LEANDRO ANTONIO ALVES AVELAR

**Síntese de Inibidores das Enzimas Cruzaína e Diidroorotato desidrogenase
de *Trypanosoma cruzi***

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

São Carlos
2014

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família e amigos, pois
são a razão e o incentivo para continuar lutando.*

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio e auxílio.

Ao meu orientador Professor Dr. Carlos Alberto Montanari, pela orientação e por me proporcionar a oportunidade de trabalhar no grupo, que resultou em grande crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Geraldo Sartori, Igor Prokopczyk, Helton Wiggers, Juliana Cheleski, Adriane Pauluk, Fabiana Rosini, Erika Meñaca, Cristian Reyes, Daniel Gedder e ao professor Dr. Andrei Leitão pelos ensinamentos, discussões e broncas.

Aos meus amigos de laboratório Josmar Rocha e Jean Ribeiro pela realização dos ensaios de determinação de constante de inibição.

Aos meus amigos de Passos-MG, Guilherme Sousa, Cícero Abreu, João Paulo Bernardes, Bernardo Abreu, Lucas e Vinícius Araújo e Everson Cardozo pelos momentos de descontração e discussões filosóficas.

Aos integrantes do Laboratório de Síntese Orgânica Prof. Warner Bruce Kover do IQSC e o Prof. Dr. Antonio Burtoloso, por me acolherem e por me auxiliarem em grande parte dos experimentos.

Ao professor Pedro Berci Filho por disponibilizar seu laboratório para a execução de alguns experimentos.

Aos integrantes do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais e Fármacos da UNICAMP pelo auxílio em alguns dos experimentos realizados.

Ao pesquisador Dr. Peter Kenny pelos ensinamentos, amizade e por passar ao menos um pouco de sua experiência.

Aos funcionários do IQSC, pelos serviços prestados direta ou indiretamente, sempre com zelo e educação.

As agências de fomento pelo financiamento dos projetos do NEQUIMED e pela bolsa Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

EPÍGRAFE

“Não me entristeço em não saber, alegro-me em poder aprender.”

Leandro Avelar

RESUMO

A doença de Chagas, que é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, ocasiona grandes danos à saúde da população latino-americana e vem-se distribuindo para regiões não-endêmicas como os Estados Unidos, Europa e Japão. O tratamento é realizado pela administração de dois medicamentos (Nifurtimox e Benzonidazol) que apresentam sérios efeitos colaterais e baixa eficácia. A busca por novos compostos químicos bioativos com ação farmacológica sobre alvos bioquímicos constitui uma estratégia em desenvolvimento em nosso grupo de pesquisa. Neste trabalho, a principal cisteína protease – a cruzaina, e a enzima central na biossíntese de pirimidinas – a DHODH, ambas de *T. cruzi*, foram escolhidas como alvos para a identificação de novos inibidores com ação potencial contra o *T. cruzi*. A síntese de inibidores dessas duas enzimas foi realizada e os ensaios bioquímicos foram usados para identificar novos inibidores em concentrações micro- e nanomolar. Alguns desses inibidores enzimáticos foram ensaiados contra o *T. cruzi* em sua forma infectiva tripomastigota e foram ativos em concentrações micromolar.

A enzima cruzaina (3.4.22.51) possui similaridade baixa na sequência de aminoácidos (18%) com a Catepsina-L (Cat-L, EC 3.4.22.15), mas suficiente para estabelecer a hipótese de que inibidores de Cat-L também poderiam inibir a cruzaina. Assim, com base no conhecimento prévio de vários inibidores da Cat-L, o dipeptídeo-nitrila Neq409 foi inicialmente sintetizado por outro membro do grupo para validar a hipótese de que nitrilas dipeptídicas poderiam inibir a cruzaina. O composto Neq409 inibiu a cruzaina com o valor de pIC_{50} igual a 5,7 que o qualificou não apenas como inibidor da cruzaina mas também como possível composto matriz para modificação molecular e estudos de relações estrutura-atividade (SAR). Cinco compostos foram então sintetizados através de uma rota de quatro etapas (proteção/desproteção de ácidos carboxílicos e duas formações de amida) e avaliados através de métodos fluorimétricos quanto às suas capacidades de inibir cruzaina. As modificações moleculares resultaram em aumento da potência de até 13 vezes em relação ao composto protótipo Neq409. A substituição do grupo benzoila, presente em P3 no Neq409, pelo grupo 3-carboxi-5-terc-butil-2-metilpirazol (Neq414) e 5-bromopiridina (Neq419) resultou nos valores de pIC_{50} de 6,5 e 6,1, respectivamente. A substituição do átomo de hidrogênio por cloro na posição *meta* da fenila em P2 no composto Neq414 deu origem ao composto Neq415 com pIC_{50} de 6,8. Outras duas modificações envolveram a inserção do grupo ciclopropila na região P1 do composto Neq0414 gerando o Neq533 (pIC_{50} = 6,8) e do composto Neq533 resultando no composto Neq543 (pIC_{50} = 6,2). Os resultados mostraram que o grupo 3-carboxi-5-terc-butil-2-metilpirazol apresenta interações mais eficientes no sub-sítio S3 da cruzaina que o grupo 5-bromopiridina e que um átomo de cloro em P2 e um grupo ciclopropila em P1 possuem contribuições semelhantes para o aumento da potência de inibição da enzima.

A busca de inibidores da enzima TcDHODH pelo grupo NEQUIMED levou à identificação de dois novos inibidores nanomolares, o Neq71 (pK_i = 6,5) e o Neq130 (pK_i = 6,4), ambos derivados de 5-arilpropilidenobarbitúricos. Com base nesses resultados, foi realizada a síntese do Neq71, Neq130 e de um novo inibidor – o Neq0393, biosótero do composto Neq130, utilizando a condensação de Knoevenagel em meio aquoso sem catalisador, por adaptação de método já descrito anteriormente na literatura. Para avaliar a importância insaturação exocíclica ao anel barbitúrico desses derivados, o Neq71, Neq130 e o Neq393 foram submetidos à redução específica dessa insaturação utilizando-se $NaBH_4$ que resultou nos compostos Neq395, Neq298 e Neq394, respectivamente. Os compostos Neq542, Neq421 e Neq420 derivados 5-metilidenobarbitúricos também foram sintetizados através do mesmo procedimento utilizado para obtenção de Neq71, Neq130 e Neq393, para avaliar a importância do comprimento da cadeia dos derivados 5-

arilpropilidenobarbitúricos. A análise das constantes de inibição dos compostos obtidos mostrou que a redução da instauração resulta de até 280 vezes de potência, enquanto o encurtamento da cadeia lateral levou a diminuição de menor escala da potência (25 vezes), indicando a importância da instauração exocíclica para a afinidade dos compostos com a enzima. A característica eletrofílica desta instauração levou identificação de um novo esqueleto para futuros inibidores, o Neq411.

ABSTRACT

Chagas disease, which is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, causes severe damage to the health of the population in Latin American countries and comes up distributing to non-endemic regions such as the United States, Europe and Japan. The treatment is accomplished by administering two drugs (Benznidazole and Nifurtimox) that have serious side effects and low efficacy. The search for new bioactive chemical compounds with pharmacological action on biochemical targets is a strategy under development in our research group. In this study, the major cysteine protease - cruzain, and the central enzyme in the biosynthesis of pyrimidines – DHODH, both from *T. cruzi*, were chosen as targets for the identification of new inhibitors with potential activity against *T. cruzi*. The synthesis of inhibitors of these two enzymes was performed and biochemical assays were used to identify new inhibitors at micro- and nanomolar concentrations. Some of these enzyme inhibitors were tested against *T. cruzi* infective trypomastigote form and were active at micromolar concentrations.

The cruzain enzyme (EC 3.4.22.51) has low similarity in amino acid sequence (18 %) towards Cathepsin L (Cat-L, EC 3.4.22.15), but sufficient to establish the hypothesis that Cat-L inhibitors could also inhibit cruzain. Thus, based on prior knowledge of various Cat-L inhibitors, a dipeptide nitrile - Neq409 was initially synthesized by another group member in order to validate the hypothesis that dipeptide nitriles could really inhibit cruzain. The compound Neq409 inhibited cruzain with a $pI_{C_{50}}$ value of 5.7, which qualified it not only as an inhibitor of cruzain but also as a possible lead compound for molecular modification and structure-activity relationships (SAR) studies. Five compounds were then designed and synthesized through a route of four steps (protection/deprotection of carboxylic acids and two formations of amides) and evaluated using fluorimetric methods to evaluate their ability to inhibit cruzain. The molecular changes for most potent compound resulted in 13-fold potency increase as compared to the prototype compound Neq409. The replacement of the P3 benzoyl group present in the Neq409 by 3-carboxy-5-tert-butyl-2-methylpyrazole (Neq0414) and 5-bromopyridine (Neq0419) resulted in the $pI_{C_{50}}$ values of 6.5 and 6.1, respectively. The replacement of the hydrogen atom by chlorine in the *meta* position of the phenyl at P2 in the compound neq0414 yielded compound Neq415 with a $pI_{C_{50}}$ of 6.8. Two other modifications involved the insertion of the cyclopropyl group in the P1 region of Neq0414 generating compound Neq0533 ($pI_{C_{50}}$ = 6.8) and compounds Neq0533 resulting in compound neq0543 with a $pI_{C_{50}}$ of 6.2. The results showed that the 3-carboxy-5-tert-butyl-2-methylpyrazole provides more efficient interactions in the cruzain S3 sub-site than 5-bromopyridine group and a chlorine atom at P2 and a cyclopropyl group at P1.

The search for inhibitors of the enzyme TcDHODH led to the identification of two new nanomolar inhibitors, the Neq0071 (pK_i = 6.5) and Neq0130 (pK_i = 6.4), both derived from 5-aryl-propiliden-barbituric acid. The Neq393, a bioisostere compound of Neq0130, was synthesized using the Knoevenagel condensation in aqueous media without catalyst, by adaptation of the method previously described in the literature. Based on these results, the synthesis of Neq71, Neq130 and a new inhibitor was performed. To assess the importance of exocyclic barbiturate ring unsaturation, Neq71, Neq130 and Neq393 underwent specific reduction of such unsaturation using $NABH_4$ that resulted in compounds Neq395, Neq298 and Neq0394, respectively. Neq542, Neq421 and Neq420 derived compounds of 5-metilidenobarbiturate were also synthesized by the same procedure used to obtain Neq71 and Neq393 to evaluate the importance of the length of the 5-arylpropilidenobarbiturate derivatives. The inhibition constant of these compounds showed that the lack of the exocyclic double bond decreased the potency 200 times and the shrinkage of the side chain to a

decrease of 25 times, showing the importance of the exocyclic bond for the inhibitors affinity for the enzyme. The electrophilicity of this bond lead to an identification of a new scaffold for novel inhibitors, the Neq411.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Ilustração do processo de desenvolvimento de um fármaco, demonstrando as fases pré-clínicas e clínicas	22
Figura 1.2: Ciclo de vida do T. cruzi.....	26
Figura 1.3: Estrutura do Nifurtimox e do Benzonidazol.....	28
Figura 1.4: Alvos terapêuticos de fármacos disponíveis atualmente no mercado. ...	31
Figura 1.5: Distribuição no espaço químico de moléculas obtidas através de a)TOS, b)Química Medicinal e c) DOS.....	33
Figura 3.1: a) Estrutura enzimática da Cruzaína (código PDB 2AIM) b) Representação dos subsítios enzimáticos de cisteína proteases.....	41
Figura 3.2: Estrutura e valor do IC50 do composto K11777	44
Figura 3.3: Estrutura cristalográfica da nitrila dipeptídica mais ativa complexada com a Catepsina-L.....	46
Figura 3.4: Estrutura das nitrilas dipeptídicas propostas neste trabalho.....	48
Figura 3.5: a) Determinação da porcentagem de inibição b) Modelo de curva de dose resposta para um inibidor enzimático.....	51
Figura 3.6: a) Esquema geral do ensaio fluorimétrico b) Substrato fluorogênico para Cruzaína Z-Phe-Arg-MCA.....	52
Figura 3.7: Espectro de RMN dos ésteres 9 e 10.	54
Figura 3.8: Espectro de Massas de 9 e 10.	56
Figura 3.9: Espectros de RMN ¹ H dos compostos 11 e 13.....	59
Figura 3.10: fragmentação dos compostos 11 e 13.....	60
Figura 3.11: Espectro de RMN ¹ H e massas do composto 12.....	62
Figura 3.12: Estrutura do agente de acoplamento HATU.	64
Figura 3.13: Interação de hidrogênio de HOAt com aminas.	66

Figura 3.14: Espectros de RMN ¹ H dos compostos Neq0414 (2), Neq0419 (3) e Neq015 (4).	68
Figura 3.15 Espectro de massas dos compostos Neq0414 (2), Neq0419 (3) e Neq0415 (4)	70
Figura 3.16: Espectros e RMN ¹ H dos compostos Neq533 (5) e Neq543 (6)	72
Figura 3.17: Espectros de massas dos compostos Neq0533 (5) e Neq0543 (6)	74
Figura 3.18: Espectros de infravermelho de Neq533 (5) e Neq543 (6)	75
Figura 3.19 Determinação de Km do substrato ZFMCA para Cruzaína	77
Figura 4.1 a) Estrutura da TcDHODH b) Interações entre os aminoácidos do sítio ativo da TcDHODH e seu substrato DHO	96
Figura 4.2 Regiões do sítio ativo da enzima TcDHODH	99
Figura 4.3 Estrutura do composto Neq71 e Neq130	100
Figura 4.4 Estrutura dos compostos propostos como inibidores da TcDHODH	101
Figura 4.5 Espectros de RMN ¹ H dos compostos Neq71, Neq130 e Neq393	105
Figura 4.6 Espectros de massas dos compostos Neq71, Neq130 e Neq0393.	107
Figura 4.7 Espectros de RMN ¹ H das moléculas Neq0542, Neq421 e Neq0420.	108
Figura 4.8 Espectros de massas de Neq542, Neq421 e Neq420.	110
Figura 4.9 Espectros de RMN dos compostos Neq395, Neq298 e Neq394	113

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 3.1: Mecanismo de catálise da Cruzaína	42
Esquema 3.2 a) Formação de tiohemiacetal e tiohemicetal b) Formação do imidato pela reação de Pinner	46
Esquema 3.3: Proposta por <i>Bethel et. al.</i> para obtenção de nitrilas dipeptídicas.	49
Esquema 3.4: Rota proposta para obtenção das nitrilas dipeptídicas.	50
Esquema 3.5: Reação de esterificação dos aminoácidos.....	53
Esquema 3.6: Mecanismo de formação do cloreto de ácido.	53
Esquema 3.7: Reações de acoplamento via cloreto de ácido.	57
Esquema 3.8: Reação de hidrólise do éster.	63
Esquema 3.9: Reações de acoplamento via agente de acoplamento.	63
Esquema 3.10 Reação de racemização de aminoácidos via oxazolona	64
Esquema 3.11: a) Obtenção do HATU b) Formas urônio e Guanidínio	65
Esquema 3.12: a) Mecanismo de reação de acoplamento utilizando (HATU) b) Formação da guanidina.	66
Esquema 4.1: Síntese de novo de pirimidina.....	95
Esquema 4.2: Mecanismo proposto para a reação catalisada pela enzima TcDHODH.....	97
Esquema 4.3: Mecanismo da condensação de Knoevenagel.	102
Esquema 4.4: Obtenção de derivados 5-arilideno-barbitúricos.	102
Esquema 4.5: Redução seletiva da insaturação exocíclica.	103
Esquema 4.6: Reação de condensação de Knoevenagel.	103
Esquema 4.7: Mecanismo de condensação do ácido barbitúrico com aldeídos.	104
Esquema 4.8: Reação de redução da insaturação exocíclica.	112

Esquema 4.9: Mecanismo da redução via borohidreto de sódio.....	112
Esquema 4.10: Síntese do Neq411	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Rendimentos das reações de acoplamento via cloreto de ácido e via agente de acoplamento.	58
Tabela 3.2: Rendimentos das reações via agente de acoplamento.	67
Tabela 3.3: Valores de deslocamento químico para os grupos referentes a acetoaminonitrila.....	70
Tabela 3.4: Valores de deslocamento químico para os grupos referentes a 2-ciclopropil-acetoaminonitrila.....	73
Tabela 3.5: Rendimentos globais dos inibidores	76
Tabela 3.6: Curvas de IC ₅₀ dos compostos sintetizados	77
Tabela 4.1: Rendimentos das reações de obtenção dos derivados barbitúricos	111
Tabela 4.2: Curvas de Ki dos compostos sintetizados.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAN	Aminoacetonitrila
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
Asn	Asparagina
ATCase	Aspartato transcarbamilase
ATP	Trifosfato de adenosina
CC	Cromatografia de Coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
CFAase	Carbamoil-fosfato sintetase
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
Cys	Cisteína
DCM	Diclorometano
DDT	DL-Ditiotreitol
DHODH	Diidroorotato desidrogenase
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOS	Síntese orientada pela diversidade
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EWG	Grupo retirador de elétrons
FMN	Flavina mononucleotídeo
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
HATU	2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato
His	Histidina
HOAt	7-aza-benzotriazol
HTS	Ensaio em larga escala
IC ₅₀	Concentração necessária para inibição de 50% da atividade
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada
k_{cat}	Constante catalítica
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LBDD	Planejamento de fármacos baseado no ligante

Leu	Leucina
Lys	Lisina
MCA	7-amino-4-metilcumarina
Met	Metionina
Neq	Código do banco de dados do grupo Nequimed
NTDs	Doenças tropicais negligenciadas
OFT	Orotato-fosforibosiltransferase
OMP	Orotidina monofosfato
OMS	Organização mundial de saúde
Phe	Fenilalanina
PRPP	Fosforibosil fosfato
RMN ¹³ C	Ressonância magnética de hidrogênio
RMN ¹ H	Ressonância magnética de carbono
SBDD	Planejamento de fármacos baseado na estrutura
Ser	Serina
TcDHODH	Diidroorotato desidrogenase de Trypanosoma cruzi
THF	Tetrahidrofurano
TOS	Síntese orientada pelo alvo
ZFRMCA	N-benzóxicarbonil-L-fenilalanila-L-arginina-7-amido-metil-cumarina

SUMÁRIO

Capítulo 1	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Química Medicinal.....	19
1.1.1 O planejamento e o desenvolvimento de fármacos.....	19
1.2 Doença de Chagas	23
1.2.1 Fisiopatologia e Transmissão da doença de Chagas.....	25
1.2.2 Tratamento da doença de Chagas	28
1.3 Avaliação da capacidade inibitória de moléculas bioativas.....	31
1.4 A síntese orgânica na obtenção de moléculas bioativas	32
1.5 Referências	34
Capítulo 2	37
2 Objetivos.....	38
2.1 Objetivos específicos.....	38
Capítulo 3	39
3 Síntese e Identificação de inibidores da enzima Cruzaína.....	40
3.1 Cruzaína	40
3.1.1 Inibidores	43
3.2 Planejamento de inibidores da Cruzaína.....	45
3.3 Síntese das nitrilas dipeptídicas	48
3.4 Determinação da atividade inibitória da Cruzaína	50
3.5 Resultados e discussões	52
3.5.1 Síntese e caracterização dos compostos propostos	52
3.5.2 Determinação da atividade inibitória e a relação com as estruturas dos inibidores	76
3.6 Conclusões.....	80
3.7 Parte experimental	80
3.7.1 Materiais	80
3.7.2 Métodos	81
3.8 Referências	89
Capítulo 4	93

4	Síntese de inibidores da Diidroorotato desidrogenase de Trypanosoma cruzi (TcDHODH)	94
4.1	TcDHODH.....	94
4.1.1	Inibidores.....	97
4.2	Planejamento de inibidores para TcDHODH.....	98
4.3	Síntese dos derivados 5-arilideno-barbitúricos.....	101
4.4	Resultados e discussão.....	103
4.4.1	Síntese e caracterização dos compostos 5-arilideno-barbitúricos.....	103
4.4.2	Redução dos 5-arilideno-barbitúricos.....	112
4.4.3	Determinação da atividade inibitória e a relação com as estruturas dos inibidores.....	115
4.4.4	Síntese do Neq411.....	117
4.5	Conclusões	118
4.6	Parte experimental.....	118
4.6.1	Materiais.....	119
4.6.2	Métodos.....	119
4.7	Referências.....	122
Capítulo 5.....		126
5	Conclusões e Perspectivas.....	127
ANEXOS Capítulo 3.....		129
ANEXOS Capítulo 4.....		185

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Química Medicinal

A Química Medicinal é definida pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como:¹

Química Medicinal é uma disciplina de base química, envolvendo também aspectos de ciências biológicas, médicas e farmacêuticas. Está relacionada com a invenção, a descoberta, design, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo do seu metabolismo, a interpretação do seu modo de ação ao nível molecular e a construção de relações estrutura-atividade. (IUPAC, 1998, p.1138)

O nascimento da Química Medicinal ocorreu no século 19, estando intimamente relacionado ao nascimento da química orgânica e à introdução do conceito de Quimioterapia por Paul Erlich, após a elaboração da sua teoria da reação em cadeia, sendo que a primeira possibilitou a obtenção e modificação de pequenas moléculas para o estudo de suas atividades frente a sistemas biológicos, e a segunda serviu de base para a concepção do conceito de receptores biológicos e também para compreensão da especificidade de enzimas a seus substratos. A história do surgimento da Química Medicinal, assim como sua definição pela IUPAC, evidencia a característica de multidisciplinaridade desta ciência, que integra principalmente aspectos básicos de química e aspectos aplicados de ciências da vida, como bioquímica, biologia molecular, farmacologia, entre outros.²

O objetivo principal da Química Medicinal é o planejamento e desenvolvimento de substâncias capazes de exercer funções biológicas de interesse, que quando tem como objetivo o combate a doenças em seres humanos são chamadas fármacos.²

1.1.1 O planejamento e o desenvolvimento de fármacos

Durante o ano de 2012, foram lançados 36 novos medicamentos no mercado, com aplicações diversas, dos quais 3 são os primeiros de suas classes, 12 possuem aplicação muito específica e são conhecidos como 'fármacos órfãos' e o restante não possui inovação, mas aplicações em diferentes casos.³

A entrada de um novo medicamento no mercado é um processo que demanda um investimento considerável de tempo e dinheiro. O custo de um novo medicamento gira em torno de U\$800 milhões de dólares gastos ao longo de uma média de 15 anos de pesquisa e desenvolvimento.^{4, 5}

Diversos fatores influenciam no custo e tempo deste processo, entre eles, os que possuem mais impactos são o tamanho da indústria responsável pelo processo e em qual área da terapêutica ele será incluído. Em uma empresa de grande porte, o custo efetivo das operações será menor frente a uma pequena empresa, pois a disponibilidade de serviços será maior diminuindo assim o custo e agilizando as etapas de desenvolvimento. Quanto à sua aplicação, tendo em vista que diferentes doenças têm diferentes mecanismos fisiopatológicos, em geral, os índices de sucesso na obtenção de substâncias efetivas para cada patologia é diretamente proporcional à facilidade de seu tratamento. Além disso, é importante levar em consideração a duração do tratamento, que quando prolongado, exige a realização de estudos frente a reações adversas e ao uso por longo prazo. Finalmente, a área em que o medicamento será empregado está diretamente relacionada a questões políticas, uma vez que o próprio governo pode oferecer subsídios para a produção ou as agências regulatórias facilitarem o processo de registro dependendo da importância da classe do medicamento.⁶

As principais informações para iniciar o planejamento de fármacos são o estabelecimento do alvo terapêutico e obtenção moléculas bioativas. Baseado nesses dois aspectos, as principais estratégias usadas no planejamento computacional de fármacos são o planejamento baseado na estrutura do alvo (SBDD, do inglês *Structure Based Drug Design*), que é realizado quando há a estrutura 3D do alvo, seja ela obtida através da cristalografia de Raios-X ou por homologia, e o planejamento baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *Ligand Based Drug Design*), que é utilizado quando se conhece a estrutura de pelo menos uma molécula com atividade frente ao alvo de interesse.⁷ Porém, quando não há informações suficientes sobre os aspectos discutidos anteriormente, a busca inicial de moléculas com a atividade biológica desejada é feita por meio de ensaios em larga escala ou HTS (do inglês *High Throughput Screening*), onde um grande número de moléculas é testado diretamente contra

o alvo terapêutico na busca de determinar um número considerável de moléculas com atividade desejada.⁷

Em contrapartida, quando há informações suficientes sobre estrutura do alvo e moléculas bioativas, é utilizada uma estratégia de busca consensual unindo os conceitos de SBDD e LBDD.⁷

O processo de desenvolvimento de fármacos é o conjunto de atividades necessárias para incluir um fármaco no mercado sendo divididas em duas fases, a primeira chamada de fase pré-clínica que envolve as etapas de pesquisa e que quando finalizada resulta em uma série de dados que justificam o início da segunda fase, conhecida como fase clínica.⁸

A fase pré-clínica começa com uma necessidade terapêutica, tendo em vista que uma doença pode ser combatida de várias formas, ou seja, pode ter vários alvos terapêuticos, que variam entre si quanto à efetividade e complexidade, e muitas vezes podem ter efeitos sinérgicos ou antagônicos quando avaliados em conjunto.^{8,9}

Determinado o alvo terapêutico, deve-se certificar que este será eficiente para o tratamento, para então iniciar a escolha das substâncias químicas a serem testadas *in vitro* de modo a identificar os ligantes (*Hits*) que servirão de base para o planejamento de outras estruturas análogas. Os compostos mais eficazes em desempenhar a função para o qual foi planejado são chamados de compostos matriz (*Lead*). Seguindo no processo de desenvolvimento eles serão avaliados quanto às suas características farmacocinéticas (relacionadas à capacidade da substância alcançar seu alvo no organismo), toxicidade e segurança - agora em modelos animais. A etapa final deste processo é a compilação de todos os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* e *in vivo* para solicitação junto à agência regulatória responsável do início dos ensaios clínicos.¹⁰

A fase clínica é dividida em quatro etapas: Fase I, onde é realizada em um pequeno grupo de voluntários em geral saudáveis para uma avaliação prévia da segurança e do perfil farmacocinético da molécula em questão; Fase II, o primeiro contato com os pacientes afetados pela doença estudada e avalia o

potencial efetivo da substância frente à enfermidade e também a segurança em curto prazo; Fase III, que segue o mesmo princípio da anterior, mas agora em larga escala buscando, além da comprovação da eficácia e segurança, a observação dos principais efeitos adversos e da influência das características dos pacientes (idade, gênero, peso, etnia, ect.) na intensidade do efeito; Por fim a Fase IV, que se estabelece com início da comercialização sendo também conhecida como estudos de vigilância pós-comercialização que tem como finalidade buscar eventos adversos pouco frequentes e ou não esperados.¹⁰ Uma representação esquemática de todo processo descrito acima é demonstrado na Figura 1.1.

Figura 1.1: Ilustração do processo de desenvolvimento de um fármaco, demonstrando as fases pré-clínicas e clínicas

Fonte: Adaptado de LOMBARDINO, J. G.; LOWE III, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. *Nature Reviews Drug Discovery* [S.l.], v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.

Uma vez que compreendido como os fármacos são desenvolvidos é interessante relembrar que o químico medicinal está direta ou indiretamente envolvido em todas as etapas do desenvolvimento de fármacos.¹¹

1.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas é a infecção do ser humano pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, e é uma das parasitoses mais importantes da América Latina, sendo estimados 8 milhões de afetados.¹² Em virtude de suas características regionais e seu caráter socioeconômico ela é considerada uma doença tropical negligenciada.¹³

Dentro do contexto das doenças negligenciadas temos um grupo chamado Doenças Tropicais Negligenciadas do inglês *Neglected Tropical diseases* (NTDs). Este grupo, como o nome sugere, é um conjunto de 13 doenças que são encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais em virtude da vulnerabilidade das populações encontradas nestas regiões, uma vez que também são prevalentes especialmente em populações pobres e estas são responsáveis por aproximadamente 500 mil mortes por ano.¹⁴ Embora este grupo possua um impacto semelhante às doenças de maior causa de morbimortalidade, a situação atual das NTDs é mais agravante do que o da tuberculose, da síndrome da imunodeficiência adquirida e da malária no contexto atual, já que existe um considerável investimento em estratégias para erradicação das mesmas. Apenas em 2007 mais de 2,5 bilhões de dólares foram investidos na busca de tratamento destas últimas, enquanto que nenhum investimento significativo foi realizado para solucionar o problema das NTDs.¹⁵

A transmissão e as consequências da doença na vida do paciente servem de base para explicar como a doença está distribuída pelo mundo e quais seus principais impactos.

A doença de Chagas ocorre tanto em regiões endêmicas quanto não endêmicas. Nos países não endêmicos, a principal causa da presença da doença é a imigração de indivíduos advindos de áreas endêmicas para essa doença. Os principais afetados são os Estados Unidos e a Espanha, por serem um dos principais destinos de imigrantes da América Latina, região endêmica dessa doença. Nos Estados Unidos, estima-se que estão presentes mais de 300 mil pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, enquanto na Espanha esse número é de mais de 60 mil infectados.¹⁶

A distribuição entre os países endêmicos pode ser ilustrada através da análise do Brasil, que consegue refletir bem o panorama das áreas endêmicas, compreendida entre o norte do México e o norte da Argentina. O Brasil apresenta a disseminação da doença por via vetorial (embora haja um intenso combate ao vetor, esse tipo de transmissão não foi efetivamente eliminada)¹⁶ e não vetorial. Quando analisado o número de óbitos causados direta ou indiretamente pela doença de Chagas vemos uma distribuição desigual entre as regiões do Brasil. A região dos estados de Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal possuem os maiores índices de óbito pela doença, reflexo da imigração da população já infectada residentes da zona rural para as áreas urbanas, contudo a progressão da mortalidade indica uma estabilização do quadro devido às estratégias de controle do vetor. Já nas regiões Norte e Nordeste do Brasil é observado o inverso, pois nessas, a transmissão oral da doença vem se intensificando e com isso a progressão da mortalidade deve sofrer um aumento com o tempo. Essas informações nos levam a concluir que apesar das estratégias de eliminação da transmissão, a doença de Chagas continua ser um problema não apenas em países endêmicos, mas de âmbito mundial.¹⁷

Os gastos mais importantes com a doença de Chagas são o tratamento do paciente, que será discutido a seguir, e sua improdutividade, uma vez que os principais afetados estão na faixa etária produtiva. Os valores estimados de custos variam entre as regiões analisadas, uma vez que diferentes países possuem diferentes sistemas de saúde e diferentes tipos de economias, mas os valores estimados mundialmente são capazes de refletir o fardo que a doença causa. Esse gasto pode ser comparado ao do câncer de pulmão (83 bilhões anuais) e câncer de mama (35 bilhões anuais) que são considerados de baixo gasto, e também a também comparado a outras doenças infecciosas como rotavirus (2 bilhões anuais) e cólera (5 bilhões anuais) para demonstrar a sua importância.¹⁸

O impacto mundial da doença de Chagas é sem dúvida, significativo e se deve em grande parte à fase crônica da doença. A erradicação da doença depende não somente da eliminação da transmissão vetorial, mas também do tratamento dos portadores do parasita.¹⁸

1.2.1 Fisiopatologia e Transmissão da doença de Chagas

O estudo das modificações fisiológicas que uma doença causa em um organismo é chamado fisiopatologia. Quando aplicada à compreensão das consequências para o indivíduo, assim como os meios de combate a etiologia da doença, é facilitada. A primeira etapa da fisiopatologia consiste na criação da relação entre o organismo e o agente etiológico, no caso da doença de Chagas isso ocorre quando há infecção do ser humano pelo *T. cruzi*. O protozoário possui três de cepas, que possuem variações genéticas, a cepa do **tipo I** é encontrada em ambientes selvagens, a cepa do **tipo II** é encontrada em ambientes domésticos e possui cinco subtipos e recentemente foi descoberta a cepa III a qual não há informações disponíveis atualmente.¹⁹

A infecção e a transmissão deste protozoário podem ocorrer de duas formas, vetorial e não vetorial. A transmissão vetorial ocorre em duas fases, uma no hospedeiro vertebrado e outra no hospedeiro invertebrado.¹⁹

Para compreender este processo é importante saber que o protozoário pode ser encontrado em três formas: tripomastigota metacíclico, forma infectante presente em ambos os hospedeiros; a forma epimastigota, presente apenas no intestino do hospedeiro invertebrado; a forma amastigota, forma intracelular presente apenas em células do hospedeiro vertebrado. Uma vez que as formas foram descritas, o próximo passo é conhecer os vetores (hospedeiros invertebrados) da doença, os insetos hematófagos: *Triatoma infestans*, principal vetor presente na América do Sul, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* presentes nas regiões mais ao norte da América do Sul e também na América Central.¹⁹

A primeira etapa da transmissão vetorial é dada pelo repasto sanguíneo entre o inseto vetor contaminado e o hospedeiro humano. Ao mesmo tempo em que o vetor se alimenta do sangue do hospedeiro, elimina suas fezes infectadas com tripomastigostas metacíclicos na região da ferida causada pela picada. A picada causa irritação na pele levando o indivíduo a coçar a área ferida, parte das fezes contaminadas entra em contato com o ferimento, atingindo a corrente sanguínea. Nessa etapa, as formas infectantes do *T. cruzi* são fagocitadas pelas células de defesa do organismo. O parasita então se transforma de

tripomastigota a amastigota e evade do processo de digestão intracelular, seguido de multiplicação no meio intracelular até causar a lise da célula retornando à sua forma tripomastigota metacíclico, quando são novamente liberados na circulação sanguínea.¹⁹

O parasito neste momento pode ou infectar outra célula do hospedeiro vertebrado ou infectar o hospedeiro invertebrado que pica o hospedeiro vertebrado contaminado. Quando o inseto ingere a forma tripomastigota metacíclica (através do hospedeiro vertebrado ou do invertebrado, uma vez que existe canibalismo nestas espécies) os protozoários se alojam em seu intestino onde se transformam em epimastigotas e se reproduzem até que o inseto se alimente mais uma vez. Neste momento os epimastigotas se transformam novamente na forma infectante tripomastigota fechando o ciclo. Todo esse processo descrito encontrasse ilustrado na Figura 1.2.^{19, 20}

Figura 1.2: Ciclo de vida do T. cruzi

Fonte: RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *The Lancet* [S.l.], v. 375, n. 9723, p. 1388-1402.

A transmissão não vetorial ocorre, seguindo o mesmo princípio, com invasão do parasita na circulação sanguínea, mas sem a presença do vetor. Os principais meios para que isso aconteça na ausência de um vetor são a transmissão congênita, transfusão sanguínea, transplante de órgãos infectados, através de relações sexuais (onde há contato com o sangue advindo da menstruação), acidentes laboratoriais e ingestão de alimentos contaminados.¹⁶

A fisiopatologia da doença se divide nas fases aguda e crônica. A fase aguda ocorre de 1-2 semanas após entrada do parasita na circulação sanguínea, tendo duração de 4-8 semanas, pode ser assintomática ou causar febre, dependendo da quantidade de parasitas no sangue e também da resposta imune do hospedeiro (transmissão por via oral é comum uma alta concentração de parasitas no sangue). Há possibilidade de óbito na fase aguda quando há miocardite ou meningoencefalite (mas comum na transmissão congênita), mas isso ocorre em apenas 5% dos casos. A fase aguda tem sua regressão espontânea em 90% dos casos mesmo na ausência de tratamento, o que dificulta bastante o diagnóstico durante esta fase da doença, sendo possível somente através de análise microscópica direta do sangue.¹⁶

Com a regressão da fase aguda, ocorre a transição para a fase crônica, onde o parasita assume principalmente sua fase intracelular. As características desta fase da doença são determinadas pelo equilíbrio entre a resposta imune do indivíduo e o dano tecidual causado pelo parasita. Quando há uma harmonia entre os fatores citados, o que ocorre em 70% dos casos, o paciente desenvolve uma forma indeterminada da doença onde não há quadro clínico. Nos outros 30% dos casos, os pacientes desenvolvem a fase sintomática que é dividida em cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. As fases sintomáticas levam de 10 a 30 anos para se desenvolverem e o tipo de órgão afetado depende da cepa do protozoário que causa a infecção. Independente do órgão atingido, o mecanismo de lesão tecidual é semelhante, ocorrendo a destruição do tecido com consequentemente perda de função devida tanto à lise das células pelo excesso de amastigotas em seu citosol aliado aos danos causados pela inflamação crônica da região. Nesta fase, em virtude da queda considerável da parasitemia, o diagnóstico é realizado através da determinação da presença e quantificação de anticorpos produzidos contra o parasito.¹⁶

1.2.2 Tratamento da doença de Chagas

Três anos após a descoberta de Chagas já haviam sido realizadas tentativas de realizar seu tratamento. As primeiras tentativas foram a utilização de compostos contendo arsênio, corantes como fucsina e compostos contendo antimônio que foram ineficazes. Em 1961 foi documentada a utilização de vários compostos para o tratamento mostrando várias classes de moléculas com ação contra o parasito, contudo apenas estudos conduzidos em 1957 levaram a primeira escolha de fármacos para o tratamento, os nitrofuranos.²²

Atualmente o Nifurtimox e o Benzonidazol, mostrados na Figura 1.3, são usados para o tratamento da doença de Chagas e ambos não são considerados bons fármacos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Quanto a eficiência, a terapia é efetiva em 80% dos casos que envolvem a fase aguda e apenas 20% dos que envolvem a fase crônica.²²

Figura 1.3: Estrutura do Nifurtimox e do Benzonidazol

Benzonidazol

Nifurtimox

O Nifurtimox assim como outros nitrofuranos, tem ação antimicrobiana devido à formação de radicais nitroânion altamente reativos que impedem o parasita de realizar reações de destoxificação, causando sua morte. O fármaco é mais efetivo na fase aguda e sua posologia envolve a administração por via oral de 8-10mg/kg/dia de 2-3 doses durante 60 dias.²²

O Benzonidazol pertence à classe dos nitroimidazóis, sua ação é devido a nitroredução de macromoléculas do parasita que perdem sua função levando consequentemente a sua morte, este fármaco é ativo principalmente na fase crônica da doença, a posologia consiste na administração via oral de 5mg/kg/dia em 2-3 doses durante 60 dias.²²

Os problemas com essa terapia são os efeitos colaterais desses fármacos e a consequentemente desistência do tratamento.²² Os efeitos colaterais, além de variados, são frequentes para os dois fármacos. O Nifurtimox causa anorexia e perda de peso em 50-75% dos pacientes, náusea em 15-50%, vômito em 15-26%, desconforto abdominal em 12-40%, dor de cabeça em 13-70%, mudança de humor em 10-49%, mialgia em 13-30%, neuropatia periférica em 2-5%, perda de memória recente em 6-14% e leucopenia <1%. Apesar dos efeitos colaterais serem amenizados pelo uso de outros fármacos o índice de desistência do uso do Nifurtimox ocorre em 6-40% dos pacientes. Pode-se observar que o Nifurtimox tem grandes problemas como uma alternativa terapêutica para a doença de Chagas e reflexo disso é o fato que sua produção foi descontinuada e ele encontra-se indisponível para os países da América do Sul.

O Benzonidazol causa dermatite alérgica em 29-50% pacientes, parestesia em até 30% dos pacientes, neuropatia periférica em 0-30%, anorexia e perda de peso em 5-40%, náusea e vômito em 0-5%, leucopenia e trombocitopenia em <1% dos pacientes. Assim como o Nifurtimox, a taxa de desistência do tratamento com o Benzonidazol está na faixa de 7-12%. O alto índice de efeitos adversos, a alta taxa de desistência do tratamento e a baixa eficácia terapêutica, justificam a busca por novos alvos terapêuticos para a doença de Chagas. Atualmente várias estratégias terapêuticas são estudadas no intuito de obter fármacos efetivos no tratamento da doença de Chagas que não possuam efeitos colaterais tão acentuados quanto os usados atualmente. Os alvos terapêuticos atualmente em estudo para o tratamento dessa doença serão brevemente descritos abaixo.²³

A via de síntese do ergosterol está presente em todas as formas do protozoário e sua inibição leva à morte do parasita, pelo fato do ergosterol ser um dos principais responsáveis pela rigidez da membrana plasmática do protozoário. Dentro desta via, três enzimas vêm sendo estudadas como alvo terapêutico; a citocromo P-450-dependente C14- α esterol demetilase (CYP51), a esqualeno sintetase e a lanosterol sintetase. Por ser uma via também encontrada em fungos, moléculas conhecidamente antifúngicas que inibiam essa via foram testadas contra o parasito, o que resultou na descoberta da ação

antiparasitária do Posaconazol, que hoje já se encontra na fase II dos estudos clínicos.²⁴

Na via de digestão proteolítica destaca-se a Cruzaína, uma cisteína protease homóloga à Catepsina-L de humanos que está envolvida no processo de obtenção de aminoácidos através da hidrólise de proteínas e envolvida também em processos de evasão da resposta imune do hospedeiro.²⁴ Esta enzima é um dos dois alvos explorados neste trabalho e será discutida com maior profundidade no Capítulo 3.

A via de metabolismo do pirofosfato se desdobra como um importante alvo, já que desempenha um papel fundamental para a regulação do equilíbrio osmótico da célula, já que no parasita, as células possuem uma organela especial para a regulação da concentração de pirofosfato. Uma vez que esse equilíbrio seja perturbado, pode ocorrer a morte do parasita.²⁴

A via de metabolismo da tripanotona no parasito substitui a via de oxidação da glutatona dos mamíferos, sendo a principal via redox de tióis. É atualmente um alvo validado, mas possui problemas quanto à questão de seletividade para sua via homóloga.²⁴

Outras vias estudadas na busca de novos alvos terapêuticos são aquelas envolvidas na biossíntese de nucleotídeos, que são essenciais para a reprodução do protozoário. A obtenção de nucleotídeos pode ser realizada de duas formas, partindo de intermediários da própria degradação das bases, conhecida como via de salvação, ou através de biomoléculas mais simples como açúcares e aminoácidos, processo conhecido como síntese de novo. A via preferencial de obtenção de nucleotídeos de purina pelo parasita é a via de salvação, e, em virtude disso, a enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase tem sido apontada como um alvo promissor. A obtenção de nucleotídeos de pirimidina, em contrapartida, é feita principalmente pela síntese de novo, e dentro desta via a enzima diidroorotato desidrogenase tem sido estudada como alvo e é uma das enzimas abordadas no trabalho e será explorada com mais detalhes no Capítulo 4.^{24, 25}

A via glicolítica do parasita também vem sendo estudada na busca de novos alvos terapêuticos uma vez que no parasita esse processo ocorre em uma organela especializada chamada glicossomo sendo a principal forma de obtenção de energia do protozoário. Várias das enzimas pertencentes a essa via vêm sendo estudas como potenciais alvos.²⁵

Em virtude do comprovado potencial como alvos terapêuticos as enzimas Cruzaína e diidroorato desidrogenase de *T. cruzi*, serão alvo para a síntese de moléculas com potencial atividade inibitória.

1.3 Avaliação da capacidade inibitória de moléculas bioativas

Entre as macromoléculas presentes em organismos vivos que são capazes de ter sua função modulada pela presença de pequenas moléculas, as enzimas são sem dúvida a principal classe, o que faz com que seja um dos principais alvos para os fármacos. Essa afirmação é claramente confirmada se levarmos em conta que, dos 483 alvos terapêuticos reconhecidos, 47% são enzimas, 30% receptores acoplados a proteína-G e o restante constituído de canais iônicos, transportadores, receptores de hormônios nucleares, DNA, integrinas, entre outros,²⁶ como demonstrado na Figura 1.4.

Figura 1.4: Alvos terapêuticos de fármacos disponíveis atualmente no mercado.

Fonte: HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R. The druggable genome. Nat Rev Drug Discov [S.l.], v. 1, n. 9, p. 727-730, 2002.

As enzimas podem ser moduladas por pequenas moléculas, de modo a terem sua atividade catalítica aumentada ou diminuída, o que consequentemente altera seu papel biológico. A diminuição da atividade enzimática é comumente conhecida como inibição, e as moléculas que possuem esses efeitos são denominados inibidores enzimáticos.²⁷

A inibição enzimática pode ocorrer com a reação do inibidor com a estrutura da enzima formando interações covalentes que inativam a macromolécula, denominada inibição covalente irreversível. A inibição também pode ser do tipo reversível onde a molécula pode se ligar a enzima por interações não covalentes ou covalentes reversíveis. Dentro da inibição reversível existem três tipos: competitiva, onde o inibidor compete pelo mesmo sítio que o substrato, não competitiva onde o inibidor além de se ligar ao sítio ativo da enzima pode se ligar também após a formação complexo enzima-substrato e incompetitiva onde o inibidor se liga apenas ao complexo enzima-substrato.²⁷

1.4 A síntese orgânica na obtenção de moléculas bioativas

O avanço da Química Medicinal está relacionado principalmente com o avanço da síntese orgânica. Uma vez que a obtenção de moléculas com atividade biológica de interesse é em grande parte através de síntese orgânica e mesmo aquelas obtidas de outras fontes vão, em algum momento do seu desenvolvimento como fármaco, sofrer influência desta ciência. Dentro da síntese orgânica, as estratégias de síntese podem ser divididas de duas formas: síntese convergente, do inglês *Target Oriented Synthesis* (TOS), onde os passos reacionais culminam em alvos específicos; síntese divergente, do inglês *Diversity Oriented Synthesis* (DOS), onde as reações resultam em produtos com estruturas diversificadas.²⁸

A TOS, abordagem utilizada neste trabalho, é a que tem como objetivo a síntese de um alvo específico, o que leva a utilização de vias sintéticas lineares. Neste caso a análise sintética parte do produto final até a determinação de materiais de partida mais simples e é chamada análise retro-sintética (*Retrosynthetic Analysis*).^{28, 29}

A DOS, por sua vez, é uma abordagem que busca a transformação de moléculas simples e similares em produtos complexos e diversos. Para isso, a rota sintética deve ser ramificada e o pensamento deve ser focado nos reagentes seguindo a análise sintética prospectiva (*Foward Synthetic Analysis*).^{28, 29}

No contexto da Química Medicinal, é necessária uma abordagem diferente: o que geralmente acontece através da síntese de análogos de moléculas com importância estrutural, realizando modificações nas estruturas com o objetivo de avaliar a alterações de suas características²⁶

A distribuição no espaço químico das moléculas obtidas através das três abordagens descritas pode ser mais bem visualizada através da Figura 1.5 onde são traçados três eixos representando propriedades moleculares e a distribuição segundo o tipo de abordagem utilizada.²⁶

Figura 1.5: Distribuição no espaço químico de moléculas obtidas através de a)TOS, b)Química Medicinal e c) DOS

Fonte: SPRING, D. R. Diversity-oriented synthesis; a challenge for synthetic chemists. *Organic and Biomolecular Chemistry* [S.l.], v. 1, n. 22, p. 3867-3870, 2003.

Após a escolha da abordagem sintética, o próximo passo é definir quais reações são necessárias para a síntese do produto desejado. Em um estudo conduzido por Carey et. al. 2005 analisando a síntese de 128 candidatos a fármaco e suas 1039 reações, foi observado que uma média aproximada de 8 etapas são necessárias para obtenção do produto final. As reações podem ser divididas em dois grupos principais: reação de construção, que constituem formação de ligações carbono-carbono, como alquilação e arilação de heteroátomos e acilação entre outras; e reações de modificação, que são

representadas pelas reações de oxi-redução, resolução de enântiomêros, proteção e desproteção de funções orgânicas, adição e interconversão de funções orgânicas. Quanto à quiralidade das substâncias analisadas, 54% possuem ao menos um centro quiral, sendo que a obtenção do centro quiral para esses candidatos ocorre pela formação durante a síntese, diretamente de materiais de partida quirais ou em misto das duas condições.³⁰

1.5 Referências

1. WERMUTH, C.-G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Chapter 36. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1997. In: JAMES, A. B. (Ed.). *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Academic Press, 1998. p. 385-395.
2. KHAN, M. O.; DEIMLING, M. J.; PHILIP, A. Medicinal chemistry and the pharmacy curriculum. *American journal of pharmaceutical education* [S.l.], v. 75, n. 8, p. 161, 2011.
3. GRAUL, A. I.; LUPONE, B.; CRUCES, E.; STRINGER, M. 2012 in review - Part I: The year's new drugs & biologics. *Drugs of Today* [S.l.], v. 49, n. 1, p. 33-38, 2013.
4. DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: New estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics* [S.l.], v. 22, n. 2, p. 151-185, 2003.
5. LAUFER, S.; HOLZGRABE, U.; STEINHILBER, D. Drug discovery: A modern decathlon. *Angewandte Chemie - International Edition* [S.l.], v. 52, n. 15, p. 4072-4076, 2013.
6. ADAMS, C. P.; BRANTNER, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Affairs (Project Hope)* [S.l.], v. 25, n. 2, p. 420-428, 2006.
7. LEITÃO, A. M., M. L. C.; MONTANARI, C. A. Desenvolvimento de fármacos. In: MONTANARI, C. A. (Ed.). *Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*. São Paulo: Edusp, 2011. Cap. 3. p. 67-90.
8. GUPTILL, J. T.; DUPUIS, R. E.; D'CRUZ, O. Emerging subspecialties in neurology: Clinical development. *Neurology* [S.l.], v. 80, n. 1, p. e4-e7, 2013.
9. LOMBARDINO, J. G.; LOWE III, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. *Nature Reviews Drug Discovery* [S.l.], v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.
10. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) n. 10/07/2013/2013.

11. IMMING, P. Chapter 2 - Medicinal Chemistry: Definitions and Objectives, Drug Activity Phases, Drug Classification Systems. In: CAMILLE GEORGES, W. (Ed.). *The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition)*. New York: Academic Press, 2008. p. 63-72.
12. ORGANIZATION, W. H. Chagas disease (American trypanosomiasis). v. 2013. n. 20/072013.
13. COURA, J. R.; VÍAS, P. A. Chagas disease: A new worldwide challenge. *Nature* [S.l.], v. 465, n. 7301 SUPPL., p. S6-S7, 2010.
14. UTZINGER, J.; BECKER, S. L.; KNOPP, S.; BLUM, J.; NEUMAYR, A. L.; KEISER, J.; HATZ, C. F. Neglected tropical diseases: Diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Medical Weekly* [S.l.], v. 142, 2012.
15. COHEN, J.; DIBNER, M. S.; WILSON, A. Development of and access to products for neglected diseases. *PLoS ONE* [S.l.], v. 5, n. 5, 2010.
16. ABAD-FRANCH, F.; DIOTAIUTI, L.; GURGEL-GONÇALVES, R.; GÜRTLER, R. E. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [S.l.], v. 108, p. 251-254, 2013.
17. MARTINS-MELO, F. R.; ALENCAR, C. H.; RAMOS, A. N., JR.; HEUKELBACH, J. Epidemiology of Mortality Related to Chagas' Disease in Brazil, 1999–2007. *PLoS Negl Trop Dis* [S.l.], v. 6, n. 2, p. e1508, 2012.
18. LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet Infectious Diseases* [S.l.], v. 13, n. 4, p. 342-348, 2013.
19. RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *The Lancet* [S.l.], v. 375, n. 9723, p. 1388-1402.
20. HABERLAND, A.; SARAIVA, S. G. M.; WALLUKAT, G.; ZIEBIG, R.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine: CCLM / FESCC* [S.l.], v. 51, n. 2, p. 271-294, 2013.
21. WIGGERS, H. J. *Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi por biocalorimetria*. (2007). 102 f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Ciências - Área de concentração: Físico-Química - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
22. COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [S.l.], v. 104, p. 549-554, 2009.

23. BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine* [S.l.], v. 364, n. 26, p. 2527-2534, 2011/06/30 2011.
24. URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica* [S.l.], v. 115, n. 1–2, p. 55-68, 2010.
25. VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J.; MICHELS, P. A. M. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resistance Updates* [S.l.], v. 4, n. 1, p. 50-65, 2001.
26. HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* [S.l.], v. 1, n. 9, p. 727-730, 2002.
27. COPELAND, R. A. A Brief History of Enzymology. In: COPELAND, R. A. (Ed.). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. New York: WILEY-VCH, 2000. Cap.1. p. 1 - 11.
28. SPRING, D. R. Diversity-oriented synthesis; a challenge for synthetic chemists. *Organic and Biomolecular Chemistry* [S.l.], v. 1, n. 22, p. 3867-3870, 2003.
29. BURKE, M. D.; SCHREIBER, S. L. A Planning Strategy for Diversity-Oriented Synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition* [S.l.], v. 43, n. 1, p. 46-58, 2004.
30. CAREY, J. S.; LAFFAN, D.; THOMSON, C.; WILLIAMS, M. T. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Organic & Biomolecular Chemistry* [S.l.], v. 4, n. 12, p. 2337-2347, 2006.

Capítulo 2

Objetivos

2 Objetivos

O objetivo central do trabalho é a obtenção de novos inibidores para enzimas Cruzaína e TcDHODH, através de reações simples, condizentes com o escopo da química medicinal, para então avaliá-los quanto a capacidade de inibição de seus alvos das enzimáticos.

2.1 Objetivos específicos

Síntese e caracterização de compostos dipeptídicos nitrílicos como inibidores da enzima Cruzaína.

Avaliar a atividade inibitória dos possíveis inibidores da Cruzaína através da determinação do valor de IC_{50} dos compostos obtidos e relacionar sua capacidade de inibição com sua estrutura.

Síntese e caracterização de compostos barbitúricos mono e diinsaturados como inibidores da enzima TcDHODH para posterior avaliação quanto a sua inibição frente a enzima.

Capítulo 3

Síntese e Identificação de inibidores da enzima Cruzaína

3 Síntese e Identificação de inibidores da enzima Cruzaína

3.1 Cruzaína

A enzima Cruzaína é a principal protease do *Trypanosoma cruzi*, tendo sido amplamente estudada como alvo terapêutico no tratamento desta doença. As proteases são enzimas responsáveis pela quebra de ligações peptídicas, que base fundamental para a formação de polímeros de aminoácidos.

Devido à complexidade de seus substratos, a classe das proteases é bastante diversa e, por esta razão são divididas de acordo com mecanismo de ação (serina, cisteína, ácido aspártico, treonina e metaloproteases) e quanto à região de clivagem do polipeptídeo: exoproteases que clivam em regiões terminais, enquanto com as endoproteases a clivagem é efetuada no meio do polipeptídeo..^{1,2}

Dentre as proteases do parasita *Trypanosoma cruzi*, a de maior relevância é enzima Cruzaína, uma endoprotease da superfamília da cisteíno-protease do tipo papaína, na qual se incluem também as Catepsina-Ls. A Cruzaína é encontrada em todas as formas do protozoário. Na epimastigota, se encontra em organelas semelhantes a lisossomos, na tripomastigota fica próxima ao flagelo e na amastigota próxima a parede celular. Sua localização nas células reflete o fato que esta enzima participa não só da obtenção de aminoácidos através de proteólise, mas também está envolvida em processos imunogênicos e de evasão da resposta imune. Isso faz com que a Cruzaína seja tratada como um alvo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos.³

A forma recombinante da Cruzaína madura é um monômero que possui 215 aminoácidos em sua cadeia polipeptídica, estes aminoácidos se organizam enovelando em dois domínios, o primeiro com a estrutura predominantemente helicoidal e o segundo com folhas betas antiparalelas formando uma estrutura semelhante a um barril beta. Entre os domínios se encontra o sítio de interação com o substrato que pode ser dividido em sete subsítios, dos quais apenas quatro são alvos para estudos visando a desenvolvimento de inibidores, os subsítios S1, S1', S2 e S3 (nos substratos as partes que interagem com respectivos sítios são denominados P1, P1', P2 e P3). Entre o sítio S1 e o

S1' está a cisteína catalítica (Cys25), assim como His159 e Gln19 que formam a tríade catalítica da enzima, sendo esses dois últimos aminoácidos responsáveis pela região conhecida como cavidade do oxianion que tem importância no mecanismo da reação catalisada pela enzima. O sítio S2 é responsável pela seletividade ao substrato, possuindo uma cavidade predominantemente hidrofóbica, mas que possui também o resíduo Glu208 mais ao fundo da cavidade, permitindo desta forma interações com aminoácidos hidrofóbicos (Phe) e com peptídeos carregados positivamente como a arginina. Entre os subsítios S1 e S3 há uma região hidrofílica que atua como ponto de reconhecimento para a ligação peptídica através da interação com a Gly66. O S3 e S1' são regiões hidrofóbicas pouco exploradas, contudo são alvos promissores para estudos de seletividade de inibidores. Os subsítios S1, S1' e S2 são responsáveis pela interação com o substrato enquanto o S3 é responsável pela sua especificidade. A Figura 3.1 mostra a estrutura da proteína e como o sítio ativo é organizado.^{4,5,6}

Figura 3.1: a) Estrutura enzimática da Cruzaína (código PDB 2AIM) b) Representação dos subsítios enzimáticos de cisteína proteases

Fonte: a) WIGGERS, H. J. Planejamento de Inibidores da Enzima Cruzaína de Trypanosoma cruzi: dos Ligantes aos Compostos Matrízes. (2011). 173 f. Tese (Doutorado) - Doutor em Ciências - Área de concentração: Química Orgânica - Departamento de Química de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011. b) FARADY, C. J.; CRAIK, C. S. Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. ChemBioChem [S.l.], v. 11, n. 17, p. 2341-2346, 2010.

O mecanismo da reação de hidrólise de ligações peptídicas catalisada pela Cruzaína pode ser dividido em quatro etapas (Esquema 3.1). O primeiro passo da reação é formação do tiolato da Cys25 através da desprotonação de seu enxofre pelo grupo imidazol da His159. Para esta etapa é necessário que o nitrogênio do heterocíclo esteja na orientação adequada para efetuar a desprotonação, o que é possível devido sua interação com a Gln19. Após a formação do tiolato, o enxofre carregado negativamente realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da ligação peptídica, resultando no deslocamento do par de elétrons da dupla ligação para o oxigênio. Nessa etapa é formado um intermediário tetraédrico com um oxiânion que é estabilizado pela interação com a cavidade do oxiânion, em seguida a His159 gira o anel imidazólico de forma a possibilitar a protonação do nitrogênio amídico facilitando a quebra de sua ligação com o carbono carbonílico e a formação do tioéster. A terceira etapa é a o ataque nucleofílico de uma molécula de água ao carbono carbonílico do tioéster formando novamente um intermediário tetraédrico que da mesma forma é estabilizado pela cavidade do oxiânion, após a formação do intermediário a ligação C-S é clivada regenerando o tiolato da cisteína catalítica e liberando a porção carboxílica do peptídeo.⁷

Esquema 3.1: Mecanismo de catálise da Cruzaína

Fonte: DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. Cruzipain, the major cysteine protease of Trypanosomacruzi: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. Current Medicinal Chemistry [S.l.], v. 16, n. 24, p. 3174-3202, 2009

3.1.1 Inibidores

Os inibidores da Cruzaína, assim como de outras proteases, podem ser divididos de uma maneira simplificada: quanto a sua estrutura em peptídeo-miméticos e não peptídicos; e também quanto ao seu tipo de inibição em reversível e irreversível. Independente de sua classificação, os inibidores seguem o mesmo padrão estrutural, uma sequência de reconhecimento (peptídica ou não peptídica) e um grupo de interação com o sítio ativo. Inibidores que se ligam covalentemente de maneira reversível ou irreversível com a cisteína catalítica apresentam um grupo eletrofílico, conhecido como *Warhead*.⁹

A utilização de inibidores peptídeo-miméticos é a primeira estratégia no estudo de inibição de proteases, principalmente de endoproteases. Inicialmente moléculas contendo grupos muito reativos como diazometano e fluorometilcetonas foram avaliadas como inibidores irreversíveis, esta série de moléculas, apesar de sua toxicidade serviu para a determinação do melhor esqueleto pseudo-peptídico para a Cruzaína, o dipeptídeo Fenilalanina-Homofenilalanina. Devido a sua alta toxicidade, os grupos reativos da primeira série de inibidores foram substituídos por um análogo contendo um grupo N-metilpiperazina e uma função vinilsulfona, gerando o inibidor K11777 (Figura 3.2), que inibe em concentrações muito baixas sendo efetivo também, contra o parasita.^{10,11}

A utilização de inibidores peptídeo-miméticos reversíveis da enzima Cruzaína iniciou usando compostos contendo a função cetona, que posteriormente foram modificados em diversos grupos funcionais como alfa cetoamidas, cetoácidos, cetoésteres e aldeídos, que apesar de apresentaram inibição considerável contra a enzima, mostraram-se pouco efetivos quando testados diretamente contra o parasito.¹²

Figura 3.2: Estrutura e valor do IC₅₀ do composto K11777

IC₅₀ = 4,00 nM

Fonte: FLORENCI, V. G. et al. Dipeptidyl-alpha,beta-epoxyesters as potent irreversible inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain. *BioorgMedChemLett* [S.l.], v. 17, n. 24, p. 6697-6700, 2007.

A Cruzaína possui também classes de inibidores não peptídicos reversíveis, sendo a em sua maioria modificações de inibidores de outras proteases. Inicialmente inibidores das classes das acil-hidrazonas e chalconas foram testadas contra a enzima, resultando na identificação de novos inibidores com potência significativa, contudo restrita. Baseado nestes resultados outras classes de inibidores de proteases reversíveis foram testados, moléculas das classes das ariluréias e as tiouréias que também apresentaram bons resultados.¹³ Outra estratégia utilizada foi a junção de isatinas com as tiosemicarbazonas. A hibridização desses dois grupos resultou em compostos potentes, mas com atividade inibitória significativamente superior à outras tiosemicarbazonas sem esta modificação.^{14,15} Recentemente foi descrita uma nova classe de inibidores contendo a função 2-acetoamidotiofeno-3-carboxiamida apresentando bons resultados contra a enzima e também contra a forma infectiva do parasita.¹⁶

Inibidores nitrílicos não peptídicos também foram testados como inibidores da Cruzaína e foram capazes de em concentrações nanomolares, contudo foram inativas quando avaliadas quanto a capacidade de erradicar as formas celulares do parasito.¹⁷

Entre os compostos não peptídicos irreversíveis, se destaca a classe das 2,3,5,6-tetrafluorofenóximetil cetonas que além de inibir a enzima em

concentrações nanomolares se mostraram efetivas na erradicação das células do parasita in vitro.¹⁸

3.2 Planejamento de inibidores da Cruzaína

A Cruzaína possui um grande grau de similaridade com as Catepsina-Ls humanas principalmente com a Catepsina-L, em virtude disto esta enzima é normalmente usada como ponto inicial para o estudo de novos inibidores para enzima do Trypanosoma.

As Catepsina-Ls são serino proteases, (A e G), aspartato proteases (D e E) ou cisteíno proteases (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) da família da papaína, estas podem ser exoproteases (C e X) ou endoproteases (B, F, H, K, L, O, S, V, e W). A Catepsina-L está envolvida em processos imunológicos, homeostase epidérmica, morfogênese do folículo capilar, assim como em processos envolvendo invasão de tumores e formação de peptídeos amiloides relacionado ao mal de Alzheimer.^{3,9,18}

Dentro das classes de inibidores da Catepsina-L, as moléculas contendo nitrilas, tem um papel de destaque sendo inibidores covalentes reversíveis assim como aldeídos e cetonas uma vez que este tipo de inibição vem sendo cada vez mais estudado em virtude de combinar uma forte ligação à proteína e relativa estabilidade frente a ataque de outros nucleófilos. O mecanismo de inibição destas funções orgânicas consiste no ataque nucleofílico da cisteína catalítica ao carbono carbonílico de cetonas e aldeídos ou ao carbono da nitrila (Reação de Pinner) formando tiohemicetais, tiohemiacetals e tioimidatos respectivamente, estes adutos podem ter suas ligações quebradas espontaneamente revertendo a reação, contudo os tioimidatos tendem a se ligar de maneira mais eficiente do que os adutos de compostos carbonílicos, pois se assemelham mais com o tioéster formado durante a hidrólise de peptídeos enquanto os adutos de compostos carbonílicos se comportam como o estado de transição tetraédrico da hidrólise, que mesmo sendo estabilizado pela cavidade do oxiânion, são menos efetivos como inibidores covalentes reversíveis do que compostos nitrílicos como exemplificado pelo Esquema 3.2.^{9,18}

Os principais tipos de nitrilas encontradas em inibidores de Catepsina-Ls são cianoamidas, aminoacetonnitrilas e aril nitrilas, diferenciando-se entre si por suas propriedades eletrofílicas, dentre elas as aminonitrilas possuem potencial mais adequado, pois não são tão reativas quanto as cianoamidas nem tão inertes quanto as aril nitrilas.¹⁸

Esquema 3.2 a) Formação de tiohemiacetal e tiohemiacetal b) Formação do imidato pela reação de Pinner

Fonte: Adaptado de FRIZLER, M. 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, 2010.

As nitrilas dipeptídicas são atualmente a classe de inibidores reversíveis com maior atividade contra a Catepsina-L, um exemplo disso é a estrutura demonstrada na Figura 3.3 que possui importantes interações com a Leu69 situada entre os sítios S2 e S3, as quais são realizadas pelo grupo em P3 e o anel benzênico de P2 e com os aminoácidos Asp71 e Asp114.²⁰

Figura 3.3: Estrutura cristalográfica da nitrila dipeptídica mais ativa complexada com a Catepsina-L

Fonte: BETHEL, P. A. et al. Design of selective Cathepsin inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [S.l.], v. 19, n. 16, p. 4622-4625, 2009

Em virtude ao alto grau de homologia da Cruzaína com a Catepsina-L e das propriedades das nitrilas como inibidores reversíveis, as nitrilas dipeptídicas foram usadas como esqueleto base no presente trabalho.

A determinação das estruturas a serem avaliadas foi realizada utilizando um processo chamado *Hypothesis Driven Design*, que consiste em uma estratégia onde partindo de um protótipo, são levantadas hipóteses sobre alterações moleculares com objetivo de alcançar determinadas propriedades desejadas.²¹ O processo de desenvolvimento de moléculas bioativas baseado nesta estratégia é retroativo, e segue um ciclo que compreende a construção da hipótese, avaliação experimental e análise de resultados. A partir desses resultados são determinadas as alterações que devem ser realizadas.²²

O composto Neq0409 (**1**) mostrado na Figura 3.4, um conhecido inibidor da Catepsina- L, contendo anéis benzênicos em P2 e P3 e dois hidrogênios em P1,¹⁹ foi escolhido como estrutura protótipo para modificações estruturais visando identificar novos inibidores da Cruzaína. Além de resultados prévios no grupo terem demonstrado que este composto é um inibidor da Cruzaína sendo capaz de eliminar também suas formas celulares do parasita *T. cruzi*.

A primeira hipótese levantada foi a possibilidade do substituinte mais efetivo na interação com o sítio S3 da Catepsina-L apresentar eficiência semelhante para Cruzaína, para tal finalidade foi proposto o composto Neq0414 (**2**).²³ A segunda hipótese foi a possibilidade da formação de uma interação halogênio com substituintes da cadeia principal da enzima, na região do sítio S3, composto Neq0419 (**3**).²⁴

A hipótese seguinte foi a de inserir um átomo de cloro na posição *meta* do anel aromático da fenilalanina. Essa alteração foi proposta com base na informação provinda da Catepsina-L onde há uma interação com a Leu69 que na Cruzaína corresponde a Leu67 e essa por sua vez fixa a molécula em uma posição que possibilita uma melhor interação do P3, **4** (posteriormente denominado Neq415).²⁵

A última modificação consistiu na inserção do grupo ciclopropila na posição P1 da estrutura com o grupo com maior potência em P3 gerando a

estrutura do composto **5** (posteriormente denominado Neq533), esta modificação foi baseada na identificação do grupo aminoacetonitrila como alvo de metabolismo, sendo este fato contornado pela proteção pela presença do ciclopropil. Com essas hipóteses foi possível cobrir uma gama de informações que proveram indício de interações efetivas ou prejudiciais para o referido sítio.²⁵ Por fim, a última etapa foi a síntese de uma molécula híbrida com todas as modificações estudadas.

Figura 3.4: Estrutura das nitrilas dipeptídicas propostas neste trabalho

3.3 Síntese das nitrilas dipeptídicas

A base da síntese de nitrilas dipeptídicas como seu próprio nome sugere envolve a formação da amida peptídica e a formação de uma nitrila. As estratégias sintéticas para obtenção deste tipo de esqueleto são bem abrangentes, contudo no contexto da química medicinal a abordagem deve envolver reações que não necessitem de extremos de temperatura, sejam relativamente tolerantes a umidade, solventes polares e possuam tratamentos simples.²⁶

As principais estratégias de obtenção das nitrilas peptídicas partem naturalmente de dois aminoácidos, um possuindo a função nitrila com a amina livre e ou com a carboxila livre para formar a amida com o primeiro. A primeira síntese descrita para esse tipo de composto foi através da reação do cloreto de cloroacetila com o aminoacetonitrila (AAN) resultando no N-cloroacetil-ANN que posteriormente teve o cloro substituído através de uma alquilação com uma

amina primária.²⁷ Atualmente as rotas sintéticas seguem o mesmo princípio, mas usam reações de formação de amidas mais eficientes e com maior controle de racemização.

As rotas descritas recentemente mostram diferenças quanto à ordem, método de formação de amidas e também a presença ou não de reações de formação da nitrila. Referente à ordem de formação das amidas, uma das estratégias empregadas é a proteção do grupo amino (normalmente é feito a partir da formação de um carbamato), seguida do acoplamento com fragmento a nitrila, ou seu precursor. Por fim, é realizada a desproteção do grupo amino e, conseqüentemente, sua acilação.^{23,28,29,30,31,32,33,34} Outra estratégia envolve a proteção da carboxila, seguida da N-acilação que é finalizada com a desproteção da carboxila e acoplamento do fragmento contendo a nitrila.^{20,23,34} A formação das amidas envolve principalmente reações via anidrido misto^{28,29,30}, via cloreto de ácido^{33,34} e reações de acoplamento utilizando derivados de carbodiimidas.^{20,23,31,32,33}

A abordagem proposta no trabalho consiste na adaptação da rota utilizada por Bethel *et al.* 2009, onde a obtenção das dipeptidil nitrilas é realizada através da proteção do grupo carboxila do aminoácido inicial, seguida pela acilação do grupo amina, hidrólise do éster e acoplamento do ácido carboxílico com o grupo amino do AAN (Esquema 3.3).

Esquema 3.3: Proposta por Bethel *et al.* para obtenção de nitrilas dipeptídicas.

Fonte: Adaptado de BETHEL, P. A. *et al.* Design of selective Cathepsin inhibitors. *Bioorganic& Medicinal ChemistryLetters* [S.l.], v. 19, n. 16, p. 4622-4625, 2009.

Uma das alterações propostas foi a utilização de cloreto de tionila na presença de metanol para a esterificação do aminoácido, procedimento comumente usado para esta finalidade.³⁵ A etapa de acoplamento foi realizada tanto por via de agentes de acoplamentos de peptídeos quanto pela formação da ligação amida via reação com o cloreto de ácido correspondente. A última estratégia foi empregada em virtude da maior simplicidade e apresentar bons rendimentos. A rota proposta para obtenção das estruturas propostas está representada pelo Esquema 3.4

Esquema 3.4: Rota proposta para obtenção das nitrilas dipeptídicas.

3.4 Determinação da atividade inibitória da Cruzaína

Uma das formas de determinação da inibição de uma enzima é através da construção da curva de dose resposta. A representação gráfica da atividade enzimática é descrita através da velocidade de reação, em concentrações constantes de enzima e substrato, *versus* as variações da concentração de uma substância avaliada como inibidor. Atividade inibitória pode ser determinada através do percentual de inibição que é obtido a partir da equação demonstrada na Figura 3.5, no entanto ela é uma métrica simplista que normalmente é usada para a triagem dos compostos. Feita essa triagem é usado um método mais robusto para a determinação da atividade inibitória que comumente é o IC_{50} (concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática). Nessa

análise é desenvolvida uma regressão linear dos valores obtidos na curva de dose resposta cujo resultado é o valor de IC_{50} .³⁶

Figura 3.5: a) Determinação da porcentagem de inibição b) Modelo de curva de dose resposta para um inibidor enzimático

a) % inibição = $100 \left(1 - \frac{v_i}{v_b} \right)$

Fonte: Adaptado de OPELAND, R. A. Lead Optimization and Structure–Activity Relationships for Reversible Inhibitors Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 169-201

Para a Cruzaína, a determinação do IC_{50} é dada através da fluorimetria. O princípio do ensaio é a utilização de substratos peptídicos ligados a uma porção fluorogênica, que quando clivada se torna fluorescente. O substrato padrão para a Cruzaína é o N-benzóxicarbonil-L-fenilalanila-L-arginina-7-amido-metilcumarina (Z-Phe-Arg-MCA ou ZFRMCA) que após reagir com a enzima libera o fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (MCA) observado na Figura 3.6 junto com um esquema geral do ensaio.^{37,38}

Figura 3.6: a) Esquema geral do ensaio fluorimétrico b) Substrato fluorogênico para Cruzaína Z-Phe-Arg-MCA

Fonte : Adaptado de WIGGERS, H. J. Planejamento de Inibidores da Enzima Cruzaína de Trypanosoma cruzi: dos Ligantes aos Compostos Matrízes. (2011). 173 f. (Doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

3.5 Resultados e discussões

3.5.1 Síntese e caracterização dos compostos propostos

A proposta de síntese deste trabalho envolveu cinco estruturas para análise de quatro hipóteses, as quais foram obtidas através da adaptação de umas das estratégias sintéticas descritas para obtenção de nitrilas dipeptídicas. Para nenhuma estrutura foi verificada necessidade de alteração dos procedimentos propostos, sendo todas sintetizadas com bons rendimentos. As hipóteses, já mencionadas, junto com os resultados dos ensaios de inibição direcionaram as modificações moleculares, em virtude disso a o substituinte escolhido para ocupar a posição P3 nos dipeptídeos **4** e **5** foi o 3-carboxi-5-tert-butil-2-metilpirazol.

3.5.1.1 Reações de Esterificação

A proteção de carboxilas é, em sua grande maioria, feita através da formação de ésteres. A escolha do grupo protetor envolve as condições utilizadas para sua formação e também para sua quebra. A razão disso é que em muitas moléculas pode haver a presença de funções vulneráveis as condições de proteção/desproteção. Os ésteres são os grupos comumente usados como protetores de ácidos carboxílicos. Nestes casos, a escolha do tipo de éster a ser usado é determinado pela condição de sua hidrólise.³⁹

A obtenção de **9** e **10** foi realizada através da formação dos sais dos ésteres metílicos via formação do cloreto de ácido *in situ* na presença de metanol, como demonstrado na Esquema 3.5.⁴⁰

Esquema 3.5: Reação de esterificação dos aminoácidos.

Para a formação do cloreto de ácido foi utilizado cloreto de tionila. O mecanismo da reação envolve a formação do intermediário clorosulfinato após o ataque do oxigênio carboxílico ao enxofre do cloreto de tionila, este intermediário rapidamente se decompõe no cloreto de acila e dióxido de enxofre. O cloreto de acila formado é então atacado pelo metanol formando o éster como demonstrado no Esquema 3.6.^{41,34}

Esquema 3.6: Mecanismo de formação do cloreto de ácido.

Fonte: GERRARD, W.; THRUSH, A. M. 433. Reactions in carboxylic acid-thionyl chloride systems. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* [S.l.], n. 0, p. 2117-2120, 1953.

Os rendimentos para estas reações foram quantitativos, uma vez que é usado um excesso de cloreto de tionila e o álcool envolvido na formação do respectivo éster é o solvente da reação, dois fatores que favorecem a obtenção do produto.

Os compostos **9** e **10** estão descritos na literatura^{40,42}, sua caracterização foi realizada a partir da comparação dos dados espectroscópicos obtidos com os descritos: nos espectros de Ressonância Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) foi observado a presença de singletos com deslocamentos na região δ 3,65 para o composto **9** e δ 3,68 para o composto **10** referentes aos três hidrogênios da metoxila adicionada às moléculas, nos espectros de infravermelhos foram

identificadas os sinais em 1745 cm^{-1} e 1754 cm^{-1} representando as carboxilas dos ésteres formados.

A diferenciação entre os dois ésteres foi possível pela análise dos sinais dos hidrogênios aromáticos para ambos os espectros de RMN ^1H , onde o composto **9** apresentou cinco hidrogênios e **10** quatro (Figura 3.7).

Figura 3.7: Espectro de RMN dos ésteres **9** e **10**.

A diferenciação também foi possível devido à análise do perfil de fragmentação das moléculas no espectro de massas. Os pico base encontrado para **9** foi m/z 120(M-59) e para **10** em m/z 154 (M-59), eles indicam a perda da carboxila do éster, contudo para **10** foi possível visualizar também um pico de m/z M-57, referente perfil de abundância isotópica do átomo de cloro (Figura 3.8)

Figura 3.8: Espectro de Massas de **9** e **10**.

3.5.1.2 Reações de N-acilação dos ésteres

Após a proteção da carboxila através da esterificação, o próximo passo na obtenção das nitrilas dipeptídicas foi a formação da amida com a amina dos ésteres.

As reações de formação de amida são amplamente usadas em química medicinal. São procedimentos bem versáteis e possuem uma gama de condições em que são realizadas. Na grande maioria das vezes envolvem a ativação da carboxila tornando-a mais susceptível ao ataque nucleofílico do grupo amina, esta ativação pode envolver diversas estratégias. As mais comuns são: transformação em anidrido, cloreto de ácido e utilização de agentes de acoplamento.

Um aspecto muito importante da formação de amidas, envolvendo carboxilas ligadas a um carbono quiral, são as reações de racemização que ocorrem, principalmente, em meio básico onde o carbono anomérico pode ser desprotonado e, quando protonado novamente pode dar origem a dois enantiômeros.

Esta etapa da síntese envolveu a carboxila de substituintes aquirais e amina do aminoácido protegido. Em virtude disso, a obtenção de amida via formação de cloreto de ácido não apresenta chance de reações de racemização,

Para esta etapa, foram realizadas reações de formação de cloreto de ácido e também com a utilização de agentes de acoplamento.²² O mesmo procedimento experimental da etapa final da rota foi utilizado com o objetivo de comparar a viabilidade de cada uma das reações.

Esquema 3.7: Reações de acoplamento via cloreto de ácido.

Os rendimentos obtidos foram bem semelhantes para as duas condições (Tabela 3.1), o que significa que ambas possuem suas vantagens. A formação do cloreto de ácido tem a vantagem de usar reagentes relativamente menos custosos. No entanto, a sensibilidade do intermediário pode explicar dos rendimentos não tão altos quanto os esperados. Sob a ótica dos agentes de acoplamento, embora sejam de alto custo, os rendimentos proporcionados foram maiores do que os encontrados para outras reações da mesma rota (Tabela 3.2).

Tabela 3.1 Rendimentos das reações de acoplamento via cloreto de ácido e via agente de acoplamento.

Produto	Rendimento reação via formação de cloreto de ácido	Rendimento reação via agente de acoplamento
11	53%	67%
12	63%	79%
13	62%	54%

A identificação dos produtos **11** e **13** foram baseadas na adição do grupo 5-tert-butil-2-metilpirazol aos ésteres dos aminoácidos. Nos espectros de RMN ^1H foram observados singletos com δ 1,30 referentes aos nove hidrogênios do radical tert-butila, os singletos na faixa de δ 4,00 representando os três hidrogênios do radical metila e também os singletos δ 6,20 dos hidrogênios aromáticos do anel pirazólico. Outro ponto importante foi a visualização de dubletos com deslocamentos na região δ 6,30, estes deslocamentos são referentes a hidrogênios amídicos que apresentaram $J_1 = 4,00\text{Hz}$ e $8,00\text{ Hz}$, demonstrando o acoplamento dos hidrogênios amídicos com o hidrogênio anomérico do aminoácido (Figura 3.9).

Figura 3.9: Espectro de RMN1H dos compostos **11** e **13**.

Nos espectros de fragmentação, assim como para os compostos **9** e **10**, foram observados picos base com m/z 284 e 318 (M-59), relativos a perda da carboxila, para ambas as moléculas e m/z 320 (M-57) referente ao perfil isotópico do cloro para **13**. Foram também observados sinais com m/z 228 e 262 (M-116) que evidenciam a perda do radical butila e picos de m/z 165 (M-178 e M-192) representando o fragmento 3-carboxi-5-tert-butil-2-metilpirazol (Figura 3.10)

Figura 3.10: fragmentação dos compostos **11** e **13**.

Analisando o espectro de infravermelho foi possível visualizar novas banda de carboxilas de amidas na região de 1655 cm^{-1} e a persistência da carboxila de éster na região de 1740 cm^{-1} evidenciando mais uma vez o sucesso da reação.

O intermediário **12** apresentou, no espectro de RMN ^1H , picos na região de $\delta\ 8,30\text{-}8,90$ referente aos três hidrogênios do anel pirimidínico do ácido 5-bromonicotínico e o dubleto (representando o acoplamento com o hidrogênio anomérico) em $\delta\ 6,70$ referente ao hidrogênio da amida formada. O espectro de fragmentação mostrou que o pico base 303 (M-59), que corresponde à perda da carboxila do éster, o pico em 305 (M-57) confirmando o perfil isotópico do bromo e também o pico de massa 183 (M-178) referente à massa do ácido 5-bromonicotínico, já no espectro de infravermelho foi possível identificar a banda da carboxila do éster em 1744 cm^{-1} e a referente à amida formada em 1655 cm^{-1} confirmando o sucesso na obtenção do produto desejado.

Figura 3.11: Espectro de RMN1H e massas do composto **12**.

3.5.1.3 Reações de Hidrólise do éster

A hidrólise do éster metílico foi conduzida na presença de uma base inorgânica forte em um sistema de solventes capaz de promover a solubilização da mesma e do éster. O meio reacional foi agitado levemente a temperatura ambiente por duas horas.

Esquema 3.8: Reação de hidrólise do éster.

Nessas condições ocorre a hidrólise seletiva do éster deixando a amida intacta devido a uma afinidade maior entre o átomo de lítio e o átomo de oxigênio.⁴³ Os produtos obtidos nestas reações foram usados sem purificação na última etapa da rota sintética.

3.5.1.4 Reações de acoplamento com o aminoacetonitrila

A etapa final foi a inclusão do warhead nas estruturas através da reação de acoplamento do sal de lítio obtido na hidrólise dos intermediários **11**, **12** e **13** com o grupo amino da respectiva aminoacetonitrila (Esquema 3.9).

Esquema 3.9: Reações de acoplamento via agente de acoplamento.

Em reações de acoplamento envolvendo carboxilas alfa anoméricas, a carboxila ativada pode levar formação de um intermediário oxazolona, onde a desprotonação do hidrogênio anomérico ocorre mais facilmente (Esquema 3.7) promovendo racemização. Por essa razão é muito comum utilização de substâncias que inibem a formação deste intermediário.³⁵

Esquema 3.10 Reação de racemização de aminoácidos via oxazolona

Fonte: Adaptado de MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* [S.l.], v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005.

Uma forma de evitar a formação da oxazolona é realizando uma ativação da carboxila com um grupo seletivo ao ataque da amina, isso foi possível através do uso do agente de acoplamento 2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato (HATU) cuja estrutura esta presente na Figura 3.12.^{35,44,45}

Figura 3.12: Estrutura do agente de acoplamento HATU.

Fonte: VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* [S.l.], v. 38, n. 2, p. 606-631, 2009.

O HATU é obtido através da reação entre o sal detetrametilclorourônio com o 7-aza-benzotriazol (HOAt),⁴⁵ ele é classificado como um sal de urônio, apesar de em solução possuir duas formas, o sal de urônio (ativa) e o de guanidínio como mostrado no Esquema 3.11:

Esquema 3.11: a) Obtenção do HATU b) Formas urônio e Guanidínio

Fonte: a) MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* [S.l.], v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005. b) EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chemicalreviews* [S.l.], v. 111, n. 11, p. 6557-6602, 2011/11/09 2011.

O mecanismo desta reação consiste no ataque nucleofílico da carboxila desprotonada em meio básico ao carbono eletrofílico do agente de acoplamento, resultando na eliminação de uréia e na formação do éster com o grupo HOAt. Esse éster é estável o suficiente para não sofrer o ataque do oxigênio do peptídeo formando a oxazolona (Esquema 3.10), mas reativo o suficiente para ser substituído pela amina formando o peptídeo diminuindo a racemização. Um fator importante nesta reação é que a amina apenas deve ser adicionada depois da ativação da carboxila, pois a mesma pode realizar o ataque nucleofílico ao carbono eletrofílico do HATU, formando derivados guanidínicos (Esquema 3.12).⁴⁴

Esquema 3.12: a) Mecanismo de reação de acoplamento utilizando (HATU) b) Formação da guanidina.

Fonte: VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. Chemical Society Reviews [S.I.], v. 38, n. 2, p. 606-631, 2009.

Os derivados de HOAt favorecem a diminuição de racemização via interação de hidrogênio formada pelo nitrogênio do anel piridínico com os hidrogênios da amina o que facilita o ataque, como demonstrado na Figura 3.13.⁴⁴

Figura 3.13: Interação de hidrogênio de HOAt com aminas.

Fonte: MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. Tetrahedron [S.I.], v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005.

As reações tiveram rendimentos aceitáveis, contudo menores do que aqueles obtidos quando esta condição foi aplicada na síntese dos intermediários

11, 12 e 13 (Tabela 3.2), um ponto observado durante os experimentos foi a dificuldade de solubilização dos sais de lítio em DMF, o que pode ser uma das causas do baixo rendimento. Outro aspecto importante desta etapa foi que inicialmente as reações foram realizadas em atmosfera inerte, mas a utilização de condições normais de umidade não promoveu nenhuma alteração no resultado das reações.

Tabela 3.2: Rendimentos das reações via agente de acoplamento.

Composto	Rendimentos das reações de acoplamento utilizando HATU
11	67%
12	79%
13	54%
Neq414 (2)	43%
Neq419 (3)	21%
Neq415 (4)	45%
Neq533 (5)	55%
Neq543 (6)	47%

Os produtos finais da rota sintética foram identificados pela observação do surgimento de picos de dois hidrogênios amídicos no espectro de RMN ^1H com concomitante desaparecimento do singlete presente em δ 3,70-3,80 dos hidrogênios do grupo metoxílico, aparecimento de sinais de carbonos nitrílicos no espectro de RMN ^{13}C e pela semelhança do padrão de fragmentação.

Os compostos Neq414 (**2**), Neq419 (**3**) e Neq415 (**4**) por possuírem o grupo aminoacetonitrila demonstraram no espectro RMN ^1H (Figura 3.14) dois sinais referentes aos hidrogênios das amidas na região δ 8,00-9,00, um dubleto resultante da interação da primeira amida formada com o hidrogênio anomérico do aminoácido, e um triplete formado pela interação do hidrogênio da segunda amida formada com os dois hidrogênios do carbono do grupo aminoacetonitrila e também do surgimento de um duplo dubleto referente aos dois hidrogênios de

seu carbono alifático (Tabela 3.3). No espectro de RMN de ^{13}C foi possível também visualizar os sinais de carbonos nitrílicos em δ 117 ppm.

Figura 3.14: Espectros e RMN1H dos compostos Neq0414 (2), Neq0419 (3) e Neq015 (4).

Tabela 3.3: Valores de deslocamento químico para os grupos referentes a acetoaminonitrila.

	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)
Composto	δ amida (J tripleto)	δ carbono nitrílico
Neq414 (2)	8,75 (6,0Hz)	117,49
Neq419 (3)	8,36 (4,0Hz)	117,49
Neq415 (4)	8,79 (5,0Hz)	117,90

Com os espectros de fragmentação dos produtos Neq0414 (**2**), Neq0419 (**3**) e Neq0415 (**4**) foram identificados sinais provenientes da fragmentação da carboxila demonstrando a perda de carboxila ligada à aminoacetnitrila (Figura 3.15).

Figura 3.15 Espectro de massas dos compostos Neq0414 (**2**), Neq0419 (**3**) e Neq0415 (**4**)

Os compostos Neq533 (**5**) e Neq543 (**6**) foram caracterizados de acordo com a presença dos sinais do 2-ciclopropil-acetoaminonitrila. No espectro de

RMN¹H foi observada a presença de dois multipletos com deslocamento entre δ 0,9-1,2 e 1,4-1,5 referentes aos hidrogênios dos carbonos alifáticos ciclopropílicos (Figura 3.16). Nos espectros de RMN¹³C também foram observados, picos de carbonos nitrílicos (δ 120 ppm) confirmando as estruturas.

Figura 3.16: Espectros e RMN¹H dos compostos Neq533 (5) e Neq543 (6)

Tabela 3.4: Valores de deslocamento químico para os grupos referentes a 2-ciclopropil-acetoaminonitrila

	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)
Composto	δ hidrogênios de carbonos ciclopílicos	δ carbono nitrílico
Neq533 (5)	0,98-1,04 e 1,42-1,47	120,73
Neq543 (6)	1,05-1,11 e 1,47-1,50	120,64

Através do espectro de massas foi observado o fragmento referente à perda do grupo nitrílico em e m/z M-109, o que caracteriza o perfil de quebra semelhante aos outros compostos (Figura 3.17).

Figura 3.17: Espectro de massas dos compostos Neq0533 (5) e Neq0543 (6)

O espectro de infravermelho de Neq0533 (5) e Neq0543 (6) foram os únicos nos quais foi possível visualizar as bandas das duas amidas e as bandas relativas à nitrila 2242 e 2241 cm^{-1} respectivamente como demonstrado na Figura 3.17.

Figura 3.18: Espectros de infravermelho de Neq533 (5) e Neq543 (6)

Os alvos sintéticos deste trabalho foram sintetizados com sucesso em quatro etapas com rendimentos globais razoáveis (18-28%), como mostrado na

Tabela 3.5, as condições reacionais foram escolhidas com o intuito de serem de fácil execução, e principalmente de minimizar ao máximo a chance de racemização dos aminoácidos, utilizando reagentes específicos para inibição deste processo. As moléculas após sua caracterização foram ensaiadas quanto a sua capacidade de inibição da enzima Cruzaína.

Tabela 3.5: Rendimentos globais dos inibidores

Inibidor	Rendimentos globais
Neq414 (2)	18%
Neq419 (3)	11%
Neq415 (4)	22%
Neq533 (5)	28%
Neq543 (6)	24%

3.5.2 Determinação da atividade inibitória e a relação com as estruturas dos inibidores

Os compostos sintetizados foram testados diretamente contra a Cruzaína pelo método fluorométrico. Os valores de IC_{50} obtidos foram usados para o desenvolvimento de uma relação entre as modificações estruturais estabelecidas com as referidas atividades inibitórias.

Para a determinação dos parâmetros da atividade inibitória, é necessário definir a constante de Michaelis-Menten para o substrato ZFMCA, uma vez que esta constante representa a concentração do substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima de sua conversão em produto. Este parâmetro foi obtido avaliando a velocidade da reação em relação à quantidade de substrato em determinado intervalo de tempo e com a mesma concentração de enzima usada no ensaio (Figura 3.19)

Figura 3.19 Determinação de K_M do substrato ZFMCA para Cruzaína

Os valores das constantes cinéticas da enzima Cruzaína reportadas na literatura para este substrato são: K_M entre 0,96 e 1,4 μM .^{38, 39}. O K_M determinado para o substrato foi 1,7 nM, enquanto a concentração do substrato no ensaio é 2 μM . Isso garante que o sítio da enzima sempre se encontre ocupado atingindo a condição estabelecida por Michaelis e Menten. As curvas de dose-resposta obtidas e os valores de IC_{50} são demonstrados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Curvas de IC_{50} dos compostos sintetizados

Composto	Curva de dose-resposta	IC_{50} (uM)	pIC_{50}
Neq414 (2)	<p style="text-align: center;">Composto 2</p>	$0,318 \pm 2,7 \cdot 10^{-4}$	6,5

<p>Neq419 (3)</p>	<p>Composto 3</p>	$0,787 \pm 1,62 \cdot 10^{-8}$	6,10
<p>Neq415 (4)</p>	<p>Composto 4</p>	$0,157 \pm 4,02 \cdot 10^{-9}$	6,80
<p>Neq533</p>	<p>Composto 5</p>	$0,166 \pm 3,19 \cdot 10^{-9}$	6,77
<p>Neq543 (6)</p>	<p>Composto 6</p>	$0,607 \pm 1,26 \cdot 10^{-8}$	6,21

O composto Neq414 (2) apresentou IC_{50} igual a 318 nM enquanto a molécula Neq419 (3) 787 nM, evidenciando que o grupo 3-carboxi-5-tert-butil-2-metilpirazol realiza interações mais eficazes com S3. O composto Neq419 (3) foi sintetizado para avaliação da hipótese de uma formação de interação de halogênio com o sítio que provavelmente ocupa. Porém, apresentar valor de IC_{50}

inferior ao do Neq414 (**2**) pode significar que não tenha ocorrido essa interação ou então que ela seja menos efetiva que a interação realizada pelo grupo 3-carboxi-5-tert-butil-2-metilpirazol. No entanto sem a confirmação estrutural via cristalografia de raio X, não há como propriamente afirmar qual posição e orientação do grupo 3-bromopiridina.

Para avaliar a hipótese seguinte (inserção do cloro na posição *meta* do anel fenílico da fenilalanina) foi sintetizado o Neq415 (**4**). Ao realizar o ensaio fluorimétrico para a determinação da atividade inibitória, observou-se um IC₅₀ de 157 nM, caracterizando-o até o momento como o inibidor mais potente. Lembrando que o Cl nessa posição, para a Catepsina-L, realiza uma interação com a Leu69 que por sua vez fixa o anel fenílico em uma orientação altamente favorável. Sabendo que a Cruzaína também apresenta o mesmo sítio que a Catepsina-L era esperado o mesmo comportamento. O composto Neq415 (**4**), assim como Neq414 (**2**), apresenta o grupo 3-carboxi-5-tert-butil-2-metilpirazol e como Neq415 (**4**) mostrou melhor valor de IC₅₀, assume-se que o Cl desempenhou papel incremental na atividade inibitória explicitando um sinergismo entre as interações com S2 e S3 e possivelmente a formação da mesma conformação formada no sítio da Catepsina-L.

As interações entre os substituintes propostos para P2 e P3 foram sucedidas, para avaliação da substituição em P1 foi sintetizada o composto Neq533 (**5**), o substituinte foi escolhido devido a sua capacidade de diminuir a metabolização *in vivo* e não pelo tipo de interações que poderia formar com o sítio P1, contudo o IC₅₀ da molécula foi de 166 nM muito semelhante ao encontrado para a molécula Neq415 (**4**), o que evidencia a presença interações sinérgicas com S3 e S1 tão eficientes quanto em S2 e S3 presentes em Neq0415 (**4**).

O último passo do trabalho foi avaliar o efeito de todas as substituições no composto **6**. Ao realizar o estudo de inibição encontrou-se um valor de IC₅₀ igual 607 nM mostrando uma diminuição na potência da molécula frente os composto Neq415 (**4**) e Neq533 (**5**).

A diminuição da potência pode ser justificada pela forma de interação do composto com o sítio ativo da enzima não ser satisfatório, isso evidencia que as

modificações em P2 e P1 resultam em uma mudança na forma de interação do inibidor com o sítio enzimático, onde a conformação assumida pela molécula pode resultar na formação de interações intermoleculares do grupo 3-carboxi-5-tert-butil-2-metilpirazol e ciclopropila com os aminoácidos do sítio ativo seja menos efetiva do que as formadas por estes grupos separadamente.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a modificação da rota de obtenção dos compostos propostos foi bem sucedida e que os mesmos inibem em baixas concentrações a enzima alvo.

3.6 Conclusões

As moléculas propostas como inibidores da Cruzaína foram sintetizadas com sucesso em bons rendimentos, através da modificação de um já procedimento descrito na literatura. A modificação consistiu na utilização de cloretos de ácido para obtenção dos intermediários **11**, **12** e **13** que se equiparam ao procedimento usando HATU.

A determinação dos valores de IC_{50} demonstrou que o Neq414 (**2**) com grupo 3-carboxi-5-tert-butil-2-metilpirazol na posição P3 a inibição ocorre em menores concentrações a Cruzaína que o Neq419 (**3**) com o grupo 5-bromopiridina, mostraram também que a presença de um átomo de cloro em P2 em Neq415 (**4**) e de um radical ciclopropil em P1 em Neq533 (**5**) apresentam capacidade de inibição semelhante. Finalmente a observação que a junção de todas as modificações estruturais em Neq543 (**6**) resultou em uma leve perda de potência.

3.7 Parte experimental

3.7.1 Materiais

3.7.1.1 Síntese de inibidores

Os reagentes (S)-fenilalanina, cloreto de tionila, trietilamina, diisopropiletilamina, ácido 5-bromonicotínico, HATU foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich, os reagentes aminoacetociclopropilnitrila 3-cloro-Phe da empresa Chemimpex. Os solventes e sais inorgânicos foram comprados da empresa Vetec.

Os processos de purificação e separação por cromatografia de adsorção em coluna (CC) foram realizados utilizando sílica gel (70-230 mesh, 60A) como fase estacionária. O diâmetro e o comprimento das colunas variaram em função da massa de sílica (20 a 100 vezes a massa da amostra). As placas de cromatografia de adsorção em camada delgada de sílica (CCD) foram reveladas em luz UV 254 nm e iodo.

As análises de pontos de fusão dos compostos foram realizadas no aparelho Micro Químicamod MQAPF-302. Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro FT-IR BOMEN HARTMAN & BRAUN, modelo MB-102. Os estudos em UV-vis foram realizado em uma aparelho Shimadzu modelo 3300. Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas Micromass Platform LC, com interface de ionização à pressão atmosférica electrospray (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI). Os espectros de ressonância foram obtidos em Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear HP – 400 e 500 MHz.

3.7.1.2 Ensaios enzimáticos

Os reagentes fosfatos de sódio monobásico e dibásico, dimetilsulfóxido (DMSO), Triton-x100, ZFRMCA e Ditiotreitól (DDT) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Todos os reagentes têm certificação do fabricante de pureza > 99 %. Nenhuma purificação/avaliação da integridade adicional foi realizada.

Os experimentos fluorimétricos foram realizados no Laboratório de Química Medicinal de (NEQUIMED) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo (USP) utilizando o leitor de microplacas Synergy™HT da empresa Bio-Tek.

3.7.2 Métodos

3.7.2.1 Reação de esterificação

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, o aminoácido (5,0 mmol) foi solubilizado em Metanol (10,0 mL) e o sistema resfriado até 0 °C sob agitação, então o Cloreto de tionila (5,6 mmol) foi adicionado lentamente sem alterar a temperatura da reação. Após a adição, o sistema foi deixado até chegar à

temperatura ambiente, em seguida o sistema foi deixado sob-refluxo com agitação por 12 h. A reação foi finalizada com a evaporação do solvente até a formação de um composto oleoso o qual foi macerado na presença de Éter etílico (3,0 mL) formando o produto desejado.

<p style="text-align: center;">9</p>	<p>Sólido cristalino branco, 1,28 g (95 % de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 150° - 151°C (Lit158°C-162°C)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δppm) 7,22-7,35 (m, 5H), 4,20-4,24 (m, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,18-3,06 (m, 2H).</p> <p>EM (ESI-positivo) 180,1005 calculado 180,1024</p> <p>Fragmentação m/z 120 (100, M-59), m/z 103 (10, M-76).</p> <p>IV(KBr) 3023, 2834, 2707, 2620, 1745 cm⁻¹</p>
<p style="text-align: center;">10</p>	<p>Sólido branco 1,15 g (92% rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 93°-96°C.</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δppm) 8,71 (s, 2H), 7,20-7,37 (m, 4H), 4,32 (s, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,11-3,21 (m, 2H).</p> <p>EM (ESI-positivo) 214,0628 calculado 214,0634</p> <p>Fragmentação m/z 214 (10, M+1) 154 (100, M-59), 156 (perfil isotópico)</p> <p>IV(KBr) 3308, 3059, 2941, 1754 cm⁻¹</p>

3.7.2.2 Reação de N-Acilação

Em um balão de fundo redondo de duas bocas de 25 mL acoplado a um condensador de refluxo, o ácido (1,0 mmol) foi solubilizado em Tolueno seco (4,0 mL) para a adição do cloreto de tionila (10,0 mmol), após a adição o sistema foi deixado em refluxo por 3 h, com o fim do refluxo o solvente foi removido (com o cuidado de não deixar o sistema em contato com umidade) obtendo o cloreto de ácido, que foi então solubilizado em Diclorometano seco (2,0 mL). Em paralelo, foi preparada uma solução do éster do aminoácido

(1,0 mmol) e Trietilamina seca (2,0 mmol) em Diclorometano seco (4,0 mL). A solução foi deixada a 0°C sob agitação.

A solução contendo o cloreto de ácido foi então transferida através de uma cânula para a solução contendo o aminoácido (1,0 mmol) e a base a 0°C sob agitação. Após a transferência, o sistema foi deixado a temperatura ambiente sob agitação por 12 h. Com o fim da reação, o Diclorometano (16,0 mL) foi adicionado ao sistema e depois extraído com 1xHCl 0,1 M (20,0 mL), 1xNaHCO₃ (20,0 mL) e 1xNaCl_(sat). A fase orgânica foi então seca com Na₂SO₄, filtrada e evaporada. O produto foi purificado utilizando cromatografia de coluna utilizando como o eluente Hexano/Acetato de etila 60% resultando em sólido parafinado.

<p style="text-align: center;">11</p>	<p>Sólido transparente amorfo, 184,73 mg (43% rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 75°-76°C</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δppm) 7,28-7,33 (m, 3H), 7,14-7,12 (m, 2H), 6,33 (d, 7,13 1H), 6,25 (s, 1H), 4,97 -5,07 (m, 1H), 4,08 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 3,16-3,27 (m, 2H), 1,29 (s 9H).</p> <p>EM (ESI-positivo) 344,1964 calculado 344,1974</p> <p>Fragmentação m/z 344 (10, M+1), 284 (100, M-59), 228 (30, M-116), 165 (29, M-178), 109 (28, M-235).</p> <p>IV(KBr) 3296, 2959, 1743, 1658 cm⁻¹</p>
<p style="text-align: center;">13</p>	<p>Sólido transparente amorfo, 227,60 mg (53% rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 83-85°C</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δppm) 7,03- 7,25(m, 4H), 6,36(d, 6,37Hz, 1H), 6,29 (s, 1H), 4,97-5,02 (m,</p>

	<p>1H), 4,02 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,13-3,25 (m, 2H), 1,30 (s, 9H).</p> <p>EM (ESI-positivo) 378,1577 calculado 378,1584</p> <p>Fragmentação m/z 378 (20, M+1), 318 (100, M-59), 320 (perfil isotópico), 262 (25, M-116), 165 (50, M-192), 139 (17, M-238) 109 (70, M-249).</p> <p>IV(KBr) 3299, 3031, 2957, 1740 cm⁻¹</p>
<p>12</p>	<p>Sólido transparente cristalino, 238,14 mg (52% rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 93°-95°C</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δppm) 8,92(dd 2,12Hz 3,13Hz, 2H), 8,32 (t 2,09Hz, 1H), 7,42-7,44 (m, 3H), 7,24-7,26 (m, 2H), 6,70 (d, 7,30Hz, 1H), 5,13-5,19 (m, 2H), 3,34-3,37 (m, 2H).</p> <p>EM (ESI-positivo)363, 0347 calculado 363,0344</p> <p>Fragmentação m/z 303 (100, M-59), 305 (perfil isotópico),221 (20, M-150), 213 (perfil isotópico, 183(57, M-178), 185 (perfil isotópico)</p> <p>IV(KBr) 3294, 3028, 2962, 1741, 1655 cm⁻¹</p>

3.7.2.3 Reação de hidrólise

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, o éster do aminoácido N-acetilado (1,00 mmol) foi solubilizado em uma mistura de Tetrahydrofurano (1,00 mL), Metanol (0,50 mL) e Água (0,5 mL) sob agitação. Após a solubilização do composto, o Hidróxido de lítio (3,00 mmol) foi adicionado e a reação foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por duas horas.

Após o tempo estimado, foi verificado término da reação através de cromatografia de camada delgada usando como eluente Hexano/Acetato de Etila 60%, onde verificou o consumo do material de partida (R_f 0,5) e formação do produto desejado (R_f 0).

Com o fim da reação os solventes foram evaporados (sem que o sistema fosse aquecido a mais de 40°C) e o sal de lítio bruto foi usado para o próximo passo sem purificação.

3.7.2.4 Reação de acoplamento com aminonitrilas

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, o sal de lítio do aminoácido N-acilado (1,00 mmol), a Diisopropiletilamina (4,00 mL) e o agente de acoplamento HATU (1,00 mmol) foram solubilizados em Dimetilformamida (3,00 mL) sob agitação a temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, foi adicionada a aminoacetonitrila (1,00 mmol), com a adição da base a reação se tornou amarela límpida e foi deixada sendo deixado sob agitação por 20h.

Com o fim da reação foi adicionado Acetato de etila (15,00 mL), a reação então foi lavada com 5xÁgua (20,00 mL), em seguida extraída com 2xHCl 0,1 M (20,00 mL), 1xNaHCO₃ (20,00 mL) e 1xNaCl_(sat). A fase orgânica foi seca com NaSO₄, filtrada e o solvente evaporado. O produto obtido foi purificado através de cromatografia de coluna usando como eluente Hexano/ Acetato de Etila 40%.

<p>Neq414 (2)</p>	<p>Sólido branco 159,35 mg (43% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 160°-162°C</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δppm) 8,77 (t 5,54 1H), 8,57 (d 8,37Hz 1H), 7,15-7,29 (m, 5H), 6,75 (s, 1H), 4,59-4,65 (m, 1H), 4,13 (dd, 1,04; 5,59Hz 2H), 3,85 (s, 3H), 1,23 (s, 9H), 2,91-3,10 (m, 2H).</p> <p>RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 27,24 30,41 31,62; 36,74 38,52 54,05; 103,81 117,49 126,39 128,16 129,07 134,97 158,69 159,54</p>
---	---

	<p>171,75.</p> <p>EM (ESI-positivo) 368,2231 calculado 367,2008</p> <p>Fragmentação 284 (88, M-83), 228 (32, M-140), 165 (100, M-202), 109 (38, M-259).</p> <p>IV(KBr) 3307, 3069, 2958, 1664, 1630 cm^{-1}</p>
<p>Neq419 (3)</p>	<p>Sólido branco 83,52 mg (21% rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 179°-180°C</p> <p>RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6, δppm) 8,87-8,88 (d 9,05 1H), 8,83-8,86 (m 3H), 8,36 (t 8,37Hz 1H), 7,15-7,31 (m 5H), 4,68 (m 1H), 4,16 (dd 1,41Hz; 5,59Hz 2H), 2,92-3,20 (m, 2H).</p> <p>RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) 27,26 36,87 54,77 117,49 119,95 126,48 128,22 129,09 130,94 137,52 137,82 147,19 152,69 163,60 171,57.</p> <p>EM (ESI-positivo) 387,0461 calculado 368,0378</p> <p>Fragmentação 303 (100, M-83) 305 (perfil isotópico), 183 (60, M-202), 185 (perfil isotópico).</p> <p>IV(KBr) 3282, 3064, 2930, 1680, 1634 cm^{-1}.</p>
<p>Neq415 (4)</p>	<p>Sólido branco 183,90 mg (45% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 175°-177°C</p> <p>RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6, δppm) 8,79 (t 5,58Hz 1H), 8,61 (d 8,59Hz 1H), 7,22-7,29 (m 3H), 6,75 (s 1H), 4,59-4,64 (m 1H), 4,11 (dd 3,79;</p>

	<p>5,55 2H), 3,85 (s 3H), 2,90-15 (m, 2H), 1,23 (s 9H).</p> <p>RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) 27,68 30,82 32,04 36,72 38,87 54,17 104,25 117,90 126,83 128,25 129,61 130,42 133,10 135,39 140,95 159,16 159,99 171,88.</p> <p>EM (ESI-positivo) 402,1677 calculado 402,1618 Fragmentação 318 (100, M-83), 262 (15, M-83), 262 (15, M-140), 165 (38, M-236), 109 (12, M-283).</p> <p>IV(KBr) 3303 3062 2960 1661 1636 cm^{-1}</p>
<p>Neq533 (5)</p>	<p>Sólido branco 217,60 mg (55% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 168°-171°C</p> <p>RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) 9,00 (s 1H), 8,54 (d 8,17 1H), 7,16-7,26 (m 5H), 6,79 (s 1H), 4,51-4,56 (m 2H), 3,87 (s 3H), 2,90-3,07 (m, 2H), 1,45 (s 2H), 1,23 (s 9H), 0,98-1,04 (m 2H),</p> <p>RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) 15,68 19,77 30,44 31,65 36,92 38,54 53,95 103,69 120,73 126,46 128,16 129,17 134,99 137,64 158,75 159,51 172,45.</p> <p>EM (ESI-positivo) 394,2241 calculado 394,2243 Fragmentação 394 (19, M+1), 284 (100, M-109), 228 (15, M-166), 165 (90, M-242).</p> <p>IV(KBr) 3257, 3032, 2955, 2241, 1667, 1643 cm^{-1}</p>

<p style="text-align: center;">Neq543 (6)</p>	<p>Sólido branco 217,60 mg (47% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 182°-183°C</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δppm) 9,02 (s, 1H), 8,57 (d, 8,59Hz 1H), 8,31 (s, 1H), 7,21-7,38 (m, 4H), 4,50-4,56 (s, 1H), 3,87 (s, 3H), 2,89-3,09 (m, 2H), 1,24 (s, 9H), 1,05-1,11 (m, 1H).</p> <p>RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 15,63 15,68 19,77 30,38 31,60 36,39 36,43 53,64 79,16 103,83 120,60 126,40 127,86 129,16 129,96 132,64 134,94 140,27 158,69 158,45 172,11.</p> <p>EM (ESI) 394,2241 (M+H) 284,1763 228,1140 165,1025 109,0408.</p> <p>IV(KBr) 3259, 3047, 2960, 2242, 1681, 1641cm⁻¹</p>
---	---

3.7.2.5 Ensaios enzimáticos

Para o ensaio de determinação de IC₅₀ da Cruzaína as condições experimentais foram: Tampão fosfato de sódio 100 mM em pH 6,3, 100 mM de NaCl, 10 mM EDTA, 5,0 % v/v de DMSO, 5,0 mM de DTT e triton X-100 0,01 % v/v. A concentração da enzima foi 2,0 nM e do substrato ZFRMCA 2,0 μM.

O ensaio foi realizado em placa para fluorimetria de 96 poços, onde as concentrações dos inibidores nos ensaios variaram de 0,6 a 40000 nM em duplicata, partindo da maior para a menor concentração, utilizando diluições seriadas de 3 vezes. Após o preenchimento da placa com os inibidores, a solução contendo a enzima é dispensada por dispensador automatizado e deixada incubar por 5min. Após a incubação a solução contendo o substrato é

dispensada, iniciada a reação, a fluorescência é lida com excitação em 355 nm e emissão 460 nm durante 6 minutos. A velocidade foi determinada pela lei da velocidade inicial. Após a coleta dos dados as curvas de dose-resposta foram geradas com auxílio do programa Origin 7.0.

3.8 Referências

1. DRAG, M.; SALVESEN, G. S. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery* [S.l.], v. 9, n. 9, p. 690-701, 2010.
2. CUDIC, M.; FIELDS, G. B. Extracellular proteases as targets for drug development. *Current Protein & Peptide Science* [S.l.], v. 10, n. 4, p. 297-307, 2009.
3. MCKERROW, J. H. *et al.* PROTEASES IN PARASITIC DISEASES. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [S.l.], v. 1, n. 1, p. 497-536, 2006.
4. MCGRATH, M. E. *et al.* The Crystal Structure of Cruzain: A Therapeutic Target for Chagas' Disease. *Journal of Molecular Biology* [S.l.], v. 247, n. 2, p. 251-259, 1995.
5. TURK, D. *et al.* Revised Definition of Substrate Binding Sites of Papain-Like Cysteine Proteases. *Biological Chemistry*. v. 379. n. 21998. p. 137.
6. FARADY, C. J.; CRAIK, C. S. Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. *ChemBioChem* [S.l.], v. 11, n. 17, p. 2341-2346, 2010.
7. DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. *Current Medicinal Chemistry* [S.l.], v. 16, n. 24, p. 3174-3202, 2009.
8. WIGGERS, H. J. *Planejamento de Inibidores da Enzima Cruzaína de Trypanosoma cruzi: dos Ligantes aos Compostos Matrízes*. (2011). 173 f. (Doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
9. OTTO, H.-H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chemical reviews* [S.l.], v. 97, n. 1, p. 133-172, 1997.
10. ENGEL, J. C. *et al.* Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Experimental Medicine* [S.l.], v. 188, n. 4, p. 725-734, August 17, 1998 1998.
11. FLORENCI, V. G. *et al.* Dipeptidyl-alpha,beta-epoxyesters as potent irreversible inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain. *Bioorg Med Chem Lett* [S.l.], v. 17, n. 24, p. 6697-6700, 2007.

12. CHOE, Y. *et al.* Development of α -keto-based inhibitors of cruzain, a cysteine protease implicated in Chagas disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 13, n. 6, p. 2141-2156, 2005.
13. SCHIRMEISTER, T.; KAEPLER, U. Non-peptidic inhibitors of cysteine proteases. *Mini Reviews In Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 3, n. 4, p. 361-373, 2003.
14. CHIYANZU, I. *et al.* Synthesis and evaluation of isatins and thiosemicarbazone derivatives against cruzain, falcipain-2 and rhodesain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [S.I.], v. 13, n. 20, p. 3527-3530, 2003.
15. DU, X. *et al.* Synthesis and Structure–Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. *Journal of Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 45, n. 13, p. 2695-2707, 2002/06/01 2002.
16. WIGGERS, H. J. *et al.* Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. *PLoS Negl Trop Dis* [S.I.], v. 7, n. 8, p. e2370, 2013.
17. MOTT, B. T. *et al.* Identification and Optimization of Inhibitors of Trypanosomal Cysteine Proteases: Cruzain, Rhodesain, and TbCatB. *Journal of Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 53, n. 1, p. 52-60, 2010/01/14 2009.
18. BRAK, K. *et al.* Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain. *Journal of the American Chemical Society* [S.I.], v. 130, n. 20, p. 6404-6410, 2008/05/01 2008.
19. FRIZLER, M. *et al.* Development of nitrile-based peptidic inhibitors of cysteine cathepsins. *Current Topics In Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 10, n. 3, p. 294-322, 2010.
20. BETHEL, P. A. *et al.* Design of selective Cathepsin inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [S.I.], v. 19, n. 16, p. 4622-4625, 2009.
21. KENNY, P. W. Hydrogen Bonding, Electrostatic Potential, and Molecular Design. *Journal of Chemical Information and Modeling* [S.I.], v. 49, n. 5, p. 1234-1244, 2009/05/22 2009.
22. PLOWRIGHT, A. T. *et al.* Hypothesis driven drug design: improving quality and effectiveness of the design-make-test-analyse cycle. *Drug Discovery Today* [S.I.], v. 17, n. 1–2, p. 56-62, 2012.
23. ASAAD, N. *et al.* Dipeptidyl nitrile inhibitors of Cathepsin L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [S.I.], v. 19, n. 15, p. 4280-4283, 2009.
24. HARDEGGER, L. A. *et al.* Systematic Investigation of Halogen Bonding in Protein–Ligand Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* [S.I.], v. 50, n. 1, p. 314-318, 2011.

25. GAUTHIER, J. Y. *et al.* The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [S.I.], v. 18, n. 3, p. 923-928, 2008.
26. COOPER, T. W. J. *et al.* Factors Determining the Selection of Organic Reactions by Medicinal Chemists and the Use of These Reactions in Arrays (Small Focused Libraries). *Angewandte Chemie International Edition* [S.I.], v. 49, n. 44, p. 8082-8091, 2010.
27. SUZUE, S.; IRIKURA, T. Studies on Hepatic Agents. I. Synthesis of Aminoacyl (and Hydroxyacyl) Aminoacetonitriles. *Chemical & pharmaceutical bulletin* [S.I.], v. 16, n. 8, p. 1417-1432, 1968/08/25 1968.
28. GUAY, D. *et al.* Design and synthesis of dipeptidyl nitriles as potent, selective, and reversible inhibitors of cathepsin C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [S.I.], v. 19, n. 18, p. 5392-5396, 2009.
29. ALTMANN, E. *et al.* Dipeptide nitrile inhibitors of cathepsin K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [S.I.], v. 16, n. 9, p. 2549-2554, 2006.
30. LÖSER, R. *et al.* Interaction of Papain-like Cysteine Proteases with Dipeptide-Derived Nitriles†. *Journal of Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 48, n. 24, p. 7688-7707, 2005/12/01 2005.
31. BONDEBJERG, J. *et al.* Dipeptidyl nitriles as human dipeptidyl peptidase I inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [S.I.], v. 16, n. 13, p. 3614-3617, 2006.
32. LI, J. *et al.* Aminoacylpyrrolidine-2-nitriles: Potent and Stable Inhibitors of Dipeptidyl-Peptidase IV (CD 26). *Archives of Biochemistry and Biophysics* [S.I.], v. 323, n. 1, p. 148-154, 1995.
33. WARD, Y. D. *et al.* Design and Synthesis of Dipeptide Nitriles as Reversible and Potent Cathepsin S Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 45, n. 25, p. 5471-5482, 2002/12/01 2002.
34. GREENSPAN, P. D. *et al.* Identification of Dipeptidyl Nitriles as Potent and Selective Inhibitors of Cathepsin B through Structure-Based Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 44, n. 26, p. 4524-4534, 2001/12/01 2001.
35. MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* [S.I.], v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005.
36. COPELAND, R. A. Lead Optimization and Structure–Activity Relationships for Reversible Inhibitors *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*. John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 169-201.
37. LIMA, A. P. C. A. *et al.* Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility

to inhibitors. *Molecular and Biochemical Parasitology* [S.I.], v. 114, n. 1, p. 41-52, 2001.

38. ALVES, L. C. *et al.* Analysis of the S2 subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of *Leishmania mexicana*, and cruzain of *Trypanosoma cruzi*, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. *Molecular and Biochemical Parasitology* [S.I.], v. 117, n. 2, p. 137-143, 2001.

39. MARTINEZ, J. *et al.* Carboxamidomethyl esters (CAM esters) as carboxyl protecting groups. *Tetrahedron Letters* [S.I.], v. 24, n. 47, p. 5219-5222, 1983.

40. DA COSTA, C. F. *et al.* Synthesis and Antitubercular Activity of Novel Amino Acid Derivatives. *Chemical Biology & Drug Design* [S.I.], v. 79, n. 2, p. 216-222, 2012.

41. GERRARD, W.; THRUSH, A. M. 433. Reactions in carboxylic acid-thionyl chloride systems. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* [S.I.], n. 0, p. 2117-2120, 1953.

42. GONZÁLEZ, A. S. *et al.* Copper(I)-Fesulphos Lewis Acid Catalysts for Enantioselective Mannich-Type Reaction of N-Sulfonyl Imines. *Organic Letters* [S.I.], v. 8, n. 14, p. 2977-2980, 2006/07/01 2006.

43. THEODOROU, V. *et al.* A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters* [S.I.], v. 48, n. 46, p. 8230-8233, 2007.

44. VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* [S.I.], v. 38, n. 2, p. 606-631, 2009.

45. EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chemical reviews* [S.I.], v. 111, n. 11, p. 6557-6602, 2011/11/09 2011.

Capítulo 4

Síntese de inibidores da enzima DHODH

4 Síntese de inibidores da Diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH)

4.1 TcDHODH

As enzimas DHODHs (E.C. 1.3.3.1) são responsáveis pela quarta reação da via de síntese *de novo* de pirimidinas, uma das principais vias de síntese de nucleotídeos.¹ As vias de obtenção de nucleotídeos são divididas em dois tipos, as vias de salvação que iniciam com intermediários do próprio metabolismo destas moléculas e as vias de síntese *de novo* que partem de moléculas mais simples como glicose e aminoácidos.²

A síntese *de novo* de pirimidinas é uma via indispensável principalmente durante a duplicação celular. A rota metabólica se inicia com a síntese do Carbamoil-fosfato a partir de uma molécula de glutamato e uma molécula de bicarbonato com o consumo de duas moléculas de Adenosina trifosfato (ATP), catalisada pela enzima Carbamoil-fosfato sintetase (CFSase). O Carbamoil-fosfato reage com uma molécula de aspartato formando o Carbamoil-aspartato pela ação da enzima Aspartato transcarbamilase (ATCase). O Carbamoil-fosfato é então convertido em (S)-Diidroorotato pela enzima Diidroorotase. A quarta etapa da reação é a produção de Orotato pela redução de uma molécula de (S)-Diidroorotato catalisada pela Diidroorotato-desidrogenase (DHODH). Após isso, a orotato-fosforibosiltransferase (OFT) liga uma molécula do açúcar fosforibosil fosfato (PRPP) à molécula de Orotato que é finalmente convertida em uridina monofosfato pela descarboxilação catalisada pela orotidina monofosfato descarboxilase (OMP descarboxilase) completando as etapas da via.³

Esquema 4.1: Síntese de novo de pirimidina.

Fonte: Adaptado de MUNIER-LEHMANN, H. *et al.* On Dihydroorotate Dehydrogenases and Their Inhibitors and Uses. *Journal of Medicinal Chemistry* [S.l.], v. 56, n. 8, p. 3148-3167, 2013/04/25 2013

Embora as enzimas DHODHs tenham o mesmo papel em organismos diferentes, elas possuem diferença estrutural significativa, que resulta na sua divisão em duas classes, 1 e 2.⁴

As enzima da classe 1 são citosólicas possuindo uma cisteína catalítica sendo subdivididas em 1A que são dímeros onde o aceitador final de elétrons é o Fumarato (FUM), enzimas do tipo 1B que são heterotetrâmeros onde a nicotinamida fosfato (NAD) serve como aceitador de elétrons e recentemente foi descrito uma nova classe chamada 1S que apesar ser citosólica possui uma serina catalítica. As enzimas da classe 2 são proteínas monoméricas de membrana (em virtude disso possuem uma alça N-terminal para ancoragem), e ao invés da cisteína ela apresenta um resíduo de serina catalítico. Os aceitadores de elétrons, para essa classe, são e derivados de quinonas. Normalmente as enzimas da classe 2 são encontradas em mamíferos.⁵

A enzima *TcDHODH* pertence a classe 1A, sendo constituída por 313 resíduos de aminoácidos com aproximadamente 68kDa em arranjo cristalino. Cada monômero tem a forma de um barril α/β formado por oito hélices- α (α 1-8) e oito folhas beta (β 1-8), possuindo um alto grau de homologia com as enzimas de *Lactococcus lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo. Uma característica estrutural importante desta enzima é a presença de uma alça flexível constituída pelos resíduos 128-135 chamada de loop β 4- α 4 que é

responsável pela entrada e saída de substratos e produtos da reação catalisada pela enzima. O sítio catalítico da enzima TcDHODH está enterrado no barril junto ao cofator sendo formado pelo aminoácido catalítico Cys130 em conjunto com os aminoácidos Lys43, Asn67, Gly70, Asn127, Asn 132, Asn 194, Met69, Leu71 e Ser195.^{6 7} As estruturas da enzima e sítio ativo estão demonstradas na Figura 4.1

Figura 4.1 a) Estrutura da TcDHODH b) Interações entre os aminoácidos do sítio ativo da TcDHODH e seu substrato DHO

Fonte: INAOKA, D. K. *et al.* Structures of *Trypanosoma cruzi* Dihydroorotate Dehydrogenase Complexed with Substrates and Products: Atomic Resolution Insights into Mechanisms of Dihydroorotate Oxidation and Fumarate Reduction†‡. *Biochemistry* [S.l.], v. 47, n. 41, p. 10881-10891, 2008/10/14 2008.

O mecanismo de conversão de (S)-Diidroorotato em orotato ocorre com a abstração do próton do C₅ pela Cys130 e consequentemente transferência para uma molécula de água, concomitante ao a saída do hidrogênio como próton, o hidrogênio do C₆ é transferido na forma de hidreto a um dos nitrogênios do anel isoaloxazínico (estabilizado pelos aminoácidos Lys43 e Lys164) dando origem ao orotato e reduzindo o cofator. Após sua formação, o orotato deixa o sítio para

a entrada do fumarato, o aceitador final de elétrons, que sofre o ataque do hidreto do cofator reduzido em sua insaturação, consequentemente causando a desprotonação da Cys130, formando o succinato e regenerando o aminoácido catalítico.⁷ O esquema 4.2 mostra o mecanismo proposto para a este tipo de catálise.

Esquema 4.2: Mecanismo proposto para a reação catalisada pela enzima TcDHODH

Fonte: ROCHA, J. R. *Planejamento de Inibidores das enzimas Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase e Diidroorotato Desidrogenase de Trypanosoma cruzi*. (2010). 201 f. (Doutorado) - IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

A importância da TcDHODH pode ser verificada através do estudo realizado por Annoura *et. al.* (2005) onde o gene responsável pela codificação da enzima foi suprimido, o que resultou na morte do parasita mostrando que, mesmo com a via de salvação das pirimidinas, o parasita é incapaz de sobreviver sem a TcDHODH, o que justifica sua utilização como alvo.⁸

4.1.1 Inibidores

Os inibidores clássicos das enzimas DHODHs são análogos ao seu inibidor natural, o orotato. Entre os inibidores mais conhecidos desta classe de

enzimas, se destacam a Lefunomida e o Braquinar, ambos desenvolvidos para interagir no sítio da Ubiquinona (ausentes na classe 1A) da enzima HsDHODH. A Leflunomida é um agente imunossupressivo que age como pró-fármaco sendo convertida *in vivo* ao metabólito ativo Teriflunomida que é responsável pela a inibição reversível da enzima. O Brequinar foi desenvolvido como agente tumoral sendo um dos inibidores mais ativos contra a enzima, mas que não demonstrou atividade esperada em ensaios *in vivo*.^{9,10}

Recentemente foi descrito por Cheleski *et al* (2010) uma série de inibidores da enzima TcDHODH, levantando a hipótese de uma inibição seletiva da enzima do parasita frente a de humanos.¹¹ Estes resultados foram a base para o planejamento de moléculas como inibidores da enzima TcDHODH neste trabalho.

4.2 Planejamento de inibidores para TcDHODH

Apesar da baixa similaridade da sequência primária de aminoácidos das enzimas DHODH de humanos e do parasita *T. cruzi*, o sítio ativo apresenta uma similaridade de 77%. Logo a busca de inibidores mais específicos para a enzima do parasita deve se focar em outras regiões. Partindo deste princípio, Rocha, J.R. (2010) realizou uma busca por cavidades com propriedades similares a sítios usando estruturas cristalográficas disponíveis de ambas as enzimas. A análise resultou na identificação de 5 regiões da estrutura da TcDHODH (S1 catalítico, S2, S3, S4 e S5), que foram consideradas como regiões potenciais para o planejamento de inibidores. Entre as regiões identificadas, observou-se que apenas na TcDHODH o sítio S2 encontra-se presente. O mesmo é separado do S1 pela alça α -4/ β -4 característica marcante da classe 1A. O sítio S3 está presente nas duas enzimas possuindo também semelhança entre eles, já o S4 e o S5 são encontrados apenas na enzima do parasita.^{12,13} As regiões identificadas são representadas na Figura 4.2.

Figura 4.2 Regiões do sítio ativo da enzima TcDHODH

Fonte: CHELESKI, J. *et al.* Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* [S.l.], v. 45, n. 12, p. 5899-5909, 2010.

As características do sítio S2 o tornam o alvo mais promissor para a busca de inibidores seletivos para a TcDHODH. Isso ficou evidente no trabalho desenvolvido por Cheleski *et al* (2010), onde foi demonstrada a influência na modificação da estrutura do orotato com o objetivo de atingir o sítio S2. De acordo com a interação do orotato com o sítio (Figura 4.1(b)), foram propostas alterações em duas posições: no carbono C5 e no C7. Os estudos mostraram que a substituição no C5 pelo aumento do potencial inibitório das moléculas.¹¹

Com base nestes resultados, a hipótese de exploração do sítio S2 através do aumento do substituinte no C5 do orotato foi avaliada usando segunda geração de moléculas.¹³ A segunda geração de inibidores com diferentes núcleos heterocíclicos e substituintes foram planejados adquiridos e testados contra a enzima TcDHODH para determinação das respectivas constantes de inibição, o que resultou na identificação de um inibidor com a constante de inibição na ordem de alto nanomolar o composto Neq71.¹³

A identificação do Neq71 como um inibidor da enzima TcDHODH ($K_i = 120$ nM.), levou a busca de novos análogos.¹³ Nesta nova série os compostos

apresentaram constantes de inibição menores que 60 μM , exceto o Neq130 ($K_i = 190 \text{ nM}$).

Figura 4.3 Estrutura do composto Neq71 e Neq130

Fonte: CHELESKI. *Planejamento de Inibidores da Enzima Diidroorotato Desidrogenase de Trypanosoma cruzi por biocalorimetria*. (2011). 157 f. (Doutorado) - IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Devido ao grande potencial dos dois inibidores, o ponto de partida deste trabalho foi a síntese dos inibidores mais potentes (Neq71 e Neq130) usando métodos simples. Em segundo lugar, foi sintetizar o Neq393 análogo do Neq130, substituindo o tiofeno por uma fenila com o objetivo de avaliar o efeito do biososterismo na afinidade pela enzima.

Outro ponto avaliado foi a importância das insaturações desta classe de moléculas. Para isso, foram sintetizados os compostos Neq395, Neq298 e Neq394 através da redução seletiva da insaturação exocíclica ao anel pirimidinotriônico. Uma vez avaliada a importância da dupla ligação exocíclica, o próximo passo foi a investigar a importância do comprimento da cadeia carbônica destes derivados para a afinidade da molécula através da síntese de Neq542, Neq421 e Neq420^{14, 15}

Figura 4.4 Estrutura dos compostos propostos como inibidores da TcDHODH

4.3 Síntese dos derivados 5-arilidenobarbitúricos

Os inibidores Neq71, Neq130 e Neq393 e as moléculas Neq542, Neq421 e Neq420 possuem em sua estrutura uma insaturação no C5 do anel que está conjugada a um anel aromático sendo classificados como derivados 5-arilidenobarbitúricos, este tipo de ligação é construída através da reação do ácido barbitúrico com um aldeído através de uma condensação do tipo Knoevenagel.¹⁵

A condensação de Knoevenagel é uma variação das reações de condensação aldólica, onde o ataque nucleofílico à carbonila do aldeído parte de um grupo metileno vicinal a grupos retiradores de elétrons. Esta é normalmente catalisada por uma base. Após a desprotonação do metileno, ocorre um ataque nucleofílico à carbonila do aldeído resultando em um intermediário hidroxilado que rapidamente sofre uma desidratação formando uma dupla ligação e liberando uma molécula de água como demonstrado no Esquema 4.3.¹⁶

Esquema 4.3: Mecanismo da condensação de Knoevenagel.

Fonte: LIST, B. Emil Knoevenagel and the Roots of Aminocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition* [S.l.], v. 49, n. 10, p. 1730-1734, 2010.

A condensação de aldeídos com o ácido barbitúrico é descrita com sucesso para aldeídos aromáticos e aldeídos aromáticos alfa-beta insaturados. Contudo, essa reação parece não funcionar para aldeídos alifáticos.¹⁴ Uma grande diversidade de condições reacionais está descritas para a obtenção destes tipos de derivados barbitúricos e são as seguintes: reações com catalisador^{16 17 18}, sem catalisador^{19 20 21}, em líquidos iônicos¹⁸, sem utilização de solvente^{19 20} e através de micro-ondas²⁰. Uma das abordagens mais interessantes é a simples utilização de um meio aquoso com aquecimento brando seguido da filtração do produto para separação do meio reacional.^{21 22} Apesar de essa abordagem ser descrita apenas para aldeídos aromáticos, ela foi aplicada também para os aldeídos aromáticos alfa-beta insaturados.

Esquema 4.4: Obtenção de derivados 5-arilidenobarbitúricos.

A utilização de um agente redutor brando, na redução de olefinas, só foi possível devido a alta polarização da insaturação exocíclica, que possui densidade positiva considerável no carbono arilidênico favorecendo o ataque nucleofílico pelo hidreto.²³ Embora o composto Neq394 possa ser obtido através da redução da dupla insaturação em altas temperaturas e na presença de ácido

fórmico²⁴, a utilização do borohidreto de sódio (NaBH_4), como agente redutor, na redução das moléculas Neq0542 e Neq0420 é descrita na literatura em condições brandas. No presente trabalho, foi realizada a tentativa de uma redução seletiva da insaturação exocíclica no sistema de dienos conjugados dos inibidores Neq71 e Neq393 na presença do borohidreto de sódio.²²

Esquema 4.5: Redução seletiva da insaturação exocíclica.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Síntese e caracterização dos compostos 5-arylidenobarbitúricos

Os derivados 5-arylideno-barbitúricos foram obtidos com sucesso utilizando uma condição amena, sem a presença de catalisador e em baixas temperaturas, que proporcionaram altos rendimentos.

Esquema 4.6: Reação de condensação de Knoevenagel.

A acidez do ácido barbitúrico (pK_a 4,0) possibilitou sua desprotonação na presença de água formando uma espécie nucleofílica capaz de atacar a

carbonila. O intermediário hidroxilado formado possui um segundo hidrogênio ácido que facilita a sua desidratação resultando na formação da insaturação exocíclica.

Os compostos formados perderam, consideravelmente, sua solubilidade em meio aquoso causando sua precipitação. Isso, além de deslocar o equilíbrio da reação no sentido da formação do produto, permite sua separação do meio reacional.

Esquema 4.7: Mecanismo de condensação do ácido barbitúrico com aldeídos.

A caracterização estrutural dos derivados diinsaturados foi realizada pela análise de seu espectro de RMN¹H (Figura 4.6), onde foi possível visualizar dubletos na região de $\delta = 7,90 - 8,00$ ppm com $J_1=16\text{Hz}$ e 12Hz que são referentes aos hidrogênios das insaturações exocíclicas formadas. Nestes espectros, também foram observados duplo-dubletos em $\delta 8,00-8,50$ com valores de J_1 12Hz e J_2 de 16Hz que são característicos de insaturações de isomeria *E*, demonstrando que as condições da reação não afetam a estereoquímica das moléculas.

Figura 4.5 Espectros de RMN dos compostos Neq71, Neq130 e Neq393.

A análise do espectro de massas (Figura 4.7) dos compostos Neq71, Neq130 e Neq0393 possibilitou a identificação do pico íon molecular. Os picos de m/z 188 e m/z 198 caracterizam a perda de um grupo formamida tanto para o composto 1, quanto para o composto 2, respectivamente. Com tais evidências, ficou explícito que o produto proposto foi obtido com sucesso.

Figura 4.6 Espectro de massas dos compostos Neq71, Neq130 e Neq0393.

Os compostos Neq542, Neq421 e Neq0420 foram caracterizados com sucesso, uma vez que em seus espectros de RMN¹H (Figura 4.8), foi possível identificar singletos de δ 8,00 - 8,30 referentes aos hidrogênios da insaturação exocíclica formada.

Figura 4.7 Espectro de RMN das moléculas Neq0542, Neq421 e Neq0420.

A confirmação da estrutura dos compostos Neq542, Neq421 e Neq420 também foi realizada pela verificação no espectro de massas (Figura 4.8). Como são compostos análogos ao Neq71, Neq130 e Neq393, o mesmo padrão de fragmentação deve ser observado. Ao avaliar-se o EM para os compostos em questão, foi possível observar os picos do íon molecular e o correspondente ao fragmento resultante da perda de uma molécula de formamida (m/z 162, 177 e 172) para ambas as moléculas.

Figura 4.8 Espectro de massas de Neq542, Neq421 e Neq420.

Assim como para os compostos Neq71, Neq130 e Neq393, a obtenção de Neq542, Neq421 e Neq420 também foram realizadas com sucesso, e a adaptação do método descrito proporcionou bons rendimentos (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Rendimentos das reações de obtenção dos derivados barbitúricos

Composto	Rendimento obtido	Rendimento literatura
Neq71	95%	95 ¹⁹ e 97% ¹⁵
Neq130	80%	90% ²¹
Neq393	82%	76 ¹⁸ , 86 ²¹ , e 95% ^{15,19}
Neq542	87%	80 ¹⁸ e 81% ¹⁵
Neq421	95%	87% ²⁰
Neq420	93%	85 ¹⁵ , 95 ^{19,22} e 98% ²³

Os rendimentos obtidos para os 5-aridilenobarbitúricos mostraram-se equivalentes aos encontrados na literatura, independente das condições usadas, o que denota que o método utilizado neste trabalho além de promover a rápida e fácil obtenção dos compostos, ocorreu com ótimos rendimentos.

4.4.2 Redução dos 5-arilidenobarbitúricos

As reações para redução específica da insaturação exocíclica realizada através da utilização de NaBH_4 em etanol à temperatura ambiente, foram sucedidas resultando nos compostos Neq0395, Neq298 e Neq394.

Esquema 4.8: Reação de redução da insaturação exocíclica.

A redução via borohidreto de sódio inicia-se com o ataque nucleofílico do hidreto ao carbono alfa ao anel barbitúrico, pois como discutido previamente é consideravelmente eletrofílico²³. Com o ataque, um intermediário carregado negativamente é formado, e o mesmo mostra-se muito estável graças a tautomeria do anel pirimidinotriônico²⁵ que distribui a carga entre seus átomos. Essa característica também é usada para explicar o caráter ácido deste composto heterocíclico. O intermediário é então convertido ao produto final pela simples protonação em meio ácido, levando a precipitação do meio reacional que permite sua separação da reação.

Esquema 4.9: Mecanismo da redução via borohidreto de sódio.

As estruturas de Neq0395, Neq298 e Neq0394 foram confirmadas pelos espectros de RMN¹H (Figura 4.10) onde foi possível identificar os hidrogênios dicarboxílicos do anel barbitúrico. Estes hidrogênios, em virtude de seu acoplamento com os hidrogênios do carbono alfa ao anel barbitúrico, aparecem no espectro como tripletos com δ 3,7-3,8 ppm com J_1 igual a 4,0 Hz. Nos espectros também foram observados tripletos relativos a dois hidrogênios na região de δ 2,8-3,0 com valores de J_1 4,0Hz. Estes sinais pertencem aos hidrogênios do carbono que sofre o ataque nucleofílico do hidreto. Outro ponto importante na caracterização foi a permanência de picos de hidrogênios vinílicos δ 6,0 – 6,5 mostrando que a redução foi seletiva para a posição desejada.

Figura 4.9 Espectros de RMN dos compostos Neq395, Neq298 e Neq394.

Embora os compostos Neq395, Neq298 e Neq0394 nas condições da reação sejam solúveis durante a reação de redução, eles apresentam solubilidade muito restrita, mesmo em condições básicas, onde se espera que ocorra a formação do ânion. A solubilidade só possível com a utilização do solvente DMSO, o que impossibilitou a obtenção do espectro de massa destes compostos, contudo a identificação no espectro de RMN¹H dos hidrogênios adicionados à molécula e a conservação daqueles presentes na insaturação resultaram na caracterização sucedida dos compostos.

O composto Neq395 foi obtido em 74% de rendimento, enquanto o composto Neq298 em 72% e o Neq394 em 69%, como citado anteriormente o composto Neq395 pode ser obtido através da redução via ácido fórmico onde o rendimento é de 81%. Embora o rendimento seja maior frente ao método utilizado, a rapidez do processo e a acessibilidade dos reagentes vão mais de encontro com o tipo de reações a serem empregadas no âmbito da Química Medicinal.

4.4.3 Determinação da atividade inibitória e a relação com as estruturas dos inibidores

As constantes de inibição (K_i) dos compostos sintetizados como inibidores da TcDHODH foram obtidas e a análise dos resultados revela a importância de determinadas características estruturais para o reconhecimento molecular.

Através dos valores de K_i mostrados na Tabela 4.2 podemos perceber a importância da dupla ligação exocíclica para a afinidade dos compostos pela TcDHODH. A redução dos compostos Neq71, Neq130 e Neq393 resultou em uma perda significativa da potência dos compostos Neq395, Neq298 e Neq394 (70-280 vezes), mostrando que a presença do carbono eletrofílico vicinal ao anel barbitúrico resulta em interações cruciais com o sítio da enzima. Outro ponto observado foi que os anéis heterocíclicos furano e tiofeno parecem favorecer mais a interação do que o anel benzênico, podendo observar esta tendência para as três modificações realizadas.

Os valores de K_i encontrados para os derivados 5-arilmetilidenobarbitúricos contendo um apenas um carbono entre o anel

pirimidinotriônico e o substituinte aromático (Neq542, Neq421 e Neq420), demonstraram que o encurtamento da cadeia dos derivados 5-arilpropilidenobarbitúricos contendo três carbonos entre os dois anéis resulta também em uma perda de potência (16-25 vezes) e, para o caso do Neq420, a queda abrupta da afinidade em relação aos demais compostos, provavelmente devido ao efeito estérico do anel de seis membros com o sítio da proteína.

Tabela 4.2: Curvas de K_i dos compostos sintetizados

Composto	Valor de K_i (μM)	Desvio	$\text{p}K_i$
Neq71	0,292	0,01	6,53
Neq130	0,362	0,02	6,44
Neq393	0,896	0,04	6,04
Neq395	69,8	2,70	4,15
Neq298	26,8	3,60	4,57
Neq394	248,4	13,5	3,6

Neq542	7,3*	0,28	5,13
Neq421	6,6*	0,35	5,18
Neq420	Inativa	-	-

* = K_i^{app} determinado a uma concentração de 5 μ M do inibidor

A avaliação das modificações moleculares realizadas nos derivados 5-propilidenobarbitúricos comprovou a importância da instauração exocíclica para interação destes inibidores com a enzima, contudo a presença do carbono eletrófilico desta insaturação é uma característica indesejável em composto protótipo uma vez que esta posição pode ser alvo de ataques nucleofílicos de forma não seletiva por outras proteínas. Em virtude disso, com o intuito de alterar esta característica foi proposto um novo esqueleto para substituição deste sistema, a (Z)-5-(carboximetilideno)-hidantoína (Neq0411) que pode ser usado como base para modificações estruturais com o objetivo de alcançar as interações com o sitio S2 da TcDHODH já validado através da série avaliada neste trabalho.

4.4.4 Síntese e determinação da atividade inibitória do Neq411

As vias de síntese do ácido orótico, em sua maioria partem de compostos acíclicos, que são ciclizados primeiramente em um intermediário de cinco membros, a (Z)-5-(carboximetilideno)-hidantoína (Neq411) demonstrado no Esquema 4.10, um isômero constitucional do ácido orótico, que é posteriormente convertido no anel de seis membros do orotato em meio básico com aquecimento.^{26,27}

A síntese do composto Neq411 foi realizada com sucesso em uma etapa partindo do ácido 5-hidantoinacético utilizando o método descrito por Bruce et. al., que consiste na reação de bromação/desidrobromação utilizando bromo em ácido acético.²⁸

Esquema 4.10: Síntese do Neq411

Fonte: BRUCE, M. J. *et al.* Formation of N-carbamoylaspartic acid and its cyclisation to orotic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* [S.I.], n. 2, p. 319-321, 1994.

O valor da constante de inibição encontrado para o Neq411 foi $13,0 \pm 0,7$ μM , foi um valor muito próximo ao obtido para o orotato $K_i = 11,2 \pm 1,2$ o inibidor natural da enzima TcDHODH, a proximidade dos valores das constantes mostra que composto é um promissor esqueleto para busca de novos inibidores, podendo ser considerado como bioisómero do orotato além de ser seu isômero constitucional.

4.5 Conclusões

Todos os compostos propostos foram sintetizados em procedimentos simples em bons rendimentos e caracterizados com sucesso. A sua obtenção e a caracterização permitem que suas constantes de inibição sejam posteriormente determinadas, permitindo a análise das hipóteses levantadas.

A análise das constantes de inibição dos compostos sintetizados mostrou que tanto a instauração exocíclica quanto o tamanho da cadeia lateral dos derivados 5-arilpropilidenobarbitúricos são essenciais para afinidade das moléculas com a enzima.

Finalmente a proposta de substituição do esqueleto barbitúrico pelo Neq411 mostrou uma boa opção uma vez que a constante de inibição desta estrutura se aproxima muito de inibidores clássicos desta enzima.

4.6 Parte experimental

4.6.1 Materiais

4.6.1.1 Síntese de compostos

Os reagentes Furfuralacroleína, cinamaldeído, Furfuraldeído, Benzaldeído e Borohidreto de sódio, ácido 5-hidantoínoacético e bromo foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich, o ácido barbitúrico da empresa Merck. Os solventes e sais inorgânicos da empresa Vetec.

Os processos de purificação e separação por cromatografia de adsorção em coluna (CC) foram realizados utilizando-se gel de sílica ACROS 70-230 mesh como fase estacionária. O diâmetro e o comprimento das colunas variaram em função da massa de sílica (20 a 100 vezes a massa da amostra). As placas de cromatografia de adsorção em camada delgada (CCD) de sílica foram reveladas em luz UV 254nm e/ou vanilina seguida de aquecimento. Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu modelo GCMS-QP5000, 99604

As análises Pontos de Fusão dos compostos foram determinados em aparelho Franz Küstner Nachf KG mod. Dresden HMK 69/2681. Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro FT-IR Shimadzu modelo 3300 onde as frequências das absorções foram expressas em números de onda (cm⁻¹). Os espectros de massas foram obtidos em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu modelo GCMS-QP5000, 99604.

4.6.2 Métodos

4.6.2.1 Condensação de Knoevenagel

Em um balão de fundo redondo de 25 mL o Ácido barbitúrico (1,0 mmol) foi solubilizado sob agitação em água (10,0 mL) a 60°C, em paralelo uma solução do aldeído (1,2 mmol) em Etanol (2,0 mL) à temperatura ambiente. Após a solubilização total do Ácido barbitúrico, o aldeído foi adicionado foi observado o início da formação de um precipitado colorido, após a adição, a reação foi deixada a 60°C sob agitação por 30 min.

Com o fim da reação o sólido foi filtrado e lavado com 2xH₂O a 60°C (5,0 mL) e 2xAcetato de etila (5,0 mL). O produto obtido foi purificado através de recristalização.

<p>Neq71</p>	<p>Sólido vermelho, 0,22 g (95% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 263°C (Lit 260°-261°C)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 11,17 (s, 1H), 11,11 (s, 1H), 8,13 (dd, 12Hz e 16Hz, 1H), 7,93 (m, 2H), 7,48 (d, 16Hz, 1H), 6,99 (d, 4Hz, 1H), 6,68 (m, 1H).</p> <p>EM (ESI-Negativo) 231,0432 Fragmentação m/z 231 (100, M-1), m/z 188 (25 M-43)</p>
<p>Neq130</p>	<p>Sólido vermelho, 0,20g (80% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão 240°C (Lit 240-242°C)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 11,18 (s, 1H), 11,18 (s, 1H), 8,11 (dd, 12Hz e 16Hz, 1H), 7,92 (d, 12Hz, 1H), 7,82 (m, 2H), 7,49 (d, 4Hz, 1H), 7,17 (m, 1H).</p> <p>EM (ESI-Negativo) 247,0170 Fragmentação m/z 247 (100, M-1), m/z 204 (20, M-43)</p>
<p>Neq393</p>	<p>Sólido amarelo, 0,20 g (82% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 257°-259°C (Lit 260°-261°C)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 11,28 (s, 1H), 11,23 (s, 1H), 8,42 (dd, 12,0Hz, 16Hz, 1H), 8,01(d, 12Hz, 1H), 7,48–7,76 (m, 6H).</p> <p>EM (ESI-Negativo) 241,0638 Fragmentação m/z 241 (100, M-1), m/z 198(19, M-43).</p>

<p>Neq542</p>	<p>Sólido amarelo, 0,18 g (87% rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 262°C (Lit 264°)</p> <p>RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 11,35 (s, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,47-8,48 (m, 1H), 8,26-8,27 (m, 1H), 8,03 (s, 1H), 6,91-6,93 (m, 1H).</p> <p>EM (ESI-Negativo) 205,0254 Fragmentação m/z 205 (100, M-1), m/z 162 (40, M-43).</p>
<p>Neq421</p>	<p>Sólido marrom 0,21g (95% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão 218°C (Lit 220-221°C)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 11,25 (s, 1H), 11,29 (s, 1H), 8,56 (m, 1H), 8,28 (m, 1H), 8,18 (m, 1H)</p> <p>EM (ESI-Negativo) 221,0022 Fragmentação 221 (100, M-1), 177 (65, M-43).</p>
<p>Neq420</p>	<p>Sólido amarelo claro 0,20g (93% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 272°-273°C (Lit 274°-276°C)</p> <p>RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 11,38 (s, 1H), 11,22 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 8,07-8,09 (m, 2H), 7,46-7,55 (m, 3H).</p> <p>EM (ESI-Negativo) 215,0456 Fragmentação m/z 215 (50, M-1), m/z 172 (100, M-43).</p>

4.6.2.2 Redução da Insaturação exocíclica

Em um balão de fundo redondo de 25 mL o produto da condensação de Knoevenagel (0,70 mmol) foi suspenso em etanol (8,00 mL) sob agitação à

temperatura ambiente, em seguida o boro hidreto de sódio (1,50 mmol) foi adicionado de uma vez à reação resultando na formação de gás (H₂), solubilização do sólido e alteração na cor da solução, após a adição do agente redutor a reação foi deixada sob agitação por 15 min.

Com o fim da reação, o solvente foi evaporado e o sólido obtido solubilizado em água (4,00 mL), o pH da reação foi ajustado para 2,00 utilizando uma solução de HCl 0,1 M resultando na precipitação de um sólido. O produto obtido foi então filtrado e lavado com água, não necessitando de purificação.

<p>Neq395</p>	<p>Sólido marrom, 0,18 g (74% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 187°C</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 11,25 (s, 2H) 7,56 (s, 1H), 6,29-6,44 (m, 3H), 5,91-5,98 (m, 1H) 3,76 (t, 4,0, 1H), 2,78 (t, 4,0Hz 2H).</p>
<p>Neq298</p>	<p>Sólido alaranjado claro, 0,18g (72% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão 200°C</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 11,20 (s, 2H), 7,31 (d, 6Hz, 1H), 6,93 (m, 2H), 6,55 (d, 16Hz, 1H), 3,71 (t, 4,0Hz, 1H), 2,73 (t, 4Hz, 2H).</p>
<p>Neq394</p>	<p>Sólido amarelo claro, 0,17 g (69% de rendimento)</p> <p>Ponto de Fusão: 184°C (Lit 186°C)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 7,20-7,35 (m, 5H), 6,41 (d, 15,81, 1H), 6,10-6,17 (m, 2H) 3,74 (t, 5,16, 1H) 2,82 (t, 5,84, 2H).</p>

4.7 Referências

1. BOYLE, J. Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [S.l.], v. 33, n. 1, p. 74-75, 2005.

2. AUSTIN, W. R. *et al.* Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. *The Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 209, n. 12, p. 2215-2228, November 19, 2012 2012.
3. EVANS, D. R.; GUY, H. I. Mammalian Pyrimidine Biosynthesis: Fresh Insights into an Ancient Pathway. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 279, n. 32, p. 33035-33038, August 6, 2004 2004.
4. ROWLAND, P. *et al.* The crystal structure of lactococcus lactis dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. *Protein Science* [S.I.], v. 7, n. 6, p. 1269-1279, 1998.
5. SØRENSEN, G.; DANDANELL, G. A new type of dihydroorotate dehydrogenase, type 1S, from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions* [S.I.], v. 6, n. 3, p. 245-251, 2002.
6. TAKASHIMA, E. *et al.* Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [S.I.], v. 122, n. 2, p. 189-200, 2002.
7. INAOKA, D. K. *et al.* Structures of *Trypanosoma cruzi* Dihydroorotate Dehydrogenase Complexed with Substrates and Products: Atomic Resolution Insights into Mechanisms of Dihydroorotate Oxidation and Fumarate Reduction†‡. *Biochemistry* [S.I.], v. 47, n. 41, p. 10881-10891, 2008/10/14 2008.
8. ANNOURA, T. *et al.* The Origin of Dihydroorotate Dehydrogenase Genes of Kinetoplastids, with Special Reference to Their Biological Significance and Adaptation to Anaerobic, Parasitic Conditions. *J Mol Evol* [S.I.], v. 60, n. 1, p. 113-127, 2005/01/01 2005.
9. MUNIER-LEHMANN, H. *et al.* On Dihydroorotate Dehydrogenases and Their Inhibitors and Uses. *Journal of Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 56, n. 8, p. 3148-3167, 2013/04/25 2013.
10. VYAS, V. K.; GHATE, M. Recent developments in the medicinal chemistry and therapeutic potential of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors. *Mini Reviews In Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 11, n. 12, p. 1039-1055, 2011.
11. CHELESKI, J. *et al.* Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 45, n. 12, p. 5899-5909, 2010.

12. ROCHA, J. R. *Planejamento de Inibidores das enzimas Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase e Diidroorotato Desidrogenase de Trypanosoma cruzi*. (2010). 201 f. (Doutorado) - IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
13. CHELESKI. *Planejamento de Inibidores da Enzima Diidroorotato Desidrogenase de Trypanosoma cruzi por biocalorimetria*. (2011). 157 f. (Doutorado) - IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
14. JURŠIĆ, B. S. A simple method for Knoevenagel condensation of α,β -conjugated and aromatic aldehydes with barbituric acid. *Journal of Heterocyclic Chemistry* [S.l.], v. 38, n. 3, p. 655-657, 2001.
15. LIST, B. Emil Knoevenagel and the Roots of Aminocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition* [S.l.], v. 49, n. 10, p. 1730-1734, 2010.
16. BIRADAR, J. S.; SASIDHAR, B. S. Solvent-free, microwave assisted Knoevenagel condensation of novel 2,5-disubstituted indole analogues and their biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* [S.l.], v. 46, n. 12, p. 6112-6118, 2011.
17. REN, Z. *et al.* KNOEVENAGEL CONDENSATION OF ALDEHYDES WITH CYCLIC ACTIVE METHYLENE COMPOUNDS IN WATER. *Synthetic Communications* [S.l.], v. 32, n. 13, p. 1947-1952, 2002/01/01 2002.
18. HU, Y. *et al.* Organic Reactions in Ionic Liquids: Ionic Liquid Promoted Knoevenagel Condensation of Aromatic Aldehydes with (2-Thio)Barbituric Acid. *Synthetic Communications* [S.l.], v. 34, n. 24, p. 4521-4529, 2004/01/01 2004.
19. KAUPP, G. *et al.* Solvent-free Knoevenagel condensations and Michael additions in the solid state and in the melt with quantitative yield. *Tetrahedron* [S.l.], v. 59, n. 21, p. 3753-3760, 2003.
20. REDDY, C. S.; NAGARAJ, A. Knoevenagel condensation of α,β -unsaturated aromatic aldehydes with barbituric acid under non-catalytic and solvent-free conditions. *Chinese Chemical Letters* [S.l.], v. 18, n. 12, p. 1431-1435, 2007.
21. DEB, M. L.; BHUYAN, P. J. Uncatalysed Knoevenagel condensation in aqueous medium at room temperature. *Tetrahedron Letters* [S.l.], v. 46, n. 38, p. 6453-6456, 2005.

22. VIEIRA, A. A. *et al.* Synthesis and in vivo evaluation of 5-chloro-5-benzobarbiturates as new central nervous system depressants. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [S.I.], v. 22, p. 364-371, 2011.
23. KADIN, S. B. Reduction of Conjugated Double Bonds with Sodium Borohydride. *The Journal of Organic Chemistry* [S.I.], v. 31, n. 2, p. 620-622, 1966/02/01 1966.
24. SEKIYA, M. *et al.* Formic Acid Reduction. IV. Barbituric Acid Derivatives. Reduction of 5-Arylmethylenebarbituric Acids and Some Analogous Barbituric Acid Derivatives. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* [S.I.], v. 17, n. 4, p. 747-751, 1969.
25. MILLEFIORI, S.; MILLEFIORI, A. Tautomerism in barbituric and thiobarbituric acids. *Journal of Heterocyclic Chemistry* [S.I.], v. 26, n. 3, p. 639-644, 1989.
26. NYC, J. F.; MITCHELL, H. K. Synthesis of Orotic Acid from Aspartic Acid. *Journal of the American Chemical Society* [S.I.], v. 69, n. 6, p. 1382-1384, 1947/06/01 1947.
27. MITCHELL, H. K.; NYC, J. F. Intermediates in the Synthesis of Orotic Acid from Oxalacetic Ester and Urea. *Journal of the American Chemical Society* [S.I.], v. 69, n. 3, p. 674-677, 1947/03/01 1947.
28. BRUCE, M. J. *et al.* Formation of N-carbamoylaspartic acid and its cyclisation to orotic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* [S.I.], n. 2, p. 319-321, 1994.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

5 Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho foram propostas e realizadas as sínteses para a identificação de inibidores da cruzaina e TcDHODH, ambas de *T. cruzi*. Os cinco inibidores dipeptídeo-nitrilas da enzima cruzaina propostos, foram obtidos com sucesso e com rendimentos globais acima de 10% em quantidades suficientes para terem os valores de IC₅₀ determinados. A síntese dos compostos foi realizada em quatro etapas envolvendo uma formação de éster, hidrólise e formação de duas amidas, através da modificação de uma rota já descrita na literatura. A modificação da etapa de N-acilação do amino dos aminoácidos foi realizada utilizando cloreto de ácidos ao invés de agentes de acoplamento e as reações mostraram rendimentos semelhantes. Embora a nova condição avaliada seja mais suscetível ao método operacional, seus reagentes são mais acessíveis.

A avaliação da atividade inibitória dos compostos através da determinação dos valores de IC₅₀, mostrou que o composto Neq0414 com grupo 3-carboxi-5-tert-butil-2-metilpirazol em P3 apresenta interações mais efetivas do que o composto Neq0419 com o grupo 5-bromopiridina, e que a adição de um átomo de cloro em P2 no caso do composto Neq0415 ou de um grupo ciclopila em P1 em Neq0533 aumentam a potência inibitória dos inibidores de forma semelhante. Por último, foi mostrado que o Neq0543, que contém todas as modificações realizadas e que resultaram em aumento da potência quando implementadas isoladamente, resultaram num efeito sinérgico detrimental para a potência do composto.

Os compostos propostos como inibidores da enzima TcDHODH foram sintetizados e caracterizados com sucesso, sendo obtidos em todos os casos com rendimentos acima de 70%.

Os derivados 5-arilpropilarilidenobarbitúricos Neq71, Neq130 e Neq393 e os derivados 5-arilmetilidenobarbitúricos Neq534, Neq421 e Neq420 foram sintetizados usando reações de condensação de Knoevenagel em meio aquoso sem catalisador em ótimos rendimentos. A redução específica da dupla ligação exocíclica dos derivados Neq71, Neq130 e Neq393 foi realizada com sucesso com a utilização de uma condição simples e rápida tendo como agente redutor o

NaBH₄. Os compostos Neq395, Neq298 e Neq0394 resultantes foram caracterizados e purificados com sucesso.

As constantes de inibição dos dez compostos sintetizados para a TcDHODH mostraram que a ausência da dupla exocíclica dos derivados 5-arilpropilidenobarbitúricos resulta em uma diminuição considerável de sua inibição, o encurtamento da cadeia lateral destes derivados também diminui sua potencia, contudo em um grau menor e que o Neq411 é um promissor ponto de partida para a síntese de novos inibidores desta enzima.

Os resultados obtidos com o estudo das modificações dos inibidores da cruzaina e TcDHODH permitem que novos inibidores sejam planejados com o objetivo de aumentar a capacidade de inibição dos compostos através de novas modificações estruturais. Estes estudos já estão em realização no grupo e serão motivo de publicação em outro trabalho.

Grande partes dos compostos foram também ensaiadas contra as formas infectivas do parasita, em alguns casos conseguindo eliminá-los em concentrações micromoleculares, mostrando assim seu potencial para seguir em frente no planejamento de novos fármacos para a Doença de Chagas.

ANEXOS Capítulo 3

Composto **9**

Composto **10**

Composto 11

Composto 12

Composto 13

Composto Neq414 (2)

Composto Neq419 (3)

Composto Neq415 (4)

Composto Neq533 (5)

Composto Neq543 (6)

ANEXOS Capítulo 4

Composto Neq71

Composto Neq130

Composto Neq393

Composto Neq395

Compostos Neq298

Composto Neq394

Composto Neq542

Composto Neq421

Composto Neq420