UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MONIQUE ADRIANI GARCIA DA SILVA

**SÍNTESE DE INIBIDORES DA CISTEÍNO PROTEASE CRUZAÍNA
E ESTUDO DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE**

São Carlos

2021

MONIQUE ADRIANI GARCIA DA SILVA

**Síntese de inibidores da cisteína protease cruzaina e estudo
de relação estrutura-atividade**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

**São Carlos
2021**

AGRADECIMENTO

Em cada um dos meus passos reconheço a graça de Deus atuando em minha vida. Meu Senhor, agradeço pelo sustento em meio a todas as tribulações e dificuldades, sem Seu amor e cuidado nada seria possível.

Agradeço imensamente ao meu orientador Carlos Alberto Montanari por me proporcionar a oportunidade de fazer parte deste grupo e executar um trabalho significativo, me gerando grande aprendizado e conhecimento. Tenho apenas gratidão por todo este tempo, atenção, compreensão, apoio e orientação.

A todos os membros do grupo NEQUIMED, por toda a companhia e auxílio nesta empreitada. Gostaria de agradecer em especial aos pós-doutorandos (Shamim, Deborah e Michele) que foram de grande importância para execução deste trabalho, ao Pedro pelas análises e purificações realizadas através do HPLC, ao Rodrigo e a Fernanda que realizaram as análises de inibição enzimática e a Fabiana que realizou as análises de ITC.

Agradeço a todos os funcionários do IQSC, vocês direta ou indiretamente foram importantes para este trabalho. Em especial, gostaria de destacar os técnicos da Central de Análises Químicas e Instrumentais (CAQI) pelas análises.

Agradeço aos órgãos de fomento pelo financiamento dos projetos do NEQUIMED, em especial pela bolsa concedida a mim pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) durante este período e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Minha gratidão aos amigos do Ministério Universidades Renovadas (MUR), acreditem, vocês foram muito importantes para a conclusão deste trabalho. Agradeço por me aproximarem de Deus e ajudarem a me manter firme. Meu coração também é muito grato por todas as pessoas que passaram pela minha vida, vocês fazem parte de quem eu sou.

Por último, mas de longe não menos importante, meu agradecimento à minha família. Em especial meus pais. Vocês sempre foram meu suporte e minha força, sem vocês nada disso teria sido possível. Obrigada pelo amor, carinho e cuidado, pelo apoio e preocupação. Bendito seja Deus por me conceder uma família tão maravilhosa.

A todos que fizeram parte da minha caminhada até aqui, muito obrigada!

É a grande beleza da nossa ciência, química, que o avanço dela, seja em maior ou menor grau, em vez de esgotar os assuntos de pesquisa, abre as portas para um conhecimento mais amplo e abundante, transbordando de beleza e utilidade.

(Michael Faraday)

RESUMO

A doença de Chagas é uma DTNs (doença tropical negligenciada) causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo. O tratamento para a enfermidade é restrito a dois fármacos associados à diversos efeitos colaterais e demonstram pouca eficácia na fase crônica da doença. Na busca de novos agentes antichagásicos, a utilização da cisteína protease (CP) cruzipaina (enzima presente no *T. cruzi*) como alvo biológico tem se mostrado eficiente na eliminação/erradicação do parasito. O grupo NEQUIMED/IQSC/USP tem desenvolvido novas entidades químicas (NCEs) capazes de inibir a cruzaina (forma recombinante da cruzipaina). Por isso, este trabalho se ocupou em sintetizar derivados dos inibidores **Neq0544** e **Neq0820** com modificações em P2 e P3, respectivamente, para avaliar as interações com os subsítios S2 e S3. Os compostos foram testados contra a enzima cruzaina (Cz) e outras CPs com interesse farmacêutico (*hCatL*, *hCatS* e *hCatB*) e relações estrutura-atividade (SAR) foram estabelecidas. Os derivados do **Neq0820** apresentaram altos valores de inibição para Cz, *hCatL* e *hCatB*. Com destaque para os inibidores que apresentaram seletividade para Cz (**Neq0659**, **Neq1056**, **Neq1075** e **Neq1079**); *hCatS* (**Neq0659** e **Neq1040**) e *hCatL* **Neq1038**. Além da alta capacidade de inibição e seletividade, estes compostos respeitam a Regra dos 5 de Lipinski e apresentam similaridade com fármacos já existentes no mercado, mostrando-se promissores candidatos a fármacos administrados por via oral. Os análogos do **Neq0544** tiveram o perfil termodinâmico para a interação cruzaina-inibidor estudado por meio da calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Foi possível notar que as modificações implantadas mantiveram o perfil apresentado pelo composto protótipo (entalpicamente dirigido) e mostraram clara compensação entalpia-entropia.

Palavra-Chave: *Doença de Chagas; Trypanosoma cruzi; cruzaina; inibidores da cruzaina; cisteína protease.*

ABSTRACT

Chagas disease is a NTDs (Neglected Tropical Disease) caused by the *Trypanosoma cruzi* parasite that affects millions of people around the worldwide. The treatment for the illness is restricted to two drugs associated with several side effects and has shown little efficacy in the chronic phase of the disease. In the search for new trypanocidal agents, the use of the cysteine protease (CP) cruzipain (*T. cruzi* enzyme) as a biological target has been shown efficiency. The NEQUIMED/IQSC/USP group has identified new chemical entities (NCEs) able to inhibit the cruzain (cruzipain recombinant form). Therefore, this work was concerned with synthesizing derived from inhibitors **Neq0544** and **Neq0820** with modifications in P2 and P3, respectively, to evaluate the interactions with subsites S2 and S3. The compounds were tested against enzyme cruzain (Cz) and CPs with pharmaceutical potential (*hCatL*, *hCatS* and *hCatB*), and structure-activity relationship (SAR) have been established. The **Neq0820** analogs presented high inhibitions values to Cz, *hCatL* and *hCatB*. Highlighting the inhibitors that shown selectivity for Cz (**Neq0659**, **Neq1056**, **Neq1075** e **Neq1079**); *hCatS* (**Neq0659** e **Neq1040**) and *hCatL* **Neq1038**. In addition to the high capacity of inhibition and selectivity, these compounds respected the Lipinski's Rule and has similarity with commercial drugs, showing promising candidates for drugs administered orally. The **Neq0544** analogs had their thermodynamic profile to the interaction cruzain-inhibitor studied by isothermal titration calorimetry (ITC). It was possible to notice that the implemented changes maintain the profiles shown for the prototype compound (enthalpically directed) and present clear enthalpy-entropy compensation.

Keywords: *Chagas disease; Trypanosoma cruzi; cruzain; cruzain inhibitors; cysteine protease.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	19
FIGURA 1.2 – Estrutura Benzonidazol e Nifurtimox.....	21
FIGURA 1.3 – Estrutura cristalográfica da papaína (PDB: 9PAP).....	22
FIGURA 1.4 – Representação esquemática de um substrato ligado a uma CP.....	23
FIGURA 1.5 – Proposta de mecanismo de inibição de cisteíno protease por peptidil nitrilas...24	
FIGURA 3.1 – (a) Representação da estrutura da cruzaina. (b) Sítio catalítico da cruzaina, em superfície de Van der Waals colorida de acordo com os subsítios de ligação, interagindo com um ligante.....	34
FIGURA 3.2 – Representação 2D do esqueleto básico de um inibidor peptídico (contendo nitrila como grupo <i>warhead</i>) a ser modificado em P1, P2 e P3 (complementares aos subsítios S1, S2 e S3).....	35
FIGURA 3.3 – Conformação da cadeia lateral do Glu205 na cruzaina interagindo com Phe, Arg e Tyr.....	36
FIGURA 3.4 – Reação de hidrólise do Z-FR-AMC (substrato empregado).....	38
FIGURA 3.5 – Redução de uma ligação dissulfeto e oxidação do DTT.....	39
FIGURA 3.6 – Estrutura 2D do Odanacatib, Neq0659 e Neq0820.....	41
FIGURA 3.7 – Rota sintética empreada.....	42
FIGURA 3.8 – Estrutura química dos compostos <i>para</i> substituídos.....	43
FIGURA 3.9 – Estrutura química dos compostos <i>meta</i> substituídos.....	43
FIGURA 3.10 – SAR dos derivados do Neq0820 frente à cruzaina.....	46
FIGURA 3.11 – SAR dos derivados do Neq0820 frente às catepsinas L e S.....	47
FIGURA 4.1 – Gráfico de <i>druglikeness model score</i> (https://molsoft.com/mprop/) para Neq1079.....	61
FIGURA 4.2 - <i>Bioavailability Radar</i> para o Neq1079 – apresenta a correlação entre tamanho da molécula, flexibilidade, solubilidade, lipofilicidade, saturação e polaridade.....	62
FIGURA 5.1 – Rota de síntese para obtenção do Neq0820 e seus derivados.....	69
FIGURA 5.2 – Mecanismo de reação de acoplamento utilizando cloroformato de isobutilo....	70
FIGURA 5.3 – Mecanismo da reação de desidratação da amida a nitrila.....	71
FIGURA 5.4 – Mecanismo da reação de remoção do grupo Boc.....	72
FIGURA 5.5 – Formação da imina em meio básico.....	73
FIGURA 5.6 – Explicação para a estereoseletividade do $Zn(BH_4)_2$	73

FIGURA 5.7 – Reação de racemização de aminoácidos via oxazolona.....	74
FIGURA 5.8 – Mecanismo de reação do acoplamento utilizando HATU.....	75
FIGURA 5.9 – Mecanismo genérico do acoplamento de Suzuki-Miyaura.....	76
FIGURA 5.10 – Estrutura do Neq1083 com os diferentes grupos da molécula.....	77
FIGURA 5.11 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) do Neq1083.....	77
FIGURA 5.12 – Ampliação da região dos aromáticos do espectro de RMN ¹ H do Neq1083....	78
FIGURA 5.13 – Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, DMSO-d ₆) do Neq1083.....	79
FIGURA 5.14 – Espectro de FT-IR do Neq1083.....	81
FIGURA 6.1 – Diagrama esquemático mostrando três diferentes perfis termodinâmicos de inibidores: entálpicamente dirigido (A), entropicamente dirigido (B) e balanceado (C).....	90
FIGURA 6.2 – Representação esquemática do ITC.....	91
FIGURA 6.3 – Reposicionamento do inibidor de cruzaina K777 para o Neq0409 como estratégia de simplificação e modificação molecular.....	94
FIGURA 6.4 – (A) Perfil termodinâmico de alguns inibidores da cruzaina com efeito típico de compensação entalpia-entropia. (B) Contribuições entálpica e entrópica favoráveis. (C) Estrutura 2D dos inibidores Neq0409, Neq0551 e Neq0544.....	94
FIGURA 6.5 – SAR dos derivados do Neq0544 frente à cruzaina.....	96
FIGURA 6.6 – SAR dos derivados do Neq0544 frente às catepsinas humanas.....	97
FIGURA 6.7 – Análise da seletividade obtida para: (a) Cz x hCatL; (b) Cz x hCatS; (c) hCatL x hCatS.....	99
FIGURA 6.8 – Relação estrutura-atividade entre os compostos analisados.....	99
FIGURA 7.1 – Reação para consecução do Neq0544 e seus derivados.....	103
FIGURA 7.2 – Estrutura do Neq0996 com os diferentes grupos da molécula.....	104
FIGURA 7.3 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do Neq0996.....	105
FIGURA 7.4 – Ampliação da região dos aromáticos do espectro de RMN ¹ H do Neq0996....	105
FIGURA 7.5 – Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, DMSO-d ₆) do Neq0996.....	107
FIGURA 7.6 – Espectro de FT-IR do Neq0996.....	108

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Custos (em dólares) por indivíduo associado a doença de Chagas.....	20
TABELA 3.1 – Parâmetros empregados para os ensaios enzimáticos.....	40
TABELA 3.2 – Resultado dos ensaios de cinética enzimática.....	44
TABELA 3.3 – Comparação entre os compostos <i>para</i> e <i>meta</i> substituídos.....	45
TABELA 3.4 – Análise da seletividade dos inibidores.....	48
TABELA 4.1 – Propriedades físico-químicas.....	59
TABELA 6.1 – Parâmetros usados para configuração do experimento de ITC.....	93
TABELA 6.2 – Resultado dos ensaios de cinética enzimática.....	95
TABELA 6.3 – Constantes de inibição enzimática e parâmetros termodinâmicos para o Neq0544 e seus derivados.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[\alpha]_D$	Rotação específica (graus)
Å	Angstrom
δ	Deslocamento químico (ppm)
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Boc	Grupo protetor <i>tert</i> -Butoxicarbonil
Boc-L-Phe	Boc-L-Phenilalanina
CAQI	Central de Análises Químicas
CP	Cisteína Protease
Cys	Cisteína
CysS ⁻	Ânion tiolato
Cz	Cruzaína
DCM	Diclorometano
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DME	Dimetoxietano
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT	<i>Diotreitol</i>
EC	<i>Enzyme Commission Number</i>
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
eq.	Equivalente
ESI	Ionização de electropulverização, do inglês <i>electrospray ionization</i>
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-Transform InfraRed spectroscopy</i>

G	Energia livre de Gibbs
Glu	Ácido glutâmico
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
H	Entalpia
HATU	<i>N-[(Dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]pyridin-1-ylmethylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide</i>
<i>hCatB</i>	Catepsina humana B
<i>hCatK</i>	Catepsina humana K
<i>hCatL</i>	Catepsina humana L
<i>hCatS</i>	Catepsina humana S
Hex	Hexano
His	Histidina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução, do inglês <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
ITC	Calorimetria de titulação isométrica, do inglês <i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
IBCF	Cloroformato de isobutilo
<i>J</i>	Constante de acoplamento (Hz)
kDa	Quilodalton
K_i	Constante de inibição
K_M	Constante de Michaelis Menten
Leu	Leucina
<i>LmCPB</i>	Cisteíno protease B do parasito <i>Leishmania mexicana</i>
MeOH	Metanol
Met	Metionina
NEQUIMED	Grupo de Química Medicinal e Biológica do IQSC
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Padrão Analítico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pK_d	-log da constante de dissociação
pK_i	-log da constante de inibição
PF	Ponto de Fusão

Phe	Fenilalanina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
S	Entropia
SAR	Relação estrutura-atividade, do inglês <i>Structure-Activity Relationship</i>
Ser	Serina
T	Temperatura
t _R	Tempo de retenção (min)
THF	Tetrahidrofurano
TFAA	Anidrido trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Z-FR-AMC	<i>Z-PheArg-7-amido-4-metilcoumarina</i>)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO.....	16
1 Química Medicinal.....	17
2 Doenças Tropicais Negligenciadas.....	17
3 Doença de Chagas.....	18
4 Cisteíno Proteases: Família da Papaína.....	21
5 Nitrilas como grupos <i>warhead</i>	23
REFERÊNCIAS.....	25

CAPÍTULO II

OBJETIVOS.....	30
1 Objetivo Geral.....	31
2 Objetivos Específicos.....	31

CAPÍTULO III

ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA OS DERIVADOS DO NEQ0820: CRUZAÍNA/CRUZIPAÍNA E OUTRAS CISTEÍNO PROTEASES.....	32
1 Introdução.....	33
1.1 Cruzipaína/Cruzaína.....	33
1.2 Desenvolvimento de inibidores da cruzaína.....	34
1.3 Outras CPs: <i>hCatB</i> , <i>hCatL</i> , e <i>hCatS</i>	37
2 Materiais e Métodos.....	38
2.1 Ensaio de inibição enzimática.....	38
2.2 Procedimento para determinação das K_M e K_i	39
3 Resultados e Discussão.....	41
3.1 SAR: Cruzaína.....	45
3.2 SAR: Catepsinas humanas (<i>hCatB</i> , <i>hCatL</i> e <i>hCatS</i>).....	46
3.3 Seletividade.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

CAPÍTULO IV

ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO E EXCREÇÃO.....	55
1 Introdução.....	56
2 Materiais e Métodos.....	57
3 Resultados e Discussão.....	58
REFERÊNCIAS.....	62

CAPÍTULO V

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS DO NEQ0820.....	64
1 Materiais e Métodos.....	65
1.1 Considerações gerais.....	65
1.2 Métodos.....	66
2 Resultados e Discussão.....	68
2.1 Síntese e mecanismo.....	68
2.1.1 Primeira etapa.....	70
2.1.2 Segunda etapa.....	72
2.1.3 Terceira e quarta etapa.....	74
2.2 Caracterização.....	76
2.2.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	77
2.2.2 Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ¹³ C).....	79
2.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	80
2.3 Compostos sintetizados.....	81
REFERÊNCIAS.....	86

CAPÍTULO VI

ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA OS DERIVADOS DO NEQ0544: CRUZAÍNA/CRUZIPAÍNA E OUTRAS CISTEÍNO PROTEASES.....	88
1 Introdução.....	89
1.1 Biocalorimetria.....	89
2 Materiais e Métodos.....	90
2.1 Calorimetria de titulação isotérmica.....	90
2.2 Procedimento para ITC.....	92
3 Resultados e Discussão.....	93

3.1 Relação estrutura-atividade.....	95
3.1.1 SAR: Cruzaína.....	95
3.1.2 SAR: Catepsinas humanas (<i>hCatB</i> , <i>hCatL</i> e <i>hCatS</i>).....	96
3.1.3 Seletividade.....	97
3.1.4 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	98
REFERÊNCIAS.....	100

CAPÍTULO VII

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS DO NEQ0544.....	102
1 Materiais e Métodos.....	103
1.1 Síntese dos compostos.....	103
2 Resultados e Discussão.....	103
2.1 Caracterização.....	103
2.1.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	104
2.1.2 Ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ¹³ C).....	106
2.1.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	107
3 Compostos sintetizados.....	108

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	112
1 Conclusões e Perspectivas.....	113
1.1 Neq0820 e seus derivados.....	113
1.2 Neq0544 e seus derivados.....	114

ANEXO A

ESPECTROS DOS DERIVADOS DO NEQ0820.....	116
---	-----

ANEXO B

ESPECTROS DOS DERIVADOS DO NEQ0544.....	126
---	-----

ANEXO C

GRÁFICO DAS ANÁLISES DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC) DOS DERIVADOS DO NEQ0544.....	135
--	-----

CAPÍTULO I

Introdução

1 QUÍMICA MEDICINAL

A química medicinal, segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), se preocupa em estudar aspectos relacionados à descoberta ou invenção de fármacos, seus mecanismos de ação e aspectos moleculares que governam a ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade). Assim como, planejamento e desenho estrutural de novas substâncias que possuam propriedades farmacoterapêuticas e a relação entre estrutura química e atividade terapêutica (SAR, do inglês *Structure-Activity Relationship*).¹⁻²

Em geral, para consecução das moléculas bioativas (ligantes), opta-se pela utilização de rotas sintéticas previamente descritas na literatura com sutis modificações.³ Com isso, são evitados altos investimentos, como reagentes caros, dispêndio de tempo e sínteses exploratórias desnecessárias; o que pode garantir o sucesso comercial de um fármaco.⁴ Além disso, os compostos bioativos devem conter simplicidade estrutural – com possibilidade de modificação molecular – visando à otimização de seu perfil farmacoterapêutico para um estudo de SAR.⁴

A interação entre o fármaco e o bioreceptor, está relacionada à capacidade que o ligante apresenta de formar um complexo com o sítio ativo do bioreceptor. A força dessa interação pode ser aumentada ou diminuída por fatores como distâncias interatômicas, forças intermoleculares, solubilidade, grau de ionização e estereoquímica.

2 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) é um grupo de 22 infecções que prevalecem em regiões tropicais e subtropicais afetando 149 países. Cerca de um bilhão de pessoas são atingidas anualmente, causando de 500 mil a 1 milhão de óbitos.⁵⁻⁷ Os principais atingidos pertencem a populações pobres na África, Ásia e América Latina. Os agentes patogênicos responsáveis por essas doenças podem ser divididos em três grupos: (1) protozoários transmitidos por vetores, bactérias e vermes filariais; (2) helmintos transmitidos pelo solo; e (3) as duas espécies de microbactérias não tuberculosas que produzem úlcera de Buruli e hanseníase.⁸

A predileção dessas doenças por regiões quentes e úmidas é consequência do subdesenvolvimento social. Por isso, possuem maior incidência em comunidades rurais remotas, favelas urbanas e populações deslocadas próximas ao equador.⁸⁻¹¹ Também

conhecidas são como doenças do “bilhão inferior” – atingindo o 1/6 mais pobre da população mundial¹²⁻¹³ –, essas enfermidades causam sofrimento maciço por doenças agudas, incapacidade prolongada, morte precoce e custam bilhões de dólares todos os anos.

Todos os países de baixa renda são afetados por pelo menos cinco DTNs simultaneamente e muitos de seus habitantes são infectados por mais de um patógeno concomitantemente.¹⁴ Além de serem resultado do baixo desenvolvimento econômico, as DTNs podem agravar a situação de pobreza das populações e indivíduos afetados. Por sua forte ligação com o desenvolvimento econômico, a prevalência de algumas delas são sugeridas como indicadores de pobreza.¹⁴⁻¹⁵

A perpetuação dessas infecções é resultado, em partes, do acesso inadequado a água potável, saneamento precário e baixo padrão de condições de habitação.¹⁴ Devido as DTNs desencadearem deficiências, desfigurações e estigmas sociais ao longo da vida, as pessoas tornam-se relutantes em procurar atendimento.⁹ Sem o tratamento adequado, essas condições acabam resultam em morbidade grave.

Apesar do enorme impacto das DTNs em todo o mundo, os tratamentos disponíveis são restritos e ineficazes, com quadro agravado pela constante presença de microrganismos resistentes.⁹⁻¹⁰ Com isso, essas doenças seguem fazendo com que as populações atingidas carreguem diversos estigmas, causando, além de perdas financeiras, inúmeras mortes.

3 DOENÇA DE CHAGAS

A Tripanossomíase americana, conhecida como doença de Chagas, é uma DTN causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida por insetos hematológicos da subfamília Triatominae¹⁴⁻¹⁷ A patologia é considerada endêmica na América Latina, com os maiores afetados pertencentes a populações pobres que residem em condições precárias.⁷ Contudo, devido ao fenômeno migratório, a doença tem sido difundida ao redor do mundo.¹⁸ A Organização Mundial da Saúde (OMS)⁷ estima que haja de 6 a 7 milhões de portadores do parasito, 25 milhões de pessoas que possuem o risco de adquirir a doença e, em decorrência das manifestações clínicas associadas a esta, mais de 10 mil óbitos ocorrem anualmente em todo o mundo. Segundo dados do Ministério da Saúde¹⁹, o número de brasileiros infectados é superior a 1,9 milhões.

Em seres humanos, a doença se manifesta em três fases clínicas: aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda ocorre de 4 a 12 dias após a infecção com duração de poucas semanas ou meses e é caracterizada pela multiplicação do parasito em sua forma amastigota intracelular

em macrófagos e nos tecidos. Muitas vezes, nesta fase, a doença apresenta-se assintomática ou possuindo sintomas inespecíficos (tais como fadiga, febre, dores no corpo, dores de cabeça, erupção cutânea, perda de apetite, diarreia e vômito), por isso, por vezes não é detectada nesta fase. Em seguida, os pacientes entram na fase indeterminada da doença, na qual os parasitos desaparecem em grande parte do sistema sanguíneo, embora possam ser detectados nos músculos cardíacos e lisos; esta fase é assintomática e pode durar vários anos. Por fim, a fase crônica pode afetar o coração e os sistemas nervoso e digestivo, tendo duração de 20 a 30 anos. Além disso, é de difícil tratamento pois os parasitos no meio intracelular estão menos acessíveis e restritos a alguns tecidos em baixas concentrações.^{7,16,20-21}

FIGURA 1.1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*.

FONTE: Rassi *et al.* (2009)²³.

O ciclo biológico (FIGURA 1.1) do parasito é heteroxênico – envolvendo um hospedeiro invertebrado (insetos pertencentes a família Triatominae) e outro vertebrado (geralmente mamíferos) – e pode ser dividido em três formas distintas: epimastigota, tripomastigota e amastigota.²² O principal meio de infecção ocorre com a penetração do tripomastigoto metacíclico eliminado na urina ou nas fezes do triatomíneo durante o hematofagismo. Essa penetração pode se dar pela transferência acidental das fezes, ou urina,

para o ponto da picada ou mucosa dos olhos, nariz e boca.¹⁶ Formas mais raras de contaminação incluem a transfusão de sangue ou derivados sanguíneos, transmissão congênita, ingestão acidental do vetor em alimentos, contaminação acidental durante o trabalho de laboratório e transplante de órgãos.¹⁵⁻¹⁶

Uma vez dentro da célula, os tripomastigotos metacíclicos são diferenciados a amastigotos; esta forma se replica até que ocorra a lise celular.²⁴ No meio extracelular, as formas amastigotas são diferenciadas a tripomastigotas, as quais invadem novas células perpetuando a infecção.^{15,24} Ao picar o hospedeiro vertebrado, o inseto acaba por se infectar, tornando-se um vetor da doença.

Sobre os impactos econômicos associados à doença, um estudo de simulação publicado em 2013²⁵ mostra dados interessantes (Tabela 1.1). Para um indivíduo portador da doença o custo anual de assistência média gira em torno de \$474. Os DALYs (anos de vida perdidos ajustados por incapacidade, do inglês *Disability Adjusted Life Years*) anuais por indivíduo são de 0,51. O custo de assistência médica com desconto vitalício para um indivíduo é de em média \$3456 e os DALYs totais na vida do indivíduo infectado é de cerca de 3,57. O custo anual por indivíduo com a doença crônica para a sociedade (por exemplo, por custos com a saúde mais perda de produtividade) é de \$4660. Por fim, a partir destes dados, foi possível estimar que um indivíduo portador da doença custa em média \$27 684 durante sua vida. Muitos desses gastos devem-se às formas de tratamento terem eficácia limitada e possuírem diversos efeitos colaterais.

TABELA 1.1 - Custos (em dólares) por indivíduo associados a doença de Chagas.

Tipo de custo	América Latina	Europa	EUA, Canadá e Austrália	Global
assistência médica por ano	383	1762	2162	474
cuidados com a saúde ao longo da vida	2600	14 948	19 514	3456
anual para a sociedade com a fase crônica	4059	13 580	15 762	4660
total durante a vida	24 245	76 919	91 531	27 684

FONTE: LEE *et al.* (2013)²⁵.

A baixa eficiência no tratamento está associada ao fato do *T. cruzi* ser um parasito intracelular, o que representa um desafio extra para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que estes devem ser capazes de atravessar a membrana plasmática celular do hospedeiro antes de atuarem no parasito. Por isso, passados mais de cem anos do reconhecimento do *T. cruzi* como patógeno associado à doença, a terapêutica da mesma, além de continuar

parcialmente ineficaz, traz consigo toxicidade inaceitável, resistência aos medicamentos, hospitalização prolongada, altos custos e é restrita a dois fármacos (FIGURA 1.2): Benzonidazol (Bz, *Rochagan*®, *Radanil*®, *Roche*) e Nifurtimox (Nx, *Lampit*®, *Bayer*).²⁶ Ambos associados a sérios efeitos colaterais e por vezes ineficientes na fase crônica da doença.²⁷⁻²⁸

FIGURA 1.2 – Estrutura Benzonidazol e Nifurtimox.

FONTE: Autoria própria.

Os mecanismos de ação do Bz e do Nx são ainda pouco conhecidos. Estudos têm demonstrado que o grupo nitro em ambos os fármacos é reduzido a grupos amino pela ação de nitroredutases, levando a formação de vários radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos que causam modificações covalentes em macromoléculas (como proteínas e DNA).²⁹⁻³⁰ Todos esses intermediários reativos são responsáveis pelos mecanismos de estresse redutivo que promovem as ações deletérias observadas no *T. cruzi* e consequente ação farmacológica.³⁰ Como estes intermediários também interagem com macromoléculas presentes nos tecidos do hospedeiro, são igualmente responsáveis pelos efeitos toxicológicos observados em mamíferos.²⁹

Os problemas associados à administração desses fármacos para o tratamento da Doença de Chagas, assim como sua ineficácia durante a fase crônica, ressaltam a importância do desenvolvimento de novos compostos capazes de combater o *T. cruzi* com menores efeitos *off-target* e maior eficiência.

4 CISTEÍNO PROTEASES: FAMÍLIA DA PAPAÍNA

As cisteíno proteases (CP) da família da papaína são, em sua maioria, endopeptidases que hidrolisam a ligação amida através de uma tríade catalítica. Essa família é muito bem conservada estruturalmente. De fato, os resíduos de aminoácidos são diferentes, mas o

enovelamento é exatamente o mesmo. Para consecução de inibidores específicos, as pequenas diferenças são utilizadas. Com isso, é possível a inibição da protease alvo sem afetar as enzimas do hospedeiro.³¹⁻³²

Essas enzimas possuem o sítio catalítico (como mostrado para a enzima papaína na FIGURA 1.3) formado pela tríade catalítica que contém os resíduos de aminoácido: Cys, His e Asn (algumas vezes substituído por Asp).³³⁻³⁴ Há também a presença de um quarto resíduo, a Gln, que está envolvido na estabilização da cavidade do oxiânion que se forma durante a catálise, sendo considerado um resíduo acessório. De modo geral, este sítio pode ser dividido em sete subsítios (FIGURA 1.4) capazes de se ligar à aminoácidos de peptídeos (S1, S2, S3, S4, S1', S2' e S3'). Cada subsítios guarda características próprias que determinam quais resíduos do substrato podem se ligar a locais específicos, dando especificidade às enzimas.³⁵⁻³⁶

FIGURA 1.3 - Estrutura cristalográfica da papaína (PDB: 9PAP).

FONTE: KAMPHUIS *et al.*, 1984³³.

Na interface entre os domínios formados por hélices-α (vermelho) e folhas-β antiparalelas (verde) está a presença do sítio catalítico formado pela tríade Cys, His e Asn.

As enzimas da família da papaína estão presentes em sistemas biológicos que vão desde vírus até vertebrados, construindo cerca de 2% de todos os genes expressos.¹⁵ Nos seres humanos, as catepsinas são geralmente encontradas no interior dos lisossomos e estão envolvidas em diferentes processos *in vivo* como remodelamento ósseo (catepsina K), reconhecimento imunológico (catepsinas S, L, V e F), homeostase epidérmica, apoptose,

processamento de proteínas intracelulares (catepsina B, C e L) e de pró-hormônios.³⁷⁻³⁸ Além disso, existe uma vasta literatura que indica a participação de cisteíno proteases na patogênese de muitas doenças parasitárias, onde atuam principalmente no processamento de nutrientes e como fatores de virulência.³⁹⁻⁴⁰

FIGURA 1.4 - Representação esquemática de um substrato ligado a uma CP.

FONTE: TURK, 2006³⁵.

As proteases possuem superfícies, denominadas subsítios, que são capazes de acomodar uma única cadeia lateral de um resíduo de substrato. Os subsítios são nomeados de S1 a Sn seguindo a direção N-terminal e S1' a Sn' seguindo a direção do C-terminal. Os resíduos de substratos acomodados são numerados de P1 a Pn e P1' a Pn', respectivamente.

Devido às extensas funções das CPs da família da papaína, esse grupo de enzimas é alvo de pesquisas para o desenvolvimento de fármacos contra diversas enfermidades. Dentre essas, destacam-se câncer de mama, colorretal, pulmão, ovário, pâncreas e osteossarcomas, além de doenças neurodegenerativas (catepsina B), osteoporose (catepsina K), doenças autoimunes como artrite reumatoide e nefrite lúpica (catepsina S), asma, fibrose cística, doenças cardiovasculares, danos cerebrais traumáticos e doenças parasitárias como doença de Chagas, malária, doença do sono e leishmaniose.⁴⁰⁻⁴³

5 NITRILAS COMO GRUPOS *WARHEAD*

O grupo nitrila apresenta uma importante classe de *warhead* com propriedades biológicas consideradas favoráveis: baixo peso molecular, metabolicamente estável e polar.⁴⁴⁻

⁴⁵ Ademais, são conhecidas por realizarem ligações covalentes reversíveis com o grupo tiol presente na Cys.⁴⁵ Por isso, dentre os inibidores peptídeomiméticos covalentes reversíveis, os compostos contendo nitrilas como grupos *warhead* merecem especial destaque. Esses compostos são reconhecidos como inibidores de papaína há mais de três décadas e, além das

vantagens demonstradas pela presença das nitrilas, mostram atividade inibitória e seletividade contra cisteíno proteases.⁴⁴⁻⁴⁶

O mecanismo de inibição promovido por grupos nitrila é semelhante ao da reação de hidrólise peptídica e depende dos resíduos de Cys e His. Tem sido proposto que o grupo imidazol da His polariza o tioimidato (grupo tiol da cisteína, -SH) e possibilita sua desprotonação, formando um par iônico altamente nucleofílico $\text{CysS}^-/\text{HisH}^+$.⁴⁷ A existência deste par iônico foi experimentalmente provada por diferentes estudos⁴⁸⁻⁵⁰ e confirmada por modelos computacionais.⁵¹ O tiolato (CysS^-) formado promove um ataque nucleofílico às nitrilas, ligando-se covalentemente à enzima.⁵²

FIGURA 1.5 – Proposta de mecanismos de inibição de cisteíno proteases por peptidil nitrilas.

FONTE: Autoria própria.

A FIGURA 1.5 apresenta dois possíveis mecanismos, propostos por Dos Santos *et al.* (2018)⁵³, para a reação de inibição. No primeiro mecanismo (em vermelho), a protonação do N1 ocorre com o ataque nucleofílico do ânion tiolato (CysS^-). A segunda proposta (em preto) é a adição nucleofílica e transferência de próton, onde o grupo tiolato da Cys ataca o carbono *sp* do grupo nitrila primeiro para formar a ligação.

Dados experimentais sugerem que inibidores que contêm nitrilas como grupo *warhead* se ligam fortemente ao sítio ativo das CPs e inibem através da formação de uma ligação covalente reversível.⁵⁴ Embora reversível, esta inibição é eficiente devido ao tioimidato (grupo tiol da cisteína) ligar-se de maneira satisfatória; de acordo com o princípio HSAB (*Hard and Soft Acid and Bases*), a adição do enxofre nucleofílico mole polarizável das CPs ao carbono eletrofílico mole da ligação tripla da nitrila é favorecida.³²

Por isso, este trabalho busca inibir a enzima cruzaina (CP da família da papaína presente no *T. cruzi*) através do emprego de peptidil nitrilas, avaliando também sua ação sobre outras CPs.

REFERÊNCIAS

1. BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Cap. 1, p. 29-35. Porto Alegre: Artmed, 2001.
2. SILVA, A. C.A. da. **Novas imidazolidinas potencialmente esquistossomicidas: bioatividade de 2-tioxo-imidazolidin-4-onas frente a vermes adultos de *schistosomamansoni* (cepa BH)**. 131 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em biotecnologia de produtos bioativos, Centro de Ciências Biológicas, UFPE (Universidade Federal de Pernambuco), Recife-PE, 2004.
3. SILVA, Daniel Geder. **Planejamento, síntese e avaliação de inibidores da enzima cruzaina e de agentes tripanossomicidas derivados de imidazopiridina**. 2017. 207 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Química, Instituto de Química de São Carlos (IQSC), USP (Universidade de São Paulo), São Carlos, 2017.
4. OPREA, Tudor I. *et al.* Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, [s.l.], v. 41, n. 5, p.1308- 1315, set. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci010366a>.
5. FIOCRUZ, Fundação. **Portal Fiocruz: doença de chagas**. Doença de Chagas. 2020. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/taxonomia-geral-7-doencas-relacionadas/doenca-de-chagas>. Acesso em: 05 ago. 2020.
6. REES, Chris A.; HOTEZ, Peter J.; MONUTEAUX, Michael C.; NIESCIERENKO, Michelle; BOURGEOIS, Florence T. Neglected tropical diseases in children: an assessment of gaps in research prioritization. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 1-14, 29 jan. 2019. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007111>.
7. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) (Org.). **Chagas disease**. Disponível em: < <https://www.who.int/portuguese/countries/bra/pt/>>. Acesso em: 20 ago. 2019.
8. FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, [s.l.], v. 93, n. 1, p. 179-200, 10 dez. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldp046>.
9. HENRY, David; LEXCHIN, Joel. The pharmaceutical industry as a medicines provider. **The Lancet**, [s.l.], v. 360, n. 9345, p. 1590-1595, nov. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)11527-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(02)11527-3).

10. TROUILLER, Patrice; OLLIARO, Piero; TORREELE, Els; ORBINSKI, James; LAING, Richard; FORD, Nathan. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, [s.l.], v. 359, n. 9324, p. 2188-2194, jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)09096-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(02)09096-7).
11. CAMARGO, Erney Plessmann. Doenças tropicais. **Estudos Avançados**, [s.l.], v. 22, n. 64, p. 95-110, dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142008000300007>.
12. COLLIER, Paul. **The Bottom Billion: Why the Poorest Countries are Failing and What can be Done about It**. Oxford: Oxford University Press, 2008. 209 p.
13. Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH (2009) Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 373, p. 1570–1575.
14. CHAGAS, Carlos. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 1, p.1-62, 1909.
15. NEVES, David Pereira *et al.* **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
16. PRATA, Aluizio. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet: Infectious Diseases**, [s.l.], v. 1, p.92-100, set. 2001.
17. KASHIWABARA, Yorico Bacelar *et al.* Doença de Chaga: Revisão de Literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research (BJSCR)**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.49-52, set. 2013.
18. COURA, José Rodrigues; VIÑAS, Pedro Albajar. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, [s.l.], v. 465, n. 7301, p.S6-S7, 24 jun. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09221>.
19. SAÚDE, Ministério da. **Ministério da Saúde: doença de chagas**. Doença de Chagas. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>. Acesso em: 20 ago. 2019.
20. WIGGERS, Helton J. *et al.* Nonpeptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 7, n. 8, e2370, 22 ago. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002370>.
21. WILKINSON, Shane R.; KELLY, John M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 31, p.1-24, out. 2009. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1462399409001252>.
22. ANDREOLLO, Nelson Adami; MALAFAIA, Osvaldo. Os 100 anos da doença de Chagas no Brasil. **Arq. Bras. Cir. Dig. (ABCD)**, [s.l.], v. 4, n. 22, p.189-191, 2009.
23. RASSI JUNIOR, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antônio. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memórias do**

- Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 104, n. 1, p. 152-158, jul. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000900021>.
24. ALVAREZ, Vanina E.; NIEMIROWICZ, Gabriela T.; CAZZULO, Juan J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [s.l.], v. 1824, n. 1, p.195-206, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.011>.
 25. LEE, Bruce; BACON, Kristina M; BOTTAZZI, Maria Elena; HOTEZ, Peter J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 342-348, abr. 2013. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(13\)70002-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(13)70002-1).
 26. PATTERSON, Stephen; WYLLIE, Susan. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.289-298, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>.
 27. COURA, José Rodrigues. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 4, p.549-554, jan. 2009.
 28. COURA, José Rodrigues; CASTRO, Solange L. de. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p.3-24, jan. 2002.
 29. CASTRO, José A.; MECCA, María Montalo de; BARTEL, Laura C. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Diseases (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, [s. l.], n. 25, p.471-479, abr. 2006.
 30. MASANA, Mónica; TORANZO, Edith G. de; CASTRO, José A. Reductive metabolism and activation of benznidazole. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.1041-1045, abr. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90511-2](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(84)90511-2).
 31. WOLFENDEN, Richard; SNIDER, Mark J. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. **Accounts of Chemical Research**, [s.l.], v. 34, n. 12, p. 938-945, dez. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ar000058i>.
 32. OROZCO, Erika Vanessa Meñaca. **Síntese e Relações Estrutura-Atividade de Dipeptidil-nitrilas Inibidoras de Cruzaína**. 2014. 150 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Orgânica e Biológica, Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 2014.
 33. KAMPHUIS, I.G.; KALK, K.H.; SWARTE, M.B.A.; DRENT, J. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 179, n. 2, p. 233-256, out. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90467-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(84)90467-4).
 34. SAJID, Mohammed *et al.* Cruzain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [s.l.], p.100-115, 2011. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8414-2_7.

35. TURK, Boris. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.785-799, set. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2092>.
36. DURRANT, Jacob D. *et al.* Computational Identification of Uncharacterized Cruzain Binding Sites. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 4, n. 5, e676, 11 maio 2010. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000676>.
37. TURK, Boris; TURK, Dušan; TURK, Vito. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 1477, n. 1-2, p. 98-111, mar. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00263-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00263-0).
38. BRIX, Klaudia; DUNKHORST, Anna; MAYER, Kristina; JORDANS, Silvia. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. **Biochimie**, [s.l.], v. 90, n. 2, p. 194-207, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.024>.
39. ENGEL, Juan C.; DOYLE, Patricia S.; HSIEH, Ivy; MCKERROW, James H. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental Trypanosoma cruzi Infection. **Journal of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 188, n. 4, p. 725-734, 17 ago. 1998. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.188.4.725>.
40. MCKERROW, J; ENGEL, J C; CAFFREY, C R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 639-644, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896\(99\)00008-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896(99)00008-5).
41. URBINA, Julio A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 115, n. 1-2, p. 55-68, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.023>.
42. MAYA, Juan Diego; CASSELS, Bruce K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, Patricio; FERREIRA, Jorge; FAÑNDEZ, Mario; GALANTI, Norbel; FERREIRA, Arturo; MORELLO, Antônio. Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l.], v. 146, n. 4, p. 601-620, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>.
43. SELZER, P. M.; PINGEL, S.; HSIEH, I.; UGELE, B.; CHAN, V. J.; ENGEL, J. C.; BOGYO, M.; RUSSELL, D. G.; SAKANARI, J. A.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 96, n. 20, p. 11015-11022, 28 set. 1999. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.20.11015>.
44. LÖSER, Reik *et al.* Interaction of Papain-like Cysteine Proteases with Dipeptide-Derived Nitriles. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 48, n. 24, p.7688-7707, dez. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm050686b>.

45. FRIZLER, Maxim *et al.* Development of Nitrile-Based Peptidic Inhibitors of Cysteine Cathepsins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.294-322, 1 fev. 2010. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/156802610790725452>.
46. OTTO, Hans-hartwing; SCHIRMEISTER, Tanja. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. **Chem. Rev.**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.133-171, 1997.
47. KEILLOR, J. W.; BROWN, R. S. Attack of Zwitterionic Ammonium Thiolates on a Distorted Anilide as a Model for the Acylation of Papain by Amides: A Simple Demonstration of a Bell-Shaped pH/Rate Profile. **J. Am. Chem. Soc.**, [s.l.], v. 114, n. 1, p.7983-7989, 1992.
48. CREIGHTON, Donald J.; GESSOUROUN, Morris S.; HEAPES, James M. Is the Thiolate-Imidazolium Ion Pair the Catalytically Important From of Papain? **Febs Letters**, [s.l.], v. 110, n. 2, p.3-6, fev. 1980.
49. LEWIS, Sidney D.; JOHNSON, Frederick A.; SHAFER, Jules A. Potentiometric determination of ionizations at the active site of papain. **Biochemistry**, [s.l.], v. 15, n. 23, p.5009-5017, 16 nov. 1976. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00668a010>.
50. LEWIS, Sidney D.; JOHNSON, Frederick Allen; SHAFER, Jules A. Effect of cysteine-25 on the ionization of histidine-159 in papain as determined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Evidence for a histidine-159-cysteine-25 ion pair and its possible role in catalysis. **Biochemistry**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.48-51, 6 jan. 1981. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00504a009>.
51. WEI, Donghui *et al.* Reaction Pathway and Free Energy Profile for Papain-Catalyzed Hydrolysis of N-Acetyl-Phe-Gly 4-Nitroanilide. **Biochemistry**, [s.l.], v. 52, n. 30, p.5145-5154, 17 jul. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi400629r>.
52. ROUSH, William R. *et al.* Potent second generation vinyl sulfonamide inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 11, n. 20, p.2759-2762, out. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-894x\(01\)00566-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-894x(01)00566-2).
53. SANTOS, Alberto Monteiro dos *et al.* Experimental study and computational modelling of cruzain cysteine protease inhibition by dipeptidyl nitriles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 20, n. 37, p.24317-24328, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8cp03320j>.
54. AVELAR, Leandro A. A. *et al.* Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 7, e0003916, 14 jul. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003916>.

CAPÍTULO II

Objetivos

1 OBJETIVO GERAL

O objetivo central deste trabalho foi a obtenção de novos inibidores da enzima cruzaina derivados do **Neq0820** e **Neq0544**. Tendo como foco avaliar a influência das modificações em P3 e P2, respectivamente, no processo de reconhecimento bimolecular com a cruzaina e outras CPs.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Sintetize e caracterização de novas entidades químicas (NCEs) candidatas a inibidores da enzima cruzaina com base nos compostos protótipos **Neq0820** e **Neq0544**;
- II. Avaliação da atividade inibitória das NCEs, determinando os valores de pK_i contra a cruzaina e outras CPs da família da papaína (*hCatB*, *hCatL* e *hCatS*) – realizado por membros do grupo NEQUIMED;
- III. Obtenção de parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) a partir da calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para os derivados do **Neq0544** – realizado por membros do grupo NEQUIMED;
- IV. Estabelecimento da relação entre as modificações estruturais e os valores de inibição da enzima cruzaina (SAR);
- V. Estabelecimento da relação entre as modificações estruturais com os parâmetros termodinâmicos obtidos por ITC, avaliando as assinaturas termodinâmicas e classificando-as (para o **Neq0544**).

CAPÍTULO III

Ensaio enzimático para os derivados do Neq0820:
cruzaína/cruzipaína e outras cisteíno proteases

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cruzipaína/Cruzaína

O sequenciamento do genoma do *T. cruzi* contribuiu para a identificação de diversos alvos biológicos, especialmente enzimas, que têm sido estudados para o desenvolvimento de novos agentes antichagásicos.¹⁻² A enzima cruzaína (forma recombinante da cruzipaína, EC 3.4.22.51, enzima presente no parasito) possui interesse em nosso grupo de pesquisa e foi selecionada como alvo para os compostos desenvolvidos no presente trabalho.

A cruzipaína é a CP mais abundante no *T. cruzi* e, devido a sua capacidade de hidrolisar ligações peptídicas, tem como principal função a nutrição do patógeno.³⁻⁴ Esta enzima também está envolvida em processos importantes da interação parasito-hospedeiro, tais como: invasão da célula mamífera, replicação, diferenciação, metabolismo e evasão de mecanismos de defesa.⁵⁻¹⁰ Sua expressão ocorre em todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* como uma mistura complexa de isoformas, estando localizada em diferentes compartimentos na célula do parasito.⁹⁻¹¹ No estágio epimastigota, onde são observados níveis de expressão até dez vezes maiores em relação aos outros estágios, a protease está confinada em uma organela pré-lisossomal conhecida como reservossoma.^{10,12-13} Para o estágio intracelular amastigota, chave no tratamento da doença, isoformas da protease são encontradas no reservossoma e ainda ligado à face externa da membrana plasmática diretamente em contato com o citoplasma da célula do hospedeiro.¹³ Portanto, a cruzipaína pode operar em dois microambientes químicos: no reservossoma (pH 6,3) e na superfície do parasito (pH 7,4).¹⁴

O sítio catalítico da enzima encontra-se na interface entre dois domínios (um deles composto predominantemente de hélices- α e outro por folhas- β antiparalelas).¹⁵ Possuindo sete subsítios (FIGURA 3.1), dos quais apenas quatro são atualmente explorados (S3, S2, S1 e S1'). Dentre eles, o subsítio S2 tem recebido especial destaque pois é o principal responsável pela especificidade da enzima pelo substrato. Os subsítios S1', S1 e S3 são menos definidos e mais expostos ao solvente, porém são formados por resíduos importantes para o reconhecimento e posicionamento de ligantes.¹⁶

FIGURA 3.1 – (a) Representação da estrutura da cruzaina. (b) Sítio catalítico da cruzaina, em superfície de Van der Waals colorida de acordo com os subsítios de ligação, interagindo com um ligante.

FONTE: (a) SOUZA, 2017¹⁷; (b) DURRANT et al., 2010¹⁸.

Vários estudos têm demonstrado que o uso de inibidores sobre o sítio-ativo da cruzaina bloqueia a proliferação do parasito em sua forma epimastigota extracelular e amastigota intracelular, além de suspenderem a metaciclogênese (transformação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos)¹⁸⁻²⁰ levando o protozoário a morte.²¹⁻²⁸ Sendo assim, o desenvolvimento de inibidores desta enzima representa uma excelente alternativa na busca de novas substâncias capazes de combater a doença de Chagas.

1.2 Desenvolvimento de inibidores da cruzaina

O planejamento de ligantes que inibem a cruzaina baseia-se nos quatro principais subsítios do sítio ativo (FIGURA 3.2): o subsítio de direção (S3), o subsítio de reconhecimento (S2), o subsítio de potenciação (S1) e o subsítio warhead (S1').²⁹

O subsítio S1 fica próximo à tríade catalítica da cruzaina e abriga os resíduos Cys25 (catalítica), Gln19, Gly23, Ser64 e Leu67.¹⁶ Chamado de subsítio de potencialização, pode ser utilizado para aumentar a atividade por meio do abrigo de diferentes substituintes na posição P1, estes substituintes aproximam a porção eletrofílica da molécula (grupo de reconhecimento químico, também denominado de *warhead*) do enxofre da Cys.^{8,30-32} A estereoquímica destes grupos P1 tem se mostrado relevante e inibidores contendo análogos da Phe nesta posição mostram-se promissores.³³⁻³⁴

FIGURA 3.2 - Representação 2D do esqueleto básico de um inibidor peptídico (contendo nitrila como grupo *warhead*) a ser modificado em P1, P2 e P3 (complementares aos subsítios S1, S2 e S3).

FONTE: Autoria própria.

A região S2 é conhecida como subsítio de especificidade por ser determinante para o planejamento da seletividade do inibidor, sendo amplamente explorada em estudos de Relação Estrutura-Atividade (SAR, do inglês *Structure Activity Relationship*). Pouco exposta ao solvente, a cavidade é delimitada pelas cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos Met68, Ala133, Leu157 e Gly160.^{15,18,35} Por isso costuma abrigar P2 compostos por peptídeos hidrofóbicos e volumosos.^{4,30-31} Além disso, há a presença do grupo Glu205 – localizado na extremidade de S2 – que confere carga negativa a região, favorecendo a interação com grupos carregados positivamente.^{4,35} Este resíduo (Glu205) pode adotar uma conformação direcionada ao substrato ou dirigida para o solvente, dependendo da disponibilidade de um parceiro de ligação de hidrogênio ou eletrostático na cavidade.⁴ Na presença de tal grupo, a cadeia lateral do Glu se volta para dentro do sítio ligante da cruzaina. Por outro lado, quando um ligante possui apenas caráter hidrofóbico, o Glu205 se direciona para fora da estrutura da cavidade e interage com os solventes da superfície da molécula.^{4,31} A FIGURA 3.3 mostra a interação desse resíduo com Phe, Arg e Tyr. No caso da Phe (amarelo), a cadeia lateral do resíduo Glu205 se volta ao solvente. Entretanto, com a cadeia lateral da Arg (azul) ocupando o S2, o Glu205 se move para dentro da cavidade formando uma ponte salina com o grupo guanidínio carregado. A interação com a Tyr (vermelho), por sua vez, não se mostra forte o suficiente para mover o Glu205 para uma posição dirigida totalmente ao substrato. Estudos já demonstraram a afinidade da região S2 pelos aminoácidos naturais fenilalanina³⁶, leucina³⁶, valina³⁷, também por grupos não-naturais como ciclobutila³³, cicloexila³⁸, cicloexilalanina³⁹ e β -sulfonila⁴⁰.

FIGURA 3.3 – Conformação da cadeia lateral do Glu205 na cruzaína interagindo com Phe, Arg e Tyr.

FONTE: GILLMOR; CRAIK; FLETTERICK, 1997 ⁴.

O subsítio S3 contém resíduos Ser61, Ser64, Gly65, Gly66 e Leu67.¹⁶ Devido à presença dos resíduos de Ser, este subsítio apresenta uma porção exposta ao solvente e é capaz de realizar ligações de hidrogênio com o inibidor.³² Suas características também permitem a utilização de grupos P3 mais volumosos, aumentando a seletividade frente a outras enzimas, como a catepsina S (que apresenta um subsítio S3 menor e delimitado). Uma vez que diversos grupos são tolerados em P3 sem perda de potência, é possível explorar essa região como moduladora de propriedades físico-químicas e biológicas, como lipofilicidade e estabilidade metabólica.³²⁻³³

O subsítio S1', por sua vez, é pouco explorado, havendo inibidores potentes que sequer interagem com essa região. Sabe-se que substituintes volumosos, como anéis aromáticos substituídos, podem ser acomodados nesse subsítio, que também possibilita a formação de ligações de hidrogênio.³³ Nele são encontrados os outros dois aminoácidos que compõe a tríade catalítica (His162 e Asn182) e os resíduos Asp161 e Trp184.¹⁶

A maioria dos inibidores mimetiza substratos naturais (peptidomimético) e podem ser divididos em irreversíveis e reversíveis.⁴¹ Dentre os inibidores que interagem por mecanismo

covalente irreversível, destacam-se os que possuem grupos *warhead* baseados em diazometano, diazometil-, fluorometil-cetonas, dipeptidil- α , β -epóxi-cetonas, epóxidos peptídicos, alil- e vinil sulfonas.^{9,41-42} Por outro lado, dentre os inibidores que atuam por mecanismos reversíveis destacam-se os que possuem grupos eletrofílicos-*warhead* do tipo aldeídos peptídicos, α -cetonas, diamino-cetonas e nitrilas.^{41,43} Da pequena fração de inibidores não peptídeomiméticos identificados, destacam-se as tiossemicarbazonas e semicarbazonas.^{41,44} Porém, na tentativa de evitar efeitos *off-target*, cada vez mais no design racional de fármacos tem sido evitado o desenvolvimento de inibidores que se liguem às enzimas de maneira irreversível, uma vez que acabam sendo mais susceptíveis a promiscuidade e toxicidade.³³

1.3 Outras CPs: CatB, CatL e CatS

Embora o alvo principal do presente trabalho seja a cruzaína, os compostos sintetizados foram também avaliados contra outras CPs da família das papaínas (*hCatB*, *hCatL* e *hCatS*) cujo inibições também são de interesse farmacoterapêutico.

A catepsina L (*hCatL*) é encontrada em humanos e participa da proteólise lisossômica e reabsorção óssea, tendo supostamente um papel importante em doenças do tecido ósseo (como artrite e câncer ósseo).⁴⁵ Além disso, níveis elevados de *hCatL* foram detectados em uma série de doenças malignas: carcinomas de mama, cólon, cabeça, pescoço e sistema gástrico, assim como melanomas e gliomas.⁴⁶⁻⁵⁰

A catepsina S (*hCatS*) desempenha um papel crucial no sistema imunológico e na nocicepção (processos de percepção da coceira e da dor).⁵⁰ Esta atividade nociceptiva é resultado da ação da CatS como sinalizador de receptores acoplados à proteína G.⁵⁰ Com isso, a inibição desta enzima tem potencial de ser uma via para o desenvolvimento de novos analgésicos, para o tratamento de doenças autoimunes e de processos de irritação cutânea.⁵¹

A catepsina B (*hCatB*) é uma CP lisossomal e, como as demais catepsina citadas, encontrada em seres humanos. Esta enzima está relacionada a processos celulares, acúmulo de plaquetas e reciclagem de proteínas, estando supostamente envolvida com a transformação de tumores do estado pré-maligno para o estado maligno.⁵²

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Ensaios de inibição enzimática

Os ensaios fluorimétricos de cinética enzimática permitem determinar duas grandezas fundamentais: a constante de Michaelis-Menten (K_M) da enzima e a constante de inibição (K_i) do substrato/inibidor.

A K_M é definida como a concentração do substrato para a qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima de catálise. Como este valor é característico para cada enzima, foi determinado antes dos outros experimentos, sendo utilizado como parâmetro para avaliar a qualidade da enzima empregada (um aumento no valor de K_M pode indicar desnaturação da proteína e sua diminuição a existência de erros experimentais).

FIGURA 3.4 – Reação de hidrólise do Z-FR-AMC (substrato empregado).

FONTE: Autoria própria.

O método para o estudo das enzimas utilizado neste trabalho, parte da clivagem do substrato Z-FR-AMC (*Z-PheArg-7-amido-4-metilcumarina*) que dá origem a uma molécula de metilcumarina que é fluorescente (FIGURA 3.4). Para a *hCatK*, no entanto, o substrato empregado possuía a fenilalanina substituída por uma leucina.

Para realização dos ensaios, além do substrato, foram empregados Triton e DTT (ditiotreitól). Triton é o nome comercial do surfactante não-iônico (composto por uma cadeia hidrofílica de óxido de polietileno e um grupo hidrofóbico aromático) e utilizado para evitar a agregação de proteínas nas tubulações do equipamento durante o processo de ativação. O DTT,

por sua vez, é um agente redutor que realiza a quebra de ligações dissulfeto e a ativação da enzima (FIGURA 3.5).

FIGURA 3.5 – Redução de uma ligação dissulfeto e oxidação do DTT.

FONTE: Autoria própria.

O método para determinação da K_i (procedimento descrito no item 2.2 deste capítulo) consiste na análise da curva progresso que pode ser utilizada para inibidores tempo e dose dependentes. Concentrações variadas do composto a ser testado foram incubadas com uma concentração constante de enzima. Em seguida, o Z-FR-AMC foi adicionado e a reação estudada por um longo período de tempo através do qual a condição de equilíbrio é mantida. Um controle, no qual houve ausência do inibidor, foi empregado a fim de garantir a linearidade do ensaio durante o tempo de análise.

A curva de progresso da reação foi dada pela fluorescência em função do tempo e a partir da sua regressão não-linear foi determinada a constante de inibição aparente (K_i') para os compostos estudados. Isso ocorreu pelo emprego da equação $V_s = V_o/(1+[I]/K_i')$, onde V_s é a taxa no estado estacionário, V_o é a taxa na ausência do inibidor e $[I]$ a concentração do inibidor. Por fim, a constante de inibição verdadeira (K_i) foi calculada pela correção de K_i' de acordo com $K_i = K_i'/(1+[S]/K_M)$, onde $[S]$ é a concentração do substrato.

2.2 Procedimento para determinação das K_M e K_i

A expressão e purificação da cruzaína e *Lm*CPB foram realizadas como descrito nos nossos trabalhos recentes Cianni *et al.* (2018)⁵³ e Cianni *et al.* (2019)⁵⁴. As catepsina humanas B, L, K e S foram compradas da Enzo Life Science®. Todos os ensaios foram realizados por membros do grupo NEQUIMED (doutoranda Fernanda Rocho e mestrando Rodrigo Cendron).

Os ensaios de cinética enzimática foram realizados em um fluorímetro Biotek Synergy HT system, usando microplacas pretas de 96 poços (Corning®) a 25 °C em 200 µL de uma solução contendo 7 nM DDT (Sigma-Aldrich), 4% em volume de DMSO, 0,014% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), empregando a concentração de 0,15 nM de enzima e o tampão adequado

para cada enzima. A taxa de reação foi monitorada utilizando a emissão de fluorescência de 460 nm (excitação de 360 nm) devido a hidrólise do substrato fluorogênico (Z-FR-AMC).

Cada enzima passou por um processo de ativação próprio antes do ensaio, no qual o tempo e a temperatura de ativação, concentração da enzima e solução tampão variam (Tabela 3.1). Para isso, as alíquotas de estoque foram descongeladas à temperatura ambiente e incubada conforme dados da tabela, utilizando a solução tampão contendo 7 nM DTT (Sigma-Aldrich) e 0,014% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich). A taxa de reação foi monitorada por 5 min, no qual a taxa de hidrólise do substrato foi medida. Para determinação da K_M (constante de Michaelis-Menten), oito diferentes concentrações de substrato foram preparadas com um fator de diluição 0,5. Sendo realizados em triplicata.

Tabela 3.1 - Parâmetros empregados para os ensaios enzimáticos.

Enzima	Concentração (nM)	Solução Tampão	Tempo de ativação	Temperatura de ativação
Cruzaína	0,15	100 nM acetato de sódio (pH = 5,5)	15 min	0 °C
hCatL	1,9	100 nM acetato de sódio (pH = 5,5)	20 min	0 °C
hCatS	1,12	100 nM citrato de sódio (pH = 6,0)	60 min	37 °C
hCatB	0,7	100 nM fosfato de sódio (pH = 6,0)	30 min	37 °C

A determinação do K_i foi realizada seguindo o mesmo protocolo descrito na Tabela 3.1. No entanto, a concentração de substrato empregada foi fixada e igual ao valor de K_M . A concentração final de 4 % (10 μ L) de DMSO (Sigma-Aldrich) foi utilizada em cada poço.

Uma inspeção visual e pré-leitura dos poços foi realizada a fim de verificar possíveis precipitações e fluorescências de fundo, respectivamente. Nenhum dos compostos mostrou uma fluorescência significativa a 460 nm. Portanto, os efeitos potenciais do filtro interno não precisaram ser considerados. A análise dos dados se deu pelo emprego do software Sigma Plot10. Cada experimento foi realizado em triplicata, utilizando oito diluições em série (fator 0,5) do inibidor. As taxas de hidrólise inicial do substrato foram calculadas utilizando o software Gen5TM Biotek. O inibidor de ligação rápida covalente reversível **Neq0570**⁵³ foi utilizado como controle em cada placa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um trabalho prévio foi realizada uma análise da SAR de inibidores da Cruzaína (Cz) possuindo nitrila como grupo *warhead* e trifluoroetilamina como substituto a amida ligada ao P3 (derivados do Odanacatib, Figura 3.6). O estudo resultou em dois potentes e seletivos inibidores reversíveis competitivos de Cz (**Neq0659** e **Neq0820**)⁵⁶⁻⁵⁷.

FIGURA 3.6 - Estrutura 2D do Odanacatib, Neq0659 e Neq0820.

FONTE: Autoria própria.

Os compostos apresentados no presente trabalho são derivados do **Neq0659** e **Neq0820** que apresentam diferentes substituintes nas posições *meta* e *para* do anel benzílico presente em P3 a fim de avaliar a influência da interação P3/S3 e como a posição do substituinte pode afetar o processo de reconhecimento bimolecular com diferentes CPs. A rota sintética empregada na obtenção destes compostos está reportada na Figura 3.7 (e no Capítulo V). As estruturas químicas dos compostos *para* e *meta* substituídos estão representados nas Figura 3.8 e 3.9, respectivamente.

FIGURA 3.8 - Estrutura química dos compostos *para* substituídos.

FONTE: Autoria própria.

FIGURA 3.9 - Estrutura química dos compostos *meta* substituídos.

FONTE: Autoria própria.

Os valores das constantes de inibição (K_i , expresso em $pK_i = -\log K_i$) para a CP do parasito *T. cruzi* (Cz) e as catepsina humanas (*hCatK*, *hCatL*, *hCatS* e *hCatB*) estão reportados na TABELA 3.2. A análise de SAR considerou as diferenças na afinidade (ΔpK_i) relacionadas as transformações estruturais. A ΔpK_i é calculada como a diferença entre dois inibidores. As

modificações que levaram a valores de ΔpK_i iguais ou inferiores a 0.2 unidades log foram consideradas não significativas e caracterizadas como substituições bioisostéricas. Acerca da seletividade, valores de ΔpK_i maiores ou iguais a 1.0 unidade log foram considerados significativos. Como ponto de partida para a análise de SAR, o **Neq0820** foi utilizado como composto protótipo.

TABELA 3.2 – Resultado dos ensaios de cinética enzimática.

<i>Composto</i>	<i>Cz</i>	<i>hCatL</i>	<i>hCatS</i>	<i>hCatB</i>
Neq0659	9.2 ± 0.01	5.8 ± 0.03	7.3 ± 0.07	4.9 ± 0.1
Neq0820	8.8 ± 0.01	7.6 ± 0.01	8.4 ± 0.05	5.6 ± 0.1
Neq1009	8.8 ± 0.03	8.1 ± 0.06	8.4 ± 0.02	<4.0
Neq1038	8.8 ± 0.02	9.4 ± 0.01	8.4 ± 0.01	<4.0
Neq1039	8.4 ± 0.03	8.0 ± 0.07	8.7 ± 0.01	<4.0
Neq1040	8.3 ± 0.03	6.9 ± 0.1	7.9 ± 0.03	<4.0
Neq1056	7.6 ± 0.09	5.7 ± 0.04	6.6 ± 0.06	<4.0
Neq1068	8.8 ± 0.1	7.2 ± 0.03	7.8 ± 0.03	<4.0
Neq1075	9.7 ± 0.03	6.5 ± 0.02	6.6 ± 0.07	<4.0
Neq1079	8.2 ± 0.05	6.8 ± 0.02	7.0 ± 0.02	<4.0
Neq1083	8.8 ± 0.01	9.1 ± 0.03	8.7 ± 0.02	5.7 ± 0.04
Neq1139	n.d.	6.5 ± 0.04	6.4 ± 0.02	<4.0
Neq1140	n.d.	6.3 ± 0.06	6.3 ± 0.1	<4.0
Neq1141	n.d.	7.9 ± 0.05	7.6 ± 0.02	<4.0

n.d. = não determinado.

TABELA 3.3 – Comparação entre os compostos *para* e *meta* substituídos.

Modificação [<i>para</i> → <i>meta</i>]	R	ΔpK_i			
		Cz	CatL	CatS	
Neq0820/Neq1009		0.0	+0.5	0.0	
Neq1083/Neq1038		0.0	+0.3	-0.3	
Neq1056/Neq1040		+0.7	+1.2	+1.3	
Neq1079/Neq1068		+0.6	+0.4	+0.8	
Neq0659/Neq1039		-0.8	+2.2	+1.4	

3.1 SAR: Cruzaína

A FIGURA 3.10 mostra a SAR para os compostos do presente trabalho, apresentando a ΔpK_i nas setas. A ΔpK_i das modificações que apresentaram um ganho na atividade está em verde, no caso da diminuição em vermelho e quando não significativa (bioisostérica) em preto.

Os compostos contendo pirimidina (**Neq0820**) e o átomo de bromo (**Neq1083**) não apresentaram diferença significativa nos valores de pK_i , possuindo uma relação bioisostérica. Entretanto, a troca da pirimidina por uma piridina (**Neq1079**), ou seja, a troca de um dos nitrogênios por um CH, resultou em um decréscimo (-0.6) na atividade, mostrando que a presença deste nitrogênio é favorável a interação da enzima com o inibidor. Por outro lado, a substituição do outro nitrogênio por um CH (**Neq0659**) (troca da piridina por uma fenila) gerou um incremento de +1.0 unidades, mostrando-se até mais favorável a interação com a enzima que o **Neq0820** (+0.4).

A substituição dos hidrogênios contidos nas posições *meta* e *para* do anel aromático do **Neq0659** por metoxilas, ou seja, a troca da fenila pelo 3,4,5-trimetóxfenil (**Neq1056**), fez com que o valor de pK_i fosse reduzido em 1.6 unidades. Por outro lado, com a troca do 3,4,5-trimetóxfenil pelo 3,4-dimetóxfenil (**Neq1075**) (troca do -OCH₃ da posição 5 por um hidrogênio) resultou em um ganho de atividade (+0.5), gerando um incremento de 1.1 unidades em relação ao composto protótipo (**Neq0820**).

A diferença de afinidade dos compostos *para* e *meta* substituídos está presente na TABELA 3.4. Embora para os compostos apresentando *3,4,5-trimetóxfenil* (**Neq1056/Neq1040**, +0.7) e *fenila* (**Neq0659/Neq1039**, -0.8) tenha sido obtida uma diferença nos valores, a média de ΔpK_i para a troca das posições mostra que tal mudança não afeta significativamente a interação dos inibidores com a cruzaina.

Todos os compostos apresentaram alta capacidade de inibição da enzima, com destaque para o **Neq1075** que apresentou maior valor de pK_i ($pK_i = 9.7$).

FIGURA 3.10 – SAR dos derivados do Neq0820 frente à cruzaina.

FONTE: Autoria própria.

3.2 SAR: catepsinas humanas (*hCatB*, *hCatL* e *hCatS*)

A FIGURA 3.11 mostra a SAR para os inibidores apresentando a ΔpK_i nas caixas. Assim como para a cruzaina, a substituição da pirimidina (**Neq0820**) por uma piridina (**Neq1079**) resultou em uma diminuição do valor de pK_i das enzimas *hCatL* e *hCatS* (-0.8 e -1.4, respectivamente). Por outro lado, a troca da pirimidina por um átomo de bromo resultou em um ganho de atividade (+1.5 e +0.3, respectivamente) para ambas as catepsinas.

A substituição da piridina (**Neq1079**) por uma fenila (**Neq0659**) resultou em uma queda na ΔpK_i (-1.0) para a *hCatL* e um aumento (+0.3) para a *hCatS*. A inserção das três metoxilas (**Neq1056**) mostrou-se uma modificação bioisostérica no caso da *hCatS* e gerou a queda da atividade (-0.7) para a interação com a *hCatS*. Por outro lado, a presença das duas metoxilas que deram origem ao **Neq1075** promoveu um aumento no valor de pK_i (+0.7) frente a *hCatL* e

uma diminuição (**-0.7**) para a *hCatS*. Assim como a introdução de uma metoxila na posição *meta* (**Neq1139**), resultando em um ganho de **+0.7** unidades para a *hCatL* e uma queda de **-0.9** para a *hCatS*.

A maior parte dos inibidores mostrou-se inativo contra a *hCatB*, com exceção do **Neq0659** ($pK_i = 4.9$), **Neq0820** ($pK_i = 5.6$) e **Neq1083** ($pK_i = 5.7$) todos compostos *para* substituídos.

Através dos dados expressos na TABELA 3.4 foi possível notar que a interação da *hCatL* e *hCatS* com os inibidores *meta* substituídos é mais favorável que com os *para* substituídos. O **Neq1038** e **Neq1083** (com o bromo como substituinte nas posições *meta* e *para*, respectivamente) apresentaram maior capacidade de inibição (**pK_i acima de 9.0**) frente a *hCatL*. Contra a *hCatS*, os compostos a apresentar os maiores valores de pK_i foram o **Neq1039** e **Neq1083** ($pK_i = 8.7$).

A maior parte das moléculas deste trabalho apresentou alta afinidade *in vitro* para cruzaina, *hCatL* e *hCatK*. A vantagem desta alta afinidade é a maior probabilidade de através da administração de dosagens baixas atingir os alvos de interesse (e consequentemente obter os efeitos terapêuticos desejados). Outras vantagens incluem a redução de efeitos de ligação inespecífica com proteínas relacionadas a efeitos tóxicos, bem como toxicidade prolongada e riscos de reações adversas devido a geração de metabólitos reativos.⁵⁸

FIGURA 3.11 – SAR dos derivados do Neq0820 frente às catepsinas L e S.

FONTE: Autoria própria.

3.3 Seletividade

Os resultados obtidos para comparação das enzimas a fim de determinar a seletividade estão representados na TABELA 3.4.

TABELA 3.4 – Análise da seletividade dos inibidores.

Composto	ΔpK_i		
	(Cz-hCatL)	(Cz-hCatS)	(hCatL-hCatS)
<i>Neq0659^c</i>	+3.4	+1.9	-1.5
<i>Neq0820^a</i>	+1.2	+0.4	-0.8
<i>Neq1009^{a*}</i>	+0.7	+0.4	-0.3
<i>Neq1038^{b*}</i>	-0.6	+0.4	+1.0
<i>Neq1039^{c*}</i>	+0.4	-0.3	-0.7
<i>Neq1040^{d*}</i>	+1.4	+0.4	-1.0
<i>Neq1056^d</i>	+1.9	+1.0	-0.9
<i>Neq1068^{e*}</i>	+1.6	+1.0	-0.6
<i>Neq1075</i>	+3.2	+3.1	-0.1
<i>Neq1079^e</i>	+1.4	+1.2	-0.2
<i>Neq1083^b</i>	-0.3	+0.1	+0.4
<i>Neq1139</i>	-	-	+0.1
<i>Neq1140</i>	-	-	0.0
<i>Neq1141</i>	-	-	+0.3

*Compostos *meta* substituídos tendo seu correspondente na posição *para* a mesma letra sobrescrita.

Em negrito os valores de $\Delta pK_i \geq 1.0$ (presença de seletividade)

É possível observar que os inibidores apresentam uma tendência de seletividade para a cruzaina frente às catepsinas L, S e B. Vale ressaltar que os compostos *para* substituídos se mostraram mais seletivos que os contendo os substituintes na posição *meta*. O **Neq0659**,

Neq1056, **Neq1075** e **Neq1079** apresentaram maior seletividade, com valores de ΔpK_i superiores a +1.0.

Quanto as catepsinas humanas, foi possível observar uma tendencia dos inibidores a seletividade para a *hCatS*. O **Neq0659** e o **Neq1040** mostraram-se seletivos frente a essa enzima. Por outro lado, o **Neq1038** apresentou seletividade para a *hCatL*. Todos os inibidores apresentaram seletividade para as catepsinas L e S frente a catepsina B (TABELA 3.3).

O **Neq0659** ($pK_i = 9.2$), **Neq1056** ($pK_i = 7.6$), **Neq1075** ($pK_i = 9.7$) e **Neq1079** ($pK_i = 8.2$) são inibidores da enzima cruzaina promissores na busca de tripanossomiscidas devido a sua alta capacidade de inibição e seletividade frente as catepsinas humanas (*hCatL*, *hCatS* e *hCatB*). O **Neq659** ($pK_i = 7.3$) e **Neq1040** ($pK_i = 7.9$) mostraram-se inibidores seletivos da enzima *hCatS* frente as catepsinas humanas L e B. E, por fim, o **Neq1038** ($pK_i = 9.1$) se apresentou como um potente e seletivo inibidor da *hCatL*.

REFERÊNCIAS

1. TURK, Boris. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.785-799, set. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2092>.
2. CAZZULO, Juan Jose; STOKA, Veronika; TURK, Vito. The Major Cysteine Proteinase of *Trypanosoma cruzi*: A Valid Target for Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 7, p.1143-1156, 2001.
3. ALVAREZ, Vanina E.; NIEMIROWICZ, Gabriela T.; CAZZULO, Juan J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [s.l.], v. 1824, n. 1, p.195-206, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.011>.
4. GILLMOR, Sarah A.; CRAIK, Charles S.; FLETTERICK, Robert J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, [s.l.], v. 6, p.1603-1611, 1997.
5. WILKINSON, Shane R.; KELLY, John M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 31, p.1-24, out. 2009. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1462399409001252>.
6. MASANA, Mónica; TORANZO, Edith G.d. de; CASTRO, José A. Reductive metabolism and activation of benzimidazole. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.1041-1045, abr. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90511-2](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(84)90511-2).

7. TURK, Boris. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.785-799, set. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2092>.
8. GILLMOR, Sarah A.; CRAIK, Charles S.; FLETTERICK, Robert J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, [s.l.], v. 6, p.1603-1611, 1997.
9. MCKERROW, James H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. **International Journal for Parasitology**, [s.l.], v. 29, p.833-837, 1999.
10. EAKIN, Ann E. *et al.* The Sequence, Organization, and Expression of the Major Cysteine Protease (Cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 267, n. 11, p.7411-7420, abr. 1992.
11. DUSCHAK, Vilma G.; COUTO, Alicia 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**, [s.l.], n. 16, p.3174-3202, 2009.
12. NASCIMENTO, Alana E.; SOUZA, Wanderley de. High Resolution Localization of Cruzipain and Ssp4 in *Trypanosoma cruzi* by Replica Staining Label Fracture. **Biol Cell**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.53-58, mar. 1996.
13. MCKERROW, James H. *et al.* Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **J. Exp. Med.**, [s.l.], v. 188, n. 4, p.725-734, ago. 1998.
14. ENGEL, Juan C. *et al.* Unpregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, [s.l.], v. 113, n. 1, p.1345-1354, mar. 2000.
15. SAJID, Mohammed *et al.* Cruzain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [s.l.], p.100-115, 2011. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8414-2_7.
16. PAULI, Ivani. **Planejamento de inibidores da enzima cruzaina candidatos a fármacos contra a doença de Chagas**. 2016. 131 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Física, Instituto de Física (IFSC), USP (Universidade de São Paulo), São Carlos, 2016.
17. SOUZA, Mariana Laureano de. **Planejamento de inibidores da enzima cruzaina de Trypanossoma cruzi candidatos a fármacos contra a doença de Chagas**. 2017. 103 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Física, Instituto de Física de São Carlos (IFSC), USP (universidade de São Paulo), São Carlos, 2017.
18. DURRANT, Jacob D. *et al.* Computational Identification of Uncharacterized Cruzain Binding Sites. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 4, n. 5, e676, 11 maio 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000676>.

19. BRAK, Katrien *et al.* Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 130, n. 20, p.6404-6410, maio 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja710254m>.
20. ROMEIRO, Nelilma C. *et al.* Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.641-652, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.11.065>.
21. WIGGERS, Helton J. *et al.* Nonpeptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 7, n. 8, e2370, 22 ago. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002370>.
22. BURTOLOSO, Antonio C. B. *et al.* Anti- trypanosomal activity of non- peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 2, e0005343, 21 fev. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005343>.
23. JONES, Brian D. *et al.* Synthesis and Evaluation of Oxyguanidine Analogues of the Cysteine Protease Inhibitor WRR- 483 against Cruzain. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.77-82, 15 dez. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00336>.
24. AVELAR, Leandro A. A. *et al.* Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 7, e0003916, 14 jul. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003916>.
25. ELIZONDO- JIMENEZ, Silvia *et al.* Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking of New Benzenesulfonylhydrazone as Potential anti-*Trypanosoma cruzi* Agents. **Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.149-158, 30 jan. 2017. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/1573406412666160701022230>.
26. CIANNI, Lorenzo *et al.* Leveraging the cruzain S3 subsite to increase affinity for reversible covalent inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 79, p.285-292, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.04.006>.
27. BRAGA, Saulo Fehelberg Pinto *et al.* Synthesis and biological evaluation of potential inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain designed by molecular simplification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.1889-1900, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.009>.
28. GOMES, Juliana C. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship of nitrile-based cruzain inhibitors incorporating a trifluoroethylamine-based P2 amide replacement. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115083>.

29. FARADY, Christopher J.; CRAIK, Charles S. Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. **Chembiochem**, [s.l.], v. 11, n. 17, p.2341-2346, 4 nov. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201000442>.
30. GAUTHIER, Jacques Yves *et al.* The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.923-928, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.12.047>.
31. POLITICELLI, Fabio *et al.* Probing the Cruzain S2 Recognition Subsite: A Kinetic and Binding Energy Calculation Study. **Biochemistry**, [s.l.], v. 44, n. 8, p.2781-2789, mar. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi048417v>.
32. SILVA, Daniel Geder. **Planejamento, síntese e avaliação de inibidores da enzima cruzaina e de agentes tripanossomicidas derivados de imidazopiridina**. 2017. 207 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Química, Instituto de Química de São Carlos (IQSC), USP (universidade de São Paulo), São Carlos, 2017.
33. NICOLL-GRIFFITH, Deborah A. Use of cysteine-reactive small molecules in drug discovery for trypanosomal disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.353-366, 6 mar. 2012. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2012.668520>.
34. BEAULIEU, Christian *et al.* Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 20, n. 24, p.7444-7449, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.10.015>.
35. MCGRATH, M. E. *et al.* The Crystal Structure of Cruzain: A Therapeutic Target for Chagas' Disease. **J. Mol. Biol.**, v. 247, p. 251–259, 1995.
36. REIS, F. C. G. *et al.* The substrate specificity of cruzipain 2, a cysteine protease isoform from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p. 215–220, 2006.
37. LI, C. S. *et al.* Identification of a potent and selective non-basic cathepsin K inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 1985–1989, 2006.
38. BRYANT, C. *et al.* Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 21, p. 6218–6221, 2009.
39. LECAILLE, F. *et al.* Subsite specificity of trypanosomal cathepsin L-like cysteine proteases Probing the S2 pocket with phenylalanine-derived amino acids. **European Journal of Biochemistry**, v. 2741, p. 2733–2741, 2001.
40. FERREIRA, R. S. *et al.* Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationships of Potent Noncovalent and Nonpeptidic Cruzain Inhibitors as Anti-*Trypanosoma cruzi* Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 2380–2392, 2014.
41. DUSCHAK, Vilma G.; COUTO, Alicia S. An Insight on Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, [s.l.], v. 2, p.19-51, 2007.

42. GÖTZ, Marion G. *et al.* Peptidyl allyl sulfones: a new class of inhibitors for clan CA cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 12, n. 19, p.5203-5211, out. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.016>.
43. HUANG, Lily; BRINEN, Linda S.; ELLMAN, Jonathan A. Crystal Structures of Reversible Ketone Based Inhibitors of the Cysteine Protease Cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.21-29, jan. 2003.
44. BLAU, Lorena *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 67, p.142-151, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.022>.
45. RUKAMP B.; POWERS J. C. Proteinase and Peptidase Inhibition: Recent Potential Targets for Drug Development. **Taylor & Francis Ltd.**, London, p. 84–126, 2002.
46. HAZEN, Lonny G. M.; BLEEKER, Fonnet E.; LAURITZEN, Bjarne; BAHNS, Sieglinde; SONG, Jiyang; JONKER, Ard; VAN DRIEL, Bernard E. M.; LYON, Hans; HANSEN, Ulla; KÖHLER, Angela. Comparative Localization of Cathepsin B Protein and Activity in Colorectal Cancer. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, [s.l.], v. 48, n. 10, p. 1421-1430, out. 2000. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/002215540004801012>.
47. STROJNIK, Tadej; KAVALAR, Rajko; TRINKAUS, Miha; LAH, Tamara T. Cathepsin L in glioma progression: comparison with cathepsin b. **Cancer Detection and Prevention**, [s.l.], v. 29, n. 5, p. 448-455, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cdp.2005.07.006>.
48. GOCHEVA, Vasilena; JOYCE, Johanna A. Cysteine Cathepsins and the Cutting Edge of Cancer Invasion. **Cell Cycle**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 60-64, jan. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.6.1.3669>.
49. JEDESZKO, Christopher; SLOANE, Bonnie F. Cysteine cathepsins in human cancer. **Biological Chemistry**, [s.l.], v. 385, n. 11, p. 1017-1027, 1 nov. 2004. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/bc.2004.132>.
50. KOS, Janko; STABUC, Borut; SCHWEIGER, Ana; KRASOVEC, Marta; CIMERMAN, Nina; KOPITAR-JERALA, Natasa; VRHOVEC, Ivan. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 3, p. 1815-1822, set. 1997.
51. DRAKE, Matthew T; CLARKE, Bart L; OURSLER, Merry Jo; KHOSLA, Sundeep. Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: biology, potential clinical utility, and lessons learned. **Endocrine Reviews**, [s.l.], v. 38, n. 4, p. 325-350, 23 jun. 2017. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2015-1114>.
52. BRÖMME, Dieter; LECAILLE, Fabien. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, [s.l.], v. 18, n. 5,

- p.585-600, 24 abr. 2009. Informa Healthcare.
<http://dx.doi.org/10.1517/13543780902832661>.
53. REDDY, Vemuri B.; SUN, Shuohao; AZIMI, Ehsan; ELMARIAH, Sarina B.; DONG, Xinzhong; LERNER, Ethan A. Redefining the concept of protease-activated receptors: cathepsin S evokes itch via activation of Mrgprs. **Nature Communications**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.2-24, 28 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms8864>.
 54. CIANNI, Lorenzo; SARTORI, Geraldo; ROSINI, Fabiana; VITA, Daniela de; PIRES, Gabriel; LOPES, Bianca Rebelo; LEITÃO, Andrei; BURTOLOSO, Antonio C.B.; MONTANARI, Carlos A. Leveraging the cruzain S3 subsite to increase affinity for reversible covalent inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 79, p. 285-292, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.04.006>.
 55. CIANNI, Lorenzo; LEMKE, Carina; GILBERG, Erik; FELDMANN, Christian; ROSINI, Fabiana; ROCHO, Fernanda dos Reis; RIBEIRO, Jean F.R.; TEZUKA, Daiane Y.; LOPES, Carla D.; ALBUQUERQUE, Sérgio de. Mapping the S1 and S1' subsites of cysteine proteases with new dipeptidyl nitrile inhibitors as trypanocidal agents. **Biorxiv**, [s.l.], 8 set. 2019. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/760736>.
 56. CIANNI, Lorenzo; ROCHO, Fernanda dos Reis; ROSINI, Fabiana; BONATTO, Vinícius; RIBEIRO, Jean F.R.; LAMEIRA, Jerônimo; LEITÃO, Andrei; SHAMIM, Anwar; MONTANARI, Carlos A. Optimization strategy of single-digit nanomolar cross-class inhibitors of mammalian and protozoa cysteine proteases. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 101, p. 104039, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104039>.
 57. GOMES, Juliana C.; CIANNI, Lorenzo; RIBEIRO, Jean; ROCHO, Fernanda dos Reis; SILVA, Samelyn da Costa Martins; BATISTA, Pedro Henrique Jatai; MORAES, Carolina Borsoi; FRANCO, Caio Haddad; FREITAS-JUNIOR, Lucio H.G.; KENNY, Peter W. Synthesis and structure-activity relationship of nitrile-based cruzain inhibitors incorporating a trifluoroethylamine-based P2 amide replacement. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 27, n. 22, p. 115083, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115083>.
 58. AVELAR, Leandro A. A.; CAMILO, Cristian D.; ALBUQUERQUE, Sérgio de; FERNANDES, William B.; GONÇALEZ, Cristiana; KENNY, Peter W.; LEITÃO, Andrei; MCKERROW, James H.; MONTANARI, Carlos A.; OROZCO, Erika V. Meñaca. Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 1-24, 14 jul. 2015. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003916>.
 59. KALGUTKAR, Amit; GARDNER, Iain; OBACH, R.; SHAFFER, Christopher; CALLEGARI, Ernesto; HENNE, Kirk; MUTLIB, Abdul; DALVIE, Deepak; LEE, Jae; NAKAI, Yasuhiro. A Comprehensive Listing of Bioactivation Pathways of Organic Functional Groups. **Current Drug Metabolism**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 161-225, 1 jun. 2005. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/1389200054021799>.

CAPÍTULO IV

Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME)

1 INTRODUÇÃO

Para que um composto se torne um fármaco comercial é necessário que esteja de acordo com três fases para a ação biológica efetiva: (1) farmacêutica, (2) farmacocinética e (3) farmacodinâmica.¹

A fase farmacocinética estuda diversas propriedades físico-químicas que os fármacos precisam ter para se obter uma boa disponibilidade e abrange os processos de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME).

Dentre os parâmetros ADME que devem ser estudados para se traçar um bom perfil farmacocinético estão a Absorção e Distribuição, para alcançar o órgão alvo em uma concentração apropriada; Metabolismo, onde ocorre a inativação/modificação do fármaco e Excreção em que o fármaco é liberado do corpo para que o mesmo não venha a provocar toxicidade.²

A etapa de absorção é caracterizada pela passagem do fármaco do seu local de administração para o plasma, sendo essa etapa importante para a maioria das vias de administração, sobretudo as vias orais/enterais que se valem de falhas em barreiras biológicas para a absorção do fármaco. A distribuição, por sua vez, foca em dirigir o fármaco ao seu local de ação, através do sistema circulatório e linfático, levando em conta a atenção na taxa de acumulação do fármaco em compartimentos periféricos.²⁻³

O metabolismo de fármacos pode ser definido como a modificação bioquímica de um substrato para formação de outros produtos, através de enzimas. Essa fase da farmacocinética que possui duas etapas (metabolismo de primeira passagem e metabolismo de segunda passagem) é realizada por diversas enzimas.⁴

Por fim, após os processos de administração, absorção e metabolismo o fármaco deve ser eliminado para evitar, em algumas situações, efeitos tóxicos, ficando a cargo da excreção esse papel. Entretanto, a fase da excreção vai além da eliminação de um fármaco, e pode ser definida como a perda de um composto quimicamente alterado de forma irreversível, no qual a maioria dos metabólitos são eliminados através da excreção renal e biliar.²⁻³

Os estudos de ADME são uma grande etapa de afunilamento para o desenvolvimento de fármacos, pois boa parte dos compostos apresenta características de baixa biodisponibilidade, efeitos tóxicos e colaterais. Com isso, cerca de 40% dos candidatos são reprovados nesta etapa, causando perda de tempo e de milhões de reais para indústrias farmacêuticas.^{2,5}

Como alternativa para resolver ou minimizar tais problemas, os estudos *in silico* de ADME apresentam-se como alternativas satisfatórias. Tais métodos preditivos têm como principais vantagens a redução de gastos, tempo e investimentos em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos no futuro. Indicando/fornecendo compostos bioativos com maior probabilidade de se tornarem fármacos mais seletivos e seguros.⁶

Um parâmetro muito utilizado nos estudos *in silico* para a previsão de um bom perfil ADME é a “Regra dos 5 de Lipinski” (RO5). Essa é uma regra prática que ajuda a determinar se um composto biologicamente ativo provavelmente tem as propriedades químicas e físicas para ser oralmente disponível. Segundo essa regra, os seguintes fatores são de grande importância para identificar moléculas promissoras⁷:

1. Massa molecular inferior a 500g/mol;
2. Número de aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) inferior ou igual a 10;
3. Número de doadores de ligação de hidrogênio (DLH) menor ou igual a 5;
4. cLogP (coeficiente de partição *n*-octanol/água calculado) inferior ou igual a 5.

A violação de 2 ou mais dessas condições prevê uma molécula como um medicamento não disponível por via oral.⁷

Outra preocupação que vem sendo analisada pelos estudos *in silico* diz respeito às características químicas versus propriedades biológicas, a relação dessas duas são utilizadas para a obtenção do composto *druglikeness*. Compostos *druglikeness* são moléculas que contêm grupos funcionais e/ou propriedades físicas semelhantes com a maioria dos fármacos conhecidos podendo ser inferidos como compostos que podem ser biologicamente ativos ou apresentar potencial terapêutico. Este algoritmo leva em conta a facilidade sintética, estabilidade, disponibilidade oral, propriedades farmacocinéticas, falta de toxicidade e potencial mínimo.⁸

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O software *SwissADME* foi selecionado para estimar os parâmetros de ADME *in silico* para os compostos que apresentaram resultados mais promissores diante das CPs estudadas neste trabalho. A investigação destas propriedades tem como foco avaliar as modificações que devam ser necessárias em trabalhos futuros afim de que sejam obtidos compostos com maior probabilidade de serem aceitos na fase farmacocinética de estudo.

O *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch/>) é um *software* livre cujo cálculos são feitos online, não necessitando de instalação. O programa reúne ferramentas para o cálculo de diversas propriedades físico-químicas (que possam interferir na farmacocinética) de moléculas de interesse medicinal, necessitando apenas de suas estruturas químicas em duas dimensões. Após o cálculo, é disponibilizado um *Bioavailability Radar* que situa as propriedades das moléculas analisadas dentro de um gráfico de radar que situa as propriedades das moléculas analisadas dentro de uma região formada pelos valores mínimos e máximos de alguns parâmetros relevantes para compostos com características de fármacos, que são: tamanho (massa molecular, SIZE), grau de insaturação (fração de carbonos saturados, INSATU), flexibilidade (número de ligações com livre rotação, FLEX), polaridade (área superficial polar topológica, POLAR), lipofilia ($\log P_{o/w}$, LIPO) e solubilidade em água ($\log S$, SOLU). Além do gráfico radar, o *SwissADME* análise com base na “regra dos 5” de Lipinsk *et al.* (1997)⁷.

A medida quantitativa de *druglikeness* utilizando um programa *online Molsoft molecules in sílico* (<https://molsoft.com/mprop/>).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando que os ensaios que avaliam a potência têm uma escalabilidade consideravelmente maior e custos mais baixos por composto, do que os ensaios utilizados para avaliar propriedades de ADME, há uma tendência para que a avaliação da farmacodinâmica tenha usualmente um papel preponderante na seleção e otimização de uma série líder.⁹ Por isso, após os ensaios enzimático, sabendo da importância de propriedades favoráveis a ADME para a descoberta de fármacos, foram realizados estudos *in sílico* ADME dos compostos estudados. Os resultados obtidos estão expressos na TABELA 4.1.

O parâmetro *druglikeness* (FIGURA 4.1 e TABELA 4.1) calcula uma pontuação geral de semelhança com fármacos existentes no mercado através da similaridade com fragmentos e propriedades físicas. Todos os inibidores apresentaram boa similaridade com fármacos mostrando-se promissores, sendo o **Neq1079** a apresentar melhor resultado.

TABELA 4.1 – Propriedades físico-químicas.

Inibidor	MM (g/mol)	ALH	DLH	TPSA (Å ²)	LogP		LogS	NLR	<i>Druglikeness</i>	RO5 (n° violações)
					MLOGP	WLOGP				
Neq0659	493.56	6	2	64.92	4.32	7.15	-6.83	12	0.33	1
Neq0820	495.54	8	2	90.70	2.30	5.94	-5.76	12	0.74	0
Neq1009	495.54	8	2	90.70	2.30	5.94	-5.76	12	0.74	0
Neq1038	496.36	6	2	64.92	3.92	6.24	-6.24	11	0.54	0
Neq1039	493.56	6	2	64.92	4.32	7.15	-6.83	12	0.33	1
Neq1040	583.64	9	2	92.61	3.24	7.17	-7.08	15	0.42	1
Neq1056	583.64	9	2	92.61	3.24	7.17	-7.08	15	0.54	1
Neq1068	494.55	7	2	77.81	2.90	6.54	-6.16	12	0.96	0
Neq1075	553.62	8	2	83.38	3.59	7.17	-7.00	14	0.26	1
Neq1079	494.55	7	2	77.81	2.90	6.54	-6.16	12	0.96	0

Neq1083	496.36	6	2	64.92	3.92	6.24	-6.24	11	0.54	0
Neq1139	523.59	7	2	74.15	3.95	7.16	-6.91	13	0.36	1
Neq1140	561.56	9	2	64.92	5.05	9.32	-7.70	13	0.28	2
Neq1141	528.01	6	2	64.92	4.77	7.8	-7.43	12	0.62	2

Calculados no *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch/>): MM – Massa Molar; ALH – número de aceptores de hidrogênio; DLH – número de doadores de ligação de hidrogênio; TPSA – área superficial topológica polar; LogP – valor do coeficiente de partição *n*-octanol/água calculado pelos métodos MLOG¹⁰⁻¹¹ e WLOGP¹²; Log S – coeficiente de solubilidade determinado pelo método ESOL, numa escala que considera insolúvel (menor que -10), pouco solúvel (-10 a -6), moderado (-6 a -4), solúvel (-4 a -2), muito solúvel (-2 a 0) e altamente solúvel (maior que 0)¹³; NRL – número de ligações rotativas.

Druglikeness em valor quantitativo calculado no *Molsolf* (<https://molsoft.com/mprop/>) apresentado em uma escala de -6.0 a +6.0.

FIGURA 4.1 – Gráfico de *druglikeness model score* (<https://molsoft.com/mprop/>) para o Neq1079.

FONTE: Autoria própria.

A RO5⁷ estabelece parâmetros que fármacos administrados por via oral, em geral, possuem. Segundo esta regra, os fármacos não apresentando mais que uma violação dos seguintes critérios: $MM \leq 500$; $\text{LogP (MLOGP)} \leq 4.15$; $ALH \leq 10$; $DLH \leq 5$. Todos os compostos analisados obedecem a RO5. Dos inibidores, dois apresentaram 3 violações, ou seja, não respeitam a RO5 (**Neq1140** e **Neq1141**), seis (**Neq0659**, **Neq1039**, **Neq1040**, **Neq1056**, **Neq1075** e **Neq1139**) apresentaram uma violação e seis (**Neq0820**, **Neq1009**, **Neq1038**, **Neq1068**, **Neq1079** e **Neq1083**) não apresentam violações.

O gráfico de *Bioavailability Radar* do *software SwissADME* (TABELA 4.1 e FIGURA 4.2) correlaciona tamanho da molécula, flexibilidade, solubilidade, lipofília, saturação e polaridade. Tendo a área demarcada em rosa o papel de delimitar condições ideais de biodisponibilidade para a administração de um fármaco via oral. O inibidor **Neq1079** apresentou os melhores resultados, estando fora da área marcada apenas em dois pontos (lipofília e flexibilidade). Para os demais compostos, os parâmetros de solubilidade (que se relaciona com a lipofília) e o tamanho da molécula também estavam fora da área rosada.

Os inibidores apresentam boa similaridade com fármacos comerciais e obedecem a RO5, mostrando-se promissores candidatos a fármacos administrados por via oral. A busca por fármacos que possam ser administrados via oral é prioritária na indústria farmacêutica, por ser a via mais segura, conveniente e econômica. Para que a chance da administração por essa via aumente, em estudos futuros, modificações podem ser implantadas buscando tornar a molécula mais rígida e solúvel (diminuindo o valor de LogP).

FIGURA 4.2 - *Bioavailability Radar* para o Neq1079 – apresenta a correlação entre tamanho da molécula, flexibilidade, solubilidade, lipofilia, saturação e polaridade.

FONTE: Autoria própria.

Vale ressaltar que os estudos *in silico* são importantes, mas não determinantes para o andamento de uma pesquisa de novos fármacos, pois outros parâmetros devem ser considerados, principalmente a atividade biológica e toxicidade do composto.

REFERÊNCIAS

1. PEREIRA, Dárcio Gomes. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 171-177, fev. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000100029>.
2. CAPÍTULO 8-9. In: RANG, H. P. *et al.* **Rang & Dale: farmacologia**. 8. ed. [s.l.]: Elsevier, 2016. Cap. 8. p. 261-317.
3. DOOGUE, Matthew P.; POLASEK, Thomas M. The ABCD of clinical pharmacokinetics. **Therapeutic Advances in Drug Safety**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 5-7, 30 jan. 2013. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/2042098612469335>.
4. TAXAK, Nikhil; BHARATAM, Prasad V. Drug Metabolism: a fascinating link between chemistry and biology. **Resonance**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 259-282, mar. 2014.
5. EL-DIN, Nabaweya Abd El Salam Sharaf. Virtual Screening, Drug Likeness, Bioavailability and Docking Studies of Small Molecules of Heterocyclic Sulfonamine. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 1145-1160, jan. 2017.

6. MITEVA, Maria A.; VILLOUTREIX, Bruno O. Computational Biology and Chemistry in MTi: emphasis on the prediction of some ADMET properties. **Molecular Informatics**, [s.l.], v. 36, n. 10, p. 1700008, 21 fev. 2017. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/minf.201700008>.
7. LIPINSKI, Christopher A.; LOMBARDO, Franco; DOMINY, Beryl W.; FEENEY, Paul J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 23, n. 1-3, p. 3-25, jan. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(96\)00423-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(96)00423-1).
8. ROY, N; KADAM, Ru. Recent trends in drug-likeness prediction: a comprehensive review of in silico methods. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 69, n. 5, p. 609-615, 2007. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4103/0250-474x.38464>.
9. KESERÜ, György M.; MAKARA, Gergely M. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 203-212, mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrd2796>.
10. MORIGUCHI, Ikuo; HIRONO, Shuichi; NAKAGOME, Izumi; HIRANO, Hiroyuki. Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 42, n. 4, p. 976-978, 1994. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.42.976>.
11. MORIGUCHI, I. *et al.* Simples Method of Calculation octanol/water Partition Coefficient. **Chem. Pharm. Bull**, [s.l.], v. 40, n. 4, p. 127-130, 1992.
12. WILDMAN, Scott A.; CRIPPEN, Gordon M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, [s.l.], v. 39, n. 5, p. 868-873, 19 ago. 1999. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/ci990307l>.
13. DELANEY, John S. ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, [s.l.], v. 44, n. 3, p. 1000-1005, maio 2004. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/ci034243x>.

CAPÍTULO V

Síntese e caracterização dos derivados do Neq0820

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Considerações Gerais

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos com pureza superior a 97%, sendo utilizados como comercializados. As reações não-aquosas foram realizadas sob atmosfera de argônio. Os solventes empregados na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram utilizados sem purificação.

O monitoramento das reações foi realizado através da cromatografia de camada delgada (CCD), com placas cromatográficas da empresa Fluka Analytical Sigma-Aldrich (matriz sílica-gel, suporte de alumínio, com indicador de fluorescência 254 nm e espessura de 200 μm) e diferentes proporções de acetato de etila e hexano como fase móvel. A visualização foi realizada por aplicação de radiação ultravioleta (254 nm) ou coloração com solução reveladora.

Para purificação dos compostos, foi empregada a cromatografia em coluna *flash* utilizando sílica gel 60 $\text{\AA}$ (0,040 – 0,063 μm) da empresa Fluka Analytical Sigma-Aldrich e hexano/acetato de etila como fase móvel. Para os compostos que não apresentaram pureza superior a 95% após a utilização da coluna, foi executada (pelo Dr. Pedro Batista ou pela Dra. Déborah Araujo) a purificação cromatográfica através da HPLC.

A caracterização foi realizada pela interpretação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS) e análise de rotação específica (α_D) realizados na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP).

A espectroscopia de RMN de carbono e hidrogênio foi realizada nos equipamentos da marca Agilent Technologies modelo 500/54 premium shielded e 400/54 premium shielded. Os deslocamentos químicos (δ , discutidos como ppm) são referenciados de acordo com o padrão interno TMS, tetrametilsilano (0.00 ppm), ou de acordo com o deslocamento químico dos sinais que correspondem ao solvente empregado. Os espectros foram registrados em DMSO- d_6 ou CDCl_3 e as constantes de acoplamento (J) são reportadas em Hz. As multiplicidades são apresentadas como: simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), multiplete (m), duplo dublete (dd) e duplo duplo dublete (ddd). A elucidação dos espectros foi realizada com o auxílio do software *Mestre Nova*, versão 6.0.2.

Os espectros de FT-IR foram obtidos em um espectrômetro *FT-IR Bomen Hartman & Braun mod MB-102*. A elucidação dos espectros foi realizada com o emprego do software *OriginPro*, versão 6.0.

As α_D foram medidas usando um polarímetro digital (P2000, Jasco) no comprimento de onda de 589 nm, na linha D de uma lâmpada de sódio. A temperatura foi definida como 25 °C e as amostras foram dissolvidas em metanol ou clorofórmio, ambos de grau HPLC.

A pureza foi avaliada pela obtenção dos pontos de fusão e cromatografia líquida de alta eficiência com colunas de fase estacionária quiral, bem como pelos espectros de RMN e HRMS.

Os pontos de fusão foram determinados com o uso do equipamento da marca Microquímica Equipamentos modelo MQAPF-302.

A determinação do teor de pureza (inclusive enantiomérica) e a purificação cromatográfica foram realizados pelo Dr. Pedro Batista com a utilização do cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC) da marca Shimadzu LC (Kyoto, Japan) equipado com sistema de bombeamento quaternário LC-20AT/AD, amostrador automático SIL-20A HT, desgaseificador DGU-20A5, forno de coluna CTO-20A (Shimadzu Corp.), coletor de frações FRC-10A, controlador de sistema CBM-20A e acoplado ao SPD-M20A DAD. A aquisição dos dados foi realizada usando o software LCsolution versão 1.26 SP5. O sistema LC foi acoplado a um espectrômetro de massas *ion trap* AmaZon SL (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado com uma interface de ionização por eletrosprei (ESI). A aquisição dos dados foi realizada com o software Bruker Daltonics Data Analysis (versão 4.2.383.1). Os solventes foram filtrados através de um filtro Merk-Millipore de 0.45 μ m antes do uso e desgaseificado em banho ultrassônico.

O método empregado para determinação da pureza foi realizados a 32 °C (forno da coluna), utilizando a coluna analítica Chiralpak® 5 μ m (250 mm x 10 mm I.D, Diacel Corporation, West Chester, PA) e um gradiente de 5 – 100% de H₂O/ACN por 30min com um fluxo de 0,5 mL/min. A purificação, foi realizada a 32 °C (forno da coluna), utilizando a coluna quiral semipreparativa *celulose-2* Phenomenex® 5 μ m (10 x 250 mm) e um gradiente de 5 – 100% de Hex/IPA por 30min com um fluxo de 1,360 mL/min. Volumes de 10 μ L (analítica) e 1000 μ L (semipreparativa) foram injetados. A quantificação foi realizada entre 200-800 nm.

Por fim, a determinação do nome dos compostos, massa molar, fórmula molecular, desenho das estruturas químicas e mecanismos foram realizados com o emprego do software *ChemDraw*, versão 18.0.0.231.

1.2 Métodos

Método A (conversão de ácido para amida): Sob agitação, a -30 °C e atmosfera de argônio, o cloroformato de isobutilo (1,1 eq.) foi adicionado gota-a-gota a uma solução de Boc-L-Phe (1

eq.) e DIPEA (2,6 eq.) em DMF anidro (4 mL/mmol). A solução permaneceu sob agitação por 30 min e, em seguida, uma solução 2M de cloreto de amônio (NH_4Cl) (1,1 eq.) foi adicionada. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 20 h. Em seguida, a solução foi concentrada, extraída com AcOEt e lavada com solução saturada de NaHCO_3 (3 x 20 mL) e *brine* (1 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, concentrada e purificada por cromatografia *flash* (80% AcOEt em Hex) resultando em **2**. (Rendimento: 85%)

Método B (desidratação de amida primária para nitrila): A amida primária (**2**) (1 eq.) foi solubilizada em THF anidro (5 mL/mmol) e a ela foi adicionado DIPEA (2.6 eq.). Em seguida, a solução foi resfriada a 0 °C e TFAA (1.3 eq.) foi adicionado por 5 min. Após 2 h de reação a temperatura ambiente, H_2O (20 mL/mmol) foi adicionada. O THF foi removido por evaporação a pressão reduzida e o produto extraído com AcOEt (2 x 50 mL). A fase orgânica foi lavada com 1 M KHSO_4 (3 x 20 mL), solução saturada de NaHCO_3 (3 x 20 mL) e *brine* (3 x 20 mL). A solução foi seca com Na_2SO_4 anidro, o solvente foi removido por pressão reduzida e o produto (**3**) foi purificado por cromatografia *flash* (15% AcOEt em Hex). (Rendimento: 65%)

Método C (remoção do grupo Boc): A nitrila (**3**) foi tratada com HCO_2H (2 mL/mmol) a temperatura ambiente. A solução resultante foi agitada por 18 h e concentrada, resultando em um resíduo amarelo. Este resíduo teve seu pH ajustado com uma solução 1 M NaOH até 9 e extraído com AcOEt (4 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com *brine* (1 x 20 mL), seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada. O produto obtido (**4**) foi utilizado na etapa seguinte sem purificação.

Método D (preparação da imina): À uma solução de L-leucina metil éster hidrolórica (1 eq.) em MeOH anidro (5 mL/mmol), sob atmosfera de argônio e refluxo, foi adicionado K_2CO_3 (1,2 eq.) e 3'-bromo-2,2,2-trifluoroacetofenona (1,1 eq.). A solução foi agitada a 50 °C por 18 h. A mistura reacional foi filtrada e o sobrenadante foi evaporado a pressão reduzida resultando em um sólido amarelo (**5b**), utilizado nas etapas seguintes sem purificação.

Método E (redução da imina para amina): O NaBH_4 (2 eq.) foi adicionado ao ZnCl_2 anidro (1 eq.). Em seguida, sob atmosfera de argônio, foi adicionado DME anidro (5 mL/mmol). A solução permaneceu sob agitação por 18 h a temperatura ambiente, resultando no $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$, o qual foi utilizado em seguida.

À imina (**5b**) (1 eq.), sob atmosfera de argônio, foi solubilizada a temperatura ambiente em uma mistura MeOH:ACN (na proporção 1:5). A temperatura foi então reduzida a -40 °C e o $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ (4 eq.) foi adicionado. Após 3 h sob agitação a -40 °C, foi adicionada água destilada à mistura reacional até que o borbulhamento parasse, então o pH foi ajustado para 2 com uma solução 2 M HCl. A solução foi extraída com AcOEt (3 x 15 mL), seca com Na_2SO_4 e o produto (**6**) purificado por cromatografia *flash* (20 – 30 % AcOEt em Hex), sendo obtido como um óleo amarelado. (Rendimento: 96%)

Método F (reação de acoplamento): A amina (**6**) (1 eq.) foi adicionada a uma solução contendo a aminonitrila desprotegida (**4**) (1,3 eq.), assim como HATU (1,3 eq.) e DIPEA (2,6 eq.) em DMF anidro (5 mL/mmol), sob atmosfera de argônio. A solução resultante foi agitada a temperatura ambiente por 20 h. A mistura reacional foi diluída em AcOEt (10 mL/mmol) e lavada com solução saturada de NaHCO_3 (3 x 20 mL) e *brine* (3 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada, resultando no produto (**7**) bruto que foi purificado por cromatografia *flash*, seguido de recristalização a partir de AcOEt. (Rendimento: 74%)

Método G (acoplamento Suzuki-Miyaura): Sob atmosfera de argônio foi adicionado, à suspensão da amina (**7**) (1 eq.) em DMF (13 mL/mmol), o ácido borônico (1,3 eq.) e uma solução 2 M de Na_2CO_3 (1,8 mL/mmol), permanecendo sob agitação por 10 min. Em seguida, PdCl_2dppf (0,05 eq.) foi adicionado e a reação foi aquecida a 80 °C. Depois de 3 h, H_2O (17 mL) foi adicionada e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 e purificadas por cromatografia *flash* usando uma mistura AcOEt/Hex e através do HPLC, resultando no produto **8**.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Síntese e Mecanismos

Os derivados do **Neq0820** e **Neq0659** foram sintetizados com substituintes nas posições *para* e *meta* da benzila contida em P3 (como demonstrado na FIGURA 3.8 e no item 2.3 deste capítulo), sendo empregada a rota representada na (FIGURA 5.1). Para fins didáticos, a rota sintética foi dividida em quatro etapas: síntese do P1 e do grupo *warhead*, acoplamento do P2 ao P3, acoplamento do P2 ao P1 e substituição do átomo de bromo.

FIGURA 5.1 – Rota de síntese para obtenção do Neq0820 e seus derivados.

Reagentes e condições: **a)** isobutilo cloroformato, DIPEA, DMF anidro, argônio, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,5 h, 2 M NH_4Cl , t.a., 20 h; **b)** DIPEA, THF anidro, TFAA, 0°C $\longrightarrow$ t.a., 2 h; **c)** HCO_2H , t.a., 18 h; **d)** $\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{N}-\text{P}_2-\text{CO}_2\text{Me}$, K_2CO_3 , MeOH, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 18 h; **e)** 1 M $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ em DME anidro, ACN/MeOH, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 h; **f)** HATU, DIPEA, DMF anidro, t.a., 20 h; **g)** $\text{R}-\text{B}(\text{OH})_2$, PdCl_2dppf , 2 M Na_2CO_3 em H_2O , DMF, 80°C , 3 h.

2.1.1 Primeira etapa

A primeira etapa engloba as três reações referentes aos **Métodos A, B e C** (item 1.2 deste capítulo)

A primeira reação (descrita no **Método A** e mecanismo representado na FIGURA 5.2), conhecida como “método dos anidridos mistos”, consiste na conversão do grupo ácido do Boc-L-Phe a um grupo amida utilizando cloroformato de isobutilo (IBCF). Com o uso do IBCF são obtidas, em geral, reações com alto rendimento e pureza enantiomérica.

Neste método, o IBCF reage com o aminoácido na presença de uma amina terciária (DIPEA) em um solvente inerte (DMF) resultando na formação do anidrido. Em seguida, há a sua condensação com a amina para gerar a ligação amida. Este ataque nucleofílico pode ocorrer nos dois carbonos carboxílicos: o ataque ao C1 leva a formação do produto e o ataque ao C2 gera uretano. Como a reação ocorre a baixas temperaturas, a obtenção do produto é favorecida devido ao menor impedimento estérico de C1 (FIGURA 5.2).¹

O produto é obtido a uma velocidade de reação rápida, com altos rendimentos e fácil purificação. Como mencionado, sua principal reação colateral é a formação do uretano. Entretanto, na maioria dos casos esta reação não tem grande importância, pois pode ser evitada limitando a quantidade de reagente e incrementando o tempo de ativação.¹

FIGURA 5.2 – Mecanismo da reação de acoplamento utilizando cloroformato de isobutilo.

FONTE: Autoria própria.

*: a amônia é formada *in situ*, através da desprotonação do íon amônio. **B**: representa qualquer base presente no meio capaz de abstrair o próton.

A segunda reação (**Método B**) utiliza DIPEA e anidrido trifluoracético (TFAA) para desidratação do grupo amida, convertendo-a a nitrila. O uso do TFAA promove condição mais amenas e não-ácidas para a reação.

O mecanismo desta reação está representado na FIGURA 5.3 e se inicia com o ataque nucleofílico do par de elétrons isolado do nitrogênio à carbonila do TFAA. Seguido da eliminação de dois TFAs e formação da tripla ligação. Por fim, a DIPEA abstrai o próton ligado ao nitrogênio resultando na formação da nitrila.²

FIGURA 5.3 – Mecanismo da reação de desidratação da amida a nitrila.

FONTE: Autoria própria.

Na terceira e última reação da primeira etapa (**Método C**) foi realizada a remoção do grupo Boc com ácido fórmico e seu mecanismo pode ser visto na FIGURA 5.4. Inicialmente, há a abstração do próton da hidroxila presente ácido fórmico pelo oxigênio do grupo Boc, seguido do rearranjo do intermediário e eliminação do *tert*-butil carbocátion. Após transferência interna de prótons, o grupo -COO^- é eliminado resultando na amina desprotegida.

FIGURA 5.4 – Mecanismo da reação de remoção do grupo Boc.

FONTE: Autoria própria.

2.1.2 Segunda etapa

A segunda etapa engloba as duas reações referentes aos **Métodos D e E** (item 1.2 deste capítulo).

A primeira reação, descrita no **Método D** e com mecanismo apresentado na FIGURA 5.5, refere-se à formação de uma imina através da reação entre 3'-bromo-2,2,2-trifluoroacetofenona (ou 2'-bromo-2,2,2-trifluoroacetofenona) com o grupo amino da *L*-leucina metil éster em meio alcalino. Em geral, iminas são formadas em meio levemente ácido. Entretanto, Hughes *et al.* (2007)³ observaram a formação de produtos de degradação em condições ácidas para compostos similares aos sintetizados neste trabalho. Isso os levou a desenvolver uma rota alternativa, utilizando meio alcalino e temperaturas mais brandas (50 °C). Essa rota resultou em excelentes rendimentos e excesso enantiomérico. O mecanismo proposto pelos pesquisadores passa pelo intermediário oxazolidinona e está representado na FIGURA 5.5.

A segunda reação, **Método E**, utiliza como reagente o $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ (boroidreto de zinco) formado *in situ* para reduzir a imina a amina. Antes da redução, o íon zinco é coordenado pelo nitrogênio da imina e pelo oxigênio do carboxilato, ativando a ligação dupla $\text{C}=\text{N}$ para o ataque nucleofílico. Em sequência, ocorre uma transferência intramolecular de um hidreto do BH_4 para o átomo de carbono que pode ocorrer tanto na face *Si* como na face *Re* da ligação dupla.

FIGURA 5.5 – Formação da imina em meio básico.

FONTE: Autoria própria.

Hughes *et al.* (2007)³ exploraram diferentes agentes redutores para iminas similares às apresentadas no presente trabalho. Eles puderam observar excelentes resultados com a utilização do $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ preparado a partir de NaBH_4 e ZnCl_2 em DME, obtendo-se preferencialmente o diastereoisômero (*S,S*). A partir desses dados e trabalhos anteriores do grupo⁴⁻⁵, o $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ foi selecionado como agente redutor para síntese dos compostos (*S,S*).

FIGURA 5.6 – Explicação para a estereoseletividade do $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$. FONTE: Adaptado de Hughes *et al.* 2007.³

A diastereosseletividade deste agente reduto pôde ser explicada através de cálculos *ab initio*.³ O trabalho mostrou que a utilização do $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ faz com que a face *re* esteja menos impedida, isso ocorre porque o contra-íon ZnCl^+ é complexado pelo oxigênio do carboxilato e o nitrogênio da imina, dificultando o acesso a face *si* e favorecendo o ataque pela outra face. A FIGURA 5.6 resume a explicação proposta.

2.1.3 Terceira e quarta etapa

A terceira etapa consiste na reação de acoplamento utilizando HATU e DIPEA, como descrito no **Método F** (item 1.2 deste capítulo).

A escolha do HATU como reagente de acoplamento deve-se ao fato deste proporcionar bons rendimentos e fácil purificação. Além disso, o HATU é capaz de evitar a formação da oxazolona. A oxazolona é um intermediário cíclico que pode ser gerado durante reações de acoplamento envolvendo carboxilas alfa anoméricas, este intermediário facilita a abstração do hidrogênio anomérico (FIGURA 5.7) levando a racemização.⁶

FIGURA 5.7 – Reação de racemização de aminoácidos via oxazolona.

FONTE: Autoria própria

O mecanismo para a reação de acoplamento de amida promovida pelo HATU se inicia com a desprotonação do grupo ácido presente no aminoácido protegido. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico da carboxila desprotonada ao carbono eletrofílico do HATU, resultando na eliminação de uréia e na formação do éster com o grupo HOAc. Este éster é estável o suficiente para não sofrer o ataque do oxigênio do peptídeo (o que leva a formação da oxazolona), mas reativo o suficiente para ser substituído pela amina formando o peptídeo, diminuindo a racemização (FIGURA 5.8).⁷

FIGURA 5.8 – Mecanismo da reação de acoplamento utilizando HATU.

FONTE: Autoria própria.

Onde B pode ser qualquer uma das bases presentes no meio reacional.

Por fim, a quarta etapa consiste no acoplamento de Suzuki-Miyaura (SM), como descrito no **Método G** (item 1.2 deste capítulo), no qual o produto da etapa anterior reage com o ácido borônico utilizando *[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II)* (PdCl_2dppf) como catalisado em meio básico para gerar o produto.

O acoplamento SM possui uma ampla gama de aplicação devido as condições reacionais serem tolerantes a diferentes grupos funcionais e grupos de baixo peso molecular, ser relativamente estável, facilmente preparada, possui um meio benigno aos reagentes organoboro e sua rápida transmetalração com complexos de paládio (II).⁸

Os elétrons de ligação da camada externa ($2s^2$, $3p^1$) no boro neutro podem envolver-se em três ligações híbridas sp^2 , resultando em uma geometria trigonal planar, com o orbital p vazio resultante ortogonal ao plano. Este orbital p desocupado é o responsável pela reatividade, características físicas de todos os compostos neutros de boro sp^2 e os tornam suscetíveis à doação de elétrons por bases de Lewis.⁸

O mecanismo da reação de SM consiste em três etapas: adição oxidativa do carbono eletrofílico ao zerovalente e coordenadamente insaturado PdL_2 , transmetalração de um carbono nucleofílico do boro ao $\text{R}_2\text{-Pd-OH}$ e a rápida eliminação redutiva do produto de acoplamento cruzado com a regeneração do catalisador PdL_2 . Como demonstrado de maneira simplificada na FIGURA 5.9, esse mecanismo se inicia com a adição oxidativa do paládio ao haleto (**2**) para formar o composto organo-paládio (**3**). A reação de (**3**) com a base dá o intermediário (**4**). E este intermediário com o complexo borônico (**5**) gera o composto organo-paládio (**6**) por intermédio de uma transmetalração. Por fim, a eliminação redutiva do produto desejado (**7**)

restaura o catalisado de paládio original.⁹ Como a síntese dos compostos deste trabalho foi realizada com o emprego de Pd(II) (PdCl₂dppf), o ciclo foi iniciado em (3).

FIGURA 5.9 – Mecanismo genérico do acoplamento de Susuki-Miyaura.

FONTE: Autoria própria.

2.2 Caracterização

Ao final da síntese e após purificação, o **Neq0820** e seus derivados tiveram sua caracterização estrutural realizada por meio das análises de RMN ¹H, RMN ¹³C e MS (os espectros podem ser encontrados no **ANEXO A**) como descrito no item 3.2. A interpretação dos espectros é descrita a seguir, no entanto, para facilitar a compreensão, os espectros que correspondem ao **Neq1083** (FIGURA 5.10) foram utilizados como exemplo.

FIGURA 5.10 – Estrutura do Neq1083 com os diferentes grupos da molécula.

FONTE: Autoria própria.

2.2.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Os espectros de RMN ^1H para o Neq0820 e seus derivados (FIGURA 5.11 e FIGURA 5.12) podem ser divididos, didaticamente, em três intervalos.

FIGURA 5.11 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do Neq1083.

FONTE: Autoria própria.

FIGURA 5.12 – Ampliação da região dos aromáticos do espectro de RMN ^1H do Neq1083.

FONTE: Autoria própria.

No primeiro intervalo, de 0 a 2 ppm, são observados sinais de hidrogênio ligados a carbonos com hibridização sp^3 . Nesta região está presente o sinal dos CH_3 (**K e L**) da cadeia lateral da leucina, este sinal aparece como dupletos devido ao acoplamento com o CH (**J**) mas também podem aparecer condensados. Além das metilas, também há dois multipletos correspondentes aos hidrogênios diaterotópicos do CH_2 (**I**) da leucina (podendo aparecer também como um sinal condensado) e um multipeto que corresponde ao CH (**J**) também da leucina.

O segundo intervalo está localizado entre 2 e 5 ppm, nesta região são encontrados os sinais de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 próximos de grupos retiradores de elétrons. O CH_2 (**Q**) da cadeia lateral da fenilalanina aparece como dois dd (ou, na maioria das vezes, multipletos) cada um com integração igual a 1, devido à diasterotopicidade de seus hidrogênios (sendo encontrado também como um sinal condensado). O sinal do CH (**H**) do aminoácido, adjacente à um átomo de nitrogênio e uma carboxila, apresenta-se como um multipeto. O pico referente ao CH (**O**) localizado entre a nitrila e o nitrogênio apresenta-se como um multipeto.

Por fim, o CH (**E**) ligado ao CF_3 é visto como um quinteto (ou multiplicidade próxima) devido ao acoplamento com os átomos de flúor, podendo ser alargado devido ao acoplamento com o NH (**G**). Além dos hidrogênios ligados a carbonos sp^3 , o hidrogênio do grupo NH (**G**) do aminoácido também aparece nessa região e é observado muitas vezes como um dd ou um t, devido ao acoplamento com os hidrogênios dos CHs (**E e H**). Os compostos contendo metoxila (Neq1040, Neq1075, Neq1056 e Neq1139) possuem espectros com sinais, correspondentes aos CH_3 , nesta região com deslocamento químico próximo a 4 ppm.

O terceiro e último intervalo (FIGURA 5.12), 7 a 9 ppm, contém os sinais dos hidrogênios aromáticos (**A, B, C, D, R, S, T e U**), que em geral aparecem como multipletos sobrepostos. Além desses sinais, para o Neq0820 e seus derivados, também é observado um dd correspondente ao NH (**N**) da amida.

2.2.2 Ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C)

Os deslocamentos químicos apresentados a seguir são referentes ao M820-P0, entretanto, para os demais compostos os sinais encontram-se próximos aos apontados. Os espectros de RMN ^{13}C para estes compostos (FIGURA 5.13) podem ser divididos, didaticamente, em dois intervalos.

FIGURA 5.13 – Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6) do Neq1083.

FONTE: Autoria própria.

No primeiro, 0 a 70 ppm, são observados os sinais dos carbonos sp^3 da molécula: CH_3 (**K e L**) da leucina (21.89 e 22.76 ppm), CH (**J**) da leucina (24.11 ppm), CH (**O**) entre o NH e a nitrila (37.29 ppm), CH_2 (**I**) da leucina (41.19), CH_2 (**Q**) da cadeia lateral da fenilalanina (42.09 ppm) e CH (**H**) aminoácido que está adjacente à um átomo de nitrogênio e uma carbonila (59.29 ppm). Além deste, o sinal mais desblindado desta região pertence ao CH (**E**) ligado ao CF_3 (61.11 – 61.79 ppm) que se apresenta como um q com J da ordem de 30 Hz ($J = 28.2$ Hz para o Neq1083) devido ao acoplamento $^2J_{CF}$. Os compostos contendo metoxila (Neq1056, e Neq1075) possuem espectros com sinais, correspondentes aos CH_3 , observados nesta região.

No segundo, 110 a 180 ppm, é observado o carbono com hibridização sp da nitrila (118.93 ppm) e os carbono sp^2 presentes na molécula: C-Br (**A**) (122.05 ppm), CH (**U**) da fenilalanina cujo hidrogênio encontra-se em *-para* em relação ao substituinte (127.17 ppm), CH (**T**) da fenilalanina com hidrogênio em *-meta* em relação ao substituinte (128.37 ppm), CH (**S**) da fenilalanina vizinho ao carbono substituído (129.37 ppm), CH (**B**) vizinho ao C-Br (130.53 ppm), CH (**C**) a três ligações do Br (131.28 ppm), C (**D**) oposto ao C-Br (134.13 ppm), C (**R**) oposto ao substituinte da fenilalanina (135.48 ppm) e carbonila (**M**) da amida (173.73 ppm). O sinal correspondente ao carbono quaternário (**F**) ligado a três átomos de flúor se desdobra em um q com $J = 284.2$ Hz devido ao acoplamento $^1J_{CF}$. Além dos sinais apresentados, o Neq1038 (com Br em *-meta*) apresenta mais um sinal de carbono aromático além dos apresentado aqui, enquanto o Neq820 e seus outros derivados apresentam outros sinais correspondentes a estrutura do substituinte que ocupa a posição *-para* ou *-meta* do anel aromático em P3.

2.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

É possível observar os seguintes estiramentos (FIGURA 5.14): N-H em 3339 cm^{-1} e 3250 cm^{-1} (presentes nas funções amida e amina); CH, CH_2 e CH_3 de 3065 cm^{-1} a 2872 cm^{-1} ; $C\equiv N$ em 2243 cm^{-1} ; C=O da ligação peptídica em 1661 cm^{-1} e C=C dos anéis aromáticos em 1491 cm^{-1} . Além disso, é possível observar a presença de sinais em torno de 1500 cm^{-1} que podem ser referentes ao modo de vibração *bend* da ligação NH do grupo trifluoroetilamina e entre 1250 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} que podem corresponder a sinais da ligação C-N e C-F.

FIGURA 5.14 – Espectro de FT-IR do Neq1083.

FONTE: Autoria própria.

2.3 Compostos sintetizados

(S)-*N*-((*S*)-1-cyano-2-phenylethyl)-4-methyl-2-(((*S*)-2,2,2-trifluoro-1-(3',4',5'-trimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)ethyl)amino)pentanamide (Neq1056): Para obtenção do Neq1056 foi seguido o Método G, sendo obtido como um sólido branco (0,1410 g, 52%). PF 50,1 – 51,7 °C. $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$: -113,79° (8,686 mg/mL; DCM grau HPLC; 23,63 °C). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.53 (s, 1H); 7.51 (s, 2H); 7.38 - 7.31 (m, 3H); 7.28 (s, 1H); 7.26 - 7.22 (m, 3H); 7.17 - 7.15 (d, J = 8.9 Hz, 1H); 6.76 (s, 2H); 5.04 - 4.99 (dt, J = 8.9, 6.6 Hz, 1H); 4.07 - 4.06 (m, 1H); 3.91 (s, 6 H); 3.89 (s, 3H); 3.33 - 3.29 (m, 1H); 3.02 (s, 1H); 3.01 (s, 1H); 1.99 (s, 1H); 1.77 - 1.67 (m, 1H); 1.56 - 1.49 (m, 1H); 1.40 - 1.34 (m, 1H); 0.94 - 0.92 (t, J = 6.8 Hz, 6H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3): 173.27; 153.45; 142.61; 137.80; 136.20; 133.68; 132.12; 129.36; 128.98; 128.73; 128.00; 127.82; 117.72; 104.47; 63.76 – 63.48 (q, J = 28.7 Hz); 60.95; 59.15; 56.19;

42.69; 40.77; 38.80; 24.83; 23.08; 21.76. FT-IR (cm^{-1}) 3323, 2959, 2936, 2245, 1680, 1589. HRMS: calculado [$\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$] 583,27; presente (ESI (+)) 584,27 [M+H] e (ESI (-)) 582,31 [M-H]. Determinação da pureza (HPLC): t_R = 28.6 min, 215 nm, <99% de pureza.

(*S*)-*N*-((*S*)-1-cyano-2-phenylethyl)-4-methyl-2-((((*S*)-2,2,2-trifluoro-1-(3-(pyridin-3-yl)phenyl)ethyl)amino)pentanamide (Neq1068): Para obtenção do Neq1068 foi seguido o Método G, sendo obtido como um óleo amarelo. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.88 (d, J = 2.0 Hz, 1H); 8.79 (d, J = 7.9 Hz, 1H); 8.59 (dd, J = 4.7, 1.4 Hz, 1H); 8.08 – 8.02 (m, 1H); 7.71 (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.57 (s, 1H); 7.54 – 7.45 (m, 2H); 7.32 – 7.20 (m, 5H); 4.83 (dd, J = 15.5, 8.1 Hz, 1H); 3.97 – 3.87 (m, 1H); 2.99 (dd, J = 13.5, 7.1 Hz, 1H); 2.90 – 2.79 (m, 2H); 1.70 (dt, J = 13.5, 6.6 Hz, 1H); 1.45 – 1.36 (m, 1H); 1.29 – 1.21 (m, 1H); 0.86 (d, J = 6.6 Hz, 6H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6) δ 174.35; 149.18; 148.21; 137.64; 136.17; 135.94; 135.60; 134.69; 129.78; 129.64; 128.80; 128.60; 127.69; 127.59; 127.39; 124.33; 119.41; 79.63; 62.52 (q, J = 28.0 Hz); 59.90; 42.62; 41.67; 37.78; 24.60; 23.27; 22.37. FT-IR 712.25, 732.46, 739.68, 877.16, 1020.43, 1020.43, 1055.60, 1055.60, 1118.96, 1160.11, 1253.04, 1470.33, 1544.95, 1673.09, 2852.71, 2871.67, 2931.63, 2994.68, 3231.49, 3439.04; Determinação da pureza (HPLC): t_R = 28.3 min, 97% de pureza. Molécula sintetizada pelo Dr. Anwar Shamim.

(*S*)-*N*-((*S*)-1-cyano-2-phenylethyl)-2-((((*S*)-1-(3',4'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2,2,2-trifluoroethyl)amino)-4-methylpentanamide (Neq1075): Para obtenção do Neq1075 foi seguido

o Método G, sendo obtido como um sólido branco (0,0805 g; 38%). PF 117,0 – 118,8 °C. $[\alpha]^{25}_D$: -89,58° (9,618 mg/mL; DCM grau HPLC; 26,63 °C). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.54 (s, 1H); 7.52 (s, 1H); 7.36 - 7.27 (m, 4H); 7.25 - 7.21 (m, 3H); 7.15 - 7.13 (m, 2H); 7.10 - 7.09 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H); 6.96 - 6.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H); 5.04 - 5.00 (dt, $J = 8.9, 6.6$, 1H); 4.25 - 4.18 (m, 1H); 4.08 - 4.04 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H); 3.94 - 3.93 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H); 3.34 - 3.32 (dd, $J = 8.8, 4.6$ Hz, 1H); 3.02 - 3.00 (d, $J = 6.6$, 2H); 1.76 - 1.68 (m, 1H); 1.54 - 1.50 (m, 1H); 1.39 - 1.33 (m, 1H); 0.95 - 0.92 (dd, $J = 9.4, 6.6$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 173.30; 149.16; 148.88; 142.25; 133.68; 133.15; 131.70; 129.34; 128.97; 128.69; 127.98; 127.50; 119.48; 117.73; 111.42; 110.43; 63.63 - 63.35 (q, $J = 28.3$ Hz); 59.14; 55.96; 42.66; 40.78; 38.79; 24.83; 23.07; 21.76. FT-IR (cm^{-1}) 3331, 2959, 2243, 1686, 1605, 1504. MS: calculado $[\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3]$ 553,26; presente (ESI (+)) 554,27 $[\text{M}+\text{H}]$ e (ESI (-)) 552,28 $[\text{M}-\text{H}]$. Determinação da pureza (HPLC): $t_R = 28.9$ min, <99% de pureza.

(*S*)-*N*-(((*S*)-1-cyano-2-phenylethyl)-4-methyl-2-(((*S*)-2,2,2-trifluoro-1-(4-(pyridin-3-yl)phenyl)ethyl)amino)pentanamide (Neq1079): Para obtenção do Neq1079 foi seguido o procedimento Método G, sendo obtido como um sólido branco (0,0806 g; 43%). PF 114,8 – 116,5 °C. $[\alpha]^{25}_D$: -83,5334° (5,830 mg/mL; DCM grau HPLC; 22,38 °C). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.88 - 8.87 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H); 8.79 - 8.77 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H); 8.58 - 8.57 (dd, $J = 4.8, 1.5$ Hz, 1H); 8.07 - 8.04 (ddd, $J = 8.0, 2.3, 1.7$ Hz, 3H); 7.72 - 7.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H); 7.49 - 7.45 (ddd, $J = 8.0, 4.8, 0.7$ Hz, 1H); 7.35 - 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H); 7.30 - 7.29 (m, 2H); 7.26 - 7.25 (m, 3H); 4.86 - 4.82 (dd, $J = 15.3, 8.2$ Hz, 1H); 3.91 - 3.85 (m, 1H); 3.33 - 3.27 (m, 1H); 3.07 - 3.03 (dd, $J = 13.5, 6.9$ Hz, 1H); 2.91 - 2.86 (dd, $J = 13.5, 8.7$ Hz, 1H); 2.70 - 2.67 (dd, $J = 10.7, 4.8$ Hz, 1H); 0.87 - 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 174.29; 149.14; 146.12; 137.89; 135.95; 135.37; 135.11; 134.61; 129.82; 129.56; 128.79; 127.61; 127.34; 124.31; 119.45; 62.13; 59.90; 42.66; 41.63; 42.66; 41.63; 37.78; 24.61; 23.27; 22.37. FT-IR (cm^{-1}) 3323, 2955, 2243, 1684, 1506. MS: calculado $[\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}]$ 494,23; presente (ESI (+)) 495,33 $[\text{M}+\text{H}]$. Determinação da pureza (HPLC): $t_R = 28.8$ min, <99% de pureza.

(*S*)-2-(((*S*)-1-(4-bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethyl)amino)-*N*-((*S*)-1-cyano-2-phenylethyl)-4-methylpentanamide (Neq1083): Para obtenção do Neq1083 foi seguido o Método G, sendo obtido como um sólido branco. PF 146,2 – 150,4 °C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.76 (s, 1H); 7.55 - 7.54 (d, J = 8.5, 2H); 7.35 - 7.32 (m, 2H); 7.29 - 7.28 (m, 3H); 7.19 - 7.17 (d, J = 8.4, 2H); 4.83 - 4.78 (dd, J = 15.4, 8.2 Hz, 1H); 3.89 – 3.83 (m, 1H); 3.26 - 3.21 (m, 1H); 3.07 - 3.02 (dd, J = 13.5, 7.0, 1H); 2.91 – 2.86 (dd, J = 13.5, 8.6 Hz, 1H); 2.72 – 2.69 (dd, J = 10.6, 5.2 Hz, 1H); 1.70 – 1.62 (m, 1H); 1.38 - 1.33 (m, 1H); 1.24 - 1.15 (m, 1H); 0.85 - 0.84 (d, J = 6.6 Hz, 6H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 173.73; 135.48; 134.13; 131.28; 131.17 – 124.40 (q, J = 284.2 Hz); 130.53; 129.37; 128.37; 127.17; 122.05; 118.93; 61.79 – 61.11 (q, J = 28.2 Hz); 59.29; 59.29; 42.09; 41.19; 37.29; 24.11; 22.76; 21.89. FT-IR (cm^{-1}) 3339, 3250, 3065, 3034, 2961, 2932, 2872, 2243, 1661 e 1491. MS: calculado [$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}_3$] 495,113310; presente (ESI (+)) 518,19 [$\text{M}+\text{Na}$] e (ESI (-)) 494,23 [$\text{M}-\text{H}$]. Determinação da pureza (HPLC): t_R = 27.7 min, 215 nm, 96% de pureza.

(*S*)-*N*-((*S*)-1-cyano-2-phenylethyl)-4-methyl-2-(((*S*)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)ethyl)amino)pentanamide (Neq1139): Para obtenção do Neq1139 foi seguido o Método G, sendo obtido como um sólido branco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.57 (s, 1H); 7.55 (s, 1H); 7.37 - 7.27 (m, 7H); 7.22 – 7.21 (d, J = 1.4 Hz, 1H); 7.20 (s, 1H); 7.17 - 7.15 (d, J = 7.7 Hz, 1H); 7.11 – 7.10 (t, J = 1.9 Hz, 1H); 7.09 (s, 1H); 6.92 – 6.91 (dd, J = 8.0, 2.2 Hz, 1H); 5.04 – 5.00 (dt, J = 8.9, 6.6 Hz, 1H); 4.06 – 4.03 (dd, J = 6.2 Hz, 1H); 3.86 (s, 3H); 3.36 – 3.35 (m, 1H); 3.01 – 3.00 (d, J = 6.6 Hz, 2H); 1.75 – 1.67 (m, 1H); 1.55 – 1.51 (m, 1H); 1.38

– 1.33 (m, 1H); 0.95 – 0.93 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H); 0.93 – 0.92 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). FT-IR (cm^{-1}) 3327, 3032, 2956, 2928, 2870, 2243, 1663 e 1483. MS: calculado $[\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2]$ 523,60; presente (ESI (+)) 546,27 $[\text{M}+\text{Na}]$. Determinação da pureza (HPLC): $t_R = 28.8$ min, 215 nm, <99% de pureza.

(*S*)-*N*-(((*S*)-1-cyano-2-phenylethyl)-4-methyl-2-(((*S*)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)ethyl)amino)pentanamide (*Neq1140*): Para obtenção do M820-P6 foi seguido o Método G, sendo obtido como um sólido branco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.71 (q, $J = 8.4$ Hz, 4H); 7.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H); 7.39 – 7.30 (m, 6H); 7.25 – 7.24 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H); 7.13 – 7.11 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H); 5.08 – 5.04 (m, 1H); 4.12 – 4.07 (m, 1H); 3.38 – 3.35 (m, 1H); 3.07 – 3.01 (m, 2H); 2.04 – 2.02 (t, $J = 4.7$, 1H); 1.78 – 1.72 (m, 1H); 1.57 – 1.54 (m, 1H); 1.42 – 1.36 (m, 1H); 0.98 – 0.97 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H); 0.96 – 0.95 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). FT-IR (cm^{-1}) 3308, 3034, 2958, 2926, 2872, 2243, 1661 e 1496. MS: calculado $[\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}]$ 561,57; presente (ESI (+)) 584,23 $[\text{M}+\text{Na}]$. Determinação da pureza (HPLC): $t_R = 29.1$ min, 215 nm, <99% de pureza.

(*S*)-2-(((*S*)-1-(4'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2,2,2-trifluoroethyl)amino)-*N*-(((*S*)-1-cyano-2-phenylethyl)-4-methylpentanamide (*Neq1141*): Para obtenção do Neq1141 foi seguido o Método G, sendo obtido como um sólido branco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.55 – 7.51 (m, 3H); 7.45 – 7.42 (m, 2H); 7.39 – 7.31 (m, 5H); 7.25 – 7.23 (m, 2H); 7.18 – 7.08 (m, 2H); 5.06 – 5.02 (m, 1H); 4.11 – 4.05 (m, 1H); 3.38 – 3.34 (m, 1H); 3.04 – 3.03 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H); 2.03 – 2.01 (t, $J = 5.0$, 1H); 1.76 – 1.72 (m, 1H); 1.56 – 1.52 (m, 1H); 1.42 – 1.35 (m, 1H); 0.97

– 0.94 (t, 6H). FT-IR (cm^{-1}) 3325, 3032, 2957, 2930, 2870, 2245, 1663 e 1485. MS: calculado [$\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}$] 527,20; presente (ESI (+)) 550,22 [M+Na]. Determinação da pureza (HPLC): t_R = 23.2 min, 215 nm, <99% de pureza.

A síntese e caracterização das moléculas **Neq0659**, **Neq0820**, **Neq1009**, **Neq1038**, **Neq1039** e **Neq1040** foram realizadas por outros membros do grupo NEQUIMED e estão reportadas em trabalhos prévios.¹⁰⁻¹¹

REFERÊNCIAS

1. EL-FAHAM, Ayman; ALBERICIO, Fernando. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 111, n. 11, p.6557-6602, 9 nov. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr100048w>.
2. NAKAJIMA, Noriyuki; UBUKATA, Makoto. Preparation of nitriles from primary amides under Swern oxidation conditions. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 38, n. 12, p.2099-2102, mar. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0040-4039\(97\)00316-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0040-4039(97)00316-x).
3. HUGHES, Greg *et al.* Diastereoselective Reductive Amination of Aryl Trifluoromethyl Ketones and α -Amino Esters. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 46, n. 11, p.1839-1842, 5 mar. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200603745>.
4. BURTOLOSO, Antônio C. B.; ALBUQUERQUE, Sérgio de; FURBER, Mark; GOMES, Juliana C.; GONÇALEZ, Cristiana; KENNY, Peter W.; LEITÃO, Andrei; MONTANARI, Carlos A.; QUILLES, José Carlos; RIBEIRO, Jean F. R. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 1-16, 21 fev. 2017. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005343>.
5. GOMES, Juliana C; CIANNI, Lorenzo; RIBEIRO, Jean; *et al.* Synthesis and structure-activity relationship of nitrile-based cruzain inhibitors incorporating a trifluoroethylamine-based P2 amide replacement. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, Elsevier Ltd, v. 27, n. 22, p. x 115083, 2019. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.115083.
6. MONTALBETTI, Christian A.g.n.; FALQUE, Virginie. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 61, n. 46, p.10827-10852, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>.
7. PROKOPCZYK, Igor Muccilo. **Determinação da Afinidade e Assinatura Termodinâmica de Inibidores da Cruzaina por Calorimetria de Titulação Isotérmica**. 2016. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química Orgânica e Biológica, IQSC, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 2016.

8. LENNOX, Alastair J. J.; LLOYD-JONES, Guy C. Selection of boron reagents for Suzuki–Miyaura coupling. **Chem. Soc. Rev.**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.412-443, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs60197h>.
9. MATOS, Karl; SODERQUIST, John A. Alkylboranes in the Suzuki–Miyaura Coupling: Stereochemical and Mechanistic Studies. **The Journal of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 63, n. 3, p.461-470, fev. 1998. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo971681s>.
10. GOMES, Juliana C.; CIANNI, Lorenzo; RIBEIRO, Jean; ROCHO, Fernanda dos Reis; SILVA, Samelyn da Costa Martins; BATISTA, Pedro Henrique Jatai; MORAES, Carolina Borsoi; FRANCO, Caio Haddad; FREITAS-JUNIOR, Lucio H.G.; KENNY, Peter W. Synthesis and structure-activity relationship of nitrile-based cruzain inhibitors incorporating a trifluoroethylamine-based P2 amide replacement. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 27, n. 22, p. 115083, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115083>.
11. CIANNI, Lorenzo; ROCHO, Fernanda dos Reis; ROSINI, Fabiana; BONATTO, Vinícius; RIBEIRO, Jean F.R.; LAMEIRA, Jerônimo; LEITÃO, Andrei; SHAMIM, Anwar; MONTANARI, Carlos A. Optimization strategy of single-digit nanomolar cross-class inhibitors of mammalian and protozoa cysteine proteases. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 101, p. 104039, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104039>.

CAPÍTULO VI

Ensaio enzimático para os derivados do Neq0544:
cruzaína/cruzipaína e outras cisteíno proteases

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biocalorimetria

Através da biocalorimetria é possível correlacionar parâmetros termodinâmicos da interação ligante-proteína e a SAR. Esta abordagem tem se mostrado muito promissora no planejamento de novas entidades química bioativas (BIONCEs), auxiliando principalmente durante a etapa de otimização.¹⁻² O método usado para obtenção dos parâmetros, em geral, é a ITC, do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*), através da qual determinam-se simultaneamente valores de energia livre de Gibbs (ΔG) e entalpia (ΔH) de ligação. Através destes valores, utilizando a equação fundamental da termodinâmica, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, a contribuição entrópica ($T\Delta S$) também pode ser calculada.³

A ΔG relaciona-se à quantificação da afinidade de ligação/interação entre a proteína e o ligante, porém, por vezes, isoladamente não fornece uma indicação clara de quais compostos selecionar para estudos posteriores que tentem otimizar a interação. Os processos aditivo-constitutivos associados ao reconhecimento bimolecular podem resultar em ligantes que interagem com a mesma (ou muito semelhante) afinidade com o alvo. Como componentes entálpicos e entrópicos refletem diferentes tipos de interações, tem sido reconhecido que a proporção pela qual as mudanças de ΔH e ΔS contribuem para a energia de ligação/interação total é um determinante crítico de propriedades importantes dos candidatos a fármacos.³⁻⁵

A ΔH é uma medida direta da mudança líquida no número e/ou força das ligações não-covalentes ao passar do estado livre para o estado ligado. Em geral, uma entalpia de ligação favorável está associada à presença de fortes ligações de hidrogênio e interações de van der Waals entre a proteína e o ligante. Ao contrário, uma entalpia desfavorável geralmente reflete a solvatação de grupos polares.⁶⁻⁸

Sob a perspectiva da ΔS , destacam-se duas formas de quantificação: mudanças na entropia de solvatação e conformacional. A solvatação, tanto de grupos polares como apolares, contribui com uma mudança desfavorável na entropia, com grupos carregados tendo efeito mais pronunciado.⁸ Por sua vez, a variação desfavorável na entropia conformacional é resultado da interação entre o ligante e o alvo, o que gera uma perda da liberdade conformacional (redução de graus de liberdade).⁹⁻¹⁰ Essa perda de energia pode ser minimizada pela introdução de limitações conformacionais para “rigidificar” o ligante, mesmo quando livre, em sua conformação bioativa.^{3,10} Essa pré-organização do ligante em sua forma ligada reduz o número de conformações possíveis que o ligante pode adotar quando não está ligado. Isso resulta em

um ganho na afinidade por razões entrópicas que também gera uma maior afinidade de ligação/interação e seletividade.^{3,10}

FIGURA 6.1 – Diagrama esquemático mostrando três diferentes perfis termodinâmicos de inibidores: entálpicamente dirigido (A), entropicamente dirigido (B) e balanceado (C).

FONTE: adaptado de O'BRIEN; HAQ, 2005.⁶

Para uma série de compostos, ΔS e ΔH são, em geral, correlacionados, e, portanto, compensam-se mutuamente para corresponder ao valor médio da energia livre.³ Com isso, como mostrado na FIGURA 6.1, existem três situações distintas para ligantes⁶: os entálpicamente dirigidos (A), entropicamente dirigidos (B) e os balanceados (C). Em posse dessas informações, os químicos medicinais têm a difícil tarefa de otimizar o composto-matriz, de forma a obter máxima contribuição entálpica e entrópica para a maior espontaneidade da interação.¹¹

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Calorimetria de Titulação Isotérmica

Um calorímetro tem como objetivo medir o calor gerado ou absorvido em um processo físico ou químico. Por outro lado, através de experimentos de titulação, é possível estudar a variação das propriedades físico-químicas de uma solução quando diluída sistematicamente no solvente. A ITC une esses dois aspectos. Para isso o calorímetro, representado na FIGURA 6.2, contém uma seringa e duas celas (amostra e referência, ambas dentro de uma armadura adiabática que evita trocas de calor com o exterior). A seringa pode ser preenchida com a

macromolécula (ou o ligante) e realiza a titulação da cela de amostra e agitação do sistema. A cela de referência pode conter tampão ou água. A cela de amostra, por sua vez, pode conter o ligante ou a macromolécula. Para os experimentos realizados neste trabalho, a seringa foi preenchida com o inibidor, a cela de amostra com a macromolécula (Cz) e a cela de referência com a solução tampão.

FIGURA 6.2 – Representação esquemática do ITC.

FONTE: Autoria própria.

Durante o experimento, a diferença de temperatura é monitorada e uma energia constante (definida pelo usuário) é aplicada na cela de referência. Quando uma reação ocorre, há uma alteração no valor da temperatura na cela de amostra, levando a uma diferença de temperatura entre as celas. Isto é detectado pelo calorímetro e um sistema de compensação equaliza essa diferença gerando um sinal. Se o processo é exotérmico, o calorímetro precisa fornecer menos energia para manter as condições isotérmicas. Do contrário, processo endotérmico, o calorímetro precisa fornecer energia adicional. Caso não aconteça absorção ou liberação de calor, o fluxo se mantém constante, correspondendo a chamada linha de base.¹²

Com isso, a ITC pode ser utilizada para determinar em um único experimento a constante de dissociação (K_d) e os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔG e ΔS) de um ligante frente ao alvo, sem a necessidade de sonda ou marcadores.¹³

A K_d descreve a relação entre a concentração de um complexo macromolécula-ligante (ML) no estado de equilíbrio de uma reação reversível entre a macromolécula (M) e o ligante (L), ambos isolados.

$$K_d = \frac{[M][L]}{[ML]}$$

Quando em condições de equilíbrio, K_d pode ser descrita em função da variação energia livre de Gibbs:¹⁴

$$\Delta G = RT \ln K_d$$

Quanto mais negativo o valor de ΔG , maior será o valor da afinidade entre o inibidor e a enzima. Como se sabe, o ΔG pode ser descrito em função da variação de entalpia menos o produto da temperatura pela variação da entropia:¹⁴

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

2.2 Procedimento para ITC

Os ensaios de ITC foram realizados pela Ms. Fabiana Rosini segundo o procedimento a seguir.

Inicialmente, uma alíquota da cruzaína foi descongelada e submetida a nova diálise. Cada uma das lavagens continha 15 mL de tampão NaOAc 100mM, NaCl 300 mM e pH 5,5. A proteína foi concentrada durante 30 a 60 minutos em membranas Amicon ultra 10 kDa (Merck/Millipore) usando uma centrífuga da bancada a 4500 RCF (Eppendorf centrifuge model 5804R). Por fim, as soluções da cela e da seringa foram preparadas utilizando o tampão da diálise (tampão acetato pH = 5,5) nas concentrações desejadas para o ensaio.

O ensaio foi realizado em um calorímetro de titulação isotérmica (PEAQ-ITC/Malvern), nele os inibidores foram colocados na seringa e a proteína na cela. Para evitar que ocorresse agregação da proteína 0,001% de Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) foi adicionado na solução da seringa e da cela; para solubilização dos ligantes foi adicionado DMSO às duas soluções.

Todos os parâmetros termodinâmicos foram calculados pelo software *Microcal PEAQ ITC Analysis Software* e realizados em duplicatas. O experimento de ITC foi configurado de acordo com os parâmetros experimentais da TABELA 6.1

TABELA 6.1 – Parâmetros usados para configuração do experimento de ITC.

Parâmetro	Valor
Número de injeções	19
Volume de cada injeção (µL)	2
Temperatura (°C)	25
Espaço entre as injeções (s)	120
Reference Power (µal/s)	5
Tempo de delay (s)	90
Rotação da seringa (rpm)	750

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O NEQUIMED vem estudando o perfil termodinâmico de inibidores da cruzaina buscando compostos que apresentem perfil entalpicamente dirigido. O planejamento dos compostos relatados neste capítulo está baseado na modificação molecular do inibidor de cruzaina K777, do qual o **Neq0409** foi obtido por simplificação molecular (FIGURA 6.2). Este composto, junto de seus derivados, teve seu perfil termodinâmico determinado em trabalhos anteriores através da ITC, apresentando clara compensação entalpia-entropia. Embora entalpicamente dirigidos, o **Neq0409**, **Neq0551** e **Neq0544** apresentam diferentes assinaturas termodinâmicas (FIGURA 6.3). O **Neq0409** tem clara contribuição detrimental da entropia. Sua modificação molecular com a introdução da tirosina em P2 resultou no **Neq0551**, o qual possui pequena contribuição positiva da entropia. A introdução do grupo t-butiloxicarbonil em P3 e do átomo de cloro em *meta* na fenilalanina em P2, resultando no **Neq0544**, no entanto, teve efeito mais pronunciado e apresentou entropia favorável.

FIGURA 6.3 – Reposicionamento do inibidor de cruzaina K777 para o Neq0409 como estratégia de simplificação e modificação molecular.

FONTE: Autoria própria.

FIGURA 6.4 – (A) Perfil Termodinâmico de alguns inibidores da cruzaina com efeito típico de compensação entalpia-entropia. (B) Contribuições entálpica e entrópica favoráveis. (C) Estrutura 2D dos inibidores Neq0409, Neq0551 e Neq0544.

2.1 Relação Estrutura-Atividade

As modificações nos derivados do **Neq0544** foram implantadas em P2 e tem como objetivo modular as interações com o subsítio S2, que por ter características lipofílicas e ser profundo acomoda bem substratos hidrofóbicos e volumosos.

A interação da enzima com o inibidor foi avaliada através da constante de inibição (K_i , expresso em $pK_i = -\log K_i$) (TABELA 6.2) seguindo o procedimento descrito no Capítulo IV. Esses dados possibilitaram o desenvolvimento de uma relação entre as modificações estruturais estabelecidas com as referidas atividades inibitórias.

TABELA 6.2 – Resultado dos ensaios de cinética enzimática.

Composto	Valores de pK_i			
	<i>Cz</i>	<i>hCatL</i>	<i>hCatS</i>	<i>hCatB</i>
Neq0400	5.9 ± 0.02	6.4 ± 0.01	6.5 ± 0.09	<4.0
Neq0544	6.1 ± 0.02	7.9 ± 0.04	7.1 ± 0.08	<4.0
Neq0996	6.2 ± 0.02	7.4 ± 0.04	7.3 ± 0.01	<4.0
Neq1024	6.0 ± 0.02	6.6 ± 0.06	7.1 ± 0.09	<4.0
Neq1025	5.9 ± 0.01	6.4 ± 0.03	7.1 ± 0.05	<4.0
Neq1032	6.3 ± 0.01	6.5 ± 0.03	5.9 ± 0.01	<4.0

2.1.1 SAR: *Cruzaína*

A SAR para os derivados do **Neq0544** está representada na FIGURA 6.4. A substituição do cloro (**Neq0544**) por um hidrogênio (**Neq0400**) resultou em um decréscimo (-0.2) no valor

de pK_i obtido contra a cruzaína. Por outro lado, a inserção do cloro na posição *para* (**Neq0996**) apresentou um ganho de **0.3** unidades em relação ao **Neq0400**. Indicando que a interação é favorecida com o substituinte ocupando a posição *para* do anel aromático.

Os compostos contendo bromo (**Neq1024**) e iodo (**Neq1025**) apresentaram valores de pK_i similares ao **Neq0400**. Enquanto os compostos contendo flúor (**Neq1032**) e cloro (**Neq0996** e **Neq0544**) apresentaram maiores valores de inibição. Através destes resultados foi possível observar uma tendência na diminuição do pK_i em função do aumento da massa do halogênio. Sendo o **Neq1032** a apresentar melhor resultado ($pK_i = 6.3$).

FIGURA 6.5 – SAR dos derivados do Neq0544 frente à cruzaína.

FONTE: Autoria própria.

2.1.2 SAR: Catepsinas humanas (*hCatL*, *hCatS* e *hCatB*)

A análise dos valores de inibição diante das modificações implementadas está presente na FIGURA 6.5. A substituição do átomo de cloro do **Neq0544** por um hidrogênio (**Neq0400**) resultou na diminuição dos valores de pK_i para as catepsinas L e S (-1.5 e -0.6, respectivamente). Enquanto a troca do cloro da posição *meta* à posição *para* (**Neq0996**) levou à diminuição do valor de pK_i (-0.5) para a catepsina L e aumento de 0.2 unidades para a catepsina S. Isso mostra que a presença do cloro é importante para a atividade contra a catepsina

L, sendo mais favorável sua presença na posição *meta*. Diferentemente, os resultados para a catepsina S demonstram que a interação é mais favorável com o cloro na posição *para*.

Todos foram inativos contra a catepsina B ($pK_i = <4.0$) e, com exceção do **Neq0996**, os compostos apresentaram diminuição nos valores de pK_i contra as catepsinas S e L em relação ao **Neq0544**. O **Neq0544** a apresentar melhor resultado frente a catepsina L ($pK_i = 7.9$) e o **Neq0996** em relação a catepsina S ($pK_i = 7.3$).

FIGURA 6.6 – SAR dos derivados do Neq0544 frente às catepsinas humanas.

FONTE: Autoria própria.

2.1.3 Seletividade

Os resultados obtidos para a comparação entre cruzaína x *hCatL* são mostrados na FIGURA 6.6 (a). É possível observar que os compostos estão distribuídos na parte negativa do gráfico, indicando uma tendencia de seletividade a *hCatL*. A maior parte deles não apresentou seletividade (diferença inferior a 1.0 unidades). Porém, o **Neq0996** e **Neq0544** apresentaram seletividade (diferença igual ou superior a 1.0 unidade) para a *hCatL* frente a cruzaína.

A cruzaína também foi analisada com a *hCatS* (FIGURA 6.6 (b)). Assim como em relação a *hCatL*, a maior parte dos compostos está distribuída na região negativa do gráfico. O **Neq0544**, **Neq0996**, **Neq1024** e **Neq1025** demonstraram tendencia de seletividade para a *hCatS*.

Sendo o **Neq1032** o único a apresentar essa tendência para a cruzaina. Isso indica que CPs de mamíferos tem maior afinidade pelos inibidores que CPs de parasitos.

Além das CPs de parasitos, a inibição das catepsinas humanas também possui interesse farmacêutico. Por isso, este trabalho também se ocupou de avaliar a seletividade dos inibidores para a enzima *hCatL* contra a *hCatS* e vice-versa (FIGURA 6.6 (c)). O **Neq0400**, **Neq1024** e **Neq1025** apresentaram maior tendência a seletividade em relação a *hCatS*. Por outro lado, o **Neq0996**, **Neq1032** e **Neq0544** apresentaram tendência para a *hCatL*.

FIGURA 6.7 – Análise da seletividade obtida para: (a) Cz x *hCatL*; (b) Cz x *hCatS*; (c) *hCatL* x *hCatS*.

O eixo-y apresenta a diferença entre os valores de pK_i para duas enzimas. O eixo-x apresenta os valores de pK_i para uma delas. Inibidores com maior afinidade pela enzima presente no eixo-x estão à direita do gráfico. Quanto maiores que zero (no eixo-y), maior a seletividade do inibidor em relação a esta enzima.

2.1.4 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os parâmetros termodinâmicos (TABELA 6.3 e FIGURA 6.7) seguiram a mesma tendência apresentada pelos dados de inibição enzimática. Vale ressaltar que os valores de pK_d mostram-se maiores que os de pK_i. Este efeito é conhecido e pode ser explicado pelo fato de a

constante de inibição ser uma medida cinética da interação entre a enzima e o inibidor na presença do substrato. Logo, além da inibição enzimática é observado um efeito da competição entre o inibidor e o substrato pelo sitio ativo da enzima. Mas este efeito não é observado no ITC, já que apenas o inibidor interage com o sitio da enzima.¹⁵

TABELA 6.3 – Constantes de inibição enzimática e parâmetros termodinâmicos para o Neq0544 e seus derivados.

Composto	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	ΔS (kcal mol ⁻¹)	pK _a	pK _i
Neq0400	-8.11 ± 0.01	-19.7 ± 0.8	11.6 ± 1.9	5.95 ± 0.01	5.9 ± 0,02
Neq0544	-8.55 ± 0.03	-15.0 ± 0.3	6.43 ± 0.37	6.27 ± 0.02	6.1 ± 0,02
Neq0996	-8.71 ± 0.04	-11.5 ± 0.2	2.72 ± 0.21	6.49 ± 0.004	6.2 ± 0,02

FIGURA 6.8 – Relação estrutura-atividade entre os compostos analisados.

FONTE: Autoria própria.

Valores de ΔG , ΔH e ΔS dados em kcal mol⁻¹.

As modificações empregadas mantiveram o perfil termodinâmico apresentado pelo **Neq0544**. Porém foi apresentado um pênalti entrópico quando comparado o composto protótipo com o **Neq0996**, sendo acompanhado de uma diminuição na ΔG e aumento da ΔH . Quando o substituinte cloro foi retirado da fenilalanina (**Neq0400**), observou-se um aumento da ΔS e da ΔG , enquanto ocorreu uma diminuição de ΔH . Mostrando clara relação de compensação entalpia-entropia.

As análises demonstram que o **Neq0544**, embora entalpicamente dirigido, não apresenta o perfil esperado (com contribuição negativa do $-T\Delta S$). E o mesmo é observado para seus derivados. Apesar disso, foi possível notar que o substituinte cloro na fenilalanina é importante para a atividade apresentada pelo composto protótipo e que a troca deste cloro da posição *-meta* para *-para*, resultando no **Neq0996**, é favorável à interação enzima-inibidor. Este composto, em relação ao **Neq0544**, apresenta uma diminuição na ΔG (**-0,16 kcal mol⁻¹**) e na ΔS (**+3,50 kcal mol⁻¹**), mas um pequeno aumento na ΔH (**-3,71 kcal mol⁻¹**), como presumido devido à compensação entalpia-entropia.

REFERÊNCIAS

1. NASIRI, Hamid R.; LINGE, Sandra; ULLMANN, Dirk. Thermodynamic profiling of inhibitors of Nrf2: Keap1 interactions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.526-529, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.082>.
2. KLEBE, Gerhard. Applying thermodynamic profiling in lead finding and optimization. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.95-110, 23 jan. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4486>.
3. MARTIN, Stephen F.; CLEMENTS, John H. Correlating Structure and Energetics in Protein- Ligand Interactions: Paradigms and Paradoxes. **Annual Review of Biochemistry**, [s.l.], v. 82, n. 1, p.267-293, 2 jun. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060410-105819>.
4. LADBURY, John E.; KLEBE, Gerhard; FREIRE, Ernesto. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.23-27, 4 dez. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3054>.
5. SCHÖN, Arne; FREIRE, Ernesto. Enthalpy screen of drug candidates. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 513, p.1-6, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2016.08.023>.
6. O'BRIEN, Ronan; HAQ, Ihtshamul. Applications of Biocalorimetry: Binding, Stability and Enzyme Kinetics. **Biocalorimetry 2**, [s.l.], p.1-34, 2 jun. 2005. John Wiley & Sons, Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/0470011122.ch1>.
7. LAFONT, Virginie *et al.* Compensating Enthalpic and Entropic Changes Hinder Binding Affinity Optimization. **Chemical Biology & Drug Design**, [s.l.], v. 69, n. 6, p.413-422, jun. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00519.x>.
8. RUBEN, Adam J; KISO, Yoshiaki; FREIRE, Ernesto. Overcoming Roadblocks in Lead Optimization: A Thermodynamic Perspective. **Chemical Biology**, [s.l.], v. 67, n. 1, p.2-4, jan. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0285.2005.00314.x>.

9. CHODERA, John D.; MOBLEY, David L. Entropy- Enthalpy Compensation: Role and Ramifications in Biomolecular Ligand Recognition and Design. **Annual Review of Biophysics**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.121-142, 6 maio 2013. Annual Reviews.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130318>.
10. KAWASAKI, Yuko; FREIRE, Ernesto. Finding a better path to drug selectivity. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 16, n. 21-22, p.985-990, nov. 2011. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2011.07.010>.
11. FREIRE, Ernesto. A Thermodynamic Approach to the Affinity Optimization of Drug Candidates. **Chemical Biology & Drug Design**, [s.l.], v. 74, n. 5, p.468-472, nov. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00880.x>.
12. PANALYTICAL, Malvern (org.). **Isothermal Titration Calorimetry (ITC)**. 2020. Disponível em:
<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/microcalorimetry/isothermal-titration-calorimetry/>. Acesso em: 24 ago. 2020.
13. SCHÖN, A.; LAM, S. Y.; FREIRE, E. Thermodynamics-based drug design: strategies for inhibiting protein-protein interaction. **Future Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 3, n. 9, p.1129-1137, 2011. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.81>
14. THOMSON, J. A.; LADYBURY, J. E. Isothermal titration calorimetry: a tutorial. In: LADBURY, J. E.; DOYLE, M. L. (Ed.). **Biocalorimetry 2**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2004. 2, p.35-57.
15. PROKOPCZYK, Igor Muccilo. **Determinação da Afinidade e Assinatura Termodinâmica de Inibidores da Cruzaina por Calorimetria de Titulação Isotérmica**. 2016. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química Orgânica e Biológica, IQSC, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 2016.

CAPÍTULO VII

Síntese e caracterização dos derivados do Neq0544

1 MATERIAIS E MÉTODOS

O **Neq0544** e todos os seus derivados foram sintetizados (FIGURA 7.1) segundo o procedimento de acoplamento abaixo, sendo aplicados os mesmos procedimentos gerais apresentados no Capítulo V.

1.1 Síntese dos compostos

Reação de acoplamento. O aminoácido protegido (1 eq.), aminoacetonitrila hidrocloreica (1,3 eq.) e HATU (1,3 eq.) em DMF (5 mL/mmol) foram agitados a temperatura ambiente e atmosfera de argônio até que todos os reagentes estivessem solubilizados. A solução foi resfriada a 0 °C e DIPEA (2,6 eq.) foi adicionada. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 16 h, diluída em AcOEt e lavada com *brine* (5 x 20 mL) e solução saturada de NaHCO₃ (1 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, evaporada a pressão reduzida e purificado por recristalização a partir de acetato de etila ou diclorometano.

FIGURA 7.1 - Reação para consecução do Neq0544 e seus derivados.

Reagentes e condições: (a) aminoacetonitrila.HCl, HATU, DIPEA, DMF, t.a., 16 h.

FONTE: Autoria própria.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Caracterização

Ao final da síntese e após purificação, o Neq0544 e seus derivados tiveram sua caracterização estrutural realizada por meio das análises de FTIR, RMN-¹H, RMN-¹³C e HRMS (os espectros podem ser encontrados no **ANEXO B**). A interpretação desses espectros é descrita

a seguir. Para facilitar a compreensão, os espectros que correspondem ao Neq0996 (FIGURA 7.2) foram utilizados como exemplo.

FIGURA 7.2 – Estrutura do Neq0996 com os diferentes grupos da molécula.

FONTE: Autoria própria.

2.1.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)

Os espectros de RMN ¹H para o Neq0544 e seus derivados (FIGURA 7.3 e FIGURA 7.4) podem ser divididos, didaticamente, em três intervalos.

No primeiro intervalo, de 0 a 2 ppm, é observado um simpleto associado ao sinal dos hidrogênios ligados aos carbonos sp³ dos CH₃ (**J**) da *terc*-butila do grupo Boc.

O segundo intervalo está localizado entre 2 e 6 ppm, nesta região são encontrados os sinais de hidrogênios ligados a carbonos sp³ próximos de grupos retiradores de elétrons. O CH₂ (**E**) da cadeia lateral da fenilalanina aparece como dois multipletos, cada um com integração igual a 1, devido à diastereotopicidade de seus hidrogênios. Os hidrogênios do CH₂ (**M**) ligado a nitrila também se apresentam como dois multipletos devido a sua diastereotopicidade. Entretanto, em geral, este sinal aparece condensado ao sinal correspondente ao CH (**F**) do aminoácido, adjacente à um átomo de nitrogênio e uma carbonila. Por fim, é possível observar o sinal do NH (**G**) do aminoácido como um simpleto alargado de baixa intensidade.

FIGURA 7.3 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do Neq0996.

FONTE: Autoria própria.

FIGURA 7.4 – Ampliação da região dos aromáticos do espectro de RMN ^1H do Neq0996.

FONTE: Autoria própria.

O terceiro e último intervalo (FIGURA 7.4), 6 a 8 ppm, contém os sinais dos hidrogênios aromáticos, que em geral aparecem com multipletos. Vale ressaltar que para os compostos -*para* substituídos (como o Neq0996) são observados dois sinais que correspondem aos hidrogênios **B** e **C** do anel aromático. Porém, no caso do Neq0544 (-*meta* substituído), são apresentados sinais condensados nesta região, os quais correspondem aos quatro diferentes hidrogênios presentes no anel. O Neq0400 (não substituído), por sua vez, apresenta três sinais de hidrogênio que correspondem aos três tipos diferentes de hidrogênios aromáticos da molécula. Além destes sinais, para o Neq0544 e seus derivados, também é observado o sinal do NH (**L**) da amida próxima a nitrila, por vezes esse sinal aparece entre os aromáticos, mas também é encontrado após os mesmos.

3.2.2 Ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C)

Os deslocamentos químicos apresentados a seguir são referentes ao Neq0996, entretanto, para os demais compostos os sinais encontram-se próximos aos apontados. Os espectros de RMN ^{13}C para estes compostos (FIGURA 7.5) podem ser divididos, didaticamente, em dois intervalos.

No primeiro, 0 a 90 ppm, são observados os sinais dos carbonos sp^3 da molécula: CH_3 (**J**) do grupo Boc (27.35 ppm), CH_2 (**M**) próximo a nitrila (28.21 ppm), CH_2 (**E**) da cadeia lateral da fenilalanina (37.13 ppm), CH (**F**) do aminoácido que está adjacente à um átomo de nitrogênio e uma carbonila (55.46 ppm) e o carbono quaternário (**I**) do grupo Boc (81.16 ppm).

No segundo, 110 a 180 ppm, é observado o carbono com hibridização sp da nitrila (115.39 ppm) e os carbonos sp^2 presentes na molécula: CH (**B**) próximo ao X-C halogênio no anel aromático (129.00 ppm), CH (**C**) a três ligações do halogênio (130.60 ppm), X-C (**A**) (133.18 ppm), C (**D**) (134.48 ppm), carbonila (**H**) do grupo Boc (155.61 ppm) e carboxila (**K**) da amida (171.43 ppm). Os compostos com substituição em -*para* na fenilalanina apresentam mesmo número de sinais de carbonos aromáticos que o Neq0996, no entanto, para o Neq0544 (substituído em -*meta*) são observados seis sinais e para o Neq0400 (não substituído) são observados quatro.

FIGURA 7.5 – Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) do Neq0996.

FONTE: Autoria própria.

3.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Em todos os espectros de FT-IR (FIGURA 7.6) foi possível notar os seguintes estiramentos: NH de amida ($3320 - 3070\text{ cm}^{-1}$), CH_2 e CH_3 ($2960 - 2850\text{ cm}^{-1}$), $\text{C}=\text{O}$ de amida ($1700 - 1630\text{ cm}^{-1}$), NH de amina secundária ($1580 - 1495\text{ cm}^{-1}$) e anel aromático *-para* substituído ($860 - 800\text{ cm}^{-1}$). A banda referente a nitrila ($2260 - 2200\text{ cm}^{-1}$), no entanto, não pode ser observada em todos os espectros.

FIGURA 7.6 – Espectro de FT-IR do Neq0996.

FONTE: Autoria própria.

3.3 Compostos Sintetizados

Tert-butyl N-[(1S)-1-[(cyanomethyl)carbamoyl]-2-phenylethyl]carbamate (Neq0400.1): Para obtenção do Neq0400.1 foi seguido o Método A, sendo obtido através da recristalização de acetato de etila como um sólido branco (0,1225 g; 78%). PF 137 - 139 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.67 – 8.65 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H); 7.28 - 7.26 (m, 2H); 7.23 - 7.17 (m, 2H); 7.08 – 7.06 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); 4.13 – 4.12 (m, 4H); 2.97 - 2.93 (m, 1H); 2.77 - 2.72 (m, 1H); 1.29 (s, 9H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 172.37; 155.25; 137.87; 129.14; 128.05; 126.25; 117.49; 78.13; 55.56; 37.14; 28.11; 27.11. Determinação da pureza (HPLC): *t_R* = 21.355 min, 204 nm, pureza > 99%.

Tert-butyl N-[(1S)-2-(3-chlorophenyl)-1-[(cyanomethyl)carbamoyl]ethyl]carbamate

(Neq0544.1): Para obtenção do Neq0544.1 foi seguido o Método A, sendo obtido através da recristalização de acetato de etila como um sólido branco (22,58 mg; 33%). PF 157 - 158 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.26 (s, 1H); 7.25 - 7.23 (m, 2H); 7.19 - 7.18 (m, 1H); 7.10 - 7.05 (m, 1H); 5.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H); 4.38 - 4.33 (dd, *J* = 14.7, 7.4 Hz, 1H); 4.13 - 4.10 (m, 2H); 3.13 - 3.08 (m, 1H); 3.02 - 2.96 (m, 1H); 1.41 (s, 11.20 H, condensado a pico residual). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 171.43; 155.78; 138.16; 134.52; 130.09; 129.31; 127.44; 127.42; 115.45; 81.15; 55.42; 37.48; 28.20; 27.35. Determinação da pureza (HPLC): *t_R* = 23.228 min, 208 nm, 99% de pureza.

Tert-butyl N-[(1S)-2-(4-chlorophenyl)-1-[(cyanomethyl)carbamoyl]ethyl]carbamate

(Neq0996): Para obtenção do Neq0996 foi seguido o Método A, sendo obtido através da recristalização de acetato de etila como um sólido branco (0,1590 g; 90%). PF 144,0 - 146,0 °C. [α]_D²⁵: -8,0 graus. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32 - 7.29 (m, 2H); 7.15 - 7.13 (m, 2H); 6.74 (s, 1H); 4.97 (s, 1H); 4.36 - 4.32 (dd, 1H); 4.17 - 4.06 (qd, 2H); 3.12 - 3.08 (dd, 1H); 3.06 - 3.01 (dd, 1H); 1.45 (s, 10H, condensado a pico residual de solvente). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 171.43; 155.61; 134.48; 133.18; 130.60; 129.00; 115.39; 81.16; 55.46; 37.13; 28.21; 27.35. FT-IR (cm⁻¹) 3325, 2988, 2932, 2362, 1664, 1516 e 817. HRMS: calculado [C₁₆H₂₀ClN₃O₃] 337,12; presente (ESI (+)) 338,34052 [M+H]. Determinação da pureza (HPLC): *t_R* = 22.967 min, 215 nm, 96% de pureza.

Tert-butyl N-[(1S)-2-(4-bromophenyl)-1-[(cyanomethyl)carbamoyl]ethyl]carbamate

(*Neq1024*): Para obtenção do *Neq1024* foi seguido o Método A, sendo obtido através de recristalização de acetato de etila como um sólido branco (0,0826 g; 42%). PF 139,5 – 141,5 °C. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.47 - 7.44 (m, 2H); 7.10 – 7.07 (m, 2H); 6.70 (s, 1H); 4.94 (s, 1H); 4.37 - 4.32 (dd, $J = 14.5, 7.3$ Hz, 1H); 4.18 – 4.07 (m, 2H); 3.11 – 3.07 (m, 1H); 3.04 – 3.00 (m, 1H); 1.42 (s, 10H, condensado a pico residual de solvente). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6) δ 171.89; 155.05; 136.90; 131.11; 130.66; 119.46; 116.87; 78.18; 55.09; 36.68; 27.82; 26.94. FT-IR (cm^{-1}) 3323, 2983, 2930, 1665, 1522 e 811. MS: calculado [$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{O}_3$] 381,07; presente (ESI (+)) 406,10 [$\text{M}+\text{Na}$] e (ESI (-)) 380,04 [$\text{M}-\text{H}$]. Determinação da pureza (HPLC): $t_R = 24.2$ min, 215 nm, >99% de pureza.

Tert-butyl N-[(1S)-1-[(cyanomethyl)carbamoyl]-2-(4-iodophenyl)ethyl]carbamate (*Neq1025*):

Para obtenção do *Neq1025* foi seguido o Método A, sendo obtido através da recristalização de acetato de etila como um sólido branco (0,1065 g; 48%). PF 146,3 – 149,6 °C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.66 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H); 7.63 - 7.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H); 7.09 – 7.05 (t, $J = 9.1$ Hz, 3H); 4.13 - 4.12 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H); 3.34 – 3.33 (m, 1H); 2.92 – 2.89 (m, 1H); 2.72 – 2.67 (m, 1H); 1.29 (s, 9H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.19; 155.28; 137.76; 136.80; 131.68; 117.52; 92.22; 78.21; 55.38; 36.63; 28.11; 27.13. FT-IR (cm^{-1}) 3323, 2984, 2930, 1666, 1521 e 801. MS: calculado [$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{IN}_3\text{O}_3$] 429,05; presente (ESI (+)) 452,15 [$\text{M}+\text{Na}$]. Determinação da pureza (HPLC): $t_R = 25.1$ min, 215 nm, 96% de pureza.

Tert-butyl N-[(1S)-1-[(cyanomethyl)carbamoyl]-2-(4-fluorophenyl)ethyl]carbamate

(*Neq1032*): Para obtenção do *Neq1032* foi seguido o Método A, sendo obtido através da recristalização de acetato de etila como um sólido branco (0,0846 g; 53%). PF 137,7 – 139,2 °C. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.65 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H); 7.29 - 7.26 (m, 2H); 7.10 – 7.07 (m, 3H); 4.14 - 4.10 (m, 3H); 2.96 – 2.92 (m, 1H); 2.75 – 2.70 (m, 1H); 1.29 (s, 9H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.25; 161.95 e 160.03 ($J = 241.6$ Hz); 155.28; 134.02 e 134.00 ($J = 2.9$ Hz); 131.04 e 130.97 ($J = 8.0$ Hz); 117.49; 114.83 e 114.66 ($J = 21.0$ Hz); 78.17; 55.61; 36.34; 28.10; 27.11. FT-IR (cm^{-1}) 3325, 2973, 2936, 1665, 1508 e 828. HRMS: calculado [$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{IN}_3\text{O}_3$] 321,15; presente (ESI (+)) 344,20 [$\text{M}+\text{Na}$] e (ESI (-)) 320,13 [$\text{M}-\text{H}$]. Determinação da pureza (HPLC): $t_R = 22.1$ min, 215 nm, <99% de pureza.

CAPÍTULO VIII

Conclusões e Perspectivas

1 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho possibilitou a obtenção do **Neq0544** e cinco de seus derivados, assim como sete derivados do **Neq0820**. A atividade dos compostos foi medida por ensaios fluorimétricos em enzimas do parasito *T. cruzi* (Cruzaína) e catepsinas humanas (*hCatB*, *hCatL* e *hCatS*).

1.1 Neq0820 e seus derivados

Os compostos aqui apresentados possuem diferentes substituintes nas posições *para* e *meta* da fenila presente em P3 do **Neq0820**. A rota sintética empregada mostrou-se eficiente sendo obtidos compostos com alta pureza enantiomérica.

As moléculas apresentaram alta capacidade de inibição da enzima cruzaína. Os compostos *para* e *meta* substituídos (em geral) não apresentaram diferença significativa nos valores de pK_i , indicando que a posição do substituinte não é relevante para a interação com o subsítio S3. O **Neq1075** (3,4-dimetóxfenil como substituinte) apresentou maior capacidade de inibição ($pK_i = 9.7$). O Br e a pirimidina apresentaram uma relação bioisostérica.

Todos os compostos mostraram-se inativos ($pK_i = <4.0$) ou apresentaram valores baixos de inibição para a *hCatB*. Entretanto, altos valores de inibição puderam ser obtidos para as catepsinas L e S. Ambas apresentaram maior afinidade pelos compostos *meta* substituídos.

Os compostos contendo Br nas posições *para* e *meta* (**Neq1083** e **Neq1038**, respectivamente) apresentaram maiores valores de pK_i contra a *hCatL* (pK_i acima de 9.0). Quanto a *hCatS*, o **Neq1039** (fenila como substituinte) e **Neq1083** apresentaram maior afinidade pela enzima ($pK_i = 8.7$).

Foi possível observar que todos os inibidores apresentaram uma tendencia de seletividade para a cruzaína frente as catepsinas L, S e B. Tendo os compostos *para* substituídos apresentado maior seletividade que os contendo o substituinte na posição *meta*. O **Neq0659** ($pK_i = 9.2$), **Neq1056** ($pK_i = 7.6$), **Neq1075** ($pK_i = 9.7$) e **Neq1079** ($pK_i = 8.2$) apresentaram seletividade (ΔpK_i superior a +1.0) frente a *hCatL* e *hCatS*, sendo inibidores da cruzaína promissores na busca de tripanossomiscidas.

A inibição das catepsinas humanas também possui interesse farmacêutico. Por isso, a seletividade de uma catepsina frente a outra também foi investigada. O **Neq0659** ($pK_i = 7.3$) e o **Neq1040** ($pK_i = 7.9$) mostraram-se inibidores seletivos da *hCatS* frente as catepsinas L e B. Enquanto o **Neq1083** ($pK_i = 9.1$) se apresentou como um potente e seletivo inibidor da *hCatL*.

As propriedades de ADME foram estimadas por métodos *in silico* para os inibidores estudados. Os compostos apresentam boa similaridade com fármacos comerciais e obedecem a RO5, mostrando-se candidatos promissores a fármacos administrados por via oral. Entretanto, para aumentar a chance da administração ocorrer por esta via, trabalhos futuros podem ser executados realizando modificações estruturais para diminuir a flexibilidade e a lipofilia das moléculas, tornando-as mais rígidas e solúveis em meio aquoso.

1.2 Neq0544 e seus derivados

As modificações implantadas nos derivados do **Neq0544** foram realizadas em P2 com a inclusão de diferentes halogênios na posição *para* da benzila. A rota sintética utilizando HATU como reagente de acoplamento se mostrou eficiente, proporcionando bons rendimentos e fácil purificação.

Dentre os compostos sintetizados, o **Neq1032** (composto contendo F na posição *para* da benzila em P2) apresentou maior valor de pK_i contra a Cz ($pK_i = 6.3$). Também foi possível notar uma tendência de aumento do valor de pK_i em função da diminuição da massa do halogênio e uma indicação de que a interação com o subsítio S2 é mais favorável com o halogênio ocupando a posição *para* do anel.

O **Neq0544** e seus derivados se mostraram inativos contra a *hCatB* ($pK_i = <4.0$), mas capazes de inibir as demais catepsinas humanas. O **Neq0544** (Cl ocupando a posição *meta*) foi a molécula com maior capacidade de inibição frente a *hCatL* ($pK_i = 7.9$), indicando que a posição mais favorável a ocupação do halogênio é a *meta*. O **Neq0996** (Cl ocupando a posição *para*) apresentou os melhores resultados frente a *hCatS* ($pK_i = 7.3$), mostrando a preferência do subsítio pelo substituinte na posição *para*.

Nenhum dos compostos apresentou seletividade para a cruzaina frente as catepsinas L e S. Ao contrário, foi possível notar que essas CPs de mamíferos possuem maior afinidade pelos inibidores que a CP do *T. cruzi*. Quanto a seletividade para uma catepsina frente a outra, os compostos não foram capazes de inibir seletivamente.

Para um incremento de potência e seletividade é possível modular a ação das moléculas explorando melhor o subsítio S3, utilizando como composto protótipo o **Neq1032** (Cruzaína), **Neq0544** (*hCatL*) e **Neq0996** (*hCatS*).

O **Neq0544**, **Neq400** e **Neq0996** tiveram seu perfil termodinâmico determinado através da ITC. O perfil termodinâmico entalpicamente dirigido foi apresentado para esses inibidores e, diferente do encontrado em um trabalho anterior, $-T\Delta S$ positivo. O **Neq0996** foi o composto

a apresentar melhores resultados, demonstrando uma diminuição (em relação ao **Neq0544**) na ΔG (**-0,16 kcal mol⁻¹**) e na ΔS (**+3,50 kcal mol⁻¹**), apresentando um pequeno aumento na ΔH (**-3,71 kcal mol⁻¹**), como presumido devido à compensação entalpia-entropia.

ANEXO A

Espectros dos derivados do Neq0820

A.1 Neq1056

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3).

Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3).

Espectro de FT-IR.

A.2 Neq1075

Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃).

Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3).

Espectro de FT-IR.

¹H NMR spectrum of compound 10a in CDCl₃. The x-axis represents the chemical shift in ppm (f1), ranging from 9.5 to 0.0. The spectrum shows several peaks, with integration values indicated below the baseline. A list of chemical shifts (δ) is provided above the spectrum.

Chemical shifts (ppm): 8.88, 8.87, 8.79, 8.77, 8.59, 8.57, 8.07, 8.06, 8.05, 8.05, 8.05, 8.04, 7.72, 7.70, 7.69, 7.48, 7.48, 7.47, 7.46, 7.35, 7.34, 7.30, 7.29, 7.26, 7.25, 4.86, 4.83, 4.82, 3.91, 3.89, 3.88, 3.88, 3.67, 3.65, 3.33, 3.31, 3.30, 3.29, 3.28, 3.27, 3.07, 3.06, 3.04, 3.03, 2.91, 2.89, 2.86, 2.70, 2.69, 2.68, 1.72, 1.71, 1.70, 1.68, 1.67, 1.67, 1.44, 1.40, 1.39, 1.38, 1.37, 1.37, 1.28, 1.26, 1.25, 1.25, 1.24, 0.87, 0.86.

Integration values: 1.00, 1.02, 0.93, 1.07, 2.17, 2.22, 2.01, 2.64, 1.13, 1.19, 0.95, 1.13, 1.11, 1.01, 1.18, 1.10, 1.38, 6.52.

¹³C NMR spectrum of compound 10b in CDCl₃. The x-axis is labeled 'f1 (ppm)' and ranges from 0 to 180. The spectrum shows several peaks with chemical shift values labeled above them: 174.29, 149.14, 148.12, 137.89, 136.97, 135.97, 135.11, 134.61, 129.82, 129.56, 128.79, 127.34, 125.86, 62.13, 59.90, 43.66, 42.29, 37.78, 24.61, 23.13, and 22.37. A large solvent peak is visible at 77.0 ppm.

Espectro de FT-IR.

A.4 Neq1083

Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆).

Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6)

Espectro de FT-IR

A.5 Neq1139

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3).

Espectro de FT-IR

A.4 Neq1140

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3).

Espectro de FT-IR

A.4 Neq1140

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3).

Espectro de FT-IR

ANEXO B

Espectro dos derivados do Neq0544

*B.1 Neq0400*Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3). Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3).

B.2 Neq0544

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3).

Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3).

B.3 Neq0996

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3).

Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3).

Espectro de FT-IR

B.4 Neq1024

Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃).

Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6).

Espectro FT-IR.

B.5 Neq1025

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6).

Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6).

Espectro de FT-IR.

B.6 Neq1032

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3).

Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6).

Espectro de FT-IR.

ANEXO C

**Gráficos das análises de Calorimetria de Titulação
Isotérmica (ITC) dos derivados do Neq0544**

C.1 Neq0544

C.2 Neq0400

C.3 Neq0996