UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA MOLECULAR ESTRUTURAL

ADERSON ZOTTIS

Planejamento Racional de Novos Agentes Quimioterápicos: Identificação e
Estudos Cinéticos de Novos Inibidores da Gliceraldeído-3-Fosfato
Desidrogenase Glicossomal de *Trypanosoma cruzi*

São Carlos

2009

ADERSON ZOTTIS

Planejamento Racional de Novos Agentes Quimioterápicos
Identificação e Estudos Cinéticos de Novos inibidores da Glicraldeído-3-
Fosfato Desidrogenase Glicossomal de *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada –
Opção Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo
Co-orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

São Carlos

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Zottis, Aderson

Planejamento racional de novos agentes Quimioterápicos – identificação e estudos cinéticos de novos inibidores da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase Glicossomal de *Trypanosoma cruzi*. / Aderson Zottis; orientador Adriano Defini Andricopulo; co-orientador Glaucius Oliva. -- São Carlos, 2009.

131 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física – Área de concentração: Física Aplicada – opção Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1.*Trypanosoma cruzi*. 2.GAPDH. 3.Ensaio virtual. 4.Inibidores. 5.Doença de Chagas.I. Título.

**UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400
13566-590 - São Carlos, SP

Fone/Fax: (16) 3373. 9777
www.ifsc.usp.br
svposgrad@ifsc.usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aderson Zottis

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada – Opção: Física Biomolecular.

Aprovado em: 26/03/2009

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Albérico Borges Ferreira da Silva

Instituição: IQSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Kátia Maria Honorio

Instituição: EACH/USP

Assinatura

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

Instituição: UFSC

Assinatura

DEDICATÓRIA

**DEDICO ESTA TESE
A MARIA LAURA E A PEDRO MIGUEL,
MEUS FILHOS,
E A SARA REGINA
MINHA ESPOSA,
PELA CONSTANTE PRESTEZA E DESPRENDIMENTO,
PROFUNDA GENEROSIDADE E
ILIMITADA PACIÊNCIA**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de aprender a respeito desta área tão instigante que é a Química Medicinal tendo ainda o privilégio da excelente orientação de dois ótimos professores-pesquisadores.

Aos meus pais José e Maria, e aos meus irmãos José (*in memorian*), Luiz, Gabriel e Marisa, pela constante motivação e participação nos meus estudos, particularmente durante todo este trabalho e por acreditarem no meu esforço e sucesso.

Aos meus orientadores, o professor Dr. Adriano D. Andricopulo e o professor Dr. Glaucius Oliva, pela confiança depositada para o desenvolvimento deste projeto, e pelo inexaurível apoio, entusiasmo, cobrança e, sobretudo, paciência durante as dificuldades encontradas no aprendizado e na conclusão das etapas.

Em especial ao colega Dr. Rafael V. C. Guido, pela contribuição neste trabalho e pela imensa contribuição na finalização da parte escrita.

Aos colegas Dr. Artur Cordeiro, MSc. Mateus Postigo, Eli F. Pimenta, e Denis Massucato pela grande presteza e disponibilidade nos momentos de troca de experiência, nos questionamentos e na busca de respostas nas etapas experimentais.

Ao professor Dr. Carlos A. Montanari, pela disponibilidade e pela valorosa ajuda para que eu ter a oportunidade de desenvolver este projeto de doutoramento junto ao CBME.

A todos os colegas e funcionários do Grupo de Cristalografia, pela disponibilidade e auxílio nas disciplinas e nos experimentos laboratoriais.

Aos professores do grupo de Cristalografia e de Biofísica, pelo apoio e paciência durante o aprendizado.

Ao grupo de Química Medicinal pela valorosa contribuição e apoio com os experimentos e programas computacionais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Secretaria do CBME pela imensa paciência e total apoio na resolução das pendências burocráticas.

Aos funcionários do *Serviço de Biblioteca e Informação Prof. Bernhard Gross*, pela disponibilidade prestada durante a elaboração desta tese.

A fé e a razão são as duas asas pelas
quais o espírito humano se eleva para
a contemplação da verdade.

João Paulo II

RESUMO

As doenças negligenciadas são conseqüências marcantes do subdesenvolvimento que atinge diversas regiões do planeta. Dentre estas, destaca-se a Doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, a qual afeta aproximadamente um quarto da população da América Latina e para qual os fármacos utilizados apresentam baixa eficácia, toxidez e sérios efeitos colaterais. Este quadro é agravado pela emergência de cepas resistentes, o que indica a grande necessidade de desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos contra esta doença. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) da via glicolítica do *T. cruzi* é um alvo macromolecular interessante devido ao seu papel essencial no metabolismo de tripanossomatídeos. Constitui o objetivo desta tese o desenvolvimento, a padronização e a validação de ensaios enzimáticos para a realização de extensivas triagens bioquímicas de modo a contribuir para a identificação de novos inibidores da GAPDH pertencentes a diversas classes químicas. Os compostos estudados são provenientes de síntese orgânica e de complexos inorgânicos de Rutênio, bem como de origem natural. Paralelamente, a realização do ensaio virtual em larga escala a partir de uma base de dados dirigida e da estrutura da GAPDH de *T. cruzi* resultou na identificação de um inibidor inédito da proteína alvo. Estudos do mecanismo de ação enzimático levaram à elucidação da modalidade de alguns inibidores identificados nesse estudo.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*, GAPDH, Ensaio virtual, Inibidores, Doença de Chagas.

ABSTRACT

Parasitic diseases are a major global cause of illness, long-term disability, and death, with severe socio-economic consequences for millions of people worldwide. In Latin America, nearly one fourth of the population is infected by *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. The limited existing drug therapies suffer from a combination of drawbacks including poor efficacy, resistance and serious side effects. Therefore, there is an urgent need for new drugs that can overcome resistance and are safe and effective for use in human. The crucial dependence on glycolysis as a source of energy makes the glycolytic parasite enzymes promising targets for drug design. In this context, the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was identified as attractive targets for drug design. The development of standard enzymatic assays combined with extensive biological screening was the aim of this work and it has been contributing for the identification of novel GAPDH inhibitors. These compounds belong to several chemical classes from different sources, including organic synthesis, inorganic complexes and natural products. In addition, a virtual screening approach was applied in a focused database, previously filtered by drug-like properties, in order to identify new hits. This strategy resulted in the discovery of a novel scaffold with significant inhibitory activity against *T. cruzi* GAPDH. Kinetic and inhibition assays were conducted to shed light on the mechanism of action of the promising inhibitors.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, GAPDH, virtual screening, Inhibitors, Chagas' Disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Amostra de sangue infectada com forma tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> (corada em violeta).	24
Figura 2	Mapa das regiões endêmicas da doença de Chagas.	25
Figura 3	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	27
Figura 4	Estrutura química dos fármacos antichagásicos.	29
Figura 5	Estrutura quaternária da GAPDH de <i>T. cruzi</i> , um homotetrâmero. A GAPDH possui 4 sítios catalíticos, localizados entre os monômeros.	35
Figura 6	a) Etapa da via glicolítica onde a GAPDH atua. b) Esquema da reação catalisada pela GAPDH de <i>T. cruzi</i> . D-G3P: D-gliceraldeído-3-fosfato; D-1,3-BPG: D-1,3-bisfosfoglicerato; NAD ⁺ : nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida.	35
Figura 7	Mecanismo de reação de conversão do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) a 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) catalisada pela GAPDH	36
Figura 8	Tempo e custos estimados no processo de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco. ⁹ HTS: ensaio biológico automatizado; VHTS: ensaio virtual.	39
Figura 9	Razões de insucesso no processo de desenvolvimento de fármacos. Dados de 7 companhias farmacêuticas do Reino Unido no período de 1964-1985	39
Figura 10	Integração da química, biologia e ADMET no processo de descoberta de fármacos.	40

Figura 11	Número de NCEs aprovadas pelo FDA (<i>U.S. Food and Drug Administration</i> , Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos) entre os anos de 1996 e 2006.	42
Figura 12	Ilustração das etapas de formação do produto a partir da ação da enzima sobre o substrato.	50
Figura 13	No início da reação catalisada enzimaticamente, a reação reversa, de formação do substrato, é praticamente inexistente.	51
Figura 14	Gráfico do comportamento da velocidade enzimática inicial. Com o aumento da concentração do substrato a velocidade inicial aumenta, até atingir um patamar onde permanece constante com o aumento da concentração do substrato.	52
Figura 15	Ilustração do equilíbrio estabelecido entre um inibidor e sua enzima-alvo.	54
Figura 16	Gráfico do duplo-recíproco obtido a partir dos dados experimentais de ensaios enzimáticos com enzimas que apresentam um comportamento do tipo Michaelis-Menten.	57
Figura 17	a) Ilustração do mecanismo de inibição do tipo competitivo; b) Gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para este tipo de mecanismo.	57
Figura 18	a) Ilustração do mecanismo de inibição do tipo não-competitivo; b) Gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para este tipo de mecanismo.	58
Figura 19	a) Ilustração do mecanismo de inibição do tipo incompetitivo; b) Gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para este	59

tipo de mecanismo.

Figura 20	Estrutura química de alguns ácidos anacárdicos estudados.	63
Figura 21	Principais subclasses de compostos flavonóides.	66
Figura 22	Exemplo de estrutura de um derivado 4,5-diidropirazólico.	65
Figura 23	Otimização da staurosporina. a) estrutura da staurosporina; b) estrutura do enantiômero organometálico R, DW1; c) sobreposição da estrutura cristalográfica da proteína quinase Pim-1 co-cristalizada com a staurosporina (roxo, código <i>PDB</i> 1YHS) e da estrutura da Pim-1 com o inibidor organometálico cinza (código <i>PDB</i> 2BZI).	68
Figura 24	Esquema geral de funcionamento de um espectrofotômetro. O monocromador seleciona um comprimento de onda específico, enquanto o detector realiza a medida da absorção da luz. A quantidade luz monocromática absorvida pela substância presente na amostra é proporcional à concentração da amostra em solução.	69
Figura 25	Gráfico da concentração de inibidor <i>versus</i> atividade catalítica da GAPDH de <i>T. cruzi</i> , obtido em um experimento para a determinação da IC ₅₀ . Quanto maior a concentração do composto no meio reacional, maior é o efeito inibitório sobre a atividade catalítica da GAPDH e, como consequência, menos inclinada será a curva.	84
Figura 26	Mapa de potencial eletrostático da região selecionada para o processo de docagem molecular utilizando a estrutura cristalográfica 1QXS da GAPDH de <i>T. cruzi</i> . NAD ⁺ em cor magenta, e HOP em cor ciano. Vermelho = sítios	89

eletronegativos; azul = sítios eletropositivos; Branco = ausência de cargas; amarelo = sítios com átomo de enxofre. Em destaque o átomo de P, a partir do qual foram utilizadas as coordenadas para o processo de docagem pelo programa GOLD.

Figura 27	Esquema ilustrativo do procedimento de ensaio virtual realizado para identificar novos compostos para o ensaio enzimático da GAPDH de <i>T. cruzi</i> .	90
Figura 28	Gráfico da comparação entre os ensaios enzimáticos descritos na literatura (metodologia A e B, curva amarela e vermelha, respectivamente) e o MÉTODO 1 (curva azul) desenvolvida no CBME. O aumento na absorbância é proporcional ao aumento da concentração de NADH em solução.	92
Figura 29	Monitoramento da reação enzimática da GAPDH de <i>T. cruzi</i> em diferentes concentrações de cofator (T-NAD ⁺) e substrato (G3P), durante 10 minutos. As retas contínuas sobrepostas servem de comparativo para observação da linearidade do método, respeitando-se as condições de estado estacionário.	92
Figura 30	Estrutura química de componentes utilizados no ensaio enzimático. Em destaque, os grupamentos reativos dos componentes presentes no meio reacional.	93
Figura 31	Influência dos solventes orgânicos MeOH (a) e DMSO (b) a diferentes concentrações sobre a atividade enzimática da GAPDH de <i>T. cruzi</i> .	94
Figura 32	Determinação do valor de K_M para (a) G3P e (b) NAD ⁺ com a GAPDH de <i>T. cruzi</i> ; (c) G3P e (d) T-NAD ⁺ com a GAPDH de <i>T. cruzi</i> ; (e) G3P e (f) NAD ⁺ com a GAPDH de	100

eritrócitos humanos utilizando tampão Tris-HCl em pH 8,6. Este último procedimento foi realizado para estudo de imobilização de enzimas.

Figura 33	Esquema do procedimento de síntese dos análogos de nucleosídeos triacilados.	104
Figura 34	Esqueleto estrutural básico dos ácidos anacárdicos. R = cadeia carbônica homogênea de 15 carbonos, saturada ou insaturada.	109
Figura 35	Gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para: a) composto 18 ; b) seu derivado saturado C ₁₂ (15).	115
Figura 36	Gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para: a) composto 51 ; b) composto 68 .	121
Figura 37	Gráfico experimental de determinação da IC ₅₀ para os complexos bioinorgânicos de Rutênio.	123
Figura 38	Gráfico do duplo recíproco para a inibição da GAPDH de <i>T. cruzi</i> apresentada pelo composto 88 . Verifica-se que este composto apresenta inibição do tipo não-competitiva com respeito ao cofator T-NAD ⁺ .	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de alvos enzimáticos e da aplicação terapêutica de seus respectivos inibidores.	32
Tabela 2	Programas Computacionais usados no Ensaio Virtual.	46
Tabela 3	Categorias Terapêuticas de Fármacos Derivados de Produtos Naturais em Diferentes Estágios de Desenvolvimento.	61
Tabela 4	Fármacos Baseados em Produtos Naturais em Diferentes Estágios de Desenvolvimento.	62
Tabela 5	Composição do meio reacional dos métodos de ensaio enzimático da GAPDH de <i>T. cruzi</i> .	82
Tabela 6	Comparação entre os resultados de atividade enzimática obtidos com diferentes concentrações de Triton X-100.	96
Tabela 7	Avaliação da influência do Triton X-100 nas análises enzimáticas de inibidores identificados.	97
Tabela 8	Comparação dos valores de K_M do cofator e do substrato obtidos para a GAPDH humana e de <i>T. cruzi</i> .	98
Tabela 9	Valores de inibição enzimática apresentada por compostos submetidos aos ensaios em ambos os métodos padronizadas no CBME.	101
Tabela 10	Estrutura geral, classe química e origem dos compostos avaliados frente a GAPDH de <i>T. cruzi</i> .	102
Tabela 11	Derivados de nucleosídeos que apresentaram atividade	105

inibitória mais expressiva contra a GAPDH de *T. cruzi*.

Tabela 12	Derivados flavonóides submetidos aos ensaios enzimáticos de inibição da GAPDH de <i>T. cruzi</i> .	106
Tabela 13	Derivados do ácido anacárdico obtidos através de síntese química planejada e seus respectivos dados de inibição da GAPDH de <i>T. cruzi</i> .	109
Tabela 14	Estrutura dos derivados mais potentes de ácido anacárdico identificados em ensaios preliminares e seus respectivos valores de IC_{50} .	114
Tabela 15	Estrutura dos compostos submetidos ao estudo mecanístico e seus respectivos valores de K_i e αK_i frente à GAPDH de <i>T. cruzi</i> .	116
Tabela 16	Valores de IC_{50} dos derivados pirazólicos submetidos aos ensaios de inibição enzimática frente à enzima GAPDH de <i>T. cruzi</i> .	117
Tabela 17	Estrutura dos derivados diidropirazólicos submetidos ao estudo mecanístico e seus respectivos valores de K_i e αK_i frente à GAPDH de <i>T. cruzi</i> .	121
Tabela 18	Dados obtidos a partir do estudo cinético dos derivados bioinorgânicos de rutênio submetidos a ensaios de inibição enzimática frente à enzima GAPDH de <i>T. cruzi</i> .	122
Tabela 19	Conjunto de compostos selecionados a partir do ensaio virtual.	125
Tabela 20	Resultado da avaliação da IC_{50} e de K_i do inibidor da GAPDH de <i>T. cruzi</i> selecionado no ensaio virtual e identificado a partir do ensaio enzimático.	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPG	1,3-bisfosfoglicerato
CBME	Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural
CEPID	Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	<i>Enzyme Comission</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
EMEA	<i>European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i>
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HTS	Ensaio biológico automatizado em larga escala
IC₅₀	Concentração Inibitória 50%
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
K_i	Constante de dissociação
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LQMC	Laboratório de Química Medicinal e Computacional
MM	Massa molar
Na₂HAsO₄·7H₂O	Arseniato de sódio heptaidratado

NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida
NCE	Nova entidade química
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAR	Relação entre a estrutura e atividade
SBDD	Planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor
T-NAD⁺	Tionicotinamida adenina dinucleotídeo forma oxidada
TEA	Trietanolamina
T-NADH	Tionicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
v_0	Velocidade inicial
$V_{\max}$	Velocidade máxima
VS	Ensaio virtual
β-mercpto	2-Mercaptoetanol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1. A DOENÇA DE CHAGAS	24
1.1.1. Patologia da Doença de Chagas	28
1.1.2. Tratamento da Doença de Chagas	29
1.1.3 ENZIMAS COMO ALVOS BIOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE QUIMIOTERÁPICOS	31
1.1.4 GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE (GAPDH) DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
1.1.4 PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS	37
2 O PANORAMA DO PROCESSO DE DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS	38
2.1 O ENSAIO VIRTUAL E A DESCOBERTA DE NOVAS MOLÉCULAS BIOATIVAS	41
2.2.1 Programas Computacionais de VS	47
2.2.1.1. GOLD	48
2.2.1.2. FlexX	49
3 CINÉTICA ENZIMÁTICA	50
3.1 Inibidores Enzimáticos	53
3.1.1 Mecanismo de Ação dos Inibidores Enzimáticos	55

4 ESTRATÉGIAS DE IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS BIOATIVAS	60
4.1 IMPORTÂNCIA DE PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS	60
4.1.1 ÁCIDOS ANACÁRDICOS	63
4.1.2 COMPOSTOS FLAVONÓIDES	64
4.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA APRESENTADA POR COMPOSTOS DIIDROPIRAZÓLICOS	66
4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA APRESENTADA POR COMPOSTOS BIOINORGÂNICOS DE RUTÊNIO	67
5 ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA	69
6 OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO	71
7 PARTE EXPERIMENTAL – MATERIAIS E MÉTODOS	72
7.1 ESPECTROFOTÔMETRO	72
7.2 REAGENTES	72
7.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA GAPDH DE <i>T. cruzi</i>	74
7.4 ORIGEM DOS COMPOSTOS INIBIDORES	75
7.4.1 Derivados do Ácido Anacárdico	76
7.4.2 Derivados Flavonóides	76
7.4.3 Derivados Diidropirazólicos	77
7.4.4 Complexos Orgânicos de Rutênio	77
7.5 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES	77

BIOLÓGICAS

7.6 SOLVENTES ORGÂNICOS	78
7.7 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_M)	79
7.8 ENSAIOS BIOQUÍMICOS COM A ENZIMA GAPDH	80
7.8.1 Comparação do MÉTODO 1 com Outros Métodos da Literatura	82
7.9 INIBIÇÃO PROMÍSCUA	83
7.10 DETERMINAÇÃO DA IC_{50}	84
7.11 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE CINÉTICA DE INIBIÇÃO (K_i) E DO MECANISMO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DA GAPDH DE <i>T. cruzi</i>	85
7.12 TRIAGEM <i>IN SILICO</i>	86
7.12.1 Preparação da Base de Dados	86
7.12.2 Preparação do Sítio de Docagem	87
7.12.3 Processo de Docagem Molecular	89
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
8.1 MÉTODOS DESENVOLVIDOS	91
8.1.1 Método 1	91
8.1.2 Método de Ensaio Enzimático Antigo	93
8.1.3 Influência do solvente	94
8.2 INTERAÇÕES INESPECÍFICAS (INIBIÇÃO PROMÍSCUA)	95
8.3 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN	98

8.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NOS MÉTODOS 1 E 2	101
8.5 CLASSES DE COMPOSTOS AVALIADAS FRENTE À ENZIMA GAPDH	102
8.6 NUCLEOSÍDEOS TRIACILADOS	103
8.7 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE DERIVADOS DE FLAVONÓIDES	105
8.8 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE DERIVADOS DO ÁCIDO ANACÁRDICO	108
8.9 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE DERIVADOS DIIDROPIRAZÓLICOS	117
8.10 INIBIÇÃO DA GAPDH DE <i>T. cruzi</i> POR COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS DE RUTÊNIO	122
8.11 IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES ATRAVÉS DO VS	125
9 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	128
REFERÊNCIAS	132

1 INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas faz parte do conjunto de doenças negligenciadas, as quais afetam cerca de um sexto da população mundial.¹ É causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Figura 1) e afeta 16-18 milhões de indivíduos na América Latina (Figura 2), causando 21 mil mortes ao ano,² e deixando outras 100 milhões de pessoas localizadas em áreas de alto risco de infecção.³⁻⁶ De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência anual média de novos casos gira em torno de 200 mil.³

Figura 1. Amostra de sangue infectada com forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (corada em violeta). Fonte: Lynne Garcia LSG & Associates Santa Monica, California 90402USA.

Figura 2. Mapa das regiões endêmicas da doença de Chagas.⁷

Levando-se em consideração o número de vidas que são afetadas e a incapacidade humana gerada devido à mortalidade prematura e perda de vida produtiva causados por esta doença (DALY's, do inglês *Disability Adjusted Life Years*), estimam-se perdas de cerca de 700 mil anos, o que impede o crescimento econômico e a prosperidade nos países afetados, contribuindo para o aumento da miséria.⁸

Um relatório do programa de desenvolvimento das Nações Unidas demonstra claramente o enorme obstáculo econômico causado pela doença de Chagas. As perdas devido à mortalidade precoce e invalidez, entre adultos jovens, chegou a atingir cifras de cerca de US\$ 8 bilhões em 1995, ou o equivalente a 2,5% da dívida externa do continente naquela época.³ Devido à intensa imigração nas últimas décadas, a doença de Chagas tornou-se um

problema de saúde também em países não endêmicos, sendo transmitida de forma congênita ou mesmo por transplante de órgãos.⁹

Apesar de ser uma doença grave, não existem vacinas ou fármacos seguros e eficazes.¹⁰ Pelo fato de ser uma doença associada com populações de baixo nível sócio-econômico, não existe um apelo atrativo por parte das companhias farmacêuticas no sentido de se desenvolver novos fármacos antichagásicos¹¹, o que agrava o seu quadro. Esta doença foi classificada como uma das mais negligenciadas do mundo, não possuindo nenhum novo fármaco nos últimos 30 anos.^{12, 13} Estes fatos, aliados ao surgimento de cepas resistentes, estimulam intensos esforços para a identificação e validação de alvos plausíveis para o desenvolvimento de novos fármacos para o controle desta doença.

A transmissão entre os hospedeiros ocorre através da picada de um inseto hematófago pertencente à subfamília Triatominae, família Reduviidae, popularmente conhecido como barbeiro. Após picar o ser humano, o vetor hematófago deposita as fezes contaminadas contendo a forma infectante tripomastigota metacíclica do parasita. A penetração do parasita ocorre através da mucosa intacta ou de lesões na pele, alcançando a corrente sangüínea e invadindo as células-alvo do hospedeiro. O parasita possui um ciclo de vida complexo, com passagem obrigatória através de hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo homem) e invertebrados (inseto triatomíneo hematófago), numa série de estágios especializados.¹⁴ Estas mudanças são necessárias e imprescindíveis para a sobrevivência, tanto no vetor quanto no hospedeiro vertebrado.¹⁵

Seguindo-se o início do estágio infeccioso, as formas infectivas tripomastigotas diferenciam-se em formas replicativas amastigotas. Logo após, deixam a célula infectada e entram novamente na corrente sangüínea, onde

retomam a forma tripomastigota e infectam outras células sadias (Figura 3). A eliminação do parasita através de imunidade adquirida não existe. São reconhecidas, através de tipagem molecular, linhagens do tipo 1 e do tipo 2 deste parasita,¹⁶ sendo que os parasitas do tipo 2 são os maiores causadores da doença.⁹

Figura 3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.¹⁷

A transmissão da doença também pode ocorrer de forma congênita, através de agulhas contaminadas ou por transfusão de sangue, sendo esta última forma responsável pela sua ocorrência, sem caráter endêmico, em países desenvolvidos.^{16, 18} Além disso, casos esporádicos de transmissão através de alimento contaminado também são reportados.¹⁶

1.1.1. Patologia da Doença de Chagas

A patogênese da doença de Chagas não é ainda completamente definida e compreendida, apresentando duas lesões inflamatórias básicas, uma focal e outra difusa.¹⁴ Também não existem métodos bem desenvolvidos para avaliar sua progressão e cura.³ Há um consenso crescente baseado em evidências mais recentes de que a persistência do parasita, acoplada a uma resposta imune desequilibrada, desempenha um papel de grande importância no desenvolvimento da patologia característica das fases aguda e crônica.^{16,19}

As manifestações clínicas da fase aguda começam dentro de 6 a 10 dias após a infecção e duram de 1 a 2 meses. Em alguns casos pode ocorrer óbito, verificado mais comumente em pessoas com idade inferior a 15 anos, principalmente por decorrência de complicações como miocardite ou meningoencefalite. Outros sinais como hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, febre e rachaduras também são comuns.¹⁶

Após a fase aguda, os sintomas desaparecem, sendo detectáveis apenas através de exames como eletrocardiograma e radiografia. Cerca de 70-85% das pessoas infectadas permanece nesta forma indeterminada crônica e o restante desenvolve manifestações de danos ao coração, sistema digestivo ou sistema nervoso num período entre 10 a 25 anos após a infecção inicial. Isto é observável principalmente em homens de 20 a 45 anos, apresentando dores no peito, palpitações, tontura, edema periferal, arritmia, tromboembolismo, deficiência cardíaca e morte súbita.¹⁶

1.1.2. Tratamento da Doença de Chagas

Segundo a OMS, um fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas deve apresentar as seguintes características: i) cura parasitológica de casos agudos e crônicos; ii) eficiência em dose única ou em poucas administrações; iii) ser acessível economicamente (baixo custo de produção); iv) não apresentar efeitos colaterais ou teratogênicos; v) não levar a hospitalização para o tratamento; vi) baixa susceptibilidade ao desenvolvimento de resistência.¹⁴ Entretanto, ainda não se encontra disponível um fármaco com este perfil, embora o contingente de indivíduos afetados diretamente por esta doença seja alto. O arsenal terapêutico contra a doença de Chagas limitava-se, até pouco tempo atrás, a dois fármacos nitro-heterocíclicos, nifurtimox (Lampit[®]) e benznidazol (Rochagan[®]) (Figura 4), introduzidos na terapêutica no início da década de 70.¹⁴ Ambos apresentam sérios efeitos colaterais e toxidez elevada, além disso, não possuem eficácia na fase crônica da doença,^{16,18,20-22} sendo que o nifurtimox não é mais comercializado no Brasil e em vários outros países da América Latina.

Figura 4. Estrutura química dos fármacos antichagásicos.

Na Figura 8 verifica-se a presença do grupo nitro (NO_2) nas estruturas destes fármacos. Em geral, compostos nitrados permanecem no organismo por mais tempo do que os respectivos análogos não-nitrados, o que poderia ser vantajoso do ponto de vista terapêutico. No entanto, a ação tóxica também aumenta de forma significativa, devido aos efeitos bioquímicos de redução enzimática. Além disso, o grupo nitro pode favorecer interações inespecíficas e a inibição de outras enzimas no organismo, levando a efeitos indesejáveis.²³

O modo de ação do nifurtimox envolve a geração de radical nitroânion através de nitroredutases que, em presença de oxigênio, originam intermediários reativos. O parasita *T. cruzi* possui uma deficiência parcial de mecanismos de detoxificação de radicais livres, tornando-se suscetível a tais intermediários.¹⁴ A ação do benzonidazol poderia estar relacionada à formação de ligação ou outras interação de nitroredução de intermediários com componentes do parasita⁵¹, ou ainda ligação ao DNA, lipídios e proteínas.²⁴

Vários compostos contra a Doença de Chagas encontram-se em planejamento²⁵ e, atualmente, alguns fármacos utilizados para outras finalidades também estão sendo testados em pacientes chagásicos, como por exemplo o fluconazol e o itraconazol, sendo que dentre estes dois azóis, o itraconazol demonstrou ser mais promissor para novos estudos.¹⁴ Dentre os alvos moleculares em estudo, além da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, objeto de estudo da presente tese, estão incluídos outras enzimas como a tripanotiona redutase, a cruzaina, a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, a diidrofolato redutase, a farnesilpírofosfato sintase e DNA topoisomerasas.¹⁴

1.1.3 ENZIMAS COMO ALVOS BIOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE QUIMIOTERÁPICOS

As enzimas são proteínas que catalisam reações químicas em sistemas biológicos, e seguem os mesmos princípios básicos da cinética de moléculas mais simples. São macromoléculas, complexas e altamente organizadas, e seu sítio ativo pode ser comparado a um solvente pré-organizado com os grupos reativos devidamente orientados para direcionar seletivamente interações químicas ao substrato, favorecendo as reações. A atividade catalítica da enzima reside justamente na sua capacidade de controlar a energia da reação.²⁶

As enzimas são classificadas seguindo a denotação da *Enzyme Commission* e estão divididas em seis classes, de acordo com o tipo de reação que catalisam.²⁷

- i) Oxidorredutases: transferência de hidreto;
- ii) Transferases: transferência de grupos, exceto H;
- iii) Hidrolases: clivagem de substrato pela água;
- iv) Liases: clivagem não hidrolítica de enzimas, removendo ou adicionando grupos a duplas ligações;
- v) Isomerases: mudanças geométricas ou estruturais de uma molécula;
- vi) Ligases: sintetases que juntam dois grupos, acoplados com a quebra do ATP ou outra molécula trifosfato similar.

Historicamente, a inibição enzimática tem se apresentado como um caminho promissor para a descoberta de diversos fármacos muito importantes na clínica médica, incluindo uma série de agentes quimioterápicos,²⁸ pois a

geração de metabólitos pode ser controlada através da inibição enzimática seletiva.²⁹ Muitos dos 100 fármacos mais vendidos no mundo são inibidores enzimáticos^{28, 29}

O motivo para que as enzimas sejam os alvos biológicos mais atrativos para a indústria farmacêutica reside justamente no papel catalítico essencial ao metabolismo que desempenham.^{30, 31} Deste modo, praticamente todas as reações dos organismos vivos são controladas enzimaticamente, o que tornam as enzimas alvos biológicos adequados para intervenção terapêutica em muitos processos fisiológicos alterados. Além disso, a estrutura do sítio ativo é apropriada para proporcionar interações de alta afinidade com moléculas pequenas.

A base para a utilização de um fármaco que atua por inibição enzimática consiste no fato de que a inibição de uma enzima em uma via bioquímica particular resulta na diminuição da concentração do metabólito correspondente, o que implica em uma resposta clínica útil. Há diversos exemplos de enzimas que são alvos biológicos de fármacos (Tabela 1).³²

Tabela 1. Exemplos de alvos enzimáticos e da aplicação terapêutica de seus respectivos inibidores.

ENZIMAS-ALVO	INIBIDORES	EMPREGO CLÍNICO
Diidrofolato redutase	Metotrexato	Câncer
Timidilato sintase	Fluorouracil	Câncer
Transcriptase reversa do HIV	Zidovudina (AZT)	AIDS
Protease do HIV	U75875	AIDS
Enzima conversora da angiotensina	Captopril, enalapril	Hipertensão
CONTINUA		

CONTINUAÇÃO		
ENZIMAS-ALVO	INIBIDORES	EMPREGO CLÍNICO
Ciclooxigenase	Aspirina, indometacina	Inflamação, dor
Catecol-metiltransferase	Ro41-0960	Doença de Parkinson
Acetilcolinesterase	Organofósforo	Miastenia grave, glaucoma, doença de Alzheimer
Bomba de próton ATPase H^+/K^+	Omeprazol	Secreção gástrica, úlceras

1.1.4 GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE (GAPDH) DE *Trypanosoma cruzi*

A identificação e caracterização de vias metabólicas essenciais à sobrevivência de parasitas são bases fundamentais para o planejamento racional de novos agentes quimioterápicos. Enzimas-chave têm sido selecionadas como potenciais alvos moleculares para o planejamento racional de NCEs candidatas a fármacos. Este processo de desenvolvimento baseia-se na identificação de diferenças estruturais nas enzimas do parasita e do hospedeiro humano, que contribuem para o planejamento racional de agentes quimioterápicos seletivos.

O bloqueio do fluxo de uma via metabólica ocorre por meio da inibição de uma ou mais enzimas-chave através da formação de complexos com inibidores. Para isto, é necessário que a enzima alvo exerça suficiente controle no fluxo e que a afinidade do inibidor pela enzima livre ou pelo complexo enzima-substrato seja grande.³³

Rigorosos estudos de metabolismo têm suportado a potencialidade de inibidores da via glicolítica em atuarem como agentes efetivos contra a infecção por *T. cruzi*.²⁵ Entre as oportunidades plausíveis para o desenvolvimento de uma nova quimioterapia contra a doença de Chagas, destacam-se as enzimas desta via.^{25, 34, 35} Em 1976 foi demonstrada que os tripanossomatídeos, quando presentes na corrente sangüínea, morrem dentro de minutos quando a glicólise é bloqueada *in vitro*³³, uma vez que neste estágio esta via metabólica representa a única fonte para obtenção de energia.³⁶ Através de simulações computacionais que incluem dados experimentais de constantes cinéticas, demonstrou-se que o bloqueio da enzima GAPDH pode resultar em grande efeito no fluxo da via glicolítica e, conseqüentemente, na produção de energia.³³ Os tripanossomatídeos presentes na corrente sangüínea morrem em minutos quando incubados com inibidores potentes da GAPDH, como a pentalenolactona e o bromopiruvato.³³ Além disso, a grande distância evolucionária entre tripanossomas e humanos e a organização específica desta via nos parasitas, explicitam distintas propriedades que podem ser exploradas no planejamento de inibidores seletivos da GAPDH. Estudos também reportaram que mais do que 95% de deficiência de GAPDH em eritrócitos não resulta em nenhum sintoma clínico no organismo do hospedeiro, o que a torna um alvo biológico atrativo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos antichagásicos.^{35, 37}

A GAPDH é formada por quatro unidades monoméricas (Figura 5). Esta enzima glicolítica atua na etapa de fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) convertendo-o a 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) na presença de pirofosfato inorgânico (Pi)⁵, utilizando a molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo na sua forma oxidada (NAD⁺) como cofator (Figura 6).

Figura 5. Estrutura quaternária da GAPDH de *T. cruzi*, um homotetrâmero. A GAPDH possui 4 sítios catalíticos, localizados entre os monômeros.

(a)

Figura 6. **a)** Etapa da via glicolítica onde a GAPDH atua. **b)** Esquema da reação catalisada pela GAPDH de *T. cruzi*. D-G3P: D-gliceraldeído-3-fosfato; D-1,3-BPG: D-1,3-bisfosfoglicerato; NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida.

O resíduo de cisteína 166 (Cys166) está envolvido diretamente no mecanismo desta catálise (Figura 7).

Figura 7. Mecanismo de reação de conversão do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) a 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) catalisada pela GAPDH.

O mecanismo catalítico da GAPDH,³⁸ que corresponde à fosforilação oxidativa do substrato (D-G3P), é descrito detalhadamente em 3 etapas:

- i) Adição do grupo sulfidril da cisteína 166 (Cys166) à carbonila do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato. Isto resulta na formação de um hemitioacetal (Figura 22.a);
- ii) Redução de NAD^+ a NADH e oxidação do hemitioacetal formado na etapa anterior, como consequência da transferência do hidreto (H^-) do grupo hemitioacetal, gerando um tioéster (Figura 22.b);
- iii) Geração do 1,3-bisfosfoglicerato ocorre com o ataque nucleofílico do fosfato inorgânico (fosforilação) ao tioéster, restaurando a sulfidril da Cys166 (Figura 22.c).

1.1.4 PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS

A introdução de um novo medicamento antichagásico no mercado exige a comercialização a preços condizentes para corresponder ao alto investimento, o que quase sempre não é possível devido ao poder aquisitivo dos indivíduos acometidos por estas doenças. Um cálculo sobre o investimento necessário para a introdução de novos fármacos contra doenças negligenciadas revela porque isto se torna uma tarefa irreal para uma única companhia ou instituto de pesquisa. De acordo com o relatório TDR da OMS, há oito doenças negligenciadas para as quais novos fármacos são necessários. Considerando-se que, diante de um projeto bem sucedido, um novo medicamento eficaz, esteja disponível em 2020 e, assumindo a taxa de sucesso para o planejamento de um fármaco anti-infeccioso em 16%, segundo estimativas históricas, pelo menos 6

compostos candidatos necessitariam entrar na fase clínica para cada doença. Atualmente, um candidato a fármaco que entra na fase clínica de desenvolvimento representa um custo de US\$ 20 milhões. Portanto, os custos para um mínimo de 48 candidatos clínicos que teoricamente resultariam em 8 novos fármacos chega a US\$ 1 bilhão, o que representa um gasto maior do que o orçamento de pesquisa anual de muitas companhias farmacêuticas. Para contornar estas dificuldades, estratégias de parcerias entre o meio acadêmico e a indústria farmacêutica são extremamente importantes³⁹ e, neste aspecto, diversos grupos de pesquisas em várias instituições de ensino procuram contribuir no processo de descoberta de novos agentes quimioterápicos contra a doença de Chagas.

2 O PANORAMA DO PROCESSO DE DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

A descoberta de fármacos de notável importância (*blockbuster drugs*, termo em inglês usado para designar os fármacos com vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão) é a base do desenvolvimento da indústria farmacêutica a nível mundial.⁴⁰⁻⁴² Desde a concepção de uma nova entidade química (NCE, do inglês *new chemical entity*) até a sua introdução no mercado farmacêutico, são necessários entre 12 e 16 anos, com investimentos da ordem de US\$ 800-880 milhões.⁴³⁻⁴⁵ O desenvolvimento de fármacos, esquematicamente representado na Figura 8, inclui várias etapas de característica intrinsecamente multidisciplinar, envolvendo altos custos e longos prazos.^{41, 46, 47}

Figura 8. Tempo e custos estimados no processo de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco.⁴⁸ HTS: ensaio biológico automatizado; VHTS: ensaio virtual.

Além disso, outra característica marcante deste processo é a alta taxa de insucessos, muitas vezes superior a 90%, considerando-se todas as etapas de pesquisa básica e desenvolvimento clínico.⁴⁴ Como consequência, o retorno financeiro também é um processo demorado e, embora haja a proteção da patente do fármaco, muitos medicamentos de marca competem com outros produtos que oferecem benefícios similares.⁴⁹ Uma das principais causas de insucesso no processo de desenvolvimento está relacionada às propriedades farmacocinéticas inapropriadas (Figura 9).⁵⁰

Figura 9. Razões de insucesso no processo de desenvolvimento de fármacos. Dados de 7 companhias farmacêuticas do Reino Unido no período de 1964-1985.⁵¹

Dentre os fatores que influenciam o comportamento farmacocinético inapropriado, citam-se a baixa absorção intestinal ou baixa biodisponibilidade absoluta, entre outros fatores.⁵¹ A fase farmacocinética é extremamente importante na ação dos fármacos administrados por via oral. Com base nisto, várias abordagens visam à otimização de propriedades farmacocinéticas nos estágios iniciais do processo de descoberta.⁴⁴ O objetivo consiste em eliminar compostos que possuam características físico-químicas e/ou farmacocinéticas inapropriadas, levando a uma redução dos custos do processo. Em particular, nos últimos anos, os métodos *in silico* (que se referem a estudos realizados no computador) têm ganhado importante espaço em vários projetos de planejamento de fármacos, como ferramentas úteis no estudo e predição de propriedades farmacocinéticas de candidatos a fármacos (Figura 10).

Figura 10. Integração da química, biologia e ADMET no processo de descoberta de fármacos.⁴⁴

2.1 O ENSAIO VIRTUAL E A DESCOBERTA DE NOVAS MOLÉCULAS BIOATIVAS

O grande avanço das técnicas experimentais em larga escala, como a química combinatória e os ensaios biológicos automatizados (HTS, do inglês *high-throughput screening*), tornou evidente a promessa de aumento de produtividade em pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos.⁵² Em 1997, executivos das maiores empresas farmacêuticas previam para o ano de 2000 avanços significativos que resultariam em uma diminuição em torno de 50% do tempo no processo de descoberta de fármacos, triplicando o número de NCEs que entrariam em fases clínicas.⁵³ Entretanto, este objetivo não foi alcançado (Figura 4) e os investimentos com P&D continuaram a aumentar, bem como o custo médio para a introdução de NCEs nas fases clínicas de desenvolvimento.⁵²⁻⁵⁴ Estes fatores contribuíram para a queda no número de novos fármacos introduzidos no mercado farmacêutico, apesar do maior volume de investimentos (Figura 11).⁴⁴ Nos anos de 1999 e 2000, considerando-se apenas as dez maiores companhias farmacêuticas, o déficit de inovação médio atingiu o patamar de aproximadamente 1,3 NCEs por ano.⁴² e um fator de grande influência neste aspecto é a avaliação de propriedades fundamentais como solubilidade, biodisponibilidade e toxidez, durante a etapa de otimização de compostos-líderes.⁵⁵

Figura 11. Número de NCEs aprovadas pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*, Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos) entre os anos de 1996 e 2006.⁵⁶

Em resposta às exigências impostas pelos elevados níveis de investimentos em P&D, as maiores companhias farmacêuticas (e.g., Pfizer, GlaxoSmithKline, Merck) têm investido em abordagens inovadoras, mais especificamente com a introdução de ferramentas computacionais de alto desempenho, procurando a integração multidisciplinar mais efetiva possível.⁵⁷

Diferentes termos são usados para descrever as abordagens e estratégias computacionais no processo de planejamento de fármacos. Estes incluem o planejamento de fármacos com o auxílio do computador (CADD, do inglês *computer-aided drug design*), planejamento molecular com o auxílio do computador (CAMD, do inglês *computer-aided molecular design*), e a modelagem molecular com o auxílio do computador (CAMM, do inglês *computer-aided molecular modeling*).⁴⁷ Entre os métodos computacionais modernos, destaca-se o ensaio virtual (VS, do inglês *virtual screening*). Esta técnica *in silico* tem revolucionado o processo tradicional de descoberta de fármacos, apresentando

novas perspectivas de análise e gerenciamento da informação, de forma rápida, eficaz e com custos atrativos.^{58, 59} O VS é uma abordagem complementar ao HTS e apresenta elevada importância econômica para a indústria farmacêutica, sendo extremamente valioso para a identificação de pequenas moléculas em etapas iniciais do processo, ou mesmo para a otimização de compostos-líderes.⁶⁰

Os programas de VS são capazes de realizar o acoplamento de várias moléculas no sítio da macromolécula-alvo, sendo este processo conhecido como docagem (do inglês, *docking*), e que consiste no processo de posicionar um ligante no sítio ativo de uma proteína buscando elevada complementaridade. Depois de finalizada a etapa de acoplamento dos ligantes, um processo de avaliação das forças de interação predominantes entre o alvo e o ligante é realizado, através de uma função de pontuação.⁶⁰⁻⁶² Basicamente, o VS fornece uma predição do modo de ligação de diferentes ligantes, presentes em bases de dados virtuais, frente a um alvo biológico estruturalmente definido.

O processo computacional de docagem envolve três etapas principais:

- i) representação do sistema (e.g. superfície, *hot spots*);
- ii) identificação da melhor posição de acoplamento dos ligantes na proteína;
- iii) pontuação (do inglês, *scoring*) para a determinação da afinidade relativa de ligação dos ligantes frente à molécula alvo.

Dentre todas estas etapas, que apresentam alto grau de complexidade, a mais bem estudada é a de acoplamento de ligantes.⁶³ A maioria dos programas trata o ligante como flexível e a estrutura do receptor como rígida ou semi-rígida, sendo que a flexibilidade do receptor permanece como um dos maiores desafios na otimização de métodos.⁶³ As estratégias de busca durante o acoplamento geram várias posições, que devem ser avaliadas por funções de

pontuação, sendo possível, assim, distinguir e classificar os melhores modos de ligação.^{64, 65}

Um algoritmo de busca é capaz, teoricamente, de examinar todos os modos possíveis de ligação. No entanto, essa é uma tarefa impraticável devido ao custo computacional com o tamanho do espaço de busca, que cresce exponencialmente com o número de graus de liberdade do sistema. Desta forma, as estratégias de busca devem se limitar a um espaço conformacional razoável, de modo que haja um equilíbrio entre o espaço a ser amostrado e o tempo de operação computacional.^{65, 66}

Dentre os algoritmos de busca comumente utilizados destacam-se: i) dinâmica molecular, que envolve o cálculo de soluções das equações de movimento de Newton; ii) Monte Carlo, onde movimentos randômicos são gerados para o sistema e então a movimentação molecular baseada na probabilidade de Boltzmann é aceita ou rejeitada; iii) algoritmos genéticos, que são particularmente úteis na solução de problemas de otimização de complexo; iii) métodos baseados em fragmentos; iv) métodos complementares locais; v) métodos de geometria de distância; vi) busca tabu; e vii) busca sistemática. Por sua vez, as principais funções de pontuação são: i) métodos de campo de força; ii) funções de energia livre empírica; e iii) força média de potencial baseada no conhecimento.⁶⁵

As funções de pontuação procuram prever a energia livre de ligação de cada molécula avaliada, representando uma etapa essencial e de elevado grau de complexidade. Em geral, uma função de pontuação que funciona bem para compostos de uma mesma série frente a um dado alvo, pode não ser eficaz da mesma forma para compostos de séries distintas.⁶³ Algumas limitações das funções de pontuação incluem características próprias do complexo ligante-

proteína, simplificações e aproximações de cálculos, solvatação, e contribuições entrópicas em diferentes sistemas.⁶⁷ Além disso, a faixa de distribuição de atividade pode ser muito pequena em alguns conjuntos de dados, quando se compara os valores de atividade biológica do composto mais potente e do de menor potência, favorecendo resultados não precisos. A construção de funções de pontuação precisas demanda a introdução de novos parâmetros. Isto, por outro lado, impõe um custo computacional muito elevado, tornando o processo impraticável devido ao tempo requerido. Portanto, dois fatores correlacionados de forma inversa devem ser considerados durante o processo: enquanto a velocidade é essencial para a avaliação de grandes coleções de compostos, a precisão torna-se uma etapa crítica para a identificação ou mesmo otimização de moléculas bioativas.⁶⁷ Apesar de suas limitações, foi demonstrado que o VS é capaz de reduzir o número de compostos a serem avaliados por uma razão da ordem de duas a três vezes,²⁹ sendo uma técnica amplamente utilizada pelas maiores companhias farmacêuticas.⁶³

Para melhorar a qualidade do resultado obtido através do VS, uma estratégia comumente aplicada é a utilização de diversos programas, ou mesmo de variadas funções de pontuação dentro do mesmo programa, para se obter a melhor informação possível do complexo gerado. Posteriormente, os valores de interação obtidos através dos diferentes programas são reordenados de acordo com um processo de pontuação por consenso (do inglês *consensus scoring*), que é uma média de valores para cada complexo, resultando em uma estimativa mais precisa e representando uma importante estratégia para estudos de interações intermoleculares proteína-ligante.⁶⁸ Atualmente, encontram-se disponíveis vários programas de docagem que empregam diferentes algoritmos de docagem e funções de pontuação (Tabela 2).^{52, 61, 64, 67}

Tabela 2. Programas Computacionais usados no Ensaio Virtual.⁶¹

Programa	Amostragem	Função de pontuação	Conveniência para VS em larga escala
Dock	Construção incremental	Campo de força ou pontuação de contato	Alta
FlexX	Construção incremental	Pontuação empírica	Alta
Slide	Combinações conformacionais	Pontuação empírica	Alta
Fred	Montagens conformacionais (<i>conformational ensemble</i>)	Pontuação de Gaussian ou pontuações empíricas	Alta
Gold	Algoritmo genético	Pontuação empírica	Baixa
Glide	Busca exaustiva	Pontuação empírica	Baixa
AutoDock	Algoritmo genético	Campo de força	Baixa
LigandFit	Monte Carlo	Pontuação empírica	Baixa
ICM	Amostragem pseudo-browniana e minimização local	Misto de campo de força e pontuação empírica	Baixa
QXP	Monte Carlo	Campo de força	Baixa

A capacidade de processamento dos programas é variável e depende da infra-estrutura de *hardware* disponível. Sempre que possível, este procedimento é realizado computacionalmente em paralelo, produzindo resultados de forma mais ágil para uma análise em tempo real.⁵⁹

Existem duas estratégias para a identificação de novos ligantes a partir do método de VS: i) baseada na estrutura tridimensional do alvo biológico, através

de um processo de reconhecimento molecular por complementaridade; ii) baseada na estrutura dos ligantes, através de um processo de reconhecimento por similaridade estrutural dos compostos biologicamente ativos.⁴⁶ As técnicas de docagem molecular baseadas na estrutura do receptor tornaram-se amplamente utilizadas com o advento de grandes quantidades de informação de alvos biológicos provenientes de técnicas cristalográficas, que terão um papel bem mais preponderante no processo de desenvolvimento de fármacos.⁶⁹ Assim, o emprego de métodos de ensaio virtual robustos, utilizando-se alvos moleculares bem definidos é muito importante para a identificação de novas moléculas bioativas.⁷⁰

Programas de VS importantes, como o GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) e o FlexX (SYBYL, da Tripos),⁷¹ são muito empregados pela academia e indústria.

2.2.1 Programas Computacionais de VS

Dentre os programas computacionais utilizados para o VS, merecem especial destaque o GOLD, com as funções de pontuação GoldScore e ChemScore, e o FlexX com a função de pontuação FlexX.

2.2.1.1. GOLD

Entre as características do programa GOLD, destacam-se:

- i) Emprego de algoritmo genético para a docagem do ligante na proteína;
- ii) Flexibilidade rotacional para aceptores de hidrogênio selecionados;
- iii) Flexibilidade total do ligante e parcial da proteína;
- iv) Opção de escolha da função de pontuação pelo usuário (e.g., GoldScore, ChemScore);
- v) Avaliação por consenso, através da utilização de duas funções de pontuação;
- vi) Gerenciamento de dados através de diferentes formatos (e.g., mol2, mol, pdb, mdl e sdf);
- vii) Pode ser utilizado no modo serial ou paralelo, resultando em agilidade e versatilidade dos processos;
- viii) Alto desempenho, apresentando eficiência e rapidez na análise de bases contendo dezenas de milhares de substâncias.

O GOLD pode utilizar um método de pontuação empírica através da função ChemScore ou pontuação baseada no campo de força, através da função GoldScore resultando no cálculo de ganho ou perda de entalpia durante a ligação para classificação dos complexos calculados.⁷² Este programa tem sido utilizado com grande sucesso na identificação de moléculas candidatas a novos fármacos. A validação do algoritmo de docagem do programa foi realizada utilizando um conjunto de 224 estruturas de complexos proteína-ligante,⁷³ resultando em soluções adequadas quando comparada com estruturas cristalográficas ($RMS < 2,0 \text{ \AA}$).⁶⁹ Foi demonstrado também que o programa GOLD, quando associado a outros programas (FlexX e PMF), foi capaz de classificar

corretamente 32 de 33 compostos testados experimentalmente contra o citocromo P450 (EC 1.14.15.1).⁷⁴ Esta metodologia foi testada com substratos e inibidores do citocromo P450 3A4. Os resultados demonstraram que estes programas foram capazes de reconhecer 334 dos 345 compostos que se ligam ao citocromo P450 3A4. Em um estudo mais recente, 100 complexos proteína-ligante (coletados do *PDB*) foram utilizados para a avaliação da capacidade preditiva deste programa.⁶⁸ Resultados promissores foram obtidos, com cerca de 60% dentro de uma faixa pré-estabelecida de 1Å de RMSD (do inglês, *Root Mean Square Deviation*) e, para um RMSD de 2Å a docagem apresentou em torno de 90% de precisão. O desempenho na correta classificação foi de aproximadamente 55%, considerando-se 2 Å de RMSD, além de demonstrar uma velocidade de processamento pouco sensível ao número de ligações rotacionáveis na molécula.⁶⁸ Quando se aplica uma busca exaustiva, o índice de sucesso em se obter um ligante amplia grandemente.

2.2.1.2. FlexX

Entre as características do programa FlexX, destacam-se:

- i) Construção incremental do ligante no sítio ativo da proteína;
- ii) Flexibilidade total do ligante enquanto a da proteína é mantida fixa;
- iii) Opção de escolha das funções de pontuação pelo usuário (e.g., ChemScore, D_Score, G_Score, PMF_Score, FlexX);
- iv) Gerenciamento de dados através de diferentes formatos de entrada de dados (e.g., mol2, mol, pdb, mdl e sdf);

v) Agilidade e versatilidade na aquisição dos resultados.

A eficiência do programa FlexX foi testada através de comparação de 19 complexos cristalográficos proteína-ligante, de modelos conformacionais gerados a partir da docagem molecular. Foram encontradas soluções bastante satisfatórias ($RMS < 0,7 \text{ \AA}$), que indicam a qualidade do método.⁷¹ A utilização integrada de diferentes programas de VS é uma estratégia que apresenta enormes vantagens na identificação de novas moléculas.⁷⁴ Além disso, em programas de planejamento de fármacos as sinergias entre as diversas técnicas avançadas empregadas no planejamento molecular, como por exemplo, técnicas cristalográficas de raios-x, ensaio virtual, RMN, SAR, QSAR, entre outras⁷⁵, contribuem para que o processo possa ser bem-sucedido.

3 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A determinação das constantes cinéticas K_M e V_{max} constitui uma etapa essencial para a compreensão da cinética enzimática e para o estudo de reações catalisadas enzimaticamente. O procedimento consiste em medir a velocidade inicial da reação a várias concentrações de substrato.⁷⁶ Este procedimento inicia com as etapas básicas de formação e quebra do complexo enzima-substrato **E•S**, como exemplificado na Figura 12.

Figura 12. Ilustração das etapas de formação do produto a partir da ação da enzima sobre o substrato.

O substrato **S** liga-se à enzima livre **E**, formando o complexo não covalentemente ligado **E•S**. Este processo é considerado rápido. Ocorre, então, uma transformação química do substrato em produto **P**, no sítio da enzima, formando o complexo enzima-produto **E•P** e regenerando a enzima livre e o produto no meio **E+P**.

O esquema da Figura 9 pode ser simplificado, assumindo que a dissociação do complexo **E•P** não seja a etapa limitante e a reversão do produto a substrato seja desprezível. Tal afirmação torna-se válida quando as condições de velocidade inicial são conhecidas. Neste caso a concentração de P é baixa, originando o esquema demonstrado na Figura 13.

Figura 13. No início da reação catalisada enzimaticamente, a reação reversa, de formação do substrato, é praticamente inexistente.

A determinação do parâmetro cinético K_M (constante de Michaelis-Menten) é realizada sob condições experimentais do estado-estacionário (do inglês, *steady-state*), onde a concentração da enzima é mantida bem abaixo daquela do substrato, garantindo um período de pré-equilíbrio breve. Isto faz com que os complexos **E•S** e **E•P** na Figura 10 tornem-se constantes e a velocidade de conversão do substrato a produto não seja dependente da concentração da enzima. Portanto, nestas condições, a equação de Michaelis-Menten (Equação 1) descreve quantitativamente a relação apresentada na Figura 10. Isto tem como consequência de que a velocidade inicial (v_0) torna-se diretamente proporcional à concentração da enzima, seguindo cinética de saturação com respeito à concentração do substrato **[S]** (Equação 2).

$$v_0 = \frac{[S] V_{\max}}{K_M + [S]} \quad (1)$$

$$V_{\max} = k_2 [E] \quad (2)$$

Graficamente, é possível verificar que, quando a **[S]** é muito baixa, v_0 aumenta linearmente, então a equação 2 pode ser simplificada (Equação 3).

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M} \quad (3)$$

À medida que a concentração do substrato aumenta, o aumento observado em v é menor do que o aumento na **[S]**, até ser atingido um platô, no qual v_0 torna-se independente da concentração do substrato ($V_{\max}$), ou seja, mesmo aumentando a concentração do substrato, não há aumento da velocidade inicial (Figura 14).

Figura 14. Gráfico do comportamento da velocidade enzimática inicial. Com o aumento da concentração do substrato a velocidade inicial aumenta, até atingir um patamar onde permanece constante com o aumento da concentração do substrato.

A constante K_M é definida como a concentração do substrato necessária para atingir a metade da velocidade máxima da reação catalisada enzimaticamente, ou seja $v_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$.

3.1 Inibidores Enzimáticos

Após a seleção dos alvos moleculares apropriados, a etapa seguinte é encontrar moléculas pequenas capazes de modular a atividade do alvo macromolecular em um caminho que fornecerá segurança e efetividade no tratamento ou prevenção de desordens ou doenças humanas.

Um inibidor enzimático é uma substância capaz de interagir com uma enzima, levando ao bloqueio parcial ou completo da sua atividade catalítica.⁷⁷ Em geral, são substâncias químicas análogas aos substratos naturais de suas respectivas enzimas. Contudo, não reagem ou reagem muito lentamente, em comparação ao estado de transição da reação enzima-substrato natural. Juntamente com os complexos **E•S** e enzima-inibidor **E•I** correspondentes são comumente utilizados para a investigação da natureza química e conformacional do sítio ativo da enzima, importante parte dos estudos para a elucidação do mecanismo de catálise enzimática.

A capacidade de uma substância em inibir a catálise enzimática depende primeiramente da sua complementaridade em relação aos resíduos do sítio catalítico. Neste sentido, para que um inibidor encontre emprego terapêutico, duas características são de fundamental importância para definir sua utilização: a potência e a seletividade. Potência diz respeito à quantidade de substância

necessária para se observar a ação inibitória, quanto maior a potência menor será a quantidade de inibidor requerida. Seletividade leva em consideração a capacidade de bloquear apenas a enzima-alvo e não atuar em outros sítios do organismo. Em conjunto, ambos os aspectos permitem uma menor necessidade de inibidor, tanto pelo fato de se diminuir sua possibilidade interação com outros sítios através da utilização de uma menor concentração (maior potência), como pela probabilidade menor de originar efeitos indesejados devido à sua ação em outros locais (seletividade), característica própria da estrutura química do inibidor ou dos metabólitos que pode gerar.⁷⁶

A afinidade e a especificidade envolvida na interação entre o inibidor e os resíduos proteicos da enzima dependem de forças do tipo hidrofóbicas, dispersivas, eletrostáticas, ligação de hidrogênio e interações π -cátion, as quais são de fundamental importância para a formação e estabilização do complexo enzima-inibidor.⁷⁶ É a soma destas interações que determina o grau de afinidade do complexo formado. Isto pode ser descrito de forma simplificada no Figura 15, que relaciona o equilíbrio entre a enzima livre **E**, o inibidor **I** e o complexo **E•I**.

Figura 15. Ilustração do equilíbrio estabelecido entre um inibidor e sua enzima-alvo.

A afinidade do inibidor pela sua enzima-alvo descreve a força com que um inibidor interage com esta, e pode ser mensurada através da constante de inibição K_i , exemplificada na Equação 4.

$$K_i = \frac{[E][I]}{[E \bullet I]} \quad (4)$$

A Equação 4 descreve que, quanto menor é o K_i maior é a interação do inibidor e, por conseguinte, melhor será o inibidor. Experimentalmente, a determinação de K_i é realizada através da utilização de pelo menos três concentrações diferentes de inibidor em ensaios enzimáticos variando-se a concentração do substrato ou do cofator.

Idealmente, o inibidor não deve sofrer transformação química, levando a um metabólito desnecessário, ou seja, a um produto que pode ser tóxico ou levar à formação de outros metabólitos tóxicos *in vivo*. Quando se faz o uso clínico de um inibidor, o efeito farmacológico máximo ocorrerá quando a concentração do fármaco (inibidor) for mantida no nível de saturação no sítio ativo da enzima-alvo. À medida que o fármaco é metabolizado, a concentração do inibidor é diminuída, requerendo repetidas administrações para manter a integridade do complexo **E•I** formado. Isso explica porque muitos fármacos (não somente inibidores) precisam ser administrados várias vezes ao dia, em intervalos de tempo pré-estabelecidos.

3.1.1 Mecanismo de Ação dos Inibidores Enzimáticos

Excetuando-se os casos onde a inibição irreversível é observada, como no caso de antibióticos, por exemplo, o mecanismo de inibição reversível é o preferencial no planejamento de fármacos. Os inibidores pertencentes a esta classe interagem com o sítio ativo da enzima-alvo de modo rápido, reversível e não covalente e obedecem à cinética de Michaelis-Menten. Além disso, apresentam vantagens em termos de administração, controle de propriedades

farmacocinéticas e redução de efeitos adversos, características não observadas com inibidores irreversíveis, os quais podem modificar quimicamente uma enzima ou inativá-la irreversivelmente.²⁹ Por não constituírem parte desta tese, os inibidores irreversíveis não serão abordados.

A determinação do mecanismo de inibição enzimática pode ser conduzida através da obtenção do gráfico de ou de Lineweaver-Burk. A equação de Michaelis-Menten (Equação 1) é convertida algebricamente no seu duplo-recíproco, originando uma forma mais útil para determinar se um inibidor é competitivo, incompetitivo ou não-competitivo (Equação 5).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]} \quad (5)$$

A separação dos componentes do numerador à direita do sinal de igualdade e a simplificação posterior resultam da equação 6 fornece um gráfico do tipo $y = ax + b$ (Equação 6).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (6)$$

Isto resulta na obtenção de retas cuja inclinação corresponde a $K_M/V_{\max}$, com o intercepto de $1/V_{\max}$ no eixo y. Os valores no eixo "x" correspondem ao dado de $1/[S]$ e os valores no eixo "y" aos dados de $1/v_0$ (Figura 16).

Figura 16. Gráfico do duplo-recíproco obtido a partir dos dados experimentais de ensaios enzimáticos com enzimas que apresentam um comportamento do tipo Michaelis-Menten.

Os inibidores enzimáticos do tipo reversível estão divididos nas seguintes classes:

i) *Inibidores Competitivos*: ocorre uma competição entre inibidor e substrato natural pela ligação ao sítio ativo da enzima, sendo esta ligação mútua exclusiva. Isto implica que, se o inibidor liga-se à enzima, o substrato não poderá ligar-se e vice-versa (Figura 17).

A

Figura 17. a) Ilustração do mecanismo de inibição do tipo competitivo; **b)** Gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para este tipo de mecanismo.

ii) *Inibidores Não-Competitivos*: podem se ligar tanto à enzima livre para formar o complexo enzima-inibidor $E \cdot I$ ou ao complexo enzima-substrato para formar o complexo enzima-substrato-inibidor $E \cdot S \cdot I$ (Figura 18).

Figura 18. a) Ilustração do mecanismo de inibição do tipo não-competitivo; **b)** Gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para este tipo de mecanismo.

iii) *Inibidores Incompetitivos*: ligam-se exclusivamente ao complexo E•S e não possuem afinidade pela enzima livre (Figura 19).

Figura 19. a) Ilustração do mecanismo de inibição do tipo incompetitivo; **b)** Gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para este tipo de mecanismo.

Após a seleção dos alvos moleculares apropriados, a etapa seguinte é encontrar moléculas pequenas capazes de modular a atividade do alvo macromolecular em um caminho que fornecerá segurança e efetividade no tratamento ou prevenção de desordens ou doenças humanas.

4 ESTRATÉGIAS DE IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS BIOATIVAS

Dentre as abordagens utilizadas em Química Medicinal na busca por novos ligantes bioativos citam-se:

- i) Triagem de produtos naturais, que constitui uma fonte importante para a obtenção de compostos com variada diversidade estrutural e biológica
- ii) Triagem de compostos sintéticos, que oferece a vantagem muitas vezes de apresentar uma rota sintética definida, facilitando a obtenção de quantidade apropriada de derivados para a realização de vários estudos;
- iii) Triagem *in silico*, através do ensaio virtual, que oferece a vantagem de direcionar o estudo para estruturas que apresentam maior probabilidade de interação com o alvo biológico em estudo.

No presente trabalho foram estudados, a partir de fontes naturais, compostos derivados de ácidos anacárdicos e flavonóides e, proveniente de síntese química, derivados orgânicos diidropirazólicos e complexos orgânicos de rutênio, além de um derivado benzimidazol identificado na triagem computacional.

4.1 IMPORTÂNCIA DE PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Embora o interesse na busca por novos fármacos a partir de produtos naturais tenha decrescido nos últimos anos em decorrência de diversos fatores, é

indiscutível o fato de que compostos provenientes de fontes naturais sejam amplamente reconhecidos como estruturas químicas privilegiadas para servir de base para o desenvolvimento de fármacos bem-sucedidos. Esqueletos estruturais das diversas classes de produtos naturais derivados de plantas, por exemplo, são amplamente utilizados em coleções de compostos obtidas através de técnicas combinatórias, com diversos exemplos baseados em alcalóides, policetídeos, terpenos e flavonóides.⁷⁸

Entre os anos de 2005 e 2007, 13 fármacos relacionados a produtos naturais foram aprovados, entre eles os peptídeos exenatida (anti-diabético) e ziconotida (analgésico), ixabepilona (anti-câncer), retapamulina (antibiótico) e trabectedina (anti-câncer), elliptinio (anticâncer), galantamina (Alzheimer) e huperzina (Alzheimer), sendo que os 5 primeiros representam novas classes de compostos. Atualmente, mais de 100 novos compostos derivados de produtos naturais estão sob investigação clínica, particularmente como agentes anti-câncer e anti-infecciosos, embora outras áreas terapêuticas sejam abordadas, e aproximadamente 100 projetos similares estão em desenvolvimento pré-clínico (Tabela 3).⁷⁸

Tabela 3. Categorias Terapêuticas de Fármacos Derivados de Produtos Naturais em Diferentes Estágios de Desenvolvimento.

Área terapêutica	Pré-clínico	Fase I	Fase II	Fase III	Pré-registro	Total
Câncer	34	15	26	9	2	86
Anti-infeccioso	25	4	7	2	2	40
Neurofarmacológico	6	3	9	4	0	22
Cardiovascular/ gastrointestinal	9	0	5	6	0	20

CONTINUA

CONTINUAÇÃO						
Área terapêutica	Pré-clínico	Fase I	Fase II	Fase III	Pré-registro	Total
Inflamação	6	2	9	1	0	18
Metabólico	7	3	6	1	0	17
Pele	7	1	2	0	0	10
Hormonal	3	0	2	1	0	6
Imunossuppressores	2	2	0	2	0	6
Total	99	30	66	26	4	225

Estudos recentes indicam que muito pouco da biodiversidade vegetal foi extensivamente avaliada em termos de atividade biológica. A diversidade química de produtos naturais é um excelente caminho para o desenvolvimento de novos fármacos, fato comprovado pelo número de compostos de origem natural que encontram-se em estágios avançados de desenvolvimento clínico (Tabela 4).⁷⁸

Tabela 4. Fármacos Baseados em Produtos Naturais em Diferentes Estágios de Desenvolvimento.⁷⁸

Estágio de desenvolvimento	Plantas	Bactérias	Fungos	Animais	Semi-sintéticos	Total ^a
Pré-clínico	46	12	7	7	28	99
Fase I	14	5	0	3	8	30
Fase II	41	4	0	10	11	66
Fase III	5	4	0	4	13	26
Pré-registro	2	0	0	0	2	4
Total	108	25	7	24	61	225

^a- não inclui reformulações de produtos existentes (66 produtos foram listados).

4.1.1 ÁCIDOS ANACÁRDICOS

Os ácidos anacárdicos compreendem o ácido 6-pentadecanilsalicílico e seus homólogos insaturados ácido 6-[8'(Z),11'(Z),14'-pentadecatrienil]salicílico, ácido 6-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienil]salicílico e ácido 6-[8'(Z)-pentadecenil]salicílico (Figura 16). O ácido anacárdico apresenta, como característica estrutural química, um anel do tipo ácido salicílico e uma longa cadeia lateral na posição 6, a qual pode ser saturada ou ainda apresentar uma, duas ou três insaturações (Figura 20). Estes compostos são encontrados em diversas plantas da medicina tradicional, como as castanhas do cajueiro. Diversos efeitos biológicos apresentados por estes compostos são descritos na literatura. Entre eles, citam-se as atividades moluscicida, antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e de radiosensibilização. Embora não seja completamente compreendido o mecanismo pelo qual esta molécula atua para resultarem nestes efeitos, sabe-se que atuam inibindo a atividade de numerosas enzimas, incluindo tirosinase, xantina oxidase, fosfolipase C específica de fosfatidilinositol, histona acetiltransferase (HAT), fator tecial VIIa, lipoxigenase, e cicloxigenase, além de possuírem atividade antioxidante.^{79, 80}

Estrutura	Derivado Ácido
6-[8'(Z),11'(Z),14'-pentadecatrienil]salicílio
6-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienil]salicílio
6-[8'(Z)-pentadecenil]salicílio
6-pentadecanilsalicílio

Figura 20. Estrutura química de alguns ácidos anacárdicos estudados.

4.1.2 COMPOSTOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides são metabólitos secundários e encontram-se entre os grupos de polifenólicos mais distribuídos em plantas. Em comparação com outros metabólitos como alcalóides ou terpenos, possuem uma variedade limitada de esqueletos estruturais.⁸¹

Vários sistemas de cultura celular como células de cólon, endoteliais, de fígado, mama, leucêmicas e queratinócitos têm sido utilizados para demonstrar os diversos efeitos biológicos que esta classe de compostos exerce. Apresentam efeitos antioxidantes de absorção de espécies oxigenadas reativas (ROS, *reactive oxygen species*), sendo capazes de estimular a produção de enzimas antioxidantes que atuam na fase II de detoxificação e de diminuir a peroxidação lipídica. A atividade antioxidante se deve principalmente pelos grupos hidroxilas

localizados nas posições 3, 3', 4' e 5' desta subclasse. Outros efeitos reportados na literatura incluem inibição da mutagênese, bloqueio do ciclo celular com efeito sobre as proteínas reguladores do ciclo, indução da apoptose através das vias mitocondrial e FAS, efeitos anti-inflamatórios, anti-invasivos e anti-angiogênicos.⁸¹⁻⁸⁵

Foi demonstrado, através de vários estudos, que estes compostos exercem efeitos protetores contra muitas doenças, em particular doenças cardiovasculares e câncer.⁸⁵ O efeito anti-câncer pode estar relacionado à capacidade de muitos compostos inibirem a atividade antimitótica através da inibição da aromatase ou da topoisomerase. Além disso, também possuem a capacidade de inibir enzimas como a proteína quinase C, diversas proteínas-tirosina quinases, ou quinases dependentes de ciclinas.⁸¹ Derivados como as catequinas, possuem maior eficiência na diminuição da permeabilidade e fragilidade capilar, além de possuir grande capacidade anti-inflamatória, capacidade de inibição de oxidação de lipoproteínas e agregação de plaquetas.⁸⁶ Foi demonstrado que as isoflavonas também possuem, além da ação antiestrogênica, a capacidade de estabilizar a estrutura do DNA, inibindo a atividade da telomerase, o que leva a crer que poderiam atuar como agentes anti-câncer.⁸⁷ Outros flavonóides também apresentaram capacidade de induzir a apoptose e esta também poderia a atividade quimiopreventiva de câncer.⁸²

Dentre os diversos compostos analisados durante este projeto de doutoramento, uma quantidade significativa de derivados flavonóides foi avaliada possibilitando uma inferência inicial entre a estrutura e a atividade inibitória de alguns derivados desta série de compostos contra a GAPDH de *T. cruzi*.

A diversidade entre as subclasses de compostos flavonóides deve-se principalmente ao padrão de substituição no anel C da qual derivam as

subclasses, podendo ocorrer hidroxilação, metoxilação, prenilação, ou glicosilação.⁸¹ As principais subclasses incluem chalconas, auronas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas, e antocianinas (Figura 21).^{88, 89}

Figura 21. Principais subclasses de compostos flavonóides.^{81, 89, 90}

4.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA APRESENTADA POR COMPOSTOS DIIDROPIRAZÓLICOS

Compostos 4,5-diidropirazólicos (Figura 22) apresentam amplo espectro de atividade biológica, e encontram aplicação como agentes agroquímicos e fármacos que apresentam efeito antiinflamatório, antifúngico, antibacteriano, antitumoral e antiviral.⁹¹ Este fato encontra grande relevância no

desenvolvimento de novos protótipos antichagásicos, uma vez que estas estruturas contribuem significativamente para a obtenção de compostos com excelentes características físico-químicas biologicamente comprovadas.

Figura 22. Exemplo de estrutura de um derivado 4,5-diidropirazólico.

4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA APRESENTADA POR COMPOSTOS BIOINORGÂNICOS DE RUTÊNIO

Os íons metálicos possuem particular interesse devido ao largo espectro de reatividade que apresentam. Assim, as diferentes geometrias de coordenação que apresentam permitem a síntese de moléculas apresentando orientação e estereoquímica de ligantes orgânicos de forma específica. Além disso, a relativa estabilidade das ligações organometálicas faz com que estes compostos em princípio comportem-se como compostos orgânicos.⁹²

Complexos inorgânicos de rutênio encontram aplicações particularmente úteis para a composição de estruturas com ligações tanto lábeis quanto inertes,⁹³ aspecto que pode apresentar grande importância sob o ponto de vista de diversificar a funcionalidade estrutural-química, o que permite uma exploração do espaço químico-biológico de maneira mais ampla e efetiva. Esta vantagem tem sido explorada na utilização de vários derivados inorgânicos de Rutênio para

a descoberta de novos quimioterápicos, sendo que alguns deles encontram-se em fase de avaliação clínica como anticancerígenos.⁹² Outros, ainda, estão sob investigação com respeito ao controle da pressão arterial.⁹³

Um exemplo da potencialidade destas estruturas reside no trabalho realizado por Meggers e colaboradores. Ao produto natural staurosporina, potente inibidor de várias quinases, foi introduzido um fragmento bioinorgânico de Rutênio (Figura 23), o qual permite uma maior variação estrutural da molécula através da substituição dos grupos coordenados ao metal para otimizar as interações enzima-inibidor. Isto resultou na descoberta de inibidores na faixa de nanomolar e até mesmo picomolar.⁹²

Figura 23. Otimização da staurosporina. **a)** estrutura da staurosporina; **b)** estrutura do enantiômero organometálico R, DW1; **c)** sobreposição da estrutura cristalográfica da proteína quinase Pim-1 co-cristalizada com a staurosporina (roxo, código *PDB* 1YHS) e da estrutura da Pim-1 com o inibidor organometálico cinza (código *PDB* 2BZI).⁹²

5 ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA

Dentre as diversas técnicas físico-químicas utilizadas no estudo das reações químicas, a espectrofotometria no ultravioleta encontra largo emprego no monitoramento de reações enzimáticas. Seu princípio baseia-se no fato de que uma grande variedade de biomoléculas absorve luz em comprimentos de onda característicos e esta propriedade físico-química pode ser utilizada para identificar moléculas assim como para medir sua concentração em solução (Figura 24).³¹

Figura 24. Esquema geral de funcionamento de um espectrofotômetro. O monocromador seleciona um comprimento de onda específico, enquanto o detector realiza a medida da absorção da luz. A quantidade luz monocromática absorvida pela substância presente na amostra é proporcional à concentração da amostra em solução.³¹

A fração da luz incidente absorvida por uma solução a um determinado comprimento de onda está relacionada à extensão percorrida pela luz assim como à concentração das espécies absorventes. Esse fenômeno é descrito pela lei de Lambert-Beer, a qual demonstra que a absorvância (A) é diretamente proporcional ao coeficiente de extinção molar (ϵ) multiplicado pelo comprimento do caminho ótico (l) e pela concentração da substância na solução a ser analisada (c) (Equação 7).⁷⁷

$$A = \epsilon lc \quad (7)$$

Na Equação 7, a variável ε tem as dimensões $M^{-1}.cm^{-1}$ e possui valores característicos para cada substância em um comprimento de onda específico, enquanto l tem a dimensão cm e c tem a dimensão M.⁷⁷

6 OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

Fundamentalmente, os objetivos desta tese foram:

- i) Desenvolver e padronizar novos ensaios enzimáticos, utilizando a metodologia de espectrofotometria no ultravioleta para a monitoração da reação catalisada pela GAPDH de *T. cruzi*;
- ii) Realizar a triagem bioquímica de diversas coleções de compostos provenientes de síntese química e de produtos naturais;
- iii) Determinar a potência biológica (IC_{50}) de alguns inibidores identificados nas etapas iniciais;
- iv) Determinar o mecanismo de ação de distintas séries de inibidores, identificando importantes aspectos estruturais relacionados à potência e seletividade;
- v) Realizar estudos das relações entre a estrutura e a atividade (SAR);
- vi) Realizar o ensaio virtual de uma extensa base de dados a partir da estrutura cristalográfica da GAPDH de *T. cruzi* com os programas computacionais FlexX e GOLD;
- vii) Adquirir comercialmente as moléculas selecionadas a partir do ensaio virtual e conduzir o ensaio enzimático frente à GAPDH de *T. cruzi*;
- viii) Determinar a constante cinética de inibição, assim como o mecanismo de inibição dos ligantes provenientes do estudo *in silico*.
- ix) Construir conjuntos padrões de dados, estabelecendo-se novas perspectivas racionais para o desenvolvimento de novos inibidores potentes e seletivos da GAPDH de *T. cruzi*;

7 PARTE EXPERIMENTAL – MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 ESPECTROFOTÔMETRO

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos em dois espectrofotômetros UV-Visível: (i) SHIMADZU®, modelo UV-1650PC com controlador de temperatura e (ii) VARIAN®, modelo Cary 100, com controlador de temperatura do tipo Peltier. Em ambos os aparelhos foram utilizadas soluções padrões de igual concentração de NADH e T-NADH para fins de comparação do sinal observado, sendo possível estabelecer que ambos os aparelhos possuíam a mesma intensidade de sinal para uma mesma concentração do cofator.

7.2 REAGENTES

Todos os reagentes empregados nesta tese de doutoramento foram de grau analítico e utilizados nas seguintes etapas:

- i) Desenvolvimento dos novos métodos espectrofotométrico de análise (MÉTODOS 1 e 2);
- ii) Estudo comparativo do MÉTODO 1 com outros métodos de ensaio enzimático utilizando a GAPDH de *T. cruzi*, reportados na literatura;
- iii) Determinação das constantes cinéticas (K_M) para o cofator e substrato com a GAPDH de *T. cruzi* e a GAPDH humana;

- iv) Determinação da potência biológica (IC_{50}) dos inibidores da GAPDH de *T. cruzi* identificados;
- v) Determinação da constante de inibição (K_i) das moléculas mais promissoras pertencentes a diferentes classes químicas;
- vi) Determinação do mecanismo de inibição enzimática da GAPDH de *T. cruzi* para alguns inibidores identificados de diferentes classes químicas.

Os reagentes utilizados na composição do meio reacional dos métodos desenvolvidos foram:

- i) Solução tampão (meio reacional), composta de trietanolamina-HCl (TEA-HCl) Merck®, sal dissódico diidratado do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) GibcoBRL® e 2-mercaptoetanol (β -mercaptoetanol) Pierce Chemical Company®, a qual foi mantida a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante as análises.
- ii) Solução tampão (meio reacional), composta de tris-hidroximetilaminometano-HCl (Tris-HCl) Merck®, sal dissódico diidratado do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) GibcoBRL® e 2-mercaptoetanol (β -mercaptoetanol) Pierce Chemical Company®, a qual foi mantida a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante as análises.
- iii) Dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma®;
- iv) β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) Sigma®;
- v) Tionicotinamida adenina dinucleotídeo (T- NAD^+) Sigma®;
- vi) Solução de mistura racêmica de DL-gliceraldeído-3-fosfato (DL-G3P) Sigma® para determinação de K_M ;
- vii) Sal monobásico de dietilacetato de DL-gliceraldeído-3-fosfato Sigma® utilizado nos ensaios cinéticos. O DL-G3P na forma livre (deacetilado) é

obtido a partir de procedimento pré-estabelecido utilizando resina de troca catiônica DOWEX 50WX4-200R Sigma® com rendimento aproximado de 95%. A solução resultante (10 mM) é estocada a -20 °C e utilizada nos ensaios de triagem, determinação do valor de IC_{50} e K_i .

- viii) Arseniato de sódio (Na_2HAsO_4).
- ix) Ditioneitol (DTT);
- x) Azida sódica (NaN_3);
- xi) Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$);
- xii) Monoidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4);
- xiii) Cloreto de potássio (KCl);
- xiv) GAPDH recombinante de *T. cruzi*, obtida através de ensaio de expressão e purificação desenvolvido no CBME.⁵ Para o ensaio com NAD^+ (MÉTODO 1) foi utilizada uma concentração de 15 nM e, para o ensaio com T- NAD^+ (MÉTODO 2), 30 nM.
- xv) GAPDH de eritrócitos humanos (EC 1.2.1.12) Sigma®;

7.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA GAPDH DE *T. cruzi*

O laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do IFSC/CBME/USP é reconhecido como um centro de excelência em expressão, purificação e cristalografia de macromoléculas, possuindo toda a infra-estrutura necessária para obtenção da proteína-alvo deste projeto com ótima atividade e estabilidade, propriedades fundamentais para os ensaios enzimáticos. O processo de produção da proteína recombinante GAPDH de *T. cruzi* é bem estabelecido,

sendo possível obter quantidades apropriadas para os ensaios biológicos propostos neste projeto, seguindo-se procedimentos anteriormente publicados.⁵

Brevemente, a GAPDH recombinante de *T. cruzi* foi expressa após incubação em uma cultura de *E. coli* de acordo com condições específicas. As células foram lisadas e centrifugadas, sendo o sobrenadante purificado por cromatografia com coluna hidrofóbica e troca catiônica. A enzima pura foi estocada na concentração de 9 mg/mL.

7.4 ORIGEM DOS COMPOSTOS INIBIDORES

Os compostos inibidores provenientes de isolamento de extratos vegetais e síntese planejada foram disponibilizados com pureza igual ou superior a 90% para os ensaios biológicos, através dos seguintes grupos colaboradores:

- i) Prof. Dr. Marcus Mandolesi Sá – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC);
- ii) Profa. Dra. Arlene Gonçalves Correa, Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e Prof. Dr. Paulo César Vieira – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar);
- iii) Dr. Jean Jerley – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo (USP);
- iv) Prof. Dr. Nilo Zanatta, Prof. Dr. Hélio G. Bonacorso, Prof. Dr. Marcos A. P. Martins e Profa. Dra. Mara E. F. Braibante – Departamento de Química – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM);

- v) Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo;
- vi) Profa. Dra. Maria Goretti de Vasconcelos Silva – Universidade Federal do Ceará.

7.4.1 Derivados do Ácido Anacárdico

Alguns derivados desta classe foram estudados anteriormente, sendo identificados inibidores de moderada potência. No entanto, não haviam sido determinados a constante de afinidade e o mecanismo pelo qual estes inibidores atuam.

7.4.2 Derivados Flavonóides

Estudos conduzidos no laboratório do CBME evidenciaram a ação inibitória de alguns derivados desta classe frente à GAPDH de *T. cruzi*. Assim, novos derivados foram solicitados para estudo, devido à ampla atividade biológica apresentada por estes compostos e à facilidade de obtenção e de modificações estruturais.

7.4.3 Derivados Diidropirazólicos

A disponibilidade sintética destes derivados e a obtenção em quantidades apreciadas são fatores que contribuíram para o estudo destes compostos neste trabalho, além das excelentes características físico-químicas que esta classe de compostos apresenta e que foram relatadas anteriormente.

7.4.4 Complexos Orgânicos de Rutênio

Os complexos orgânicos de Rutênio apresentam certas características que os tornam adequados para o estudo biológico, em particular, a GAPDH de *T. cruzi*. Estas incluem: i) estabilidade em condições fisiológicas (37 °C e pH 7,2); ii) baixa toxicidade; iii) hidrossolubilidade; iv) potenciais acessíveis a redutores biológicos.⁹⁴ Estudos recentes, além disso, demonstraram que complexos de rutênio com grupos doadores de NO apresentam excelente atividade tripanocida e tripanostática contra as diferentes formas do *T. cruzi*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.⁹⁵

7.5 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Os métodos de análise foram desenvolvidos e padronizados baseando-se no monitoramento da reação de redução de NAD⁺ a NADH em $\lambda = 340$ nm ($\epsilon = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)⁷⁰ (MÉTODO 1) ou de T-NAD⁺ a T-NADH em $\lambda = 400$ nm ($\epsilon = 11,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)⁹⁵ (MÉTODO 2). O tempo de análise foi de 8 minutos.

Este tempo oferece a vantagem da utilização desta metodologia em análises automatizadas e na identificação de compostos que podem apresentar mecanismo de inibição tempo-dependente. Todas as medidas foram realizadas a 25 °C.

Para a realização dos ensaios enzimáticos com os derivados do ácido anacárdico e dos nucleosídeos triacilados foi utilizado o MÉTODO 1, enquanto que o MÉTODO 2 foi aplicado no estudo com os derivados flavonóides, compostos diidropirazólicos e complexos orgânicos de Rutênio.

7.6 SOLVENTES ORGÂNICOS

A influência de solventes orgânicos como o dimetilsulfóxido (DMSO) e o metanol (MeOH) adicionados ao meio reacional, sobre a atividade enzimática da GAPDH, foi determinada através da adição de um volume de solvente definido, em termos de porcentagem do mesmo em relação ao volume do meio reacional. As concentrações dos demais componentes permaneceram constantes enquanto a concentração do solvente foi variou entre 0 e 40% em relação ao volume total da cubeta de reação.

7.7 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_M)

Para o desenvolvimento dos métodos de análise 1 e 2 foi determinada, inicialmente, a constante de Michaelis-Menten (K_M) da GAPDH de *T. cruzi* para os cofatores NAD^+ e T- NAD^+ e para o substrato D-G3P. Tanto os cofatores quanto o substrato foram considerados como substratos distintos para a realização dos experimentos. Os procedimentos adotados foram:

- i) MÉTODO 1: a concentração do cofator NAD^+ foi mantida constante (condição de saturação, a 2.000 μM), enquanto a concentração do substrato G3P foi variada nas sucessivas análises (entre 25 e 1.200 μM). Após, foi realizado outro experimento semelhante, porém a uma condição de saturação do G3P (2.000 μM) e variando-se a concentração do cofator NAD^+ entre 25 e 1.200 μM ;
- ii) MÉTODO 2: a concentração do cofator T- NAD^+ foi mantida constante (2.000 μM), enquanto a concentração do substrato G3P permaneceu entre 1500 e 25 μM . Para a determinação do K_M do T- NAD^+ , a concentração do G3P foi mantida em 2.000 μM , enquanto a concentração do T- NAD^+ variou entre 1.500 e 25 μM ;

O desenvolvimento de outros dois métodos analíticos, desta vez utilizando a GAPDH humana foi realizado seguindo procedimentos semelhantes à determinação do K_M para o cofator e o substrato da GAPDH de *T. cruzi*, porém, com as seguintes condições distintas de meio reacional:

- i) Utilizando apenas o cofator NAD^+ em solução-tampão trietanolamina, pH 7,5;
- ii) Utilizando apenas o cofator NAD^+ em solução-tampão Tris-HCl, pH 8,6.

Os demais componentes permaneceram nas concentrações já estabelecidas para os métodos 1 e 2.

Os dados experimentais coletados nestes experimentos foram analisados com o módulo de cinética enzimática disponível no programa SIGMAPLOT e os valores de K_M determinados através de análise de regressão não-linear de melhor ajuste.

7.8 ENSAIOS BIOQUÍMICOS COM A ENZIMA GAPDH

O processo de triagem bioquímica *in vitro* é de grande valor para a identificação de inibidores de enzimas-alvo em programas de planejamento de fármacos. Compostos promissores podem ser selecionados para posterior determinação de potência e afinidade.

No processo de triagem de substâncias químicas, um teste de inibição em dose (para mistura de substâncias) ou concentração única (compostos puros) é geralmente empregado na avaliação inicial. Compostos puros ou misturas que apresentam inibição maior do que 30% podem ser selecionados para novas avaliações e encaminhados para ensaios de determinação de potência. Em nossos estudos, a concentração única de 200 μM foi empregada nas triagens iniciais, sendo selecionados os compostos que apresentaram inibição substancial (> 30%). Para a determinação da potência através de valores de IC_{50} , que corresponde à concentração de inibidor necessária para reduzir em 50% a atividade enzimática, foram utilizadas cinco ou seis concentrações de inibidor, capazes de reduzir a atividade enzimática entre 15 e 85%. Todas as medidas

foram realizadas em triplicata a 25 °C. Em todos os testes de inibição, utilizou-se como controle negativo a mistura reacional acrescida de 10% de DMSO, e como controle positivo uma solução 200 µM de uma amostra denominada de inibidor padrão (uma cumarina sintética com IC₅₀ de 64 µM).

A concentração de enzima utilizada na cubeta de reação pode sofrer pequena variação, de acordo com a pureza da preparação do lote de enzima obtida. Utiliza-se, geralmente, uma concentração de 15 nM para os ensaios com NAD⁺ e 30 nM para os ensaios com T-NAD⁺. Os resultados da análise são obtidos pela diferença de absorbância entre os tempos 3 e 6 minutos, o qual reflete indiretamente a atividade enzimática no ensaio em estudo.

O percentual de inibição é calculado através da Equação 8.

$$I = 1 - [(a / b) \times 100] \quad 8$$

Neste caso *a* representa a medida da atividade enzimática na presença do composto amostra e *b* corresponde à medida da atividade enzimática verificada em uma análise sem a introdução do composto. A determinação é sempre feita em duplicata ou triplicata.

As condições experimentais estão descritas na Tabela 5:

Tabela 5. Composição do meio reacional dos métodos de ensaio enzimático da GAPDH de *T. cruzi*.

METODOLOGIA 1	METODOLOGIA 2
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tampão TEA-HCl 100 mM ➤ EDTA dissódico 1 mM; ➤ β-mercaptoetanol 1 mM; ➤ Dimetilsulfóxido 1,4 mM; ➤ Arseniato de sódio 30 mM; <ul style="list-style-type: none"> ➤ NAD⁺ 400 μM; ➤ DL-G3P 600 μM; ➤ Enzima 15 nM; ➤ pH 7,5 ➤ Temperatura 25 °C; ➤ Tempo de análise: 8 minutos ➤ $\lambda = 340$ nM 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tampão TEA-HCl 100 mM; ➤ EDTA dissódico 1 mM; ➤ β-mercaptoetanol 1 mM; ➤ Dimetilsulfóxido 1,4 mM; ➤ Arseniato de sódio 30 mM; <ul style="list-style-type: none"> ➤ Tio-NAD⁺ 250 μM; ➤ DL-G3P 800 μM; ➤ Enzima 30 nM; ➤ pH 7,5 ➤ Temperatura 25 °C; ➤ Tempo de análise: 8 minutos ➤ $\lambda = 400$ nM

O volume final na cubeta foi mantido em 1.000 μ L e a reação ocorreu sob agitação com barra magnética.

7.8.1 Comparação do MÉTODO 1 com Outros Métodos da Literatura

O MÉTODO 1 foi comparado com outras duas metodologias de análise espectrofotométrica descritas na literatura:

- i) Metodologia A⁹⁶ – Tampão TEA-HCl 100 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM a pH 7,5, DMSO 5% V/V*, NAD⁺ 200 µM, G3P 800 µM, K₂HPO₄ 10 mM, MgSO₄ 5 mM, NaN₃ 1 mM, enzima 5 nM. Temperatura de 25 °C;
- ii) Metodologia B⁹⁷ – Tampão TEA-HCl 100 mM. EDTA 1 mM e DTT 1 mM a pH 7,5, DMSO 5% V/V*, NAD⁺ 400 µM, G3P 800 µM, K₂HPO₄ 10 mM, KCl 100 mM, enzima 5 nM. Temperatura de 25 °C;

* relação volume/volume (V/V), 5% equivale a um volume de 25 µL em 500 µL; 10% equivale a 50 µL em 500 µL.

7.9 INIBIÇÃO PROMÍSCUA

Os compostos inibidores identificados nesta etapa inicial foram submetidos aos experimentos para avaliação de possível inibição promíscua. A avaliação da inibição promíscua foi realizada através da adição de 5 µL de uma solução de Triton X-100 (1%) à mistura reacional (concentração final de 0,01% v/v). Esta metodologia teve a finalidade de comprovar a consistência dos dados obtidos, verificando a presença de possíveis inibidores que apresentam interação inespecífica e evitar, assim, a seleção de falsos ligantes.⁹⁸

Três estratégias distintas foram empregadas para a avaliação de inibição promíscua: i) análise dos compostos sem adição de Triton X-100; ii) análise direta dos compostos adicionados ao meio reacional contendo Triton X-100; iii) análise após incubação da enzima no meio reacional contendo Triton X-100, durante intervalos de tempo diferentes, em 5 e 10 minutos.

7.10 DETERMINAÇÃO DA IC₅₀

Experimentos de IC₅₀ foram planejados e conduzidos com os inibidores identificados nas análises iniciais para medir a eficiência da inibição. Cada análise foi realizada de modo a selecionar concentrações com inibição entre 15 e 85% da atividade catalítica máxima (na ausência de um inibidor).²⁹ Os inibidores foram analisados em concentrações preparadas através de diluição seriada de uma solução estoque de DMSO para cada composto (Figura 25). Os dados de IC₅₀ proveniente de cinco pontos de titulação foram obtidos a partir do cálculo com os valores obtidos experimentalmente, através do programa GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc. USA) por meio de uma análise de regressão não linear da curva de concentração-resposta.

Figura 25. Gráfico da concentração de inibidor *versus* atividade catalítica da GAPDH de *T. cruzi*, obtido em um experimento para a determinação da IC₅₀. Quanto maior a concentração do composto no meio reacional, maior é o efeito inibitório sobre a atividade catalítica da GAPDH e, como consequência, menos inclinada será a curva.

7.11 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE CINÉTICA DE INIBIÇÃO (K_i) E DO MECANISMO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DA GAPDH DE *T. cruzi*

Para a análise do mecanismo de inibição de alguns inibidores identificados, foram conduzidos ensaios para a determinação de K_i (constante de inibição), através da avaliação quantitativa da cinética de estado estacionário.²⁹ O mix utilizado para a reação continha: 5 mL de uma solução de tampão trietanolamina/HCl, pH 7,5 contendo EDTA, 2-marcaptoetanol, arseniato de sódio, inibidor em estudo em concentração previamente definida, D-G3P e GAPDH (15 nM ou 30 nM, conforme o método). O cofator $\text{NAD}^+/\text{T-NAD}^+$ foi acrescido primeiramente às 6 cubetas, em um volume suficiente para atingir as concentrações respectivas de 200, 400, 600, 1200, 1600 e 2000 μM . Após esta etapa, o mix de reação foi adicionado às cubetas sob agitação e a reação monitorada a 340/400 nm, de acordo com o método de análise, durante o tempo de 8 minutos.

As derivadas das curvas entre 3 e 6 minutos foram tomadas como base para obter o resultado dos experimentos. Os gráficos do duplo-recíproco de Lineweaver-Burk ($1/v$ vs $1/[S]$)³¹ foram gerados e o valor de K_i para cada inibidor foi determinado usando o software SigmaPlot (Systat Software, Inc. USA).

7.12 TRIAGEM *IN SILICO*

Neste estudo, foi conduzido o ensaio virtual baseado na estrutura do receptor. Para isto foram utilizados:

- i) A estrutura cristalográfica da GAPDH (EC 1.2.1.12), depositada no PDB (*Protein Data Bank*) com o código 1QXS, contendo co-cristalizadas as moléculas de NAD^+ e de ácido [3(*R*)-hidroxi-2-oxo-4-fosfonoxibutil]fosfônico;
- ii) Base de dados virtual de compostos das companhias SIGMA e MAYBRIDGE, disponível no site <http://zinc.docking.org>;
- iii) Os programas computacionais GOLD, com as funções de pontuação GoldScore e ChemScore, e o FLEXX com a função de pontuação FlexX, para implementação da docagem molecular e posterior pontuação por consenso.

7.12.1 Preparação da Base de Dados

Uma filtragem prévia baseada em propriedades físico-químicas foi aplicada com o intuito de ampliar a taxa de sucesso durante o procedimento de VS. Assim, o número de ligantes inicial de cerca de 100 mil na base de dados foi reduzido para aproximadamente 25 mil, de acordo com as seguintes características:

- i) Massa molar: 350-500 u.m.a.;
- ii) Número máximo de grupos doadores de ligação hidrogênio: 5;

- iii) Número máximo de grupos aceptores de ligação hidrogênio: 5;
- iv) Log P: 0-4;
- v) Tipos de átomos presentes nas moléculas: C, O, H, N, S, P, F, Cl, Br.

Adicionalmente, checagens estruturais dos compostos selecionados da base de dados também foram efetuadas. Estas incluíram: i) geração de estruturas 3D para a identificação de centros quirais; ii) geração de tautômeros, uma vez que o equilíbrio tautomérico pode ocorrer no pH do ensaio experimental e os tautômeros podem apresentar diferentes afinidades pelo sítio enzimático; iii) assinalamento de cargas parciais, neste caso foi utilizada a de Gasteiger-Hückel; iv) checagem de ionização.

Este procedimento forneceu uma nova base de dados, que foi a utilizada no ensaio virtual, contendo cerca de 25.000 compostos.

7.12.2 Preparação do Sítio de Docagem

Uma checagem prévia da estrutura cristalográfica sempre é necessária no procedimento de VS para adequar a estrutura para a docagem molecular. Neste caso foi realizado o procedimento de adição de hidrogênios à estrutura, direcionando estas ligações de modo a otimizar as interações possíveis nos resíduos selecionados. Em seguida, foram adicionadas as cargas, efetuada a checagem de ionizações e selecionado o tautômero da His194, resíduo envolvido na catálise. Além disso, também foram verificados os conformeros dos resíduos His194 e Cys166, de modo a otimizar a interação entre os dois. Todo este

procedimento foi conduzido com o programa Biopolymer[®], pertencente ao mesmo pacote computacional do FlexX.

A GAPDH de *T. cruzi* possui um sítio para ligação com o substrato (G3P) e outro para o cofator (NAD⁺), como demonstrado na estrutura cristalográfica com os ligantes NAD⁺ e HOP co-cristalizados (Figura 26). A visualização das interações observadas entre a molécula do cofator NAD⁺ e a GAPDH de *T. cruzi* na estrutura cristalográfica 1QXS, através do programa PyMol[®], permitiu a seleção do ponto com as coordenadas X=28.887, Y=-13.620, Z=22.915, a partir do qual foi definido um raio de abrangência de 10 Å a ser considerado no processo de docagem com o programa GOLD. A preparação desta região de docagem envolveu a remoção das moléculas do cofator NAD⁺ e do análogo HOP do arquivo da estrutura cristalográfica 1QXS para o programa GOLD. Para o FlexX, as moléculas do cofator e do análogo co-cristalizadas foram mantidas. Isto é devido ao modo operacional deste programa, que necessita da presença da moléculas co-cristalizadas para a seleção dos resíduos do sítio a ser considerado. Foram considerados os aminoácidos presentes dentro um raio de 5,7 Å a partir da molécula do cofator para considerar um sítio de docagem praticamente idêntico ao selecionado no GOLD.

Figura 26. Mapa de potencial eletrostático da região selecionada para o processo de docagem molecular utilizando a estrutura cristalográfica 1QXS da GAPDH de *T. cruzi*. NAD^+ em cor magenta, e HOP em cor ciano. Vermelho = sítios eletronegativos; azul = sítios eletropositivos; Branco = ausência de cargas; amarelo = sítios com átomo de enxofre. Em destaque o átomo de P, a partir do qual foram utilizadas as coordenadas para o processo de docagem pelo programa GOLD.

7.12.3 Processo de Docagem Molecular

A partir deste procedimento computacional, foram identificados e selecionados 400 moléculas a partir do ensaio virtual com o programa GOLD, contando com duas funções de pontuação, GoldScore e ChemScore e 200 moléculas através do programa FlexX, com a função de pontuação FlexX. Posteriormente, estes dados foram submetidos a um processo de consenso, resultando na identificação e seleção de 50 compostos. Ainda assim, uma avaliação mais acurada através de uma análise geométrica e de complementaridade forneceu a seleção de 9 compostos (Figura 27).

Figura 27. Esquema ilustrativo do procedimento de ensaio virtual realizado para identificar novos compostos para o ensaio enzimático da GAPDH de *T. cruzi*.⁶¹

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 MÉTODOS DESENVOLVIDOS

Inicialmente, apenas o MÉTODO 1 havia sido desenvolvido e padronizado. Como diversos compostos não puderam ser analisados, devido à elevada absorção observada em $\lambda = 340$ nm, surgiu a necessidade do desenvolvimento de um método alternativo de análise (MÉTODO 2). Com a disponibilidade de análise em diferentes comprimentos de onda, foi ampliado significativamente o número de compostos avaliados.

8.1.1 Método 1

Foi observado que o MÉTODO 1 possui um comportamento cinético de velocidade inicial melhor que os descritos na literatura, ou seja, o gráfico de medida da atividade catalítica da GAPDH apresenta uma curva cinética próxima da linearidade (Figura 28). A relação de concentração entre substrato (ou cofator) e enzima, é da ordem de 10^3 unidades (condições saturantes). Como a inclinação da curva entre 30 e 60 segundos permaneceu praticamente invariável, os ensaios enzimáticos nas etapas iniciais puderam ser realizados durante o tempo de 30 segundos. A diminuição da concentração da enzima de 25 nM para 15 nM,

posteriormente permitiu um aumento do tempo de análise para 8 minutos (Figura 29).

Figura 28. Gráfico da comparação entre os ensaios enzimáticos descritos na literatura (metodologia A e B, curva amarela e vermelha, respectivamente) e o MÉTODO 1 (curva azul) desenvolvida no CBME. O aumento na absorvância é proporcional ao aumento da concentração de NADH em solução.

Figura 29. Monitoramento da reação enzimática da GAPDH de *T. cruzi* em diferentes concentrações de cofator (T-NAD⁺) e substrato (G3P), durante 10 minutos. As retas contínuas sobrepostas servem de comparativo para observação da linearidade do método, respeitando-se as condições de estado estacionário.

8.1.2 Método de Ensaio Enzimático Antigo

O ensaio enzimático utilizado anteriormente no laboratório do CBME consistia de um meio reacional com tampão Tris-HCl, pH 8,6.⁵ Nestes novos métodos de ensaio, a influência que o pH do meio biológico exerce sobre o inibidor é considerada. Diante disso, o pH do meio reacional foi modificado para 7,5. Além disso, outro motivo que justificou a alteração nas condições de ensaio é com relação ao tampão Tris-HCl. Pelo fato deste possuir um grupo amina livre e o substrato (D-G3P), um grupo aldeído (Figura 30), interferências nas análises podem ocorrer devido a reações paralelas. Esta condição foi contornada com a substituição da solução tampão Tris-HCl por trietanolamina (amina terciária) na composição do tampão de análise.

Figura 30. Estrutura química de componentes utilizados no ensaio enzimático. Em destaque, os grupamentos reativos dos componentes presentes no meio reacional.

Os métodos da literatura sugerem a utilização de fosfato de sódio (Pi) no meio reacional. No entanto, a substituição deste por arseniato de sódio (Na₂HAsO₄), como descrito em Souza (1998)⁵ permite eliminar as variações observadas durante o procedimento operacional, melhorando a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados obtidos em ambos os métodos. Este componente atua deslocando o equilíbrio da reação em direção aos produtos.⁵

8.1.3 Influência do solvente

Solventes orgânicos são amplamente empregados em ensaios cinéticos para a solubilização dos compostos investigados. Entretanto, como as proteínas são biomoléculas sensíveis à presença de solventes, fez-se necessário avaliar previamente a concentração máxima de solvente permitida no meio reacional. Diante disso, foi avaliada a atividade enzimática da GAPDH na presença dos solventes comumente utilizados nos ensaios cinéticos (DMSO e metanol).

Inicialmente, foi monitorada a atividade da enzima sem nenhum acréscimo de solvente. Posteriormente, realizou-se a medida da atividade enzimática correspondente às diferentes concentrações de solvente (Figura 31).

Figura 31. Influência dos solventes orgânicos MeOH (a) e DMSO (b) a diferentes concentrações sobre a atividade enzimática da GAPDH de *T. cruzi*.

Observa-se, a partir dos dados demonstrados na Figura 33, que o DMSO apresenta diminui a atividade enzimática a partir de 25%. Essa queda na atividade pode estar relacionada ao desenovelamento parcial da estrutura terciária da proteína. As variações observadas com o metanol, em quantidades acima de 30% foram principalmente devido à formação de bolhas no meio reacional. A partir deste experimento, foi possível estabelecer que concentrações

entre 10 e 20% de cada solvente não exercem efeitos significativos sobre a atividade enzimática, estabelecendo assim os limites para a solubilização dos compostos para análise em solventes orgânicos. Os resultados obtidos foram consistentes e o erro associado às medidas foi de 3%.

8.2 INTERAÇÕES INESPECÍFICAS (INIBIÇÃO PROMÍSCUA)

Compostos orgânicos são capazes de formar agregados macromoleculares e adsorver as proteínas livres em solução, neste caso, fazendo com que a quantidade de enzima livre disponível para catálise seja reduzida no meio de reação. Este fenômeno de interação não específica entre as moléculas do ligante e da proteína fornece resultados falso-positivos, ou seja, devido à menor quantidade de proteína ativa no meio reacional verifica-se uma menor atividade enzimática, resultando em uma interpretação errônea do resultado obtido como sendo proveniente de uma inibição enzimática. Algumas moléculas orgânicas são conhecidas como inibidores promíscuos, devido ao fato de inibirem diversas enzimas através de interações não específicas.⁹⁸

Para se evitar este tipo de condição, diferentes concentrações do surfactante Triton X-100 - um conhecido agente antiagregante¹⁰⁰ - foram adicionadas ao meio reacional (Tabela 9). Nesta etapa, o objetivo foi avaliar a influência de concentrações crescentes de Triton X-100 sobre a atividade catalítica da GAPDH. O volume da solução tampão contendo TEA, 2-mercaptoetanol e EDTA foi reduzido em equivalência ao volume de solução de Triton X-100 adicionado de modo a manter-se a concentração final dos

componentes e o volume de reação. Os dados da Tabela 6 indicam que a concentração ótima de Triton X-100 para análise é de 0,01% V/V, uma vez que nesta concentração este surfactante não iônico não interfere na atividade enzimática da GAPDH.

Tabela 6. Comparação entre os resultados de atividade enzimática obtidos com diferentes concentrações de Triton X-100.

Concentração	Redução da Atividade Enzimática ²
Triton X-100 a 0,10% (V/V) ¹	18%
Triton X-100 a 0,05% (V/V)	8%
Triton X-100 a 0,01% (V/V)	0%

¹ – V/V – medida do volume da solução de Triton X-100 adicionado em relação ao volume do meio reacional.

² – em relação à medida da atividade enzimática sem a adição de Triton X-100. Média de três medidas cinéticas.

Para avaliar o real potencial deste método em identificar inibidores promíscuos, alguns inibidores previamente identificados e outros conhecidos como moléculas bioativas em diversos sistemas biológicos foram empregados nos ensaios com Triton X-100 (Tabela 7). Os dados indicam que o método foi capaz de identificar os inibidores que interagem com a enzima através de interações não específicas. Os resultados sugerem que a capacidade inibitória dos compostos **a**, **b** e **c** não é afetada pela presença do surfactante no meio reacional. Entretanto, uma diminuição significativa na capacidade inibitória dos compostos **d** e **e** foi observada quando adicionou-se 0.01% de surfactante ao meio reacional. Esses resultados indicam que esses os compostos inibem a enzima através de um mecanismo de inibição não-específica. Este procedimento apresenta grande utilidade na validação dos inibidores identificados nas análises preliminares.

Tabela 7. Avaliação da influência do Triton X-100 nas análises enzimáticas de inibidores identificados.

Compostos ^a	Inibição a 200 μ M (%) ^b
a	92 (ST) ^c
	90 (AD) ^d
	89 (IN5) ^e
	91 (IN10) ^f
b	100 (ST)
	100 (AD)
	100 (IN5)
	100 (IN10)
c	38 (ST)
	40 (AD)
	38 (IN5)
	39 (IN10)
d	47 (ST)
	40 (AD)
	8 (IN5)
	0 (IN10)
e	40 (ST)
	38 (AD)
	2 (IN5)
	0 (IN10)

^a – com o intuito de avaliar somente a influência do solvente, são apresentadas apenas as estruturas dos compostos utilizados, sem numeração;

^b – média de duas medidas cinéticas;

^c ST – sem adição de Triton X-100;

^d AD – análise direta, com adição de Triton X-100;

^e IN5 – incubação durante 5 minutos, com Triton X-100;

^f IN10 – incubação durante 10 minutos, com Triton X-100.

8.3 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN

Tendo em vista a necessidade de avaliar a afinidade da GAPDH pelo substrato e cofator nos métodos desenvolvidos, foram realizados ensaios cinéticos para a determinação dos parâmetros cinéticos nas novas condições experimentais. As constantes cinéticas avaliadas foram: (i) K_M , constante de Michaelis-Menten, definida como a concentração de substrato responsável por metade da velocidade máxima de reação; e (ii) V_{max} , velocidade máxima de reação obtida em condições de saturação de substrato. As constantes cinéticas foram obtidas para o cofator e para o substrato sob condições de estado estacionário (do inglês, *steady state*). Além disso, foram determinados os valores de K_M para o substrato e cofator com a GAPDH de eritrócitos humanos. Esses resultados contribuem para futuros estudos de avaliação da seletividade dos inibidores da GAPDH de parasita (Tabela 8). Os dados experimentais coletados foram analisados com o módulo de cinética enzimática do programa SigmaPlot versão 7.0 e os parâmetros cinéticos calculados através de análise de regressão não-linear de melhor ajuste. As curvas obtidas no ensaio para a determinação da constante de Michaelis-Menten estão demonstradas na Figura 33.

Tabela 8. Comparação dos valores de K_M do cofator e do substrato obtidos para a GAPDH humana e de *T. cruzi*.

GAPDH	Humana		<i>T. cruzi</i> ^a		<i>T. cruzi</i> ^b	
Cofator/Substrato	NAD ⁺	D-G3P	NAD ⁺	D-G3P	T-NAD ⁺	D-G3P
K_M (μM)	65 ± 6	160 ± 14	250 ± 19	425 ± 35	140 ± 13	270 ± 15

A enzima GAPDH de *T. cruzi* segue a cinética de Michaelis-Menten, ou seja, em concentrações baixas de G3P e NAD⁺ ($[S] \ll K_M$) a velocidade de reação (v_0)

é diretamente proporcional às suas concentrações. Em concentrações altas de G3P e NAD^+ ($[\text{S}] \gg K_M$), v_0 se próxima do seu valor máximo, sendo independente de suas concentrações.

Figura 32. Determinação do valor de K_M para (a) G3P e (b) NAD^+ com a GAPDH de *T. cruzi*; (c) G3P e (d) Tio- NAD^+ com a GAPDH de *T. cruzi*; (e) G3P e (f) NAD^+ com a GAPDH de eritrócitos humanos utilizando tampão Tris-HCl em pH 8,6. Este último procedimento foi realizado para estudo de imobilização de enzimas.

8.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NOS MÉTODOS 1 E 2

Com o objetivo de avaliar a confiabilidade na comparação direta entre os resultados obtidos nas duas metodologias, inibidores identificados nos diferentes ensaios foram reavaliados.

Através da comparação dos dados apresentados na Tabela 9, verifica-se que os valores a capacidade inibitória dos compostos situam-se dentro do intervalo de erro associado às medidas, o que permite uma comparação direta entre os valores obtidos para um mesmo composto em ambas as condições. Estes resultados indicam a robustez de ambos os métodos de análise.

Tabela 9. Valores de inibição enzimática apresentada por compostos submetidos aos ensaios em ambos os métodos padronizadas no CBME.

Compostos ^a	Concentração (μM)	Inibição (%) ^b	
		MÉTODO 1	MÉTODO 2
200	91 ± 8	88 ± 4
200	15 ± 4	13 ± 3
200	67 ± 8	63 ± 5

^a - com o intuito de avaliar apenas a influência do solvente, são apresentadas apenas as estruturas dos compostos utilizados, e não seus códigos correspondentes;

^b - valores representativos de três medidas cinéticas.

8.5 CLASSES DE COMPOSTOS AVALIADAS FRENTE À ENZIMA GAPDH

Um número aproximado de 520 compostos foi avaliado durante esta tese de doutoramento. A estrutura geral representativa de cada uma das classes químicas dos compostos investigados que apresentaram atividade inibitória significativa frente a GAPDH de *T. cruzi* está apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Estrutura geral, classe química e origem de alguns compostos avaliados frente a GAPDH de *T. cruzi*.

Estrutura Geral	Classe química	Origem
cumarinas	Produto natural
flavonóides	Produto natural
nucleosídeos	Sintética
carboidratos	Produto natural
flavonas	Produto natural

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

Estrutura Geral	Classe química	Origem
diidropirazóis	Sintética
quinolinas	Sintética
tiouréias	Sintética
Ácidos anacárdicos	Produto natural e sintética
Complexos orgânicos de rutênio	Sintética

8.6 NUCLEOSÍDEOS TRIACILADOS

Uma investigação inicial do mecanismo catalítico da GAPDH resultou na síntese, através de química combinatorial, de vários análogos de nucleosídeos. O procedimento sintético foi realizado pela equipe do prof. Dr. Marcus Mandolesi Sá, da Universidade Federal de Santa Catarina. O esquema da síntese está demonstrado na Figura 33.

Figura 33. Esquema do procedimento de síntese dos análogos de nucleosídeos triacilados.

Deste conjunto de nucleosídeos triacilados, quatro compostos (Tabela 11) demonstraram inibição significativa da atividade catalítica da GAPDH de *T. cruzi* na triagem inicial. Devido à quantidade insuficiente de amostra, os parâmetros de IC_{50} e K_i não foram determinados, sendo apresentada somente a percentagem de inibição destes compostos frente à GAPDH de *T. cruzi* a uma concentração fixa de 200 μ M.

Tabela 11. Derivados de nucleosídeos que apresentaram atividade inibitória mais expressiva contra a GAPDH de *T. cruzi*.

Composto	R	Inibição (%)
1	Br	77 ± 7
2	Cl	75 ± 8
3	NO ₂	71 ± 3
4	F	16 ± 2

O estudo preliminar de relação estrutura-atividade (SAR) deste conjunto indica que a presença dos substituintes Br, Cl e NO₂ na posição *para* no anel benzênico é favorável para a inibição da atividade enzimática, enquanto uma fraca inibição é observada com o derivado que apresenta F nesta mesma posição. Estes dados sugerem que a presença de grupos volumosos retiradores de elétrons do anel aromático favorece uma interação mais eficiente com o sítio catalítico da GAPDH de *T. cruzi*.

8.7 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE DERIVADOS DE FLAVONÓIDES

Os resultados obtidos a partir da avaliação dos compostos flavonóides são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Derivados flavonóides submetidos aos ensaios enzimáticos de inibição da GAPDH de *T. cruzi*.

Composto	Estrutura	Inibição a 200 μ M (%)	IC ₅₀ (μ M)
5		90 $\pm$ 9	143 $\pm$ 13
6		93 $\pm$ 11	138 $\pm$ 15
7		42 $\pm$ 8	> 250
8		9	> 300
9		37 $\pm$ 4	246 $\pm$ 30

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

Composto	Estrutura	Inibição a 200 μ M (%)	IC ₅₀ (μ M)
10		16 $\pm$ 3	141 $\pm$ 18
11		92 $\pm$ 7	46 $\pm$ 8
12		-	> 300
13		-	> 300

A análise comparativa dos dados apresentados na Tabela 12 permite inferir que derivados da subclasse dos flavonóis (hidroxila na posição 3 do anel central) apresentam potência superior às flavonas (composto **7**). A metoxilação

da posição 3 (composto **6**) não interfere na potência, indicando a necessidade da presença de átomos aceptores de ligação hidrogênio nesta posição para a obtenção de derivados mais potentes. Por outro lado, a metoxilação dos grupamentos hidroxila nas posições 3, 7 e 4' (composto **8**) altera de forma desfavorável a potência destes derivados. A glicosilação da posição 3 modula significativamente a potência (compostos **9-11**) e, dependendo da estrutura do glicosídeo, a potência pode ser ampliada ou diminuída. Além disso, grupamentos glicosídicos muito volumosos também podem interferir de modo desfavorável, diminuindo a potência inibitória destes derivados (compostos **12** e **13**) frente à GAPDH de *T. cruzi*.

8.8 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE DERIVADOS DO ÁCIDO ANACÁRDICO

Vários derivados do ácido anacárdico, potente inibidor da GAPDH de *T. cruzi*, foram obtidos por meio de síntese planejada. Durante a avaliação destes compostos foi possível obter informações mais detalhadas a respeito da importância de determinadas modificações na estrutura química destes derivados, evidenciando de forma inequívoca a importância que os grupamentos ligados ao anel salicílico (Figura 34). exercem na inibição da atividade catalítica da GAPDH de *T. cruzi* (Tabela 13).

Figura 34. Esqueleto estrutural básico dos ácidos anacárdicos. R = cadeia carbônica homogênea de 15 carbonos, saturada ou insaturada.

Tabela 13. Derivados do ácido anacárdico obtidos através de síntese química planejada e seus respectivos dados de inibição da GAPDH de *T. cruzi*.

<div style="text-align: center;"> </div>				
Composto	R ₁	R ₂	R ₃	% inibição (24 μM) ^a
13	CO ₂ CH ₃	OH	C ₁₅ H ₃₁	32
14	CO ₂ CH ₃	CO ₂ CH ₃	C ₁₅ H ₃₁	0
15	OH	CO ₂ H	C ₁₂ H ₂₅	40
16		CO ₂ CH ₃	C ₁₅ H ₃₁	0
17		CO ₂ H	C ₁₅ H ₃₁	0
18	OH	CO ₂ H	C ₁₅ H ₃₁	90
19	OH	CO ₂ H	C ₁₅ H ₂₉	21
20	OH	CO ₂ H	C ₁₅ H ₂₇	59
21	OH	CO ₂ H	C ₁₅ H ₂₅	85
22	OH	CO ₂ H	C ₉ H ₁₉	0
23	H	H	H	0

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

Composto	R	% inibição % (24 μ M) ^a
24	H	0
25	Br	0
26	Cl	0
27	NO ₂	0
28	CH ₃	0
29	OCH ₃	0

Composto	R	% inibição % (24 μ M) ^a
30	H	0
31	Br	0
32	Cl	0
33	NO ₂	0

34		0
-----------	--	---

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

Composto	Estrutura	% inibição (24 μ M) ^a
35		0
36		0
37		0
38		0
39		0
Composto	R	% inibição (24 μ M) ^a
40	OH	0
41	CH ₃ COO	0

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

Composto	R	% inibição (24 μ M) ^a
42	H	0
43	CN	0
44	OCH ₃	0

Composto	R ₁	R ₂	% inibição (24 μ M) ^a
45	OCH ₃	OH	0
46	OCH ₃	OCH ₃ SO ₂	0
47	OH	CO ₂ CH ₃	0

Composto	R ₁	R ₂	% inibição (24 μ M) ^a
48	CH ₃		0

^a – a concentração menor que a usualmente utilizada é devido à solubilidade dos compostos testados.

Obs.: média de três medidas cinéticas; o erro associado aos valores foi $\leq 7\%$.

A partir dos dados apresentados na Tabela 13 verifica-se que, dentre os compostos estudados, os mais promissores foram aqueles que apresentam um

substituinte acetilado em **R₁** (**13**), ou uma cadeia lateral alquílica C₁₂ saturada (**15**) ou ainda com insaturações na cadeia lateral alquílica C₁₅ (**19**, **20**, **21**). Os demais derivados, que apresentam modificações na hidroxila e/ou no grupamento carboxílico resultam em compostos de baixa solubilidade no meio reacional de análise e, além disso, inativos. Verifica-se, portanto, que a integridade do anel salicílico, juntamente com a cadeia lateral alquílica saturada ou insaturada de 12 a 15 carbonos, localizada em posição *orto* em relação à carboxila constituem a estrutura básica para a geração de compostos inibidores da atividade catalítica da GAPDH de *T. cruzi* de moderada potência. Ainda, a diminuição do tamanho da cadeia alquílica saturada, de C₁₅ para C₁₂ e C₉ resulta na diminuição progressiva da capacidade de inibição destes congêneres (compostos **18**, **15** e **22** respectivamente). Por outro lado, a presença de uma insaturação na posição 8 da cadeia lateral alquílica C₁₅ (**19**) diminui o efeito inibitório observado em relação à mesma cadeia alquílica saturada (**18**). Entretanto, com a introdução de uma insaturação nas posições 11 e 14 desta cadeia (**20** e **21**, respectivamente), a potência é praticamente restabelecida, demonstrando a importância que o tamanho e a presença de insaturações na cadeia lateral exercem na modulação da potência destes derivados. A introdução destas duplas ligações pode contribuir significativamente na busca por novos derivados mais potentes e com características físico-químicas e estereoquímicas mais desejáveis. O resultado do estudo para a determinação da potência dos derivados mais potentes deste conjunto está evidenciado na Tabela 14.

Tabela 14. Estrutura dos derivados mais potentes de ácido anacárdico identificados em ensaios preliminares e seus respectivos valores de IC_{50} .

Composto	ESTRUTURA	IC_{50} (μM)
15		55 ± 6
18		28 ± 4
19		162 ± 20
20		69 ± 10
21		39 ± 4
22		> 150

Posteriormente, estudos de determinação da constante de afinidade enzima-substrato foram conduzidos para a determinação do mecanismo de inibição em relação ao substrato G3P e ao cofator NAD^+ . Os dados para os inibidores mais potentes estão demonstrados no gráfico de Lineweaver-Burk ou do duplo-recíproco (Figura 35).

a

b

Figura 35. Gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para: **a)** composto **18**; **b)** seu derivado saturado C_{12} (**15**).

A análise gráfica do estudo de mecanismo de inibição (Figura 34) indica que o intercepto entre as linhas encontra-se no quadrante superior esquerdo para o cofator NAD^+ , sugerindo que os inibidores desta série inibem a GAPDH

através do mecanismo de inibição não competitiva.²⁹ Neste caso, os inibidores apresentam afinidade tanto pela enzima livre como pelo complexo enzima-substrato. Assim, a constante de inibição foi determinada tanto para o complexo binário enzima-inibidor (K_i) quanto para o complexo ternário enzima-substrato-inibidor (αK_i) (Tabela 15).

Tabela 15. Estrutura dos compostos submetidos ao estudo mecanístico e seus respectivos valores de K_i e αK_i frente à GAPDH de *T. cruzi*.

Composto	Estrutura Química	K_i	
		K_{ic} (μM) ^a	K_{iinc} (μM) ^b
26		5 ± 2	43 ± 5
29		4 ± 1	6 ± 2

^a – competitivo

^b – incompetitivo

Os grupos hidroxila e carboxila, ligados ao anel benzênico, apresentam fundamental importância para a acentuada inibição da atividade enzimática da GAPDH de *T. cruzi* observada nos derivados de ácido anacárdico. O aumento do tamanho da cadeia alquílica também influencia diretamente este parâmetro.

8.9 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE DERIVADOS DIIDROPIRAZÓLICOS

Um amplo conjunto de compostos orgânicos sintéticos contendo o anel 4,5-diidropirazol na estrutura básica (Tabela 15) foi sintetizado e posteriormente submetido às avaliações bioquímicas frente à GAPDH de *T. cruzi*.

Tabela 16. Valores de IC₅₀ dos derivados pirazólicos submetidos aos ensaios de inibição enzimática frente à enzima GAPDH de *T. cruzi*.

<div style="text-align: center;"> </div>				
Composto	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM)
49	CF ₃	CCl ₃	H	> 600
50	CF ₃	CCl ₃	CH ₂ Br	> 600
51	CF ₃	CCl ₃	CH ₂ SCN	53 ± 5
52	CF ₃	CCl ₃		> 600
53	CCl ₃	CCl ₃	H	488 ± 23
54	CCl ₃	CCl ₃	CHBr ₂	> 600
55	CCl ₃	CCl ₃	CH ₃	> 600
56	CCl ₃	CCl ₃		> 600
57	CF ₃	CF ₃	H	> 600
				CONTINUA

CONTINUAÇÃO

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM)
58	CF ₃	CF ₃		I
59	CCl ₃	CF ₃	CH ₂ Br	> 600
60	CCl ₃	CF ₃	CHBr ₂	I
61	CCl ₃	CF ₃		I

Composto	R	IC ₅₀ (μM)
62	H	147 ± 18
63	CH ₃	T
64	F	285 ± 15
65	Cl	158 ± 14
66	Br	T

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

Composto	R	IC ₅₀ (μM)
67	OCH ₃	T
68	NO ₂	88 ± 8
69		79 ± 6

Composto	R	IC ₅₀ (μM)
70	H	T
71	CH ₃	T
72	F	T
73	Cl	T
74	Br	T
75	OCH ₃	> 600
76	NO ₂	> 600

Obs.: alguns valores de IC₅₀ não foram determinados devido à insolubilidade que os compostos analisados apresentaram na faixa de concentração necessária para a obtenção dos dados. T: turvação no meio de reação; I: insolúvel no meio de reação.

Através de uma análise da estrutura do composto diidropirazólico numerados de **49** a **61**, verifica-se que a presença de um grupo volumoso retirador de elétrons como o CCl_3 em R_1 e R_2 , quando $\text{R}_3 = \text{H}$ (**53**), favorece a potência inibitória desta subclasse. A potência pode ser ampliada grandemente com a substituição de CCl_3 por CF_3 em R_1 e introdução do grupamento metiltiocianato em R_3 (**51**). A análise comparativa dos compostos **62-76** indica que a presença da hidroxila na posição 5 do anel diidropirazólico aumenta a solubilidade e contribui favoravelmente para a interação com o sítio enzimático da GAPDH. Além disso, a presença de determinados grupos volumosos retiradores de elétrons do anel, como o NO_2 ou uma fenila contribuem para aumentar a potência inibitória, como verificado em **68** e **69**, respectivamente.

O estudo do mecanismo de inibição de alguns derivados deste conjunto permitiu concluir que estes compostos atuam como inibidores enzimáticos não competitivos com respeito ao cofator T-NAD⁺ (Figura 36, Tabela 16).

a

b

Figura 36. Gráfico do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) para: **a)** composto **51**; **b)** composto **68**.

Tabela 17. Estrutura dos derivados diidropirazólicos submetidos ao estudo mecanístico e seus respectivos valores de K_i e αK_i frente à GAPDH de *T. cruzi*.

Composto	Estrutura Química	K_i	
		$K_{ic} (\mu M)^a$	$K_{iinc} (\mu M)^b$
51		171 ± 13	55 ± 5
68		56 ± 5	53 ± 5

8.10 INIBIÇÃO DA GAPDH DE *T. cruzi* POR COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS DE RUTÊNIO

Uma iniciativa inédita aplicada na busca por novos inibidores da GAPDH de *T. cruzi* foi a investigação de complexos bioinorgânicos de rutênio. Durante a avaliação destes compostos foi possível verificar a presença de uma cinética de inibição do tipo tempo-dependente. Assim, foi realizada a avaliação da IC₅₀ em duas situações distintas: i) sem incubação (medida direta); ii) mantendo a enzima incubada com os compostos no meio reacional durante um tempo de 30 minutos (Tabela 18, Figura 37). Estes complexos possuem isomeria *cis*.

Tabela 18. Dados obtidos a partir do estudo cinético dos derivados bioinorgânicos de rutênio submetidos a ensaios de inibição enzimática frente à enzima GAPDH de *T. cruzi*.

Composto	Estrutura Química	IC ₅₀ (μM)	
		Medida direta	Incubação (30 min.)
77		130 ± 8	52 ± 6

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

Composto	Estrutura Química	IC ₅₀ (μM)	
		Medida direta ^a	Incubação (30 min.)
78		311 ± 11	229 ± 10
79		515 ± 35	333 ± 24

^a – logo após acréscimo dos componentes

Figura 37. Gráfico experimental de determinação da IC₅₀ para os complexos bioinorgânicos de Rutênio.

Um mecanismo que descreve satisfatoriamente o comportamento de inibição tempo-dependente apresentado por estes compostos de rutênio nas análises *in vitro* pode estar relacionado com a liberação do grupamento nitrosônio em solução. Este, por sua vez, apresenta alta reatividade com grupamentos tióis (SH) de moléculas orgânicas. Neste caso, a formação de uma ligação covalente irreversível com a cisteína catalítica (Cys166) do sítio enzimático da GAPDH poderia ser favorecida, o que explica o aumento do potencial inibitório observado ao longo do tempo para uma mesma concentração de composto no meio de reação. Outra evidência experimental resulta no fato de que a introdução de mais substrato (D-G3P) e cofator (T-NAD⁺) após cinco minutos de reação também não exerceu nenhum efeito no sentido de aumentar a atividade enzimática. Estas observações indicam que o mecanismo de inibição destes complexos pode ser do tipo irreversível, resultando na inativação enzimática. Os diferentes grupamentos (bipiridinas, sulfito⁻, imidazolil e metilimidazolil) contribuem para controlar a cinética de liberação do óxido nítrico no meio reacional. Destes três complexos, o composto **77** apresenta a maior potência inibitória da GAPDH de *T. cruzi*. Ao contrário do esperado, o derivado com grupamento sulfito é o que menos libera óxido nítrico livre em solução em função do tempo. Esta informação, fornecido por nosso colaborador, juntamente com o fato de que o isômero *trans*, embora tenha maior capacidade ainda de liberar óxido nítrico que o seu isômetro *cis*, não apresenta inibição da GAPDH nos tempos de análise empregados, indica a uma possível presença de seletividade estrutural destes compostos frente à inibição catalítica da GAPDH de *T. cruzi*.

8.11 IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES ATRAVÉS DO VS

A partir do procedimento de VS foram selecionados e adquiridos nove compostos comercialmente disponíveis (Tabela 19).

Tabela 19. Conjunto de compostos selecionados a partir do ensaio virtual.

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA
80
81
82
83

CONTINUA

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA
84
85
86
87
88

Análises realizadas com este conjunto indicaram que o composto 88 possuía as características adequadas de solubilidade e não interação com o meio reacional, o que permitiu avançar nos estudos cinéticos posteriores para a determinação da IC_{50} e da constante de inibição (Tabela 20), assim como do mecanismo de inibição enzimática (Figura 38).

Tabela 20. Resultado da avaliação da IC_{50} e de K_i do inibidor da GAPDH de *T. cruzi* selecionado no ensaio virtual e identificado a partir do ensaio enzimático.

Composto	Estrutura	IC_{50} (μM) ^a	K_i (μM)	
88		149 ± 12	K_{ic} ^a	K_{iinc} ^b
			113 ± 10	26 ± 2

^a – competitivo

^b – incompetitivo

Figura 38. Gráfico do duplo recíproco para a inibição da GAPDH de *T. cruzi* apresentada pelo composto **88**. Verifica-se que este composto apresenta inibição do tipo não-competitiva com respeito ao cofator T-NAD⁺.

Como pode ser observado pelos dados obtidos com o estudo experimental, o composto **88** apresenta uma potência inibitória moderada frente à GAPDH de *T. cruzi*. No entanto, diversas modificações estruturais na sua estrutura podem conduzir a uma ampliação da potência e da seletividade de novos derivados. Paralelamente, uma busca sistemática por novos compostos que apresentam este esqueleto básico na estrutura também pode contribuir para a obtenção de novas moléculas mais potentes e seletivas.

9 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No decorrer desta tese de doutoramento foram desenvolvidos e padronizados novos ensaios enzimáticos, através de um longo e exaustivo estudo, resultando em metodologias inéditas na literatura, mais robustas e eficientes. Ambas as metodologias de análise foram de suma importância no processo de identificação de novos inibidores e sem as quais não seria possível avançar no estudo em direção à identificação de novos compostos inibidores da GAPDH de *T. cruzi* com ampla diversidade estrutural química. Ainda, estes métodos demonstraram ser de grande importância e aplicabilidade no processo de identificação, estudo cinético e desenvolvimento de novos compostos inibidores da GAPDH de *T. cruzi*, etapa essencial para o planejamento de novos protótipos de fármacos contra a Doença de Chagas.

A complementaridade dos métodos de análise também favorece a avaliação de conjuntos mais amplos de compostos, que possuam elevada diversidade estrutural química, permitindo que os dados obtidos sejam comparados de forma direta, ampliando a descrição da SAR de forma criteriosa e confiável. Estes métodos de ensaio encontram também ampla utilização em outros projetos desenvolvidos paralelamente a este, resultando no benefício direto de várias outras pesquisas realizadas com a GAPDH de *T. cruzi* e humana.

Compostos pertencentes a variadas classes químicas foram identificados como potenciais estruturas para o desenvolvimento de novos compostos líderes contra a Doença de Chagas. Isto resultou na ampliação do conjunto de inibidores da GAPDH de *T. cruzi* até o momento e irá favorecer futuras abordagens para modificações químicas a partir de derivados com esqueletos estruturais definidos.

A avaliação das propriedades biológicas dos derivados 4,5-diidropirazólicos possibilitou a obtenção de importantes dados de SAR frente à GAPDH de *T. cruzi*. Deste modo, a compreensão da importância que determinados grupamentos químicos ligados ao esqueleto básico exercem sobre a inibição catalítica será fundamental para conduzir a síntese de novos derivados mais eficazes. Os compostos 4,5-diidropirazólicos constituem uma classe inédita de inibidores identificados, e cuja rota sintética encontra-se bem descrita e caracterizada, permitindo a obtenção de novos derivados desta classe um processo de planejamento relativamente simples e com excelentes rendimentos. Estudos posteriores para a determinação da estereoquímica destes compostos e separação dos enantiômeros podem, além disso, fornecer derivados de maior potência frente à inibição catalítica da GAPDH de *T. cruzi* e mais seletivos.

Os dados cinéticos obtidos a partir da avaliação dos derivados do ácido anacárdico bem como dos compostos flavonóides serão de grande utilidade para a descrição das características estruturais relevantes de novos derivados capazes de fornecer maior potência na inibição da GAPDH de *T. cruzi*. Isto contribuirá de forma significativa para a construção de novos modelos farmacofóricos, fornecendo o embasamento para direcionar futuros projetos de planejamento de novos congêneres a partir destes compostos que apresentem maior potência e seletividade frente à GAPDH de *T. cruzi*. As modificações estruturais no anel salicílico evidenciaram de forma inequívoca a importância da integridade deste esqueleto estrutural, juntamente com a presença de uma cadeia lateral alquílica, na modulação da inibição catalítica da GAPDH de *T. cruzi*. A introdução de insaturações na cadeia lateral representa um importante aspecto inicial para a obtenção de outros conjuntos de derivados, com o objetivo de conduzir novos estudos que relacionem a importância de determinadas características físico-

químicas e estereoquímicas na obtenção de moléculas que possam apresentar maior potência e seletividade frente a este alvo molecular.

Os complexos de rutênio são inibidores promissores da GAPDH de *T. cruzi*. Esses compostos são exemplos que diferentes classes de ligantes modulam a cinética de inibição tempo-dependente. O fato destes compostos encontrarem particular utilidade na terapêutica como, por exemplo, em agentes anticancerígenos, devido à farmacocinética e à baixa toxicidade apresentadas, serve também de grande estímulo para a condução de estudos mais aprofundados com novos derivados organometálicos de rutênio doadores de NO.

A aplicação exaustiva dos diversos programas de modelagem molecular disponíveis no Laboratório de Química Medicinal e Computacional do CBME permitiu, de forma bem sucedida, a identificação de um composto inédito (**88**) dentre 25 mil estruturas químicas avaliadas por programas de docagem molecular. Isto evidencia a robustez da estratégia utilizada para a identificação de novos esqueletos moleculares úteis no desenvolvimento de compostos líderes inovadores. A partir de 50 compostos selecionados deste total, apenas nove foram adquiridos e submetidos aos testes, resultando na identificação de um composto ativo de moderada potência. Considerando a taxa de sucesso normalmente obtida em etapas iniciais de programas de planejamento e desenvolvimento de fármacos, pode-se afirmar que este estudo computacional foi bem sucedido. O esqueleto estrutural do composto **88** apresenta várias posições suscetíveis para modificação estrutural e/ou introdução de novos grupamentos. Futuros estudos de SAR com novos derivados obtidos a partir deste composto irão trazer, certamente, novas perspectivas no processo de planejamento de inibidores da GAPDH de *T. cruzi* mais potentes e seletivos. Este aspecto amplia grandemente as possibilidades para o desenvolvimento de novos

protótipos mais efetivos contra a GAPDH de *T. cruzi* a partir do estudo de estruturas bem definidas e com características físico-químicas apropriadas para um processo de planejamento de um novo fármaco antichagásico.

Os estudos de SAR foram de fundamental importância e servirão para orientar a síntese de novos derivados semi-sintéticos e sintéticos mais potentes e seletivos. Este é um aspecto imprescindível para acelerar o processo de desenvolvimento de novos protótipos antichagásicos, e foi alcançado neste trabalho através de um estudo aprofundado do comportamento cinético-molecular dos novos conjuntos de inibidores da GAPDH de *T. cruzi* identificados.

A sistemática adotada e apresentada nesta tese permitiu aprimorar o conhecimento em ambos os processos *in silico* e *in vitro* e, como consequência, resultou no desenvolvimento de abordagens paralelas robustas e de grande confiabilidade, e que serão muito importantes para o processo de planejamento de novos candidatos a fármacos para a Doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

1. KOZIKOWSKI, A. ; REITZ, A. B. Filling the pipeline for neglected diseases: creation of a medicinal chemistry-centric international drug discovery institute [iDDi]. *Drug Discov. Today*, v. 13, n. 3-4, p. 97-98, 2008.
2. NERES, J.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology: *trans*-sialidase as a case study for Chagas disease. *Drug Discov. Today*, v. 13, n. 3-4, p. 110-117, 2008.
3. FRANCO-PAREDES, C.; VON, A.; HIDRON, A.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; TELLEZ, I.; BARRAGÁN, M. JONES, D.; NAQUIRA, C. G.; MENDEZ, J. Chagas disease: an impediment in achieving the millennium development goals in Latin America. *BMC Int. Health Hum. Rights*, v. 7, p. 1-7, 2007. Disponível em: <www.biomedcentral.com/1472-698X/7/7>. Acesso em: 02 fev. 2009.
4. TOMAZELA, D. M.; PUPO, M. T.; PASSADOR, E. A.; DA SILVA, M. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; FO, E. R.; OLIVA, G.; PIRANI, J. R. Pyrano chalcones and a flavone from *Neuraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. *Phytochemistry*, v. 55, n. 6, p. 643-651, 2000.
5. SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. G. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. *FEBS Lett.*, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.
6. WIGZELL, H.; NKURUMAH, F. K.; CASTILLO, G. T.; AMOR, J. S.; THALWITZ, W. P. Final Report Third External Review of the UNDP/World Bank/Who Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). *WHO LIBRARY*, n. 21, 1998. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/TDR_JCB\(21\)_98.5_\(part1\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/TDR_JCB(21)_98.5_(part1).pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2009.
7. WIKIMEDIA COMMONS. *Map of Chagas disease: endemic zones*. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carte_maladie_Chagas.png>. Acesso em: 12 fev. 2008.
8. VERLINDE, C. L. M. J.; BRESSI, J. C.; CHOE, J.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VOORHIS, W. C. V.; MICHELS, P. A. M.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J. (). Protein structure-based design of anti-protozoal drugs. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 13, n. 6, p. 843-848, 2002.

9. PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.*, v. 1, n.2, p. 92-100, 2001.
10. WEIR, E. Chagas disease: hidden affliction and visible neglect. *CMAJ*, v. 174, n. 8, p. 1096, 2006.
11. FAIRLAMB, A. H. Future prospects for the chemotherapy of Chagas disease. *Medicina (B. Aires)*, v. 59, s2, p. 179-187, 1999.
12. YACOUB, S.; MOCUMBI, A. O.; YACOUB, M. H. Neglected tropical cardiomyopathies: I. Chagas disease. *Heart*, v. 94, p. 244-248, 2008.
13. BOIANI, L.; AGUIRRE, G.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; CHIDICHIMO, A.; CAZZULO, J. J.; BERTINARIA, M.; GUGLIELMO, S. Furoxan-, alkylnitrate-derivatives and related compounds as anti-trypanosomatid agents: mechanism of action studies. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, n. 17, p. 7900-7907, 2008.
14. COURA, J. R.; CASTRO, S. L de. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.
15. URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J. Mol. Med.*, v. 77, n. 3, p. 332-338, 1999.
16. BARRET, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J. The trypanosomiasis. *The Lancet*, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
17. URBINA, J. A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 14, n. 6, p. 733-741, 2001.
18. KIRCHHOFF, L. V. Current concepts – American trypanosomiasis (Chagas-disease) – a tropical disease now in the United States. *N. Engl. J. Med.*, v. 329, p. 639-644, 1993.
19. URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS Parasitol.*, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.
20. BLUMENSTIEL, K.; SCHONECK, R.; YARDLEY, V.; CROFT, S. I.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Nitrofurantoin drugs as common subversive substrates of

- Trypanosoma cruzi lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. *Biochem. Pharmacol.*, v. 58, n.11, p. 1791-1799, 1999.
21. HUANG, L.; ELLMAN, J. A. Identification of potent and selective mechanism-based inhibitors of the cysteine protease cruzain using solid-phase parallel synthesis. *J. Med. Chem.*, v. 45, n. 3, p. 676-684, 2002.
 22. STOPPANI, A. O. The chemotherapy of Chagas disease. *Medicina (B. Aires)*, v. 59, S2, p. 147-165, 1999.
 23. KOROLKOVAS, A. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
 24. TORANZO, E. G. D. de; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from Trypanosoma cruzi. *Experientia*, v.44, n. 10, p. 880-881, 1988.
 25. BRESSI, J. C.; VERLINDE, C. L. J. J.; ARONOV, A. M.; Shaw, M. L.; SHIN, S. S.; NGUYEN, L. N.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VOORHIS, W. C. V.; KUNTZ, I. D.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae via structure-based drug design. *J. Med. Chem.*, v. 44, n.13, p. 2080-2093, 2001.
 26. SMITH, H. J.; SIMONS, C. *Enzymes and their inhibitors: drug development*. Boca Raton: CRC Press, 2005.
 27. IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). *Enzyme nomenclature*. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>>. Acesso em: 12 jan. 2008.
 28. McLEISH, M.; KENYON, G. L. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. *Approaches to the rational design of enzyme inhibitors*. New York: John Wiley Sons Inc., 2003, p. 715-779.
 29. COPELAND, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery – a guide for medicinal chemists and pharmacologists*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2005
 30. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

31. NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: principles of biochemistry*. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000.
32. WERMUTH, C. G. *The practice of medicinal chemistry*. San Diego: Academic Press, 2001.
33. VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H., HOL, I, W. G. J.; MICHELS, P. A. M. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist. Updat.*, v. 4,n. 1, p. 50-65, 2001.
34. BARRET, M. P.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends Microbiol.*, v. 7, n. 2, p. 82-88, 1999.
35. BAKKER, B. M.; WESTERHOFF, H. V.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. M. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 106, n. 1, p. 1-10.
36. ARONOV, A. M.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VOORHIS, W. C. V.; VERLINDE, C. L. M. J.; OPPERDOES, F. R.; HOL, W. G. J. Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 96, p., n. 8, 4273-4278, 1999.
37. BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R.; WESTERHOFF, H. V. What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*?. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 21, p. 14551-14559, 1999.
38. STRYER, L. *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman Co, 1995.
39. HOPKINS, A. L.; WITTY, M. J.; NWAKA, S. Mission possible. *Nature*, v. 449, p. 166-169, 2007.
40. BUNIN, B. A. Increasing the efficiency of small-molecule drug discovery. *Drug Discov.. Today*, v. 8, n. 18 p. 823-826, 2003.
41. GOODNOW Jr., R. A. Current practices in generation of small molecule new leads. *J. Cell Biochem.*, v. 84, n. S37, p. 13-21, 2001.

42. DREWS, J. Strategic trends in the drug industry. *Drug Discov. Today*, v. 8, n. 9, p. 411-420, 2003.
43. DIMASI, J. A. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health Econ.*, v. 22, p. 151-185, 2003.
44. YU, H.; ADEDOYIN, A. ADME-Tox in drug discovery: integration of experimental and computational technologies. *Drug Discov. Today*, v. 18, n. 18, p. 852-861, 2003.
45. GIACCOTTO, C.; SANTERRE, R. E.; VERNON, J. A. Drug prices and research and development investment behavior in the pharmaceutical industry. *J. L. Econ.*, v. 48, p. 195-214, 2005.
46. SEIFERT, M. H. J.; WOLF, K.; VITT, D. Virtual high-throughput in silico screening. *Biosilico*, v.1, n. 4, p. 143-149, 2003.
47. KAPETANOVIC, I. M. Computer-aided drug discovery and development (CADD): *in silico*-chemico-biological approach. *Chem. Biol. Interact.*, v. 171, n.2, p. 165-176, 2008.
48. NWAKA, S.; RIDLEY, R. G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 2, p. 919-928, 2003.
49. GREGSON, N.; SPARROWHAWK, K.; MAUSKOPF, J.; PAUL, J. Pricing medicines: theory and practice, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 4, p. 121-130, 2005.
50. PARK, K. B.; DALTON-BROWN, E.; HIRST, C.; WILLIAMS, D. P. Selection of new chemical entities with decreased potential for adverse drug reactions. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 549, n. 1-3, p. 1-8, 2006.
51. WALKER, D. K. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in the assessment of drug safety in early drug development. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 58, n. 6, p. 601-608, 2005.
52. KLEBE, G. The use of composite crystal-field environments in molecular recognition and the de novo design of protein ligands. *J. Mol. Biol.*, v. 237, n. 2, p. 212-235, 1994.

53. MYERS, S.; BAKER, A. Drug discovery – an operating model for a new era. *Nat. Biotechnol.*, v. 19, p. 727-730, 2001.
54. KONG, D. X.; LI, X. J.; ZHANG, H. Y. Where is the hope for drug discovery? Let history tell the future. *Drug Discov. Today*, v. 14, n. 3-4, p. 115-119, 2009.
55. TSUNOYAMA, K.; AMINI, A.; STERNBERG, M. J. E.; MUGGLETON, S. H. Scaffold hopping in drug discovery using inductive logic programming. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 48,, n. 5, p. 949-957, 2008.
56. BROWN, D. Unfinished business: target-based drug discovery. *Drug Discov. Today*, v. 12, n. 23-24, p. 1007-1012, 2007.
57. SUBRAMANIAM, S. Productivity and attrition: key challenges for biotech and pharma. *Drug Discov. Today*, v. 8, n. 12, p. 513-515, 2003.
58. OPREA, T. I. Virtual screening in lead discovery: a viewpoint. *Molecules*, v. 7, p. 51-62, 2002.
59. JENKINS, J. L.; KAO, R. Y.; SHAPIRO, R. Virtual screening to enrich hit lists from high-throughput screening: a case study on small-molecule inhibitors of angiogenin. *Proteins*, v. 50, n. 1, p. 81-93, 2003.
60. GOODNOW, R. A., Jr. Hit and lead identification: integrated technology-based approaches. *Drug Discov. Today Tech*, v. 3, n. 4, p. 367-375, 2006.
61. LYNE, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug. Discov. Today*, v. 7, n. 20, p. 1047-1055, 2002.
62. BISSANTZ, C.; FOLKERS, G.; ROGNAN, D. Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J. Med. Chem.*, v. 43, n. 25, p 4759-4767, 2000.
63. LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Prediction of protin-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. *J. Med. Chem.*, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, 2006.
64. TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, v. 16, n. 3, p. 151-166, 2002.

65. KAAPRO, A.; OJANEN, J. *Protein docking*, 2002. Disponível em: <<http://www.lce.hut.fi/teaching/S-114.500/k2002/Protdock.pdf>>. Acesso em: 09/01/2009.
66. GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. EADock: docking of small molecules into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization. *Proteins*, v. 67, n.4, p. 1010-1025, 2007.
67. MOITESSIER, N.; ENGLEBIENNE, P.; LEE, D.; LAWANDI, J. CORBEIL, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *Br. J. Pharmacol.*, v. 153, p. S7-S26, 2008.
68. KELLENBERGER, E.; RODRIGO, J.; MULLER, P.; ROGNAN, D. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins*, v. 57, n. 2, p. 225-242, 2004.
69. PEI, J.; WANG, Q.; LIU, Z.; LI, Q.; YANG, K.; LAI, L. PSI-DOCK: towards highly efficient and accurate flexible ligand docking. *Proteins*, v. 62, n. 4, p. 934-946, 2006.
70. ALVAREZ, J.; SCHOICHET, B. *Virtual screening in drug discovery*. New York: CRC Press, 2005.
71. RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T; KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.*, v. 261, p. 470-489, 1996.
72. XING, L.; HODGKIN, E.; LIU, Q.; SEDLOCK, D. Evaluation and application of multiple scoring functions for a virtual screening experiment. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, v. 18, n. 5, p. 333-344, 2004.
73. NISSINK, J. M.; MURRAY, C.; HARTSHORN, M.; VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; TAYLOR, R. A. A new test set for validating predictions of protein-ligand interaction. *Proteins*, v. 49, n. 4, p. 457-471, 2002.
74. KESERU, G. M. A virtual high throughput screen for high affinity cytochrome P450cam substrates. Implications for *in silico* prediction of drug metabolism. *J. Com. Aid. Mol. Des.*, v. 15, n. 7, p. 649-57, 2001.
75. FARUTIN, V.; MASTERSON, L.; ANDRICOPULO, A. D.; CHENG, J.; RILEY, B.; HAKIMI, R.; FRAZER, J. W.; CORDES, E. H. Structure-activity relationships

- for a class of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *J. Med. Chem.*, v. 42, n. 13, p. 2422-2431, 1999.
76. McLEISH, M.; KENYON, G. L. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. *Approaches to the rational design of enzyme inhibitors*. New York: John Wiley Sons Inc., 2003, p. 715-779.
 77. BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. *Métodos de laboratório em bioquímica*. São Paulo: Manole, 2003.
 78. HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today*, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.
 79. SUNG, B.; PANDEY, M. K.; AHN, K. S.; YI, T.; CHATURVEDI, M. M.; LIU, M.; AGGARWAL, B. B. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- κ B kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood*, v. 111, n. 10, p. 4880-4891, 2008.
 80. PEREIRA, J. M.; SEVERINO, R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. da; ZOTTIS, A.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; CORRÊA, A. G. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 8889-8895, 2008.
 81. TEILLET, F.; BOUMENDJEL, A.; BOUTONNAT, J.; RONOT, X. Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. *Med. Res. Rev.*, v. 28, n. 5, p. 715-745, 2008.
 82. WANG, L.-S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.*, v. 269, p. 281-290, 2008.
 83. DOSS, M. X.; POTTA, S. P.; HESCHELER, J.; SACHINIDIS, A. Trapping of growth factor by catechins: a possible therapeutical target for prevention of proliferative diseases. *J. Nutr. Biochem.*, v. 16, p. 259-266, 2005.
 84. ASL, M. N.; HOSSEINZADEH, H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and bioactive compounds. *Phytother. Res.*, v. 22, 2008.

85. WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 36, n. 7, p. 829-837, 2004.
86. KONG, J.-M.; CHIA, L.-S.; GOH, CHIA, T.-F., BROUILLAR, R. Analysis and biological activity of anthocyanins. *Phytochemistry*, v. 64, p. 923-933, 2003.
87. VACEK, J.; KLEJDUS, B.; LOJKOVÁ, L.; KUBÁN, V. Current trends in isolation, separation determination and identification of isoflavones: a review. *J. Sep. Sci.*, n. 31, p. 2054-2067.
88. FRAGA, C. G. Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life*, v. 59, n. 4, p. 308-315, 2007.
89. WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, n. 18, p. 8404-8411, 2008.
90. KALE, A.; GAWANDE, S.; KOTWAL, S. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytother. Res.*, v. 22, p. 567-577, 2008.
91. CUNICO, W.; CECHINEL, C. A.; BONACORSO, H. G.; MARTINS, M. A. P.; ZANATTA, N.; SOUZA, M. V. N. de; FREITAS, I. O.; SOARES, R. P. P.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of 4-(5-trifluoromethyl-1H-pyrazol-1-yl)chloroquine analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 16, n. 3, p. 649-653, 2005.
92. BRUIJNINCX, P. C. A.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v. 12, p. 197-206.
93. TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B. R.; FRANCO, D. W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. *Coord. Chem Rev.*, v. 236, p. 57-69, 2003.
94. SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. *Br. J. Pharmacol.*, v. 152, n. 1, p. 112-121, 2007.
95. ANDERSON, B. M.; ANDERSON, C. D.; LEE, J. K.; STEIN, A. M. The thionicotinamide analogs of DPN and TPN. I. Preparation and analysis. *Biochemistry*, v. 2, n. 5, p. 1015-1017, 1963.

96. ARONOV, A. M.; VERLINDE, C. L. M. J.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Selective tight binding inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase via structure-based drug design. *J. Med. Chem.*, v. 41, p. 4790-4799, 1998.
97. VERLINDE, C. L. M. J.; CALLENS, M.; CALENBERGH, S. V.; AERSCHOT, A. V.; HERDEWIJN, P.; HANNAERT, V.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R.; HOL, G. J. Selective inhibition of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: toward new drugs for the treatment of sleeping sickness. *J. Med. Chem.*, v. 37, p. 3605-3613, 1994.
98. McGOVERN, S. L.; HELFAND, B. T.; FENG, B.; SHOICHET, B. A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J. Med. Chem.*, v. 46, n. 20, p. 4265-4272, 2003.