de -112 até -1 e o domínio catalítico de 1 a 215.

His <sub>6</sub> + Pro-Region		Cruzain		
-112				<b>HH HHHHGS</b> CLVP
-100	AATASLHAE	TLTSQFAEFK	QKHGRVYESA	AEAAFRLSVF RENLFLARLH
-50	AAANPHATFG	VTPFSDLTRE	EFRSRYHNGA	AHFAAAQERA RVPVKVEVVG
1	<b>APA</b> AVDWRAR	<b>GAVTAVKDQG</b>	<b>QCGSCWAFSA</b>	<b>I GNVECQWFL</b> AGHPLTNLSE
51	<b>QMLV</b> SCDKTD	<b>SGCSGGLMNN</b>	<b>AFEWIVQENN</b>	<b>GAVYTEDSYP</b> YASGEGISPP
101	<b>CTTSGHTVGA</b>	<b>TITGHVELPQ</b>	<b>DEAQIAAWLA</b>	<b>VNGPVAVAVD</b> ASSWMTYTGG
151	<b>VMTSCVSEQL</b>	<b>DHGVLLVGYN</b>	<b>DSAAVPYWII</b>	<b>KNSWTTQWGE</b> EGYIRIAKGS
201	<b>NQCLVKEEAS</b>	<b>SAVVG</b>		

Fonte: LEE, G. M. et al. Mapping Inhibitor Binding Modes on an Active Cysteine Protease via Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry*, 51 (50): 10087, 2012.

### 3.2.3.1- Transformação da *Escherichia coli* para expressão da proteína

Um microtubo com 50 µL da bactéria competente ArticExpress (DE3)RIL foi retirado do freezer a -80 °C e mantido no gelo por 15 min. Depois foi adicionado 5 µL do plasmídeo e deixou-se no gelo por 30 min. Então a solução foi levada a choque térmico a 42°C por 30 s e incubada em banho de gelo por 2 min. Foi adicionado 250 µL de meio SOC ao microtubo e este foi levado ao shaker, a 37°C sob agitação de 225 rpm por 1 h. Após esse período de tempo as bactérias foram aderidas em duas placas contendo meio *Luria Broth* (LB) Ágar (uma com 20 µL e outra com 200 µL de bactéria), na presença dos antibióticos carbenicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>) e gentamicina (20 µg mL<sup>-1</sup>). As placas foram mantidas em uma estufa a 37 °C por 12 h.

### 3.2.3.2- Pré-inóculo

Uma colônia isolada das bactérias transformadas foi selecionada e adicionada em 200 mL de meio de cultura LB, com os antibióticos carbanicilina (100 µg/mL) e gentamicilina (20 µg mL<sup>-1</sup>). Deixou-se o pré-inóculo no shaker a 37°C, 12 h, a 250 rpm.

### 3.2.3.3- Inóculo e auto-indução

Preparou-se 1 L do meio de auto-indução com a composição descrita na Tabela 3.1. O meio foi autoclavado e, quando em temperatura ambiente, foi misturado a 10 mL de uma solução de D-glicose 5%, 40 mL de  $\alpha$ -lactose 5% e o volume necessário para que os antibióticos (carbenicilina e gentamicina) tivessem a concentração final igual  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

**TABELA 3.1-** Composição do meio de auto-indução.

Componente	Quantidade
N-Z amina	10 g
Extrato de levedura	5 g
Glicerol	5 mL
Água	900 mL
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	25 mL de uma solução a 1 M
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	25 mL de uma solução a 1 M
$\text{NH}_4\text{Cl}$	50 mL de uma solução a 1 M
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	5 mL de uma solução a 1 M
$\text{MgSO}_4$	2 mL de uma solução a 1 M

Fonte: Autoria própria.

Antes de inocular o meio de auto-indução foi determinado a densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) do pré-inóculo, pois é necessário que a  $\text{OD}_{600}$  inicial do meio de auto-indução esteja igual a 0,16. Então foi calculado o volume de pré-inóculo que deveria ser adicionado ao meio de auto-indução, para que apresentasse a  $\text{OD}_{600}$  necessária. O meio de auto-indução foi dividido em dois frascos Erlenmeyers de 1 L ficando cada um deles com 500 mL de meio. Ambos foram levados ao shaker a  $18^\circ\text{C}$  com agitação constante de 250 rpm por 60 h. A cada 24 h a  $\text{OD}_{600}$  foi medida para acompanhar o crescimento e a estabilização do processo de expressão. Após as 60 h o meio foi centrifugado (50000 rpm, por 25 min. a  $4^\circ\text{C}$ ). O sobrenadante foi descartado e o precipitado, os *pellets*, foi pesado e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.2.3.4- Lise das células

O *pellet* foi descongelado e em seguida ressuspendido em tampão de lise (TABELA 3.2) e mantido em banho de gelo por 1 h, sendo que para cada 5 g de *pellet* foram adicionados 20 mL de tampão de lise. Então a solução foi levada a um desmembrador celular para que as membranas das bactérias fossem rompidas. O sistema foi configurado da seguinte forma: amplitude de 15%, pulso ligado de 30 s, pulso desligado de 59,9 s e tempo total de 15 min. Depois a solução foi submetida a uma centrifugação a 20 000 rpm, por 30 min, a 4 °C. Após essa etapa, iniciou-se o procedimento de purificação.

**TABELA 3.2-** Composição do tampão de lise.

Componente	Quantidade
Tampão A (50 mM Tris, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM e pH 10,0)	20 mL
CaCl <sub>2</sub>	10 mL de um estoque a 1 M
MgSO <sub>4</sub>	10 mL de um estoque a 1 M
Lisozima	Suficiente para 0,2 mg mL <sup>-1</sup>
<i>PMSF</i>	100 mL de um estoque 0,2 M
DNase	4 mL
RNase	4 mL

Fonte: Autoria própria.

### 3.2.3.5- Purificação em Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado (IMAC)

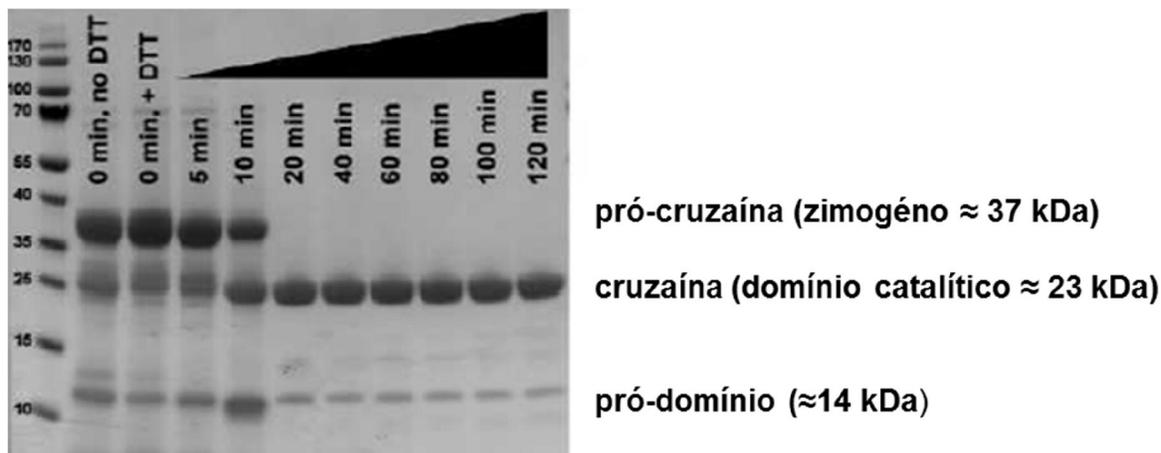
O sobrenadante foi misturado com 4 mL de uma solução de Ni-NTA e deixado sob agitação em banho de gelo, por 2 h. Depois a solução foi transferida para uma coluna de 25 mL e deixou-se na câmara fria a 4°C. Então foi iniciada a etapa de eluição sendo que primeiramente foram eluídos os 20 mL do sobrenadante, seguida pela adição e eluição de 15 mL do tampão A (TABELA 3.2). Depois, foi preparado o tampão B (tampão A + 500 mM de imidazol) e cerca de 25 mL foram usados para eluir a cruzaina da coluna de Ni-NTA.

### 3.2.3.6- Ativação e estocagem

A fração coletada foi transferida para uma membrana de diálise de 10 kDa e deixadas em diálise por 12 h, em 2 L de tampão acetato de sódio (NaOAc 100 mM, NaCl 300 mM e pH 5,5). No dia seguinte outra diálise com 2 L de tampão de ativação foi realizada, agora por 2 h. Depois dessa etapa a concentração da enzima foi determinada por espectroscopia de absorção no ultravioleta (UV), utilizando o equipamento *nanodrop* DS-11+ da DeNovix. Após a diálise a solução da proteína foi diluída em tampão de ativação (tampão acetato + 5mM de DTT), para ter uma concentração final de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> e também foi corrigido o pH para 5,2. A solução foi levada a banho termostatizado a 37°C por 2 h e foram retiradas alíquotas para monitorar a ativação, por gel de eletroforese SDS-PAGE 12% de Bis-Tris (FIGURA 3.6). O gel foi corado em 40% (v/v) metanol, ácido acético a 10% e 0,5% de Coomassie Blue R-250, e descorado na mesma solução sem Coomassie.

Na ativação ocorre a auto-proteólise do pró-domínio a partir do zimógeno, que pode ser observada após este período de 2 h. A solução de aspecto leitoso se tornou límpida indicando a transformação do zimógeno inativo em domínio catalítico ativo e a completa proteólise do pró-domínio. Após a ativação, a enzima foi concentrada com o uso de concentradores Amicon de 10 kDa e sua atividade foi determinada. Por fim, alíquotas de 20µl da enzima foram congeladas e estocadas em tampão acetato à -80°C.

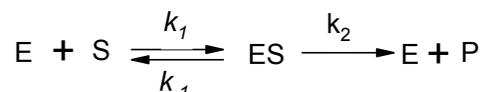
**FIGURA 3.6-** Análise em gel de eletroforese para acompanhar a ativação da cruzaina a partir da auto-proteólise do pró-domínio N-terminal.



Autoria: Adaptado de LEE, G. M. et al. Mapping Inhibitor Binding Modes on an Active Cysteine Protease via Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry*, 51 (50): 10087, 2012.

### 3.2.4- Ensaio cinéticos para determinação do $K_i$

O comportamento cinético para várias enzimas pode ser explicado por este simples modelo proposto:

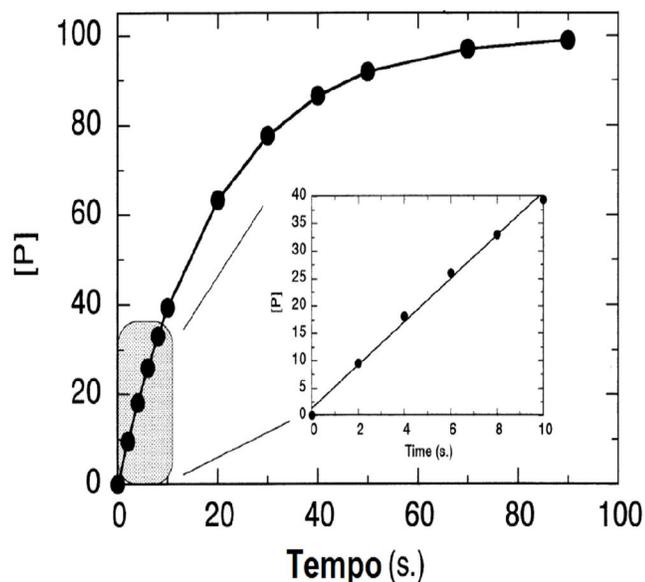


onde E é uma enzima, S é um substrato, P é um produto e ES é um complexo enzima-substrato. O processo ocorre em duas etapas, a primeira reversível e a outra irreversível. O termo  $k_1$  é a constante de velocidade de formação do complexo ES e  $k_{-1}$  é a constante de velocidade de dissociação do complexo ES. Neste modelo, o passo limitante da velocidade global da reação é a dissociação do complexo ES para formar o produto.<sup>54</sup>

Um dos principais fatores que afetam a velocidade de uma reação enzimática é a concentração do substrato ( $[S]$ ), mas é difícil avaliar os efeitos da  $[S]$  devido à variação que ocorre durante a reação, à medida que o substrato é convertido a produto. Uma abordagem utilizada em experimentos cinéticos é medir a velocidade inicial ( $V_0$ ) da reação, quando a  $[S]$  é muito maior do que a concentração de enzima. Sob essas condições assume-se que a  $[S]$  não é alterada significativamente, podendo ser considerada constante e a reação reversa não

contribui para a velocidade da reação. A  $V_0$  é a porção linear da reação enzimática (FIGURA 3.7), onde menos de 10% do substrato tenha sido consumido ou menos do 10% do produto tenha sido formado.<sup>55,56</sup>

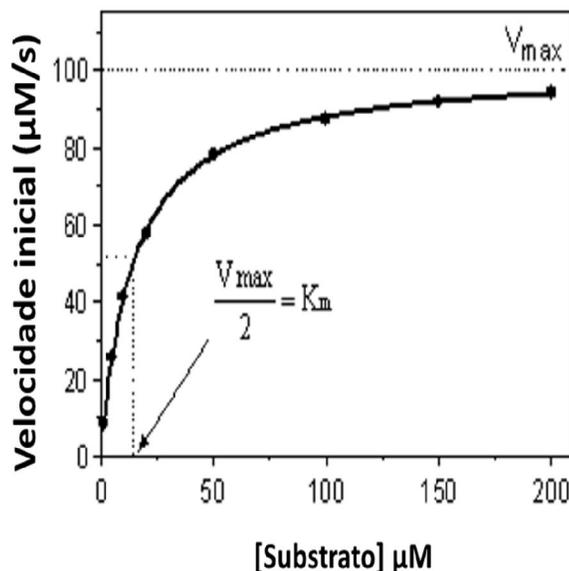
**FIGURA 3.7-** Curva de progresso da formação do produto durante uma reação enzimática, onde a porção linear corresponde a  $V_0$ .



Fonte: Adaptado de COPELAND, R.A. *Enzymes A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2a ed. Wiley-Interscience, 2000.

Quando se utiliza uma  $[S]$  em grande excesso em relação a concentração de enzima, diz-se que a reação enzimática está sob condições do estado estacionário. O estado estacionário refere-se ao período da reação enzimática durante o qual a velocidade de formação do complexo  $[ES]$  é exatamente igual a sua velocidade de dissociação a enzima e produtos, ou seja, quando a concentração do complexo  $[ES]$  permanece constante durante a reação. Em baixas concentrações de substrato a  $V_0$  aparenta ter um comportamento de pseudo-primeira ordem e aumenta quase linearmente com a  $[S]$  (FIGURA 3.8).<sup>57-59</sup>

FIGURA 3.8- Gráfico de Michaelis-Menten ( $V_0 \times [S]$ ).



Fonte: Adaptado de COPELAND, R.A. Enzymes A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, 2a ed. Wiley-Interscience, 2000.

A descrição matemática para o comportamento cinético das enzimas, que relaciona a velocidade da reação ( $V$ ) e a  $[S]$ , é referida como equação de Michaelis-Menten (Equação 3):

Equação 3:

$$v = \frac{[S] V_{\text{máx}}}{[S] + K_m}$$

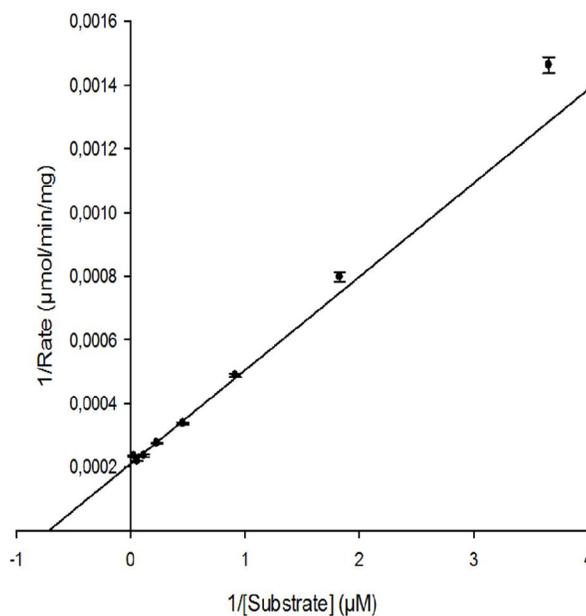
onde  $K_m$  é a constante de Michaelis-Menten, que é definida como a  $[S]$  para a qual a velocidade da reação enzimática é metade da velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ). Para determinar o valor de  $K_m$  deve-se acompanhar  $V_0$  de uma reação com concentrações de substrato no intervalo de 0,2 a 5,0 vezes o valor de  $K_m$ , com pelo menos 8 concentrações diferentes. A seguir a  $V_0$  é plotada versus a  $[S]$  (FIGURA 3.8), então a  $V_{\text{máx}}$  e o  $K_m$  podem ser calculados através de uma análise de regressão linear.<sup>56,58</sup>

A equação de Michaelis-Menten pode ser transformada na equação de Lineweaver-Burk (Equação 4). A partir dessa equação pode-se construir o gráfico chamado de duplo-recíproco ( $1/V_0$  vs  $1/[S]$ ; FIGURA 3.9), que é representado por uma linha reta onde a inclinação é  $K_m/V_{\text{máx}}$ , o intercepto no eixo y é  $1/V_{\text{máx}}$  e no eixo

x é  $-1/K_m$ . O gráfico duplo recíproco é útil para a visualização de diferentes mecanismos de ação enzimática e análise de inibidores.<sup>60,61</sup>

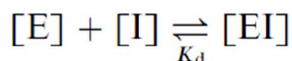
Equação 4: 
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

**FIGURA 3.9-** Gráfico duplo-recíproco ( $1/V_0 \times 1/[S]$ ).



Fonte: Autoria própria.

Existem duas classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis. Na maioria dos casos os inibidores se ligam de forma reversível as enzimas com rápidas velocidades de associação e dissociação. A potência relativa de um inibidor reversível é medida por sua capacidade de se ligar ao alvo enzimático. Esta é tipicamente quantificada através da constante de dissociação ( $K_d$ ) (Equação 5) para um complexo enzima-inibidor:



Equação 5: 
$$K_d = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

No caso particular das interações enzima-inibidor a constante de dissociação é frequentemente referida também como constante de inibição ( $K_i$ ). O valor de  $K_i$  de

um inibidor reversível pode ser determinado experimentalmente de várias maneiras. O meio mais comum consiste em avaliar o efeito do inibidor sobre a atividade catalítica da enzima, que pode ser realizado medindo-se a diminuição da  $V_0$  com o aumento da concentração de inibidor.<sup>58</sup>

Os inibidores reversíveis podem ser: competitivos, não-competitivos, incompetitivos ou parciais, dependendo do modo de ligação do inibidor ao alvo enzimático. O inibidor competitivo compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. O inibidor não-competitivo se liga a regiões diferentes do sítio e pode se ligar tanto a enzima livre quanto ao complexo ES, já os inibidores incompetitivos se ligam exclusivamente ao complexo ES. Na inibição parcial a enzima ainda é capaz de clivar o substrato mesmo com o inibidor ligado, embora a uma velocidade muito reduzida.<sup>58,61</sup>

O gráfico duplo-recíproco pode ser utilizado para determinar o tipo de inibição realizando-se experimentos sem a presença de inibidor e com diferentes concentrações de inibidor, que vão gerar um gráfico com um padrão de retas característico de cada tipo de inibição. No caso de um inibidor competitivo ao aumentar a concentração de inibidor serão obtidas retas que se interceptam no mesmo ponto do eixo  $1/V_0$ , mas que possuem diferentes inclinações (FIGURA 3.10). Como a intercepção no eixo y é igual a  $1/V_{máx}$ , então a  $V_{máx}$  não apresentará nenhuma mudança na presença de um inibidor competitivo. Devido às retas apresentarem inclinações diferentes será observado um aumento no valor do  $K_m$  aparente. A influência desses fatores na  $V_0$  é dada pela equação 6 ou pelo inverso desta equação (Equação 7).<sup>58,59,61</sup>

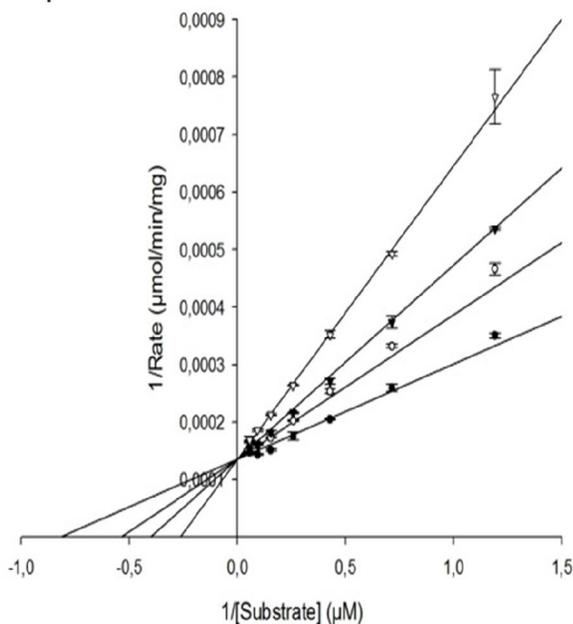
Equação 6:

$$v = \frac{V_{máx} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Equação 7:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{máx}} + \left(\frac{1}{[S]} \frac{K_m}{V_{máx}}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

**FIGURA 3.10-** Gráfico duplo-recíproco obtido com inibidor competitivo.



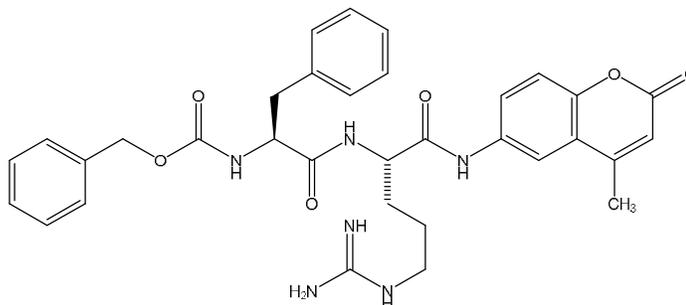
Fonte: Autoria própria.

Os ensaios enzimáticos são utilizados principalmente na descoberta de fármacos para estimar a potência dos compostos, o qual é geralmente expressa como  $IC_{50}$ , que é a concentração do composto necessária para inibir 50% da atividade enzimática nas condições do ensaio. No entanto, este parâmetro não mede a afinidade dos compostos pelo alvo assim como faz o  $K_i$ , mas expressa à capacidade de um composto para competir com um substrato presente no ensaio numa concentração definida. Para a maioria dos inibidores (exceto não competitivos), qualquer alteração na concentração do substrato encontrado no ensaio também irá resultar em uma alteração do  $IC_{50}$ , entretanto o  $K_i$  permanecerá o mesmo. Sendo assim a determinação do  $K_i$  é a mais adequada para se expressar a afinidade de um inibidor e mais confiável, por não depender das concentrações de substratos no ensaio. Além disso, não é possível comparar os valores de  $IC_{50}$  de ensaios determinados em diferentes  $[S]$ , sendo assim justifica-se comparar os valores de  $K_i$ .<sup>62</sup>

No ensaio realizado contra a cruzaina é utilizado um substrato peptídico ligado a um fluoróforo, o *N*-benzoxicarbonil-L-fenilalanila-L-arginina-7-amido-metil-cumarina (Z-Phe-Arg-MCA ou ZFRMCA) (FIGURA 3.11) que após ser hidrolisado pela enzima é liberado. A fluorescência do fluoróforo ligado ao substrato é monitorada no fluorímetro e aumenta intensamente quando esta porção é liberada,

sendo que a intensidade de fluorescência é linearmente proporcional à atividade da enzima.

**FIGURA 3.11-** Estrutura do substrato ZFRMCA.



Fonte: Autoria própria.

Os valores de  $K_m$  descritos na literatura para o substrato ZFRMCA estão entre 0,96 e 1,4  $\mu\text{M}$ .<sup>63,64</sup> No ensaio deve-se utilizar uma concentração de enzima necessária para que o  $K_m$  esteja dentro desse intervalo. A determinação do  $K_i$  foi realizada em tampão acetato de sódio 100 mM em pH 5,5 com 300 mM de NaCl, 0,01% de triton-X100, 5 mM de DTT e 5% de DMSO. A concentração de cruzaina utilizada foi de 0,15 nM e foram utilizadas 8 concentrações do substrato ZFRMCA, variando entre 30 a 0,11  $\mu\text{M}$  com um fator de diluição de 0.6.

Para selecionar as concentrações de inibidor que foram utilizadas no ensaio de  $K_i$  foi avaliado o efeito de várias concentrações de inibidor, com uma  $[S] = K_m$ . A partir destes resultados, foram escolhidas as concentrações de inibidor que inibirão de 30 a 75% da atividade enzimática.<sup>57</sup> Sendo assim, previamente a realização da determinação do  $K_i$  foi realizado um ensaio de percentual de inibição (%I), para determinar qual a concentração de inibidor deveria ser utilizada no ensaio de  $K_i$ . Como os inibidores são fragmentos, por isso há baixa afinidade enzimática, as concentrações de inibidor utilizadas foram de 2 mM, 1 mM, 500  $\mu\text{M}$  e 250  $\mu\text{M}$ . A concentração de enzima utilizada foi de 0,15 nM e de substrato 1,5  $\mu\text{M}$ . Todos os experimentos foram realizados no mínimo em duplicata.

No ensaio de determinação do  $K_i$  primeiramente os inibidores foram distribuídos em uma placa de 96 poços, nas concentrações determinadas previamente, dissolvidos em 100% de DMSO. A enzima foi incubada com a solução tampão, com DTT por 30 min, antes de adicioná-la a placa contendo os inibidores. Após adicionar a enzima à placa deixou-se incubando juntamente com os inibidores

por 2 min, então o substrato foi adicionado em sequência e a hidrólise do substrato foi acompanhada por fluorescência com excitação em 360 nm e emissão em 460 nm. A  $V_0$  da reação foi medida em cada poço durante um período de 5 min, considerando os 20 primeiros pontos da reta. Todos os experimentos foram feitos no mínimo em duplicata. A análise dos dados foi realizado no programa SigmaPlot 10.0 e o valor do  $K_i$  foi obtido utilizando-se um modelo competitivo.



# **CAPÍTULO 4**

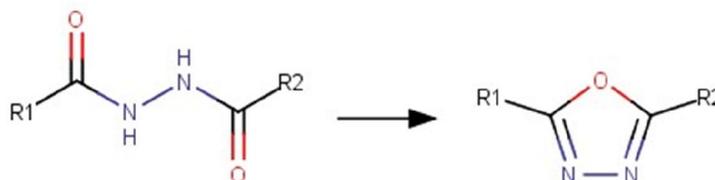
## **Resultados e Discussão**

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- SÍNTESE

Os materiais de partida mais comuns para a síntese de 1,3,4-oxadiazóis são derivados de hidrazida (FIGURA 4.1), que podem ser ciclizados sob várias condições.<sup>50</sup> Sendo assim inicialmente foi realizada a preparação da diacil-hidrazina que permitiu após sua ciclização a obtenção do Neq0617 e Neq0616.

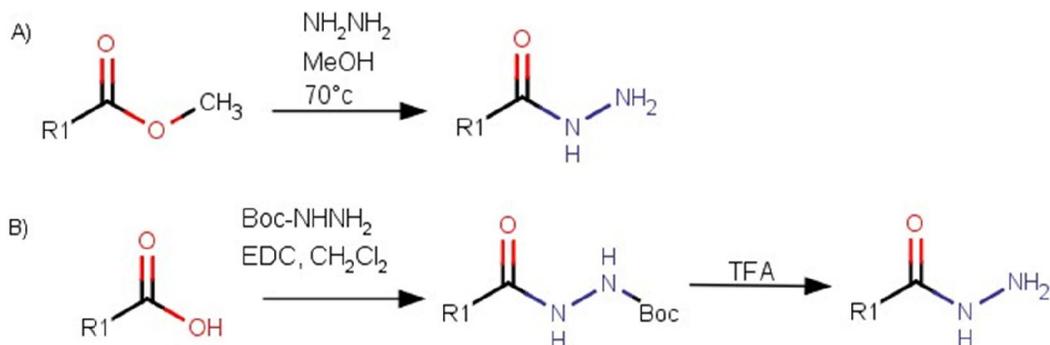
**FIGURA 4.1-** Síntese de 1,3,4-oxadiazol via diacil-hidrazida.



Fonte: Autoria própria

A diacil-hidrazida pode ser preparada sob condições de formação de ligação amida, através da reação de acoplamento da acil-hidrazina não substituída (R-NH-NH<sub>2</sub>) com um ácido carboxílico. O método mais relatado na literatura para a preparação de acil-hidrazinas é através da hidrazinólise direta de metil ésteres (FIGURA 4.2-A).<sup>47</sup> Este método não é muito atrativo devido a toxicidade e o perigo de explosão da hidrazina.<sup>47</sup> O uso da hidrazina pode ser contornado através de um protocolo de dois passos, no qual o ácido carboxílico é acoplado com a hidrazida Boc-protégida (carbazato de t-butila), seguida pela desproteção com TFA (FIGURA 4.2-B) e foi o método escolhido para a síntese da acil-hidrazida neste trabalho.<sup>47</sup>

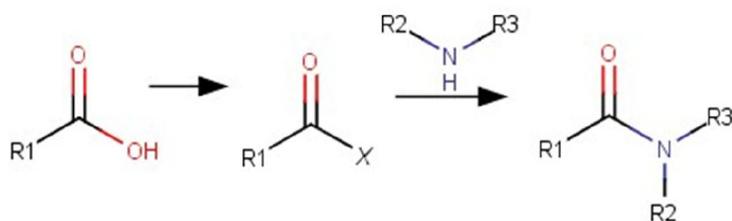
**FIGURA 4.2-** Síntese de acil-hidrazida via: A) hidrazinólise direta de metil ésteres; B) acoplamento com hidrazina Boc-prottegida seguido por desproteção com TFA.



Fonte: Adaptado de BRASLAU, R. et al. Acil-hidrazinas como precursors de radicais acil, *Tetrahedron*, **58**: 5513, 2002.

As reações de acoplamento consistem em primeiramente ativar o ácido carboxílico, pela conversão do grupo OH em um bom grupo abandonador antes do tratamento com a amina (FIGURA 4.3). Podem ser utilizados para ativar o ácido carboxílico os chamados reagente de acoplamento, que irão levar a formação de compostos como cloretos ácidos, anidridos (simétricos ou mistos), anidridos carbônicos ou ésteres ativados.<sup>51</sup>

**FIGURA 4.3-** Reação de acoplamento para formação de ligação amida.

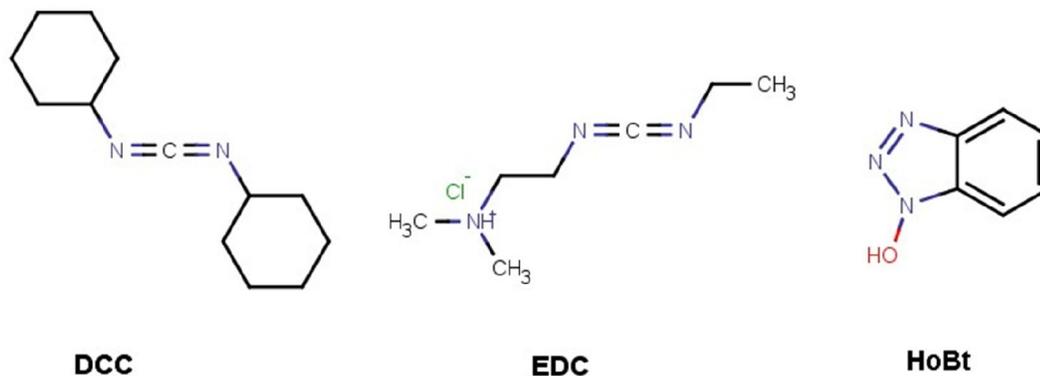


Fonte: Adaptado de VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents, *Chemical Societe Reviews*, **38**: 606, 2009.

As carbodiimidas são reagentes de acoplamento utilizados principalmente na síntese de peptídeos. A carbodiimida mais utilizada é a diciclo-hexilcarbodiimida (*DCC*- FIGURA 4.4) e leva a formação de um precipitado, a *N,N*-diciclo-hexiluréia (*DCU*). No entanto, quando se utiliza o *DCC* em solução é difícil remover traços de *DCU*, então a *DCC* tem sido substituída por outros reagentes como o *EDC* (FIGURA 4.4). O *EDC* é adequado para ser utilizado em solução,

porque o reagente e sua uréia são solúveis na fase aquosa podendo ser removidos no *workup*. Devido a essas vantagens o reagente de acoplamento utilizado nas reações de acoplamento foi o *EDC*.<sup>52</sup>

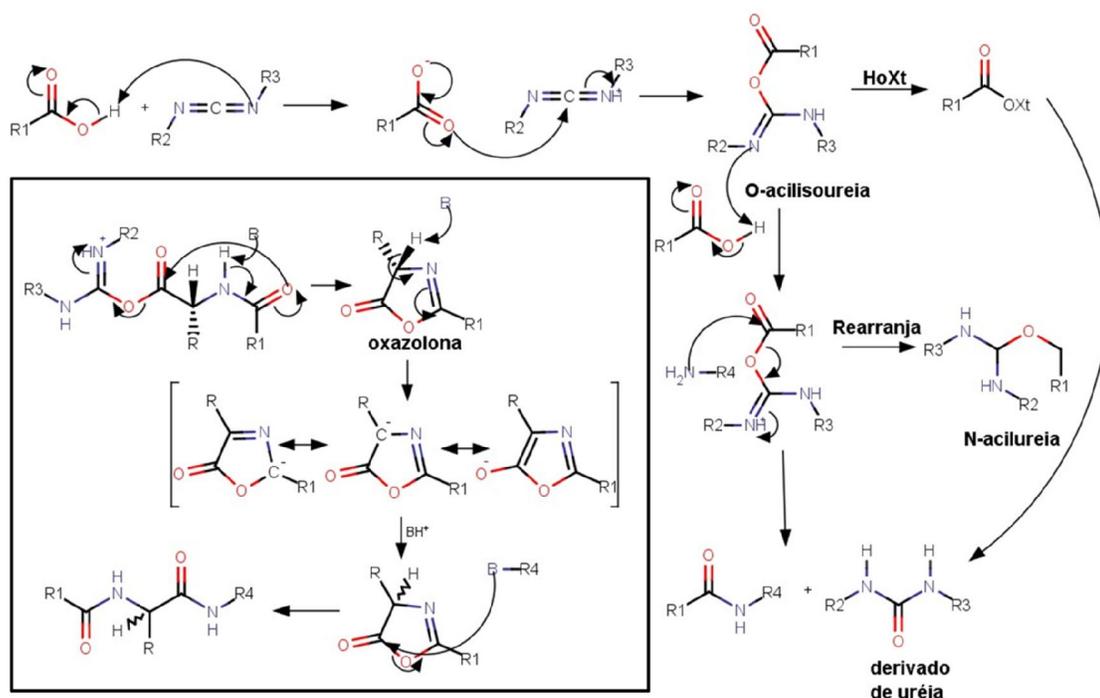
**FIGURA 4.4-** Estruturas do *DCC*, *EDC* e *HoBt*.



Fonte: Autoria própria.

A reação entre a carbodiimida e o ácido leva a formação da *O*-acilisoureira (FIGURA 4.5). A *O*-acilisoureira é um espécie reativa, que rapidamente sofre aminólise na presença de uma amina levando a formação da ligação amida. A *O*-acilisoureira pode ciclizar a uma oxazolona levando a racemização do produto, quando se utiliza aminoácidos como matérias de partida. Outra reação indesejada que pode ocorrer é o rearranjo da *O*-acilisoureira, levando a formação da *N*-acilureia, uma forma inerte e estável. Nas reações de acoplamento com carbodiimidas são frequentemente utilizados aditivos derivados *N*-hidroxi (HoBx), como o *HoBt* (FIGURA 4.4), que reagem com *O*-acilisoureira levando a formação do éster ativado. Esses aditivos aumentam a eficiência das reações mediadas por carbodiimidas, pois suprimem a formação de *N*-acilureias e ainda são capaz de prevenir a reação intramolecular, diminuindo também o grau de racemização. O *HoBt* foi utilizado nas reações de acoplamento realizadas juntamente com o *EDC*.<sup>52</sup>

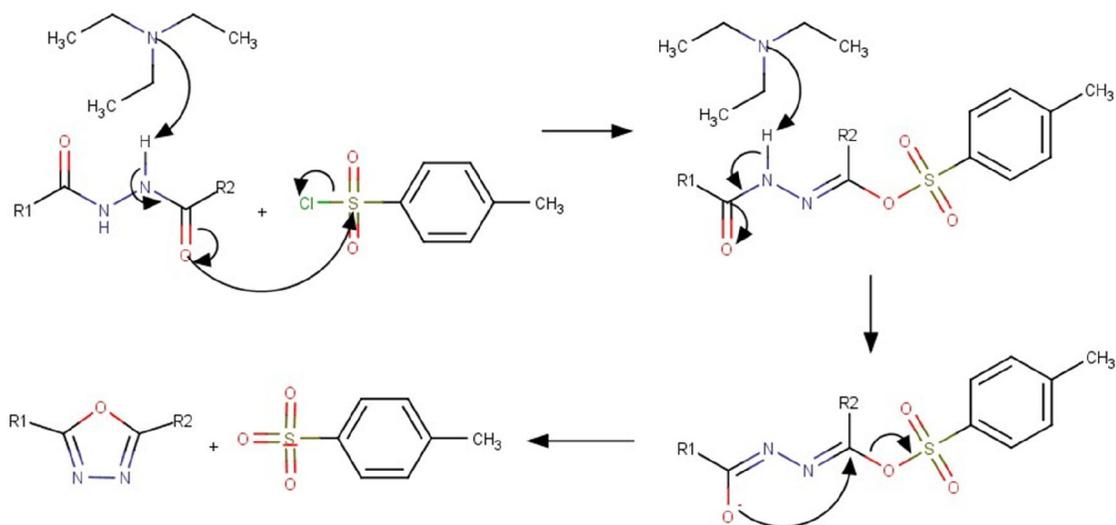
FIGURA 4.5- Mecanismo da reação de acoplamento com carbodiimida.



Fonte: Adaptado de EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup, Chemical Reviews, **111**: 6557, 2011.

Entre os vários métodos descritos para a síntese de 1,3,4-oxadiazóis o mais frequentemente utilizado é a reação de ciclodesidratação de 1,2-diacilhidrazinas utilizando reagentes desidratantes, sendo que os mais empregados são o  $\text{SOCl}_2$  e  $\text{POCl}_3$ . Entretanto, esses reagentes requerem a utilização de condições severas, como altas temperaturas e grande excesso de agente desidratante. O *p*-TsCl é um reagente relativamente barato, não tóxico, medeia à reação de ciclodesidratação na presença de uma base terciária, como  $\text{Et}_3\text{N}$ , e ainda possibilita a utilização de condições brandas, como t.a.. Portanto o método escolhido para ser empregado foi a reação de ciclodesidratação com *p*-TsCl e  $\text{Et}_3\text{N}$ . O mecanismo proposto para esta reação está ilustrado na FIGURA 3.6.<sup>53</sup>

**FIGURA 4.6-** Mecanismo da ciclodesidratação com *p*-TsCl e Et<sub>3</sub>N.



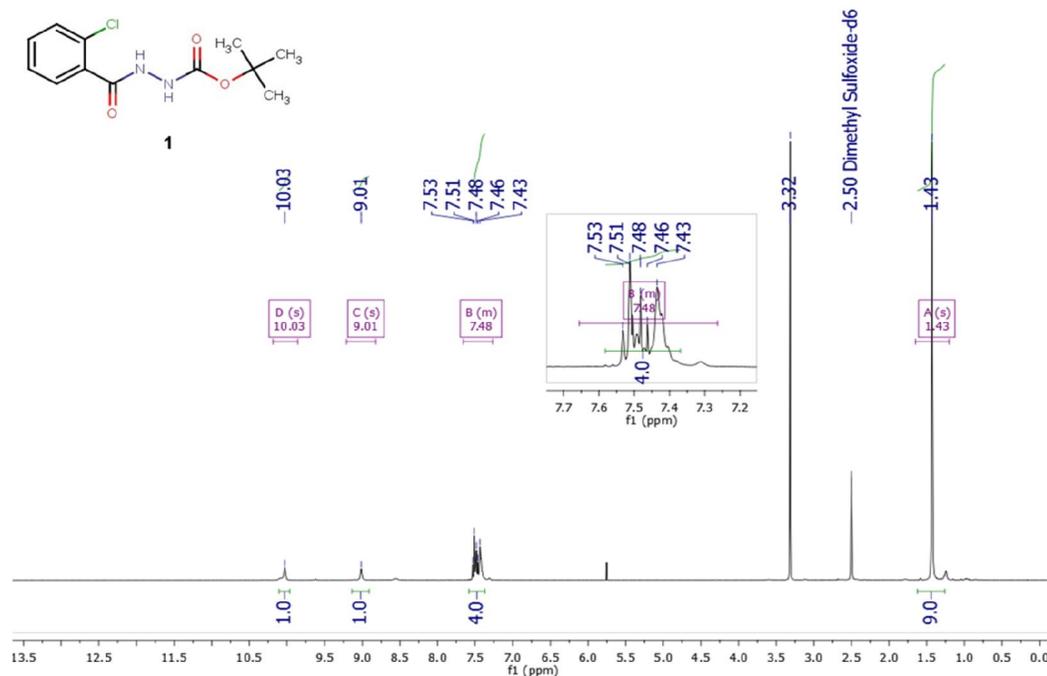
Fonte: Autoria própria.

Os compostos sintetizados foram caracterizados por RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, espectroscopia de massas e ponto de fusão.

#### 4.1.1- Caracterização do composto Neq0617

O composto 1 foi sintetizado pela reação de acoplamento do ácido 2-clorobenzóico com o carbazato de *tert*-butila e pode-se evidenciar a sua formação através de seu espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 4.7). O pico A corresponde aos hidrogênios das metilas (9H), o pico B pertence aos hidrogênios do anel aromático (4H) e os picos C e D são os hidrogênios dos nitrogênios da hidrazida.

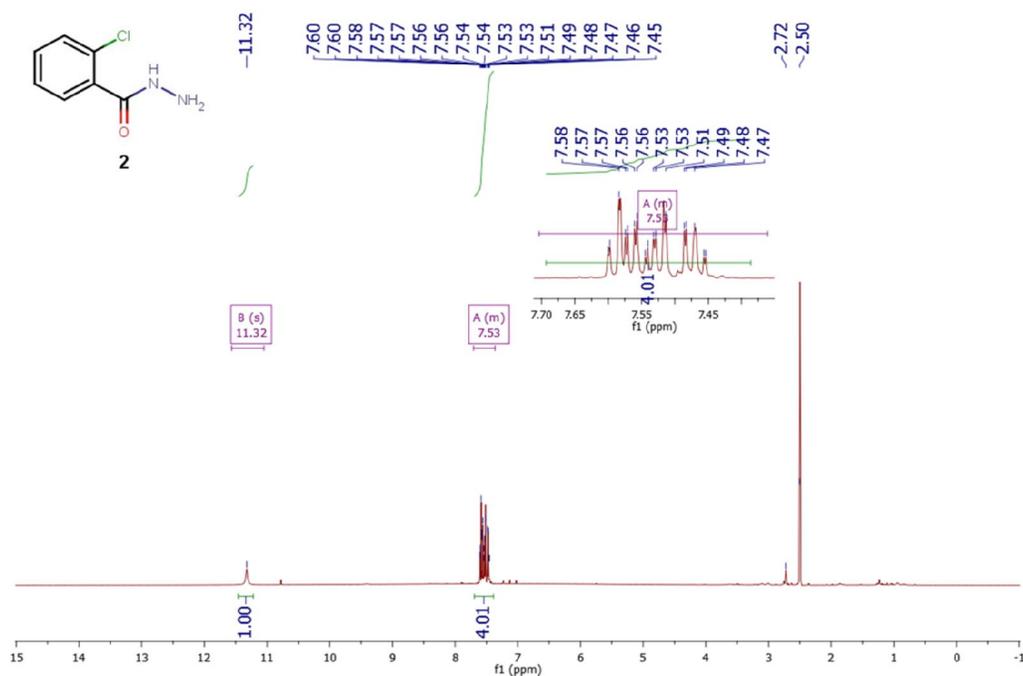
**FIGURA 4.7-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto 1.



Fonte: Autoria própria

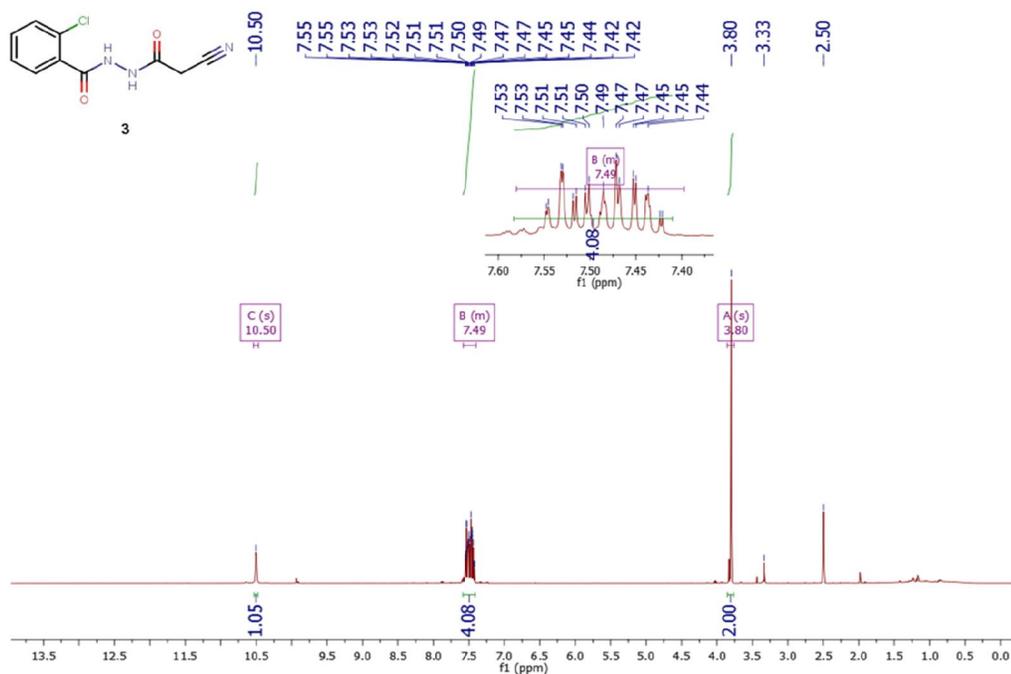
Depois o composto 1 sofreu uma reação de desproteção com o TFA originando o composto 2, pode-se observar em seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.8) que ocorreu o desaparecimento dos hidrogênios do grupo protetor Boc. Os hidrogênios do  $\text{NH}_2$  não estão presentes no espectro, porque frequentemente os picos  $-\text{NH}$  são largos, fracos e sem nenhum acoplamento com hidrogênios do carbono adjacente. Este efeito ocorre por troca de prótons ou pela propriedade dos átomos de nitrogênio, chamada de alargamento quadrupolar. Em seguida, foi realizado o acoplamento do composto 2 com o ácido cianoacético levando a formação do composto 3. Em seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.9) estão presentes os hidrogênios do  $\text{CH}_2$  no pico A (2H), mas apareceu apenas um hidrogênio  $-\text{NH}$  possivelmente devido a troca de prótons.

**FIGURA 4.8-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto 2.



Fonte: Autoria própria

**FIGURA 4.9-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto 3.

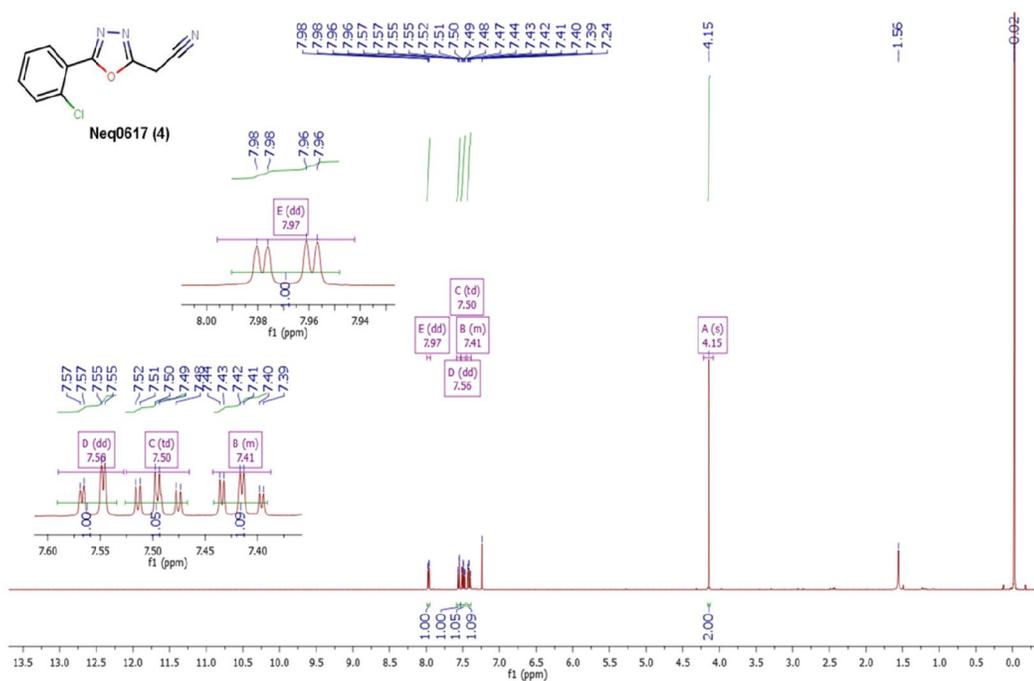


Fonte: Autoria própria

Por fim foi realizada a reação de cicledesidratação do composto 3 para levar a formação do composto Neq0617. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Neq0617

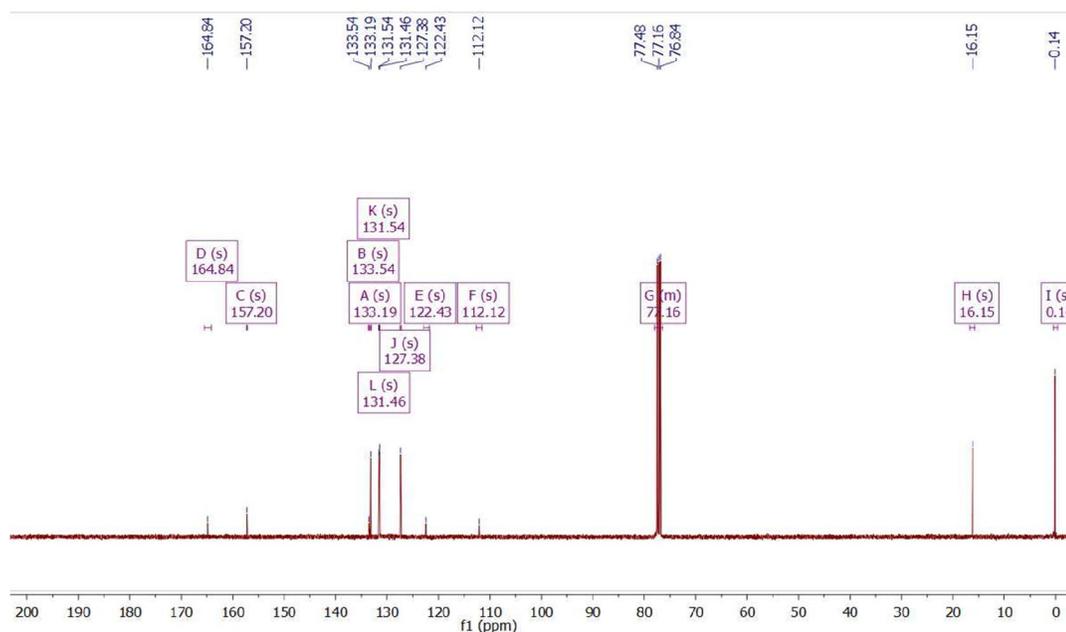
(FIGURA 4.10) apresenta os sinais B, C, D e E que correspondem aos hidrogênios do anel aromático e o A que corresponde aos dois hidrogênios metilênicos (ESQUEMA 4.1). Os picos B e C são dois tripletos de dubletos (td), então correspondem a hidrogênios acoplados a dois hidrogênios. Os picos D e E são dois dupletos de dubletos (dd), portanto devem pertencer a hidrogênios que estão acoplados a um próton. O pico E pertence ao hidrogênio do anel aromático mais desblindado que corresponde ao que está mais próximo do anel heterocíclico e do átomo de cloro. Como a constante de acoplamento (J) dos prótons C e E são iguais indicam que estes hidrogênios estão acoplados. No espectro de RMN<sup>13</sup>C todos os carbonos do composto estão presentes (FIGURA 4.11)

**FIGURA 4.10**– Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do Neq0617.



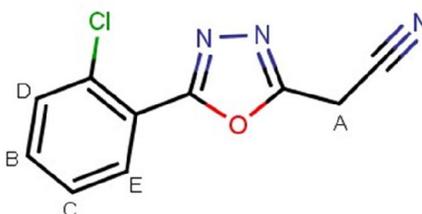
Fonte: Autoria própria.

**FIGURA 4.11-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do Neq0617.



Fonte: Autoria própria.

**ESQUEMA 4.1-** Atribuição das sinais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância Neq0617.

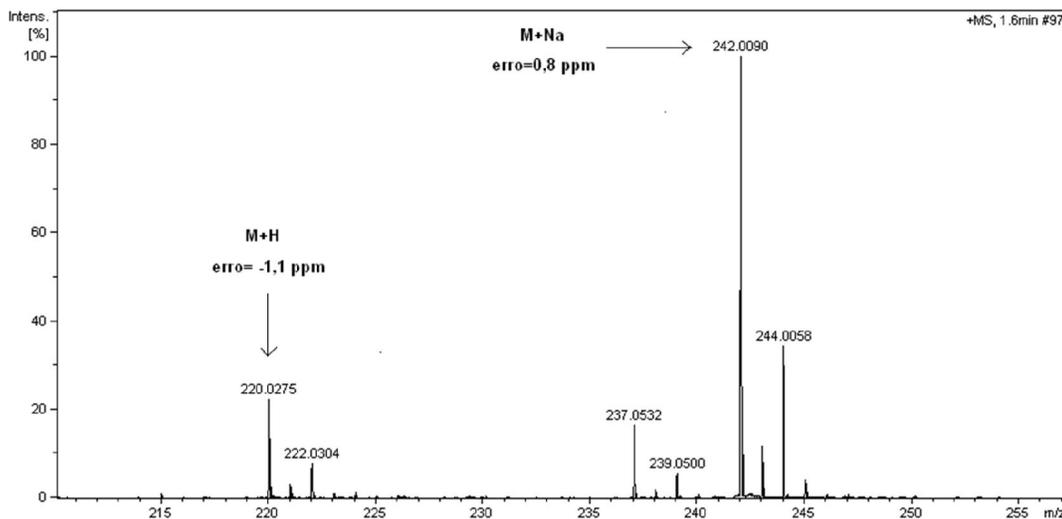


Próton	$\delta$	J (multiplicidade)	Carbono	$\delta$	Atribuição
A	4,15	(s; 2H)	1	16,15	$\text{CH}_2$
B	7,38	(m; 1H)	2	112,12	Carbono da nitrila
C	7,50	$J^3 = 7,7$ ; $J^4 = 1,7$ (td; 1H)	3	122,43	Carbono aromático
D	7,56	$J^3 = 8,1$ ; $J^4 = 1,3$ (dd; 1H)	4	127,38	Carbono aromático
E	7,97	$J^3 = 7,8$ ; $J^4 = 1,7$ (dd; 1H)	5	131,46	Carbono aromático
			6	131,54	Carbono aromático
			7	133,19	Carbono aromático
			8	133,54	Carbono aromático
			9	157,20	Carbono do oxadiazol
			10	164,84	Carbono do oxadiazol

Fonte: Autoria própria.

O pico do íon molecular  $[M+1]$  e do aduto de sódio  $[M+Na]$  estão presentes no espectro de massas do Neq0617 (FIGURA 4.12), além dos picos isotópicos  $[M+2]$ .

**FIGURA 4.12-** Espectro de massas de alta resolução do Neq0617 (ESI/QqTOF-MS).



Fonte: Autoria própria.

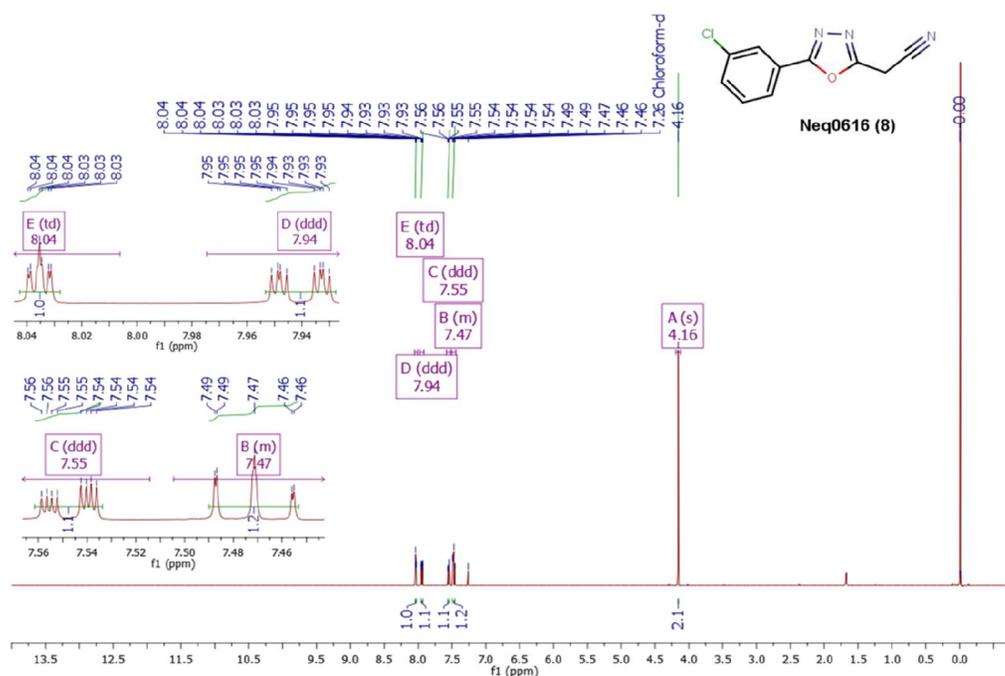
A pureza foi determinada via *HPLC* e composto apresentou uma %A > 95, o cromatograma está presente no Apêndice.

#### 4.1.2- Caracterização do composto Neq0616

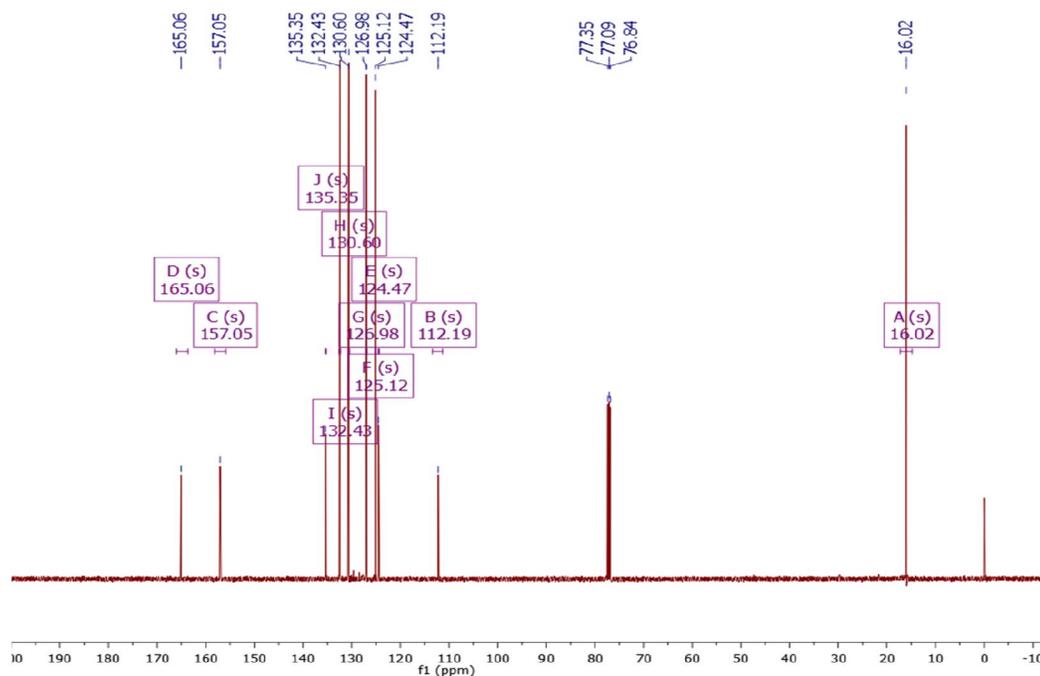
No espectro de RMN  $^1H$  do Neq0616 (FIGURA 4.13) os hidrogênios do anel aromático correspondem aos picos B, C, D e E, enquanto que o pico A pertence aos hidrogênios do  $CH_2$  (ESQUEMA 4.2). O pico E corresponde ao hidrogênio vizinho ao átomo de cloro, pois é o próton mais desblindado e também não possui acoplamento *orto* com outros prótons como pode ser observado pelos valores de suas constantes de acoplamento (ESQUEMA 4.2). Os picos C e D são dois dupletos de duplo dubletos (ddd), então correspondem a prótons acoplados a um hidrogênio. No entanto, o próton D que é o mais desblindado, corresponde ao hidrogênio vizinho ao átomo de cloro, pois o cloro é um grupo retirador de elétrons por efeito indutivo. O

pico B é um tripleto de dubletos sendo assim corresponde ao próton que está acoplado a dois hidrogênios. No espectro de RMN<sup>13</sup>C todos os carbonos do composto estão presentes (FIGURA 4.14). No espectro de massas (FIGURA 4.15) há a presença do pico do íon molecular [M+1] e o pico isotópico [M+2]. A pureza foi determinada via *HPLC* e o composto apresentou uma %A > 95, o cromatograma está presente no Apêndice.

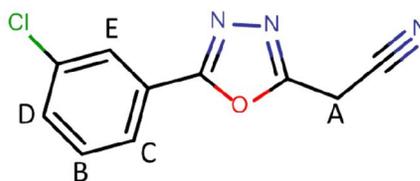
**FIGURA 4.13-** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do Neq0616.



Fonte: Autoria própria.

**FIGURA 4.14-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do Neq0616.

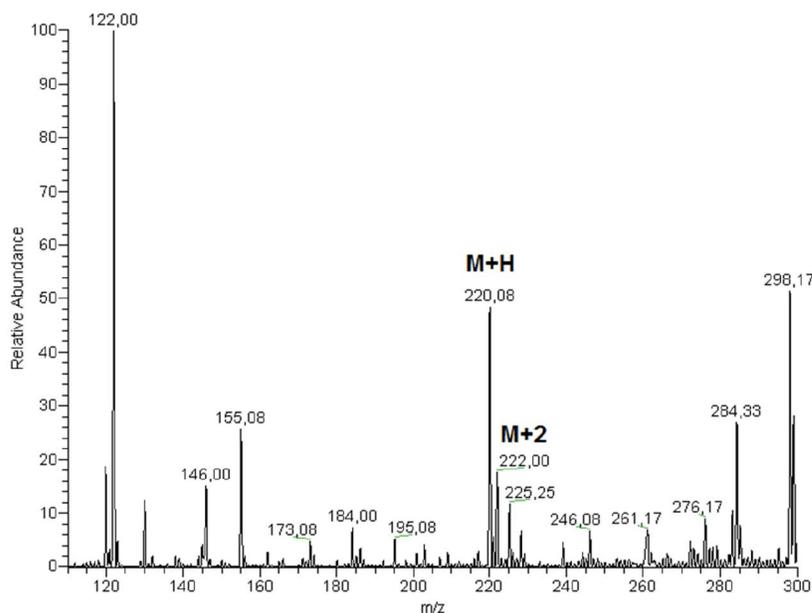
Fonte: Autoria própria.

**ESQUEMA 4.2-** Atribuição das sinais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância Neq0616.

Próton	$\delta$	J (multiplicidade)	Carbono	$\delta$	Atribuição
A	4,16	(s; 2H)	1	16,02	$\text{CH}_2$
B	7,47	(m; 1H)	2	112,19	Carbono da nitrila
C	7,55	$J^3 = 8,1; J^4 = 2,1; J^4 = 1,1$ (ddd; 1H)	3	124,47	Carbono aromático
D	7,94	$J^3 = 7,8; J^4 = 1,6; J^4 = 1,1$ (ddd; 1H)	4	125,12	Carbono aromático
E	8,04	$J^4 = 1,9; J^5 = 0,4$ (td; 1H)	5	126,98	Carbono aromático
			6	130,60	Carbono aromático
			7	132,43	Carbono aromático
			8	135,35	Carbono aromático
			9	157,05	Carbono do oxadiazol
			10	165,06	Carbono do oxadiazol

Fonte: Autoria própria.

**FIGURA 4.15-** Espectro de massas de baixa resolução do Neq0616 (ESI/QqTOF-MS)..



Fonte: Autoria própria.

## 4.2- ENSAIOS CINÉTICOS

De modo geral os fragmentos possuem baixa afinidade pelo alvo (milimolar a elevado micromolar), portanto é essencial encontrar um método que possua sensibilidade adequada para a detecção de interações fracas.<sup>39</sup> O risco de se enganar com artefatos experimentais é maior quando trabalha-se com fragmentos.<sup>65</sup>

Os ensaios realizados com fragmentos requerem a utilização de altas concentrações, no entanto alguns compostos quando são testados em altas concentrações em tampões aquosos podem formar agregados microscópicos levando a uma inibição não seletiva de várias enzimas, referida como agregação promíscua. A maneira mais fácil de evitar esse problema é a adição de um detergente não iônico como o Triton-X100 ou Tween no ensaio. Além disso, os ensaios enzimáticos são realizados em tampões aquosos com 5% de DMSO, portanto os fragmentos para que possam ser testados em elevadas concentrações requerem elevada solubilidade.<sup>39,65</sup>

O parâmetro utilizado para avaliar a atividade dos inibidores foi o  $K_i$ . A preferência pela utilização do  $K_i$  ao invés do  $IC_{50}$  deve-se ao fato de que no ensaio de  $IC_{50}$  são utilizadas várias concentrações de inibidor, sendo necessário no caso dos fragmentos utilizar concentrações extremamente altas impossibilitando a realização dos ensaios devido a insolubilidade. Entretanto, no ensaio cinético realizado para determinar o  $K_i$  a concentração de inibidor utilizada é constante e o que varia é a concentração do substrato. Além disso, como discutido anteriormente o  $K_i$  é um parâmetro mais apropriado do que o  $IC_{50}$ , que pode variar conforme as condições utilizadas no ensaio.

Os valores de  $K_i$ , desvio padrão ( $SD$ ) e o intervalo de confiança de 95% obtidos a partir dos ensaios cinéticos estão apresentados na TABELA 4.1, sendo que os inibidores que apresentaram  $K_i \geq 3$  mM foram considerados inativos. Os gráficos de Michaelis-Mente e Lineweaver-Burk obtidos nos ensaios cinéticos estão presentes no Apêndice.

**TABELA 4.1-** Resultados da constante de inibição ( $K_i$ ).

ID	$K_i \pm SD$ ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo de confiança de 95% ( $\mu\text{M}$ )
Neq0558	2485,39 $\pm$ 441,117	1583,19 a 3.387,60
Neq0555	1074,25 $\pm$ 134,704	798,744 a 1349,75
Neq0596	1626,2 $\pm$ 105,20	1411,1 a 1841,2
Neq0601	>3000	
Neq0559	>3000	
Neq0560	1823,61 $\pm$ 248,2671	1315,83 a 2331,38
Neq0556	65,27 $\pm$ 4,468	56,40 a 74,15
Neq0557	133,15 $\pm$ 11,082	111,14 a 155,16
Neq0598	2064,0 $\pm$ 398,50	1249,0 a 2879,0
Neq0599	242,9 $\pm$ 20,76	200,3 a 285,5
Neq0617	64,47 $\pm$ 3,954	56,38 a 72,55
Neq0561	268,06 $\pm$ 22,942	221,14 a 314,99
Neq0602	304,85 $\pm$ 27,657	248,29 a 361,42
Neq0597	340,62 $\pm$ 43,831	250,97 a 430,27
Neq0600	1134,5 $\pm$ 75,900	979,30 a 1289,8
Neq0603	250,0 $\pm$ 25,90	197,00 a 303,00
Neq0616	702,0 $\pm$ 101,00	498,60 a 905,50

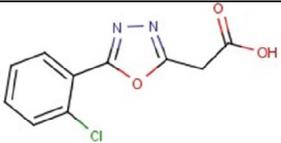
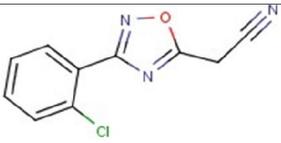
Parâmetros estatísticos: Graus de liberdade 93; Valores do teste  $p < 0.001$ ; Soma dos quadrados 4,470 e<sup>+6</sup>;  $Sy.x$  219,242 e AICc 1.040,306. Fonte: Autoria própria.

### 4.3- AVALIAÇÃO DA SAR

Para discutir os resultados obtidos e avaliar a SAR os compostos foram separados em grupos que apresentassem o mesmo padrão de substituição no anel aromático. Além disso, os compostos também foram comparados com seus análogos que apresentavam o átomo de cloro em diferentes posições.

A primeira hipótese consistia na substituição do grupo carboxilato do Neq0147 ( $K_i = 910,91 \mu\text{M}$ ;  $LE = 0,26$ ) por um grupo nitrila dando origem ao Neq0617 (TABELA 4.2), o que levou a um elevado ganho de afinidade cerca de 14 vezes a do fragmento inicial (Neq0147). Esse aumento da afinidade foi devido à capacidade da nitrila em ligar-se de forma covalente reversível com a cisteína catalítica, que é uma interação mais forte do que as ligações de hidrogênio que ocorrem com carboxilato. Consequentemente, foi observada uma maior  $LE$  ( $LE = 0,40 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{atom}^{-1}$ ), ou seja, o Neq0617 possui uma alta eficiência de interação.

TABELA 4.2- Valores de  $K_i$ ,  $pK_i$  e  $LE$  dos compostos *orto*-substituídos.

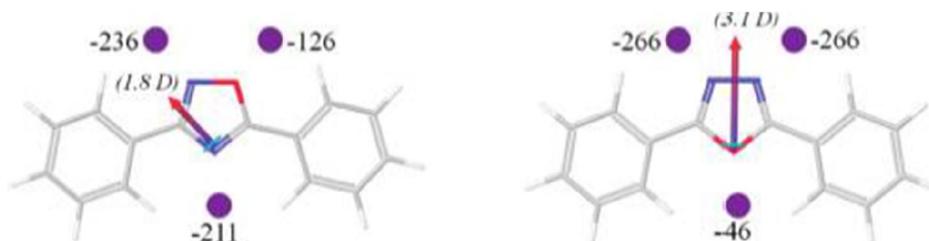
ID	Estrutura	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$pK_i$	$LE$ ( $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{atom}^{-1}$ )
Neq0147		$910,91 \pm 52,6$	3,04	0,26
Neq0617		$64,47 \pm 3,954$	4,19	0,40
Neq0561		$268,062 \pm 22,942$	3,57	0,34

Fonte: Autoria própria.

O Neq0561 contém o anel 1,2,4-oxadiazol que é regioisômero do 1,3,4-oxadiazol, mas apresentou uma menor afinidade do que o Neq0617. Apesar desses anéis serem virtualmente idênticos possuem diferente distribuição de cargas (FIGURA 4.16).<sup>50</sup> Os nitrogênios do anel 1,3,4-oxadiazol possuem maiores valores

negativos de potencial eletrostático mínimo ( $V_{\min}$ ), que é utilizado como um preditor da força do *HBA*, do que os do anel 1,2,4, então os nitrogênios do anel 1,3,4 são melhores grupos *HBA* do que os do 1,2,4.<sup>50</sup> Sendo assim o Neq0617 pode ter apresentado maior afinidade do que seu regioisomero Neq0561 devido os nitrogênios presente em seu anel serem melhores *HBA*.

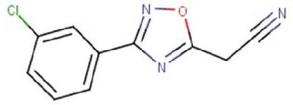
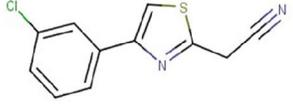
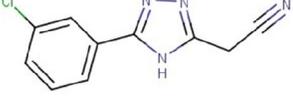
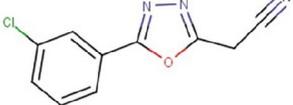
**FIGURA 4.16-** Ilustração mostrando que os dois nitrogênios do 1,3,4-oxadiazol são melhores aceitadores de ligação de hidrogênio (maiores valores negativos de  $V_{\min}$ )



Fonte: BOSTRÖM, J.; HOGNER, A.; LLINÀS, A.; WELLNER, E.; PLOWRIGHT, A. T. "Oxadiazoles in Medicinal Chemistry", *Journal of Medicinal Chemistry*, 55 (5): 1817, 2012.

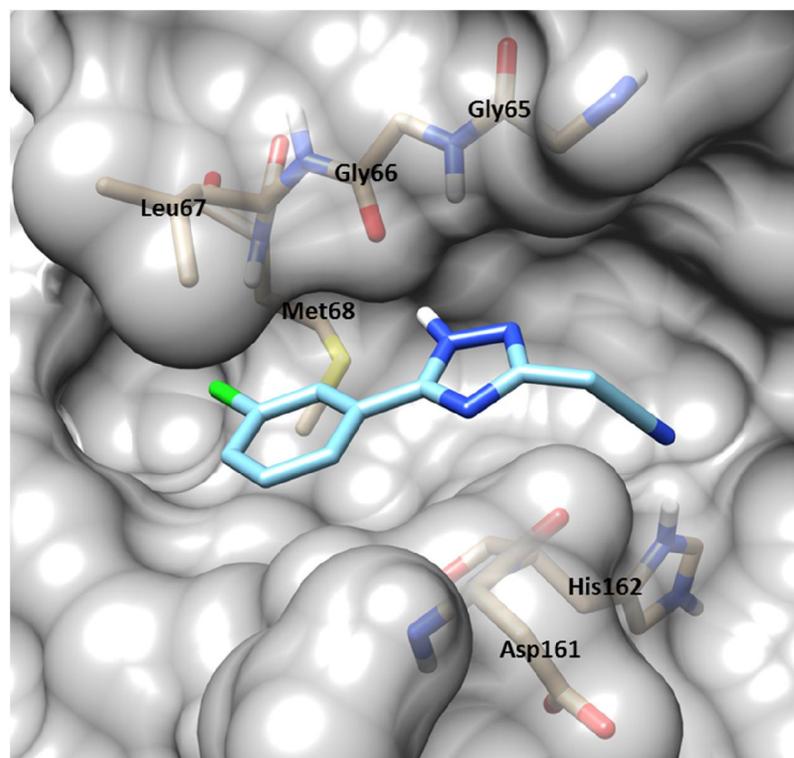
Os compostos apresentados na TABELA 4.3 diferem entre si apenas por seu anel heterocíclico, permitindo assim avaliar qual o efeito de tal porção da molécula. A intenção de substituir o anel 1,3,4-oxadiazol por outros anéis heterocíclicos de cinco membros era explorar interações com o *Asp161* e a *Gly65*. Desta forma o anel ideal para interagir com esses resíduos de aminoácidos seria o triazol (Neq0600), pois apresenta dois *HBA* e um *HBD* que poderiam interagir com os resíduos *Gly66*, *Gly65*, e *Asp161*, respectivamente (FIGURA 4.17).

TABELA 4.3- Valores de  $K_i$ ,  $pK_i$  e  $LE$  dos compostos *meta*-substituídos.

ID	Estrutura	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$pK_i$	$LE$ ( $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{atom}^{-1}$ )
Neq0602		$304,85 \pm 27,657$	3,52	0,33
Neq0597		$340,62 \pm 43,831$	3,47	0,33
Neq0600		$1134,5 \pm 75,900$	2,94	0,28
Neq0616		$702,0 \pm 101,00$	3,15	0,29

Fonte: Autoria própria.

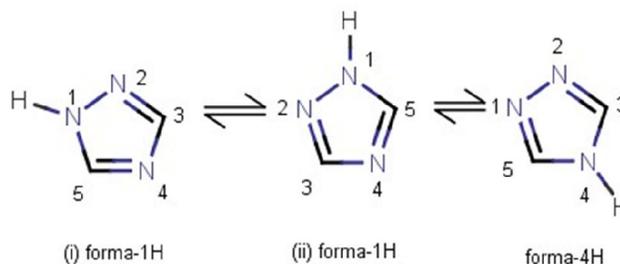
FIGURA 4.17- Docagem do composto Neq0600 com a cruzaina



Fonte: Autoria própria.

Porém, quando comparado com os demais compostos da série o Neq0600 apresentou uma baixa afinidade. Provavelmente por conta do fenômeno de tautomerização (FIGURA 4.18) impossibilitando determinar qual a forma que estaria em maior proporção, sendo que apenas uma delas permitiria a formação das interações desejadas (forma-4H).

**FIGURA 4.18-** Tautomerização do anel triazol.



Fonte: Fonte: Autoria própria.

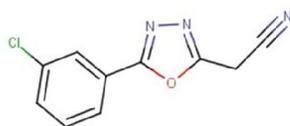
O Neq0597 (TABELA 4.3) apresentou menor afinidade em relação ao composto que possui o anel 1,2,4-oxadiazol (Neq0602). O comprimento da ligação C-S é maior do que da ligação C-O, isto pode ter provocado a perda de interações que ocorriam com o anel oxadiazol devido ao maior comprimento de ligação o anel triazol apresentaria uma orientação diferente.

O Neq0616, que apresenta o 1,3,4-oxadiazol, foi menos afim do que o Neq0602 que é seu regioisômero, ao contrário do que foi observado quando esses compostos apresentam o átomo de cloro em *orto*, anteriormente discutido. Possivelmente, quando o átomo de cloro está em *meta* a molécula adota uma orientação no sítio ativo da enzima, que torne mais favorável interações com o anel 1,2,4-oxadiazol do que com o 1,3,4 levando o Neq0602 ter maior afinidade.

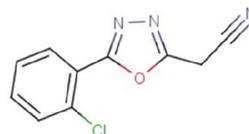
No entanto, quando se compara o Neq0616 com o Neq0617 (FIGURA 4.19), que se diferem apenas pela posição do cloro, pode-se observar que a presença do cloro em *orto* provavelmente permitiu que ocorressem interações do tipo ligação de halogênio com a *Met68*. Esse tipo de interação não é possível quando o cloro está na posição *meta*, levando o inibidor Neq0617 a apresentar uma maior afinidade. Os compostos Neq0602 e Neq0597 apesar de terem menor afinidade que o Neq0617 são potenciais candidatos a otimização, pois um fragmento

para ser selecionado para otimização requer tem uma  $LE \geq 0,3$  e estes compostos apresentaram  $LE = 0,33$ .

**FIGURA 4.19-** Estruturas,  $K_i$  e  $pK_i$  dos compostos Neq0616 e Neq0617



**Neq0616**  
 $K_i = 702,0 \pm 101,00$   
 $pK_i = 3,15$



**Neq0617**  
 $K_i = 64,47 \pm 3,95$   
 $pK_i = 4,19$

Fonte: Autoria própria

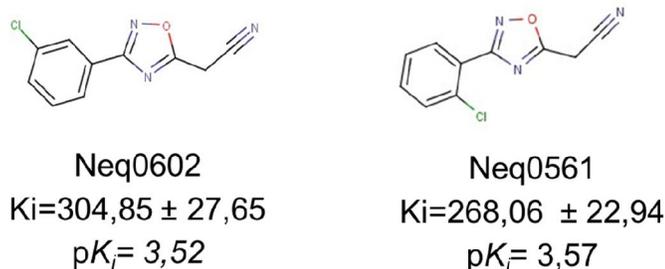
Ao analisar o efeito do cloro na posição *para*, nota-se que o Neq0599 (TABELA 4.4) apresentou maior afinidade do que o Neq0598. Essa alteração pode ser explicada pela perda de uma possível ligação de hidrogênio do anel tiazol com a cadeia principal da *Gly66*, que pode ajudar na estabilização da molécula e possibilitar que as outras interações ocorram justificando assim sua menor afinidade. Comparando o Neq0599 com seus análogos (Neq0602 e Neq0561; FIGURA 4.20), que possuem o cloro nas posições *meta* e *orto*, observamos que os compostos de maior afinidade foram os que apresentam o cloro em *orto* e *para*.

**TABELA 4.4-** Valores de  $K_i$ ,  $pK_i$  e  $LE$  dos compostos *para*-substituídos

ID	Estrutura	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$pK_i$	$LE$ ( $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{atom}^{-1}$ )
Neq0598		$2064,0 \pm 398,50$	2,68	0,25
Neq0599		$242,9 \pm 20,76$	3,61	0,34

Fonte: Autoria própria.

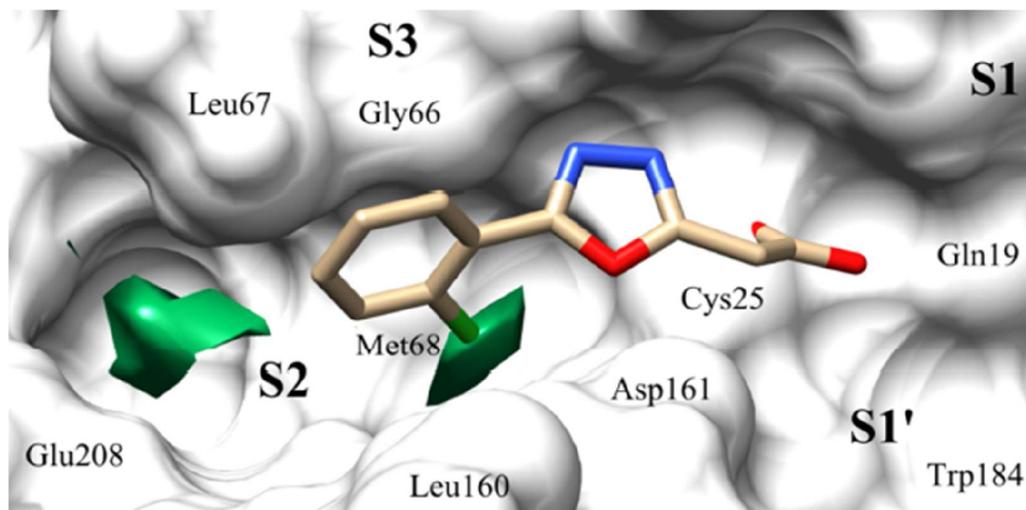
**FIGURA 4.20-** Estruturas,  $K_i$  e  $pK_i$  dos compostos Neq0602 e Neq0561.



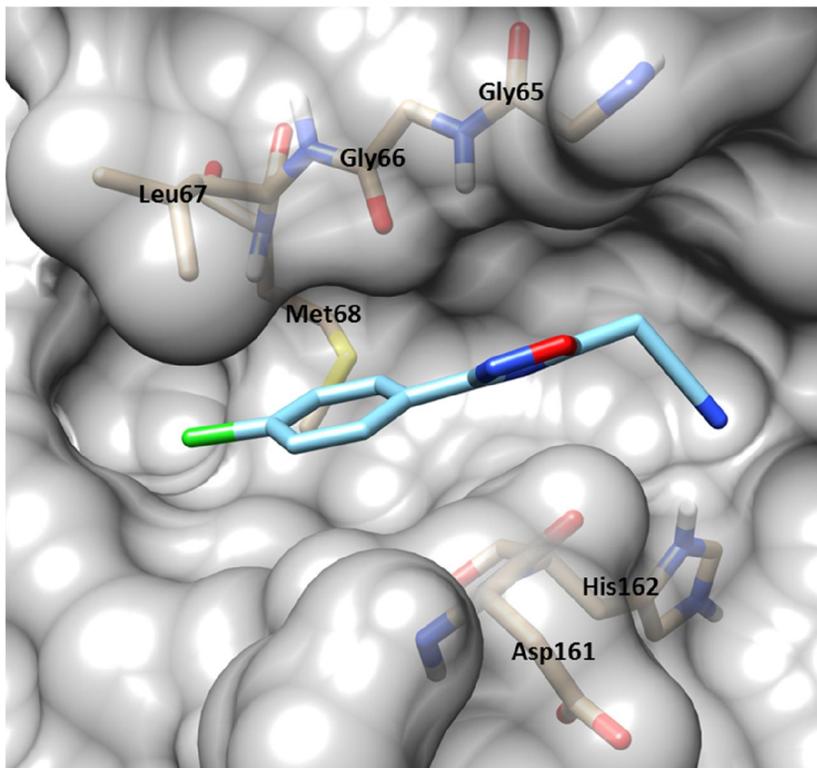
Fonte: Autoria própria.

Um estudo realizado pelo aluno de doutorado Jean Francisco Rosa Ribeiro no software GRID, que pode ser utilizado para mapear o sítio em busca de regiões favoráveis para interações, foi feito para as sondas do cloro. Os resultados são apresentados como mapas de contorno, nos quais os contornos indicam regiões onde os grupos sonda tem alta probabilidade de interagir. Através da sobreposição da superfície proveniente do mapeamento com a estrutura obtida por meio de cristalografia de raio-X do Neq0147 (FIGURA 4.21), observou-se que é importante ter o cloro em *orto* para interagir com a *Met68*. Mas também indicou que é possível explorar uma substituição com outro átomo de cloro na posição *para* (FIGURA 4.22). Os resultados do GRID corroboraram com o evidenciado experimentalmente, onde os compostos com cloro em *orto* (Neq0561) e *para* (Neq0599) foram os de maior afinidade já que essas posições propiciam a interação com o cloro.

**FIGURA 4.21-** Sobreposição do mapa de superfície com a estrutura cristalográfica do Neq0147.



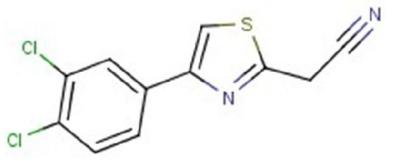
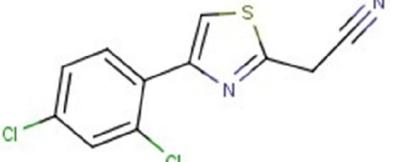
Fonte: William Borges Fernandes.

**FIGURA 4.22-** Docagem do Neq0599 com a cruzaina.

Fonte: Autoria própria.

No entanto apresentar átomos de cloro em *orto* e *para* na mesma molécula (Neq0557; TABELA 4.5) não possibilitou obter o composto de maior afinidade, porque o Neq0556, com átomos de cloro em *meta* e *para*, teve uma afinidade cinco vezes maior do que o Neq0557. Provavelmente quando um dos átomos de cloro interage com uma das regiões anteriormente mostradas, a conformação ou posição adotada pela molécula talvez não permita que o outro cloro também consiga ter interação (FIGURA 4.23). Porém, quando o átomo de cloro está nas posições *meta* e *para* provavelmente ambos consigam interagir com regiões do sítio (FIGURA 4.23), o que foi evidenciado através do acréscimo na afinidade da cruzaina pelo composto.

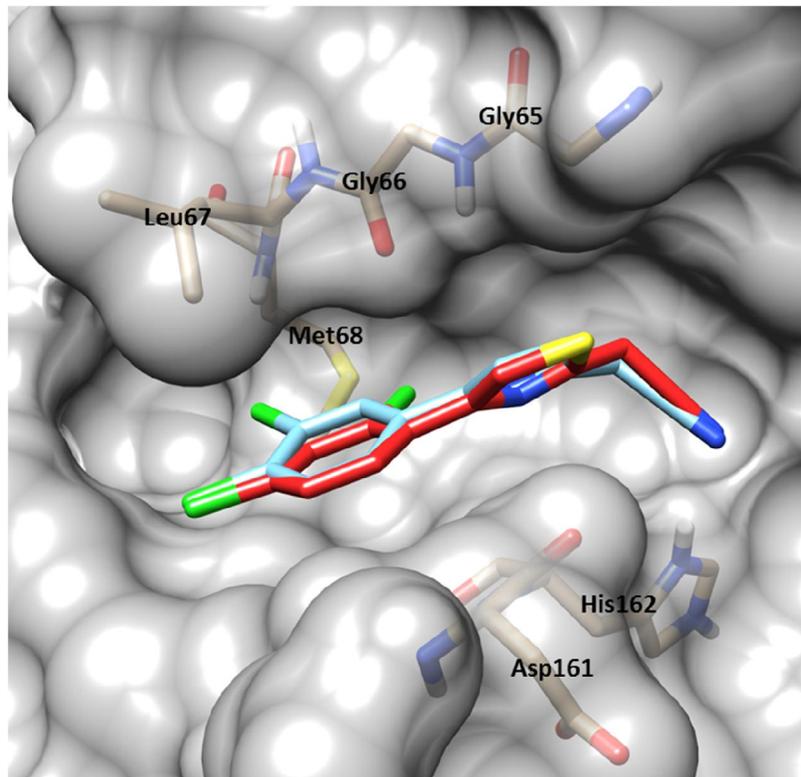
TABELA 4.5- Valores de  $K_i$ ,  $pK_i$  e  $LE$  dos compostos di-substituídos.

ID	Estrutura	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$pK_i$	$LE$ ( $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{atom}^{-1}$ )
Neq0556		$65,27 \pm 4,468$	4,18	0,37
Neq0557		$133,15 \pm 11,082$	3,88	0,34

Fonte: Autoria própria.

Comparando o Neq0556 com o Neq0597 ( $K_i = 340,62 \pm 43,831$ ; TABELA 4.3), que possui apenas um átomo de cloro em *meta*, podemos ver que a adição de um cloro em *para* levou a uma afinidade de cerca de 5 vezes maior. O Neq0598 ( $K_i = 2064,0 \pm 398,50$ ; TABELA 4.4), que possui apenas um átomo de cloro em *para*, era praticamente inativo e através da adição de um cloro em *meta* (Neq0556) teve um elevado ganho de afinidade. O Neq0556 teve uma afinidade muito similar a do Neq0617 ( $K_i = 64,47 \pm 3,95$ ;  $LE = 0,40$ ), mas o Neq0617 teve uma maior eficiência de ligação (maior  $LE$ ) devido o Neq0556 um maior número de átomos. Além disso, o Neq0556 apresentou uma maior afinidade do que o fragmento inicial (Neq0147), mas a custo de um elevado aumento de lipofilicidade, devido a presença de dois átomos de cloro, e durante o processo de otimização do fragmento busca-se aumentar a afinidade sem provocar um aumento de lipofilicidade ao mesmo tempo.

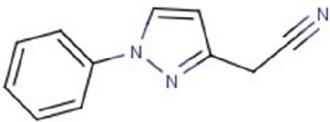
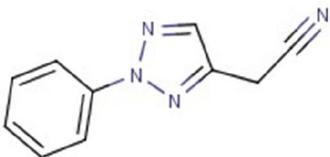
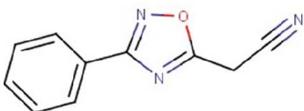
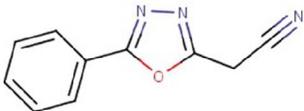
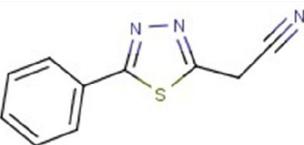
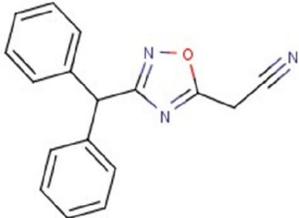
**FIGURA 4.23-** Docagem do Neq0556 (azul) e Neq0557 (vermelho) com a cruzaina



Fonte: Autoria própria.

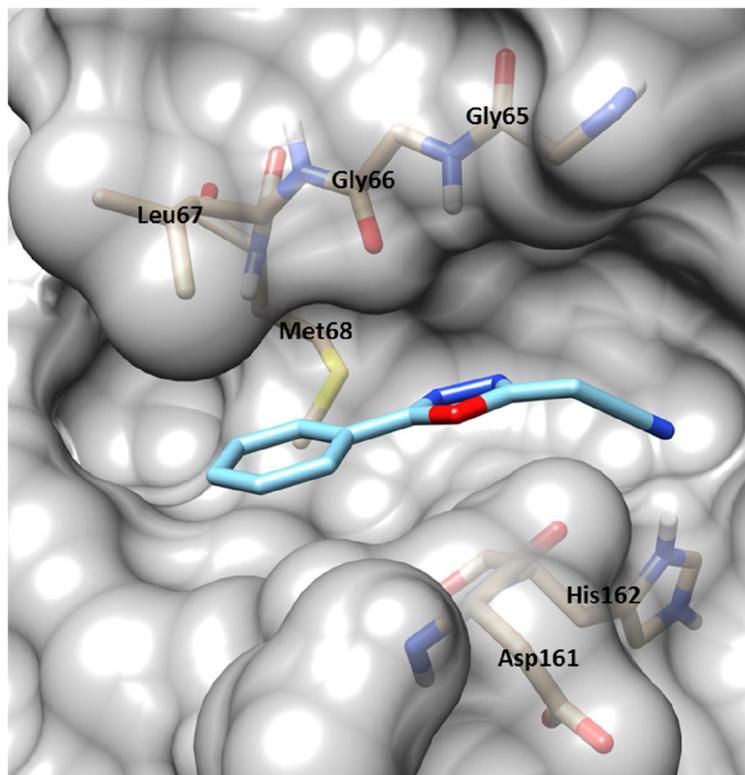
Os compostos que não possuem o átomo de cloro como substituinte mostraram-se pouco ativos (TABELA 4.6). O Neq0601 que corresponde ao Neq0617 sem a presença do cloro foi praticamente inativo ( $K_i > 3000 \mu\text{M}$ ), mostrando que é importante a presença do cloro (FIGURA 4.24). O átomo de cloro (*orto*) interage com a *Met68* fazendo com que a molécula adote um ângulo torsional entre o anel aromático e o heterocíclico, que permite adotar um posicionamento adequado para que outras interações importantes ocorram. No entanto, sem a presença do átomo de cloro essas interações são perdidas tornando os compostos praticamente inativos. Esperava-se que o Neq0559 possibilitasse explorar interações com o bolsão mais profundo do subsítio S2 e com o subsítio S3, mas esse inibidor foi inativo mostrando que não foi possível que essas interações ocorressem.

**TABELA 4.6-** Valores de  $K_i$ ,  $pK_i$  e  $LE$  dos compostos sem substituição no anel aromático.

ID	Estrutura	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$pK_i$	$LE$ ( $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{atom}^{-1}$ )
Neq0558		$2485,39 \pm 441,117$	2,60	0,26
Neq0555		$1074,25 \pm 134,704$	2,97	0,30
Neq0596		$1.626,2 \pm 105,20$	2,79	0,28
Neq0601		>3000		0,23
Neq0560		$1823,61 \pm 48,261$	2,74	0,28
Neq0559		>3000		0,17

Fonte: Autoria própria.

**FIGURA 4.24-** Docagem do Neq0601 com a cruzaina.



Fonte: Autoria própria.

# **CAPÍTULO 5**

## **Conclusão**

## 5- CONCLUSÃO

A doença de Chagas atinge milhões de pessoas ao redor do mundo e provoca morbidade e mortalidade precoce. Os fármacos disponíveis para o tratamento são ineficazes, principalmente na fase crônica da doença. Além disso, apresentam severos efeitos colaterais e precisam ser utilizados por um longo período de tempo. Portanto, é necessário o desenvolvimento de novos fármacos para esta doença. A cruzaina é um alvo terapêutico validado para o desenvolvimento de novos fármacos tripanossomicidas. A maioria dos inibidores de cruzaina descritos na literatura são dipeptídicos do tipo covalente irreversíveis. Os inibidores irreversíveis apresentam mais efeitos *off-target* do que os observados com os reversíveis e tem-se evitado a utilização de inibidores dipeptídicos, devido a sua baixa estabilidade metabólica. Sendo assim, é preferível a utilização de inibidores covalente reversíveis e não peptídicos. O *FBDD* é uma abordagem que vem sendo utilizada na descoberta e desenvolvimento de fármacos, que permite inicialmente identificar fragmentos com baixa afinidade porém com alta eficiência de ligação.

Neste trabalho, foi realizada a otimização das interações do fragmento Neq0147, através de um estudo de SAR. Algumas modificações moleculares baseadas no Neq0147 foram propostas para realizar o estudo de SAR. Primeiramente foi realizada a substituição do grupo carboxilato por uma nitrila, com a intenção de aumentar a afinidade do inibidor, devido a nitrila se ligar de forma covalente reversível com a enzima, e também para atuar como âncora. Depois o anel oxadiazol foi substituído por outros anéis heterocíclicos de cinco membros (1,2,4-oxadiazol, triazol, pirazol, tiadiazol e tiazol), com a finalidade de explorar interações com os resíduos de aminoácidos *Asp161* e *Gly65*. Por último a posição do átomo de cloro no anel aromático também foi modificada, para explorar interações hidrofóbicas com aminoácidos presentes no subsítio S2. Os compostos necessários para avaliar as hipóteses foram adquiridos e sintetizados. Então todos os fragmentos foram testados contra a cruzaina para a determinação do  $K_i$ .

A partir dos resultados dos ensaios cinéticos pode-se avaliar o efeito da substituição do carboxilato, do anel oxadiazol e da posição do cloro. Através do estudo de SAR podemos concluir que a substituição do grupo carboxilato pela nitrila foi a modificação que gerou um maior ganho de afinidade. Entre os compostos que

apresentavam o cloro em *orto*, o composto com anel 1,3,4-oxadiazol foi o que apresentou maior afinidade (Neq0617). Quando o cloro estava em *meta* o anel que permitiu obter uma maior afinidade foi o 1,2,4-oxadiazol (Neq0602), sendo que os compostos Neq0602 e Neq0597 apresentaram alta eficiência de ligação ( $LE \geq 0,3$ ). No grupo dos compostos substituídos com o cloro em *para*, aquele que apresentou maior afinidade foi o com o anel 1,2,4-oxadiazol (Neq0599). Pode-se observar que presença do átomo de cloro como substituinte foi fundamental para a atividade dos fragmentos, pois os compostos sem a presença do átomo cloro no anel aromático foram praticamente inativos. Provavelmente o cloro tenha interações hidrofóbicas com aminoácidos presentes no subsítio S2, permitindo que seja possível manter um ângulo ideal entre os dois anéis possibilitando o estabelecimento de interações importantes com o sítio ativo. Além disso, preferencialmente o átomo de cloro deve encontrar-se nas posições *orto* ou *para*.

Por meio deste trabalho foi possível identificar vários fragmentos com afinidade no intervalo micromolar e com alta eficiência de ligação, que os credenciam a candidatos à otimização como alternativas aos inibidores dipeptídicos. Sendo que um fragmento, Neq0617, apresentou uma afinidade 14 vezes maior do o Neq0147. O Neq0556 apresentou uma afinidade semelhante ao do Neq0617, mas a custo do aumento de lipofilicidade e do número de átomos. A partir dessas informações obtidas pode-se propor novos inibidores similares a fragmento. Posteriormente a determinação do MOB dos melhores inibidores identificados, poderá ser realizada a adição de grupos para explorar interações com os subsítios S2 e S3 obtendo assim inibidores com maior afinidade.

## REFERÊNCIAS

1. WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases-topics/chagas/en/>>. Acessado em: 05 de maio de 2015.
2. CHAGAS, C. “Nova tripanozomíase Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen. n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem”, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1 (2): 159, 1909.
3. COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. “Chagas disease: a new worldwide challenge”, Nature, **465**: S6, 2010.
4. BONNEY, K. M. “Chagas Disease in The 21st century: a public health success or an emerging threat?”, Parasite, 21 (11), 2014.
5. RIBEIRO, A. L.; NUNES, M. P.; TEIXEIRA, M. M; ROCHA, M. O. C. “Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy”, Nature Reviews Cardiology, **9**: 576, 2012.
6. MARTINS-MELO, F. R; RAMOS A.N. Jr; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J.; “Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis”, Acta Tropica, **130**: 167, 2014.
7. CDC: Centers for disease control and prevention. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>>. Acessado: 06 de maio de 2015.
8. NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11a ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
9. RASSI Jr, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. “Chagas disease”, Lancet, **375**: 1388, 2010.
10. PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; ANDREW THOMPSON, R. C. “Chagas disease: the challenge of polyparasitism?”, Trends in Parasitology, 30 (4): 176, 2014.
11. NUNES, C. M. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J; RIBEIRO, A. L. “Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects”, Journal of the American College of Cardiology, 62 (9): 767, 2013.
12. URBINA, J. A. “Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches”, Acta Tropica, **115**: 55, 2010.
13. MCKERROW, J. H.; DOYLE, P. S.; ENGEL, J. C.; PODUST, L. M.; ROBERTSON, S. A.; FERREIRA, R.; SAXTON, T.; ARKIN, M.; KERR, I. D.; BRINEN, L. S.; CRAIK, C. S. “Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease”, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **104**: 263, 2009.

14. BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. "Advances in Chagas disease drug development", *Current Opinion Infection Disease*, 23 (6): 609, 2010.
15. IUPAC- *International Union of Pure Applied Chemistry*. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/>>. Acessado em: 09 de maio de 2015.
16. GUIDO; R. V. C.; ANDRICOPULO; A. D.; OLIVA, G. "Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas", *Estudos Avançados*, 24 (70): 81, 2010.
17. LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. "The role of the medicinal chemist in drug discovery then and now", *Nature Reviews Drug Discovery*, 3 (10): 853, 2004.
18. MONTANARI, C. A. *Química Medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*. 1a ed. São Carlos: Edusp, 2011.
19. LIMA, L. M. "Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira", *Química Nova*, 30 (6): 1456, 2007.
20. TURK, B. "Targeting proteases: successes, failures and future prospects", *Nature Reviews*, 5: 785, 2006.
21. OTTO; H. H.; SCHIRMEISTER, T. "Cysteine proteases and their inhibitors", *Chemical Reviews*, 97 (1): 133, 1997.
22. MENDEZ-LUCIO, O.; ROMO-MANCILLAS, A.; MEDINA-FRANCO, J. L.; CASTILLO, R. "Computational study on the inhibition mechanism of cruzain by nitrile-containing molecules", *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 35: 28, 2012.
23. ROGERS, K. E.; KERÄNEN, H.; DURRANT, J. D.; RATNAM, J.; DOAK, A.; ARKIN, M. R.; MCCAMMON, J. A. "Novel Cruzain Inhibitors for the Treatment of Chagas Disease", *Chemical Biology & Drug Design*, 80 (3): 398, 2012.
24. BRAK, K.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ELLMAN, J. A. "Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain", *Journal of the American Chemical Society*, 130 (20): 6404, 2008.
25. SELZER, P. M. *Antiparasitic and antibacterial drug discovery: from molecular targets to drug candidates*, Wiley-Blackwell, 2009.
26. MCGRATH, M. E.; EAKIN, A. E.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. "The crystal structure of cruzain - a therapeutic target for Chagas disease", *Journal of Molecular Biology*, 247: 251, 1995.
27. GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. "Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain", *Protein Science*, 6:1603, 1997.
28. CHEN, Y. T.; BRINEN, L. S.; KERR, I. D.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ROUSH, W. R. "*In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal

properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*”, PLoS Neglected Tropical Diseases, 4 (9): e825, 2010.

29. QUE, X.; BRINEN, L. S.; PERKINS, P.; HERDMAN, S.; HIRATA, K.; TORIAN, B. E.; RUBIN, H.; MCKERROW, J. H.; REED, S. L. “Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*”, Molecular and Biochemical Parasitology, 119 (1): 23, 2002.

30. HUANG, L.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. “Crystal structures of reversible ketone-based inhibitors of the cysteine protease cruzain”, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11 (1): 21, 2003.

31. LEE, G. M.; BALOUCH, E.; GOETZ, D. H.; LAZIC, A.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S. “Mapping inhibitor binding modes on an active cysteine protease via nuclear magnetic resonance spectroscopy”, Biochemistry **51**: 10087, 2012.

32. DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. “Cruzain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review”, Current Medicinal Chemistry, 16 (24): 3174, 2009.

33. BRINEN, L. S.; HANSELL, E.; CHENG, J.; ROUSH, W. R.; MCKERROW, J. H.; FLETTERICK, R. J. “A target within the target: probing cruzain’s P1’ site to define structural determinants for the Chagas’ disease protease”, Structure, 8 (8): 831, 2000.

34. MEHRTENS, J. M. The Design, Synthesis and Biological Assay of Cysteine Protease Specific Inhibitors, Nova Zelândia, Christchurch, University of Canterbury, 2007. Tese de doutorado.

35. SCHULTES, S.; DE GRAAF, C.; HAAKSMA, E. E. J.; ESCH, I. J. P.; LEURS, R.; KRÄMER, O. “Ligand efficiency as a guide in fragment hit selection and optimization”, Drug Discovery Today: Technologies, 7(3): e157, 2010.

36. CONGREVE, M.; CHESSARI, G.; TISI, D.; WOODHEAD, A. J. “Recent developments in fragment-based drug discovery”, Journal of Medicinal Chemistry, 51 (13): 3661, 2008.

37. REES, D. C.; CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; CARR, R. “Fragment-based lead discovery”, Nature Reviews Drug Discovery **3**: 660, 2004.

38. FATTORI, D.; SQUARCIA, A.; BARTOLI, S. “Fragment-based approach to drug lead discovery overview and advances in various techniques”, Drugs Review Discovery, 9 (4): 217, 2008.

39. CARR, R. A.; CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; REES, D. C. “Fragment-based lead discovery: leads by design”, Drug Discovery Today, 10 (14): 987, 2005.

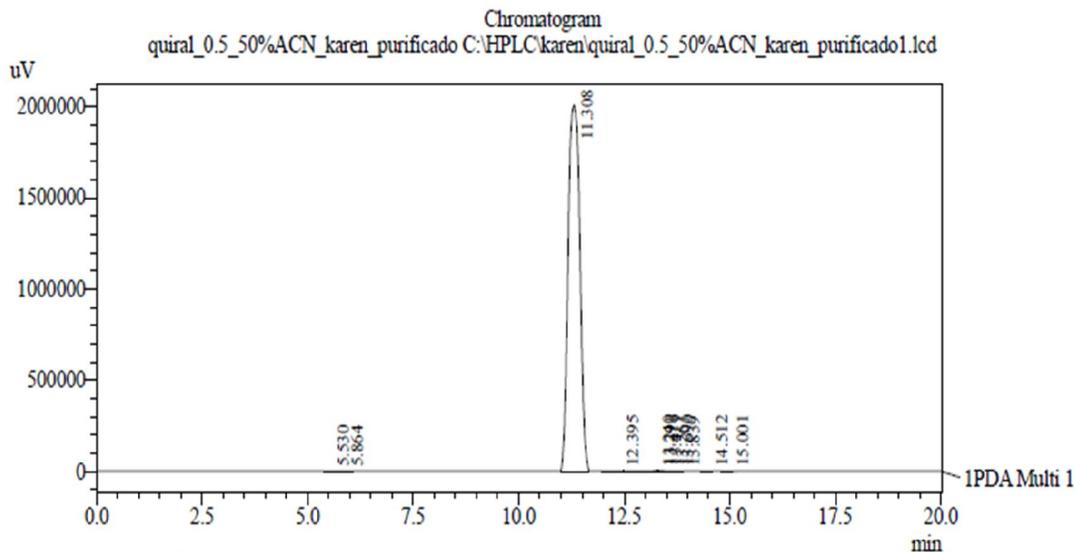
40. SIEGAL, G.; AB, E.; SCHULTZ, J. “Integration of fragment screening and library design”, Drug Discovery Today, 12 (23-24): 1032, 2007.

41. MURRAY, C. W.; REES, D. C. "The rise of fragment-based drug discovery", *Nature Chemistry*, **1**: 187, 2009.
42. HUBBARD, M. N.; SCHULZ, R. E. "Recent progress in fragment-based lead discovery", *Current Opinion in Pharmacology*, **9** (5): 615, 2009.
43. PLOWRIGHT, A. T.; JOHNSTONE, C.; KIHLEBERG, J.; PETTERSSON, J.; ROBB, G.; THOMPSON, R. A. "Hypothesis driven drug design: improving quality and effectiveness of the design-make-test-analyses cycle", *Drug Discovery Today*, **17** (1/2): 56, 2012.
44. O'REILLY, B. How to implement hypothesis-driven development. Disponível em: <<http://baryoreilly.com/2013/10/21/how-to-implement-hypothesis-driven-development/>> Acessado em: 11 de maio de 2015.
45. FONSECA, E. M. B. Planejamento de inibidores da cruzaina baseados em fragmentos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2011. Dissertação de mestrado.
46. PATRICK, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, United Kingdom: 5a ed., Oxford, 2005.
47. BRASLAU, R.; ANDERSON, M. O.; RIVERA, F.; JIMENEZ, A.; HADDAD, T.; AXON, J. R. "Acyl hidrazines as precursors to acyl radicals", *Tetrahedron* **58**: 5513, 2002.
48. ANDRIANI, G.; AMATA, E.; BEATTY, J.; CLEMENTS, Z.; COFFEY, B. J.; COURTEMANCHE, G.; DEVINE, W.; ERATH, J.; JUDA, C. E.; WAWRZAK, Z.; WOOD, J. T.; LEPESHEVA, G. I.; RODRIGUEZ, A.; POLLASTRI, M. P. "Antitrypanosomal lead discovery: identification of a ligand-efficient inhibitor of *Trypanosoma cruzi* cyp51 and parasite growth", *Journal of Medicinal Chemistry*, **56** (6): 2556, 2013.
49. LAI, H.; DOU, D.; ARAVAPALLI, S.; TERAMOTO, T.; GERALD H. LUSHINGTON, G.H.; MWANIA, T.M.; ALLISTON, K.R.; EICHHORN, D.M.; PADMANABHAN, R.; GROUTAS, W.C. "Design, synthesis and characterization of novel 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one and 1,3,4-oxadiazole hybrid derivatives: potent inhibitors of dengue and west nile virus ns2b/ns3 proteases", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21**(1):102, 2013.
50. BOSTRÖM, J.; HOGNER, A.; LLINÀS, A.; WELLNER, E.; PLOWRIGHT, A. T. "Oxadiazoles in Medicinal Chemistry", *Journal of Medicinal Chemistry*, **55** (5): 1817, 2012.
51. VALEUR, E.; BRADLEY, M. "Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents", *Chemical Society Reviews*, **38** (2): 606, 2009.
52. EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. "Peptide coupling reagents, more than a letter soup", *Chemical Review*, **111**: 6557, 2011.

53. STABILE, P.; LAMONICA, A.; RIBECAL, A.; CASTOLDI, D.; GUERCIO, G.; CURCURUTO, O. "Mild and convenient one-pot synthesis of 1,3,4-oxadiazoles", *Tetrahedron Letters*, 51 (37): 4801, 2010.
54. SINGH, J.; PETTER, R. C.; BAILLIE, T. A.; WHITTY, A. "The resurgence of covalent drugs", *Nature Reviews Drug Discovery*, 10 (4): 307, 2011.
55. NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*, Handcover, 4a ed., 2004.
56. BROOKS, H. B.; GEEGANAGE, S.; KAHL, S. D.; MONTROSE, C.; SITTAMPALAM, S.; SMITH, M. C.; WEIDNER, J. R. "Basics of enzymatic assays for HTS", *Assay Guidance Manual*, Eli Lilly & Company, 2012.
57. COPELAND, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery*, 1a ed., John Wiley & Sons, 2005.
58. COPELAND, R. A. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, 2a ed. Wiley-Interscience, 2000.
59. STRELOW, J.; DEWE, W.; IVERSEN, P. W.; BROOKS, H. B.; RADDING, J. A.; MCGEE, J.; WEIDNER, J. *Mechanism of Action assays for Enzymes Assay Guidance Manual*, Eli Lilly & Company, 2012.
60. VOET, D.; VOET, J. V. *Biochemistry*. 4a ed. Wiley-Interscience, 2011.
61. FERSHT, A. *Enzyme Structure and Mechanism*. WH Freeman and Co., 1985.
62. CHÈNE, P. "Can biochemistry drive drug discovery beyond simple potency measurements?", *Drug Discovery Today*, 17 (7/8): 388, 2012.
63. LIMA, A. P. C. A.; DOS REIS, F. C. G.; SERVEAU, C.; LALMANACH, G.; JULIANO, L.; MÉNARD, R.; VERNET, T.; THOMAS, D. Y.; STORER, A. C.; SCHARFSTEIN, J. "Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors". *Molecular and Biochemical Parasitology*, **114**: 41; 2001.
64. ALVES, L. C.; MELO, R. L.; CEZARI, M. H. S.; SANDERSON, S. J.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. "Analysis of the S2 subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of *Leishmania mexicana*, and cruzain of *Trypanosoma cruzi*, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids", *Molecular and Biochemical Parasitology*, **117**: 137; 2001.
65. DAVIS, B. J.; ERLANSON, D. A. "Learning from our mistakes: the 'unknown knowns' in fragment screening", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23 (10): 2844, 2013.

## APÊNDICE

### Cromatograma do Neq0617

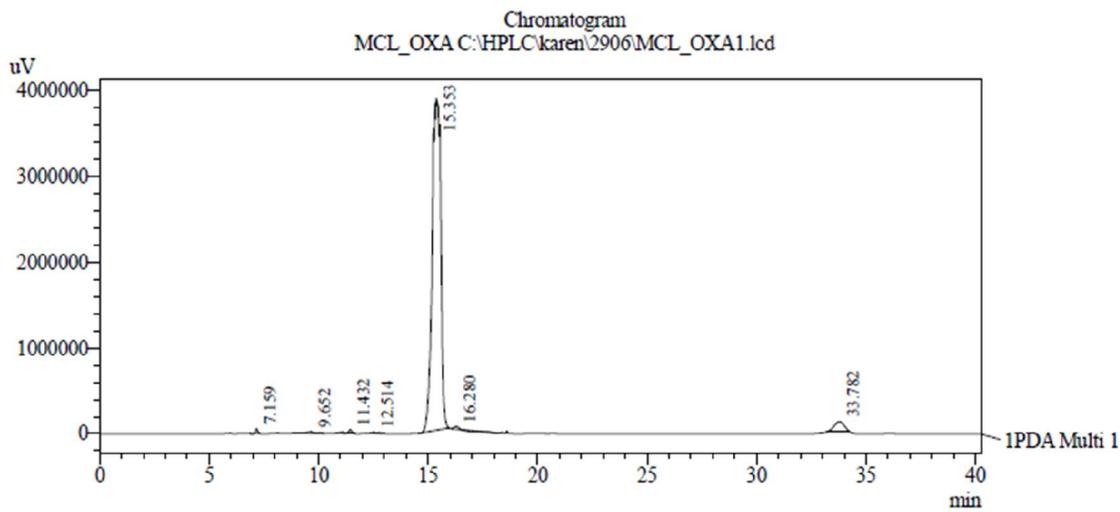


PeakTable

PDA Ch1 200nm - 800nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.530	1036	108	0.003	0.005
2	5.864	5070	479	0.013	0.024
3	11.308	38735341	2009561	99.499	98.785
4	12.395	18894	994	0.049	0.049
5	13.240	90625	3419	0.233	0.168
6	13.291	7805	3676	0.020	0.181
7	13.419	27305	4283	0.070	0.211
8	13.561	6746	2137	0.017	0.105
9	13.690	14581	2185	0.037	0.107
10	13.839	4925	2324	0.013	0.114
11	14.512	7769	2243	0.020	0.110
12	15.001	10316	2880	0.026	0.142
Total		38930413	2034288	100.000	100.000

## Cromatograma do Neq0616

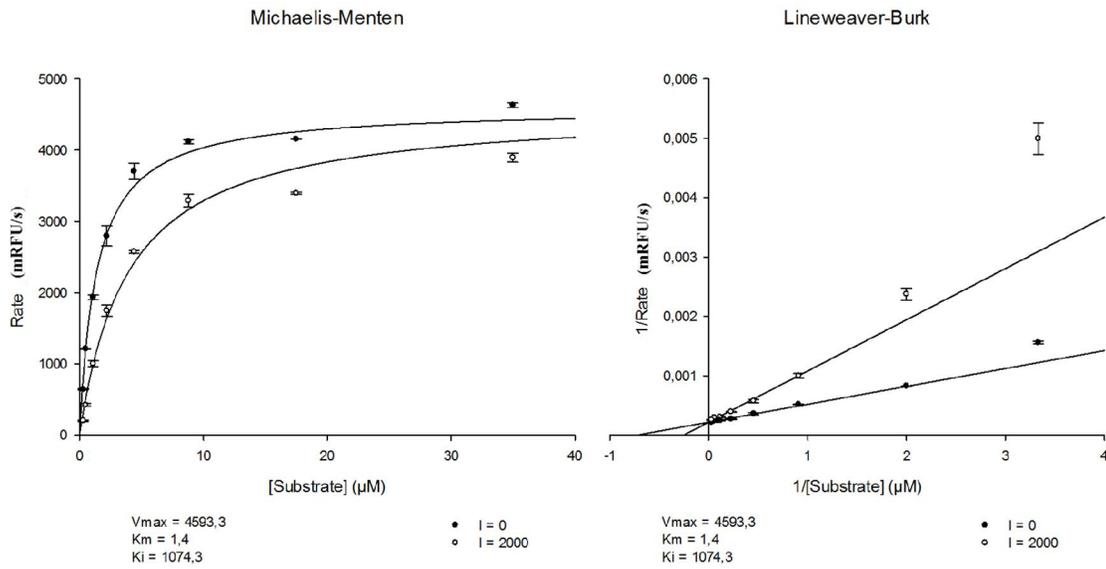


PeakTable

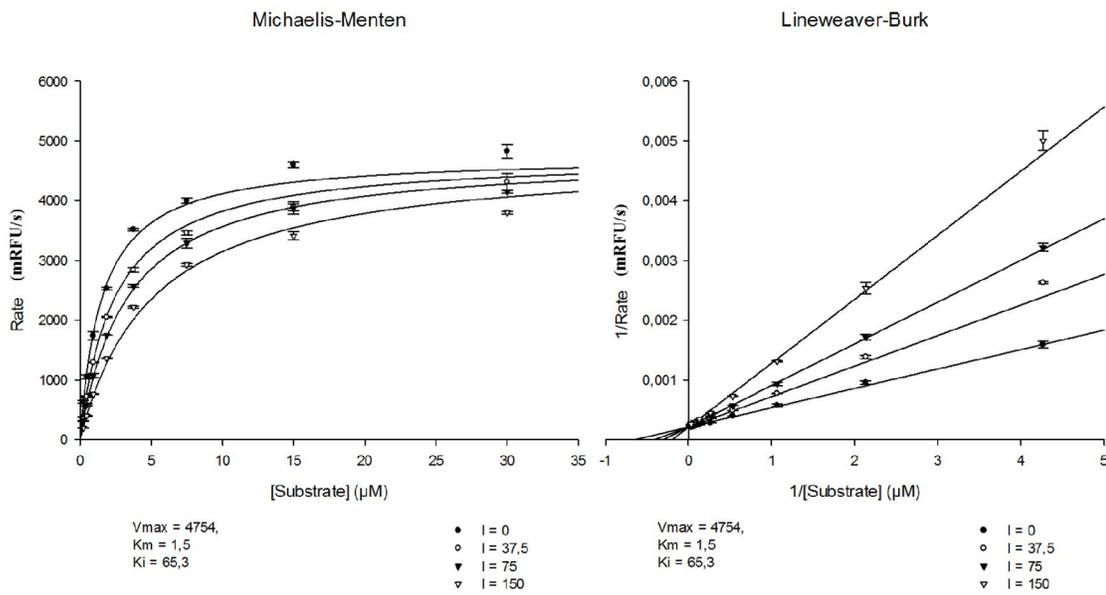
PDA Ch1 200nm - 800nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.159	359910	55671	0.321	1.336
2	9.652	283635	21531	0.253	0.517
3	11.432	485805	45886	0.433	1.101
4	12.514	147480	19227	0.132	0.461
5	15.353	106676470	3871033	95.171	92.903
6	16.280	182096	32964	0.162	0.791
7	33.782	3954191	120430	3.528	2.890
Total		112089588	4166743	100.000	100.000

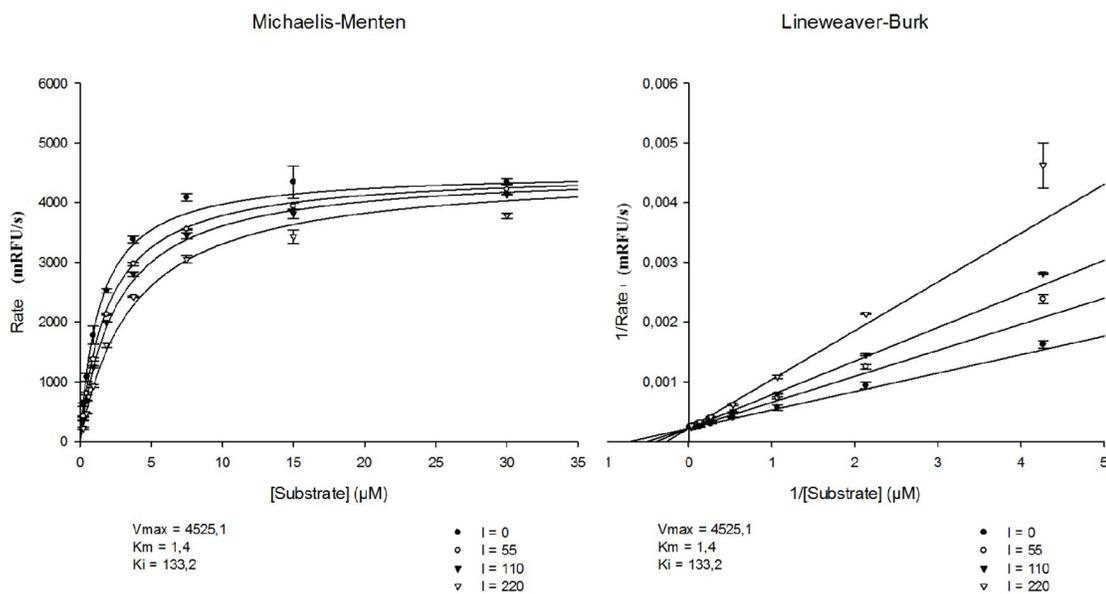
## Neq0555



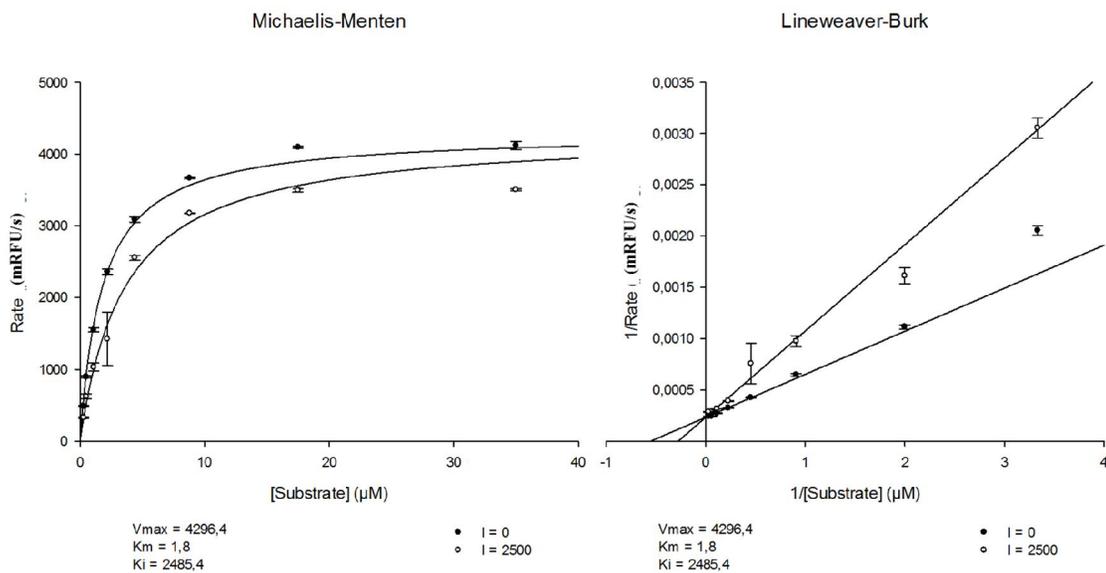
## Neq0556



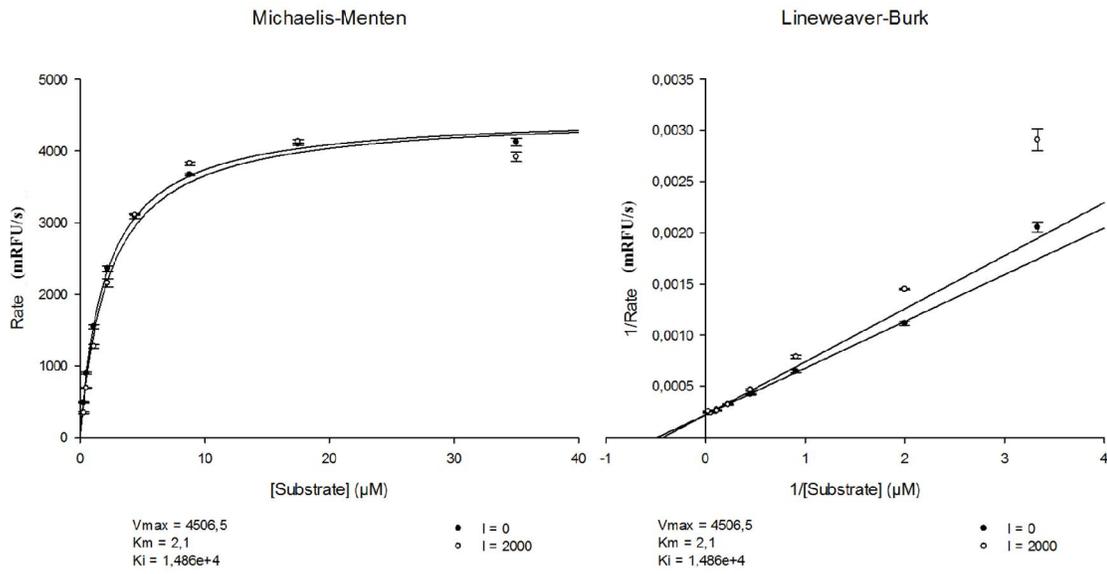
## Neq0557



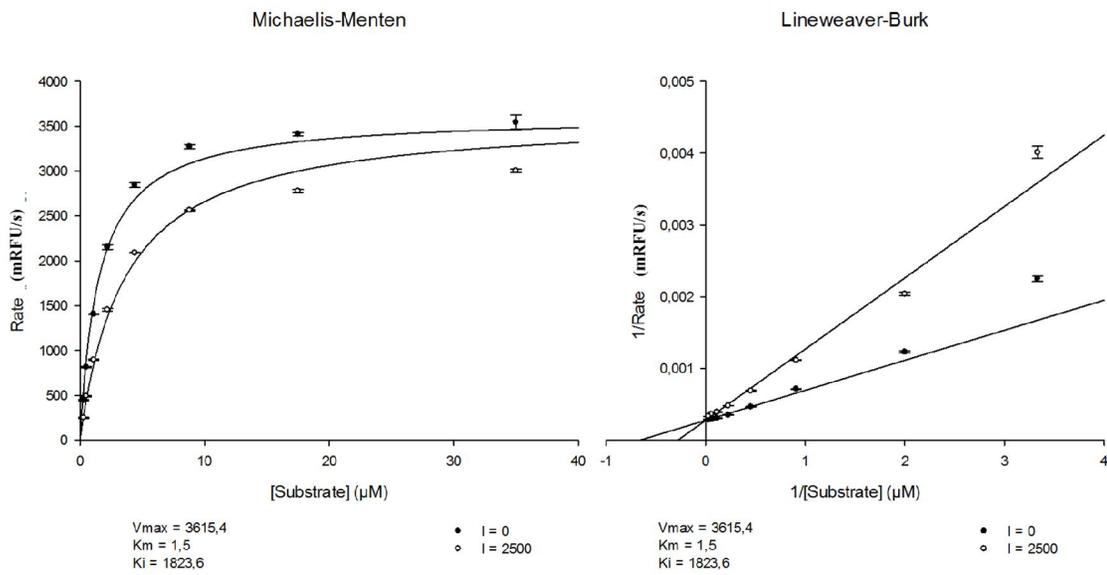
## Neq0558



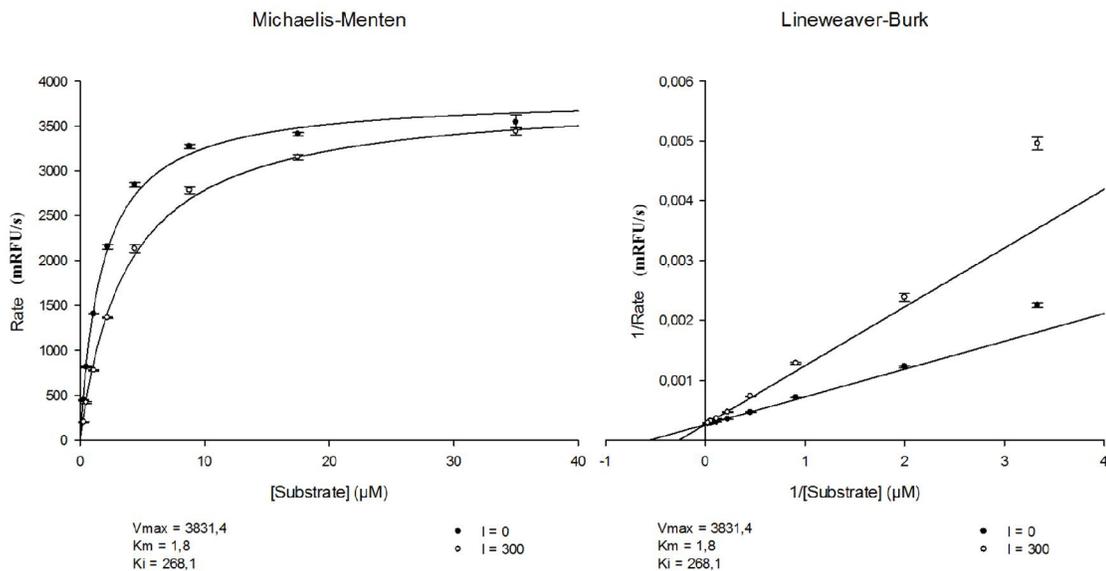
**Neq0559**



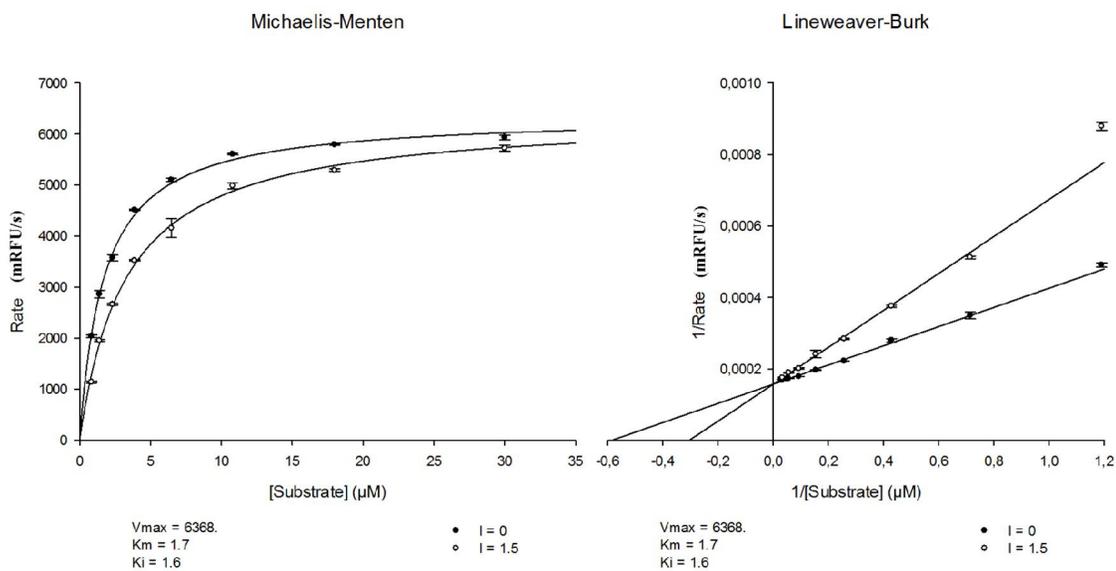
**Neq0560**



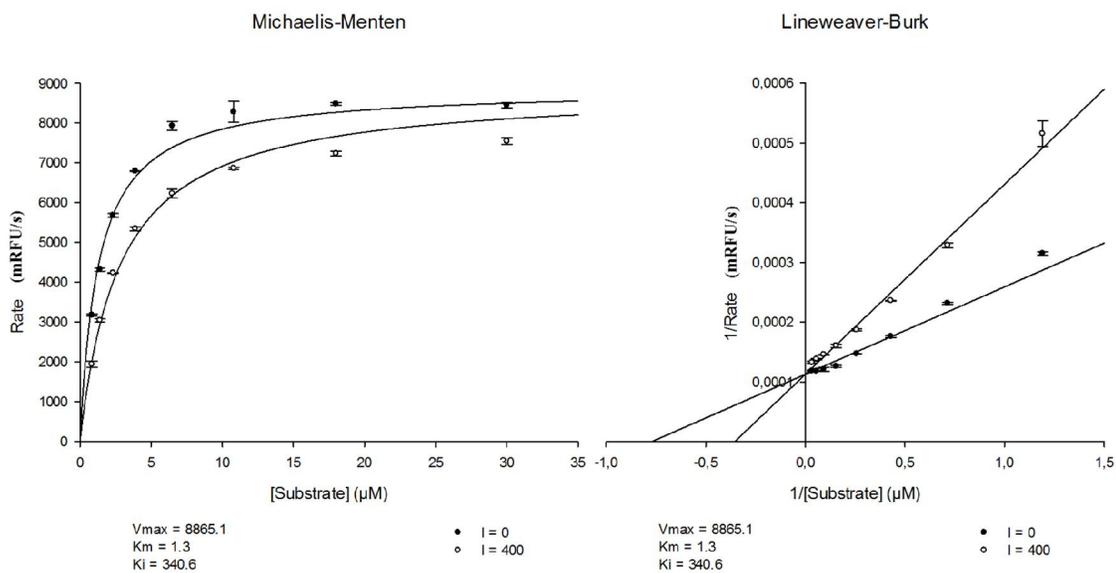
## Neq0561



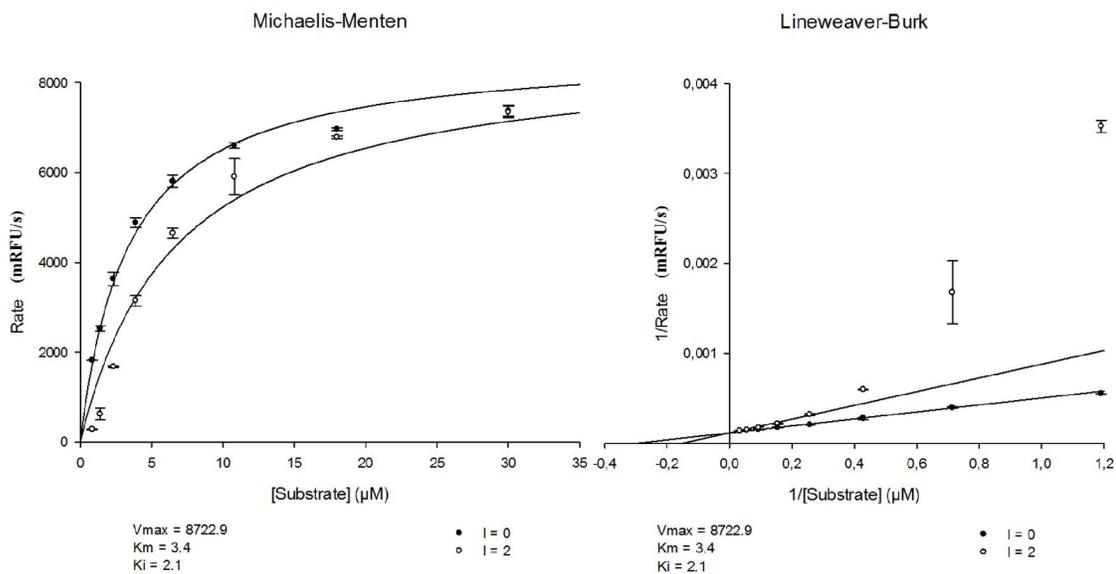
## Neq0596



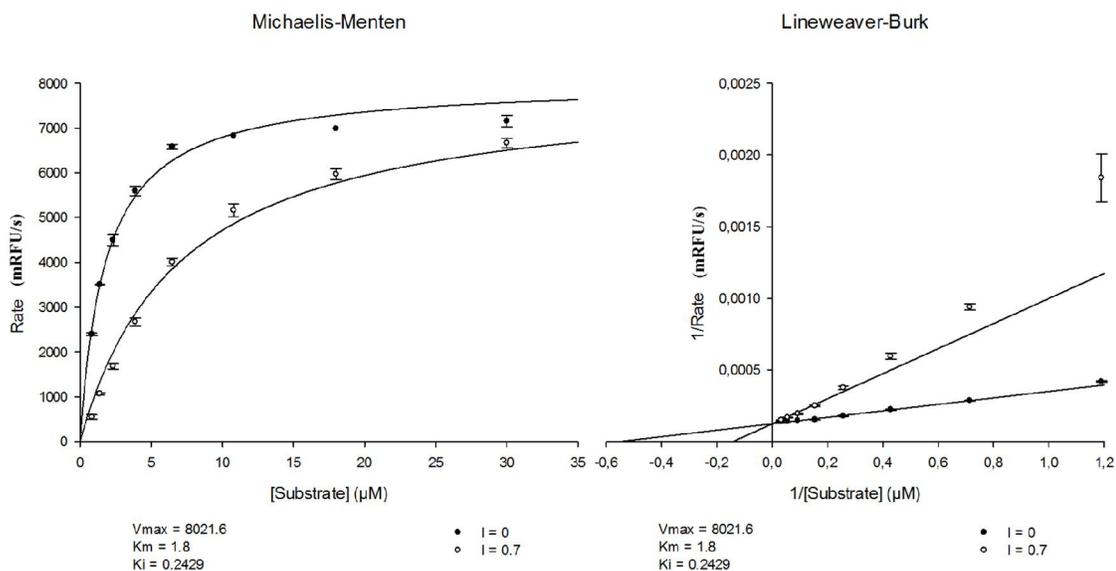
## Neq0597



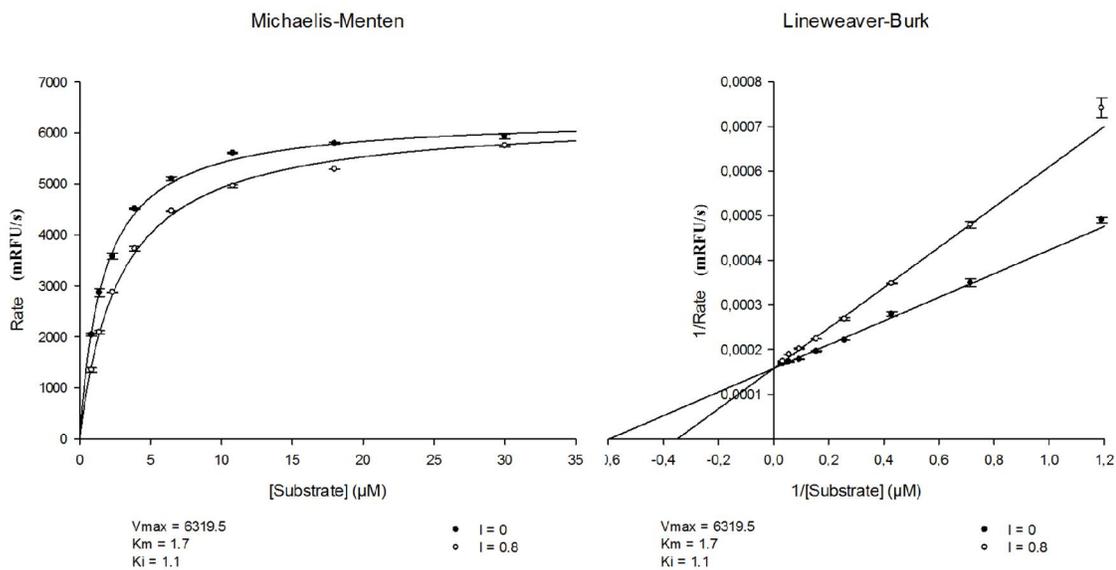
## Neq0598



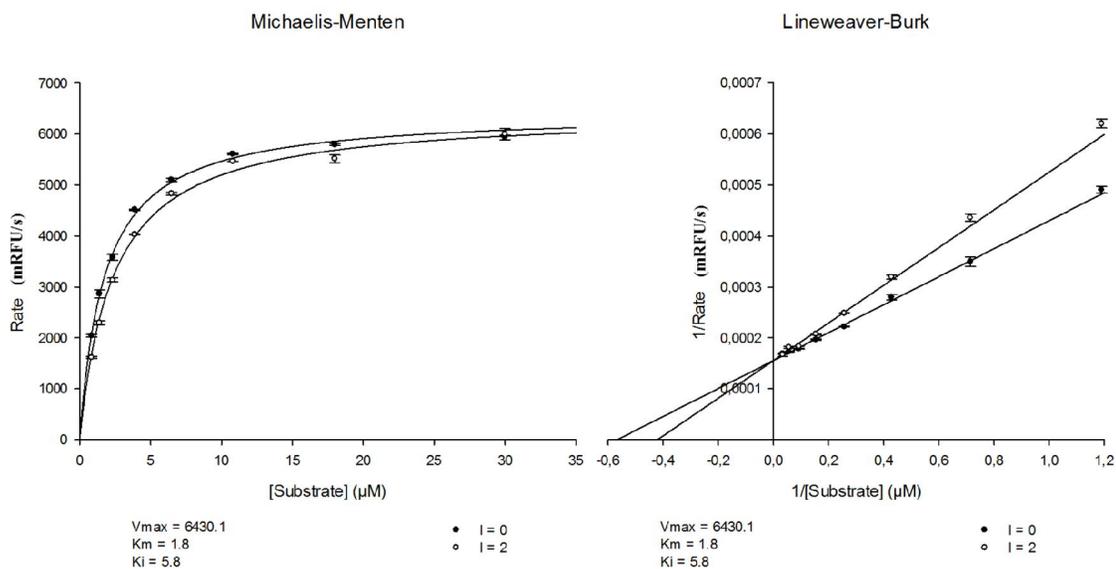
## Neq0599



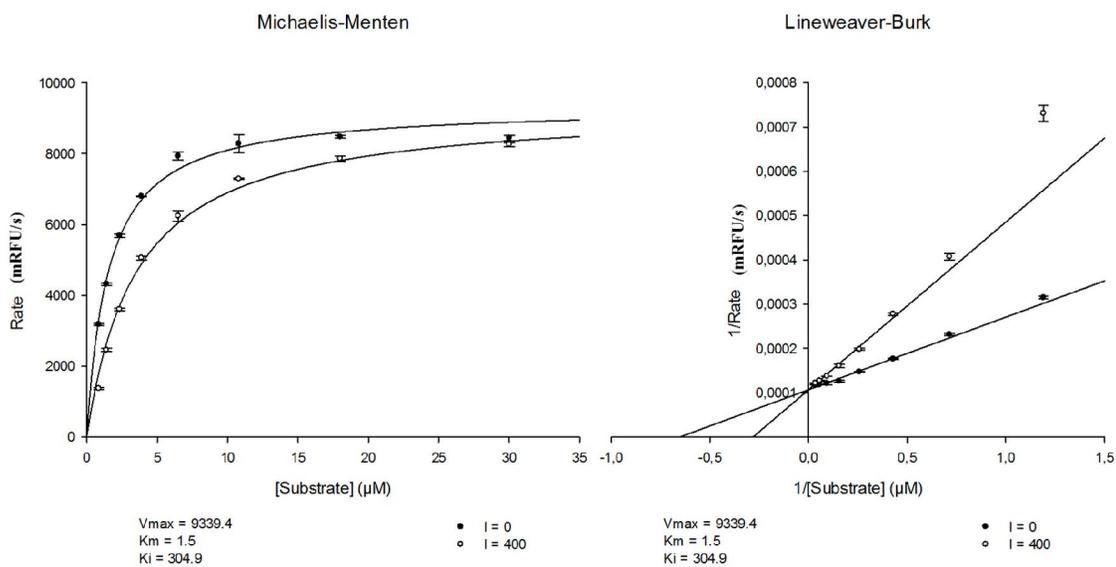
## Neq0600



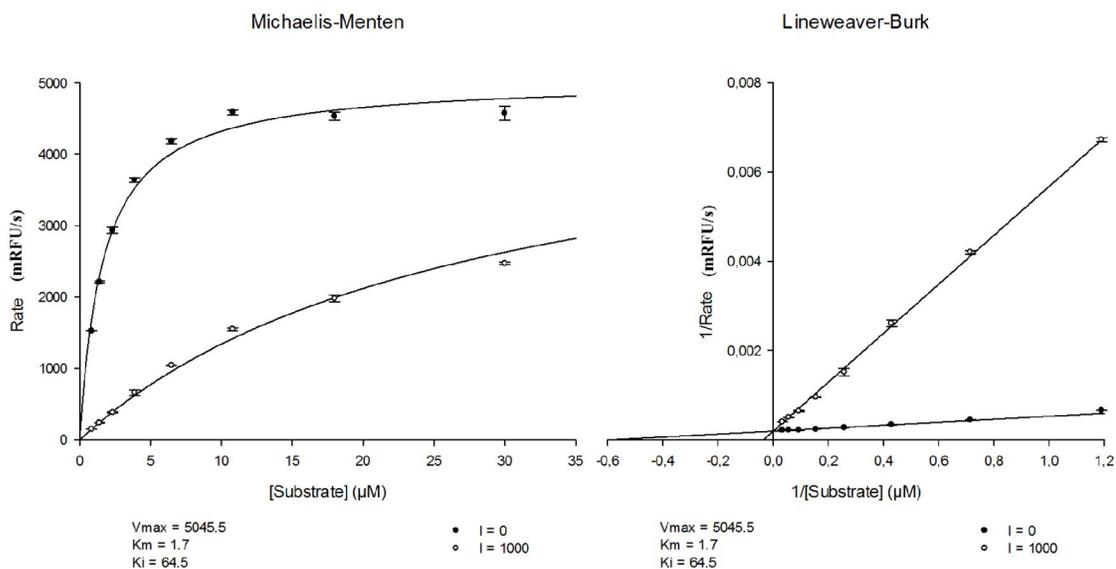
## Neq0601



## Neq0602



## Neq0617



## Neq0616

