UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Síntese de Dipeptidil-nitrilas como Inibidores da Enzima Cruzaína

Cristian David Camilo Reyes

São Carlos, SP
2014

CRISTIAN DAVID CAMILO REYES

Síntese de Dipeptidil-nitrilas como Inibidores da Enzima Cruzaína

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do 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, SP

2014

Dedico este trabalho a os meus pais, Luis Gerardo e Mariela que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos. Aos meus avós, que sempre me apoiaram e compartilharam comigo as alegrias .À minha esposa lina por estar sempre ao meu lado, nessa conquista

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, minha gratidão a Deus por iluminar o meu caminho, por estar comigo em todos os momentos sendo o meu refúgio e fortaleza.

À minha esposa Lina, que esteve sempre do meu lado incansável e compreensiva.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, incentivo e apoio.

Ao meu orientador Dr. Carlos Montanari pela sua confiança, por ter me acolhido e ter me possibilitado aprendizagens valiosas.

Ao grupo Nequimed, pela valiosa ajuda e tudo o aprendido.

Ao Centro de Análise Químicas do Instituto de Química de São Carlos, pela ajuda e boa disposição no fornecimento dos equipamentos.

Ao Instituto de Química de São Carlos, professores e funcionários, pela amabilidade e acolhimento.

Ao grupo de cromatografia do Instituto de Química de São Carlos, pela ajuda.

Aos professores, alunos e funcionários da química da Universidade Federal de São Carlos, em especial ao O Laboratório de Química Bio-orgânica pela disposição e ajuda.

Aos professores, alunos e funcionários da química da Universidade Estadual de Campinas, e particularmente ao Laboratório de síntese de produtos naturais e fármacos contribuírem na concretização deste projeto.

Ao CNPQ, pela bolsa de estudo.

Aos meus amigos pelos bons momentos e pela companhia.

A todos, muito obrigado.

RESUMO

A doença de Chagas, descrita em 1909 pelo médico sanitarista brasileiro Dr. Carlos Chagas, é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*. É uma doença tropical negligenciada que afeta aproximadamente entre 12 e 14 milhões de indivíduos em América latina. No ano de 2008 foi responsável pela morte de cerca de 10 mil pessoas no mundo, sendo que a terapia atual consiste no uso dos fármacos benzonidazol e nifurtimox que são eficazes apenas no estágio inicial da doença (fase aguda) e ainda possuem efeitos colaterais severos. Esse quadro justifica a necessidade da busca por substâncias mais eficientes para o tratamento dessa doença. Entre os candidatos em fase pré-clínica, o K777 mostrou-se eficaz em eliminar efetivamente a infecção pelo *T. cruzi* em modelos animais por meio da inibição irreversível da Enzima cruzaina, uma cisteína protease expressada durante todo o ciclo de vida do parasito. Novas técnicas em planejamento computacional de fármacos tem possibilitado a rápida identificação de compostos bioativos com atividade contra essa Enzima. A abordagem baseada em fragmentos moleculares foi utilizada para identificação de pequenas substâncias bioativas. Aqui, uma junção molecular foi realizada entre fragmentos ativos, obtidos em estudos prévios, com a finalidade de explorar o sítio ativo da cruzaina. Os compostos foram sintetizados por meio de reações de acoplamento, com a finalidade de investigar a relação estrutura atividade (SAR), visando potencializar as interações responsáveis pela inibição no alvo. Os análogos obtidos foram testados *in vitro*, utilizando-se a espectrometria de fluorescência para a confirmação da inibição da atividade enzimática.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*, Benzonidazol Nifurtimox K777, Fragmentos moleculares, Alvo Enzima, Cruzaina, Inibição.

ABSTRACT

Chagas disease, described in 1909 by the Brazilian physician Carlos Chagas, is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, which is a neglected tropical disease that affects approximately 10 million individuals. In 2008, Chagas disease was responsible for the death of about 10 thousand people, and the current therapy consists of the use of benznidazole and nifurtimox drugs that are only effective in the early stage of the disease (acute phase) and still have severe side effects. This scenario justifies the need to search for more efficient substances for the treatment of Chagas disease. Among candidates in pre-clinical phases, the K777 was effective in eliminating the *T. cruzi* infection in animal models by irreversibly inhibiting the enzyme cruzain, which is a cysteine protease expressed throughout the parasite lifecycle. New techniques in computational drug design have enabled the rapid identification of bioactive compounds with activity against this cruzain. A molecular approach based on fragments was used to identify small bioactive substances of the class. The dipeptidil nitriles were synthesized via coupling reactions, in order to investigate the structure activity relationship (SAR) aimed at enhancing the interactions responsible for inhibition of the target cruzain enzyme. The analogs have been assayed *in vitro* using fluorescence spectrometry to confirm inhibition of cruzain activity that inhibit cruzain in low-micro molar range.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1– ROTAS DE MIGRAÇÃO DA AMÉRICA LATINA E ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE PESSOAS INFECTADAS EM PAÍSES NÃO ENDÊMICOS ^[1]	15
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DO NIFURTIMOX E BENZONIDAZOL	17
FIGURA 3 - ÁREAS ENDÊMICAS COM AÇÕES DE CONTROLE NO BRASIL. ^[10]	18
FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DO TRYPANOSOMA CRUZI ^[15]	20
FIGURA 5 - ALVOS DOS FÁRMACOS NA TERAPÊUTICA DISTRIBUÍDOS POR CLASSES BIOQUÍMICAS ^[17]	20
FIGURA 6 - REAÇÃO DE CLIVAGEM DE LIGAÇÃO PEPTÍDICA POR PROTEASES.	21
FIGURA 7 - ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA CRUZAÍNA (PDB: 2AIM). EM DESTAQUE OS RESÍDUOS QUE PARTICIPAM DO MECANISMO CATALÍTICO	22
FIGURA 8 - A CISTEÍNA DOA O PRÓTON PARA A HISTIDINA PARA A FORMAÇÃO DE UM PAR IÔNICO CORRESPONDENTE A ENZÍMA ATIVADA ^[23]	22
FIGURA 9 - MECANISMO DE CATÁLISE DE ENZÍMAS CISTEÍNO PROTEASES ^{[23], [24]}	23
FIGURA 10 - ESTRUTURA DO K777	25
FIGURA 11 - ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA GERAR O SINAL DE FLUORESCÊNCIA EM REAÇÕES CATALISADAS POR CISTEÍNO-PROTEASES	29
FIGURA 12 - ESTRUTURA DO ZFRMCA (SUBSTRATO SINTÉTICO PARA A CRUZAÍNA)	30
FIGURA 13 - ORIENTAÇÃO DA SUBSTÂNCIA PROTÓTIPO (NEQ0409) NO SÍTIOCATALÍTICO DA CRUZAÍNA.	31
FIGURA 14 - ESTRUTURA DE RAIOS X DA SUBSTÂNCIA PROTÓTIPO NEQ0409 INIBINDO A CRUZAÍNA MUTANTE.	32
FIGURA 15 - ESPECTRO ¹ H RMN DA SUBSTÂNCIA PROTÓTIPO NEQ0409	50
FIGURA 16 - ESPECTRO ¹ H RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0400	52
FIGURA 17 - ESPECTRO ¹ H RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0538	54
FIGURA 18 - ESPECTRO ¹ H RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0536	55
FIGURA 19 - ESPECTRO ¹³ C RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0536	56
FIGURA 20 - ESPECTRO ¹ H RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0535	57

FIGURA 21 - ESPECTRO ^{13}C RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0535	58
FIGURA 22 - ESPECTRO ^1H RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0537	59
FIGURA 23 - ESPECTRO ^{13}C RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0537	60
FIGURA 24 - ESPECTRO ^1H RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0545	61
FIGURA 25 - ESPECTRO ^{13}C RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0545	62
FIGURA 26 - ESPECTRO DEPT 135 DA SUBSTÂNCIA NEQ0545	62
FIGURA 27 - ESPECTRO ^1H RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0546	64
FIGURA 28 - ESPECTRO ^{13}C RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0546	65
FIGURA 29 - ESPECTRO DE ^1H RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0547	67
FIGURA 30 - ESPECTRO ^{13}C RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0547	68
FIGURA 31 - ESPECTRO ^{13}C RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0544	70
FIGURA 32 - ESPECTRO ^1H RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0548	72
FIGURA 33 - ESPECTRO ^1H RMN DA SUBSTÂNCIA NEQ0549	73
FIGURA 34 - PERFIL DAS CURVAS DOSE-RESPOSTA OBTIDAS	76
FIGURA 35 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA FRENTE AO COMPOSTO PROTÓTIPO (NEQ0409)	86
FIGURA 36 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA FRENTE AO COMPOSTO NEQ0400	86
FIGURA 37 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA FRENTE AO COMPOSTO NEQ0538	87
FIGURA 38 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA FRENTE AO COMPOSTO NEQ0536	87
FIGURA 39 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA FRENTE AO COMPOSTO NEQ0535	88
FIGURA 40. CURVA DE INIBIÇÃO DA ENZÍMA CRUZAÍNA FRENTE AO COMPOSTO NEQ0537	88
FIGURA 41 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CURZAINA FRENTE AO COMPOSTO NEQ0545	89
FIGURA 42 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA FRENTE AO COMPOSTO NEQ0546	89
FIGURA 43 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA FRENTE AO COMPOSTO NEQ0547	90

FIGURA 44 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA FRENTE AO COMPOSTO NEQ 0544	90
FIGURA 45 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA FRENTE AO COMPOSTO NEQ0548	91
FIGURA 46 - CURVA DE INIBIÇÃO DA CURZAINA FRENTE AO COMPOSTO NEQ0549	91
FIGURA 47 - ESPECTRO MS DA SUBSTÂNCIA NEQ0536	92
FIGURA 48 - ESPECTRO MS DA SUBSTÂNCIA NEQ0535	92
FIGURA 49 - ESPECTRO MS DA SUBSTÂNCIA NEQ0537	93
FIGURA 50 - ESPECTRO MS/MS DA SUBSTÂNCIA NEQ0545	93
FIGURA 51 - ESPECTRO MS/MS DA SUBSTÂNCIA NEQ0546	94
FIGURA 52 - ESPECTRO MS/MS DA SUBSTÂNCIA NEQ0547	94
FIGURA 53 - ESPECTRO MS/MS PARA O COMPOSTO NEQ0548	95
FIGURA 54 - ESPECTRO MS/MS DA SUBSTÂNCIA NEQ0549	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONDIÇÕES DE SECAGEM DE SOLVENTES SOB PENEIRA MOLECULAR	34
TABELA 2 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H DA SUBSTÂNCIA PROTÓTIPO NEQ0409	51
TABELA 3 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H DA SUBSTÂNCIA. NEQ0400	53
TABELA 4 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H DA SUBSTÂNCIA NEQ0538	54
TABELA 5 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H E ^{13}C DA SUBSTÂNCIA NEQ0536	56
TABELA 6 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H E ^{13}C DA SUBSTÂNCIA NEQ0535	58
TABELA 7 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H E ^{13}C DA SUBSTÂNCIA NEQ0537	60
TABELA 8 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H E ^{13}C DA SUBSTÂNCIA NEQ0545	63
TABELA 9 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H E ^{13}C DA SUBSTÂNCIA NEQ0546	66
TABELA 10 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H E ^{13}C DA SUBSTÂNCIA NEQ0547	68
TABELA 11 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H DA SUBSTÂNCIA NEQ 0544	71
TABELA 12 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H DA SUBSTÂNCIA NEQ0548	72
TABELA 13 - ATRIBUIÇÃO DAS SINAIS ^1H DA SUBSTÂNCIA NEQ0549	74
TABELA 14 – RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS.	77

CONTEUDO

Síntese de Dipeptidil-nítrilas como Inibidores da Enzima Cruzaína.....	1
RESUMO	5
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Doença de chagas	14
1.1.1 Doença de Chagas no Brasil.....	17
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.3 Alvos enzimáticos no <i>T. cruzi</i>	20
1.4 Cruzaína	21
1.5 Inibição da cruzaína	24
1.6 K777	24
1.7 Síntese de substâncias bioativas	25
1.8 Modificações estruturais	26
1.9 Reação de acoplamento	27
1.10 Ensaio enzimático (determinação da potência dos inibidores)	28
1.11 Precedentes de pesquisa	30
1.12 Objetivos Gerais	33
1.13 Objetivos Específicos	33
2 PARTE EXPERIMENTAL.....	34
2.1 Sínteses dos compostos	34
2.1.1 Reagentes e solventes.....	34
2.1.2 Caracterização estrutural dos compostos e precursores	34
2.1.3 Síntese da substância protótipo (Neq0409)	35
2.1.4 Protocolo de reação para a síntese da substância protótipo (Neq0409)	36
2.1.5 Modificações no fragmento P3.....	38
2.1.6 Protocolo de reação para a síntese de substâncias com modificações no fragmento P3.	39
2.1.7 Modificações no fragmento P2.....	44

2.1.8	Protocolo de reação para a síntese de substâncias com modificações no fragmento P2	44
2.1.9	Modificação no fragmento P1	46
2.1.10	Protocolo de reação para a substância com modificação no fragmento P1	46
2.2	Ensaio bioquímico.....	47
2.2.1	Reagentes e solventes.....	47
2.2.2	Ensaio de inibição das Enzimas cruzada para determinação de IC ₅₀	47
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1	Composto protótipo.....	49
3.1.1	Reação de formação de ligação peptídica (reação de acoplamento)	49
	Esquema 12 - Reação de formação de ligação peptídica (composto protótipo Neq0409) ..	49
3.2	Síntese de substâncias com modificações em P3	51
3.2.1	Substância Neq0400.....	52
3.2.2	Substância Neq0538.....	53
3.2.3	Substância Neq0536.....	55
3.2.4	Substância Neq0535.....	57
3.2.5	Substância Neq0537	59
3.2.6	Substância Neq0545.....	61
3.2.7	Substância Neq0546.....	64
3.2.8	substância Neq0547.....	67
3.3	Modificações no fragmento do sítio P2.....	69
3.3.1	Substância Neq0544.....	69
3.3.2	Substância Neq0548.....	71
3.4	Modificação no fragmento P1	73
3.4.1	Substância Neq0549.....	73
3.5	Ensaio de inibição das Enzimas cruzada para determinação de IC ₅₀	74
3.6	Relações estrutura-atividade (SAR)	76
4	Conclusão.....	80

5	Perspectivas.....	81
6	REFERENCIAS	82
	ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de chagas

A doença de Chagas existiu nas Américas por milhões de anos como uma doença enzoótica (doença de animais silvestres). Vetores, principalmente dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae), mas também de outros gêneros, transmitiram a doença entre os animais por quase 10 milhões de anos. Mais de 150 espécies de triatomíneos (vetores da doença) e mais de 100 espécies de mamíferos, principalmente as espécies selvagens, mantêm a infecção por *T. cruzi* na natureza. ^[1]

Estima-se que, há cerca de 10 mil anos atrás, as atividades agrícolas e a domesticação de animais pode ter incentivado a infecção, apesar de ser principalmente uma antropozoonose (uma infecção acidental do homem) há milhares de anos. No entanto, o desoxirribonucleico (DNA) de *T. cruzi* foi encontrado em múmias do norte do Chile e sul do Peru, que têm cerca de 9.000 anos e há evidências de *Triatoma infestans* nos domicílios em tempos pré-colombino - nomeadamente Incas - e das culturas Chinchorro, indicando a introdução gradual de transmissão doméstica. Nos últimos 200-300 anos, com o desmatamento para criação de agricultura e pecuária e a abertura de rotas terrestres de transporte (ferrovias e rodovias), os triatomíneos perderam gradualmente sua fonte primária de alimento de sangue animal selvagem e, ao mesmo tempo, tiveram mais oportunidades para se espalhar. Eles se adaptaram para as zonas circundantes das habitações humanas, alimentando-se do sangue de animais domésticos e seres humanos. Desta forma, um novo ciclo de infecção foi estabelecido, e a doença de Chagas tornou-se uma zoonose (uma doença que é transmitida entre animais e seres humanos endemicamente). ^[2]

A doença de Chagas encontra-se distribuída primeiramente no continente americano, por ser este o continente que alberga o vetor do parasito. Por tal motivo, a doença é conhecida como tripanossomíase americana, sendo endêmica em 21 países da América. Porém, há incidência em outros países desenvolvidos, considerados como não endêmicos; é uma doença que ainda não foi possível erradicar, completando mais de 100 anos desde seu descobrimento. ^[3]

Devido aos processos migratórios, há ocorrência da doença não somente na América Latina, como também em outros países e continentes, conforme é apresentado na Figura 1:

Estados Unidos (300.000 pessoas infectadas), Austrália (1.500 pessoas infectadas), Japão (3.000 pessoas infectadas), Europa (80.000 pessoas infectadas) e Canadá (5.500 pessoas infectadas).

Figura 1– Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de pessoas infectadas em países não endêmicos ^[1]

Fonte: Massad, E 2008, p. 1159.

A doença de Chagas recebeu esse nome como homenagem ao pesquisador brasileiro e médico sanitarista Doutor Carlos Justiniano Ribeiro Chagas que, em 1909, descreveu toda sua etiologia. Apesar de todos os esforços ao longo do século, desde a descoberta da doença até a redução da transmissão do parasito, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que haja cerca de 10 milhões de pessoas infectadas na América Latina e mais 25 milhões em risco de adoecer.

A contaminação se dá principalmente pelo contato com as fezes do inseto vetor (conhecido como barbeiro), podendo também ocorrer por transfusão de sangue, transplante de órgão, ingestão de alimentos contaminados e transmissão congênita. Atualmente o vetor pertence a uma família com aproximadamente 130 espécies, sendo que cerca de doze podem transmitir o *Trypanosoma*. ^[4, 5]

A doença de Chagas é a doença tropical transmissível com maior prevalência na Latina América, com índices de morbimortalidade, que na década de 1990 era cinco vezes maior que os índices de paludismo e outras doenças tropicais geradas na mesma região. Embora os índices de morbimortalidade tenham diminuído consideravelmente, nos últimos anos ainda é maior que os índices da Malária, Leishmania e a Lepra. ^[6]

Atualmente a doença é um dos principais problemas socioeconômicos enfrentados na América Latina. Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas do sul dos Estados Unidos até a Patagônia estejam infectadas, causando aproximadamente 50.000 mortes por ano, sendo que outros 100 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco de contaminação. ^[2, 5] Sabe-se que, apenas em 2008, ocorreram mais de 10 mil mortes causadas por complicações desta doença.

Apesar das sérias consequências sociais e econômicas, as doenças tropicais são largamente negligenciadas pela indústria farmacêutica. Afetando principalmente as populações pobres em países tropicais, não são vistas como um mercado atraente para impulsionar investimentos no desenvolvimento de novos fármacos, ^[7], pois quem mais necessita dos medicamentos não gera retorno financeiro desejado. Por isso doenças como a malária, leishmaniose, doença do sono, filariose e a doença de Chagas são geralmente denominadas como *doenças tropicais negligenciadas*. Esse termo é bem apropriado, já que dos mais de 1300 fármacos introduzidos para todas as indicações terapêuticas entre 1975 e 1999, somente 13 foram devotados para as doenças tropicais. Em 2000, somente 0,1% do investimento global em pesquisas na área de saúde foram destinados para a busca de fármacos contra a Malária, Leishmaniose, Tripanossomíases e Tuberculose. ^[2]

No que se refere ao tratamento, infelizmente, o caso da doença de Chagas é ainda mais grave, ao ponto de alguns pesquisadores a considerarem como uma doença tropical *super-negligenciada*. ^[8] Os únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença são ativos apenas na fase aguda da doença e são os mesmos introduzidos há mais de 30 anos: nifurtimox (Lampit[®]) e benzonidazol (Rochagan[®]). Devido à natureza empírica da descoberta e desenvolvimento do nifurtimox e do benzonidazol (Figura 2), estes fármacos foram registrados e utilizados clinicamente por vários anos sem um entendimento claro dos seus mecanismos de ação. Atualmente, sabe-se que a ação antiparasitária do nifurtimox está associada com a produção de grandes quantidades de espécies reativas tóxicas de oxigênio (tais como ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio), resultantes da reação do oxigênio com metabólitos nitro-anions instáveis produzidos a partir grupo nitro presente na molécula. Entretanto, a citotoxicidade do Benzonidazol não está associada com a geração de níveis significantes de espécies reativas tóxicas de oxigênio; ao contrário, está provavelmente associada ao estresse redutivo, o qual envolve modificações covalentes de macromoléculas por intermediários de nitro-redução. ^[1, 8]

Desde a última década, a empresa Bayer AG tem diminuído a fabricação do nifurtimox, que agora é produzido somente em El Salvador e já não é mais comercializado no Brasil.

Figura 2 - Representação das estruturas químicas do Nifurtimox e Benzonidazol

Fonte: Autoria Própria.

Por apresentar uma baixa eficiência durante a fase crônica da doença, efeitos colaterais severos como anorexia, perda de peso, vômito, náusea e diarreia, serem teratogênicos, apresentarem um alto custo, não haver formulações pediátricas, dentre motivos, já não se encontram comercialmente disponíveis no Brasil..

1.1.1 Doença de Chagas no Brasil

No Brasil, 711 municípios de 18 Estados foram identificados no final dos anos 1970 como zonas endêmicas da doença de Chagas. As zonas de maior incidência e com maior risco de transmissão da doença incluem os Estados de Bahia, Ceará, Alagoas, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Sergipe, São Paulo e Tocantins, sendo Minas Gerais um dos estados com maior prevalência e o local onde foi descoberta a doença, conforme ilustra a. ^[10]

Figura 3 - Áreas endêmicas com ações de controle no Brasil. ^[10]

Fonte: Guia de Vigilância Epidemiológica **2005** p 302.

Dentre as causas que determinam a ocorrência desta doença, encontram-se principalmente os fatores sócio-econômico-culturais precários da população (educação, habitação, saneamento, migração, dentre outras). A doença de Chagas é considerada como a doença da pobreza: calcula-se que, em média, 100 milhões de pessoas na América vivem em áreas de exposição e estão em risco de pegar essa doença; representam não somente um desafio de morbimortalidade, mas também, um desafio político, social e econômico. A doença contribui perpetuando o ciclo de pobreza nos países endêmicos, reduzindo a capacidade de aprendizado da população que está exposta à doença, diminuindo a produtividade e a possibilidade de gerar ingressos e sustentabilidade familiar e social. ^[6]

Portanto, no que se refere ao controle e tratamento de pacientes na fase crônica e à ocorrência de casos agudos em algumas regiões, trata-se de um grande desafio para América Latina. A busca de novos fármacos que tenham uma forte indicação do efeito curativo, com ou sem baixo efeito tóxico e demais efeitos colaterais, permitindo a identificação de compostos eficazes e a baixo custo de produção é de extrema necessidade. ^{[11], [12]}

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, da ordem cinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* é o agente causador da doença de Chagas. O parasita possui um complexo ciclo biológico do tipo heteroxênico, no qual envolve um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado e apresenta três formas distintas: (i) epimastigota,

forma presente no vetor e em cultura axênica; (ii) tripomastigota, forma sanguínea circulante e infectante; e (iii) amastigota, forma de replicação intracelular. ^[8, 13] Conforme ilustrado na Figura 4, o parasito passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos).

Considerando o mecanismo natural de infecção pelo *T. cruzi*, os tripomastigotas eliminados nas fezes e urina do vetor, durante ou logo após o hematofagismo, penetram pelo local da picada e causam a contaminação. Em seguida, ocorre a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária simples. A seguir, ocorre a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas, que são liberados da célula hospedeira caindo no interstício. Estes tripomastigotas caem na corrente circulatória, atingem outras células de qualquer tecido ou órgão para cumprir novo ciclo celular ou são destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro. Podem ainda ser ingeridos por triatomíneos, onde cumprirá seu ciclo extracelular. ^[14]

No estômago do inseto eles se transformam na forma epimastigotas. No intestino médio, os epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples, sendo, portanto, responsáveis pela manutenção da infecção no vetor. No reto, porção terminal do tubo digestivo, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas (infectantes para os vertebrados), sendo eliminados nas fezes ou urina. Normalmente, é essa a descrição clássica adotada para o ciclo do *T. cruzi*. ^[14]

Figura 4 - Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*^[15]

Fonte: World Health Organization. (<http://www.who.int/tdr/diseases-topics/chagas/en/index.html>) accessed 11/01/2014

1.3 Alvos enzimáticos no *T. cruzi*

Inicia-se um novo fármaco com a identificação da necessidade de uma nova terapia e o julgamento sobre a adequação dos tratamentos existentes. Em seguida, faz-se necessário identificar e validar o alvo terapêutico; os mais importantes e estudados são Enzimas, DNA, receptores hormonais, receptores nucleares e células. O número de alvos na terapêutica é 348^[16] e a Figura 5 mostra uma distribuição dos alvos com medicamentos aprovados na terapia^[17]. Estabelecer modelos para estes alvos é essencial para o desenvolvimento do projeto.

Figura 5 - Alvos dos fármacos na terapêutica distribuídos por classes bioquímicas^[17]

Fonte: Hopkins A., Groom, C. 2002 p 730.

1.4 Cruzaína

A Cruzaína é uma cisteíno protease chave, é a principal protease do *Trypanosoma cruzi*, sendo essencial para a sobrevivência do parasita. Essa Enzima está envolvida em todas as fases do ciclo de vida do *T. Cruzi* e pertence à superfamília papaína de cisteíno proteases, com estrutura e funções similares às Enzimas humanas catepsina B, L, K, S, F e V.^[18] Ela está envolvida na replicação, diferenciação celular do parasita e nutrição com a hidrólise de proteínas do hospedeiro. Ela é essencial para a infecção das células hospedeiras, metabolismo e imunoevasão (evasão da resposta imune)^{[19], [20]}.

A cruzaína catalisa reações de hidrólise de ligações peptídicas (Figura 6) e seu número de classificação segundo a comissão de nomenclatura de Enzimas (*Enzyme Commission*) é EC 3.4.22.51. Os números 3, 4 e 22 correspondem, respectivamente, à classe de hidrolases, à sua atuação em ligação peptídica e ao grupo de cisteíno endopeptidases, enquanto que 51 é o número específico da cruzaína.

Figura 6 - Reação de clivagem de ligação peptídica por proteases.

Fonte: Autoria própria.

A estrutura cristalográfica da cruzaína revela que ela é composta por uma cadeia polipeptídica de 215 resíduos de aminos, dobrada em dois domínios (Figura 7). Um domínio é principalmente helicoidal (domínio L), e o outro é composto por folhas β antiparalelas (domínio R). Para as Enzimas da família da papaína, existe uma extensa fenda entre os dois domínios, em que está localizado o sítio ativo, sendo a tríade catalítica composta pelos resíduos Cys25, His159 e Asn175.

Figura 7 - Estrutura cristalográfica da cruzaína (PDB: 2AIM). Em destaque os resíduos que participam do mecanismo catalítico

Fonte: Protein Data Bank PDB: 2AIM

As proteases têm um papel importante em vários processos patológicos, pois estão implicadas em doenças como artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, infecções bacterianas e virais, câncer e doença de Alzheimer. ^[22]

Todas as cisteíno proteases têm em comum um sítio ativo que consiste dos resíduos de aminos cisteína, histidina e glutamina. A cisteína e a histidina formam um par iônico que é estabilizado pela glutamina; há uma cavidade nesta região das cisteíno proteases capaz de estabilizar intermediários aniônicos próximos ao resíduo de glutamina e, por este motivo, é chamado de cavidade do oxiânion (do inglês *oxyanion hole*).

Figura 8 - A cisteína doa o próton para a histidina para a formação de um par iônico correspondente a Enzima ativada ^[23]

Fonte: Autoria propina a partir de Lecaille, F., Kaleta, J., Brömme, D., **2002**, 4467.

O mecanismo de hidrólise de peptídeos desempenhado pelas cisteíno proteases envolve quatro etapas. Um esquema representativo da sequência das etapas do mecanismo da reação está ilustrado na Figura 9.

Figura 9 - Mecanismo de catálise de Enzimas cisteíno proteases^{[23], [24]}

Fonte: Autoria propina a partir de Lecaille, F., Kaleta, J., Brömme, D., **2002**, 4467.

A primeira é a desprotonação do grupo tiol da cisteína catalítica pela histidina adjacente. Em seguida, o enxofre aniônico nucleofílico se liga ao carbono carbonílico do substrato formando um intermediário tetraédrico, o qual é estabilizado pela cavidade do oxiânion. Logo, o fragmento amino terminal do substrato é liberado e a histidina é restituída na sua forma desprotonada. Na sequência, o intermediário acil-Enzima é hidrolisado e um segundo intermediário tetraédrico é formado; novamente há a estabilização pela cavidade do oxiânion. Por fim, ocorre o substituinte N-terminal é liberado restituindo a Enzima no estado inicial^{[23], [25]}

1.5 Inibição da cruzaina

A cruzaina possui excelentes provas de validação pré-clínica como um alvo de fármacos viável. Vários inibidores dessa protease, com diferentes esqueletos moleculares e mecanismos catalíticos, mostraram ser capazes de curar a infecção em modelos celulares, caninos e em ratos. [26], [27],[28, 29] Inibidores seletivos desta Enzima bloqueiam a proliferação do parasito epimastigota extracelular e amastigota intracelular, e suspendem a metacicloênese (transformação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos). [28],[19],[30]

A cruzaina, bem como as demais cisteíno-proteases, são efetivamente moduladas por várias classes de inibidores covalentes baseados no estado de transição da reação catalisada pela Enzima. Nestes compostos estão presentes grupos contendo um átomo de carbono susceptível ao ataque nucleofílico (*warheads*) efetuados pela cisteína ativada presente no sítio ativo da Enzima. Este ataque, dependendo da natureza do *warhead*, pode tanto promover a ligação dos compostos de forma irreversível quanto reversível. Usualmente, a inibição reversível envolve interação não covalente entre a Enzima e o inibidor, mas, em alguns casos, a ligação covalente formada é lábil o bastante para ser hidrolisada e liberar as duas moléculas envolvidas. ¹²

A cruzaina representa um alvo interessante e potencial para busca de novos fármacos antichagásicos. As estruturas de inibidores existentes para a cruzaina são diversas, incluindo uma série de vinil-sulfonas, hidroxicetonas, tiossemicarbazona e derivados de 2-hidroxi-aril-N-acilhidrazona, entre outros. [8] Dentre esses, destaca-se o K777 (Figura 10) que apresenta uma interação inicial de reconhecimento da Enzima, muito forte, além de formar uma ligação covalente entre a dupla do vinil sulfona e a Cisteína 25 da triade catalítica da cruzaina.

1.6 K777

Um modelo animal da doença de Chagas em camundongos infectados foi usado para o tratamento com inibidores planejados para inativar a Enzima cruzaina. Os inibidores peptídeomiméticos fluorometil cetonas evitaram a infecção letal dos animais. A melhor estrutura molecular continha a fenilalanina e homofenilalanina no esqueleto. Para obter a cura da infecção, inseriu-se um substituinte vinil sulfônico menos tóxico no esqueleto peptídico

mimético, resultando no N-metil piperazina-Phe-homofe-vinil sulfona (K777 ou K777) ^[31]. A estrutura está ilustrada na Figura 10.

O K777, N-metil piperazina-Phe-homoPhe-vinil sulfona, foi eficaz na cura ou alívio da infecção por *T. cruzi* em estudos pré-clínicos de prova de conceito e foi inserido nas pesquisas de desenvolvimento pré-clínico de fármaco. O K777 demonstrou ser suficientemente eficaz para curar a doença em modelos infecção aguda em camundongos infectados e também reverter o dano cardíaco em cães. Pela primeira vez tais estudos demonstraram que a inibição da Enzima cruzaina interfere efetivamente na infecção pelo parasito *T. cruzi* e os inibidores peptídicos vinil sulfônicos não são tóxicos em doses terapêuticas, colocando sob questionamento a potencialização da molécula e aumentando a seletividade deste inibidor em relação às catepsinas humanas (homólogas da cruzaina). ^[7, 32]

Figura 10 - Estrutura do K777

Fonte: Autoria própria

1.7 Síntese de substâncias bioativas

No final do século XIX, Felix Hoffmann descobriu o acetil salicílico (AAS), primeiro fármaco sintético empregado como tal, permitindo combater um dos principais problemas da humanidade, as dores. ^[33] Esta molécula que possui, apenas nove átomos de carbono foi pioneira dentre os fármacos sintéticos que predominam na terapia moderna. ^[34]

O setor de saúde tem mostrado um dinamismo tecnológico acentuado, que exige cada vez mais capacitação tecnológica e interdisciplinar envolvida nestas atividades. Segundo

dados da Abifina, a indústria farmacêutica brasileira tem mostrado um grande crescimento ao longo dos últimos anos, registrando faturamentos de US\$ 17,1 bilhões em 2008 contra US\$ 14,6 bilhões em 2007 e US\$ 9,2 bilhões em 2005. Além disso, as exportações de fármacos e medicamentos apresentaram um aumento de cerca de 50% entre 2005 e 2008. Os fármacos de origem sintética representam uma significativa parcela do mercado farmacêutico mundial; parcela esta estimada, em 390 bilhões de dólares/ano. No mundo, até 1991, entre 866 fármacos usados na terapêutica, 680 (79%) eram de origem sintética; os 186 restantes (21%) correspondiam àqueles de origem natural ou semi-sintética.

De modo geral, o processo de descoberta de um novo medicamento obedece a várias etapas já bem estabelecidas, como identificação e caracterização de um alvo molecular, síntese e seleção de moléculas líderes, otimização molecular, caracterização físico-química, avaliação de atividades *in vitro* e *in vivo* visando à escolha da molécula candidata ao desenvolvimento e ensaios pré-clínicos e clínicos.

Em função dos altos custos, dos riscos envolvidos no investimento, do longo tempo de pesquisa e, principalmente da alta tecnologia envolvida nesta área, o desenvolvimento de novos medicamentos está basicamente restrito as grandes indústrias farmacêuticas sediadas nos países desenvolvidos.

Algumas estimativas apontam insucesso nos projetos pré-clínicos envolvendo atividades farmacocinéticas insatisfatórias para 40% dos fármacos (de 198 fármacos avaliados), ausência de eficácia terapêutica em 30%, 21% de toxicidade e 8% razões comerciais como competição de mercado, ausência de inovação ou diferenciação de outros produtos do mercado ou em desenvolvimento.

Neste contexto, observa-se uma dramática urgência na busca de mecanismos que possibilitem a predição terapêutica na síntese de novas moléculas-candidatas a fármacos. Os estudos interdisciplinares que aliam interação química farmacológica e as relações estrutura-atividade ganham cada vez mais credibilidade e possibilitarem a obtenção de novos compostos.

1.8 Modificações estruturais

A modificação estrutural se apresenta como promissória na introdução de novos fármacos na terapêutica. O processo de modificação estrutural permite que as propriedades desejáveis em uma molécula sejam ressaltadas, mediante a retirada, substituição ou

introdução de novos grupos químicos cuja participação na atividade da molécula é determinante.

A modificação estrutural surgida no final do século XX, como suporte racional para o planejamento de novos fármacos, permitiu que este processo resultasse útil na introdução de fármacos na terapêutica.

A introdução de um substituinte pode produzir modificações atingindo várias propriedades físico-químicas da molécula, tais como hidrofobicidade, densidade eletrônica, conformação estrutural e propriedades farmacocinéticas, etc, cuja análise poderá orientar as sínteses a serem seguidas.

As relações estrutura-atividade (SAR) geralmente são determinadas com pequenas alterações na molécula protótipo, seguidas da avaliação do efeito sobre a atividade biológica. Pesquisas de SAR são realizadas preparando-se um grande número de análogos para serem então avaliados. ^[35] Estas alterações podem ser classificadas de acordo com o tamanho e conformação do esqueleto carbônico, natureza e grau de substituição e a estereoquímica do protótipo, por exemplo e São realizadas considerando-se as atividades dos compostos com estruturas semelhantes e também, a natureza química e bioquímica do análogo desejado. Na química medicinal, os estudos de relação estrutura-atividade são fundamentados no efeito do substituinte em um determinado anel aromático, uma vez que mais de 50% dos fármacos ou compostos bioativos possuem este tipo de anel. ^[36]

1.9 Reação de acoplamento

A presença de grupos amida frequente em uma grande variedade de compostos biologicamente importantes. Os peptídeos e as proteínas desempenham um papel importante na biologia moderna. Um passo chave na produção de peptídeos é a formação da ligação peptídica, embora ligações amidicas desempenhem um papel importante para a elaboração e composição de sistemas biológicos, como por exemplo, ligações entre aminos para a formação de proteínas, elas não estão limitadas a sistemas biológicos e estão, presentes em uma enorme variedade de moléculas, incluindo medicamentos na terapia. Atorvastatina, uno dos fármacos mas vendidos no mundo desde 2003, atua bloqueando a produção de colesterol contém uma amida; o lisinopril (inibidor da Enzima conversora de angiotensina), o valsartan (bloqueio do receptor de angiotensina) e diltiazem (bloqueador do canal de cálcio utilizado no

tratamento da angina e hipertensão). Ligações amidicas são normalmente sintetizadas a partir da união de s carboxílicos e aminas, no entanto, a unificação de estes dois grupos funcionais não ocorre espontaneamente com a eliminação de água necessária em temperatura ambiente; esta reação só acontece a temperaturas elevadas (>200) nas quais são condições prejudicial para a integridade dos substratos. Por esta razão, primeiro faz-se necessário ativar o carboxílico, um processo que normalmente ocorre convertendo o -OH do em um bom grupo abandonador antes do tratamento com a amina (Esquema 1). A catálise enzimática também tem sido investigada para a síntese de amidas e na química orgânica já é possível encontrar alguns desses métodos úteis como uma alternativa para a formação da ligação peptídica. ^[37]

A fim de ativar os s carboxílicos, para a formação da ligação peptídica é possível utilizar os chamados reagentes de acoplamento, que atuam como reagentes indispensáveis para gerar os compostos, tais como os cloretos de , anidridos mistos, ésteres ativos carbodimidas, entre outros. Muitos estudos sobre reagentes de acoplamento têm sido realizados, ^[37] o que demonstra a sua importância na síntese orgânica. De modo geral, toda reação de complemento é feita seguindo o esquema Esquema 1.

Esquema 1. - Ativação do ácido carboxílico e reação de acoplamento.

Fonte : Autoria própria a partir de Albericio, F. 2011 p 6558.

1.10 Ensaios enzimáticos (determinação da potência dos inibidores)

O ensaio cinético padrão utilizado para a determinação da atividade das Enzimas cruzaína é realizado através de espectrometria de fluorescência. O mecanismo fundamental de fluorescência é a emissão de fótons quando a molécula excitada no estado singlete retorna ao estado fundamental. O processo de emissão e excitação no fenômeno de fluorescência é muito rápido, com tempo de vida na ordem de um nano segundo. É possível observar facilmente

fluorescência à temperatura ambiente e diretamente em solução, o que torna o procedimento experimental bastante simples.

O método de fluorescência tem sido amplamente utilizado para a determinação da cinética das Enzimas do tipo cisteíno-proteases. Zimmerman e colaboradores sintetizaram a primeira classe de substratos fluorogênicos para as proteases tripsina, elastase e quimotripsina. Esses substratos eram amidas de acil aminos ou peptídeos com o substituinte 7-amino-4-metilcumarina (MCA). A Figura 11 ilustra a estratégia utilizada para a determinação da formação de produto catalisada pelas Enzimas. ^[38]

Figura 11 - Estratégia utilizada para gerar o sinal de fluorescência em reações catalisadas por cisteíno-proteases

Fonte: WIGGERS, H., 2011 p 86.

Aos grupos terminais carbóxi e amino de um dipeptídeo são ligados a um grupo fluorescente e supressor, respectivamente. Após a quebra da ligação peptídica pela Enzima, o grupo fluorescente é liberado em solução permitindo a detecção da formação do produto e determinação da cinética de reação catalisada pela Enzima. ^[28]

Diversos substratos fluorogênicos foram utilizados como substratos para a Enzima cruzaina ^[39, 40]. O substrato estabelecido como padrão para as análises cinéticas de novos inibidores da Enzima foi o N-benzóxicarbonil-L-fenilalanila-L-arginina-7-amido-metilcumarina (Z-Phe-Arg-MCA ou ZFRMCA).

Figura 12 - Estrutura do ZFRMCA (substrato sintético para a cruzaina)

Fonte: WIGGERS, H., **2011** p 86.

Os valores das constantes cinéticas da Enzima cruzaina reportadas na literatura para este substrato são: K_M entre 0,96 e 1,4 μM , k_{cat} entre 3,9 e 11,6 s^{-1} e k_{cat}/K_M entre 4677 e 9667 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$. [39-41] [42]

1.11 Precedentes de pesquisa

O composto protótipo é um dipeptídeo que apresenta inibição em outras cisteíno proteases. [43] Compostos peptídomiméticos tem demonstrado ser inibidores de cisteíno proteases e especificamente da cruzaina. [40, 44] O composto protótipo **Neq0409** é um inibidor planejado pra inativar a Enzima cruzaina pelo fato de ser peptídomimético e conservar a fenilalanina presente na molécula K777, que é um dos fragmentos melhor reconhecidos no subsítio S2 da proteína. [31, 45] No lugar do vinil sulfona que ocupa a região do sítio S1, o composto protótipo possui um grupo nitrila que interage com a cisteína do sítio catalítico das Enzimas catépsinas K,L,S, [46-48] (Enzimas da mesma família da Cruzaina)

Figura 13 - Orientação da substância protótipo (**Neq0409**) no sítio catalítico da Cruzaína.

Fonte: Autoria própria.

Em um trabalho em andamento em nosso grupo este composto foi cocrystalizado com a cruzaína dando base para validação da orientação e modos de interação esperados no composto prototipo **Neq0409** com a Cruzaína.^[49]

O MOB (modo de interação) do inibidor protótipo **Neq0409**, mostrando posição, orientação e interações com o sítio catalítico da cruzaína, foi obtido por cristalografia por difração de raios X, em uma construção mutante (C25S) da cruzaína. Esta construção preserva todas as propriedades no sítio catalítico da Enzima selvagem, tendo porém a substituição de um grupo tiol da cysteína25 por uma hidroxila (Ser25) no resíduo catalítico. Esta estrutura cristalográfica foi determinada a 3Å de resolução no grupo espacial P43212 pelo grupo Nequimed (IQSC USP) e está em processo de publicação. A estrutura mostra que o inibidor está presente no sítio catalítico com os grupos P2 e P3 do inibidor interagindo muito eficientemente com os sub-sítios S2 e S3, conforme a hipótese original para a criação da substância. Além disto a porção peptideomimética da cadeia principal do inibidor, está estabilizada por três ligações de hidrogênio com os aminos Gly66, Asp161 (considerados resíduos de reconhecimento no sítio catalítico da Enzima). A fenilalanina da posição P2 do inibidor interage com os resíduos Leu67, Met68, Ala138 e Leu160 do sub-sítio S2 (importante para a seletividade da Enzima) por interações hidrofóbicas. A porção P3 do inibidor interage apenas com a Leu67 do subsítio S3, sendo este um subsítio grande, superficial e com poucos pontos de ancoragem. A nitrila não está covalentemente ligada no resíduo catalítico da Enzima, lembrando que se trata de uma Enzima mutante uma serina no lugar da cisteína catalítica que em pH 7,5, a hidroxila não estaria dissociada não havendo

assim possibilidades de uma ligação covalente. Com este MOB seria perfeitamente válido assumir que o inibidor na Enzima selvagem ativa estaria covalentemente ligado assumindo as mesmas interações intermoleculares, justificando sua alta potência.

Figura 14 - Estrutura de raios x da substância protótipo **Neq0409** inibindo a Cruzaína mutante.

Fonte: Fernandez w. 2014.

OBJETIVOS

1.12 Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo geral identificar e sintetizar inibidores da Enzima cruzaina.

1.13 Objetivos Específicos

- I. Estabelecimento da rota sintética para os inibidores propostos
- II. Síntese dos compostos inibidores da cruzaina
- III. Determinação dos valores de IC_{50} dos compostos obtidos
- IV. Obter informação da relação estrutura atividade dos compostos.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Sínteses dos compostos

2.1.1 Reagentes e solventes

Para a síntese dos compostos, os solventes utilizados foram adquiridos das empresas Synth, Sigma-Aldrich e Vetec. Quando necessário, foram secados sob peneira molecular 3 Å (20% m/v) seguindo os dados da tabela 1, mas nenhuma purificação foi realizada.

Tabela 1 – Condições de secagem de solventes sob peneira molecular

Solvente	Conteúdo de água (ppm) a 0 horas	Conteúdo de água (ppm) a 24 horas	Conteúdo de água (ppm) a 48 horas	Conteúdo de água (ppm) a 72 horas
THF	107.8± 0.7	14.7± 0.3	6.1± 0.2	4.1± 0.1
DCM	22.4± 1.2	0.1± 0.1	-----	-----
MeOH	175.1± 0.4	28.1± 0.4	23.1± 0.6	19.2± 0.6
EtOH	1428.3± 3.8	119.8± 0.7	25.0± 0.7	20.5± 0.5

Fonte: Autoria própria.

Os reagentes utilizados para a síntese foram adquiridos das empresas Sigma-Aldrich e Merck, com pureza superior a 97 % e utilizados conforme iam sendo recebidos.

2.1.2 Caracterização estrutural dos compostos e precursores

Para o monitoramento do andamento das reações foi utilizada a cromatografia de camada delgada (CCD), com placas cromatográficas da empresa Fluka com indicador de fluorescência (254 nm) e com gradientes dos sistemas de solventes de diferentes polaridades permitindo detectar a formação dos produtos em reação dos reagentes iniciais. A purificação dos compostos foi feita por recristalização em os solventes adequados e, quando necessário, por cromatografia em sílica gel usando sílica da empresa Fluka (tamanho de poro 60Å e tamanho de partícula 35-75 µm).

Para a caracterização dos compostos e precursores foi determinado o ponto de fusão com o equipamento da empresa Microquímica Equipamentos modelo MQAPF-302, espectroscopia no infravermelho (IV) equipamento FTIR da empresa Bomem modelo MB 102 da Central de Análises Químicas (CAQUI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP) e as amostras foram preparadas com brometo de potássio (KBr), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono e hidrogênio no equipamento da empresa Agilent Technologies modelos 500/54 premium shield e 400/54 premium shield no CAQUI, no Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos, equipamento da empresa Bruker 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio), e espectroscopia de massas no espectrômetro de massas híbrido quadrupolo/tempo de voo (QqTOF) da empresa Bruker Daltonics modelo Microtof-QII do grupo de cromatografia do Instituto de Química de São Carlos. A medida de rotação óptica foi efetuada em um polarímetro Schmidt-Hench Polartronic. Foi utilizado como solvente clorofórmio e a relação amostra/solvente foi de 10 mL de solvente para 0,023 g do derivado.

2.1.3 Síntese da substância protótipo (Neq0409)

A síntese da substância protótipo foi realizada, seguindo uma rota utilizada em trabalhos prévios no laboratório, e representada no Esquema 2.

Esquema 2 - Rota sintética para obtenção da substância protótipo (Neq0409)

Reagentes e condições: a) SOCl_2 , MeOH, 12 h. t.a., b) Cloreto de benzoila, TEA, THF, 0°C 12 h., c) LiOH, THF, H_2O , 4 h t.a., d) Aminoacetonitrila, HATU, DIPEA, DMF, t.a. 22 h.

Fonte: Autoria própria.

2.1.4 Protocolo de reação para a síntese da substância protótipo (Neq0409)

Metil (2s)-2-amino-3-fenilpropanoato (1).^[50] Uma solução de fenilalanina (6.60 g, 40 mmol) em metanol seco (80 mL) a -10 °C foi adicionado SOCl₂ (1,2 equiv., 48 mmol, 4 mL) sem permitir que a temperatura aumentasse de 5 °C. Depois da adição, o banho frio (gelo, NaCl) foi retirado e a reação deixada em agitação à temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente foi levado a refluxo por duas horas e a mistura de reação foi secada à vácuo e lavada com éter. Em seguida, filtrou-se sob pressão reduzida, a fim de se obter o produto como um sólido branco (6,8 g) com um rendimento de 95 %. O produto foi suficientemente puro para ser usado na reação seguinte, sem necessidade de qualquer purificação adicional. PF 150-151 °C (valor da literatura 158-160 °C).^[50] IV (KBr) 2985, 2838, 1750, 1580, 1494, 1242 cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ 3,09 (dd, *J* = 14,0 7,5 Hz, 1H), 3,20 (dd, *J* = 14,0 5,8 Hz, 1H), 3,64 (s, 3H), 4,22 (dd, *J* = 7,3 6,0 Hz, 1H), 7,28 (m 5H).

(S)-N-(acyl)-amino acid methyl éster(2).^[46] A uma solução do éster metílico da fenilalanina (1,5 g 7,0 mmol) em THF seco sob peneira molecular, foi adicionado Et₃N (2 mL 15,4 mmol) a 0 °C. O cloreto de benzoila (0,9 mL 7,7 mmol) foi adicionado lentamente, e em seguida, o banho de gelo foi retirado e a mistura de reação mantida em agitação até o consumo total do material de partida (monitorado por CCD). A mistura de

reação foi lavada com 1 M HCl, solução saturada de NaHCO₃ e secada com MgSO₄. O solvente foi evaporado ao vácuo para dar o produto como um sólido branco, que foi purificado em coluna cromatográfica (sílica gel, hexano/acetato de etila 1/1) a fim de se obter o produto como um sólido branco (0,90 g 3,07 mmol). PF 81-82°C (valor da literatura 81-83°C.). IV (KBr) 3315, 3024, 2946, 1738, 1637, 1531, 1214, 697 cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ 3,13 (ddd, *J* = 23,8 13,8 7,7 Hz, 2H), 3,63 (s, 3H), 4,67 (ddd, *J* = 10,0 7,9 5,4 Hz, 1H), 7,18 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H), 7,32 – 7,23 (m, 4H), 7,45 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,45 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,52 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,83 – 7,74 (m, 2H), 8,82 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H).

(2*S*)-3-*fenil*-2-(*ácido propanoico*)*fenilformamido* (**3**). A uma solução da substância **6** (0,68 g 2,4 mmol) em THF (8 mL), foi adicionado gota a gota uma solução de hidróxido de lítio (LiOH) (0,165 g 7,2 mmol) em água. A mistura de reação foi mantida em agitação por 4h, concentrada sob pressão reduzida e em seguida foi levada a pH 2~3 com uma solução 4 mol/L de HCl em 1,4 dioxano. Logo após, a solução foi secada com pressão reduzida e lavada com éter, o produto foi obtido como um sólido branco e usado na seguinte etapa sem purificação adicional. IV (KBr) 3323, 3059, 1615, 1535, 1413, 698 cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ 3,04 (dd, *J* = 13,3 6,6 Hz, 1H), 3,21 (dd, *J* = 13,3 4,8 Hz, 1H), 4,28 (dd, *J* = 11,7 6,6 Hz, 1H), 7,13 – 7,06 (m, 1H), 7,20 – 7,14 (m, 4H), 7,41 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,48 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,71 – 7,66 (m, 2H), 7,73 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H).

(2s)-N-(cianometil)-3-fenil-2-(fenilformamido)propanamida (Neq0409).^[43] O composto **4** (0,2 g 0,74 mmol), O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU) (0,306 g 0,81 mmol) e N-etildiisopropilamina (DIPEA) (0,144 mL 0,81mmol) foram dissolvidos em DCM (20 mL). Após 30 minutos, adicionou-se sal hidrolórico do aminoacetonitrila (0,071 g 0,76 mmol). A solução resultante foi agitada à temperatura ambiente por 24 horas, a mistura de reação foi diluída em acetato de etila, lavada com água (10x), 1M NaOH (2x), 1M HCl (1x) e concentrada ao vácuo. A parte da purificação foi feita por coluna cromatográfica (sílica gel, hexano:acetato de etila 1:1). O produto foi obtido como um sólido (1,53g 0,47mmol 63%). PF 179-180°C. $[\alpha]_D^{23} = -34,1$ (Conc = 1,01 Dioxano). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3,02 (dd, 13,6 10,8 Hz, 1H), 3,14 (dd, 13,7 4,3 Hz, 1H), 4,17 (d, 5,6 Hz, 2H), 4,70 (ddd, 10,7, 8,4, 4,4 Hz, 1H), 7,17 (t, 7,3 Hz, 1H), 7,26 (t, 7,5 Hz, 2H), 7,34 (d, 7,3 Hz, 2H), 7,45 (t, 7,4 Hz, 2H), 7,52 (t, 7,3 Hz, 1H), 7,84 – 7,78 (m, 2H), 8,69 (d, 8,3 Hz, 1H), 8,79 (t, 5,5 Hz, 1H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ 27,62 37,25 55,22 117,32 127,11 127,49 128,75 128,87 129,35 132,30 133,53 137,24 168,21 172,88 IV (KBr) 3299, 3060, 2236, 1673, 1636, 1532, 1326, 693 cm⁻¹. HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₁₈H₁₇N₃O₂] 307,1320, presente: 308,1387 [M+H].

2.1.5 Modificações no fragmento P3

Modificações na região P3 da molécula protótipo são feitas com a finalidade de explorar o subsítio S3 e construir uma relação estrutura atividade na série de moléculas sintetizadas. Tais modificações foram feitas seguindo a ilustração do Esquema 3.

Esquema 3 - Rota sintética e representação das moléculas modificadas no fragmento P3.

Reagentes e condições: a) BOC₂O, NaHCO_{3(aq)}, TFH 4 h, 0 °C - t.a., b) Aminoacetonitrila, HATU, DIPEA, DMF, t.a., 22 h. c) ácido fórmico d) correspondente ácido, HATU, DIPEA, DCM, t.a., 22 h.

Fonte: Autoria própria.

2.1.6 Protocolo de reação para a síntese de substâncias com modificações no fragmento P3.

(2s)-2-[(terbutoxilcarbonil)amino]-3-ácido fenilpropano (5). Na solução de fenilalanina (10 g 61 mmol) em THF (100 mL) 0°C, foi adicionado di-terc-butildicarbonato (15,9 g 60 mmol) e solução saturada de NaHCO_{3(aq)} (100 mL). A mistura de reação foi agitada a 0 °C por 6 h e concentrada sob pressão reduzida; o pH foi ajustado 2~3 como uma solução saturada de KHSO₄. Posteriormente, a reação foi extraída com acetato de etila (EtOAc) (3 x) e a fase orgânica obtida foi secada sob MgSO₄, filtrado e concentrado ao vácuo para dar o produto como um óleo colorido (14,5 g 91%). O produto foi puro suficiente para ser usado na reação seguinte sem purificação adicional.

Ter-butil N-[(1s)-1-[(cianometil)carbomoil]-2-feniletil]carbamoto (Neq0400).^[43] O composto **5** (10 g 37,7 mmol), O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfate (15,7 g 41,5 mmol) e N-etildiisopropilamina (4 mL 37,7 mmol) foram dissolvidos em DMF (100 mL); em seguida foi adicionado aminoacetonitrila hidroclicóric (3,8 g 41,5 mmol). A solução resultante foi agitada a temperatura ambiente por 16 horas; a mistura de reação foi diluída em acetato de etila (100 mL) e lavada com água (10x 100), 1M NaOH (2x 100), 1M HCl (1x 100) e posteriormente concentrada ao vácuo; foi purificado em coluna cromatográfica (sílica gel, hexano:acetato de etila/1:1). **Neq0400** foi obtido como um sólido branco (9,2 g 82%). PF 131-133°C (lit.136-138 °C). $[\alpha]_D^{20} = -1,39$ (Conc = 1,03.MeOH)^[43] ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,44 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 7,30 – 7,15 (m, 5H), 4,18 (dd, J = 13,1 8,2 Hz, 1H), 4,11 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 2,99 (dd, J = 13,8 5,0 Hz, 1H), 2,80 (dd, J = 13,8 9,5 Hz, 1H), 1,31 (s, 9H). ¹³C RMN. (101 MHz, CDCl₃) δ 142,88 131,04 127,69 126,21 120,81 107,59 37,36.

(1s)-1-[(cianometil)carbomoil]-2-feniletano-1-aminium (Neq0538).^[51] A solução de **Neq0400** (5.0 g, 16.5 mmol) foi dissolvida em ácido fórmico puro (10 mL), e agitada por 16 h a temperatura ambiente, posteriormente concentrado ao vácuo e usado na seguinte etapa sem precisar de purificação adicional. O produto foi obtido como um óleo (4,48 g 90%).

(2s)-N-(cianometil)-2-(furan-2-ilformamido)-3-3fenilpropanamida (**Neq0536**). Na solução do ácido orgânico (0,84 g 0,75 mmol), O-(7-Azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronium hexafluorofosfato (0,31 g 0,82 mmol) e N-etildiisopropilamina (0,16 mL 1,5 mmol) dissolvidos em DMF (5 mL) foi adicionado **Neq0538**, (0,220 g 0,82 mmol). A solução resultante foi agitada a temperatura ambiente por 16 h, a mistura de reação foi dissolvida em acetato de etila (5 mL), lavado com água (10x 5 mL), 1M NaOH (2x 5mL), 1M HCl (1x 5mL) e concentrada ao vácuo purificado em coluna cromatográfica (sílica gel, hexano:acetato de etila/1:1). (0,169 g 76%) P.F. 76-179°C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,82 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 8,54 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,83 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H), 7,32 – 7,21 (m, 4H), 7,20 – 7,10 (m, 2H), 6,61 (dd, $J = 3,5, 1,7$ Hz, 1H), 4,65 (td, $J = 10,3, 4,5$ Hz, 1H), 4,16 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H), 3,11 (dd, $J = 13,7, 4,4$ Hz, 1H), 3,00 (dd, $J = 13,7, 10,4$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171,77 157,66 147,27 145,19 137,87 129,07 128,14 126,36 117,46 113,90 111,82 79,17 53,88 36,73 27,21. HRMS (ESI (+)) Calcd. $[\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3]$ 297,3086. Presente: 298,1185 $[\text{M}+\text{H}]$.

(2S)-N-(cianometil)-3-fenil-2-(tiofen-2-ilformamido)propanamida (**Neq0535**). Sintetizado nas mesmas condições da substância **Neq0536**, o produto foi obtido como um sólido branco (0,160 g 70%). P.F. 162-165°C ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,81 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 8,72 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,82 (dd, $J = 3,8, 1,2$ Hz, 1H), 7,71 (dd, $J = 5,0, 1,1$ Hz,

1H), 7,33 – 7,26 (m, 2H), 7,22 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,18 – 7,10 (m, 2H), 4,61 (ddd, $J = 10,6$ 8,4 4,5 Hz, 1H), 4,13 (d, $J = 5,9$ Hz, 2H), 3,09 (dd, $J = 13,7$ 4,5 Hz, 1H), 2,95 (dd, $J = 13,7$ 10,6 Hz, 1H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ 172,01 161,22 139,24 137,99 133,18 131,18 129,15 128,80 128,22 127,95 126,45 117,54 54,63 36,91 27,27 HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₁₆H₁₅N₃O₂S] 313,374. Presente: 336,0784 [M+Na].

(2S)-N-(cianometil)-2-[(2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)formamido]-3-fenil propanamida (**Neq0537**). Sintetizado nas mesmas condições da substância **Neq0536**, o produto foi obtido como um sólido branco (0.143 g 56 %) P.F. 262-265°C ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,28 (s, 1H), 9,12 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,88 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 7,31 – 7,24 (m, 4H), 7,23 – 7,16 (m, 1H), 6,03 (s, 1H), 4,64 – 4,55 (m, 1H), 4,17 (dd, $J = 5,6$ 1,3 Hz, 2H), 3,13 (dd, $J = 13,7$ 4,3 Hz, 1H), 2,91 (dd, $J = 13,7$ 10,8 Hz, 1H), 2,08 (s, 1H). ^{13}C RMN (126 MHz, DMSO-d₆) δ 171,46 164,51 160,59 151,10 144,78 137,97 129,46 128,67 126,96 117,82 100,84 79,60 55,21 37,08 31,13 27,63 HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₁₆H₁₅N₅O₄] 341,3214. Presente: 342,1196 [M+1].

(2S)-N-(cianometil)-3-fenil-2-trifluoroacetamido)propanamida (**Neq0545**). Sintetizado nas mesmas condições da substância **Neq0537**, o produto foi obtido como um sólido branco (0.192g 63 %) ^1H RMN (400 MHz, dmso) δ 9,74 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,94 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H), 7,24 (d, $J = 1,5$ Hz, 4H), 7,17 (dd, $J = 9,4$ 4,5 Hz, 1H), 4,57 – 4,48

(m, 1H), 4,16 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H), 3,09 (dd, $J = 13,7, 4,4$ Hz, 1H), 2,89 (dd, $J = 13,7, 10,8$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (126 MHz, dmsO) δ 170,70 137,50 129,50 128,62 127,03 119,55 117,80 117,25 114,96 54,86 36,80 28,95 27,67 DEPT 135 ^{13}C RMN (101 MHz, dmsO) δ 129,48 128,59 127,00 54,91 36,77 28,92 27,64 HRMS (ESI (+)) Calcd. $[\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2]$ 299,2485. Presente: 322,07712 $[\text{M}+\text{Na}]$.

*Ter-butyl N-[2-(5-[(1*s*)-1-[(cianometil)carbomoil]-2-heniletil]carbamoil)-4-metil 1,3-tiazol-2-il)etil]carbamate (Neq0546).* Sintetizado nas mesmas condições da substância **Neq0537**, o produto foi obtido como um sólido branco (0,172g 58 %) ^1H NMR (500 MHz, dmsO) δ 8,82 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 8,31 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,31 – 7,24 (m, 4H), 7,18 (dd, $J = 9,7 4,3$ Hz, 1H), 6,96 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H), 4,65 – 4,57 (m, 1H), 4,18 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H), 3,24 (dd, $J = 12,9 6,9$ Hz, 2H), 3,08 (dd, $J = 13,7 4,4$ Hz, 1H), 3,01 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 2,98 – 2,92 (m, 1H), 2,34 (s, 3H), 1,37 (s, 8H) HRMS (ESI (+)) Calcd. $[\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}]$ 471,572. Presente: 472,2012 $[\text{M}+\text{H}]$.

*(2*s*)-2-[(2-[2-aminoetil]-4-metil-1,3-tiazol-5-il)formamido]-N-(cianometil)-3-fenilpropanamida (Neq0547).* A solução de **Neq0546** (0.060 g, 0,12 mmol) foi dissolvida em ácido fórmico puro (10 mL) e agitada por 16 h a temperatura ambiente, posteriormente

concentrado ao vácuo, o produto foi obtido como um óleo. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8,78 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 8,28 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,29 – 7,20 (m, 4H), 7,16 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 6,93 (s, 1H), 4,57 (dd, $J = 13,5$ 5,3 Hz, 1H), 4,14 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H), 3,23 – 3,17 (m, 1H), 3,05 (dd, $J = 12,4$, 3,2 Hz, 1H), 2,97 (dd, $J = 12,9$, 5.8 Hz, 2H), 2,92 (s, 1H), 2,31 (s, 3H), HRMS (ESI (+)) Calcd. $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}]$ 372,457. presente: 372,1489 $[\text{M}+\text{H}]$.

2.1.7 Modificações no fragmento P2.

Modificações na região P2 da molécula protótipo são feitas com a finalidade de explorar o subsítio S2 e construir uma relação estrutura atividade na série de moléculas sintetizadas. As modificações foram feitas seguindo a ilustração do esquema 4.

Esquema 4 - Rota sintética molécula modificadas no fragmento P2

Reagentes e condições: a) BOC_2O , $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$, TFH 4h. 0°C - t.a., b) Aminoacetonitrila, HATU, DIPEA, DMF, t.a. 22h.

Fonte: Autoria própria.

2.1.8 Protocolo de reação para a síntese de substâncias com modificações no fragmento P2

Ter-butil-N-[(1s)-2-(3-clorofenil)-1-[(cianometil)carbamoil]carbamato (Neq0544)]. A solução do amino (2,52 g 12,5 mmol) em THF (25 mL) a 0°C foi adicionado di-ter-butildicarbonato (3,00 g 13,8 mmol) e solução saturada de NaHCO₃ (25 mL) a mistura de reação e agitada a 0 °C por 6 h e concentrada sob pressão reduzida, o pH ajustado 2~3 como uma solução saturada de KHSO₄. Posteriormente, a solução foi lavada com acetato de etila (EtOAc) (3 x 20 mL), e a fase orgânica obtida foi secada sob MgSO₄, filtrado e concentrado ao vácuo para dar o produto como um óleo amarelo, o qual foi usado na seguinte reação sem purificação (3,07 g 82%).

Ao produto anterior (1,50 g 5 mmol), O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfate, (1,90 g 5,5 mmol), e N-etildiisopropilamina (0,53 mL 5mmol) em DMF (15 mL) foram adicionados aminoacetonitrila hidrocloreto (0,52 g 5,5 mmol). A solução resultante foi agitada a temperatura ambiente por 16 horas, posteriormente foi diluída em acetato de etila e lavada com água (10x 10 mL), 1M NaOH (2x 10 mL), 1M HCl (1x 10 mL) e posteriormente concentrada ao vácuo, purificado em coluna cromatográfica (sílica gel, hexano:acetato de etila/ 1:1) o produto foi obtido como um sólido branco.

Ter-butil-N-[(1s)-1-[(cianometil)carbamoil]-3-metilbutilcarbamato (Neq0548)].

Sintetizado nas mesmas condições da substância **Neq0544**, o produto foi obtido como um sólido branco ¹H NMR (400 MHz, cdcl₃) δ 7,33 (s, 1H), 5,04 (s, 1H), 4,14 (d, *J* = 5,4 Hz, 4H), 1,63 (dd, *J* = 15,1 9,8 Hz, 3H), 1,51 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 1,43 (s, 12H), 0,95 (s, 1H), 0,92 (dd, *J* = 9,8 6,2 Hz, 7H) HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₁₃H₂₃N₃O₃] 269,34. Presente: 392,1632 [M+Na].

2.1.9 Modificação no fragmento P1

Modificações na região P1 da molécula protótipo foram feitas com a finalidade de explorar o subsítio S1 e construir uma relação estrutura atividade na série de substâncias sintetizadas. As modificações foram feitas seguindo o Esquema 5.

Esquema 5 - Modificação no fragmento P1

Reagentes e condições: a) BOC_2O , $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$, TFH 4 h. 0°C - t.a., b) 1-aminociclopopropano-1-carbonitrila, HATU, DIPEA, DMF, t.a. 22 h.

Fonte: Autoria própria.

2.1.10 Protocolo de reação para a substância com modificação no fragmento P1

Ter-butil *N-[(1s)-1-[(1-cianociclopopil)carbomoil]-3-metilbutil]carbamato* (**Neq0549**). Sintetizado nas mesmas condições da substância **Neq0544**, o produto foi obtido como um sólido branco ^1H NMR (400 MHz, dmso) δ 8,80 (s, 1H), 6,91 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 3,87 (dd, $J = 13,6$ 8,7 Hz, 1H), 1,60 – 1,50 (m, 1H), 1,46 (dd, $J = 7,6$ 5,5 Hz, 3H), 1,38 (d, $J = 10,8$ Hz, 9H), 1,07 (dd, $J = 7,7$ 5,4 Hz, 1H), 0,85 (dd, $J = 8,7$ 6,7 Hz, 6H).

2.2 Ensaios bioquímicos

2.2.1 Reagentes e solventes

Os reagentes fosfatos de sódio monobásico e dibásico, etilenodiamino tetra-acético (EDTA), dimetilsulfóxido (DMSO), Triton-x100, acetato de sódio, glicerol, cloreto de sódio, ZFRMCA, foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O reagente Ditiotretitol (DDT) foi adquirido da empresa USB Corporation com grau de pureza “ultrapuro”.

Todos os reagentes têm certificação do fabricante de pureza > 99 %. Nenhuma purificação/avaliação da integridade adicional foi realizada.

Os ensaios bioquímicos foram feitos utilizando o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader da Biotek. Foi utilizando também uma placa de 96 poços; os filtros de banda de excitação e emissão foram de 355 nm e 460 nm respectivamente. O volume final de cada poço foi de 200 µL e as medições para cada poço foram feitas em duplicada.

2.2.2 Ensaios de inibição das Enzimas cruzaina para determinação de IC₅₀

Solução estoque da Enzima: Cruzaina preparada por outro membro do grupo de acordo com o procedimento previamente descrito - 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.^[49]

A concentração da Enzima utilizada foi 2,0 nM e do substrato ZFRMCA 2,0 µM.

Os valores de concentração para inibir 50% da atividade enzimática (IC₅₀) foram determinados através da curva dose-resposta. As concentrações dos inibidores nos ensaios variaram de 10 a 1000 nM. Estas concentrações, do mais concentrado para o menos concentrado, foram realizadas segundo um esquema de diluição serial na proporção de diluição 2 vezes, partindo da concentração mais alta de 10 mM. O procedimento utilizado para a Enzima foi incubar a Enzima na solução tampão contendo DTT por 5 minutos, em seguida o inibidor foi incubado também por 5 minutos antes de adicionar o substrato; a hidrólise do substrato foi acompanhada por fluorescência com a excitação em 355 nm e emissão 460 nm durante 6 minutos. A velocidade foi determinada pela lei da velocidade

inicial. Todos os experimentos foram feitos no mínimo em duplicata. As curvas de percentual de inibição em função da concentração das substâncias testadas foram ajustadas na curva dose-resposta utilizando o programa Sigmaplot 10.0.

Os compostos a testar foram distribuídos em uma placa de 96 poços: as soluções dos compostos, dissolvidos em DMSO, foram colocadas na placa no volume de 7,5 uL. Na coluna 01 da placa colocou-se o DMSO puro (branco), nas 11 subsequentes as soluções em diferentes concentração de cada composto. Nas duas primeiras filas foi colocado E64 (inibidor padrão) em concentrações entre 2 nM e 2 μ M, com a finalidade de monitorar a concentração da Enzima no correr dos ensaios, e nas seguintes 6 filas foram colocados 3 compostos cada um em duplicata.^[49]

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composto protótipo

3.1.1 Reação de formação de ligação peptídica (reação de acoplamento)

Esquema 6 - Reação de formação de ligação peptídica (composto protótipo Neq0409)

Reagentes e condições: Aminoacetonitrila, HATU, DIPEA, DMF, t.a. 22h.

Fonte: Autoria própria.

Esquema 7 - Mecanismo de acoplamento da substância protótipo

Fonte: Autoria própria.

O mecanismo de reação para acoplamento utilizado para todos os compostos com o reagente 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate, *N*-[(Dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]pyridin-1-ylmethylene]-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphate *N*-oxide (HATU) para a formação da substância protótipo (usado para a obtenção de todas as moléculas) inicia-se com uma reação base entre a DIPEA e o respectivo ácido carboxílico (Esquema 13, página 49). Posteriormente, a carboxila precisou ser ativada para sofrer o ataque da aminoacetonitrila; o processo de

ativação ocorreu depois da formação do éster, que é um intermediário gerado *in situ*, que permite à carbonila ser atacada pela aminoacetonitrila. A formação do produto foi confirmada pelo espectro ^1H RMNe a rotação específica apresentada $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -34,1$ (Conc = 1,01 Dioxano) Figura 15.

Figura 15 - Espectro ^1H RMN da substância protótipo **Neq0409**

Fonte: Autoria própria.

Os sinais **A** e **B** são evidências de que a molécula apresenta duas ligações peptídicas na sua estrutura (sinais N-H de amidas). Além disso a multiplicidade dos sinais e o valor das constantes do acoplamento químico (*J*) evidenciam que estes sinais apresentam acoplamento com os sinais **I** e **J** Hidrogênios vizinhos. Há também no composto **Neq0409** (**C,D,E,F,G,H**) sinais correspondentes a 10 hidrogênios aromáticos, e em um deslocamento químico de 4,14 sinal **J** um dubleto, correspondente aos dos hidrogênios da nitrila.

Tabela 2 - Atribuição das sinais ^1H da substância protótipo **Neq0409**

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	8,77	(t) 5,58
B	8,67	(d) 8,29
C	7,78	(m) ---
D	7,50	(t) 7,31
E	7,42	(t) 7,37
F	7,31	(d) 7,06
G	7,23	(t) 7,49
H	7,14	(t) 7,26
I	4,67	(ddd) 5,24 / 8,91 / 10,56
J	4,14	(d) 5,83
K	3,11	(dd) 4,33 / 13,64
L	2,99	(dd) 10,74 / 13,58d

Fonte: Autoria própria.

3.2 Síntese de substâncias com modificações em P3

Com a finalidade de explorar o sítio S3 da cruzaína, foram feitas modificações na molécula protótipo gerando oito compostos diferentes, (**Neq0400**, **Neq0535**, **Neq0536**, **Neq0537**, **Neq0545**, **Neq0546**, **Neq0547**) que foram sintetizados mediante um intermediário comum (substância **Neq0538**).

3.2.1 Substância Neq0400

A substância **Neq0400** é já conhecida e apresenta atividade frente outras sistemo proteases,^[43] neste trabalho sintetizada com a finalidade de testar contra a Enzima cruzaína; a obtenção da substância confirmada por ¹HRMN Figura 16 (pagina 51) e por a rotação específica apresentada $[\alpha]^{23}_D = -1,39$ (Conc = 1,03 MeOH).

Figura 16 - Espectro ¹H RMN da substância **Neq0400**

Fonte: Autoria própria.

O espectro de RMN de ¹H obtido para este composto apresenta a sinal **A** correspondente aos hidrogênios N-H da ligação amida, sinal **B** correspondente aos hidrogênios do anel aromático, sinal **C** é um dubleto correspondente aos hidrogênios da nitrila, **E** e **F** hidrogênios embora ligados no mesmo carbono não equivalentes por estar do lado de um centro estrogênico; o sinal **G** faz referência a 9 hidrogênios equivalentes correspondentes à terbutila do grupo protetor.

Tabela 3 - Atribuição das sinais ^1H da substância. **Neq0400**

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	8,44	(t) 5,15
B	7,23	(m) ---
C	4,19	(dd) 7,74 / 12,34
D	4,11	(d) 5,65
E	3,00	(dd) 5,05 / 12,81
F	2,80	(dd) 9,50 / 13,80
G	1,32	(s) ---

Fonte: Autoria própria.

3.2.2 Substância **Neq0538**

A substância **Neq0538** foi obtido como um sólido branco, e sua obtenção foi confirmada pelo espectro RMN (Figura 17), **Neq0538** permitiu comprovar a importância dos substituintes na região P3, pois todas as substâncias com substituinte no P3 apresentaram uma potência maior nos ensaios contra a cruzaina (Tabela 14).

Figura 17 - Espectro ¹H RMN da substância Neq0538

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 - Atribuição das sinais ¹H da substância Neq0538

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	8,63	(t) 5,60
B	7,19	(m) ---
C	6,40	(d) 8,08
D	4,28	(dd) 7,88 / 13,78
E	4,07	---
F	2,88	(dd) 5,80 / 13,71
G	2,75	(m) ---

Fonte: Autoria própria.

Neste espectro ^1H é possível encontrar sinais similares à da substância anterior, porém a ausência do grupo protetor Boc é sinalada pela falta do sinal referente aos 9 hidrogênios correspondentes.

3.2.3 Substância Neq0536

A substância **Neq0536** foi obtido como um solido branco, e não apresenta registro na literatura, o espectro de RMN ^1H (Figura 18) e ^{13}C (Figura 19) e espectro de massas (Figura 47) comprovam a obtenção da Substância.

Figura 18 - Espectro ^1H RMN da substância **Neq0536**

Fonte: Autoria própria.

Figura 19 - Espectro ¹³C RMN da substância Neq0536

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Atribuição das sinais ¹H e ¹³C da substância Neq0536

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	8,82	(t) 5,55
B	8,54	(d) 8,43
C	7,83	(d) 0,94
D	7,26	(m) ---
E	7,15	(m) ---
F	6,61	(dd) 1,74 / 3,45
G	4,65	(td) 4,47 / 10,29
H	4,16	(d) 5,70
I	3,11	(dd) 4,43 / 13,75
J	3	(dd) 10,42 / 13,71

Carbono	Sinal (δ)	Atribuição
1	171,7	Carbono da amida
2	157,6	Carbono da amida
3	147,3	Carbono aromático
4	145,2	Carbono aromático
5	137,9	Carbono aromático
6	129,1	Carbono aromático
7	128,1	Carbono aromático
8	126,4	Carbono aromático
9	117,5	RC≡N
10	113,9	Carbono aromático
11	111,8	Carbono aromático
12	79,2	R ₂ CHNHC=O
13	53,9	R ₂ CHNHC=O
14	36,7	C-H alquenos
15	27,2	C-H alquenos

Fonte: Autoria própria.

Como evidência da obtenção da substância, o espectro de ^1H RMN apresenta os sinais **A** e **B** correspondentes aos hidrogênios N-H das ligações amida. Além disso, apresenta os sinais **C**, **D**, **E**, **F** como sinais correspondentes aos 8 hidrogênios aromáticos; **G** faz referência ao hidrogênio no centro estereogênico; o sinal **H** correspondente aos dos hidrogênios da amino nitrila, **I** e **J** correspondem aos hidrogênios vizinhos ao centro estereogênico. No espectro ^{13}C RMN obtiveram-se sinais para 15 carbonos, nos quais dois deles são carbonos na região de carbonos de ligações amida (**1** e **2**), 8 sinais de carbonos aromáticos e um sinal correspondente ao carbono $\text{C}\equiv\text{N}$ da nitrila (sinal **9**). Os sinais apresentados garantem a formação da substância Neq0536.

3.2.4 Substância Neq0535

A substância **Neq0535** não apresenta registro na literatura, A substância foi obtida como um sólido branco, de rotação específica $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -141,8$ (Conc = 1,01 MeOH) o espectro de RMN ^1H , ^{13}C , massas comprovam a obtenção da molécula (Figura 20, Figura 21 e Figura 48).

Figura 20 - Espectro ^1H RMN da substância **Neq0535**

Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Espectro ¹³C RMN da substância Neq0535

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6 - Atribuição das sinais ¹H e ¹³C da substância Neq0535

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	8,81	(t) 5,60
B	8,72	(d) 8,37
C	7,82	(dd) 1,15 / 3,76
D	7,71	(dd) 1,14 / 5,00
E	7,29	(m) ---
F	7,22	(d) 7,44
G	7,13	(m) ---
H	4,61	(ddd) 4,50 / 8,39 / 10,58
I	4,13	(d) 5,94
J	3,09	(dd) 4,49 / 13,70
k	2,95	(dd) 10,61 / 13,69

Carbono	Sinal (δ)	Atribuição
1	172,0	Carbono da amida
2	161,2	Carbono da amida
3	139,24	Carbono aromático
4	138,0	Carbono aromático
5	133,2	Carbono aromático
6	131,1	Carbono aromático
7	129,2	Carbono aromático
8	128,8	Carbono aromático
9	128,2	Carbono aromático
10	127,9	Carbono aromático
11	126,5	Carbono aromático
12	117,5	RC≡N
13	54,6	R ₂ CHNHC=O
14	36,91	C-H alquenos
15	27,27	C-H alquenos

Fonte: Autoria própria.

O espectro de ^1H RMN apresenta os sinais **A** e **B** correspondentes aos hidrogênios N-H das ligações amida. Além disso, apresenta os sinais **C**, **D**, **E**, **F**, **G**, como sinais correspondentes a 8 hidrogênios aromáticos, **H** faz referência ao hidrogênio no centro estereogênico, o sinal **I** correspondente aos dos hidrogênios da amino nitrila, **K** e **J** correspondem aos hidrogênios vizinhos ao centro estereogênico. No espectro ^{13}C RMN se obteve sinais para 15 carbonos, os quais dois deles são carbonos na região de carbonos de ligações amida (**1** e **2**); além disso 9 sinais de carbonos aromáticos, o sinal **9** correspondente ao carbono $\text{C}\equiv\text{N}$ da nitrila, os sinais apresentadas são uma forte evidência da formação da substância Neq0535.

3.2.5 Substância Neq0537

A substância **Neq0537** não apresenta registro na literatura, A substância foi obtida como um solido branco, de rotação específica $[\alpha]_D^{23} = -39,2$ (Conc = 1,0 MeOH) e o espectro de RMN ^1H e ^{13}C são apresentados e discutidos (Figura 22, Figura 23, e Tabela 7).

Figura 22 - Espectro ^1H RMN da substância **Neq0537**

Fonte: Autoria própria.

Figura 23 - Espectro ¹³C RMN da substância Neq0537

Fonte: Autoria própria.

Tabela 7 - Atribuição das sinais ¹H e ¹³C da substância Neq0537

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	11,28	(s) ---
B	9,12	(d) 8,26
C	8,88	(t) 5,55
D	7,27	(m) ---
E	7,20	(m) ---
F	6,03	(s) ---
G	4,60	(m) ---
H	4,17	(dd) 1,30 / 5,57
I	3,13	(dd) 4,31 / 13,74
J	2,91	(dd) 10,79 / 13,71
K	2,08	(s) ---

Carbono	Sinal (δ)	Atribuição
1	171,5	Carbono da amida
2	164,5	Carbono da amida
3	160,6	Carbono da amida
4	151,1	Carbono da amida
5	144,8	Carbono aromático
6	138,0	Carbono aromático
7	129,5	Carbono aromático
8	128,7	Carbono aromático
9	127,0	Carbono aromático
10	117,8	RC≡N
11	100,8	Carbono aromático
12	76,6	HRN-C=CH ₂ R
13	55,2	R ₂ CHNHC=O
14	37,1	C-H alquenos
15	31,1	C-H alquenos
16	27,6	C-H alquenos

Fonte: Autoria própria.

O espectro de ^1H RMN para a substância Neq0537, apresentou o sinal **A** em δ 11,28 ppm característica da substância pois seu N-H está entre duas carbonilas, o que faz com que o hidrogênio apresente tal deslocamento. Duas ligações amidas (sinais **B** e **C**), 5 hidrogênios na região dos aromáticos (**D**, **E**), o sinal **F** correspondente a um hidrogênio vinílico, **G** hidrogênio do centro estereogênico, **H** dois hidrogênios da nitrila. O espectro ^{13}C RMN apresentou 16 sinais correspondentes aos carbonos presentes na molécula, os quatro primeiros correspondentes aos C=O das amidas, 6 sinais correspondentes aos carbonos aromáticos; o sinal **10** em δ 117,8 ppm bem conhecido da nitrila e sinais correspondentes à dupla ligação são evidência da formação da substância Neq0537.

3.2.6 Substância Neq0545

A substância **Neq0545** não apresenta registro na literatura; o substituinte no P3 (derivado do ácido trifluoroacético) é inserido com a finalidade de aumentar a acidez do grupo amino vizinho, e promover assim ligações de hidrogênio com o sítio catalítico. ^1H (Figura 24) ^{13}C (Figura 25), DEP 135 (Figura 26) RMN e espectrometria de massas (Figura 50) são apresentados e discutidos.

Figura 24 - Espectro ^1H RMN da substância **Neq0545**

Fonte: Autoria própria.

Figura 25 - Espectro ^{13}C RMN da substância **Neq0545**

Fonte: Autoria própria.

Figura 26 - Espectro DEPT 135 da substância **Neq0545**

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 - Atribuição das sinais ^1H e ^{13}C da substância Neq0545

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	9,74	(d) 8,37
B	8,94	(t) 5,45
C	7,20	(m) ---
D	4,57	(m) ---
E	4,16	(d) 5,52
F	3,09	(dd) 4,45 / 13,69
G	2,89	(dd) 10,79 / 13,68

Carbono	^{13}C RMN (δ)	DEP 135 (δ)	Atribuição
1	170,7	---	Carbono da amida
2	157,2	---	Carbono da amida
3	156,9	---	Carbono da amida
4	156,6	---	Carbono da amida
5	156,32	---	Carbono da amida
6	137,5	---	Carbono aromático
7	129,5	CH	Carbono aromático
8	128,6	CH	Carbono aromático
9	127,0	CH	Carbono aromático
10	117,8	---	RC≡N
11	117,2	ND	Carbono aromático
12	115,0	ND	Carbono aromático
13	54,9	CH	R ₂ CHNHC=O
14	36,8	CH ₂	C-H alquenos
15	27,7	CH ₂	C-H alquenos

Fonte: Autoria própria.

O espectro de ^1H RMN para o composto Neq0545 apresenta dois sinais correspondentes aos hidrogênios N-H das ligações amidas, porem neste espectro a sinal do hidrogênio **A** faz referência ao hidrogênio da amida ligada ao grupo CF_3 , grupo muito elétron retirador que faz com que o sinal seja deslocado a um campo mais alto dos apresentados nas substâncias anteriores, 5 hidrogênios no sinal **C** correspondentes a hidrogênios aromáticos, o sinal **D** correspondente ao hidrogênio do centro estrogênico, E evidencia da presença da nitrila, **F** e **G** hidrogênios vizinhos do centro estrogênico. O espectro de ^{13}C RMN apresenta 15 sinais e tem a particularidade de ser mais complexo já que a presença dos 3 átomos de flúor que acoplam com os carbonos vizinhos ao CF_3 geram quatro sinais para um mesmo átomo de carbono (quartetos). Neste caso foi necessário obter o espectro de carbono sob o experimento DEPT 135, que mantem o deslocamento das sinais mas permitiu distinguir entre carbonos quaternários, secundários, terciários e primários, (carbonos secundários para baixo, quaternários não apresentam sinal, primários e terciários aparecem normalmente). Assim foi possível atribuir os sinais aos carbonos como é apresentado na Tabela 8 e foi possível perceber o efeito de desdobramento sob os carbonos mas pertos ao grupo CF_3 , principalmente no carbono **2** que apresenta 4 sinais.

3.2.7 Substância Neq0546

O composto **Neq0546**, não registrado na literatura é comparado com as demais substâncias obtidas neste trabalho e sua potencia apresentada na Tabela 14. A presença do produto foi confirmada por espectrometria de massas (Figura 51), ^1H RMN (Figura 27), ^{13}C RMN (Figura 28).

Figura 27 - Espectro ^1H RMN da substância **Neq0546**

Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Espectro ¹³C RMN da substância Neq0546

Fonte: Autoria própria.

Tabela 9 - Atribuição das sinais ^1H e ^{13}C da substância **Neq0546**

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	8,82	(t) 5,57
B	8,31	(d) 8,17
C	7,16	(m) ---
D	4,61	(m) ---
E	4,18	(d) 5,60
F	3,24	(dd) 6,86 / 12,93
G	3,08	(m) ---
H	3,01	(t) 7,03
I	2,95	(m) ---
J	2,34	(s) ---
k	1,37	(s) ---

Carbono	Sinal (δ)	Atribuição
1	172,2	Carbono da amida
2	171,7	Carbono da amida
3	171,3	Carbono da amida
4	166,1	Carbono aromático
5	165,5	Carbono aromático
6	161,5	Carbono aromático
7	154,5	Carbono aromático
8	138,2	Carbono aromático
9	129,6	Carbono aromático
10	128,6	Carbono aromático
11	126,8	Carbono aromático
12	126,0	Carbono aromático
13	117,9	$\text{RC}\equiv\text{N}$
14	55,3	$\text{R}_2\text{CHNHC}=\text{O}$
15	42,5	C-H alquenos
16	38,4	C-H alquenos
17	37,1	C-H alquenos
18	30,1	C-H alquenos
19	28,9	C-H alquenos
20	27,6	C-H alquenos
21	17,2	C-H alquenos

Fonte: Autoria própria.

O espectro ^1H RMN da substância **Neq0546**, apresenta **A** e **B** como hidrogênios N-H dos grupos amida, com seu respectivo acoplamento com os hidrogênios vizinhos (**C** e **D** respectivamente), **D** sinal do hidrogênio do centro estrogênico, **E** sinal dos dois hidrogênios do CH_2 vizinho à nitrila, **J** referente aos hidrogênios da metila, e **K** como referência aos 9 hidrogênios do grupo protetor do nitrogênio. O espectro de ^{13}C RMN apresenta 21 sinais, entre as mais características estão sinais **1**, **2** e **3** dos hidrogênios da função amida, sinais para 9 carbonos aromáticos, e a sinal 13 referente ao $\text{C}\equiv\text{N}$.

3.2.8 substância Neq0547

Neq0547, não registrado na literatura e comparado e sua potencia apresentada na Tabela 14. A presença do produto foi confirmada por espectrometria de massas (Figura 52), ^1H RMN (Figura 29), ^{13}C RMN (Figura 30).

Figura 29 - Espectro de ^1H RMN da substância **Neq0547**

Fonte: Autoria própria.

Figura 30 - Espectro ¹³C RMN da substância Neq0547

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10 - Atribuição das sinais ¹H e ¹³C da substância Neq0547

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	8,78	(t) 5,55
B	8,28	(d) 8,19
C	7,21	(m) ---
D	6,93	(t) 5,29
E	4,57	(dd) 5,28 / 13,47
F	4,14	(d) 5,58
G	3,21	(dd) 6,80 / 12,90
H	3,06	(m) ---
I	2,93	(m) ---
J	2,31	(s) ---

Carbono	Sinal (δ)	Atribuição
1	172,1	Carbono da amida
2	167,8	Carbono da amida
3	161,7	Carbono da amida
4	155,9	Carbono da amida
5	154,3	Carbono da amida
6	138,2	Carbono da amida
7	129,6	Carbono da amida
8	128,5	Carbono da amida
9	126,8	Carbono da amida
10	125,7	Carbono da amida
11	117,9	RC≡N
12	78,2	RCH ₂ N
13	55,2	R ₂ CHNHC=O
14	37,1	C-H alquenos
15	33,4	C-H alquenos
16	28,7	C-H alquenos
17	27,6	C-H alquenos

Fonte: Autoria própria.

O espectro de ^1H RMN apresenta os sinais das funções amida (**A** e **B**), sinais dos hidrogênios aromáticos (**C**). Ilustra-se também um sinal correspondente ao N-H do grupo amina e com relação à substância Neq0546 manteve os outras sinais, exceto o singlete correspondente aos 9 hidrogênios do grupo protetor da amina. O espectro de ^{13}C RMN apresenta 17 sinais correspondentes à substância apresentada na Tabela 10.

3.3 Modificações no fragmento do sítio P2

Com a finalidade de explorar o sítio S2 da cruzaina foram feitas modificações na molécula protótipo gerando as substâncias Neq0544 e Neq0548.

3.3.1 Substância Neq0544

Neq0544, não apresenta registro na literatura, e foi sintetizado sob a hipótese de que substituição em posição meta da fenila do fragmento P2 (que interage na region S2) gero um ganho na potencia de inibidores de outras cisteino proteases,^[52] neste trabalho o substituinte cloro em posição meta (Neq0544) apresento um ganho na potencia com relação à substância que não apresenta a substituição (Neq0400), resultados e comparação da inibição são apresentados na Tabela 14 – Relação estrutura atividade das substâncias obtidas. Tabela 14. A formação do produto é confirmada pelo espectro ^1H RMN (Figura 31).

Figura 31 - Espectro ^{13}C RMN da substância **Neq0544**

Fonte: Autoria própria.

Para o composto **Neq0544**, o espectro ^1H RMN apresenta um sinal correspondente ao N-H da função amida, e neste caso apresentou somente 4 hidrogênios aromáticos. No anel aromático, um dos hidrogênios foi trocado por cloro, o sinal do CH_2 vizinho da nitrila foi mantido (**D** 4,11 ppm), os sinais **E** e **F** correspondentes aos hidrogênios vizinhos do centro estereogênico e o sinal **G** corresponde aos 9 hidrogênios do grupo protetor.

Tabela 11 - Atribuição das sinais ^1H da substância **Neq0544**

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	8,61	(t) 5,37
B	7,19	(m) ---
C	7,02	(d) 8,42
D	4,11	(dd) 5,37 / 12,85
E	2,92	(dd) 4,57 / 13,69
F	2,71	(dd) 10,31 / 13,57
G	1,26	(s) ---

Fonte: Autoria própria.

3.3.2 Substância **Neq0548**

Neq0548 não apresenta registro literário; foi sintetizado com a hipótese de que o aumento na hidrofilicidade na região P2 promove interações com o subsítio S2 e aumenta a potência destes inibidores em cisteína proteases;^[48] e a comparação entre a substância **Neq0548** e **Neq0400** valida esta hipótese (Tabela 14). A formação do produto é confirmada pelo espectro ^1H RMN (Figura 32)

Figura 32 - Espectro ^1H RMN da substância **Neq0548**

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 - Atribuição das sinais ^1H da substância **Neq0548**

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	7,33	(s) ---
B	5,04	(s) ---
C	4,14	(d) 5,45
D	1,63	(dd) 9,85 / 15,14
E	1,51	(d) 8,98
F	1,43	(s) ---
G	0,95	(s) ---
H	0,92	(dd) 6,21 / 9,80

Fonte: Autoria própria.

Para o composto Neq0548, o espectro ^1H RMN apresentou somente um sinal como referência ao N-H da função amida **A**. São apresentados sinais de hidrogênios aromáticos, pois a molécula não tem anéis aromáticos; de novo apresenta-se um sinal em 4,14 ppm referente aos hidrogênios CH_2 vizinhos da nitrila. Há também o sinal F, referente a nove hidrogênios correspondentes as três metilas do grupo protetor, e os sinais H,G,E,D correspondentes aos hidrogênios presentes na molécula de leucina.

3.4 Modificação no fragmento P1

3.4.1 Substância Neq0549.

Uma única modificação na região P1 foi feita, baseado na hipótese de que inibidores de cisteino proteases de tipo dipeptidil-nitrilas são metabolizadas na nitrila e consequentemente apresentam perda na potencia,^[48] pequenas modificações na region P1 apresentou uma maior estabilidade das moléculas frente ao metabolismo, porem apresentou também perda na potencia frente as cisteino proteases. O espectro de RMN (Figura 33) evidenciou a formação do composto Neq0549.

Figura 33 - Espectro ^1H RMN da substância **Neq0549**

Fonte: Autoria própria.

O espectro ^1H RMN para o composto **Neq0549** apresenta as sinais **C,D,E,F,I** correspondentes aos hidrogênios da leucina, a sinal **H** correspondentes aos 4 hidrogênios do ciclopropil, e a sinal **G** como referencia aos 9 hidrogênios do grupo protetor.

Tabela 13 - Atribuição das sinais ^1H da substância **Neq0549**

Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	8,80	(s) ---
B	6,91	(d) 7,93
C	3,87	(dd) 8,65 / 13,63
D	1,55	(m) ---
E	1,46	(dd) 5,49 / 7,60
F	1,41	(m) ---
G	1,37	(s) ---
H	1,07	(dd) 5,38 / 7,72
I	0,85	(dd) 6,71 / 8,74

Fonte: Autoria própria.

3.5 Ensaios de inibição das Enzimas cruzaina para determinação de IC_{50}

A inibição da Enzima cruzaina foi determinada mediante curvas doses-resposta permitindo medir a concentração da substância necessária para inibir 50% da atividade da Enzima (IC_{50}). O IC_{50} permitiu comparar a potência dos inibidores sintetizados, os quais foram testados nas mesmas condições experimentais; fatores como pH, força iônica e temperatura podem causar mudanças no valor de IC_{50} e, por isso, foram mantidas constantes a fim de gerar dados comparáveis para uma série de compostos. A concentração da Enzima utilizada para os ensaios foi 2,0 nM e do substrato (ZFRMCA) foi 2,0 μM ; o excesso do

substrato garante que a Enzima opere em estado estacionário, o E64 (inibidor padrão da cruzafina foi utilizado como controle sob as condições dos ensaios).

Para qualquer concentração de inibidor, a concentração total de Enzima é a soma da Enzima livre e o complexo Enzima-inibidor. A atividade fracional da Enzima v_i/v_b (v_i atividade sem inibidor e v_b com inibidor) está diretamente relacionada com a razão entre a concentração de Enzima livre e a concentração total de Enzima. A fração ocupada pelo inibidor, segundo o balanço de massas, será $1 - v_i/v_b$ a uma concentração fixa de Enzima e substrato; a velocidade da reação diminui com o aumento da concentração do inibidor até não haver atividade residual (exceto em caso de inibição parcial). Uma curva da fração da velocidade (ou percentual de inibição da Enzima) em função da concentração do inibidor terá um formato sigmoidal (perfil de curva dose-resposta); o ponto médio da curva, onde a fração da velocidade é igual a 0,5 corresponde a 50 % de inibição da Enzima (IC_{50})^[53].

O percentual de inibição em cada ponto de concentração foi calculado utilizando-se a seguinte equação. ^[54]

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

onde, v_i é a velocidade na presença de inibidor e v_b a velocidade do experimento controle. A Figura 34 figura (curva dose resposta para o composto protótipo) mostra o perfil das curvas com o ajuste matemático da equação da curva dose-resposta dos pontos determinados experimentalmente para as substâncias que apresentaram atividade inibitória frente à Enzima cruzafina. Os resultados para todas as substâncias são apresentados nas Figura 35 à Figura 46.

Figura 34 - Perfil das curvas dose-resposta obtidas

Fonte: Autoria própria.

Os valores do percentual de inibição das Enzimas foram considerados, a variável dependente (eixo Y) enquanto os valores da concentração dos inibidores foram calculados os logaritmos e considerados as variáveis independentes (eixo X).

Os valores de IC_{50} foram calculados utilizando a seguinte equação, o método de ajuste foi não-linear dos mínimos quadrados.

$$\%inibição = A_0 + \frac{(A_1 - A_0)}{1 + 10^{(LogIC_{50})h}}$$

onde, A_0 é o platô inferior da curva, A_1 é o superior, $LogIC_{50}$ é o logaritmo da concentração de IC_{50} e h o coeficiente de Hill. Os valores de A_1 e A_0 representam a resposta máxima e ausência de resposta, respectivamente, da Enzima na presença do inibidor. ^[55]

3.6 Relações estrutura-atividade (SAR)

Uma etapa imprescindível no processo de descoberta de substâncias bioativas é a confirmação da atividade inibitória de ligantes identificados e o estabelecimento de relações entre a estrutura química e a atividade biológica(Tabela 14).

Tabela 14 – Relação estrutura atividade das substâncias obtidas.

Composto	P2	P3	X	IC50 (μM)
Neq0409				2,74 ± 0,09
Neq0400				8,12 ± 0,42
Neq0544				7,19 ± 0,25
Neq0538				20,53 ± 2,04
Neq0536				1,13 ± 0,03
Neq0535				3,54 ± 0,10
Neq0537				5,27 ± 0,24
Neq0545				7,33 ± 0,23

Neq0546				$1,10 \pm 0,02$
Neq0547				$4,08 \pm 0,14$
Neq0548				$5,12 \pm 0,14$
Neq0549				$3,83 \pm 0,09$

Fonte: Autoria própria.

O subsítio S2 da cruzaina possui características bastante distintas do S3, tanto em termos de forma quanto às possibilidades para formação de interações específicas e hidrofóbicas. Além de ser uma cavidade mais pronunciada que os demais subsítios, o que permite a ancoragem de substituintes ainda podem ser formadas interações com resíduos capazes de aceitar (Glu208) ou doar ligações de hidrogênio ao interagir com substituintes posicionados sobre mesmo. O caráter mais hidrofóbico ao substituinte fenila poderia tirar vantagem da interação com o subsítio S2 e, por isso, o composto Neq0544 foi sintetizado com intuito de avaliar esta hipótese. A substituição na posição *meta* mostra-se prejudicial para a atividade; entretanto, é possível que a posição mais adequada seja a *orto*, como se observa para o ligante não covalente co-cristalizado com a cruzaina que é substituído por bromo nesta posição.^[56]

Há uma perda de potência quando a fenila da substância protótipo é substituída pelo grupo protetor (Neq0400). Por outro lado, em relação a este último, ambas as modificações feitas através da substituições da fenila por isopropila para o subsítio S2 (Neq0548), quanto fechamento de um ciclopropila que deve ocupar os subsítio S1 oferecem ganhos de potência. Estes dados indicam estas duas substituições como promissoras quando acumuladas com a substituição do grupo protetor pelas substituintes para o subsítio S3 encontrados nos compostos, Neq0409, Neq0536 Neq0546 por exemplo. Desta forma, os resultados encontrados através do ensaios dos compostos sintetizados mostraram-se úteis para o entendimento e o ganho de conhecimento sobre a relação estrutura-atividade para fomentar

estudos posteriores de síntese para otimização da potência dos inibidores de cruzaína. Além disso, com base nestas observações é razoável esperar um incremento na potência que resultará em novos ligantes com IC_{50} na faixa de sub-micromolar.

4 Conclusão.

Uma série de potentes inibidores da cruzaina da classe de dipeptidil nitrilas foi sintetizada e um breve estudo de relações estrutura-atividade (SAR) foi realizado com base na estrutura cristalina de um novo complexo cruzaina-ligante. A estrutura cristalina da substância Neq0409 foi descrita e apresenta interação com a cruzaina que serviu de base para a busca de novos inibidores. As substâncias sintetizadas inibem a cruzaina em concentrações que têm uma região de potência entre 1 e 20 μM . Neste trabalho, exploramos, essencialmente, a posição P3 das dipeptidil nitrilas. Todas as substituições em P3 resultaram em aumento da potência, sendo que a introdução do heterociclo furano (Neq0535) resultou na substância mais potente da série. A troca por tiofeno mantém a potência em nível similar. A inclusão do heterociclo 1,3-tiazol-2-aminoetil (Neq0547) resultou em pequena diminuição na potência após a eliminação do grupo protetor da substância Neq0546. A inclusão da ciclopropila em P1 resultou em pequeno ganho na potência para a substância Neq0549. Em conclusão, os requisitos de potência para inibidores da cruzaina com variação do substituinte em P3 pode ser usados para modular a interação bimolecular com o sítio S3 da cruzaina e provê base para ampliação do espaço químico necessário para a identificação de inibidores nanomolares.

5 Perspectivas

Nos últimos anos, o número de candidatos a fármacos com mecanismo de ação covalente tem crescido. Entretanto, apesar do interesse em inibidores covalentes ter aumentado, os desafios para a caracterização e otimização desses inibidores tornam-se evidentes, particularmente em relação aos efeitos *off-target*. Uma alternativa é constituída de inibidores covalentes reversíveis como os propostos neste trabalho. Para isso, será ainda necessário demonstrar esse fenômeno de forma adequada e experimentos de inibição da cruzaina dependentes do tempo deverão ser realizados para avaliar o comportamento das dipeptidil nitrilas como inibidores reversíveis da cruzaina. Estudos de seletividade frente a outras cisteíno proteases, como a Catepsina L, também deverão ser realizados. Além disso, é importante ressaltar que as substâncias estudadas são, em sua essência, fragmentos moleculares. A substância mais potente, o Neq0536, tem 22 átomos diferentes do átomo de hidrogênio com uma massa molecular de 297 Da que pode ser considerado uma substância susceptível à otimização de sua estrutura molecular. Como a sua eficiência de ligante (LE) é $0,38 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ atomo}^{-1}$ com uma eficiência lipofílica (LLE_{AT}) de $0,43 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ atomo}^{-1}$, há possibilidade adequada dentro do espaço químico para o aumento da massa molecular e também da lipofilia. Estudos da ação inibitória do parasito *T. cruzi* deverão ser realizados com o objetivo de validar a hipótese de que as dipeptidil nitrilas são agentes tripanossomicidas.

6 REFERENCIAS

- [1] E. Massad, *Epidemiology and Infection* **2008**, 136, 1153-1164.
- [2] C. C. Man, E. I. Ferreira, J. L. Santos, J. Giarolla, D. G. Rando, A. E. Almeida, P. L. Bosquesi, R. F. Menegon and L. Blau, *Molecules* **2008**, 13, 616-677.
- [3] M. D. SAÚDE in *GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA*, Vol. **2005**, p. 295.
- [4] P. Chirac and E. Torreele, *Lancet* **2006**, 367, 1560-1561.
- [5] M. Moran, J. Guzman, A. L. Ropars, A. McDonald, N. Jameson, B. Omune, S. Ryan and L. Wu, *PLoS Medicine* **2009**, 6, 0137-0146.
- [6] OMS in *Organização Mundial de Saúde*.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> acessada em, Vol. (Ed. OMS), **2011**.
- [7] J. R. Coura and J. R. Cançado in *A história da terapêutica da doença de Chagas*, Vol. 2011
<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126>.
- [8] L. C. Dias, M. A. Dessoay, J. J. N. Silva, O. H. Thiemann, G. Oliva and A. D. Andricopulo, *Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos* **2009**, 32, 2444-2457.
- [9] F. O. Cruz in *Doença de Chagas*, Vol. 2013 **2013**.
- [10] M. B. Viellela, Maria. Melo, Vicente. Pinto João, *VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA DOENÇA DE CHAGAS* **2007**, 2428-2438.
- [11] J. R. Coura, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, 104, 549-554; J. A. Urbina and R. Docampo, *Trends in Parasitology* **2003**, 19, 495-501.
- [12] J. A. Urbina, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2003**, 13, 661-669.
- [13] S. B. M. Pessoa, A. V. , *Guanabara Koogan* 11, 872.
- [14] K. M. Tyler and D. M. Engman, *International Journal for Parasitology* **2001**, 31, 472-480.
- [15] OMS in *Organização Mundial de Saúde*, Vol. acessada em 25/03/2011 (Ed. OMS), **2011**.
- [16] F. Zhu, B. Han, P. Kumar, X. Liu, X. Ma, X. Wei, L. Huang, Y. Guo, L. Han, C. Zheng and Y. Chen, *Nucleic Acids Research* **2009**, 38, D787-D791.
- [17] A. L. Hopkins and C. R. Groom, *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, 1, 727-730.
- [18] B. T. Mott, R. S. Ferreira, A. Simeonov, A. Jadhav, K. K. H. Ang, W. Leister, M. Shen, J. T. Silveira, P. S. Doyle, M. R. Arkin, J. H. McKerrow, J. Inglese, C. P. Austin, C. J. Thomas, B. K. Shoichet and D. J. Maloney, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53, 52-60; A. Moncayo and M. I. Ortiz Yanine, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **2006**, 100, 663-677.

- [19] N. C. Romeiro, G. Aguirre, P. Hernández, M. González, H. Cerecetto, I. Aldana, S. Pérez-Silanes, A. Monge, E. J. Barreiro and L. M. Lima, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 641-652.
- [20] J. M. dos Santos Filho, A. C. L. Leite, B. G. d. Oliveira, D. R. M. Moreira, M. S. Lima, M. B. P. Soares and L. F. C. C. Leite, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 6682-6691.
- [21] Y. T. Chen, L. S. Brinen, I. D. Kerr, E. Hansell, P. S. Doyle, J. H. McKerrow and W. R. Roush, *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2010**, *4*.
- [22] C. M. Salisbury and J. A. Ellman, *Chembiochem* **2006**, *7*, 1034-1037.
- [23] F. Lecaille, J. Kaleta and D. Brömme, *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 4459-4488.
- [24] J. C. Powers, J. L. Asgian, O. D. Ekici and K. E. James, *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 4639-4750.
- [25] D. Leung, G. Abbenante and D. P. Fairlie, *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 305-341.
- [26] J. H. McKerrow, P. S. Doyle, J. C. Engel, L. M. Podust, S. A. Robertson, R. Ferreira, T. Saxton, M. Arkin, I. D. Kerr, L. S. Brinen and C. S. Craik, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 263-269.
- [27] N. Fujii, J. P. Mallari, E. J. Hansell, Z. MacKey, P. Doyle, Y. M. Zhou, J. Gut, P. J. Rosenthal, J. H. McKerrow and R. K. Guy, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 121-123.
- [28] K. Brak, P. S. Doyle, J. H. McKerrow and J. A. Ellman, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 6404-6410.
- [29] S. P. Fricker, R. M. Mosi, B. R. Cameron, I. Baird, Y. Zhu, V. Anastassov, J. Cox, P. S. Doyle, E. Hansell, G. Lau, J. Langille, M. Olsen, L. Qin, R. Skerlj, R. S. Y. Wong, Z. Santucci and J. H. McKerrow, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, *102*, 1839-1845.
- [30] J. D. Durrant, H. Keränen, B. A. Wilson and J. A. McCammon, *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2010**, *4*.
- [31] J. C. Engel, P. S. Doyle, I. Hsieh and J. H. McKerrow, *Journal of Experimental Medicine* **1998**, *188*, 725-734.
- [32] I. D. Kerr, J. H. Lee, C. J. Farady, R. Marion, M. Rickert, M. Sajid, K. C. Pandey, C. R. Caffrey, J. Legac, E. Hansell, J. H. McKerrow, C. S. Craik, P. J. Rosenthal and L. S. Brinen, *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 25697-25703.
- [33] H. L. Leyesque, O, **2000**.
- [34] T. L. Vaughan, L. M. Dong, P. L. Blount, K. Ayub, R. D. Odze, C. A. Sanchez, P. S. Rabinovitch and B. J. Reid, *The Lancet Oncology* **2005**, *6*, 945-952.
- [35] B. Chaudhry, J. Wang, S. Wu, M. Maglione, W. Mojica, E. Roth, S. C. Morton and P. G. Shekelle, *Annals of Internal Medicine* **2006**, *144*, 742-752.
- [36] G. A. Patani and E. J. LaVoie, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 3147-3176.

- [37] M. M. Joullié and K. M. Lassen, *ARKIVOC: Online Journal of Organic Chemistry* **2010**, 189-250; E. Valeur and M. Bradley, *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, 606-631; A. El-Faham and F. Albericio, *Chemical Reviews* **2011**, 111, 6557-6602.
- [38] M. Zimmerman, B. Ashe, E. C. Yurewicz and G. Patel, *Analytical Biochemistry* **1977**, 78, 47-51.
- [39] A. P. C. A. Lima, F. C. G. Dos Reis, C. Serveau, G. Lalmanach, L. Juliano, R. Ménard, T. Vernet, D. Y. Thomas, A. C. Storer and J. Scharfstein, *Molecular and Biochemical Parasitology* **2001**, 114, 41-52.
- [40] L. C. Alves, R. L. Melo, M. H. S. Cezari, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, L. Juliano and M. A. Juliano, *Molecular and Biochemical Parasitology* **2001**, 117, 137-143.
- [41] A. E. Eakin, A. A. Mills, G. Harth, J. H. McKerrow and C. S. Craik, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 7411-7420.
- [42] W. H. Baricos, Y. Zhou, R. W. Mason and A. J. Barrett, *Biochemical Journal* **1988**, 252, 301-304; R. W. Mason, *Biochemical Journal* **1986**, 240, 285-288; M. Fairhead and C. F. Van Der Walle, *Protein and Peptide Letters* **2008**, 15, 47-53.
- [43] R. Löser, K. Schilling, E. Dimmig and M. Gütschow, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, 7688-7707.
- [44] L. C. Alves, W. A. S. Judice, P. M. S. Hilaire, M. Meldal, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, L. Juliano and M. A. Juliano, *Molecular and Biochemical Parasitology* **2001**, 116, 1-9; C. Bryant, I. D. Kerr, M. Debnath, K. K. H. Ang, J. Ratnam, R. S. Ferreira, P. Jaishankar, D. Zhao, M. R. Arkin, J. H. McKerrow, L. S. Brinen and A. R. Renslo, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 6218-6221; P. Jaishankar, E. Hansell, D. M. Zhao, P. S. Doyle, J. H. McKerrow and A. R. Renslo, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2008**, 18, 624-628.
- [45] C. Serveau, G. Lalmanach, I. Hirata, J. Scharfstein, M. A. Juliano and F. Gauthier, *European Journal Of Biochemistry / FEBS* **1999**, 259, 275-280.
- [46] E. Altmann, R. Aichholz, C. Betschart, T. Buhl, J. Green, R. Lattmann and M. Missbach, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16, 2549-2554.
- [47] N. Asaad, P. A. Bethel, M. D. Coulson, J. E. Dawson, S. J. Ford, S. Gerhardt, M. Grist, G. A. Hamlin, M. J. James, E. V. Jones, G. I. Karoutchi, P. W. Kenny, A. D. Morley, K. Oldham, N. Rankine, D. Ryan, S. L. Wells, L. Wood, M. Augustin, S. Krapp, H. Simader and S. Steinbacher, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 4280-4283; P. A. Bethel, S. Gerhardt, E. V. Jones, P. W. Kenny, G. I. Karoutchi, A. D. Morley, K. Oldham, N. Rankine, M. Augustin, S. Krapp, H. Simader and S. Steinbacher, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 4622-4625; M. J. Boyd, S. N. Crane, J. Robichaud, J. Scheiget, W. C. Black, N. Chauret, Q. Wang, F. Massé and R. M. Oballa, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 675-679.

- [48] D. Guay, C. Beaulieu, T. Jagadeeswar Reddy, R. Zamboni, N. Methot, J. Rubin, D. Ethier and M. David Percival, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 5392-5396.
- [49] H. J. F. Wiggers, William. Carlos, Montanari. James, Mckerrow., **2013**, *7*.
- [50] Č. Malavašič, U. Grošelj, A. Golobič, J. Bezenšek, B. Stanovnik, K. Stare, J. Wagger and J. Svete, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 629-640.
- [51] R. G. Doveston, R. Steendam, S. Jones and R. J. K. Taylor, *Organic Letters* **2012**, *14*, 1122-1125.
- [52] P. A. Bethel, S. Gerhardt, E. V. Jones, P. W. Kenny, G. I. Karoutchi, A. D. Morley, K. Oldham, N. Rankine, M. Augustin, S. Krapp, H. Simader and S. Steinbacher, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 4622-4625.
- [53] H. J. Wiggers in *Planejamento de Inibidores da Enzima Cruzaína de Trypanosoma cruzi: dos Ligantes aos Compostos Matrizes*, Vol. Doutorado UFSCar, São Carlos, **2011**, p. 173p.
- [54] S. Zhang, H. Zhao and R. John, *Biosensors and Bioelectronics* **2001**, *16*, 1119-1126.
- [55] R. A. Copeland in *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists*, Vol. **46** **2005**, pp. 1-265.
- [56] R. S. Ferreira, A. Simeonov, A. Jadhav, O. Eidam, B. T. Mott, M. J. Keiser, J. H. McKerrow, D. J. Maloney, J. J. Irwin and B. K. Shoichet, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 4891-4905.

ANEXOS

Figura 35 - Curva de inibição da Cruzaína frente ao composto protótipo (Neq0409)

Fonte: Autoria própria.

Figura 36 - Curva de inibição da Cruzaína frente ao composto Neq0400

Fonte: Autoria própria.

Figura 37 - Curva de inibição da Cruzaína frente ao composto **Neq0538**

Fonte: Autoria própria.

Figura 38 - Curva de inibição da Cruzaína frente ao composto **Neq0536**

Fonte: Autoria própria.

Figura 39 - Curva de inibição da Cruzaína frente ao composto **Neq0535**

Fonte: Autoria própria.

Figura 40. Curva de inibição da Enzima Cruzaína frente ao composto **Neq0537**

Fonte: Autoria própria.

Figura 41 - Curva de inibição da curzaína frente ao composto Neq0545

Fonte: Autoria própria.

Figura 42 - Curva de inibição da Cruzaína frente ao composto Neq0546

Fonte: Autoria própria.

Figura 43 - Curva de inibição da Cruzaína frente ao composto **Neq0547**

Fonte: Autoria própria.

Figura 44 - Curva de inibição da Cruzaína frente ao composto **Neq 0544**

Fonte: Autoria própria.

Figura 45 - Curva de inibição da Cruzaína frente ao composto **Neq0548**

Fonte: Autoria própria.

Figura 46 - Curva de inibição da curzaina frente ao composto **Neq0549**

Fonte: Autoria própria.

Figura 47 - Espectro MS da substância **Neq0536**

Fonte: Autoria própria.

Figura 48 - Espectro MS da substância **Neq0535**

Fonte: Autoria própria.

Figura 49 - Espectro MS da substância **Neq0537**

Fonte: Autoria própria.

Figura 50 - Espectro MS/MS da substância **Neq0545**

Fonte: Autoria própria.

Figura 51 - Espectro MS/MS da substância **Neq0546**

Fonte: Autoria própria.

Figura 52 - Espectro MS/MS da substância **Neq0547**

Fonte: Autoria própria.

Figura 53 - Espectro MS/MS para o composto **Neq0548**

Fonte: Autoria própria.

Figura 54 - Espectro MS/MS da substância **Neq0549**

Fonte: Autoria própria.