UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: BUSCA RACIONAL DE COMPOSTOS COM AÇÃO SELETIVA PELA CRUZAÍNA

Gustavo Henrique Goulart Trossini

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2008

GUSTAVO HENRIQUE GOULART TROSSINI

Antichagásicos Potenciais: Busca Racional de Compostos com Ação Seletiva pela Cruzaína

Tese apresentada à
Faculdade de Ciências Faramcêuticas
da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de
Doutor em Fármaco e Medicamentos.

Orientador: Prof. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo, 2008.

Gustavo Henrique Goulart Trossini

Antichagásicos Potenciais: Busca Racional de Compostos com Ação Seletiva pela Cruzaína

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

_____
3°. examinador

_____
4°. examinador

São Paulo, _____ de _____.

"Não quero que me chamem de Mestre ou Doutor, de modo algum, nem quero que me tirem essa grande liberdade de estar aprendendo, me melhorando"

Gilberto Freyre

Dedico esse trababalho aos
meus pais Claudio e Sonia,
exemplos de vitória e perseverança,
aos meus irmãos Thiago e Eduardo,
que sempre acreditaram em mim.
À minha namorada Marta,
por todo carinho e companheirismo.
Aos meus avós
Adélia e Zóti (In memorian)
pelo exemplo de vida

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, inteligência suprema, causa primária de todas as coisas, por me dar saúde e perspicácia para realizar este trabalho.

À Profª. Titular Elizabeth Igne Ferreira, exemplo profissional e humano, pelo aprendizado, estímulo constante, carinho, preocupação, companheirismo e pelo crescimento científica que me proporcionou, meu muito obrigado.

Ao Prof. e amigo Dr. Adriano D. Andricopulo pelas discussões científicas, incentivos e pela oportunidade de estágio no LQCM.

Ao amigo Dr. Rafael V. C. Guido pela colaboração nos estudos de QSAR.

Ao Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro pela oportunidade do curto período de estágio no LASSBio e à amiga Profa. Dra. Nelilma C. Romeiro pela colaboração.À Profa. Dra. Vera L. E. Lima e ao doutorando Cedric Graebin pela oportuninade de estágio e aprendizado em síntese orgânica em fase sólida.

Ao Prof. Dr. Luiz Juliano por fornecer amostras da enzima cruzaína.

Ao amigo Prof. Dr. Rodrigo L. O. R. Cunha, pelas conversas científicas e apoio, sem medir esforços para colaborar na realização dos ensaios biológicos.

À Profa. Dra. Antônia Tavares do Amaral por disponibilizar seu laboratório para realização de grande parte dos estudos computacionais deste trabalho.

Aos amigos Dr. Alberto Malvezzi e Leandro de Rezende pelas colaborações e sugestões.

Ao Prof. Dr. Tudor I. Oprea pela oportunidade de estágio no Department of Biocomputing of the University of New Mexico, *pela atenção e recepção dispensada e ao Dr. Andrei Leitão pelas discussões científicas, colaboração no trabalho de SBDD, tornando o período de estágio mais agradável e produtivo.*

Ao grande amigo Dan C. Fara por toda ajuda nos meses de estágio sanduíche, pela amizade conquistada e pelos momentos agradáveis em Albuquerque;

Aos colegas do Department of Biocomputing of the University of New Mexico.

À Dra. Carla M. S. Menezes pelos ensinamentos, sugestões e incentivo.

Ao amigo e técnico Charles L. Brito pela colaboração na síntese dos compostos.

Ao amigo Hamilton M. Bigatão, pela ajuda, discussões científicas, não-científicas e por momentos de descontração que tornam a vida mais fácil.

Ao amigo Guilherme C. Matsutani pelo companhirismo e estímulo.

À Profa. Dra. Carlota O. Rangel Yague, pelas discussões científicas e incentivo constanste.

Aos amigos, colegas e estagiários do LAPEN pela colaboração e ajuda constante: Jeanine, Carol, Daniela, Kátia, Vanessa, Plínio, Sun, Leonardo, Kerly e Mauro.

A todos os professores e funcionários da FCF-USP que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Claudio e Sonia e irmãos Thiago e Eduardo por viverem comigo essa conquista.

Aos meus avôs Adélia Goulart Figueiredo e Joaquim Goulart Figueiredo (In memorian) e a tia Maria Ivete pelo carinho, amor e pensamento positivo constante.

À Martinha, minha namorada, por acreditar em mim, comemorou ao ao meu lado cada conquista e me deu força para vencer cada obstáculo. Pessoa que me deu atenção, carinho e todo amor nesses últimos anos.

Ao grande amigo Diogo Oliveira Silva pelas sugestões, ensinamentos, companheirismo e novamente por que: "parceria não se compra no mercado".

Ao grande amigo Claudio M. P. Perreira pelo incentivo e companheirismo.

Ao seu José, dona Regina, Rê, José Augusto e José Otávio, pessoas que gosto demais e que me deram muito apoio e carinho.

Aos amigos de moradia Arthur, Janaína, Marcia, Paulo Renato, Jão Vitor (In Memorian), Paulinho e Sonia pelo companheirismo e descontração, que acompanharam minha trajetória durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Paulo Renato de Souza pela paciência em ouvir e por me incentivar.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A doença de Chagas, parasitose endêmica causada pelo Trypanosoma cruzi, *se apresenta como grande causa de morbimortalidade, afetando cerca de 18 milhões de pessoas no continente americano e causando 21.000 mortes, a cada ano. Atualmente, estima-se que 100 milhões de pessoas estejam sob risco de contaminação nos 18 países da área endêmica da doença. A quimioterapia contra a tripanossomíase americana é constituída por apenas dois fármacos, nifurtimox e benznidazol, que não apresentam ação adequada na fase crônica da doença. Por estas razões, é premente a necessidade de novas e mais eficazes alternativas terapêuticas. A cruzaína, mais abundante cisteíno-protease do parasita, é enzima essencial em todos os estágios de modificação celular do parasita e está, também, presente no processo de invasão e modificação do sistema imune do hospedeiro. Além disso, apresenta diferenças em relação a enzimas dessa categoria no hospedeiro. Trata-se, pois, de excelente alvo bioquímico para a pesquisa de novos agentes contra o* T. cruzi. *Face ao exposto e tendo-se em vista a especificidade da cruzaína, considera-se de grande interesse a compreensão do mecanismo de interação de compostos com essa enzima com o intuito de planejar derivados com atividade antichagásica potencial. O presente trabalho teve o objetivo de elucidar a afinidade de diferentes classes de compostos pela enzima, na busca racional de novos tripanomicidas. Assim, pró-fármacos peptídicos recíprocos, derivados de primaquina(PQ) e de nitrofural(NF), anteriormente sintetizados, e pró-fármacos peptídicos duplos do hidroximetilnitrofural (NFOH) planejados, e cuja síntese foi estudada, foram submetidos a estudos de modelagem molecular e de* docking. *Os peptídios foram escolhidos com base na cisão específica pela cruzaína. Avaliou-se a interação com a enzima e elucidar o mecanismo de liberação dos fármacos e composto ativo a partir desses derivados. Os estudos indicaram que o melhor transportador a ser utilizado no planejamento de novos pró-fármacos é o dipeptídio LysArg, corroborando o que havia sido observado nos ensaios em cultura de células infectadas com o* T. cruzi. *Ante a possibilidade de um segundo mecanismo de ação pela interação entre a Cys25 da cruzaína e o grupo semicarbazona, presente no NF e no NFOH, planejaram-se e sintetizaram-se análogos destes compostos, utilizando bioisosterismo clássico entre enxofre e oxigênio. Estudos de modelagem molecular e* docking *indicaram a participação também deste mecanismo de ação na atividade dos referidos derivados nitro-heterocíclicos. Todos os bioisósteros apresentaram ação inibitória na cruzaína – IC_{50} entre 2,71μM e 22,83 μM – evidenciando, também, este mecanismo de ação. Com o objetivo de se estudar a influência do grupamento (tio)semicarbazona presente nos derivados bioisostéricos sintetizados, realizaram-se estudos de QSAR 2D e 3D em série de compostos descritos na literatura, obtendo-se modelos robustos e com grau elevado de predição, comprovando a ação na cruzaína. Tais grupos podem ser utilizados no planejamento de novos tripanomicidas. Complementando a busca racional de novos antichagásicos potenciais, efetuou-se triagem virtual de novos ligantes utilizando o planejamento racional com base na estrutura do receptor (SBDD) a partir de modelo farmacofórico específico obtido para a cruzaína. Esse estudo proporcionou a sugestão de vinte moléculas a partir do banco de dados CHEMDIV, com possível ação inibitória da enzima. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os*

estudos realizados com pró-fármacos e análogos por meio de processos racionais de planejamento forneceram dados importantes para a pesquisa de candidatos a novos fármacos antichagásicos.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Antichagásicos potenciais. Latenciação. Bioisosterismo. Planejamento de fármacos com base na estrutura do ligante. Planejamento com base na estrutura do receptor. Hidroximetilnitrofural. Tiossemicarbazonas. Semicarbazonas.

ABSTRACT

Chagas´ disease, a parasitosis caused by Trypanosoma cruzi, *is an endemic disease that affects most part of Latin America. About 18 million people are infected by the parasite and around 21 thousand deaths are related to Chagas' disease each year. Nowadays, 100 millions of people are estimated to be under the risk of infection in the 18 countries of the endemic areas. The therapeutic armamentarium available against Chagas´ disease is comprehended by only two drugs, nifurtmox and benznidazol, which are not effective in the chronic phase of the disease. Cruzain, the most abundant cysteine protease of the parasite, is essential in all stages of the cellular development of the parasite and responsible for invasion and modification of the immunologic system of the human host. Besides, it has differences relatively to those enzymes in the humans. So, it is an excellent biochemical target for searching new agents against* T. cruzi. *This said and in the view of cruzain specificity, understanding the mechanism of interaction of compounds with this enzyme is considered very interesting in order to design derivatives with potential anti-Chagas´disease. The present work had the objective of elucidating the affinity of different classes of compounds to the enzyme, in the rational search for new trypanomicides. So, mutual peptide prodrugs, derived from primaquine (PQ) and nitrofurazone (NF), previously synthesized, and designed double peptide prodrugs of hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), which synthesis has been studied, were submitted to molecular modeling and docking studies. The peptides were chosen based on specific cleavage by cruzain. The interaction with the enzyme and the drug as well as the active compound release mechanism from those derivatives were evaluated. The studies have indicated the dipeptide LysArg as the best carrier to be used in the design of new prodrugs, corroborating what had been earlier observed in the tests of* T. cruzi *infected cell culture. Based on the possibility of a second mechanism of action through the interaction between cruzain Cys25 and the semicarbazone group, found in NF and NFOH, analogs of this class of compounds were designed, and synthesized, using classic bioisosterism between sultur and oxygen. Molecular modeling and docking studies have indicated also the participation of this mechanism in the activity of the nitro-heterocyclic compounds referred. All bioisosters showed to inhibit cruzain -- IC_{50} between 2.71μM and 22.83 μM -- also evidencing this mechanism of action. With the purpose of studying the influence of (thio)semicarbazone group present in the synthesized bioisoster derivatives, 2D and 3D QSAR have been developed for a series of compounds reported in the literature, leading to robust and high- preditive level models, confirming their action in cruzaine. Those groups might be used in the design of new trypanomicides. Complementing the rational search for new antichagasic compounds, a virtual screening of new ligands, using the structure-based drug design (SBDD) was developed based on a specific pharmacophore model obtained for cruzain. This study have provided the suggestion of twenty compounds from the CHEMDIV data bank with possible inhibitory activity in cruzain. Based on the results obtained, the conclusion is that the studies herein developed with prodrugs and analogs through rational drug design lead to important data towards the research of new candidates as new antichagasic drugs.*

Key-Words: Chagas´ disease. Potential antichagasic agents. Prodrug design. Bioisosterismo. Ligand-Based Drug Design. Structure-Based Drug Design. HydroxymethylNitrofurazone. Thiosemicarbazones. Semicarbazones.

SUMÁRIO

Parte I – Introdução – Revisão Bibliográfica e Objetivos 17
Capítulo 1 – Doença de Chagas 18
1. Doença de Chagas 19
1.1 ***Epidemiologia*** 19
1.2 Ciclo biológico do T. cruzi 21
1.3 Quimioterapia 23
1.3.1 Tripanomicidas atualmente usados 23
1.3.2 Tripanomicidas em estudo 24
1.3.2.1. Nitrofural 27
1.4 Alvos bioquímicos na pesquisa de novos antichagásicos 29
1.4.1 *Cisteína-Proteases* 30
1.4.2 *Tripanotiona Redutase* 37
1.4.3 *Biossíntese de Esteróides* 38
1.4.4 *Metabolismo de Pirofosfato* 40
1.4.5 *Purinas* 40
1.5 ***Referências Bibliográficas*** 42
Capítulo 2 – Gênese de Fármacos 57
2. Gênese de fármacos 58
2.1 Modificação Molecular 60
2.1.1 Latenciação 60
2.1.2 Bioisosterismo 63
2.2 Planejamento racional de fármacos 67
2.2.1 Química computacional 67
2.2.1.1 Relações Quantitativas entre Estrutura Química e Atividade Biológica 68
2.2.1.2 Modelagem Molecular 73
2.2.1.3 *Docking* 74
2.2.1.4 Química Combinatória *X High Througthput Screening* - HTS 76
2.2.1.5 Pesquisa de novos fármacos baseado na estrutura do receptor e/ou de ligantes já existentes 77
2.3 Referências Bibliográficas 80

Capítulo 3 – Objetivos e Justificativas 91
3. Objetivos e Justificativa 92
3.1 Referências Bibliográficas 97
Parte II – Experimental 99
Capítulo 4 - Pró-Farmacos dipeptídicos como antichagásicos: Avaliação da especificidade pela cruzaína 100
4. ***Pró-Farmacos dipeptídicos como antichagásicos: Avaliação da especificidade pela cruzaína*** 101
4.1 Material e Métodos 102
4.2.1 Material 102
4.2.1.1 Computadores 102
4.2.1.2 Programas para modelagem molecular 102
4.2.2 *Métodos* 103
4.2.2.1 Modelagem molecular utilizando método AM1 103
4.2.2.2 Estudos de *Docking* 104
4.3 *Resultados e Discussão dos estudos de modelagem molecular e docking dos pró-farmacos* 105
4.3.1 Estudo das propriedades estereoeletrônicas utilizando o método semi-empírico AM1 105
4.3.2.1 Construção e análise dos espaçantes dipeptídico 106
4.3.2.2 Construção e análise dos modelos dipeptídicos de primaquina e pró-fármacos recíprocos dipeptídicos de primaquina e nitrofural 108
4.3.2.3 Construção e análise dos pró-farmacos duplos de NF com espaçantes dipeptíficos 112
4.3.2 Docking 115
4.3.2.1 *Docking* dos pró-fármacos específicos para cruzipaína 115
4.4 *Conclusões* 129
4.5 *Referências Bibliográficas* 130
Capítulo 5 - Análogos do NF e do NFOH com potencial atividade antichagásica 132
5. Análogos do NF e do NFOH com potencial atividade antichagásica 133
5.1 Material e Métodos 135

5.1.1 Material 135
5.1.1.1 Reagentes e solventes 135
5.1.1.2 Equipamentos 135
5.1.1.3 Softwares para modelagem molecular 135
5.1.2 *Métodos Sintéticos* 136
5.1.2.1. Síntese do NFOH 136
5.1.2.2 Otimização da síntese do hidroximetilnitrofural (NFOH) 137
5.1.2.3 Síntese de Análogos de NF e do NFOH 138
5.1.2.3.1 Síntese de análogos do NF 138
5.1.2.3.2 Síntese dos análogos do NFOH 140
5.1.3 *Métodos Computacionais* 142
5.1.3.1 Modelagem Molecular 142
5.1.3.2 Estudo de *docking* dos análogos do NF e do NFOH 142
5.1.3.2.1 FlexE 142
5.1.3.2.2 GOLD 143
5.1.4 *Ensaios biológicos* 144
5.1.4.1 Ensaios de inibição da cruzaína 144
5.3 *Resultados e discussão* 144
5.3.1 Sínteses 144
5.3.1.1 Síntese do NFOH 144
5.3.1.2 Otimização da síntese do NFOH 148
5.2.1.3 Síntese de Análogos de NF e do NFOH 164
5.2.1.3.1 Síntese de análogos do NF 164
5.2.1.3.2 Síntese dos análogos do NFOH 168
5.3.2 *Química computacional* 173
5.3.2.1 Estudos de Modelagem Molecular dos bioisósteros de NF e de NFOH 173
5.3.2.2 Estudo de *docking* dos análogos do NF e do NFOH 176
5.3.2.2.1 Por FlexE 176
5.3.2.2.1 Por GOLD 178
5.3.3 Ensaios biológicos 184
5.3.3.1 Ensaios de inibição da cruzaína 184
5.3 Conclusões 188

5.4 Referências bibliográficas 189
Capítulo 6 - Estudos de QSAR de potenciais antichagásicos derivados de (tio)semicarbazona 193
6. Estudos de QSAR de potenciais antichagásicos derivados de (tio)semicarbazona 194
6.1 Material e Métodos 195
6.1.1 Material 195
6.1.2 Métodos 195
6.1.2.1 Estudos de QSAR 195
6.1.2.1.1 Holograma QSAR – HQSAR 198
6.1.2.1.2 QSAR Clássico 199
6.1.2.1.3 Estudos de QSAR 3D 200
6.2 Resultados e discussão dos estudos de QSAR 201
6.2.1 QSAR 201
6.2.1.1 QSAR 2D 203
6.2.1.1.1 HQSAR 203
6.2.1.1.2 QSAR clássico 208
6.2.1.1.3 QSAR 3D 211
6.3 Conclusões 219
6.4 Referências Bibliográficas 220
Capítulo 7 - Planejamento de fármacos com base na estrutura da cruzaína 222
7. Planejamento de fármacos com base na estrutura da cruzaína 223
7.1 Material e métodos 224
7.1.1 Material 224
7.1.1.1 Computadores 224
7.1.1.2 Softwares 224
7.1.1.3 Banco de dados 224
7.1.2 Métodos 225
7.1.2.1 Seleção e alinhamento das estruturas das cisteíno-proteases 225
7.1.2.1.1 GRID/GOLPE 225
7.1.2.1.2 Geração do modelo farmacofórico 226
7.1.2.1.3 Geração de banco de dados 227

7.1.2.1.4 Avaliação dos modelos farmacofóricos 227
7.1.2.1.5. Seleção das estruturas do CHEMDIV 228
7.1.2.1.6 *Docking* 229
7.2 Resultados e Discussão 231
7.2.1 *Seleção e alinhamento das estruturas das cisteíno-proteases* 231
7.2.1.1. GRID/GOLPE 232
7.2.1.2. Geração do modelo farmacofórico 239
7.2.1.3 Geração dos bancos de dados 243
7.2.1.4 Avaliação dos modelos farmacofóricos 244
7.2.1.5 Seleção das estruturas do CHEMDIV 245
7.2.1.6. *Docking* 247
7.3 Conclusões 251
7.4 Referências Bibliográficas 253
Capitulo 8 - Perspectivas 255
8. Perspectivas 256
Anexos 257

Parte I - Introdução

Capítulo 1

Doença de Chagas

1. Doença de Chagas

1.1 *Epidemiologia*

Descoberta em 1909, por Carlos Chagas, a tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma protozoose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, presente apenas no continente americano, principalmente entre pequenos mamíferos selvagens (LEWINSOHN, 1981; SILVA, 1985; BRENNER, 1989; WHO/TRD, 2008; DNDi, 2008). O vetor para esse protozoário é o *Triatoma*, principalmente *T. infestans* e *T. dimidiata*, que são popularmente conhecidos como "barbeiro" (DIAS, 1992; WHO, 1999; WHO/TDR, 2008; DNDi, 2008).

O *T. cruzi* é encontrado do sul dos EUA até o sul da Argentina (WHO, 2002; WHO/TRD, 2008; DNDi, 2008). Nos 18 países endêmicos, estima-se que de 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita na América Latina. e que 100 milhões de pessoas se apresentem sob risco de infecção em todo o mundo. Estima-se, também, que ocorram, aproximadamente, 21.000 mortes causadas por complicações decorrentes da doença de Chagas a cada ano e que cerca de 300.00 pessoas sejam contaminadas a cada ano (WHO, 2002; MONCAYO, 2003; MONCAYO, ORTIZ YANINE, 2006; DIAS, 2007). A Figura 1.1 mostra a distribuição geográfica da parasitose.

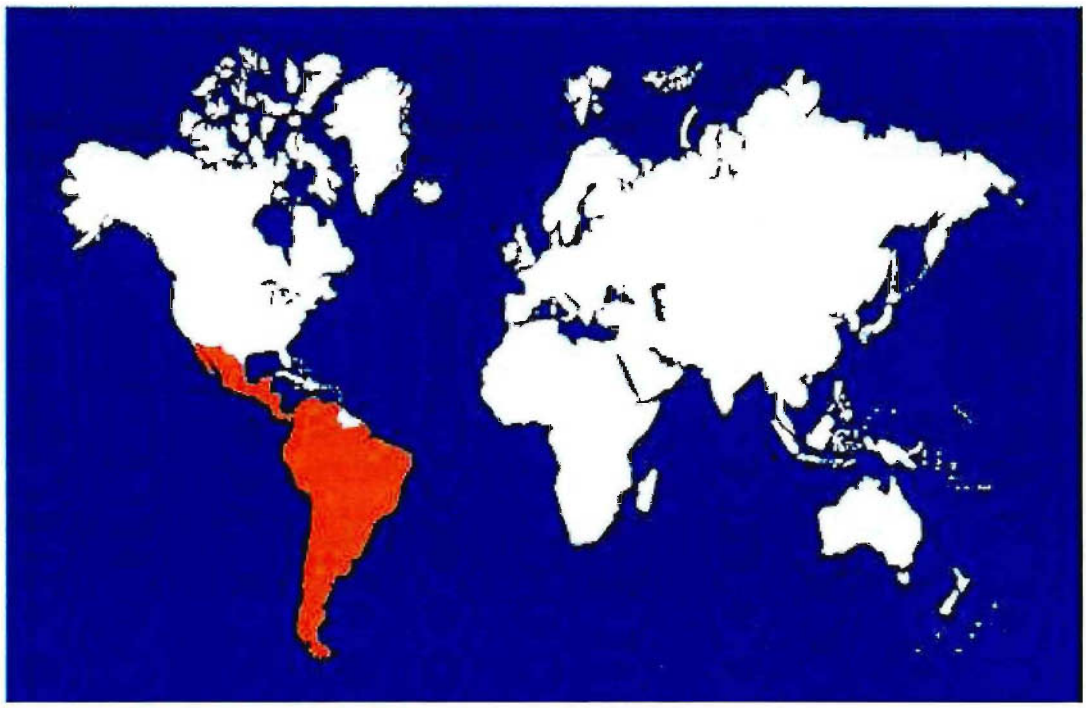


Figura 1.1 – Distribuição geográfica da doença de Chagas (2002). Fonte: http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/files/chagas-poster.pdf

O perfil epidemiológico tradicional da doença de Chagas foi modificado entre as décadas de 1970 e 1980 devido aos movimentos migratórios rural-urbanos, transformando a infecção por *T. cruzi* em infecção urbana. Trata-se, pois, de problema de saúde pública relacionado, principalmente, com as grandes cidades, pois é para elas que se dirigem as pessoas infectadas, assintomáticas ou oligossintomáticas, focalizadas na busca de trabalho. Ademais, nessas metrópoles encontram-se os doentes à procura de tratamento (MONCAYO, 2003; ARAÚJO, SABROZA, DIAS, 2007; SCHMUNIS, 2007). Formas alternativas de contaminação são a grande precupação atual, maior que a vetorial, tendo em vista os programas de controle de inseto vetor aplicados nas regiões endêmicas (COURA, 2007). Dentre as formas alternativas de transmissão, a transfusão sangüínea é a segunda forma mais relevante de transmissão do *T. cruzi,* tendo prevalência de contaminação sanguínea maior que HIV, hepatites B e C, em bancos de sangue de algumas cidades do continente (WHO, 2002; COURA, 2007; WHO/TRD, 2008; DNDi, 2008). Outra forma de transmissão, além da contaminação em laboratório, que desportou interesse recente é a oral. Por essa via, a ingestão de

tripomastigotas se dá em razão da contaminação de alimentos por insetos vetores, provenientes de fontes silvestres, triturados durante a preparação daqueles. Recentemente, ocorreram surtos de doença de Chagas com forma aguda e morte por ingestão de formas tripomastigotas dissolvidas em bebidas, como suco de cana e açaí, em que os insetos vetores, silvestres provavelmente, foram triturados durante o preparo ou suas fezes contaminaram o alimento, conforme divulgado amplamente na mídia e, em 2006, no Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (CARDOSO *et al.*, 2006).

No País, a morbi-mortalidade da doença de Chagas era significativa na década de 1990, vitimando 20% ou mais dos indivíduos infectados, que adquiriam cardiopatia chagásica crônica evolutiva, capaz de matar, no mínimo, 15.000 pessoas/ano (DIAS, JATENE, 1992). Hoje, a doença de Chagas é a quarta causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias (ARAÚJO, SABROZA, DIAS, 2007; COURA, 2007). A faixa etária em que se registra a maior incidência é aquela acima de 45 anos, quando as pessoas se encontram, ainda, em sua capacidade produtiva. Os pacientes concentram-se nas grandes cidades, especialmente da região Sudeste.

A doença de Chagas não é um problema isolado da população latino-americana. Nas áreas endêmicas, está intimamente relacionada com as doenças "sociais" típicas, como desnutrição, diarréia, tuberculose e outras parasitoses (COURA, 2007; DIAS, PRATA, CORREIA, 2008).

O inseto triatomíneo, que transmite o parasita, alimenta-se de sangue e encontra ambiente favorável em frestas de paredes e telhados de habitações pobres em áreas rurais e em favelas. A eliminação da transmissão via triatomíneo vem apresentando decréscimo considerável. No entanto, cabe ressaltar a preocupação de que, com essa possibilidade, se diminuam as medidas de controle, como ocorreu com a malária na década de 1950, e a transmissão por essa forma ressurja com toda a força (COURA, 2007).

1.2 Ciclo biológico do T. cruzi (DIAS, 1992)

Figura 1.2 – Ciclo biológico do *T. cruzi.*
Fonte: (WHO, 2002).

O ciclo biológico do *T. cruzi* (Figura 1.2) inicia-se pela ingestão, pelo vetor triatomíneo, de sangue infectado contendo as formas tripomastigotas do parasita. Os parasitas ingeridos sofrem diferenciação para a forma epimastigota no lume intestinal do inseto, local onde ocorre a proliferação parasitária. Os parasitas, ao atingir a parte posterior do intestino do inseto vetor, modificam-se para formas tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes do parasita. Estas são eliminadas pelas fezes e urina do triatomíneo. A infecção pelo *T. cruzi* tem início quando os parasitas eliminados pelo inseto entram em contato com uma lesão na pele ou mucosa do vertebrado. A maneira mais comum de transmissão é a vetorial, através da picada do "barbeiro", que, durante a ingestão de sangue, deposita suas fezes próximas ao local da picada. A picada provoca irritações locais, facilitando o acesso do parasita ao interior do organismo. Caso a picada seja próxima aos olhos ou à boca, o parasita pode penetrar pelas mucosas. Dentro do organismo do vertebrado as formas tripomastigotas metacíclicas do parasita passam por transformação para as formas amastigotas, reproduzindo-se por fissão binária.

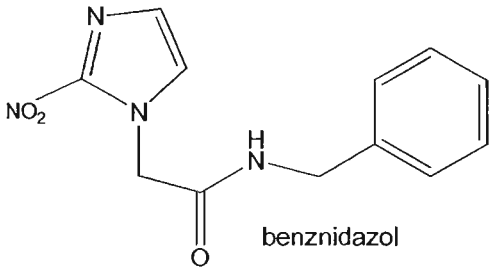
O hospedeiro apresenta hipersensibilidade no local de entrada do parasita com intensa destruição celular. Esta faz com que formas amastigotas se transformem em tripomastigotas, que são liberadas nos vasos periféricos e estarão aptas para infectar novas células em outros pontos do organismo, como músculos lisos e tecido nervoso. Assim, a transformação de amastigotas para tripomastigotas pode ocorrer em outros pontos do organismo, continuando o ciclo da infecção. Com a picada do hospedeiro por um novo agente vetor não contaminado e a ingestão de formas sanguíneas do parasita, junto com sangue do hospedeiro, essas se transformam em formas fusiformes, denominadas epimastigotas. Estas se desenvolvem no aparelho digestivo do parasita e são transmitidas a outros indivíduos vertebrados por meio das excretas do inseto vetor contaminado, ou se estabelecem em reservatórios naturais (COURA, 2007).

1.3 Quimioterapia

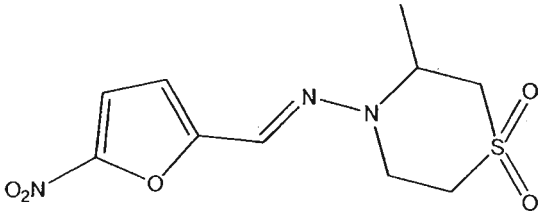
1.3.1 Tripanomicidas atualmente usados

Apesar da tendência de se evitar a presença de grupos nitro-aromáticos como componente estrutural de derivados potencialmente ativos porque eles podem provocar metemoglobinemia, tais compostos têm sido usados na terapêutica desde 1944 (ROSS, 1980; DOCAMPO, MORENO, 1985).

Os tripanomicidas atualmente em uso -- nifurtimox e benznidazol -- causam efeitos adversos graves e são pouco eficazes na fase crônica da doença. Além disso, algumas cepas de *T. cruzi* mostram-se a eles resistentes (FILARDI, BRENER, 1987).



benznidazol



nifurtimox

O *nifurtimox,* (Lampit® Bayer) derivado 5-nitrofurano, foi sintetizado, em 1964, por Herlinger *et al.*, sendo mais ativo contra as cepas argentinas e chilenas do tripanossoma e muito mais eficaz na fase aguda da doença. Inibe tripomastigotas e amastigotas, mas apresenta graves efeitos adversos, como anorexia, náuseas, epigastralgias, convulsões, polineuropatias periféricas e manifestações cutâneas(FRIES, FAIRLAMB, 2003; KOROKOLVAS, 2007).

O *benznidazol* (Rochagan® Roche), derivado 2-nitroimidazol, foi descoberto por pesquisadores da Hoffman-La Roche, em 1969, e é considerado fármaco de escolha para tratamento das tripanossomíases brasileiras. Analogamente ao nifurtimox, é mais eficaz na fase aguda e apresenta efeitos adversos graves, como astemia, tonturas, parestemias, polineuropatias periféricas e hematopoese (FRIES, FAIRLAMB, 2003; KOROKOLVAS, 2007).

Esses compostos apresentam mecanismo de ação citotóxica, que inicialmente envolve uma ou mais reações de redução do grupo nitro, seguidas por inibições de várias enzimas, que são necessárias às exigências energéticas da célula do parasita (DOCAMPO, MORENO, 1985; DOCAMPO, 1990; GRINGAUZ, 1997; FRIES, FAIRLAMB, 2003; KOROKOLVAS, 2007).

1.3.2 Tripanomicidas em estudo

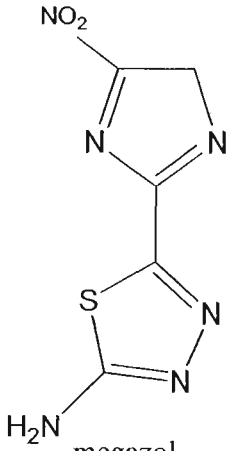
Ao longo dos anos, diversas classes de compostos vêm sendo pesquisadas com o fim de se desenvolver um novo agente antichagásico. Há vários nitro-heterocíclicos com alta atividade antichagásica, sem, contudo, apresentar utilidade terapêutica, face aos efeitos adversos graves que apresentam. Entre eles encontram-se o nitrofural (nitrofurazona) e o megazol. Também, a primaquina, de emprego como antimalárico na terapêutica (KOROLKOVAS, 2007), apresenta atividade antichagásica (DUSCHAK, COUTO, 2007).

Compostos com atividade antifungica, incluindo fármacos como cetoconazol e terbinafina, apresentam atividade tripanomicida. Esses compostos apresentam como possível mecanismo de ação a inibição da biossíntese de esteróides, em fungos é o ergosterol, que são componentes da membrana plasmática do parasita (URBINA, 2002; URBINA, DoCAMPO, 2003,

DUSCHAK, COUTO, 2007).

Outra fonte que vem sendo aproveitada e estudada na busca de novos compostos antichagásicos são os produtos naturais. Diversas classes de compostos, metabólitos de plantas, apresentaram atividade interessante contra o *T. cruzi* (URBINA, 2002; DUSCHA, COUTO, 2007). Dentre essas classes de compostos, oriundos de produtos naturais, podem-se citar: flavonóides chalconas, xantonas, catequinas, antraquinonas, arilfloglucinóis, entre outros (MAYA *et al.* 2007).

O megazol [2-amino-5,1-metil-nitro-2-imidazolil-1,3,4-tiadiazol], derivado nitrotiazólico, foi sintetizado em 1960. Apresenta-se como potente antimicrobiano de amplo espectro, com ação em grande variedade de protozoários e bactérias (BERKELHAMMER, ASATO, 1968; CANÇADO, 1980).



megazol

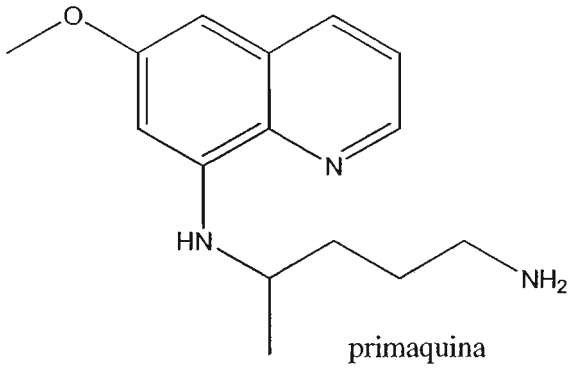
Ensaios realizados mostraram alta atividade antichagásica do megazol em relação a outros nitro-heterocíclicos (BRENER, 1989; MAYA *et al.,* 2007), apresentando atividade curativa em infecções causada por várias cepas do *T. cruzi*, incluindo aquelas resistentes aos fármacos empregados hoje na terapêutica, nifurtimox e benznidazol (FILARDI, BRENER, 1982). Sua atividade apresenta-se superior à do nifurtimox e à do benznidazol (DE CASTRO, MEIRELLES, 1986; LAGES-SILVA, FILARD, BRENER, 1990; ROSSELLI, ALBUQUERQUE, Da SILVA, 2006; CARVALHO *et al.,* 2007).

Esse composto, assim como outros nitro-heterocíclicos estudados como forma aternativa no tratamento da doença de Chagas, apresentam ação citotóxica, envolvendo uma ou mais reações de redução do grupo nitro, gerando derivados nitrosos, hidroxilaminas e aminas, que inibem várias

enzimas, necessárias às exigências energéticas da célula do parasita (DOCAMPO, MORENO, 1985; DOCAMPO, 1990; GRINGAUZ, 1997; LA-SCALEA, 1998; FRIES, FAIRLAMB, 2003; MAYA *et al.* 2007; ROSSELLI, ALBUQUERQUE, Da SILVA, 2006; KOROKOLVAS, 2007).

Recentemente, com o intuito de otimizar a atividade e minimizar a toxicidade do megazol, CARVALHO e colaboradores (2007a,b) realizaram modificações moleculares, utilizando, entre outros métodos, o bioisosterismo na busca de análogos mais ativos e menos tóxicos do que o composto protótipo. .

A primaquina é fármaco de uso na quimioterapia da malária, representando o único esquizonticida tecidual disponível na terapêutica (KOROLKOVAS, 2007). Sua atividade antichagásica experimental foi relatada inicialmente por JARPA (1950) e por RUBIO e PIZZI (1954). Contudo, seu emprego na quimioterapia antichagásica não é usual.



primaquina

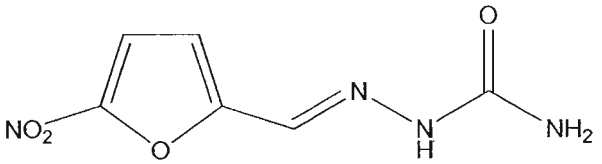
Inicialmente, esse fármaco era considerado de ação primária em formas tripomastigotas extracelulares (PEREIRA DA SILVA, KIRCHNER,1962). Posteriormente, sua ação em formas intracelulares foi relatada por McCABE (1988). Esse mesmo estudo permitiu a comprovação do efeito sinérgico entre a primaquina e o cetoconazol, surgerindo a utilização desse fármaco associado ou não no tratamento da doença de Chagas em sua fase crônica.

Derivados peptídicos de primaquina mostraram-se ativos tanto em formas amastigotas quanto em tripomastigotas em ensaios *in vitro*, em culturas de células infectadas com *T. cruzi* (CHUNG *et al.*, 1997).

Ensaios *in vitro* da associação da primaquina com nitrofural mostraram

efeito sinérgico da mesma (GONÇALVES *et al.,* 1994). Por outro lado, pró-fármacos recíprocos da primaquina e nitrofural, utilizando como espaçantes aminoácidos, dipeptídios e derivados não-peptídicos, mostraram-se ativos em células infectadas por *T. cruzi* (CHUNG,1996). Outra associação da primaquina é aquela proposta por POLLI (2003), por meio de pró-fármacos recíprocos de primaquina e megazol.

1.3.2.1 Nitrofural



nitrofural

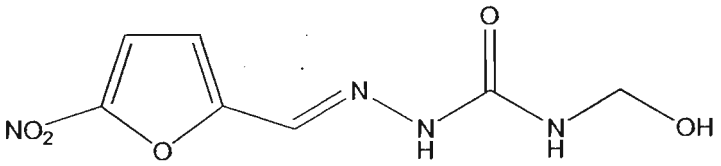
O nitrofural (NF), 5-nitro-2-furfurilidenossemicarbazona, foi sintetizado a partir da atividade bacteriostática do ácido furóico e seus derivados, alquilados e mercuriais (DODD, STILLMAN, 1944). Empregado inicialmente durante a II Guerra Mundial, apresentou amplo espectro de atividade antibacteriana (CRENSHAW *et al.*, 1976). Contudo, em razão da resistência bacteriana, o espectro de atividade foi se modificando ao longo do tempo (KOROLKOVAS, 2007).

Sua toxicidade é alta por via oral, provocando hemólise e neuropatia graves. Hoje é empregado apenas por via tópica, sendo de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas na pele -- feridas, queimaduras e úlceras -- resistentes a outros fármacos (KOROLKOVAS, 2007).

Em 1969, ANDRADE e BRENER observaram que o nitrofural provocava destruição do *T. cruzi.* Mais tarde, HENDERSON e colaboradores (1988) constataram a inibição de naftoquinonas e nitrofuranos, incluindo o nitrofural, sobre a tripanotiona redutase.

A formação do nitro radical aniônico a partir do nitrofural, anteriormente observada por MORENO (1983) e responsável pelo mecanismo de ação tripanomicida do fármaco, foi, também, comprovada, por meio de geração eletroquímica, com o uso de eletrodo de carbono vítreo (LA-SCALEA, CHUNG, FERREIRA, 1999).

Trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, desenvolvido por CHUNG (1996), utilizando o nitrofural como fármaco de partida para a síntese de derivados peptídicos junto à primaquina, mostrou que o intermediário de síntese das bases de Mannich respectivas, o hidroximetilnitrofural (CHUNG *et al.*, 2003), era mais ativo e menos tóxico do que aquele nitro-heterocíclico. O aspecto altamente promissor desse composto, além da atividade tripanomicida *in vitro*, foi a diminuição da toxicidade em quatro vezes, comparativamente ao nitrofural, segundo o observado nos testes de mutagenicidade (GÜIDO *et al.*, 2001; CHUNG *et al.*, 2003). Tais intrigantes resultados conduziram à necessidade de aprofundamento do estudo acerca do mecanismo de ação/toxicidade desse derivado e bases de Mannich derivadas, propostas como mais estáveis, foram sintetizadas (TROSSINI, 2004). Para melhor caracterização do composto foi realizando estudo de cristalografia de raio X (DORIGUETTO *et al.,* 2005). Com o propósito de se obter maior quantidade de NFOH realizou-se estudo de otimização de sua síntese, utilizando método de quimiometria, por meio de planejamento fatorial 3^2, verificando-se o ponto de maior rendimento, 88%, com 7,5 horas de reação (TROSSINI *et al* 2008).



hidroximetilnitrofural

AGUIRRE e colaboradores (2004), em trabalho realizado com análogos do NF contendo semicarbazona e tiossemicarbazona em suas estruturas, estudaram um segundo mecanismo de ação para esse tipo de compostos relacionado à ligação covalente com a cruzipaína. Esse mecanismo foi proposto por DU e colaboradores, em 2002 (Figura 1.3) e compreende a interação da tiocarbonila das tiossemicarbazonas com a Cys25 da cruzipaína.

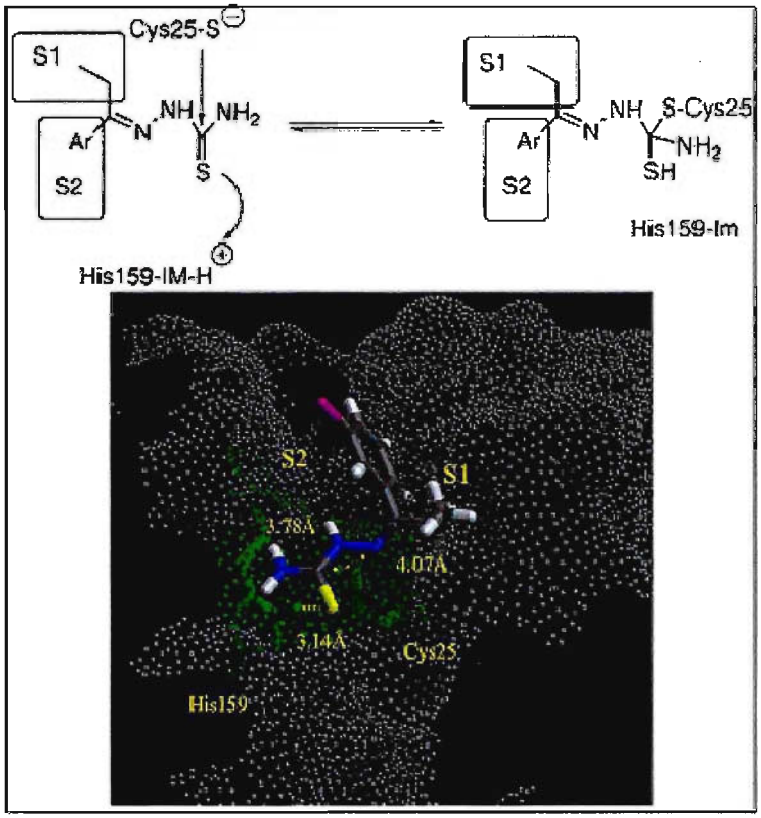


Figura 1.3 – Proposta de mecanismo de ação na cruzipaína para as tiossemicarbazonas, demonstrando a interação entre a tiocarbonila e a Cys25 da cruzipaína. Apresenta-se o *docking* da tiossemicarbazona com a cruzipaína (DU *et al.*, 2002).

1.4 Alvos bioquímicos na pesquisa de novos antichagásicos

As diferenças nas vias metabólicas entre o agente causador de uma doença e o hospedeiro humano são excelentes alvos terapêuticos para o planejamento racional de fármacos (COURA, DE CASTRO, 2002; URBINA, DOCAMPO, 2003; LESPINET, LABEDAN, 2006; GUIDO, OLIVA, ADRICOPULO, 2008). O conhecimento desses alvos, graças ao desenvolvimento da genômica, proteômica e da bioinformática, permite antever futuro mais promissor na pesquisa de novos antichagásicos (FAIRLAMB, 1999; DUSCHAK, COUTO, 2007).

É sabido que o arsenal terapêutico hoje utilizado na quimioterapia contra a doença de Chagas, além de apresentar eficiência questionável, é composto

por fármacos que apresentam graves efeitos adversos ao paciente. Torna-se, pois, urgente a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos antichagásicos menos tóxicos, mais seletivos e eficientes. Com essa finalidade é fundamental que se conheçam as vias metabólicas do parasita caracterizando enzimas e componentes específicos e suas diferenças com as vias metabólicas do hospedeiro, o que permite, assim, identificar possíveis alvos bioquímicos (ZINGALES, COLLI, 1985; COURA; DE CASTRO, 2002; URBINA, DOCAMPO, 2003; DUSCHAK, COUTO, 2007).

Entre os alvos mencionados, sobressaem as proteases envolvidas em todas as etapas de vida do parasita e, também, nos processos de invasão celular e modificação da resposta imune do hospedeiro (McKERROW *et al.*, 1995; CAZZULO, STOKA, TURK, 2001). A tripanotiona redutase e as enzimas auxiliares do sistema antioxidante complexo e peculiar, utilizado pelo protozoário para se defender do hospedeiro (FAIRLAMB, CERAMI, 1985; FAIRLAMB *et al.*, 1985; JOCKERS-SCHERUBL, SCHIRMER, KRAUTH-SIEGEL,1989; LOPEZ *et al., 2000*). Os glicoconjugados da superfície do parasito e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossômica, enzima da via glicolítica, exercme papel central no processo de glicólise do parasita(SOUZA *et al.*, 1998; COLLI, ALVES, 1999, VERLINDE *et al.* 2001). Biossíntese de esteróides, farnesiltransferase, síntese de poliisoprenóides, metabolismo de pirofosfato e trans-sialidadeses, entre outros, também são alvos de grande importância na busca de especificidade de ação de compostos contra o *T. cruzi* (URBINA, 2003; DUSCHAK, COUTO, 2007).

1.4.1 Cisteína-Proteases

As proteases de protozoários são alvos interessantes devido ao seu papel na replicação, metabolismo, sobrevivência e patologia das protozooses (McKERROW *et al.*, 1995). Entre as proteases de interesse, as cisteína-proteases são as enzimas mais abundantes na maioria dos protozoários responsáveis por parasitoses humanas. Estas são capazes de hidrolisar ligações peptídicas e, dependendo da posição na cadeia peptídica em que promovem a hidrólise, são classificadas em endopeptidases ou exopeptidases.

As cisteína-proteases apresentam um grupo tiol no seu sítio ativo e estão presentes em vírus, bactérias, protozoários, plantas, mamíferos e fungos. Em protozoários observa-se a presença de diversas cisteína-proteases, as quais têm papel fundamental na nutrição do parasita e na invasão das células hospedeiras (OTO, SCHIRMEISTER, 1997; CAZZULO, STOKA, TURK, 2001; ALVES *et al.*, 2002).

A cisteína-protease cruzipaína (CAZZULO *et al.*, 1990a,b) está, provavelmente, implicada no desenvolvimento do *T. cruzi* e na diferenciação dos vários estágios do ciclo biológico do parasito, na invasão no hospedeiro e na alteração da resposta imune do hospedeiro (SCHARFSTEIN *et al.*, 1986; MEIRELLES *et al.*, 1992; CHAGAS *et al.*, 1997; DEL NERY *et al.*, 1997; ALVES *et al.*, 2001). Trata-se da cisteína-protease mais abundante do tripanossoma (CAZZULO, STOKA, TURK, 1997) e é o antígeno imunodominante, reconhecido durante a infecção humana (CHAGAS *et al.*, 1997; DEL NERY *et al.*, 1997). É codificada por mais de 100 cópias de genes polimórficos localizados em vários cromossomos. Entretanto, a despeito do polimorfismo genético, a cruzipaína é uma das proteases parasitárias mais bem caracterizadas (CAZZULO, 1999; CAZZULO, STOKA, TURK, 2001). Essa enzima é encontrada próximo à superfície do parasita intracelular. Tem massa molecular de aproximadamente 60 kDa e é uma glicoproteína ativada por β-mercaptoetanol ou glutationa reduzida, sendo inibida por organomercuriais, TLCK (tosilisilclorometilcetona), TPCK (tosilfenilalanilclorometilcetona), leupeptina, quimostatina e antipaína. É encontrada nos lisossomas do parasito (Mc GRATH *et al.*, 1995; DEL NERY *et al.*, 1997; CAZZULO *et al.*, 2001).

Todas as variedades moleculares relatadas até agora apresentam a tríade catalítica característica das cisteína-proteases e organização estrutural similar à das proteases lisossômicas de mamíferos, semelhantes à papaína (DEL NERY *et al.*, 1997; CAZZULO *et al.*, 2001). Ao contrário destas últimas, entretanto, a cruzipaína tem uma cadeia C terminal, que pode ser liberada por auto-proteólise. O tamanho dessa cadeia varia de 100 a 130 resíduos de aminoácidos e a seqüência entre o domínio catalítico e o domínio terminal C, contendo grupamentos de Thr, Pro e Ser, é suscetível à clivagem proteolítica. A função desse domínio terminal C ainda permanece incerta. Propõe-se que ele esteja envolvido não só na diminuição da resposta imune do hospedeiro e

no aumento da atividade catalítica (SERVEAU *et al.*, 1996; DEL NERY *et al.*, 1997; STOKA *et al.*, 1998), como também na invasão da célula do hospedeiro, ligação às células-alvo, replicação intracelular e diferenciação do parasita (SERVEAU *et al.*, 1996; DEL NERY *et al.*, 1997; CAZZULO *et al.*, 2001), funções que seriam atribuídas, também, à porção *N* terminal. Tais funções, importantes nos vários estágios do ciclo biológico do parasito, fazem da cruzipaína excelente alvo para inibidores específicos e irreversíveis, que podem ser usados para o desenvolvimento de novos quimioterápicos. Muitas tentativas nesse sentido foram realizadas e bem sucedidas, resultando em inibição da invasão da célula hospedeira e do desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* (SERVEAU *et al.*, 1996).

A presença de cruzipaína nas formas intra e extracelular do *T. cruzi* tem estimulado bastante a tentativa de se desenvolver a primeira geração de inibidores, com alta eficácia *in vitro*. Alguns desses compostos têm apresentados excelentes resultados em experimentos realizados com camundongos infectados com *T. cruzi* (SERVEAU *et al.*, 1996). A cruzipaína é membro da super família das proteases parasitárias denominada "*papaín like*", apresentando no sítio catalítico e no C terminal homologia com a enzima que dá nome a essa família, a papaína (CAZZULO *et al.*, 1995; DUSCHAK *et al.*, 2006). Essa enzima apresenta alto grau de homologia não só com a papaína, mas também com catepsinas, que fazem parte desta família, principalmente as catepsinas L e S (CAZZULO, STOKA, TURK, 2001). À vista das relações estrutural e funcional próximas entre as cisteína-proteases parasitárias e as proteases do hospedeiro relacionadas à papaína, os mesmos substratos e inibidores usados, até agora, para experimentos com a cruzipaína são aqueles atualmente utilizados para as catepsinas lisossômicas L e B de mamífero (SERVEAU *et al.*, 1996). A cruzipaína preserva a tríede catalítica da família da papaína (*Cys25*, *His159*, e *Asn175*) e uma cavidade para acomodar um oxiânion, proveniente da catálise no sítio S1' (*Cys25* e *Gln19*) (OTTO, SCHIRMEISTER, 1997).

Do melhor conhecimento da especificidade do substrato das cisteína-proteases do parasita e sua sensibilidade aos inibidores depende o desenvolvimento de novos fármacos que diferenciem as proteases do parasita e do mamífero.

O isolamento e a purificação da cruzipaína foram realizados a partir de epmastigotas do do *T.cruzi,* por BONTEMPI e colaboradores (1984). Sua forma recombinante, que preserva a unidade catalítica, e é denominada cruzaína, foi expressa pela utlização de Biologia Molecular com a introdução de um plasmído contendo o gene de expreção em cepa de *Escherichia coli* por EAKIN e colaboradores (1992). Estudos comparativos das formas selvagem, natural do parasita e recombinante da enzima foram realizados por JUDICE, em 2001, e não apresentaram diferenças significativas em relação à especificidade, estabilidade ou aos parâmetros bioquímicos de ativação e catálise enzimática.

A compreensão da especificidade da cruzaína no seu sítio ativo e nos bolsos acessórios da cavidade catalítica da enzima é de grande impotância para o planejamento de novas alternativas quimioterápicas para a doença de Chagas (CAZZULO, STOKA, TURK, 2001, JAISHANKAR *et al.,* 2008). A cruzipaína tem preferência por substratos contendo resíduos hidrofóbicos não-aromáticos na posição P_2 (Arg, Leu, Phe ou Val) (MEIRELLES *et al.*, 1992; DEL NERY *et al.*, 1997; GILLMOR *et al.*, 1997; HARRIS *et al.*, 2000; LECAILLE *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2001a). Compartilha interessantes propriedades com a calicreína tecidual humana, por exemplo, a habilidade de hidrolisar eficientemente substratos contendo Arg ou Lys na posição P_1 (CAZZULO *et al.,* 1990a; DEL NERY *et al.*, 1997b; ALVES *et al.*, 2001b;). As posições *P3* e *P4* podem acomodar grande diversidade de resíduos. A posição *P3* apresenta preferência por resíduos básicos (HARRIS *et al.*, 2000; SERVEAU *et al.*, 1999), enquanto que a posição *P4* tem pouca afinidade por resíduos hidrofóbicos (DEL NERY *et al.*, 1997b). A figura 1.4 apresenta representação esquemática da clivagem pepetídica realizada pela cruzipaína.

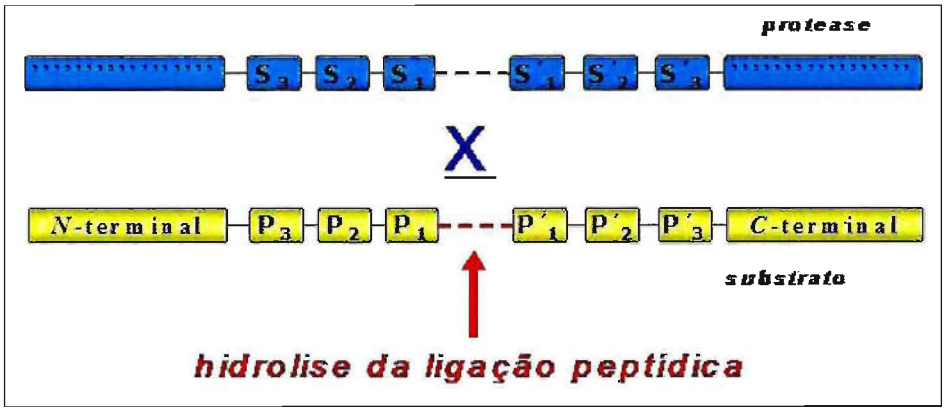


Figura 1.4 – Representação esquemática da ligação de protease com o substrato (McKERROW, McGRATH, ENGEL, 1995).

Os primeiros inibidores de cruzipaína apresentaram resíduos com grupamentos aromáticos em P_2 (MEIRELLES *et al.*, 1992). Ainda que a presença de Leu, Val ou mesmo Tyr na posição X não induza alteração dramática nos valores da constante de especificidade da cruzipaína, o bolso S_2 não pode acomodar eficientemente a grande cadeia lateral do Trp. A presença de Ala na posição P_2', assim como observado para a papaína, tem efeito muito favorável na suscetibilidade do substrato à cruzipaína (DEL NERY *et al.*, 1997).

O subsítio S_1 das cisteína-proteases tem especificidade menos definida que o subsítio S_2 e a maioria dos seus substratos comuns contém Arg como resíduo P_1. A cruzipaína mostrou preferência marcante por resíduos de Phe, Cys(tBu), Leu e Tyr em P_1, enquanto que os substratos contendo cadeias laterais ß ramificadas, tais como Ile e Val, foram mais resistentes à hidrólise (DEL NERY *et al.*, 1997, ALVES *et al., 2001a*).

A cruzipaína mostrou grande suscetibilidade aos substratos com His na posição P_1, o que foi consistente com a observação de uma clivagem auto-catalítica no resíduo His na região do propeptídio da cruzipaína recombinante (DEL NERY *et al.*, 1997).

Diversas classes químicas têm sido ensaiadas como inibidores da cruzipaína (MEIRELLES *et al.*, 1992). Derivados fluorogênicos foram recentemente estudados com o objetivo de se alcançar maior especificidade à cruzipaína em relação a proteases de mamíferos. Alguns deles discriminam a cruzipaína das enzimas correlatas de mamíferos, a despeito da dupla especificidade de catepsina B e L que a cruzipaína apresenta (CHAGAS *et al.*,

1997).

Peptídios derivados de fluormetilcetonas (FMK) são substratos análogos, que inibem irreversivelmente as cisteína-proteases. Tanto as peptidilfluormetilcetonas como o homólogo peptidildiazometano se mostraram excelentes inibidores da cruzipaína, sendo que o derivado Z-Phe-Arg-FMK apresentou maior atividade que o derivado Z-Phe-Ala-FMK frente à enzima purificada. A ação nos diferentes estágios do ciclo biológico do *T. cruzi* foi comprovada (HARTH *et al.*, 1993; MEIRELLES *et al.*, 1992). Observou-se baixa toxicidade dos inibidores peptidil FMK para as cobaias e células de mamíferos, quando comparada à toxicidade para o parasito em cultura. Essa seletividade biológica pode refletir adaptação do *T. cruzi* à vida dentro das células dos mamíferos – a fim de manter seu ciclo de replicação de 7 horas, a forma intracelular amastigota tem que ser eficiente captador de pequenas moléculas no citoplasma da célula hospedeira. Sua localização no citoplasma, ao invés de estar no interior de uma organela intracelular, também facilita a captação do inibidor. A localização do inibidor por microscopia de fluorescência sugere que muito pouco, ou nenhum, inibidor tem acesso às catepsinas no compartimento lisossômico das células hospedeiras infectadas (McGRATH *et al.*, 1995).

Alguns inibidores específicos da cruzipaína foram desenvolvidos racionalmente por meio de estudos de Relação Estrutura-Atividade (REA) (Figura 1.5). Estes promovem inibição seletiva desta protease, bloqueando a proliferação tanto das formas extracelulares epimastigotas quanto das formas intracelulares amastigotas e impedem a metaciclogênese (transformação das formas epimastigotas em tripomastigotas) *in vitro*, indicando o papel essencial dessa enzima na sobrevivência e crescimento do parasita (URBINA, DOCAMPO, 2003).

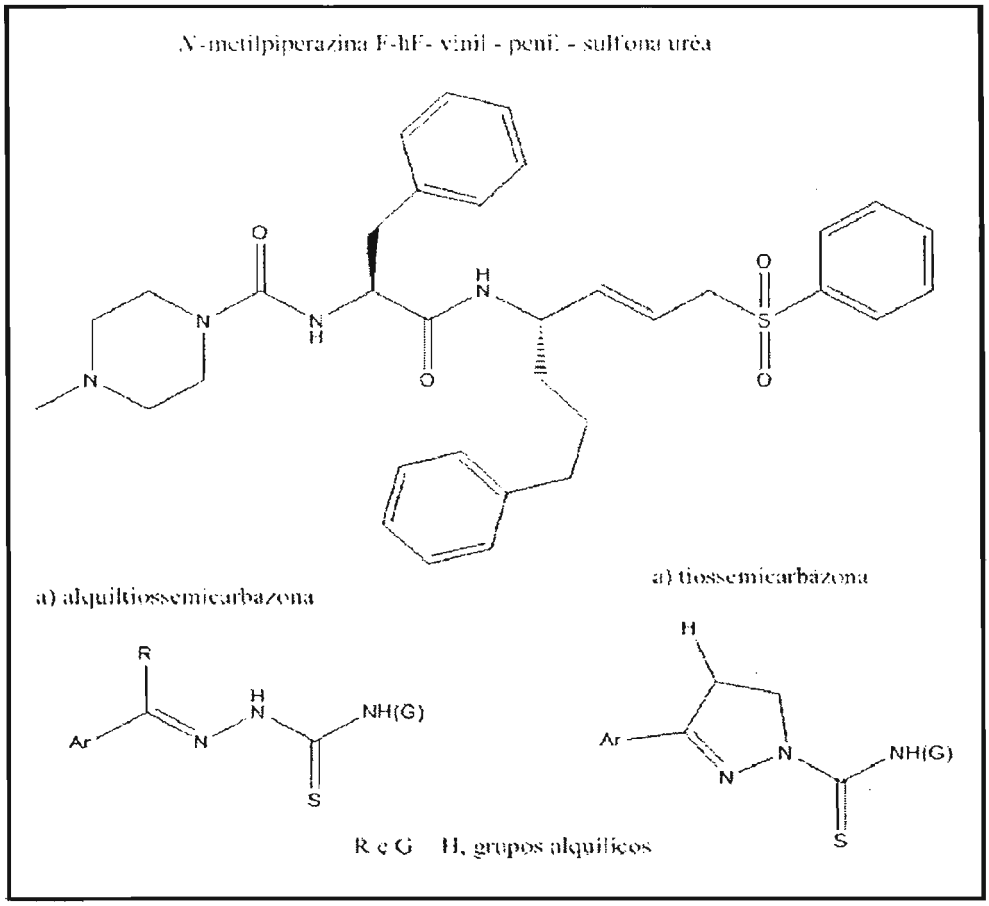


Figura 1.5 – Inibidores seletivos de cruzipaína racionalmente planejados por REA.

O conhecimento da estrutura cristalina da cruzipaína (Figura 1.6) mostrou-se como ferramenta importante em estudos com a finalidade de desenvolver inibidores seletivos desta enzima, resultando em inibição da invasão da célula hospedeira e do desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* (SERVEAU *et al.*, 1996; GILMOR *et al.* 1997).

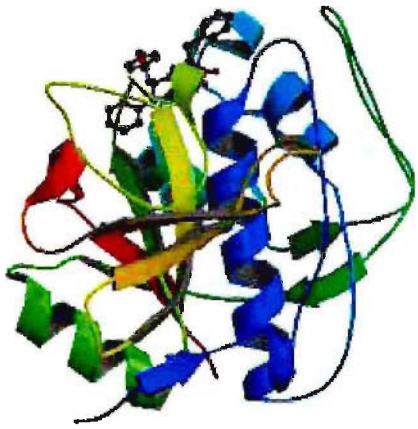


Figura 1.6 - Estrutura cristalina da cruzipaína. *Fonte*: www.rcsb.org/pdb (1ME4)

A pesquisa de inibidores da cruzipaína (cruzaína), atualmente é realizada com auxílio de técnicas modernas de planejamento de fármacos, que envolvem a química computacional, selecionando, com sucesso, classes de compostos não-peptídicos como inibidores (DUSCHAK, COUTO, 2007). Apresentamos destaque para o grupo das semi e tiossemicarbazonas, as quais apresentam afinidade pela cruzaína com potente grau de inibição (DU *et al.,* 2002, AGUIRRE *et al.,* 2004; AGUIRRE *et al.,* 2006; SILES *et al.,* 2006).

1.4.2 Tripanotiona Redutase

Todos os organismos aeróbios apresentam defesa contra o estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio, geradas durante o metabolismo oxidativo, entre elas ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e seus subprodutos. Essas espécies danificam biomoléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos. Como prevenção de danos celulares é utilizado um sistema de defesa, compreendido por várias enzimas e moléculas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase, várias peroxidases e o sistema glutationa (CHANGE, SIES, BOVERIS, 1979; CADENAS, 1989).

Nas células de mamíferos, a principal via de destoxificação de peróxido de hidrogênio envolve a glutationa peroxidase, agindo junto com a NADPH, glutationa e glutationa redutase (FLAIRLAMB, CERAMI, 1992).

É bem conhecida e relatada a deficiência do sistema de destoxificação

do *T.cruzi* frente ao estresse oxidativo (VIODÉ *et al.*, 1997). Esse parasita não tem catalase e glutationa peroxidase e a glutationa redutase é substituída por enzima específica do parasito, denominada tripanotiona redutase (FAIRLAMB, CERAMI, 1985; FAIRLAMB *et al.*, 1985; JOCKERS-SCHERUBL, SCHIRMER, KRAUTH-SIEGEL,1989; HENDERSON *et al.*, 1991). A tripanotiona redutase constitui-se, também, em um dos principais alvos do planejamento de novos antichagásicos (FAIRLAMB, 1999).

Inibidores de tripanotiona redutase são considerados como antichagásicos potenciais (CHAN *et al.*, 1995, 1998). Neste particular, os compostos nitro-heterocíclicos constituem-se em excelentes candidatos, por meio dos seus correspondentes ânions radicais, por interferirem com o metabolismo do oxigênio (AUGUSTO *et al.*, 1986; KOROLKOVAS, 1988; TSUHAKO *et al.*, 1989; DOCAMPO, 1990; DE CASTRO, MEIRELLES, 1992; GRINGAUZ, 1997; VIODÉ *et al.*, 1997, URBINA, 2003; DUSCHAK, COUTO, 2007).

A inibição da triapanotiona redutase se dá por inibidores seletivos, que impedem a redução do substrato fisiológico, o dissulfeto de tripanotiona, comprometendo, dessa maneira, o sistema de defesa redox do parasita, tornando-o mais sensível a fármacos que agem por oxi-redução, como os nitrocompostos (WALSH, BRADLEY, NADEAU, 1991; GIRAULT *et al.,* 1997, D'SILVA, DAUNES, 2000). É, portanto, essencial o conhecimento da estrutura cristalina (Figura 1.7) da tripanotiona redutase para o desenvolvimento de fármacos seletivos com a capacidade de inibir a enzima.

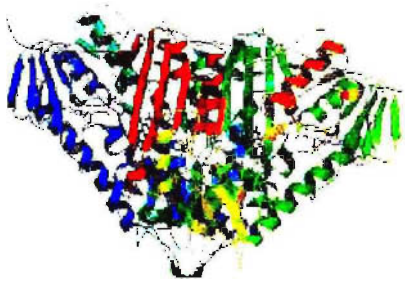


Figura 1.7 - Estrutura cristalina da tripanotiona redutase.
Fonte: www.rcsb.org/pdb (1AOG)

1.4.3 Biossíntese de Esteróides

A rota biossíntetica de esteróides representa importante alvo contra a doença de Chagas (COURA, CASTRO, 2002; DUSCHAK, COUTO, 2007). O *T. cruzi* necessita de esteróides específicos para a viabilidade e proliferação em todas as fases do ciclo de vida. Por tal razão, esta via é extremamente suscetível à ação de inibidores (URBINA, DOCAMPO 2003; DUSCHAK, COUTO, 2007). Dentre eles, encontram-se diversos antifúngicos e antiprotozoários, tanto os já comercializados como aqueles em estudo (Figura 1.8).

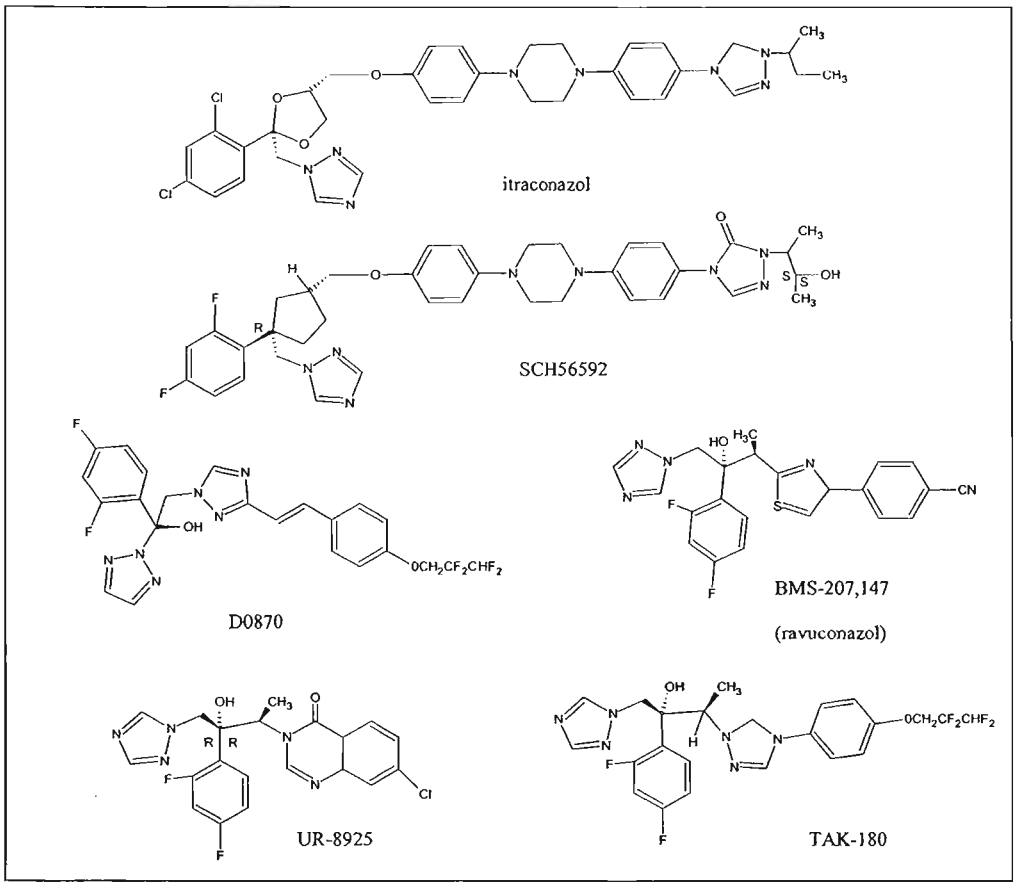


Figura 1.8 – Compostos azólicos estudados como possíveis antichagásicos (URBINA, DOCAMPO, 2003).

Esses compostos azólicos apresentam mecanismo de ação baseado no bloqueio na síntese de esteróides, inibindo a formação do ergosterol e de seu precursor, o lanosterol, através da inibição da enzima lanosterol 14α-

desmetilase dependente do citocromo P-450. Tal bloqueio resulta em acúmulo de lanosterol e perda de ergosterol. A enzima 14α-desmetilase também está presente em mamíferos, porém sua sensibilidade é consideravelmente menor que a enzima presente no *Trypanosoma*. Devido à essa especificidade de bloqueio na rota biossintética do parasita em relação ao hospedeiro, tais quimioterápicos podem representar importantes alternativas para o tratamento da doença de Chagas (DOCAMPO, SCHMUÑIS, 1997; DUSCHAK, COUTO, 2007).

1.4.4 Metabolismo de Pirofosfato

O *T. cruzi* apresenta organelas especiais, como os acidocalcissomas envolvidos no armazenamento de cátions e polifosfatos e na adaptação deste microrganismo ao estresse oxidativo. A captação de cálcio é realizada por matriz acidocalcissômica e regulada por série de mecanismos, os quais incluem Ca^{+2} ATPase, NA^{+}/H^{+} mutante, bomba de H^{+}/ATPase e polifosfatases (DOCAMPO, MORENO, 2001). Bifosfonatos análogos do pirofosfato (Figura 1.9), usados no tratamento de disfunções de reabsorção de ossos, têm apresentado atividade *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi*. Eles são seletivamente acumulados no parasita e podem inibir enzimas envolvidas em reações orgânicas e inorgânicas do pirofosfato com a farnesil-pirofosfato-sintetase e com a bomba de H^{+}-pirofosfatase. Constituem-se, pois em quimioterápicos promissores para parasitos tripanossomatídeos e apicomplexos (URBINA, DOCAMPO, 2003; DUSCHAK, COUTO, 2007).

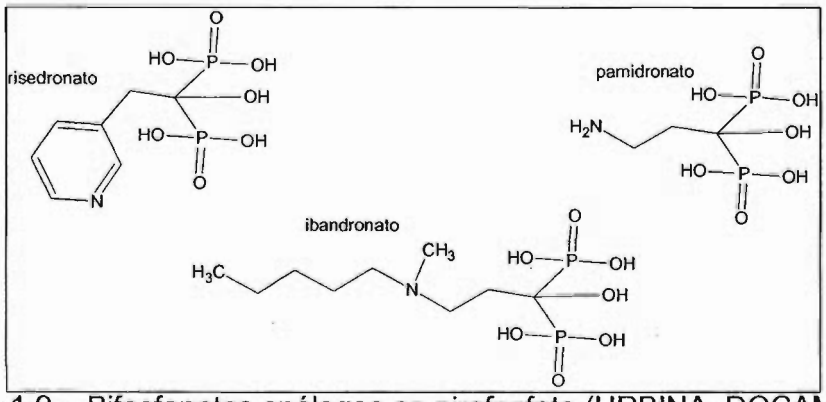
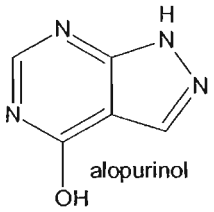


Figura 1.9 – Bifosfonatos análogos ao pirofosfato (URBINA, DOCAMPO, 2003).

1.4.5 Purinas

Os parasitas da classe *Tripanosomatidae* são extremamente deficientes na biossíntese *de novo* de purinas. No entanto, purinas são essenciais para o seu desenvolvimento e crescimento. A enzima chave desta rota é a hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT), tornando-se importante alvo bioquímico para esses parasitas (URBINA, DOCAMPO, 2003; DUSCHAK, COUTO, 2007). O alopurinol, fármaco utilizado no tratamento de gota, é metabolizado a oxipurinol em humanos e ambos são potentes inibidores de xantina oxidases (KOROLOLVAS, 2007). Nos *tripanossomatídeos*, que são deficientes em xantina oxidases, o alopurinol é incorporado ao DNA, impedindo a síntese de RNA e de proteínas. Esse fármaco tem sido considerado possível agente antichagásico, tanto *in vitro* como *in vivo* (URBINA, DOCAMPO, 2003; DUSCHAK, COUTO, 2007).



alopurinol

Observa-se, pelo exposto, a importância de se explorarem etapas biossintéticas e enzimas dos parasitos, que diferem daquelas do hospedeiro, com vistas a buscar novos e seletivos quimioterápicos contra a parasitose. Ainda que as pesquisas de novos alvos despertem maior interesse, essa ainda é área carente, que merece investimento, sobretudo face ao problema que a parasitose represente e a emergência de se encontrar alternativas quimioterapêuticas realmente eficazes.

1.5 Referências Bibliográficas

AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; FERNANDEZ, M.; GONZALEZ, M.;DENICOLA, A.; OTERO, L.; GAMBINO, D.; RIGOL, C.; OLEA-AZAR, C.; FAUNDEZ, M. *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.*, v.12, p. 4885-4893, 2004.

AGUIRRE, G.; BOIANI, M.; CABRERA, E.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; DENICOLA, A.; SANT'ANNA, C. M.; BARREIRO, E. J. New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of Trypanosoma cruzi growth. 3D-QSAR (CoMFA) studies. *Eur. J. Med. Chem.* v. 41, p. 457-66, 2006.

ALVES, L. C.; MELO, R. L.; CEZARI, M. H. S.; SANDERSON, S. J.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. Analysis of the S-2 subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of Leishmania mexicana, and cruzain of *Trypanosoma cruzi*, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. *Mol. .Biochem.. Parasitol.,*. v. 117, p. 137-143, 2001a.

ALVES, L. C.; MELO, R. L.; SANDERSON, S. J.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; CALIENDO, G.; SANTAGADA, V.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. S-1 subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana* compared with cruzain, human cathepsin L and papain using substrates containing nonnatural basic amino acids. *Eur. J. Biochem.*, v. 268, p. 1206-1212, 2001b.

ANDRADE, Z. A.; BRENNER, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 11, p. 222-228, 1969.

ARAÚJO, A. J. G.; SABROZA, P. J.; SILVA, L. F. R. F. Epidemiologia: situação atual. [www.fiocruz.br/chagas]. Acesso em 3 de fevereiro de 2008.

AUGUSTO, O.; ALVES, M. J. M.; COLLI, W.; FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Primaquine can mediate hydroxyl radical generation by *Trypanosoma cruzi* extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 135, p. 1029-1034, 1986.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal*: as bases moleculares da terapêutica. Porto Alegre: Artmed, 2008. 271-341p.

BERKELHAMMER, G.; ASATO, G. 2-amino-5-91-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)1,3,4-thiadiazole: a new antimicrobial agent. *Science*, v. 162, p. 1146, 1968.

BONTEMPI, E., DECAZZULO, B. M., RUIZ, A. M., CAZZULO, J. J. Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of trypanosoma-cruzi. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.*, v.77, p. 599-604, 1984.

BRENER, Z. A. A descoberta. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v. 84 (supl II), p. 1-6, 1989.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem*, v. 58, p. 79-110, 1989.

CANÇADO, J. P. Forma aguda da doença de Chagas no Brasil. *Rev. Assoc. Med. Bras.,* v. 26, p. 285-288, 1980.

CARDOSO, A. V. N.; LESCANO, S. A. Z.; AMATO NETO, V.; GAKIYA, E.; SANTOS, S. V. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. *Rev. Inst. Med. Trop.,* v. 48, p. 287-289, 2006.

CARVALHO, S. A.; LOPES, F. A.; SALOMÃO, K.; ROMEIRO, N. C.; WARDELL, S. M.; DE CASTRO, S. L.; DA SILVA, E. F.; FRAGA, C. A. M. Studies toward the structural optimization of new Brazilian zone related trypanocidal 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, v.16, p. 413-421, 2007.

CARVALHO, S. A.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; ROMEIRO, N. C.; CASTRO, S. L.; BOECHAT, N. Design, synthesis and activity against *Trypanosoma cruzi* of azaheterocyclic analogs of megazol. *Med. Chem.*, v. 3, p. 460-465, 2007.

CAZZULO, J. J.; CAZZULO FRANKE, M. C. I.; MARTINEZ, J.; FRANKE DE CAZZULO, B. M. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi. Biochim. Biophys. Acta*, v. 1037, p. 186-191, 1990a.

CAZZULO, J. J.; HELLMAN, V.; COUSO, R.; PARODI, A. J. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanossoma cruzi.* Absence of phosphorylated mannose residues. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 38, p. 41-8, 1990b.

CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK. V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi. Biol. Chem.*, v. 378, p. 1-10, 1997.

CHAGAS, J. R.; AUTHIE, E.; SERVEAU, C.; LALMANACH, G.; JULIANO, L.; GAUTHIER, F. A comparison of the enzymatic properties of the major cysteine proteinase from *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 88, p. 85-94, 1997.

CHAN, C.; YIN, H.; GARFORTH, J.; MCKIE, J. H.; JAOUHARI, R.; SPEERS, P.; DOUGLAS, K. T.; ROCK, P. J.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; FAIRLAMB, A. H. Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. *J. Med. Chem.*, v. 41, p. 148-156, 1998.

CHAN, C.; YIN, H.; GARFORTH, J.; MCKIE, J.H.; JAOUHARI, R. A; DOUGLAS, K. T.; FAIRLAMB, A. H.; CROFT, S. L. Inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal drugs. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 23, p. 511S. 1995.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, v. 59, p. 527-605, 1997.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; SANTOS, J. L.; GIAROLLA, J.; RANDO, D. G.; ALMEIDA, A. E.; BOSQUESI, P. L.; MENEGON, R. F.; BLAU, L. Prodrugas fo tthe treatment of neglectef diseases. *Molecules,* v. 13, p. 616-677, 2008.

CHUNG, M. C.; GONÇALVES, M. F.; COLLI, W.; FERREIRA, E. I.; MIRANDA, M. T. M. Synthesis and *in vitro* activity of dipeptide prodrugs of primaquine potentially antichagasic. *J. Pharm. Sci.*, v. 86, p. 1127-1131, 1997.

CHUNG, M. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. T.; GÜIDO, R. V. C.; VARANDA, E. A.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and *in vitro* antichagasic activity of hydroxymethylnitrofurazone, a prodrug of nitrofurazone. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 11, p. 4779-4783, 2003.

CHUNG, M. C. *Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de NF e primaquina potencialmente antichagásicos*. São Paulo, 1996, 196p. [Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

CHUNG, M. C.; SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GUIDO, R. V. C.; NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E.I. Avanços na latenciação de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 41, p. 155-179, 2005.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem, Inst. Oswaldo Cruz,* v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 3-24, 2002.

CRENSHAW, C. A.; GLANGES, E.; STUART, B. H.; PIERCE, J. Nitrofurazone therapy in "middle burns": a review. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.*, v. 19, p. 487-492, 1976.

DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. L. Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivative upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v. 85, p. 95-99, 1990.

DEL NERY, E; JULIANO, M. A.; LIMA, A. P.; SCHARFSTEIN, J.; JULIANO, L. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi. J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 25713-25718, 1997.

DIAS, J. C. P. *Chagas' disease – American trypanosomiases: its impact on transfusion and clinical medicine.* In: http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter4.html, 1992.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniqüidade e doença de Chagas. *Cad. Saúde Pública*, v.23, Sup 1, p.S13-S22, 2007.

DIAS, J. C.; PRATA, A.; CORREIA, C. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev. Inst. Med. Trop.,* v. 41, p. 193-196, 2008.

DIAS, J. C. P. *Doença de Chagas*: clínica e terapêutica. Brasília, DF: Ministério da Saúde, SUCAM, 1990.

DIAS, J. C. P. *Doença de Chagas*: epidemiologia e prevenção. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 63, p. 451-455, 1994.

DIAS, J. C. P.; BRENER, S. Chagas' disease and blood transfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, , v. 79, supl., p. 139-147, 1984.

DIAS, J. C. P.; JATENE, A. D. Doença de Chagas no Brasil – Situação atual e perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 25, supl. 3, p. 6-8, 1992.

DNDi – Drugs for Neglected Disease initiative, 2008. Disponível em: http://dndi.org/. Acessado em: 23/07/2008.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem. Biol. Interact.*, v.73, p.1-27, 1990.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *T. cruzi*. *Rev. Infect. Dis.*, v. 6, p. 233-238, 1984.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of American trypanosomes. *Rev. Biochem. Toxicol.*, v. 7, p. 159-204,1985.

DODD, M. C.; STILLMAN, W. B. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. *J. Pharmacol. Exp.Ther.*, v. 82, p. 11-18, 1944.

DORIGUETTO, A. C.; PAULA SILVA, C. H. T.; ELLENA, J.; TROSSINI, G. H. G.; CHUNG M. C.; FERREIRA, E. I. 5-Nitro-2-furaldehyde N-hydroxymethyl)semicarbazone. *Acta Crystal. Section E- Structure Reports*, v. 61, p. 2099-2101, 2005.

D'SILVA, C.; DAUNES, S. Structure-activity study on the in vitro antiprotozoal activity of glutathione derivatives. *J. Med. Chem.*, v. 43, p. 2072-2078, 2000.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med Chem.*, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An Insight on targets and pantented drugs for chemotherapy of Chagas Disease, *Recent Patents Anti-Infect. Drug Discov.*, v. 2, p. 19-51, 2007.

EAKIN, A. E., MILLS, A. A., HARTH, G., MCKERROW, J. H., CRAIK, C. S., The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Bio.Chem.*, v. 267, p. 7411-7420, 1992.

FAIRLAMB, A. H. Future prospects for the chemotherapy of Chagas' disease. *Med. Buenos Aires*, v. 59, p. 179-187, 1999.

FAIRLAMB, A. H.; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B. T.; CERAMI, A. Trypanothione: a novel *bis*(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, v. 227, p. 1485-7, 1985.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Identification of a novel thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biol. Parasitol.*, v. 14, p. 187-198, 1985.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanotione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 46, p. 695-729, 1992.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas'-disease. *T. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, p. 755-759, 1987.

FREIS, D. S.; FAIRLAMB, A. H.; *Antiprotozoal agents* In; In: WOLFF, M. E., ed. *Burger's medicinal chemistry*, 6 ed, v.5, New York: Wiley, 2003. p.1033-1088.

GILLMOR, S. A., CRAIK, C. S., FLETTERICK, R. J., Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain, *Protein Science*, v. 6, p. 1603-1611, 1997.

GIRALT, S.; BAILLET, S.; HORAVATH, D.; LUCAS, V.; DAVIOUDCHARVET, E.; TARTAR, A.; SERGHERAERT, C. New potent inhibitors of trypanotione reductase from *Trypanosoma cruzi* in the 2-aminodiphenylsulfide series. *Eur. J. Med. Chem.,* v. 32, p. 39-52, 1989.

GONÇALVES, M. T.; CHUNG, M. C.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Ação da asscociação da primaquina com nitrofurazona em células LLC-MK2 com formas tripomastigotas de *Tripanosoma cruzi. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,* v. 27, supl. 1, Res. 238, p. 164, 1994.

GRINGAUZ, A. *Introduction to medicinal chemistry* – how drugs act and why. New York: Wiley-VCH, 1997. p. 265-230.

GÜIDO, R. V. C.; FERREIRA, E. I.; NASSUTE, J. C.; VARANDA, E. A.; CHUNG, M. C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao NF (nitrofurazona). *Rev. Ciênc. Farm.*, v. 22, p. 319-333, 2001.

GÜIDO, R. V. C.; VARANDA, E. A.; FERREIRA, E. I.; CHUNG, M. C. Hydroxymethylnitrofurazone, a potential antichagasic prodrug with decreased mutagenic activity related to nitrofurazone. *International Congress of Pacific Basin Societies,* Honolulu, Hawaii, USA, dezembro de 2000. Book of Abstracts, Part 1.

GUIDO, R. V. C; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies, *Curr. Med. Chem.*, v. 15, p. 37-46, 2008.

HARRIS, J. L.; BACKES, B. J.; LEONETTI, F.; MAHRUS, S.; ELLMAN, J.A.; CRAIK, C. S. Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 7754-7759, 2000.

HARTH, G.; ANDREWS, N.; MILLS, A. A.; ENGEL, J. C.; SMITH, R.; MCKERROW, J. H. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem.Parasitol.,* v. 58, p. 17-24, 1993.

HENDERSON, G. B.; MURGOLO, N. J.; KURIYAN, J.; OSAPAYU, K.; KOMINOS, D.; BERRY, A.; SCRUTTON, N. S.; HINCHLIFFE, N. W.; PERHAM, R. N.; CERAMI, A. Engineering the substrate specificity of glutathione reductase toward that trypanothione reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 8769-8773, 1991.

HENDERSON, G. B.; ULRICH, P.; FAIRLAMB, A. H.; ROSENBERG, I.; PEREIRA, M., SELA, M.; CERAMI, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione dissulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas´ disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, v. 85, p. 5374-5378, 1988.

JAISHANKAR, P.; HANSELL, E.; ZHAO, D. M.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; RENSLO, A. R. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,*. v. 18, p. 624-628, 2008.

JARPA, A. *Contribuición al studio de la enfermedad de Chagas X Quimioterapia de la enfermedad de Chagas experimental.* Tesis, Universidad de Chile, 1950. *Apud:* RUBIO, M. F., PIZZI, T. Acción de la primaquina, pentaquina y pentaquina-quinina, sobe formas sanqguíneas virulentas de *Trypanosoma cruzi. Bol. Chil. Parasitol.*, v. 9, p. 75-79, 1954.

JOCKERS-SCHERUBL, M. C.; SCHIRMER, R. H.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Trypanotione reductase from *T. cruzi*: catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur. J. Biochem.*, v. 180, p. 267-272, 1989.

JUDICE, W. A. S.; CEZARI, M. H. S.; LIMA, A. P. C. A.; SCHARFSTEIN, J.; CHAGAS, J. R.; TERSARIOL, I. L. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Comparison of the specificity, stability and individual rate constants with respective activation parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinant form, cruzain, from *Trypanosoma cruzi. Eur.J. Biochem.*, v. 268, p. 6578-6586, 2001.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico Guanabara*, Ed.2007/2008, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 18.6-18.13.

KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*, 2 ed, New York: Wiley-Interscience, 1988. p. 579-670.

LAGES-SILVA, E.; FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v. 85, p. 401-405, 1990.

LA-SCALEA, M. A.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. Geração eletroquímica do nitro radical aniônico a partir do NF utilizando-se eletrodo de carbono vítreo. 10° Encontro Nacional de Química Analítica, Química Analítica e qualidade das águas, Santa Maria, RS, 1999. *Livro de Resumos*, Res. EL-4.

LA-SCALEA, M. A. Comportamento voltamétrico e mecanismo de ação biológica de nitroimidazóis. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, v.34, p.59-75, 1998.

LECAILLE, F.; COTTON, J.; MCKERROW J. H.; FERRER-DI MARTINO, M.; BOLL-BATAILLE, E.; GAUTHIER, F.; LALMANACH, G. Reversible inhibition of cathepsin L-like proteases by 4-mer pseudopeptides. *FEBS Lett.*, v. 507, p. 362-366, 2001.

LESPINET, O.; LABEDAN, B. Orphan enzymes could be an unexplored reservoir of new drug targets. *Drug Disc. Today*, v. 11, p. 300-305, 2006.

LEWINSOHN, R. Carlos Chagas and the discovery of Chagas' disease (American Trypanosomiasis). *J. Roy. Soc. Med.*, v. 74, p. 451-455, 1981.

LOPEZ, J. A.; CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W.; FLOHE, L. GUERRERO, S. A.; MONTEMARTINI, M.; KALISZ, H. M.; NOGOCEKE, E.; SINGH, M.; ALVES, M. J. M.; COLLI, W. Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase synstem in *Triapnosoma cruzi. Free Rad. Biol. Med.,* v. 28, p. 767-772, 2000.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol.,* v. 146, p. 601-620, 2007.

McCABE, R. E.; Falilure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. *J. Infect. Dis.,* v. 158, p. 1408-1409, 1988.

McGRATH, M. E.; EAKIN, A. E.; ENGEL, J. C.; McKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. The crystal struture of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *J. Mol. Biol.,* v. 247, p. 251-259, 1995.

McKERROW, J. H.; McGRATH, M. E.; ENGEL, J. C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. *Parasitol. Today,* v. 11, p. 272-82, 1995.

MEIRELLES, M. N. L.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S. G.; COSTA, E. M.; MURTA, A. C.; SCHARFSTEIN, J. Inibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi in vitro. Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 52, p. 175-84, 1992.

MONCAYO, A. Chagas´ disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v. 98, p. 577-591, 2003.

MONCAYO, A.; ORTIZ-YAHINE, M. I. An update on Chagas´ disease (human American trypanosomiasis). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 100, p. 663-677, 2006.

MORENO, S. N.; MASON, R. P.; MUNIZ, R. P. A.; CRUZ, F. S.; DOCAMPO, R. Generation of free radicals from metronidazole and other nitroimidazoles by *Trichomonas foetus. J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 4051-4054, 1983.

OTTO, H. H., SCHIRMEISTER, T., Cysteine proteases and their inhibitors, *Chem. Rev.*, v. 97, p. 133-171, 1997.

PEREIRA DA SILVA, L. H.; KIRCHNER, J. A. Experimental chemoterapy of *Trypanosoma cruzi.* A comparative study on the action of primaquine, cabidumsulphate and the aminonucleoside of stylomycin. *Rev. Inst. Med. Trop.,* v. 4, p. 16-28, 1962.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. *Parasitologia médica*, 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

POLLI, M. C. *Antichagásicos potenciais: Síntese de pró-fármacos demegazol e primaquina,* 2003, 157 p. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

ROSSELLI, F. P.; ALBUQUERQUE, C. N.; Da SILVA, A. B. A chemometric study of megazol derivatives with activity against *Trypanosoma equiperdum. SAR QSAR Environ. Res.,* v. 17, p. 533-547, 2006.

SCHARFSTEIN, J.; SCHECHTER, M.; SENNA, M.; PERALTA, J. M.; MENDONÇA-PREVIATO, L., MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (Gp57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol.*, v. 137, p. 1336-1341, 1986.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v. 102 (supl 1), p. 75-85, 2007.

SERVEAU, C.; LALMANACH, G.; JULIANO, M. A.; SCHARFSTEIN, J.; JULIANO, L.; GAUTHIER, F. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrate s and inhibitors. *Biochem. J.*, v. 313, p.951-956, 1996.

SILES, R.; CHEN, S. E.; ZHOU, M.; PINNEY, K. G.; TRAWICK, M. L. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* v. 16, p. 4405-4409. 2006.

SILVA, A. T. A. ; CASTRO, L. F. ; GÜIDO, R. V. C. ; CHUNG, M. C. ; FERREIRA, E. I. Advances in prodrug design. *Mini-Rev. Med. Chem.*, v. 5, p. 893-914, 2005.

SILVA, J. L. A doença de Chagas no Brasil. Índices de sua ocorrência e distribuição até 1909. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v.27, p.219-223, 1985.

SOUZA, D. H. F; GARRATT, R. C; ARAUJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. 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, p. 131-135, 1998.

STOKA, V.; McKERROW, J. H.; CAZZULO, J. J.; TURK, V. Substrate inhibition of cruzipain is not affected by the C-terminal domain. *Febs. Lett.*, v. 429, p. 129-133, 1998.

TROSSINI, G. H. G. *Antichagásicos potenciais: Síntese de bases de Mannich do hidroximetilnitrofural,* 2004, 130 p. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

TROSSINI, G. H. G.; GIAROLLA, G. REZENDE, L.; DO-AMARAL, A. T.; ZAIM, M. H.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, E.I. Synthesis optimization of hydroxymethylnitrofurazone, a potential antichagasic candidate, using 3^2 factorial design. *Tetrahedron Lett.,* submetido.

TSUHAKO, M. H.; ALVES, M. J. M.; COLLI, W.; BRENER, Z. E.; AUGUSTO, O. Restricted bioreductive metabolism of nitroimidazole-thiadiazol derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Biochem. Pharmacol.*, v. 38, p. 4491-4496, 1989.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas´ disease. *Curr. Pharm. Des.,* v. 8, p. 287-295, 2002.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas´ disease: controversis and advances. *Trends Pasitol.,* v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

URBINA, J. A.; VIVAS, J.; VISBAL, G.; CONTRERAS, L. M. Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by $\Delta^{24(25)}$–sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with Ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.,* v. 73, p. 199-210, 1995.

VERLINDE, C. L.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G.; MICHELS, P. A. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome. *Drugs. Drug Res. Update,* v. 4, p. 50-65, 2001.

VIODÉ, C.; ALBUQUERQUE, C. N.; CHAUVIÈRE, G.; HOUÉE-LÉVIN, C.; PÉRIE, J. Comparative study by pulse radiolysis of the radical anion derived from compounds used in Chagas' disease therapy. *New J. Chem.*, v. 21, p. 1331-1338, 1997.

WALSH, C.; BRADLEY, M.; NADEAU, K. Molecular studies on trypanothione reductase, a target for antichagasic drugs. *Tibs,* v. 16, p. 305-309, 1991.

WHO, in: http://www.who.mt/ctd/html/chagdts/html, 2002.

WHO/TDR- Word Health Organization – *Special programme for research and training in tropical disease*, 2008. Disponível em: http://www.who.int/tdr/index.html. Acessado em: 23/07/2008.

ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*-interactions with host cells. *Curr. Top. Microbiol.*, v. 117, p. 129-152, 1985.

Capítulo 2

Gênese de Fármacos

2. Gênese de Fármacos

A introdução de fármacos na terapêutica foi se modificando ao longo dos anos, passando de utilização empírica de plantas medicinais até processos , avançados, que se socorrem de métodos computacionais, como os utilizados nos dias de hoje. É sabido que as sociedades humanas mais primitivas já faziam o uso de plantas medicinais em rituais e para fins terapêuticos. Algumas destas plantas são empregadas até os dias de hoje (VIEGAS, BOLZANI, BARREIRO, 2006; BARREIRO, FRAGA, 2008). Com o passar dos anos e com a evolução da Ciência, que permitiu o conhecimento mais aprofundado de muitas doenças em suas bases moleculares, o planejamento racional de fármacos foi fortalecido (BARREIRO, FRAGA, 2008).

Os avanços científicos acumulados durante milênios nas áreas de Biologia e Química proporcionaram melhor compreensão (dos processos fisiológicos e farmacológicos. Esses conhecimentoS, aliadoS a avanços em Biologia Molecular, Química, Física, Cristalografia, Bioquímica, Informática, entre outra áreas que auxiliam no entendimento do mecanismo de ação de moléculas bioativas, tornaram a descoberta de novos fármacos processo multi e interdisciplinar (WERMUTH, 2003; LOMBARDINO, 2004; GUIDO, OLIVA, ADRICOPULO, 2008).

No entanto, mesmo com os avanços tecnológicos e a racionalização do planejamento de fármacos, ainda persiste a descoberta de fármacos com base no trinômio dedicação/intuição/sorte (KUBINYI, 1998a).

Os fármacos podem, então, ser introduzidos na terapêutica mediante vários processos. Originalmente, a ênfase foi dada a compostos naturais, oriundos de plantas e animais, os quais foram os principais processos de introdução de fármacos na terapêutica até durante a primeira metade do século XX. O desenvolvimento da Química Orgânica conduziu à obtenção de produtos de origem sintética, que ainda hoje prevalecem, embora se tenha retomado o interesse por produtos naturais (NEWMAN, CRAGG, KINGSTN, 2003; KUBINYI, 2003).

Como já citado, a exploração de novas metodologias vem despertando interesse aumentado com vistas à descoberta de fármacos. Merecem destaque (BÖHM *et al.*, 2000; KUBINYI, 2003): Química combinatória (GORDON,

KERWIN, Jr, 1998) e a variante Síntese paralela (KUBINYI, 2004; KOPPITZ, EIS, 2006); Engenharia genética (WERMUTH, 2003), Cristalografia de proteínas (RONDEAU, SCHREUDER, 1996; DAVIS, TEAGUE, KLEYWEGT, 2003); técnicas multidimensionais em RMN (SHUKER, HAJDUK, MEADOWS, FESIK, 1996); e a Química computacional (GASTEIGER, 2006a; TEKO *et al.* 2005; ROCHE, GUBA, 2005; SCHNECKE, BOSTRÖM, 2006).

A Química computacional se tornou ferramenta indispensável no planejamento racional de fármacos a partir dos anos 1980, com avanços na produção de softwares e hardwares e, com isso, obtenção de alto poder de processamento de dados e predição de atividade biológica dos compostos planejados (GASTEIGER, 2006). Os processos envolvendo química computacional são amplamente empregados na área de planejamento racional de fármacos, sendo denominado planejamento de fármacos auxiliado por computador – do inglês *Computer-Assisted Drug Design* (CADD). Algumas áreas de destaque no contexto de CADD são: relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica – *QSAR* (HANSCH, FUJITA, 1964; FUJITA, 2007; TROPSHA, 2003) e a variante *3D-QSAR (*KUBINYI, 1993*);* modelagem molecular; planejamento com base na estrutura do receptor (*Structure-based Drug Desing* (SBDD)), ou com base na estrutura do ligante (*Ligand-based Drug Desing* (SBDD)), KLEBE, 2006; SHUKER *et al.,* 1996; KUBINYI, 1998a; KUBINYI, 1998b; KLEBE, ABRAHAM, 1999; BÖHM, *et al.*, 2000; GASTEIGER, 2006; TETKO *et al.* 2005; ROCHE, GUBA, 2005), entre outras.

Apesar do uso de novas e avançadas tecnologias, especialmente as computacionais, persiste o desafio de que para um ligante se tornar um fármaco deve-se considerar, em primeiro lugar, a biodisponibilidade, estreitamente ligada à sua lipofilicidade (AJAY *et al.*, 1998; KUBINYI, 1998c; PAGLIARA *et al.*, 1999). Aliada à absorção, a distribuição no sistema biológico, o metabolismo e a eliminação, ou os parâmetros **ADME** (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) do ligante são fatores determinantes da sua atividade biológica. Assim sendo, os métodos avançados, envolvendo CADD, auxiliam os processos clássicos e mais simples na determinação de propriedades e predição de efeitos biológicos no intuito de transformar um ligante em um novo fármaco (OPREA, 2007).

2.1 Modificação Molecular

A modificação molecular tem se mostrado a técnica mais promissora para a introdução de novos fármacos na terapêutica (KOROLKOVAS, 1988; WERMUTH, 2003a). Tal processo permite que as propriedades indesejáveis dos protótipos sejam diminuídas e as características desejáveis, ressaltadas, mediante retirada, substituição, introdução de grupos químicos, cuja participação na atividade biológica é determinante, ou cuja função acessória pode auxiliar na interação com o receptor. Apesar de, em geral, a modificação molecular clássica não utilizar as bases moleculares da doença como suporte racional para o planejamento de novos fármacos, esse foi o processo mais profícuo de introdução de fármacos na terapêutica (BARREIRO, FRAGA, 2008; RAUTIO *et al.*, 2008).

2.1.1 Latenciação

Entre os processos de modificação molecular, a latenciação é um dos mais promissores (BUNDGAARD, 1985; CHUNG, FERREIRA, 1999; CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005) e é definida como a transformação do fármaco em forma inativa de transporte, denominada pró-fármaco, que, mediante reação química ou enzimática *in vivo*, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. (WERMUTH, 1984; ETTMAYER *et al.*, 2004; RAUTIO *et al.*, 2008). Atualmente, de 5 a 7% dos fármacos disponíveis podem ser classificados como pró-farmacos (RAUTIO *et al.*, 2008). Dentre esses fármacos podem-se citar alguns dos chamados "blockbusters", como o enalapril, omeprazol, sinvastatina, aciclovir antre outros (ETTMAYER *et al.*, 2004).

A Figura 2.1 mostra esquematicamente o conceito clássico de latenciação.

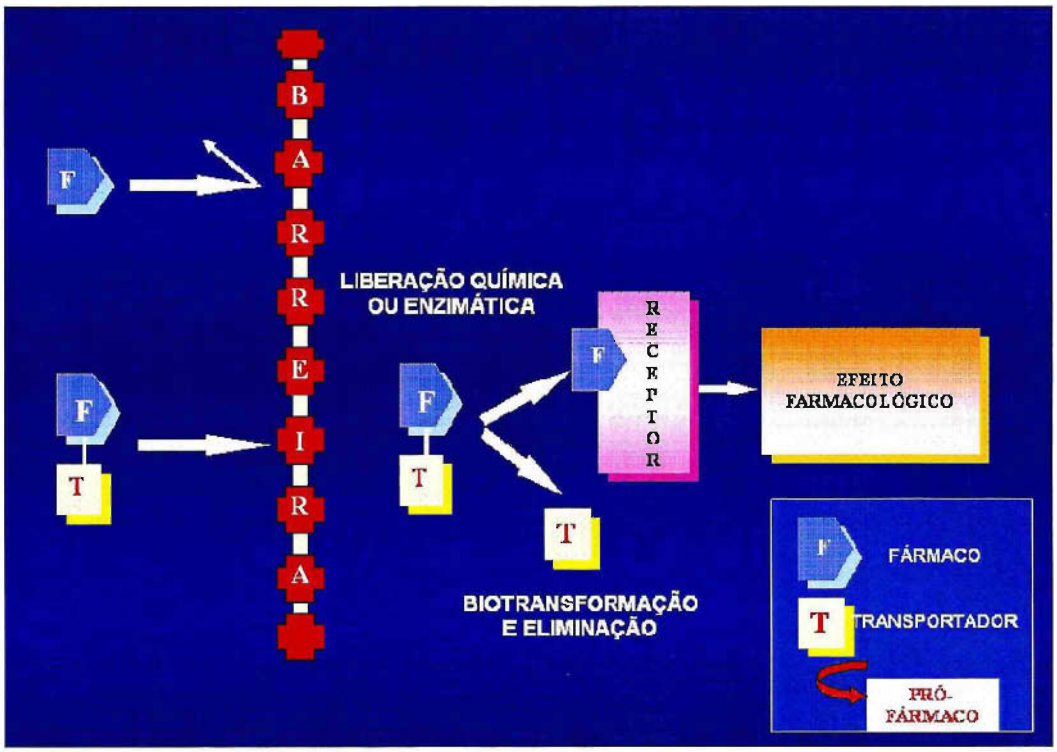


Figura 2.1 - Representação esquemática de latenciação clássica.
(Adaptado de FRIIS e BUNDGAARD (1996).

WERMUTH, em 1984, classificou as formas latentes em: pró-fármacos clássicos, bioprecursores e fármacos dirigidos.

Especialmente no caso de pró-fármacos clássicos e bioprecursores, o planejamento pode ser dividido em três passos básicos: 1-Identificação do problema associado ao fármaco; 2-Identificação das propriedades físico-químicas a serem alteradas e 3-Escolha do transportador adequado, no caso de pró-fármacos clássicos, e da ligação a ser cindida no compartimento biológico desejado.

Os *pró-fármacos clássicos* compreendem área da pesquisa de fármacos que é voltada, especialmente, para a otimização das propriedades farmacocinéticas correspondentes, objetivando resolver, especialmente, problemas farmacêuticos e farmacocinéticos dos protótipos. O termo pró-fármaco implica ligação covalente entre o grupo ativo e o transportador, porém alguns autores usam-no para caracterizar algumas formas de sais de princípios ativos (FRIIS, BUNDGAARD, 1996; Steffansen *et al.*, 2004; RAUTIO *et al.*, 2008).

Quando o transportador é ligado a uma ponte conectada com o fármaco, conhecida como grupo espaçante, o termo duplo é utilizado. Pró-fármacos duplos, triplos ou em cascata são aqueles que além de ligações por meio de espaçante apresentam liberação por vias química e enzimática (CHUNG *et al.*, 2005; RAUTIO *et al.*, 2008).

Pró-fármaco recíproco é o termo aplicado à forma latente que consiste de dois fármacos, em geral de ação sinérgica, ligados um ao outro (um fármaco é transportador de outro e vice-versa) (SINGH, SHARMA, 1996; ETTMAYER *et al.*, 2004).

Sistema misto, em que o transportador deve ser biotransformado antes de permitir a liberação do fármaco e que se presta a conferir especificidade de localização, é o CDS – *Chemical Delivery System*. Tal sistema, idealizado por BODOR, FARAG E BREWSER (1981), permite atingir altas concentrações cerebrais de fármacos (PROKAI, PROKAI-TATRAI, BODOR, 2000).

Bioprecursor é um tipo de pró-fármaco, em que a reversão ao composto ativo se dá por meio de reações enzimáticas, em geral, não-hidrolíticas e/ou por reação de oxirredução (WERMUTH, 2003b; RAUTIO *et al.*, 2008). Nesses casos, não se utilizam transportadores. Há, no entanto, formas mistas de bioprecursores e pró-fármacos clássicos, quando os primeiros agregam transportador, que é liberado para, em seguida, permitir a bioconversão da forma latente ao fármaco de origem (WILLIAMS, LEMKE, 2002; RAUTIO *et al.*, 2008).

Fármacos dirigidos são formas latentes em que o transportador apresenta alta especificidade, por si só (anticorpos, imunoglobulinas, ácidos nucléicos), ou contêm grupos diretores da ação ao nível celular (TAKAKURA, HASHIDA, 1995; RONDEAU, SCHREUDER., 2003; TAKAKURA *et al.*, 1996), como ocorre com vários polímeros aos quais aqueles se agregam (JO, CHOI, 2004; ETTMAYER *et al.*, 2004).

A busca por sistemas de liberação eficaz e específica vem sendo um paradigma no planejamento de novos pró-fármacos (CHUNG *et al.*, 2005). Sitemas de liberação rápida utilizando liberação lisossomotrópica são utilizados para a liberação rápida do fármaco. Nesses sistemas, o pró-fármaco sofre endocitose e é liberado por ação de enzimas lisossômicas. Existem dois tipos de pró-fármacos planejados para serem liberados dessa maneira: PDEPT

(*Polymer-Directed Enzyme Prodrug Therapy*) e PELT (*Polymer–enzyme Liposome Therapy*) (DUCAN *et al.*, 2001; SATCHI-FAINARO *et al.*, 2003). O LEAPT (*Lectin-Directed Enzyme-Activated Prodrug Therapy*) é um sistema de liberação em duas etapas, que explora o sistema endógeno da ligação de carboidratos à lectina (ROBINSON *et al.*, 2004).

Atualmente buscam-se variantes de grande especificidade de ação (ETTMAYER *et al.*, 2004), que englobam a concepção de fármaco dirigido. São eles os processos de ADEPT – *Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy* (MELTON *et al.*, 1996; ETTMAYER *et al.*, 2004) e GEDEPT/VDEPT – *Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy/Virus-Directed Enzyme Prodrug Therapy* que utliza genes ou vírus específicos para liberação (HAN, AMIDON, 2000; HULL, CHESTER, 2002; PALMER *et al.*, 2004; HELSBY *et al.*, 2004). Por esse planejamento, inicialmente se administra um conjugado anticorpo monoclonal-enzima não existente no organismo, e, em seguida, pró-fármaco, cuja ligação ao transportador é cindida especificamente pela enzima componente do conjugado.

2.1.2 *Bioisosterismo*

Entre os métodos de modificação molecular, o bioisosterismo é muito utilizado com o objetivo de introduzir novas moléculas biologicamente ativas na terapêutica (BARREIRO, FRAGA, 2008).

Os bioisósteros são conceituados como compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos, que apresentam características topológicas, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes e têm a capacidade de apresentar propriedade biológica análoga, agonista ou antagonista. (PATANI E LAVOIE, 1996; WERMUTH, 2003; SILVERMAN, 2004; LIMA, BARREIRO, 2005; BARREIRO, FRAGA, 2008). Além de melhorar as propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas de um protótipo, permitem vencer barreiras patentárias, o que desperta o interesse de indústrias farmacêuticas(SHOWELL, MILLS, 2003; BARREIRO, FRAGA, 2008).

O termo bioisosterismo é derivado do conceito de isosterismo, que teve início com o desenvolvimento completo das teorias de Química geral e das propriedades dos elementos químicos (PATANI, LAVOIE, 1996; WERMUTH,

2003). Os estudos que fundamentaram a teoria de isosterismo se iniciaram com a verificação de que distribuição eletrônica periférica idêntica condicionavam propriedades físico-químicas similares. LANGMUIR, em 1919, definiu o conceito de isosterismo como (WERMUTH, 2003): Duas moléculas são isomeros se apresentaram na ultima camada eletrônica o mesmo o mesmo número e arranjo de elétrons. As comoleculas, isosteros, deve, conseqüentemente, conter o mesmo número dos átomos. Sendo a diferença essencial entre os isósteros às cargas constituintes do núcleo dos átomos". (LANGMUIR;1919).

GRIMM e colaboradores, em 1925, introduziram a lei do deslocamento de hidreto, a qual afirma que a adição de um átomo de hidrogênio, com um par de elétrons, a outro átomo resulta em um pseudo-átomo, o qual apresenta as propriedades físicas daqueles presentes na coluna posterior da Tabela periódica. (LIMA, BARREIRO, 2005; BARREIRO, FRAGA, 2008). Esse conceito pode ser visualizado na Tabela II.1.

Tabela II.1 – Regra do Hidreto de Grimm

Regra do hidreto de Grimm						
Número de elétrons	6	7	8	9	10	11
	C	N	O	F	Ne	Ne^+
	H^-	CH	NH	OH	FH	FH_2^+
		H^-	CH_2	NH_2	OH_2	OH_3^+
			H^-	CH_3	NH_3	NH_4^+
				H^-	CH_4	

Com a verificação de que não apenas o número e o arranjo eletrônico estavam relacionados às características e propriedades similares dos elementos químicos o conceito de isosterismo foi se expandindo. Em 1932, ERLENMEYER e colaboradores consideraram como isósteros:

1- Grupos de elementos presentes em uma mesma coluna da Tabela periódica. Assim o silício torna-se isóstero do carbono, o enxofre do oxigênio, e assim por

diante.

2- Pseudoáatomos, incluindo grupos que à primeira vista parecem totalmente diferentes, mas que na prática apresentam propriedades similares. Como exemplo, podem-se citar os pseudoalogênios (Cl ≅ CN ≅ SCN, entre outros.).

3- Anéis equivalentes. A equivalência entre CH=CH- e –S- expande o conceito para a analogia entre benzeno e tiofeno, por exemplo.

A observação da grande utilidade dos conceitos de isosterismo em fenômenos biológicos e de ação de fármacos levou FRIEDMAN, em 1951, a criar a termo "bioisosterismo", que pode ser explicado como um grupo de moléculas as quais têm similaridade química e física e produzem efeitos biológicos similares ou antagônicos em um mesmo sítio receptor (PATANI E LAVOIE, 1996; WERMUTH, 2003; BARREIRO, FRAGA, 2008).

O bioisosterismo encontra grande aplicação no planejamento de antimetabólitos, presentes em muitas classes de quimioterápicos (WERMUTH, 2003).

O bioisosterismo pode ser subdividido em *Bioisosterismo Clássico*, que abrange a definição de Erlenmeyer (átomos, íons ou moléculas em que as camadas periféricas de elétrons podem ser consideradas idênticas). Podem-se citar como exemplo grupos da classificação periódica, univalentes, bivalentes, e assim por diante, e equivalentes anelares; e *Bioisoterismo não-clássico,* compreendendo átomos oou grupos de átomos que apresentam disposição estérica e configuração eletrônica semelhante, exemplo:, -CO- e -SO_2-, entre outros (SILVERMAN, 2004). O bioisosterismo entre H e F, antes considerado como não-clássico, é, hoje, classificado como clássico por alguns pesquisadores (PATANI, LaVOIE, 1996).

Os Quadros 2.1 e 2.2 apresentam, respectivamente, os grupos de bioisósteros.

Quadro 2.1 – Grupos de isósteros clássicos

monovalentes	bivalentes	trivalentes	tetravalentes
F, OH, NH_2, CH_3, OR	$-CH_2-$	CH-	=C=
Cl, SH, PH_2 ,Si_3 , SR	-O-	=N-	=Si=
Br	-S-	=P-	$=N^+=$
I	-Se-	=As-	$=P^+=$
	-Te-	=Sb-	$=As^+=$
			$=Sb^+=$

Quadro 2.2 – Grupos de isósteros não-clássicos

-CO-	-COOH	$-SO_2NH_2$	-H	-CONH-	-COOR-	$-C0NH_2$
$-CO_2-$	$-SO_3-$	$-PO(OH)NH_2$	-F	-NHCO-	-ROCO-	$-CSNH_2$
-SO-	tetrazol					
$-SO_2NR$	$-SO_2NHR$		-OH		-catecol	
-CH(CN)-	-3-hidroxiisoxazol		$-CH_2OH$		-bezimidazol	
R-S-R'	=N-		$-NHCONH_2$			$-C_5H_4N$
(R-O-R')			$-NH-CS-NH_2$			
R-N(CN)-R'			$-NH-C(=CHNO_2)-NH_2$			$-C_6H_5$
R-C(CN)(CN)-R'	Halogênio $-CF_3$ -CN $-N(CN)_2$ $-C(CN)_3$					$-C_4H_4N$ C_4H_4S

A integração entre o processo de bioisosterismo e as modernas técnicas de informática e de armazenamento de dados já está disponível para o planejamento rápido de coleções de compostos químicos a serem testados como possíveis novos fármacos. Exemplo dessa integração é a base de dados *BIOSTER,* formada por diversos fragmentos moleculares que são agrupados por caracteristicas bioisostéricas. Esses fragmentos podem ser utilizados na otimização e identificação de compostos bioisósteros a serem testados para a geração de novos fármacos, por planejamento racional, utilizando a química computacional (WAGENER, LOMMERSE, 2006).

2.2 Planejamento racional de fármacos

O planejamento de fármacos com base na estrutura do ligante ou do receptor é processo que visa obter fármacos "sob medida" para determinada ação biológica. Relações entre estrutura química e atividade biológica, qualitativas e quantitativas, além dos processos de modelagem molecular e *docking* fazem parte do CADD – *Computer Assisted Drug Design*, que tem como ferramenta essencial a química computacional para obtenção de novos fármacos (HOPFINGER, 1985).

2.2.1 Química computacional

A química computacional, também denominada quimioinformática, agrega conjunto de técnicas que utilizam métodos computacionais na resolução de problemas químicos. Essas técnicas vêm se desenvolvendo nos últimos 40 anos e apresentando aplicação nas diversas áreas da Química (GASTEIGER, 2006a). Os processos realizados em química computacional são assistidos por computador no processamento, visualização e manipulação dos resultados gerados, utilizando recursos matemáticos, de mecânica clássica e de física quântica, entre outros, e a química teórica (OLSSON, OPREA, 2001; GASTEIGER, 2006a, b).

Na década de 1980, o desenvolvimento e o barateamento de novos programas e de computadores, associados aos avanços do conhecimento

bioquímico sobre as bases moleculares das doenças, permitiram o avanço significativo na química computacional (COHEN, 1996). A produção de novos *softwares* proporciona ampla utilização da quimioimformática tanto na academia quanto nas indústrias química e farmacêutica (WERMUTH, 2003), auxiliando no desenho bi- e tridimensional de estruturas; na produção de banco de dados de compostos e de substâncias químicas; no armazenamento e recuperação dessas estruturas; no planejamento de síntese e na otimização de reações químicas; nos planejamentos por quimiometria; em métodos para estudo das relações estrutura-propriedade e estrutura-atividade quantitativos (QSPR e QSAR) ou não (SPR e SAR); na predição de atividade biológica de compostos, de reações químicas e de seus rendimentos; na simulação de espectros e na elucidação de estruturas, entre outros (GASTEIGER, 2006a, b). Desta forma, a química computacional vem se mostrando como forte tendência na descoberta de novos fármacos.

Problema encontrado na utilização da química computacional, principalmente para paises subdesenvolvidos, é o valor agregado à aquisição de *softwares* e de computadores suficientemente potentes. Assim sendo, a comunidade científica vem unindo forças para a melhor utilização dos recursos em química computacional. Exemplo desse esforço é o *Virtual Computational Chemistry Laboratory (VCCLab www.vcclab.org)*, projeto que envolve rede de laboratórios de informática e universidades européias e que pode ser acessado pela Internet, disponibilizando ferramentas de química computacional sem custos com o objetivo de calcular propriedades moleculares e descritores a serem utilizados em SPR, SAR, QSPR e QSAR. Esses recursos encontram-se disponíveis para utilização de pesquisadores em todo o mundo (TETKO *et al.*, 2005).

2.2.1.1 Relações Quantitativas entre Estrutura Química e Atividade Biológica

As relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica, do inglês *Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR, são representadas por modelos matemáticos, que incluem técnicas de regressão linear e de reconhecimento de padrões (SANT'ANA, 2002). Os estudos de QSAR tanto 2D quanto 3D são úteis nos processos de introdução de novos

fármacos na terapêutica através da seleção de compostos promissores com base na importância e/ou influência de diferentes parâmetros físico-químicos ou conformacionais na atividade biológica de determinada classe de moléculas (KUBINYI, 1993).

Uma abordagem atual na utilização das técnicas de QSAR conjugadas com técnicas de *Structure-based Drug Design* quando a estrutura 3D do alvo é conhecida. O uso das técnicas em conjunto permite que as propriedades químicas e estruturais calculadas nos modelos de QSAR sejam comparadas com as características do receptor biológico. Sendo informações complementares, o planejamento de ligantes com alta afinidade pelo receptor e conseqüentemente a alta atividade biológica é facilitada (GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2008).

A. QSAR clássico (2D)

O QSAR clássico consiste, basicamente, no estabelecimento de modelos matemáticos, que correlacionam a atividade biológica de séries congêneres e as propriedades físico-químicas através de parâmetros previamente estabelecidos. Foi introduzido por HANSCH (1964) e pode ser resumido na seguinte equação:

AB=f(parâmetros hidrofóbicos) + f(parâmetros eletrônicos) + f(parâmetros estéricos) + f(outros parâmetros) + correção

em que:

- AB representa atividade biológica da classe em estudo, e é expressa de acordo com o tipo de atividade envolvida;
- Parâmetros hidrofóbicos: π (Hansch), Coeficiente de Partição (Log P), k' (HPLC), Rm (CCD);
- Parâmetros Eletrônicos: σ (Hammett), HOMO (*highest occupied molecular orbital)*, LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*), pKa
- Parâmetros estéricos: Es, STERIMOL (Verloop);
- Outros parâmetros: refratividade molar (RM), Massa molecular (MM), E (potencial eletroquímico), etc.

Esses modelos são avaliados por parâmetros estatísticos, próprios de regressão multiparamétrica, que analisa a adequação do mesmo à série estudada e, também, a capacidade de previsão para compostos que não pertençam à série, mas sejam congêneres. Requisitos importantes devem ser obedecidos em relações dessa natureza (GAUDIO *et al.*, 2002). São eles: falta de correlação entre os parâmetros utilizados; escolha racional das variáveis e sua validação; busca do modelo mais simples (princípio da parcimônia); escolha do número ideal de membros da série, de 5 a 6 (compostos), para cada parâmetro estudado, afim de obter um modelo racional, e modelo qualitativo consistente com os princípios físico-químicos.

Variáveis indicadoras podem ser, também, utilizadas e não expressam propriedades físico-químicas, mas, apenas, a presença ou ausência de certa característica estrutural (FREE, WILSON, 1964). Tais variáveis, utilizadas em conjunto com os parâmetros físico-químicos, em um modelo único, constituem o modelo misto, Hansch-Free-Wilson (KUBINYI, 1993).

Referências sobre o método de QSAR-2D (KUBINYI, 1993; TAVARES, FERREIRA, 2002; AGUIRRE *et al.*, 2005; CASTILHO *et al.*, 2007; GUIDO *et al.*, 2008) mostram os princípios que o regem e a sua importância como processo plenamente validado pelo uso há quatro décadas.

Derivação do QSAR-2D clássico, o Método HQSAR (Holograma QSAR) utiliza um holograma e mínimos quadrados parciais, ou PLS (*Partial Least Square*), para gerar subestruturas, fragmentos, comuns a uma série de compostos químicos e relacioná-los quanto à sua importância e influência na atividade biológica.

A primeira estratégia do HQSAR é a geração do Holograma, que vai depender do tamanho do fragmento e de sua distinção. O HQSAR gera caixas, *bins*, que compõem o holograma e do número escolhido depende o comprimento do holograma. São agrupados em cada *bin* os fragmentos moleculares com características comuns (número de átomos, tipo de átomos, entre outros) e eles são utilizados como descritores de variáveis independentes contendo informações topológicas da série de moléculas. Estas informações topológicas são, então, relacionadas com a atividade biológica, gerando um modelo de QSAR. Assim, o HQSAR gera modelos de QSAR relacionando os

fragmentos estruturais e a atividade biológica (LOWIS, 1997; CASTILHO, GUIDO, ANDRICOPULO, 2007a, b).

B. QSAR-3D

A interação ligante-receptor é processo intrinsecamente tridimensional, no qual o receptor reconhece o ligante primeiramente através do seu potencial eletrostático e, num segundo momento, através de sua superfície acessível ao solvente (PATRICK, 2001). Resulta daí a necessidade de proceder à análise tridimensional das estruturas químicas potencialmente ativas e de seus respectivos alvos a serem avaliados (MARSHALL *et al.*, 1995).

B1. CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*)

Desde sua introdução, o método CoMFA (CRAMER *et al.*, 1988) tornou-se uma das ferramentas mais utilizadas do QSAR para desenvolvimento de fármacos. O método CoMFA foi pioneiro em introduzir novo paradigma de QSAR-3D, no qual formas e propriedades estão relacionadas a características moleculares específicas (substituintes) e suas relações espaciais. Esta técnica de QSAR-3D se baseia em uma suposição de que as diferenças em propriedades moleculares dos compostos da série em estudo são decorrentes das interações não-covalentes causadas por campos eletrostáticos e estéricos entre o ligante e o receptor. Os resultados dos estudos são apresentados como mapas de contorno da regressão por PLS, em que regiões da molécula importantes para a atividade podem ser facilmente identificadas. Além disso, pode-se ter idéia da topologia do sítio do receptor, sem mesmo se ter conhecimento do mesmo. (PRATHIPATI *et al.*, 2005).

Ponto crucial no desenvolvimento e obtenção de bons resultados nos estudos de CoMFA é o alinhamento da série da moléculas. Esse alinhamento pode ser realizado por diversos métodos, sendo os mais comuns: ponto a ponto ou estrutura comum; por grupo farmacofórico e utilizando conformações resultantes de *docking*. O método de alinhamento deve ser escolhido de acordo com as características da série (CASTILHO *et al.*, 2006).

B2. CoMSIA(*Comparative Molecular Similarity Analysis*)

O método CoMSIA (KLEBE *et al.*, 1994) emprega estratégia diferente do método CoMFA para derivar os descritores moleculares a serem utilizados na análise comparativa. Nesta estratégia, utilizando-se um átomo de prova, índices de similaridades são calculados a intervalos regulares para cada uma das moléculas alinhadas no conjunto de dados. Os valores obtidos não representam medidas diretas de similaridade entre as moléculas, mas, indiretas, da similaridade de cada uma delas com o átomo de prova (distância mútua entre o átomo de prova e os átomos das moléculas no conjunto de dados).

O método COMSIA foi desenvolvido com o intuito de resolver os problemas encontrados no método CoMFA, no qual pequenas variações no alinhamento molecular geram grandes mudanças na informação fornecida pelos descritores. Isso se deve fato de que os potenciais de Lennard-Jones, utilizados para gerar os campos de resposta do método COMFA, sofrem variações abruptas próximo à superfície de van der Waals, resultando em grandes variações nas superfícies próximas à estrutura estudada (KLEBE *et al.*, 1994; KLEBE, ABRAHAM, 1999).

C. Outras técnicas de QSAR

Para melhor poder de predição e a busca de modelos mais robustos de QSAR, desenvolveram-se métodos utilizando número maior de variáveis além das eletrônicas e estéricas dos modelos de QSAR 3D. O método de QSAR-4D utiliza o incremento da dinâmica molecular, no intuito da obtenção de conformações estáveis de interação com o receptor biológico (KLEIN, HOPFINGER, 1998). Neste caso, a quarta dimensão inclui conformação, alinhamento, farmacóforo e entropia. Outras vertentes existentes, ainda, são os denominados nD QSAR em que vão se somando dimensões ao modelo, no caso, por exemplo, do 5D utiliza-se amostragens de conformações, e no 6D além de mais de uma conformação é adicionado o alinhamento dessas conformações (HOPFINGER, 2007).

2.2.1.2 Modelagem Molecular

A modelagem molecular consiste na geração, manipulação, análise e representação realista de estruturas moleculares obtidas através de cálculos de propriedades físico-químicas por química computacional (COHEN, 1996; SILVA, 2003). Através de seu desenvolvimento, a modelagem molecular permite o estudo de sistemas moleculares complexos, capazes de auxiliar no planejamento de novos fármacos, bem como de contribuir para a interpretação e a elucidação das relações entre estrutura química e atividade biológica. A modelagem molecular pode, então, ser definida como técnica empregada para se estudar as características estruturais e propriedades físico-químicas de uma substância. Ao fazer uso de recursos da química computacional acoplados a interfaces gráficas, permite a obtenção de modelos tridimensionais representativos (BARREIRO, FRAGA, 2008).

A aplicação da modelagem molecular com propósitos farmacêuticos pode ser realizada de forma direta ou indireta. A abordagem direta é realizada quando se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico (receptor ou enzima). O alvo isolado é caracterizado por cristalografia de raios-X o que possibilita a visualização tridimensional de sua estrutura. A partir desta, é possível a construção de modelos estruturais específicos, denominados ligantes, seguindo o conceito de chave-fechadura. A abordagem indireta se dá quando a estrutura do alvo biológico não está disponível e é realizada através da tentativa de se obter parâmetros eletrônicos e estéricos, que elucidem as relações entre estrutura química e atividade biológica (COHEN, 1996; SILVA, 2003). Com esses conceitos, diversas técnicas de modelagem molecular vêm sendo utilizadas na descoberta de novos fármacos, incluindo inibidores de cisteína-proteases que podem vir a ser utilizados como agentes contra a cruzaína (LINDVALL, 2002).

A modelagem molecular utiliza os princípios da Física, sendo ela clássica ou quântica para geração de modelos moleculares a serem utilizados no planejamento de fármacos e elucidação de mecanismo de ação de moléculas bioativas. A *mecânica molecular*, por exemplo, utiliza campos de força gerados por meio de cálculos de Física quântica para a parametrização e

minimização de estruturas químicas. Já no método de *dinâmica molecular* são utilizados os campos de força para avaliar os movimentos dos átomos de molécula através da integração numérica por uma equação Newtoniana. Esses métodos, entre outros, são utilizados para avaliar a conformação de menor energia, sugerida como ativa, de moléculas biologicamente ativas.

2.2.1.3 Docking

O método de *docking* estuda a interação energética comparando as afinidades de ligação entre o alvo biológico e o ligante por meio de um campo de força (WERMUTH, 2003). Esta metodologia é de ampla aplicação no planejamento de novos fármacos tendo como função primária simular a correta posição e orientação de ligação em estudos que envolvam interações entre ligante e receptor (SOTRIFFER *et al.*, 2000).

O receptor e o ligante encontram-se em equilíbrio entre os estados associado e não-associado. Em estudo de *docking* pode-se indicar o modelo de ligação de energia global mínima, apresentado, assim, como estrutura estável e precisa (ITAI *et al.*, 1996). Desta forma, o *docking* é utilizado para prever a estrutura complexa formada entre duas ou mais moléculas (KAAPRO, OJANEN, 2002).

A mais importante aplicação dos programas de *docking* consiste na procura virtual de novos ligantes. Os bancos de dados de moléculas químicas atualmente existentes possibilitam pesquisa e seleção rápida de ligantes e suas interações com o receptor, diminuindo o número de compostos a ser sintetizado, o que torna a pesquisa de novos fármacos mais rápida e racional (ITAI *et al.*, 1996).

Em estudo de *docking* devem ser consideradas as forças de origem eletrostática, eletrodinâmica, estérica, hidrofóbicas e de Van der Wasls, a interação com o solvente e os graus de flexibilidade das moléculas envolvidas (KAAPRO, OJANEN, 2002). Este estudo deve, ainda, procurar avaliar todas as possibilidades de interação do complexo formado, considerando-se todos os graus de liberdade para rotação e translação em relação à conformação do ligante (ITAI *et al.*, 1996). Realizado desta maneira, procura resolver um dos grandes problemas dos estudos iniciais de interação, quando se avaliavam

apenas modelos rígidos (ITAI *et al.*, 1996; SOTRIFFER *et al.*, 2000; KAAPRO, OJANEN, 2002).

Os métodos atualmente disponíveis de *docking* podem ser realizados utilizando-se uma ou duas equações matemáticas. Na primeira abordagem, é usada a função da conformação resultante da interação ligante-receptor, enquanto na segunda, utilizam-se as equações reduzidas das estruturas do ligante e do receptor (KAAPRO, OJANEN, 2002).

Os métodos empregados para simulação do complexo ligante-receptor são: (KAAPRO, OJANEN, 2002):

- ✓ *Dinâmica molecular*: emprega equações newtonianas de movimento para solução dos cálculos;
- ✓ *Método de Monte Carlo*: simula estruturas moleculares através de processos randômicos e aleatórios;
- ✓ *Algoritmo Genético*: códigos binários das variáveis, em especial, os graus de liberdade, são aleatoriamente combinados em busca de melhor avaliação das possíveis populações;
- ✓ *Método Baseado no Fragmento*: fragmenta o ligante, fazendo a interação de cada fragmento ao receptor, ligando-os ao final do processo;
- ✓ *Método de Pontos complementares*: baseado na elucidação do contorno e/ou da complementaridade química entre as interações moleculares;
- ✓ *Método da distância geométrica*: utiliza como ferramenta as distâncias geométricas intra- e intermoleculares;
- ✓ *Pesquisas Tabu*: processo randômico no qual são geradas conformações diferentes das iniciais, as quais são armazenadas e classificadas em ordem ascendente e não-repetitiva, e
- ✓ *Pesquisa Sistemática*: avalia todas as possíveis conformações e representações, partindo-se de modelos rígidos.

Os algoritmos de pesquisa podem criar número ótimo de conformações (da interação fármaco-receptor), que são avaliadas e classificadas por funções de contagem (*score*) com a finalidade de distinguir aquela, experimentalmente

determinada, das demais configurações geradas. Entre as funções de contagem encontram-se os métodos de campo de força.

Campos de força são utilizados normalmente para gerar previsões precisas para complexos ligante-receptor, por interpolação e extrapolação a partir de modelos moleculares experimentalmente simples. Considerando-se a idéia de que na mecânica molecular, base para a construção dos métodos de campo de força, os elétrons dos átomos envolvidos podem ser considerados fixos, a geometria da molécula é dada pela somatória de todas as interações de força envolvidas. Otimizações são realizadas até a obtenção de geometria de energia mínima. É importante ressaltar que os parâmetros de campo de força não têm significado se não forem consideradas as funções de energia potencial (KAAPRO, OJANEN, 2002).

Em estudos de *docking* envolvendo macromoléculas biológicas, como ácidos nucléicos, proteínas e os complexos ligante-proteína, o método de campo de força geralmente utilizado é o AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) (WEINER *et al.*, 1984, 1986) ou, em português, Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia (SANT'ANNA, 2002). Este campo de força AMBER foi utilizado, por exemplo, para avaliação e planejamento de inibidores covalentes de uma cisteína-protease, a papaína (DRABIK *et al.*, 2000).

2.1.1.4 Química combinatória X *High Throughput Screening - HTS*

As inovações tecnológicas criaram um paradigma na introdução de novos fármacos na terapêutica entre as décadas de 1970 e 1990. Esse paradigma se baseou na questão da capacidade de gerar novas moléculas, por processos químicos, *versus* a capacidade de teste biológicos para estas. Até os anos 1970, os avanços na Química orgânica proporcionaram maior rapidez na geração de novas entidades químicas a serem testadas como candidatos a novos fármacos, sendo o fator limitante para a introdução de novos fármacos na terapêutica os ensaios biológicos que, até então, realizados em modelos *in vivo*, caros e lentos, limitavam o teste de muitos compostos. Com os avanços nas áreas Biológicas a partir da década de 1970, ensaios *in vitro* começaram a fazer parte da busca de moléculas bioativas (KUBINYI, 1998a; KLEBE, 2006).

Sendo esses mais baratos e rápidos, o fator limitante para introdução de novos fármacos se tornou a síntese de novos compostos. Essa limitação se tornou ainda maior quando os avanços tecnológicos proporcionaram a utilização de "robôs", como parte integrante dos processos de ensaios biológicos, em ensaios *in vitro* ultra-rápidos -- *HTS (High Throughput Screening)*. Como resposta surgiu a química combinatória, composta por reações automatizadas de multicomponentes, gerando, com alta velocidade, centenas de milhares de compostos, os quais foram reunidos em bibliotecas de compostos para a utilização em testes de HTS (KUBINYI, 1998).

Os resultados da combinação entre a química combinatória e o HTS foi aquém do esperado, não introduzindo tantos fármacos como se esperava na terapêutica. Ao contrário, observaram-se muitos resultados falsos-positivos, provavelmente devido à não racionalização da síntese de compostos direcionados para alvos específicos (WESS *et al.*, 2001).

A disponibilidade de técnicas computacionais e dos modelos tridimensionais de enzimas a serem utilizados como alvos para novos fármacos constituiu-se na técnica de planejamento de fármacos baseados na estrutura do receptor biológico -- *Structure-based Drug Design-SBDD* – na tentativa de realizar ensaios biológicos com moléculas específicas para o alvo biológico (KLEBE, 2006).

2.2.1.5 Pesquisa de novos fármacos com base na estrutura do receptor e/ou de ligantes já existentes

O processo de descoberta de novos fármacos, desde a pesquisa de um alvo de atividade biológica determinada até a seleção de moléculas ativas e posterior otimização química e estudos de ADMET, formulação e geração de um novo fármaco é complexo e custoso. Envolve várias etapas em seu gerenciamento em um ambiente comum entre a Química e a Biologia. Por essa razão, a pesquisa de novos fármacos seguiu padrão interdisciplinar, envolvendo todos os ramos da ciência como: química, física, bioquímica até a genômica e proteômica. Com o aumento do conhecimento de métodos

computacionais e visualizações 3D apoiadas por estruturas cristalográficas de raios-X de boa definição e o entendimento de interações ligante-receptor as pesquisas de novos fármacos tanto na indústria quanto na academia voltam-se para estudos de desenvolvimento de fármacos com base na estrutura do receptor (*Structure-based Drug Design-SBDD*) ou na estrutura do ligante (*Ligand-based Drug Design-LBDD*) (GROOM, HOPKINS, 2002; GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2008).

Os novos processos de desenvolvimento de fármaco com base na estrutura compreendem várias etapas, sendo elas, de modo geral (ROCHE, GUBA, 2005):

- ✓ *Pesquisa virtual em Massa*: também chamado de *Virtual Screening (VS)*. Método rápido que visa à pesquisa, por meio de técnicas computacionais, de moléculas com determinadas características, utilizando banco de dados, geralmente com milhares de estruturas, e filtros que selecionam ou excluem as moléculas que não apresentam as características ideais (FEHER, 2006). Exemplo muito empregado e de grande utilidade na pesquisa de novos ligantes é a regra dos 5 de Lipinski (*rule of five)*, cujo nome se dá por que os valores dos filtros utilizados são múltiplos de cinco: massa molecular ≤ 500; clog P ≤ 5; grupos doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5; grupos aceptores de ligações de hidrogêno ≤ 10 (OPREA *et al.*, 2007);

- ✓ *Estudo do farmacóforo*: estudo que procura mapear os pontos importantes de interação no receptor biológico (SBDD) e/ou dos ligantes já existentes (LBDD), visando à construção de um modelo farmacofórico computacional ideal e sua utilização para verificar a interação dos candidatos a ligantes com pontos importantes no receptor e/ou pontos comuns aos ligantes já existentes (GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2008). Essa etapa constitui-se em filtro na pesquisa de VS e/ou na etapa de *Docking*.

- ✓ *Similaridade 2D e 3D:* utilização de métodos computacionais por meio dos quais se verifica a similaridade entre as moléculas pesquisadas entre si e os ligantes existentes. É realizado por meio de *clusters,* que agrupam as moléculas por características comuns (WALE, KARYPS, WATSON, 2007).

- ✓ *Estudo de docking:* neste processo o estudo de *docking* tem grande importância para avaliar as moléculas que realmente apresentam compatibilidade para interação com o receptor biológico. É utilizado basicamente em SBDD e pode ser auxiliado por um farmacóforo (LEACH, SHOICHET, PEISHOFF, 2006).

- ✓ *Ensaios biológicos:* após obtenção de modelos computacionais e seleção de ligantes líderes, ou seja, candidatos a novos fármacos, é necessária a validação de todo o processo e o teste biológico destes compostos para a verificação de sua atividade biológica real e a seleção de ligantes com potencial ação como novos fármacos (DESAI *et al.*, 2004).

DESAI e colaboradores (2004, 2006) descrevem os processos de planejamento de novos fármacos com base na estrutura do receptor (SBDD) e na estrutura do ligante (LBDD) na pesquisa de novos inibidores de cisteíno-protease, utilizando duas bibliotecas virtuais de compostos: *ChemBridge Database*, contendo 241.000 compostos (2004), e a *Available Chemical Directory* v. 2003/2004, contendo 355.000 compostos, que resultaram em 24 e 22 compostos ativos, respectivamente.

2.2 Referências Bibliográficas

AJAY, L.; WALTERS, W. P.; MURCKO, M. A.. Can we learn to distinguish between "drug-like" and "nondrug-like" molecules? *J. Med. Chem.,* v. 41, p. 3314-3324, 1998.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal*: as bases moleculares da terapêutica, Porto Alegre: Artmed, 2008, 536 p.

BÖHM, H.-J. Ligand design. In: KUBINYI, H., Ed. *3D QSAR in Drug Design.* Theory, methods and applications. Leiden: ESCOM, 1993. p. 386-405.

BÖHM, H-J.; BOEHRINGER, M.; BUR, D.; GMUENDER, H.; HUBER, W.; KLAUS, W.; KOSTREWA, D.; KUEHNE, H.; LUEBBERS, T.; MEUNIER-KELLER, N.; MUELLER, F. Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. A promising alternative to random screening, *J. Med. Chem.*, v. 43, p. 2664-2674, 2000.

BUNDGAARD, H. *Design of prodrugs*, Elsevier: Amsterdam, 1985. 360p.

BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs Fut.,* v. 16, p. 443-58, 1991.

BUNDGAARD, H.; JOHANSEN, M. Hydrolysis of *N*-(α-hydroxyalkyl) amide derivatives: implications for the design of *N*-acyloxylkyl-types prodrugs. *Int. J. Pharm.*, v. 22, p. 45-56, 1984.

CASTILHO, M. S.; GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. 2D Quantitative structure activity relationship studies on a series of cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Bioorg.. Med. Chem.*, v. 15, p. 6242-6252, 2007.

CASTILHO, M. S.; GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Classical and hologram QSAR studies on a series of tacrine derivatives as butyrylcholinesterase inhibitors. *Lett. Drug Des. Discov.*, v. 4, p. 106-113, 2007.

CHUNG, M. C.; SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GUIDO, R. V. C.; NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E. I. Avanços na latenciação de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 41 p. 155-179, 2005.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; SANTOS, J. L.; GIAROLLA, J.; RANDO, D. G.; ALMEIDA, A. E.; BOSQUESI, P. L.; MENEGON, R. F.; BLAU, L. Prodrugas fo tthe treatment of neglectef diseases, *Molecules,* v. 13, p. 616-677, 2008.

CHUNG, M. C.; GONÇALVES, M. F.; COLLI, W.; FERREIRA, E. I.; MIRANDA, M. T. M. Synthesis and *in vitro* activity of dipeptide prodrugs of primaquine potentially antichagasic. *J. Pharm. Sci.,* v. 86, n. 10, p. 1127-1131, 1997.

CHUNG, M. C; FERREIRA, E. I. O processo da latenciação no planejamento de fármacos. *Quim. Nova*, v. 22, p. 75-84, 1999.

CLARK, M., CRAMER, R. D., VANOPDENBOSCH, N., Validation of the general-purpose Tripos 5.2 force-field, *J. Comp. Chem.,* v. 10, p. 982-1012, 1989.

CRAMER III, R. D.; PATTERSON, D. E.; BUNCE, J. D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 110, p. 5959-5967, 1988.

DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J.; KLEYWEGT, G. J. Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* v. 23, p. 2718-2736, 2003.

DESAI, P. V.; PATNY, A.; SABNIS, Y.; TEKWANI, B.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.; SRIVASTAVA, A.; AVERY, M. Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors using virtual screening. 1. The ChemBridge database. *J Med. Chem.*, v. 47, p. 6609-15, 2004.

DESAI, P. V.; PATNY, A.; GUT, J.; SABNIS, Y.; TEKWANI, B.; ROSENTHAL, P.; SRIVASTAVA, A.; AVERY, M. Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors by use of virtual screening. 2. The available chemical directory. *J. Med. Chem.,* v. 49, p. 1576-1584, 2006.

DRABIK, P.; POLITOWSKA, E.; CZAPLEWSKI, C.; KASPRZYKOWSKI, F.; LANKIEWICZ, L.; CIARKOWSKI, J. Theoretical studies of binding modes of two covalent inhibitors of cysteine proteases, *Acta Biochim. Polonica*, v. 47 p. 1061-1066, 2000.

DUNCAN, R.; GAC-BRETON, S.; KEANE, R.; MUSILA, R.; SAT, Y. N.; SATCHI, R.; SEARLE, F. Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic. *J. Controlled Release,* v. 74, p. 135-146, 2001.

ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.,* v. 47 p. 2393-2404, 2004.

FEHER, M. Consensus scoring for protein-ligand interactions. *Drug Discov. Today*. v. 11, p. 421-428, 2006.

FRIIS, G. J.; BAK, A.; LARSEN, B.D.; FORKJAER, S. Prodrugs of peptides obtained by derivatization of the C-terminal peptide bond in order to effect protetion against degradation by carboxpeptidases. *Int. J. Pharm.,*v. 36 , p. 612-69, 1996.

FRIIS, G. J.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U., eds. *A textbook of drug design and development*. Amsterdam: Harwood Academic, 1996. p. 351-385.

FUJITA, T. The extrathermodynamic approach to drug desig, In: HANSCH, C., SAMMES, P. G., TAYLOR, J. B., eds. *Comprehensive Medicinal Chemistry.* The rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds Oxford: Pergamon Press, 2007. v. 6, p. 497–560.

GASTEIGER, J. Chemoinformatics: a new field with a long tradition, *Anal. Bioanal. Chem.,* v. 384, p. 57–64, 2006a.

GASTEIGER, J. The central role of chemoinformatics. *Chemometrics Intelligent Lab. .Syst.,* v. 82, p. 200-209, 2006b.

GAUDIO, A. C., FERREIRA, M. M. C., MONTANARI, C. A. seleção de variáveis em QSAR, *Quím. Nova,* v. 25, n. 3, p. 439-448, 2002.

GORDON, E. M.; KERWIN Jr., J. F. (EDS.). *Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery.* New York: Wiley-Liss, 1998, 516p.

GROOM C. R.; HOPKINS, A. L. Protein kinase drugs--optimism doesn't wait on facts, *Drug Discov. Today*, v. 7, p. 801-802, 2002.

GUIDO, R. V. C; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its Integration with modern drug design technologies. *Curr. Med. Chem.*, v. 15, p. 37-46, 2008.

HAN, H. K.; AMIDON, G. L. Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS Pharm. Sci.*, v. 2, p. 1-32, 2000.

HANSCH, C.; FUJITA, T. RHO_SIGMA-PI Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 86, p. 1616-1626, 1964.

HOPFINGER, A. J. Cuomputer-assisted drug design, *J. Med. Chem.*, v. 28, p. 1133-1139, 1985.

HOPFINGER, A. J. Wendy Warr Interviews Anton ("Tony") Hopfinger, *QSAR World,* entevista realizada em 01/05/2007. Disponível em: http://www.qsarworld.com/qsar-hopfinger1.php. Acesso em 04/09/2008.

HULL, D.; CHESTER, M. Gene therapy trials: a patient pathway. *Nurs. Stand.* v. 17, p. 39-42, 2002.

ITAI, A.; MIZUTANI, M. Y.; NISHIBATA, Y.; TOMIOKA, N. Computer-assisted new lead design In: COHEN, N.C. (ED.) *Guidebook on molecular modeling drug design*, San Diego: Academic Press, 1996. p.100-101.

KAAPRO, A.; OJANEN. J. Protein docking, Disponível em: http://www.lce.hut.fi/teaching/S-114.500/k2002/Protdock.pdf. Acesso em: 20/04/2004.

KLEBE, G. Structural alignment of molecules. IN: KUBINYI, H. (ED.) *3D QSAR* in *drug design.* Theory, methods and applications, *Leiden:* ESCOM, 1993. p. 173-199.

KLEBE, G., ABRAHAM, U. Comparative Molecular Similarity Index Analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *J. Compt.-Aided Mol. Des.*, v. 13, p. 1-10, 1999.

KLEBE, G., ABRAHAM, U., MIETZNER, T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J . Med. Chem.,* v. 37, p. 4130-4146, 1994.

KOPPITZ, M., EIS, K. Automated medicinal chemistry. *Drug Discovery Today*, v. 11, p. 561-568, 2006.

KUBINYI, H. Combinatorial and computational approaches in structure-based drug design. *Curr. Opin. Drug Des. Discov.*, v. 1, p. 16-27, 1998b.

KUBINYI, H. *QSAR: Hansch analysis and related approaches.* In: MANNHOLD, R., KROSGAARD-LARSEN, P., TIMMERMAN, H. (EDS.) *Methods and principles in medicinal chemistry*, v.1, Weinheim: VCH, 1993. 240p.

KUBINYI, H. Similarity and dissimilarity: A medicinal chemist's view. *Persp. Drug Des. Disc.*, v. 9, p. 225-252, 1998a.

KUBINYI, H. Strategies and recent technologies in drug discovery. *Pharmazie*, v. 50, p. 647-662, 1995.

KUBINYI, H. Structure-based design of enzyme inhibitors and receptor ligands. *Curr. Opin. Drug Des. Discov.*, v. 1, p. 4-15, 1998b.

KUBINYI, H., Drug research: myths, hype and reality, *Nature Rev.Drug Discovery*, v.2,p. 665-668, 2003.

KUBINYI, H. (ED.) *3D QSAR* in *drug design. Theory, methods and applications.* Leiden: *ESCOM*, 1993. 759p.

KUBINYI, H.; HAMPRECHT, F. A.; MIETZNER, T. Three-dimensional quantitive similarity-activity relationships (3D-QSiAR) from SEAL similarity matrices. *J. Med. Chem.*, v. 41, p. 2553-2564, 1998.

LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Predition of protein-ligand interaction. Docking and scoring: successes and gaps. *J. Med. Chem.*, v. 49, p. 5850-5, 2006.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug dsign. *Curr. Med. Chem.,* v. 12, p. 23-49, 2005.

LINDVALL, M. M. Molecular modeling in cysteine protease inhibitor design, *Curr. Pharm. Design.,* v. 8, p. 1672-1681, 2002.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J.A. 3rd. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. *Nat. Rev. Drug. Discov.,* v. 10, p. 853-62, 2004.

LOWIS, D. R. HQSAR: A new, highly predictive QSAR technique, http://www.tripos.com/data/SYBYL/HQSAR_Application_Note_072605.pdf

MARSHALL, G. R.; HO, C. M. W.; HEAD., R. D.; SMYTHE, M. L.; OPREA, T. I.; WALLER, C. L.; GRENN, S. M. 3D QSAR and de novo design: Choosing the apropriate tools, QSAR and molecular modeling: concepts and computational tools and biological application. Bocca Raton*: Prous Science Publishers.*, 1995. p. 623-629.

NEWMAN, D.; CRAGG, G.; KINGSTON, D. Natural products as pharmaceutical and sources for lead structures. In: WERMUTH, C.G., Ed. *The practice of medicinal chemistry,* San Diego: Academic Press, 2003, p. 91-111.

OLSSON, T.; OPREA, T. I. Cheminformatics: a tool for decision-makers in drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.,* v. 4, p. 308-132, 2001.

OPREA, T. I.; TROPSHA, A.; FAULON, J. L.; RINTOUL, M. D. Systems chemical biology. *Nat. Chem. Biol.*, v. 3, p. 447-50, 2007.

PALMER, D. H.; MAUTNER, V.; MIRZA, D.; OLIFF, S.; GERRITSEN, W.; VAN DER, S. I. J. P. JR; HUBSCHER, S.; REYNOLDS, G.; BONNEY, S.; RAJARATNAM, R.; HULL, D.; HORNE, M.; ELLIS, J.; MOUNTAIN, A.; HILL, S.; HARRIS, P.A.; SEARLE, P. F.; YOUNG, L. S.; JAMES, N. D.; KERR, D. J. Virus-directed enzyme prodrug therapy: intratumoral administration of a replication-deficient adenovirus encoding nitroreductase to patients with resectable liver cancer. *J. Clin. Oncol.* , v. 22, p. 1546- 1552, 2004.

PATANI, G. A.; LaVOIE, E. J. Bioisosterism: A rational approach in dug design. *Chem. Rev.,* v. 96, p. 3147-3176, 1996.

PATRICK, G. L. An Introdution to medicinal chemistry, London: *Oxford*, 2. ed., 2001. 620p.

PRATHIPATI, P.; PANDEY, G.; SAXENA, A. K. CoMFA and docking studies on glycogen phosphorylase a inhibitors as antidiabetic agents, *J. Chem. Inf. Model.*, v. 45, p. 136-145, 2005.

PROKAI, L.; PROKAI-TATRAI, L.; BODOR, N. Targeting drugs to the brain by redox chemical delivery systems. *Med. Res. Rev.*, v. 20, p. 367-416, 2000.

RAUTIO, J.; KUMPULAINEN, H.; HEIMBACH, T.; OLIYAI, R.; OH, D.; JÄRVINEN, T.; SAVOLAINEN, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug. Discov.* v. 7, p. 255-70, 2008.

ROBINSON, M. A.; CHARLTON, S. T.; GARNIER, P.; WANG, X. T.; DAVIS, S. S.; PERKINS, A. C.; FRIER, M.; DUNCAN, R.; SAVAGE, T. J.; WYATT, D. A.; WATSON, S. A.; DAVIS, B. G. LEAPT: lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 101, p. 14527-32, 2004.

ROCHE, O.; GUBA, W. Computational chemistry as an integral component of lead generation. *Mini-Rev. Med. Chem.*, v. 5, p. 677-683, 2005.

RONDEAU, J. M.; SCHREUDER, H. Protein crystallography and drug discovery. In: WERMUTH, C.G., Ed. *The practice of medicinal chemistry,* London: Academic Press, 2003. p. 417-445.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossary of terms in theoretical organic chemistry. *Quim. Nova*, v. 25, p. 505-512, 2002.

SATCHI-FAINARO, R.; HAILU, H.; DAVIES, J. W.; SUMMERFORD, C.; DUNCAN, R. PDEPT: polymerdirected enzyme prodrug therapy. 2. HPMA copolymerbeta-lactamase and HPMA copolymer-C-Dox as a modelcombination. *Bioconjug. Chem.*, v. 14, p. 797-804, 2003.

SCHNECKE, V.; BOSTRÖM, J. Computational chemistry-driven decision making in lead generation. *Drug. Discov. Today*, v. 11, p. 43-50, 2006.

SHOWELL, G. A.; MILLS, J. S. Chemistry challenges in lead optimization: silicon isosteres in drug discovery, *Drug Disc. Today*, v. 8, p. 551-556, 2003.

SHUKER, S. B.; HAJDUK, P. J.; MEADOWS, R. P.; FESIK, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science,* v. 274, p. 1531-1534, 1996.

SILVA, T. H. A. Modelagem molecular, In: ANDREI, C. C.; FERREIRA, T. D.; FACCIONE, M.; FARIA, J.T. (EDS.) *Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular, um curso prático*. Barueri: Malone, 2003. p.111-139.

SILVERMAN, R. B. *The organic chemistry of drug design and drug action.* 2ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004, p. 29-34

SINGH, G.; SHARMA, P. D. Mutual prodrugs – a recent trend in prodrug design. *Indian J. Pharm. Sci.*, v. 56, p. 69-79, 1996.

SOTRIFFER, C. A.; FLADER, W.; WINGER, R. H.; RODE, B. M.; LIEDL, K. R.; VARGA, J. M.; Automated docking of ligands to antibodies: methods and applications. *Methods*, v. 20, p. 280-91, 2000.

STEFFANSEN, B.; NIELSEN, C. U.; BRODIN, B.; ERIKSSON, A. H.; ANDERSEN, R.; FROKJAER, S. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 21,p. 3-16, 2004.

TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v. 18, p. 207-231, 1995.

TAKAKURA, Y.; MAHATO, R. I.; NISHIKAWA, M.; HASHIDA, M. Control of pharmacokinetic profiles of drug-macromolecule conjugates. *Adv. Drug. Del.. Rev.*, Amsterdam, v. 19, p. 377-399, 1996.

TAVARES, L. C.; FERREIRA, E. I. Relações quantitativas entre estrutura-atividade: fundamentos e aplicações da análise de Hansch. In: PRADO, M.A., BARREIRO, E.J. (EDS.) *Praticas de química farmacêutica y medicinal*: CYTED. 2002. p.36-66.

TETKO, I. V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V. A.; RADCHENKO, E. V.; ZEFIROV, N. S.; MAKARENKO, A. S.; TANCHUK, V. Y.; PROKOPENKO, V. V. Virtual computational chemistry laboratory--design and description. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, v. 19, p. 453-63, 2005.

TROPSHA, A. Rencet trends in quantitative structure-activity relationships, In: WOLFF, M. E. (ED.) *Burger's Medicinal Chemistry,* 6th . ed, v. 1, New York: Wiley, 2003. p. 49-83.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. D.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. *Quim. Nova*, v. 29, p. 326-337, 2006.

WAGENER, M.; LOMMERSE, J. P. M. The quest for bioisosteric replacements, *J. Chem. Inf. Model.,* v. 46, p. 677-685, 2006.

WALE, N.; KARYPS, G.; WATSON I.A. Methods for effective virtual screening and scaffold-hopping in chemical compounds, *Comput Syst Bioinform. Conf.,* v. 6, p. 403-414, 2007.

WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A.; SINGH, U. C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; PROFETA, S.; WEINER, P. A new force-field for molecular mechanical simulation of nucleic-acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.,* v. 106, p. 765-784, 1984

WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; NGUYEN, D. T.; CASE, D. A. An all atom force-field for simulations of proteins and nucleic-acids. *J. Comput. Chem.,*v. 7, p. 230-252, 1986.

WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: WERMUTH, C.G., Ed.*The practice of medicinal chemistry,* 2 ed. London: Academic Press, 2003. p. 561-586.

WERMUTH, C. G., Strategies in the search for new lead compounds or original working hypothesisIn: WERMUTH, C. G., Ed *The practice of medicinal chemistry,* 2 ed. London: Academic Press, 2003. p. 67-91.

WILLIAMS, D. A., LEMKE , T. L. *Foye´s principles of medicinal chemistry*, 5 ed, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 1114p.

Capítulo 3

Objetivos e justificativa

3. Objetivos e Justificativa

Face ao exposto e à escassez de alternativas quimioterápicas contra a doença de Chagas, a necessidade de novos antichagásicos é premente.

Os avanços na bioquímica de parasitos alcançados devido ao desenvolvimento da genética e da bioinformática levaram ao conhecimento das vias metabólicas do *T. cruzi* e de suas diferenças com as humanas. Estas, junto às enzimas nelas envolvidas, consistem em ótimos alvos na pesquisa de novos quimioterápicos. Outrossim, os avanços nas técnicas computacionais aliados a esse conhecimento proporcionam suporte para o planejamento racional de novos fármacos, com base na estrutura do receptor e/ou de ligantes que apresentem atividade (GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2008). Todas essas ferramentas têm como objetivo auxiliar na busca de moléculas que apresentem seletividade, ou seja, que atuem diretamente no alvo para as quais foram planejadas (OPREA,*et al.*, 2007).

Considerando-se:

1. a atividade do nitrofural (NF) contra o *T. cruzi,* por meio da inibição da tripanotiona redutase (HENDERSON *et al.*, 1988), enzima do sistema antioxidante peculiar para a defesa do parasita, e
2. o mecanismo de ação proposto para a inibição da cruzipaína, outra enzima específica do tripanossoma, por compostos contendo grupos (tio)semicarbazona (DU *et al.,* 2002; AGUIRRE *et al.* 2004), parte integrante da molécula do NF,

este fármaco apresenta-se como ótimo protótipo para o desenvolvimento de novos antichagásicos.

Segundo mencionado anteriormente, o pró-fármaco hidroxilado do NF, o hidroximetilnitrofural (NFOH), sintetizado como intermediário de pró-fármacos recíprocos do NF e da primaquina, mostrou-se mais ativo e quatro vezes menos mutagênico do que seu precursor (CHUNG *et al.,* 2003), despertando grande interesse em estudos mecanísticos.

Em trabalhos anteriores, sintetizou-se e avaliou-se a atividade

antichagásica de pró-fármacos dipeptídicos de PQ (CHUNG *et al.* 1997) e peptídicos duplos de PQ e NF(CHUNG, 1996), utilizando transportadores pepitídicos buscando a especificidade pela cruzaína. Em outro trabalho (TROSSINI, 2004), procedeu-se à síntese de bases de Mannich entre NF e os aminoácidos lisina (Lys), arginina (Arg) e o didipeptídio lisina-arginina (Lys-Arg), tendo-se, além disso, otimizado a obtenção do NFOH. O propósito dessas sínteses foi o de obter derivados mais estáveis do NFOH, para que fosse possível estudar os mecanismos de liberação e de ação desse composto. O dipeptídio utilizado como transportador nesse trabalho foi aquele que melhores resultados forneceu como espaçante dos pró-fármacos recíprocos anteriormente sintetizados (CHUNG, 1996), cuja base foi a seletividade na liberação por parte da cruzipaína (CAZZULO *et al.*, 1997).

Face ao exposto, os objetivos gerais foram: 1. estudar, teoricamente, a seletividade de liberação dos pró-fármacos peptídicos pela cruzaína e 2. elucidar os mecanismos de ação do NFOH e de nitro-heterocíclicos similares, como prováveis candidatos a antichagásicos.

Considerou-se que a duplicação da molécula do NFOH em um pró-fármaco de liberação seletiva pela cruzaína conduzisse, também, ao aumento da eficácia. Esperava-se tal efeito, em razão do fato de que duas moléculas pudessem chegar ao mesmo tempo no alvo. Dentro desse contexto, a proposta de pró-fármacos dipeptídicos duplos de NFOH com liberação específica pela cruzaína foi avaliada, por modelagem molecular, como uma alternativa quimioterápica contra a doença de Chagas.

Adicionalmente, tendo-se em vista a possibilidade de ação dos grupos (tio)semicarbazona por ligação covalente à cruzaína e, conseqüentemente, sua inibição, procurou-se, por meio de bioisoterismo clássico (WERMUTH, 2003), avaliar a atividade de compostos análogos de NF e de NFOH sintetizados, utilizando variação entre O e S no anel e no grupo (tio)semicarbazona.

Por outro lado, tendo-se em vista a disponibilidade das técnicas computacionais para desenvolvimento de fármacos e de estruturas cristalográficas de raio X 3D da cruzaína com boa resolução, utilizou-se o processo de planejamento de fármacos com base na estrutura do receptor (*Structure Based Drug Design-SBDD)* na busca novos ligantes nitro-

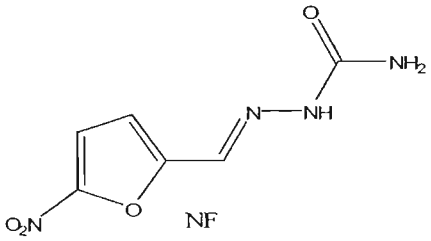
heterocíclicos com potencial atividade antichagásica.

Os objetivos específicos encontram-se arrolados como segue:

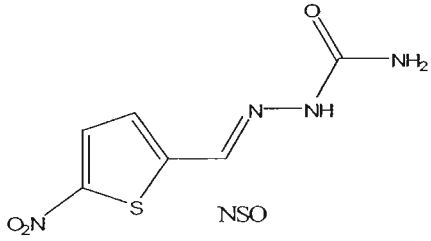
- Avaliar, por modelagem molecular, a especificidade de liberação de pró-fármacos pepitídicos pela cruzaína. Os pró-fármacos estudados foram os sintetizados LysArg-PQ, PheAla-PQ, PheArg-PQ, Arg-PQ (CHUNG *et al.,* 1997); pró-fármacos recíprocos de PQ e NF (NF-LysArg-PQ,NF-PheAla-PQ,NF-PheArg-PQ (CHUNG, 1996) e também os pró-fármacos duplos planejados de NF (NF-LysArg-NF,NF-PheAla-NF,NF-PheArg-NF, (SERVEAU *et al.*, 1996);
- Avaliar a liberação entre os pró-fármacos duplos com espaçantes dipeptídicos e a cruzaína, por meio de estudos teóricos de modelagem molecular e de *docking*;
- Síntetizar análogos bioisostéricos do NF e do NFOH, utilizando bioisoterismo entre O e S, a fim de se estudar as bases mecanísticas e estruturais para a atividade do NFOH;
- Ensaiar os derivados bioisostéricos obtidos na cruzaína;
- Construir e validar modelo farmacofórico computacional seletivo para a cruzaína;
- Realizar estudo de SBDD e LBDD na busca de candidatos à atividade inibitória da cruzaína.

Estruturas dos derivados propostos

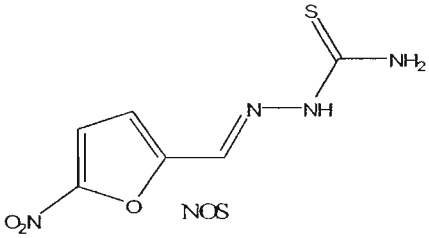
- Bioisósteros do NF



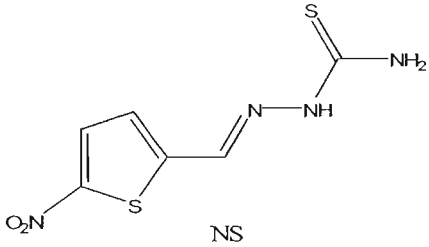
NF



NSO

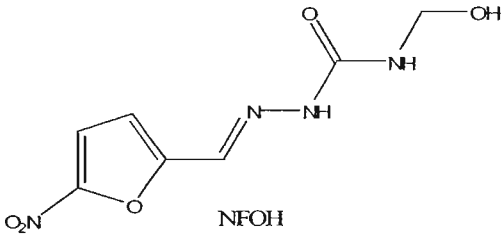


NOS

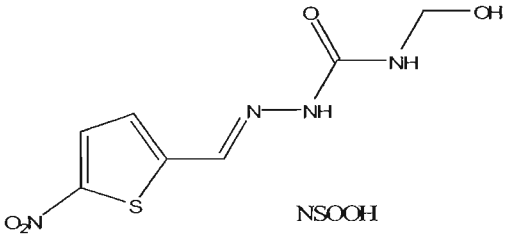


NS

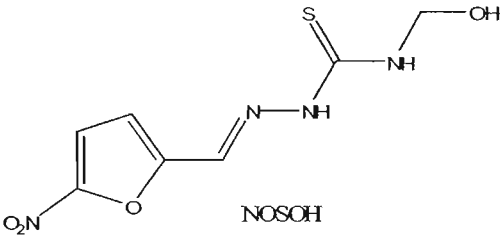
- Análogos do NFOH:



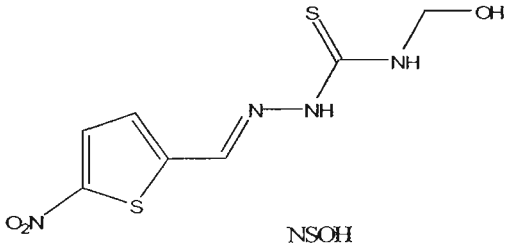
NFOH



NSOOH

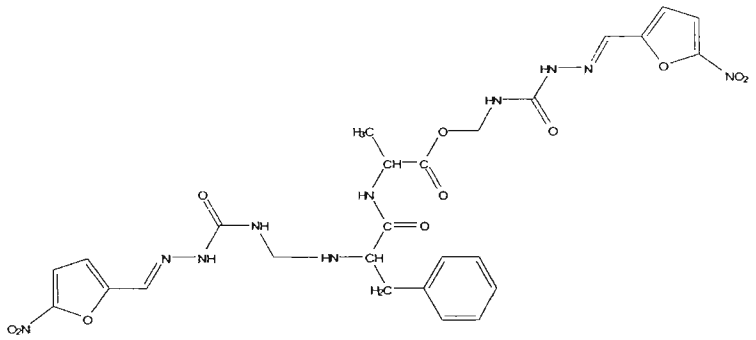


NOSOH

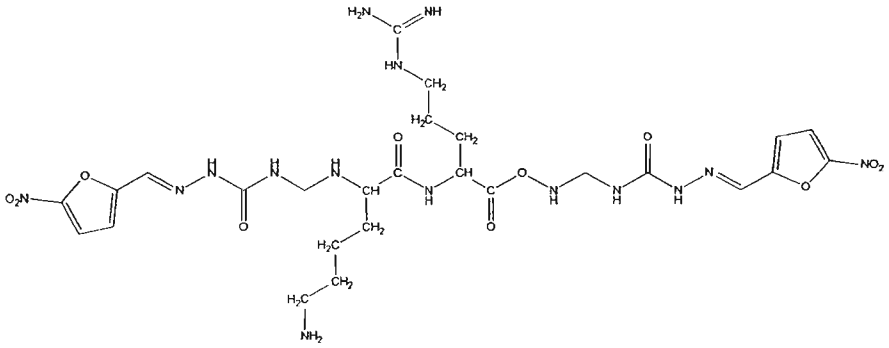


NSOH

- Pró-fármacos



NF-PheAla-NF



NF-LysArg-NF

3.1 Referências Bibliográficas

AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; FERNANDEZ, M.; GONZALEZ, M.;DENICOLA, A.; OTERO, L.; GAMBINO, D.; RIGOL, C.; OLEA-AZAR, C.; FAUNDEZ, M. *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.,* v.12, p.4885-4893, 2004.

CAZZULO, J.J.; STOKA, V.; TURK. V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi. Biol. Chem.*, v.378, p.1-10, 1997.

CHUNG, M. C.; GONÇALVES, M. F.; COLLI, W.; FERREIRA, E. I.; MIRANDA, M. T. M. Synthesis and *in vitro* activity of dipeptide prodrugs of primaquine potentially antichagasic. *J. Pharm. Sci.,* v. 86, p. 1127-1131, 1997.

CHUNG, M. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. T.; GÜIDO, R.V.C.; VARANDA, E.A.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K.C.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and *in vitro* antichagasic activity of hydroxymethylnitrofurazone, a prodrug of nitrofurazone. *Bioorg. Med. Chem.,* v.11, p. 4779-4783, 2003.

CHUNG, M.C. *Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de NF e primaquina potencialmente antichagásicos.* São Paulo, 1996, 196p. [Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med Chem.,* v. 45, p. 2695-2707, 2002.

GUIDO, R.V.C; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Virtual screening and its Integration with modern drug design technologies. *Curr.. Med. Chem.*, v.15, p. 37-46, 2008.

HENDERSON, G.B.; ULRICH, P.; FAIRLAMB, A.H.; ROSENBERG, I.; PEREIRA, M., SELA, M.; CERAMI, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione dissulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas´ disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, v.85, p.5374-8, 1988.

OPREA, T.I.; TROPSHA, A.; FAULON, J.L.; RINTOUL, M.D. Systems chemical biology. *Nat. Chem. Biol.*, v.3, p. 447-50, 2007.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: WERMUTH, C. G., Ed. *The practice of medicinal chemistry.*, 2 ed. London: Academic Press, 2003. p. 561-585.

Parte II - Experimental

Capítulo 4

Pró-Farmacos dipeptídicos como antichagásicos: Avaliação da especificidade pela cruzaína

4. *Pró-Farmacos dipeptídicos como antichagásicos: Avaliação da especificidade pela cruzaína*

A transformação química de um fármaco em sua forma inativa,que é biotransformada quimica ou enzimaticamente à sua forma ativa matriz, no local ou próximo do local de ação (CHUNG *et al.*, 2005; CHUNG *et al.*, 2008; RAUTIO *et al.*, 2008), processo, denominado latenciação, é responsavel por 5 a 7% dos fármacos aprovados atualmente no mundo. O desenvolvimento de pró-fármacos tem como objetivo resolver diversos problemas relacionados aos fármacos, como baixa biodisponibilidade, toxicidade, falta de seletividade e instabilidade, entre outros (CHUNG *et al.*, 2005; RAUTIO *et al.*, 2008) como mencionado no Capitulo 2.

Artigo sobre a utilização da latenciação na pesquisa de alternativas químioterápicas para doenças negligenciadas foi publicado recentemente por CHUNG e colaboradores (2008). Neste trabalho abordaram-se algumas formas latenciadas com atividade na doença de Chagas, doença do sono, tuberculose, malária, leishmaniose e esquistossomíase.

O emprego de pró-fármacos na pesquisa de novos antichagásicos em nosso grupo de pesquisa tem sido feito com base no direcionamento para alvos bioquímicos específicos do parasita. Neste contexto, alguns trabalhos foram realizados, utilizando transportadores peptídicos específicos para a liberação pela cruzaína.

Pró-fármacos dipeptídicos de primaquina (PQ), fármaco que apresenta atividade por meio de estresse oxidativo, com liberação específica pela cruzaína, foram sintetizados utilizando-se os espaçantes LysArg, PheAla e PheArg. Trabalho desenvolvido por CHUNG e colaboradores (1997) mostrou a maior atividade no *T. cruzi* do derivado de LysArg como transportador. CHUNG (1996), em sua tese de doutorado, sintetizou, também, pró-fármacos recíprocos de PQ e NF com os mesmos espaçantes peptídicos, buscando, assim, clivagem específica pela cruzaína e atividade em dois alvos diferentes do parasita, respectivamente tripanotiona redutase e estresse oxidativo. Novamente, os pró-fármacos contendo o espaçante LysArg foram mais ativos (CHUNG, 1996; CHUNG *et al.*, 2008). Os mesmos dipeptídios foram utilizados

por POLI (2003), que sintetizou pró-fármacos recíprocos de primaquina (PQ). TROSSINI(2004) utilizou o dipeptídio LysArg por apresentar maior atividade nos trabalhos mencionados e os aminoácidos Lys e Arg, na síntese de pró-fármacos do tipo *N*-bases de Mannich com o intuito de obter formas mais estáveis do NFOH e também direcionar a ação no *T. cruzi* pela clivagem específica do pró-fármaco pela cruzaína (TROSSINI, 2004).

Com base nos pró-farmacos já sintetizados e ante a utilização da latenciação no planejamento de novas moléculas com liberação específica potencial pela cruzaína, fez-se necessário o estudo para avaliar essa seletividade de ação.

A disponibilidade de técnicas de química computacional e de modelos cristalográficos de de alta definição da cruzaína possibilitaram o estudo e a interpretação desta seletividade. Para esse estudo utilizaram-se os pró-fármacos dipetídicos de PQ: LysArg-PQ, PheAla-PQ, PheArg-PQ, Arg-PQ (CHUNG *et al.,* 1997); pró-fármacos recíprocos de PQ e NF (NF-LysArg-PQ,NF-PheAla-PQ,NF-PheArg-PQ (CHUNG, 1996)) e, também, os pró-fármacos duplos de NF (NF-LysArg-NF,NF-PheAla-NF, NF-PheArg-NF) planejados, cujo estudo das condições de reação encontram-se no ANEXO.

4.1 Material e Métodos

4.2.1 Material

4.2.1.1 Computadores

- Computador PC Linux, processador AMD (64 MHz)
- Computador PC Windows (Dell XPS), processador Centrino (core duo 2)
- WorkSation SGI

4.2.1.2 Programas para modelagem molecular

- Sybyl 7.3 (Tripos.inc)
- Spartan O2 v.118 (Wavefunction)
- GOLD (*GOLD - Protein-Ligand Docking*) 3.0 (GlaxoSmithKline.inc),
- DeepView (GlaxoSmithKline R&D)
- Weblab ViewerLite (Accelrys)
- PYMOL Viewer (Delano Scientific LLC)

4.2.2 *Métodos*

4.2.2.1 Modelagem molecular utilizando método AM1

Para a construção dos modelos para os fármacos (NF e PQ) e dipeptídios (Lys-Arg, Phe-Ala, Ala-Phe, Phe-Arg) utilizados como espaçantes com reconhecimento específico pela cruzaína (McKERROW, 1997) nos pró-fármacos, desenvolveu-se a seguinte metodologia, utilizando-se o módulo de desenho do programa Spartan O2 v. 118 para Linux/Unix (Wavefunction).

1-Desenho das estruturas;

2-Otimização da geometria por mecânica molecular, método MMFF94, buscando corrigir imperfeições em ângulos e distâncias de ligação das estruturas desenhadas;

3-Cálculo do equilíbrio geométrico por AM1 (DEWAR *et al.*, 1985), buscando a estrutura de energia mínima global;

4-Análise conformacional por método de Monte Carlo, em que foram rotacionados os diedros a cada 120°, conforme condi ção padronizada pelo programa (AM1), chegando, assim, ao confôrmero de menor energia;

5-Cálculo de ponto de carga única por AM1 (*Single Point*), juntamente com os cálculos de superfícies e mapas orbitalares necessários para estudo das propriedades eletrônicas.

O estudo de modelagem molecular (MM) para os pró-fármacos se dividiu em três partes:

- MM dos pró-fármacos de primaquina (PQ) (LysArg-PQ, PheAla-PQ, PheArg-PQ (CHUNG *et al.*, 1997));
- MM para os pró-fármacos recíprocos de PQ e NF (NF-LysArg-PQ,NF-PheAla-PQ,NF-PheArg-PQ (CHUNG, 1996)) e
- MM dos pró-farmacos duplos de NF (NF-LysArg-NF,NF-PheAla-NF, NF-PheArg-NF).

Para esses estudos partiu-se dos confôrmeros de menor energia mínima em gás construídos/selecionados para os dipeptídios e os confôrmeros de menor energia mínima em gás construídos/selecionados dos fármacos. Foi feita a união entre os peptídios e os fármacos através de ligação do tipo amida, quando o fármaco era PQ, e base de Mannich ou éster, quando o fármaco era

NF. Em razão de se partir de confôrmero de menor energia, optou-se por trabalhar com os fármacos e peptídios com seus diedros livre, dando liberdade para cálculo para os diedros das ligações. Para todos os três grupos de pró-fármacos utilizou-se a metodologia de cálculos descrita para os peptídios.

Na figura 4.1 apresenta-se fluxograma da metodologia empregada nos estudos de modelagem molecular para os pró-fármacos.

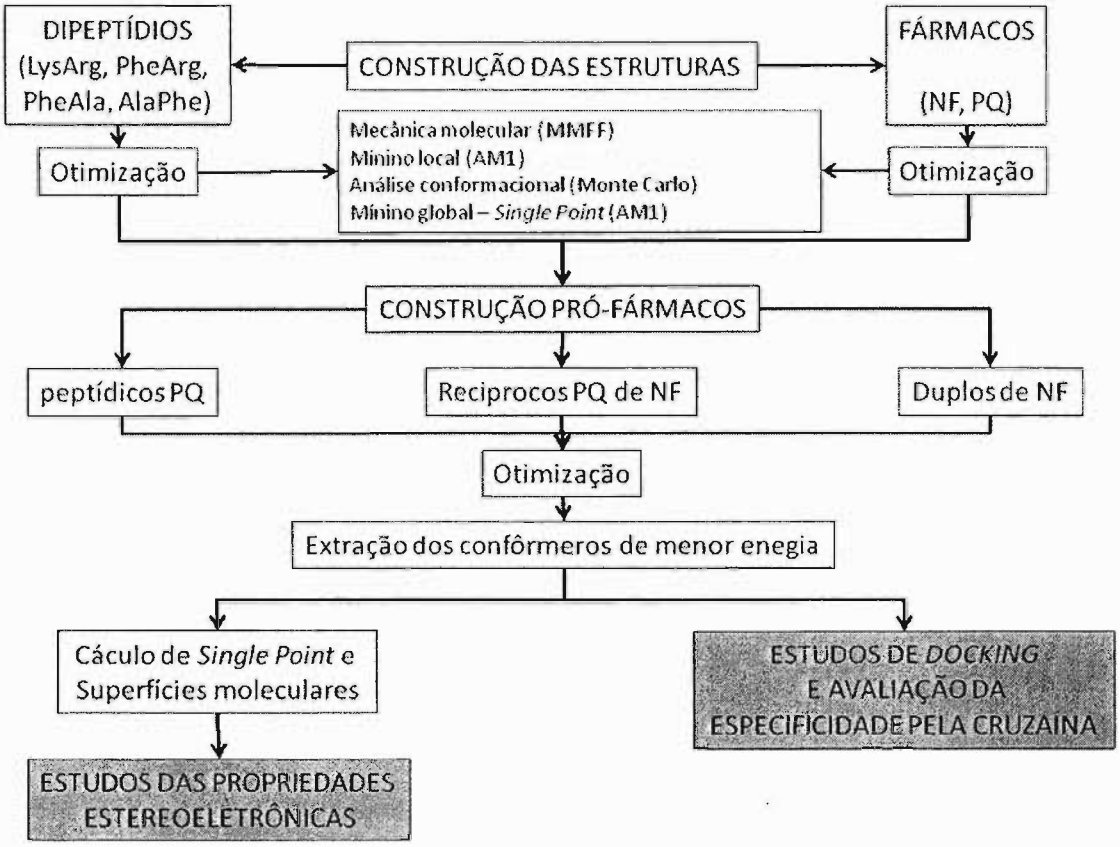


Figura 4.1 – Fluxograma empregado nos estudos de modelagem molecular dos pró-fármacos para avaliação da especificidade de liberação pela cruzaína.

4.2.2.2 Estudos de *Docking*

O estudo de *docking* dos pró-farmacos foi realizado utilizando-se as estruturas de energia mínima dos pró-fármacos e a proteína, cruzaína (1ME4), previamente preparada. O estudo foi efetuado no programa GOLD, utilizando-se o *default* do programa, indicando-se o resíduo da Cys25 como centro da caixa de *docking* (*Grid*) e também indicando o tamanho do Grid de 30:30:50 Å.

Após estabelecer esses parâmetros , realizou-se o *docking* computacional dos modelos dos três grupos de pró-fármacos (peptídicos de PQ, recíprocos de PQ e NF e duplos de NF).

As estruturas de PDB da cruzaína foram extraídas do *site* http://www.pdb.org. Optou-se por trabalhar com a estrutura 1ME4, por ser de boa definição, 1,2 Å. A proteína foi preparada, retirando-se o ligante e as moléculas de água por meio do programa PYMOL (DeLano Scientific).

Estudos de *docking* dos pró-fármacos Lys-Arg-PQ, PheAla-PQ, PheArg-PQ e Arg-PQ (CHUNG *et al.,* 1997); NF-LysArg-PQ, NF-PheAla-PQ, NF-PheArg-PQ (CHUNG, 1996) e também dos pró-fármacos NF-LysArg-NF, NF-PheAla-NF, NF-AlaPhe-NF e NF-PheArg-NF foram realizados, utilizando-se os programas Autodock 3.0 e GOLD 3.0 (GlaxoSmithKline.inc), para os cálculos e DeepView, Gview e Pymol para visualização e interpretação dos resultados.

4.3 *Resultados e Discussão dos estudos de modelagem molecular e docking dos pró-farmacos*

4.3.1 Estudo das propriedades estereoeletrônicas utilizando o método semi-empírico AM1

O estudo de modelagem molecular por emprego do método semi-empírico AM1 foi efetuado com o intuito de avaliar as propriedades estereoeletrônicas dos compostos propostos, procurando obter uma possível conformação, de mínima energia, útil à análise da aproximação e ataque da Cys25 da cruzaína aos pró-fármacos. Tal informação poderia auxiliar na previsão da liberação dos fármacos para sua ação, visto ser conhecida a afinidade dos peptídios pela cruzaína (MCKERROW, 1997). Também, este estudo poderia fornecer bases moleculares para o planejamento de novos pró-fármacos com especificidade pela cruzaína, além de auxiliar no entendimento da atividade dos pró-fármacos previamente testados contra o *T. cruzi* (CHUNG, 1996; CHUNG *et al.*, 1997). Esse estudo foi realizado com a colaboaração da Dra. Carla Maria de Souza Menezes, bolsista PRODOC/CAPES junto ao Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de

Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por ocasião do trabalho.

4.3.2.1 Construção e análise dos espaçantes dipeptídicos

O primeiro estudo foi realizado com os transportadores dipeptídicos Lys-Arg, Phe-Ala e Phe-Arg. Com o objetivo de verificar a influência da ordem dos aminoácidos na liberação dos peptídios que compõem os agentes espaçantes e transportadores dos pró-fármacos planejados, realizou-se estudo de modelagem molecular da forma inversa do dipeptídio PheAla, a saber, AlaPhe. Nesse estudo, verificou-se que as propriedades estereoeletrônicas do dipeptídio Lys-Arg favoreciam a aproximação e a posterior clivagem pela cruzipaína, pois a carbonila da ligação peptídica encontra-se mais disponível, o que pode ser verificado pelo modelo CPK (*space filling)*. Em adição, esta carbonila estaria eletronicamente favorecida para o ataque nucleofílico da Cys25 da cruzipaína, provável resíduo responsável pela clivagem. Esta observação se deve à menor densidade eletrônica deste grupo, verificado através dos mapas de distribuição orbitalar e também na superfície de LUMO (*Lowest-Unoccupied Molecular Orbital*) (Figura 4.2).

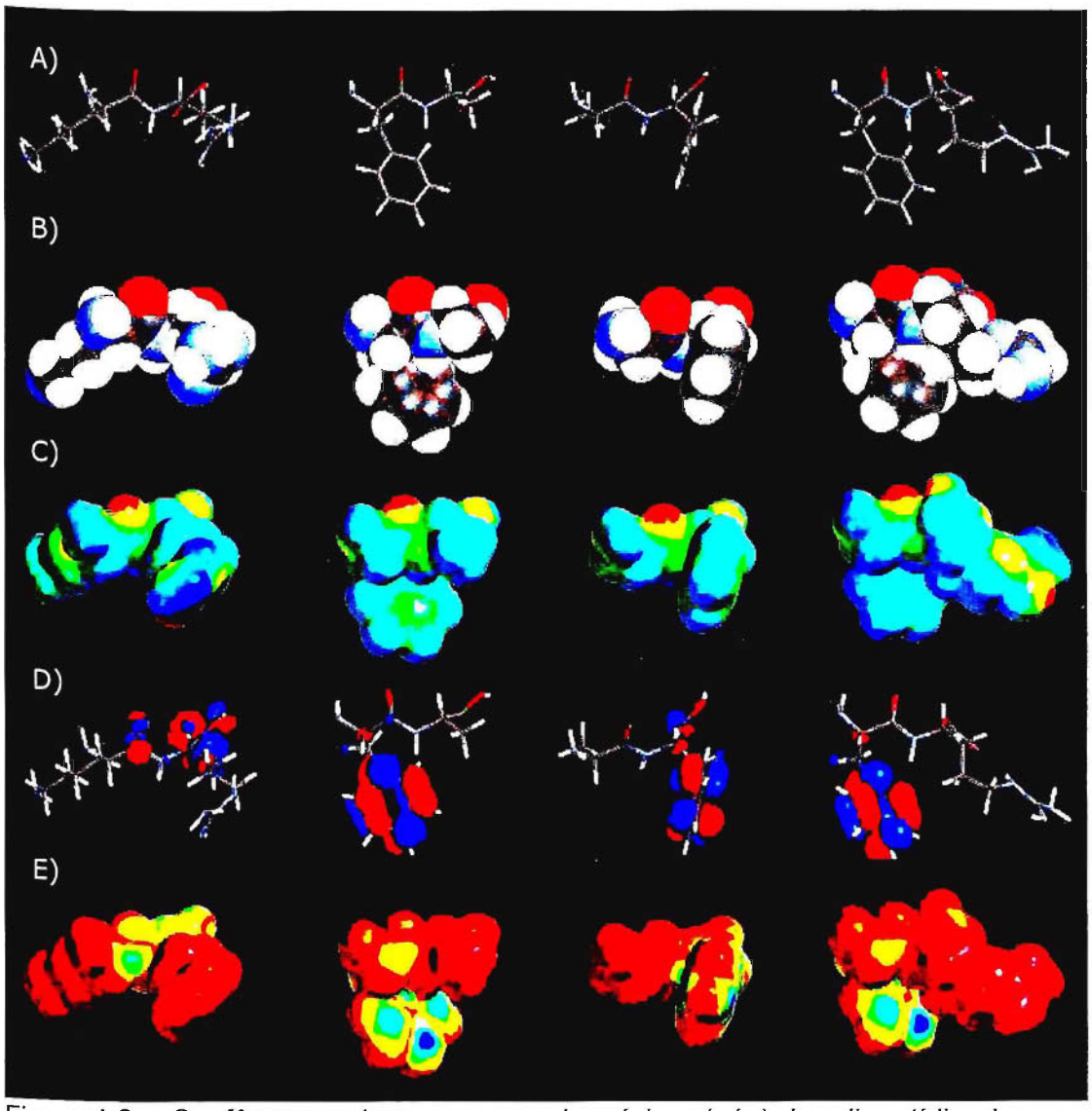


Figura 4.2 – Confôrmeros de menor energia mínima (gás) dos dipeptídios Lys-Arg, Phe-Ala, Ala-Phe e Phe-Arg: A) modelo tubo; B) CPK; C) MEPs (–65 (vermelho) a 30 (azul) kcal/mol) superposta na isodensidade de 0,002 e/au^3; D) orbitais LUMO (isossuperfície 0,002 eV); E) Mapas LUMO (0,000 (vermelho) a 0,012 (azul) kcal/mol) na isodensidade de 0,02 e/au^3. Átomos nas cores: C (cinza), O (vermelho), N (azul) e H (branco).

4.3.2.2 Construção e análise dos modelos dipeptídicos de primaquina e pró-

fármacos recíprocos dipeptídicos de primaquina e nitrofural

Para a validação da metodologia proposta no estudo de MM, decidiu-se adotar como modelo pró-fármacos dipeptídicos de PQ e recíprocos NF-dipeptídios-primaquina (PQ), anteriormente sintetizados em nosso Laboratório por CHUNG (1996), dos quais se dispõem de dados de atividade biológica. Partindo-se, então, dos confôrmeros de menor energia mínima em gás selecionados para os dipeptídios LysArg, PheAla e PheArg e do respectivo confôrmero da primaquina (PQ), obtido através de metodologia descrita para construção dos modelos de peptídios, construíram-se, inicialmente, os modelos de pró-fármacos dipeptídicos da primaquina (LysArg-PQ; PheAla-PQ e PheArg-PQ), parte dos derivados finais utilizados como modelos e cuja atividade também foi determinada (CHUNG *et al.*, 1997). A ligação amídica entre a PQ e os dipeptídios foi realizada por meio da união entre o nitrogênio da amina primária terminal da PQ e o grupo carboxílico livre presente na Arg e Ala dos respectivos dipeptídios.

Em razão de se empregar confôrmero de mínima de energia, optou-se por fixar (*freezing*) átomos de parte das estruturas da PQ e do dipeptídio, mantendo-se livre apenas as novas ligações amídicas recém-construídas. Realizou-se, então, a otimização por método MMFF94, seguida por método AM1. Os átomos das moléculas foram liberados, ou descongelados, ao final da otimização. Pelas razões anteriormente apontadas, o estudo de análise conformacional por método de Monte Carlo foi realizado com a rotação de apenas dois dos diedros que envolvem a ligação amídica fármaco/peptídios, com a possibilidade de análise de total de 36 confôrmeros, com rotação a cada 120° por diedro. Os procedimentos seguintes foram s emelhantes aos descritos para os dipeptídios. Os resultados obtidos para os pró-fármacos dipeptídicos de PQ corroboram aqueles obtidos para os espaçantes peptídicos isolados, demonstrando menor impedimento estérico da carbonila peptídica do LysArg-PQ e favorecimento eletrônico desta carbonila pelo ataque pela Cys25 da cruzipaína, o que pode ser observado na Figura 4.3. Nesta, apresentam-se os pró-fármacos em questão nos modelos de Tubo, CPK e seus respectivos MEPs (*molecular electrostatic potential* ou mapa de potencial eletrostático). Nos MEPS a representação se dá pela intensidade de cor sobre a superfície:

quanto maior a intensidade do vermelho, maior a densidade eletrônica e quanto maior a intensidade do azul, menor a densidade eletrônica. A menor liberdade dos derivados PheAla-PQ e PheArg-PQ se dá pelo impedimento estérico proporcionado pelo grupo fenila presente no resíduo Phe. É importante ressaltar que os resultados de atividade biológica contra *T. cruzi*, reportados por CHUNG e colaboradores (1997) estão de acordo com os resultados da MM, pois nestes ensaios o LysArg-PQ se mostra mais ativo que os outros dois pró-fármacos.

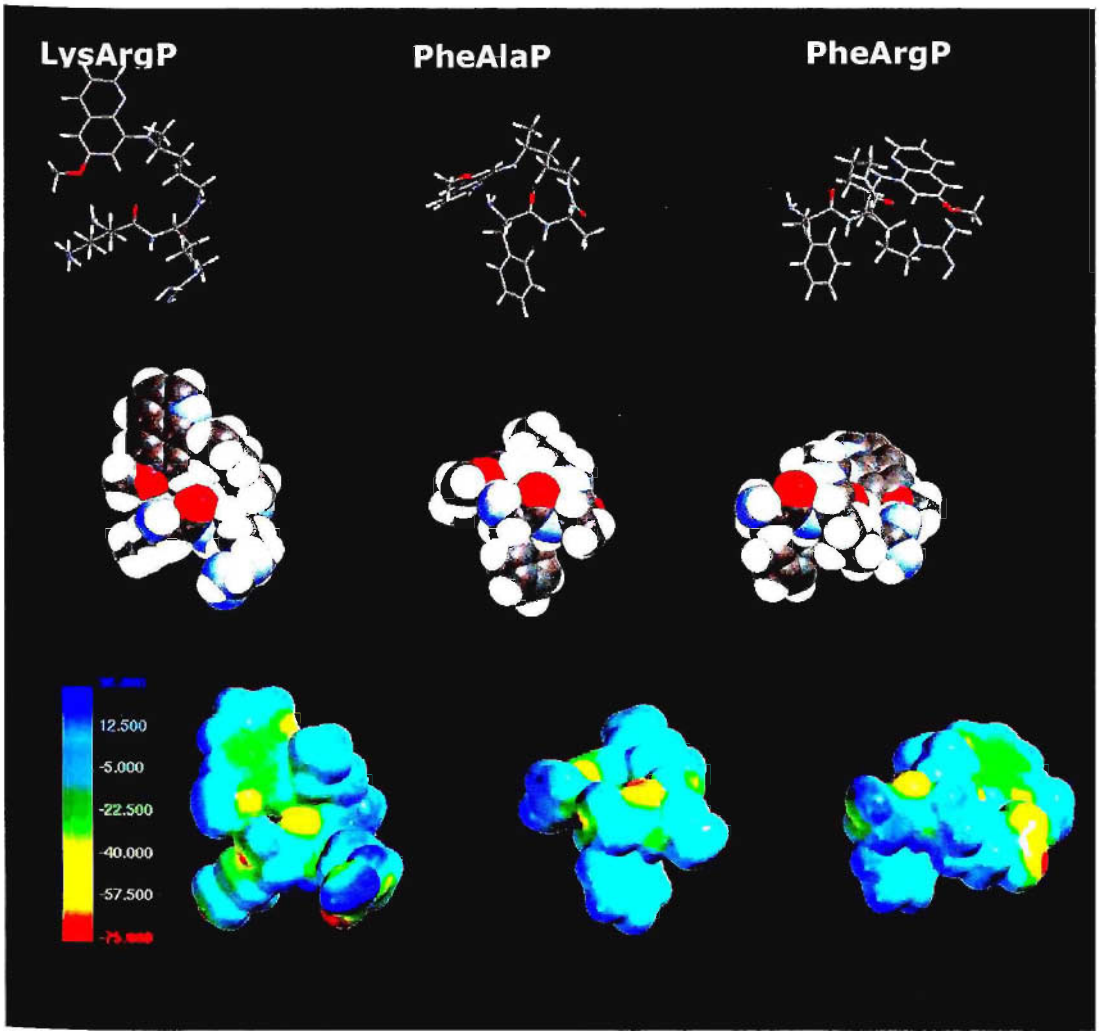


Figura 4.3 - Confôrmeros de menor energia (gás) pró-fármacos peptídicos de PQ: A) modelo tubo; B) CPK; C) MEPs (–65 (vermelho) 30 (azul) kcal/mol) superposta na isodensidade de 0,002 e/au^3. Átomos nas cores: C (cinza), O (vermelho), N (azul) e H (branco).

Para o estudo dos pró-fármacos recíprocos de NF e PQ e dos pró-

fármacos duplos de NF construiu-se um modelo para NFOH, pois é o intermediário de síntese de bases de Mannich passível de ser liberado e exercer ação, visto ter apresentado melhor atividade e menor mutagenicidade que seu precursor NF (CHUNG *et al.*, 2003). O modelo do NFOH foi construído seguindo os procedimentos descritos para os dipeptídios. O confôrmero de menor energia mínima foi comparado em suas distâncias e ângulos de ligação com os dados cristalográficos (DORIGUETTO *et al.*, 2005), validando o método AM1, utilizado para a construção do modelo.

Seguindo a metodologia utilizada para os pró-fármacos peptídicos de PQ, utilizaram-se os confôrmeros de menor energia mínima em vácuo dos peptídios Lys-Arg, Phe-Arg, Phe-Ala e Ala-Phe e os confôrmeros previamente selecionados da PQ e do NFOH. Ligação amídica foi empregada para a união entre a PQ e a Arg ou Ala dos dipeptídios. Os processos de otimização da geometria e análise conformacional seguiram conforme descrito para os pró-fármacos peptídicos de PQ. Os confôrmeros de menor energia mínima, em vácuo, foram selecionados para a construção dos pró-fármacos recíprocos de PQ e NF através da ligação do tipo *N*-base de Mannich, contendo ponte metilênica entre o nitrogênio α-amino da Phe ou Lys e o nitrogênio terminal do NF. As geometrias das estruturas foram fixadas, deixando livre apenas as duas ligações presentes na ponte metilênica. Os dois diedros compreendidos nesta última foram submetidos à análise conformacional por Monte Carlo, como descrito anteriormente. Os confôrmeros de menor energia mínima foram selecionados e submetidos a cálculos de propriedades e superfícies eletrônicas. Os modelos e as superfícies eletrônicas obtidas para os pró-fármacos recíprocos de NF e PQ foram avaliados. As observações referentes a esses modelos corroboram aquelas obtidas para os pró-fármacos dipeptídicos de PQ. Os pró-fármacos contendo espaçante LysArg se mostram com maior liberdade da carbonila peptídica e representam, também, condição eletrônica favorável para o ataque pela Cys25 da cruzipaína, conforme pode ser visualizado pelos modelos apresentados e pelo MEPs (Figura 4.4). Tal fato leva a supor que este seria o composto mais ativo, resultado este confirmado pelos dados obtidos por CHUNG (1996).

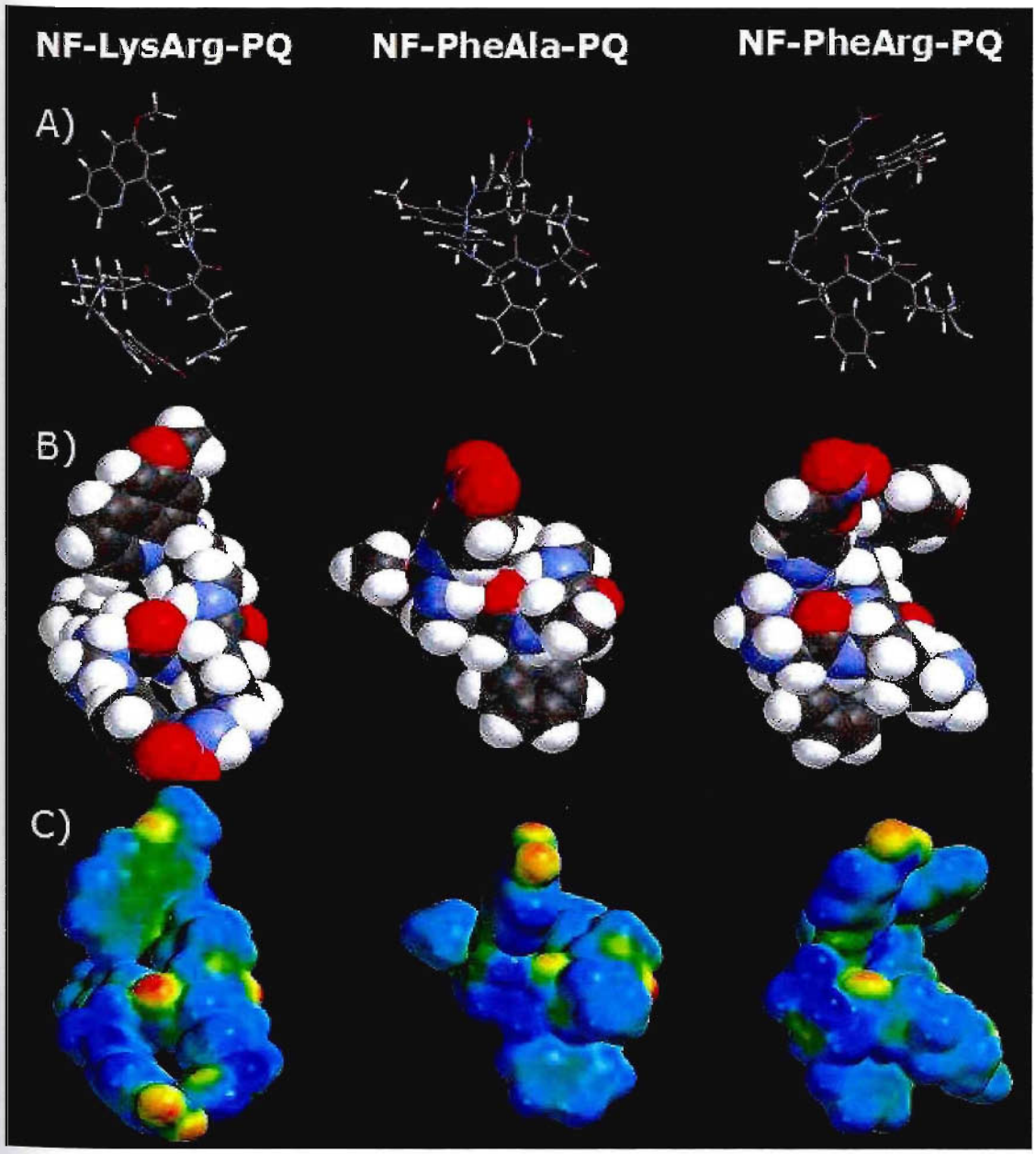


Figura 4.4 – Confôrmeros de menor energia (gás) para os pró-fármacos recíprocos de NF e PQ: A) modelo tubo; B) CPK; C) MEPs (–65 (vermelho) 30 (azul) kcal/mol) superposta na isodensidade de 0,002 e/au^3. Átomos nas cores: C (cinza), O (vermelho), N (azul) e H (branco).

4.3.2.3 Construção e análise dos pró-farmacos duplos de NF com espaçantes dipeptíficos

Utilizando-se os confôrmeros de menor energia mínina em vácuo dos dipeptídios LysArg, PheArg, PheAla e AlaPhe e do NFOH, previamente calculados, foram construídos e otimizados os modelos de pró-fármacos duplos de NFOH contendo os espaçantes peptídicos anteriormente citados.

A união entre a primeira molécula de NFOH e o dipeptídio se deu por meio de ligação éster entre o grupo carboxílico presente no peptídio e a hidroxila do NFOH. As etapas de otimização da geometria e análise conformacional foram realizadas conforme descrito para as outras séries de pró-fármacos, fixando os átomos provenientes das estruturas minimizadas dos peptídios e do fármaco em questão e conferindo liberdade conformacional para átomos e diedros envolvidos na ligação para formação das estruturas dos pró-fármacos. Os respectivos confôrmeros de menor energia mínima no vácuo foram selecionados e submetidos a cálculo de determinação de carga de ponto único. Estes confôrmeros foram posteriormente ligados a uma segunda molécula de NF por meio de ligação do tipo base de Mannich, com a amina em posição α do segundo aminoácido constituinte do dipeptídio. A otimização e análise conformacional seguiram metodologia descrita para as duas primeiras séries de pró-fármacos, fixando-se as ligações de átomos dos peptídios, provenientes de estrutura de mínima energia, e deixando livre os átomos e diedros envolvidos nas ligações entre o fármaco e dipeptídio, que se tomou como modelo para o estudo dos pró-fármacos. O confôrmero de menor energia mínima selecionado (estado gasoso) foi empregado para o cálculo de determinação de carga de ponto único e de construção de superfícies eletrônicas. Observou-se para os modelos construídos que, novamente, o dipeptídio LysArg parece ser espaçante mais promissor, pois no pró-fármaco NF-LysArg-NF há maior liberdade para ataque à carbonila peptídica, como o demonstrado pelo modelo CPK, e condição energética favorável ao ataque nucleofílico pela Cys25 da cruzipaína, demonstrado pelo MEP, ambos apresentados na Figura 4.5.

Realizou-se análise comparativa entre as propriedades físico-químicas calculadas por método AM1 dos valores de energia entálpica dos confôrmeros

de menor energia mínima nos meios de vácuo e solvatado, as respectivas cargas eletrônicas dos carbonos das carbonilas peptídicas, o coeficiente de partição, representado pelo log P calculado conforme método de Ghose-Cripen, disponível no programa Spartan, e o volume molecular dos pró-fármacos dipeptídicos recíprocos de NF e PQ e dos pró-fármacos duplos de NF (Tabela V). Essa análise também indica o dipeptídio LysArg no pró-fármaco recíproco de NF e PQ como o mais promissor.

Tabela IV.1 – Análise das propriedades físico-químicas dos pró-fármacos recíprocos de NF e PQ e duplos de NF

Pró-fármaco	**log P**	**Volume Molecular (Å^3)**	**Energia de formação (kcal/mol)**		**Carga no carbono carbonílico (eV)**
			Vácuo	**Solvatado**	
NF-LysArg-NF	-2,78	666,72	-67,97	-95,63	0,68
NF-PheAla-NF	-0,31	601,13	-42,73	-60,58	0,64
NF-AlaPhe-NF	-0,31	600,07	-47,56	-60,48	0,56
NF-PheArg-NF	-0,85	684,67	-24,34	-45,96	0,64
NF- LysArg-PQ	-0,92	859,38	-49,20	-72,17	0,74
NF-PheAla-PQ	1,55	688,52	-23,69	-34,72	0,63
NF-PheArg-PQ	1,02	862,98	-23,84	-24,84	0,60

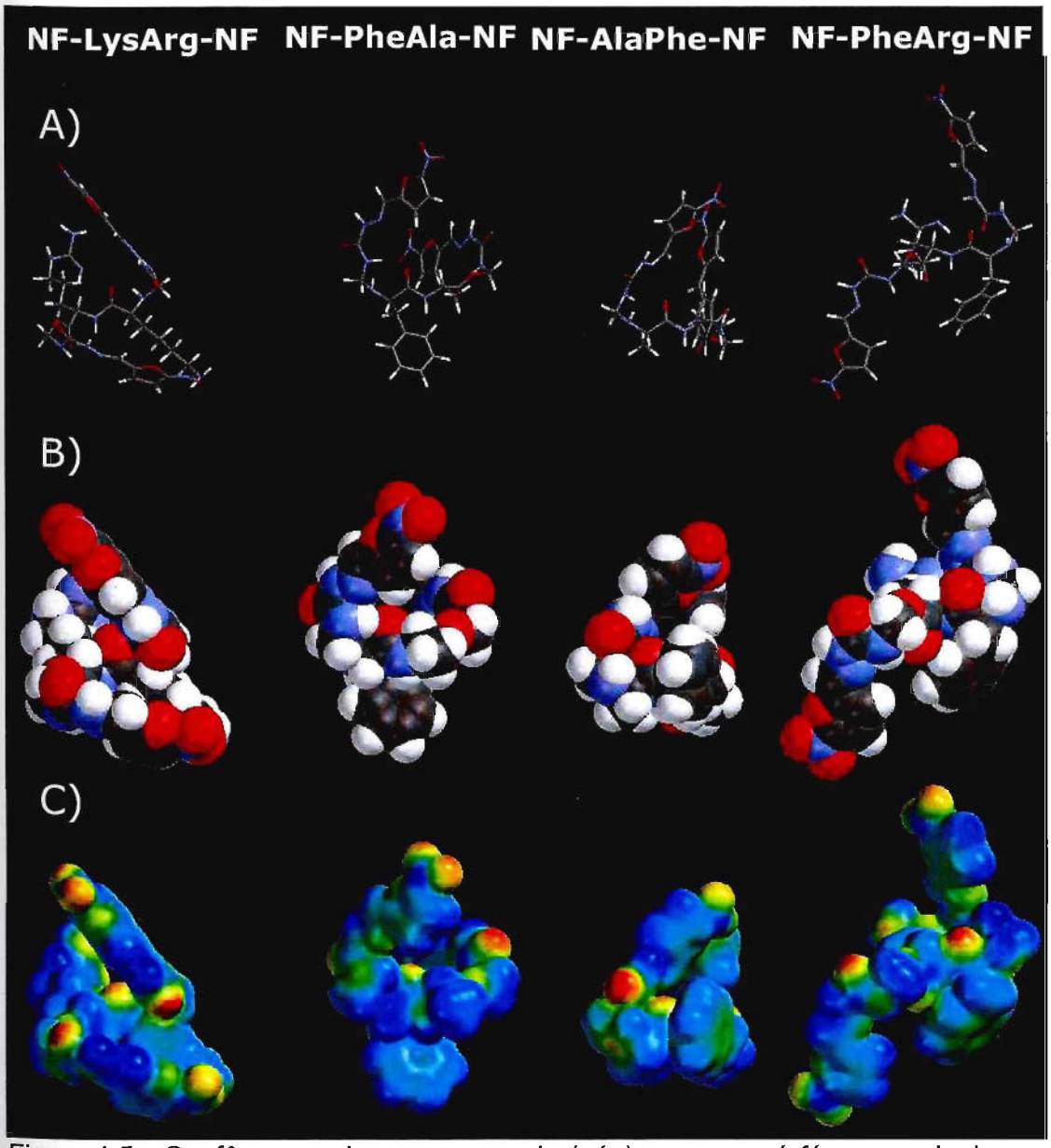


Figura 4.5 - Confôrmeros de menor energia (gás) para os pró-fármacos duplos de NF: A) modelo tubo; B) CPK; C) MEPs (–65 (vermelho) 30 (azul) kcal/mol) superpostos na isodensidade de 0,002 e/au^3. Átomos nas cores: C (cinza), O (vermelho), N (azul) e H (branco).

4.3.2 Docking

4.3.2.1 *Docking* dos pró-fármacos específicos para cruzipaína

Os primeiros estudos de *docking* foram realizados em colaboração com o Dr. Alberto Malvezzi (orientado pela Profa. Dra. Antônia T. Do Amaral, IQ-USP), com o objetivo de predizer teoricamente a interação dos pró-fármacos com espaçantes dipeptídicos específicos para cruzaína, NF-lysArg-PQ, NF-PheAla-PQ, NF-PheArg-PQ (CHUNG, 1996) e também dos pró-fármacos NF-LysArg-NF, NF-PheAla-NF, NF-AlaPhe-NF e NF-PheArg-NF. Estudos de *docking* dos pró-fármacos peptídicos de PQ (Lys-Arg-PQ, PheAla-PQ, PheArg-PQ e Arg-PQ (CHUNG *et al.*, 1997)), foram efetuados em razão dos dados de atividade tripanomicida disponíves, de forma a validar os estudos realizados. Tais compostos serviriam de modelo para predizer a possível interação entre o os pró-fármacos e a cruzaína, o favorecimento ou não da clivagem dos pró-fármacos e liberação do fármaco (PQ) para a exercer a atividade biológica, além de interpretar os resultados de atividade biológica dos mesmos.

A primeira parte do trabalho de *docking* consistiu na extração e preparação da estruturas de PDB da cruzaína, as quais foram obtidas do *site* http://www.pdb.org. Optou-se por trabalhar com a estrutura 1ME4, por ser estrutura cristalizada de boa definição, 1,2 Å. A preparação da proteína foi realizada no programa DeepView (http://www.expasy.org/spdbv/), utilizando-se o respectivo tutorial, sendo retirados o ligante, co-cristalizado com a enzima, e as moléculas de água. A superfície da estrutura da cruzipaína com seus respectivos bolsos de interação com os ligantes é mostrada na Figura 4.6.

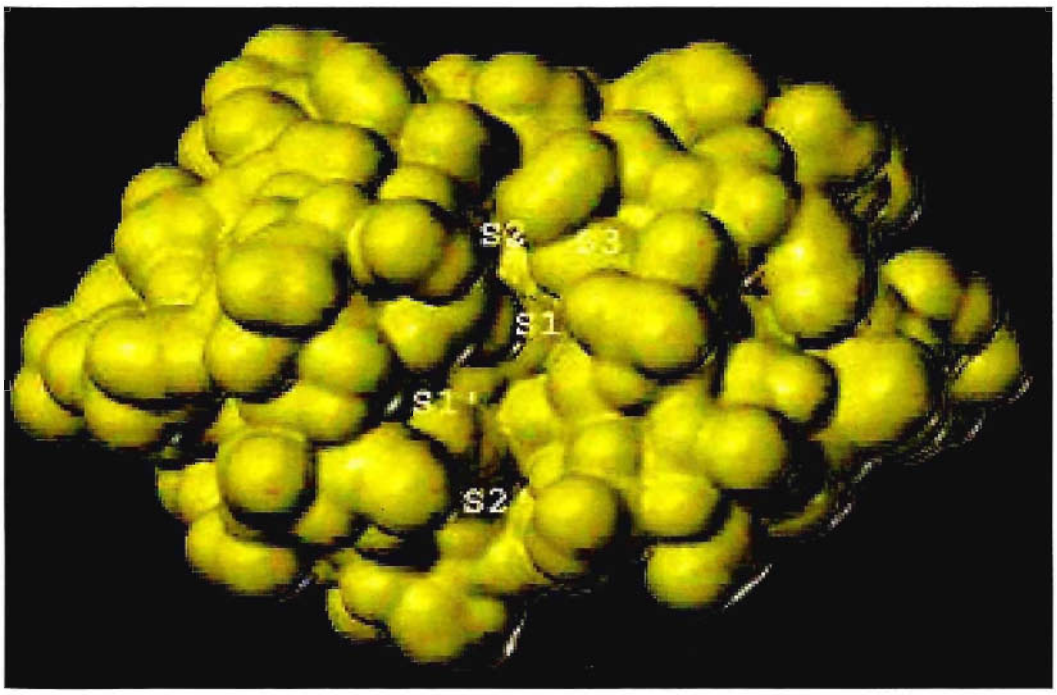


Figura 4.6 – Superfície da estrutura cristalizada da cruzaína mostrando os respectivos bolsos de possível interação com os ligantes.

Os confôrmeros de menor energia mínima dos pró-fármacos calculados por método AM1 no estudo de modelagem molecular foram selecionados para serem empregados como ligantes. Escolheram-se os modelos de menor energia da interação entre ligante e receptor. Os estudos de *docking* para os pró-fármacos específicos da cruzipaína foram efetuados utilizando-se o programa GOLD 3.0 (GlaxoSmithKline.Inc.). Neste, indicou-se o resíduo da Cys25 como o centro da caixa de *docking* (*Grid*) e adotou-se como tamanho do *grid* 30:30:50 Å.

Por meio dos estudos de *docking* com os pró-fármacos NF-dipeptídios-PQ, anteriormente sintetizados em nosso Laboratório por CHUNG (1996), buscou-se a interpretação da atividade biológica que eles apresentaram. Para os três pró-fármacos NF-dipeptídios-PQ submetidos ao *docking* verificou-se a importância de um grupo hidrofóbico em contato com o sítio S2 da cruzipaína, o que pode ser observado na Figura 4.7. Nesta se mostra o *docking* do composto NF-PheAla-PQ, com o resíduo Phe acomodado no sítio S2. Essa mesma interação ocorre no *docking* do NF-PheArg-PQ (Figura 4.8). Neste também se observa a aproximação da carbonila semicarbazônica do NF,

presente no pró-fármaco, à Cys25 da cruzípaína, o que condiz com o mecanismo de ação proposto por DU e colaboradores (2002). Já no *docking* do NF-LysArg-PQ, a importância de um grupamento hidrofóbico é apresentada pelo enovelamento do resíduo Lys para se acomodar no bolso S2, afastando deste a parte hidrofílica do aminoácido. Nesse pró-fármaco, novamente se verifica a proximidade da carbonila semicarbazônica, presente no NF, à Cys25 da cruzipaína. A distância entre o carbono carbonílico e o enxofre da Cys foi medida, 3,5 Å, verificando-se, assim, a possibilidade do ataque nucleofílico da Cys25 à carbonila e reforçando-se a idéia do mecanismo de ação descrito anteriormente.

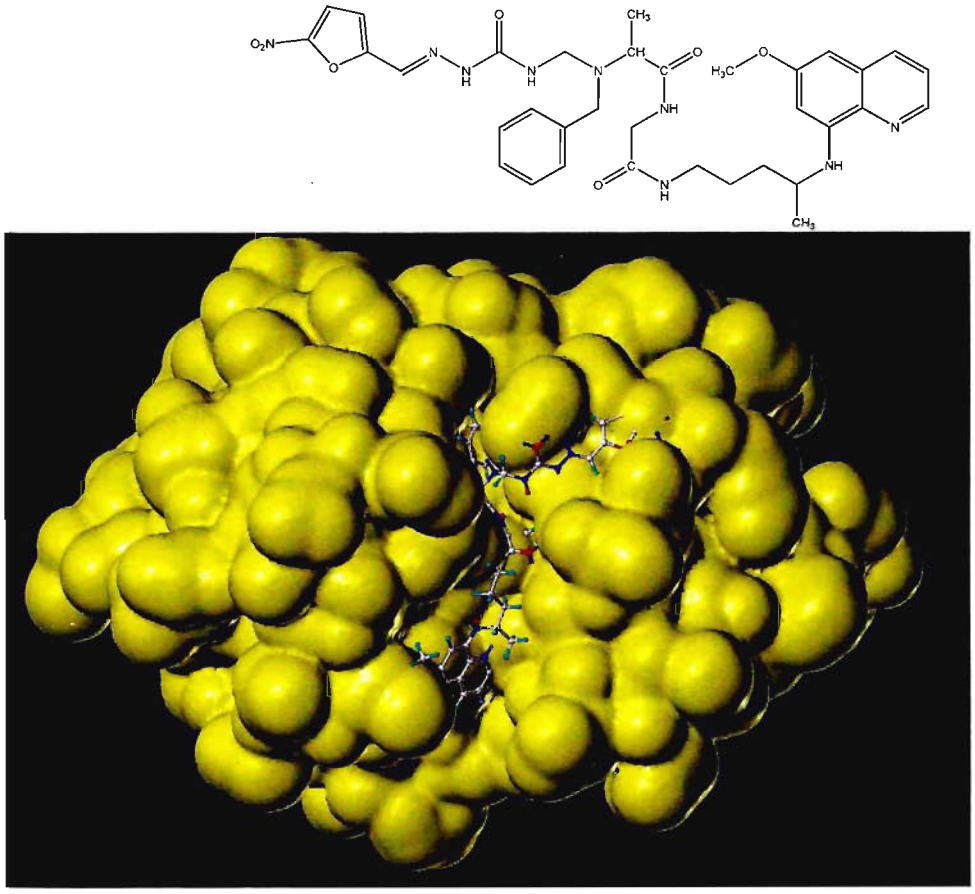
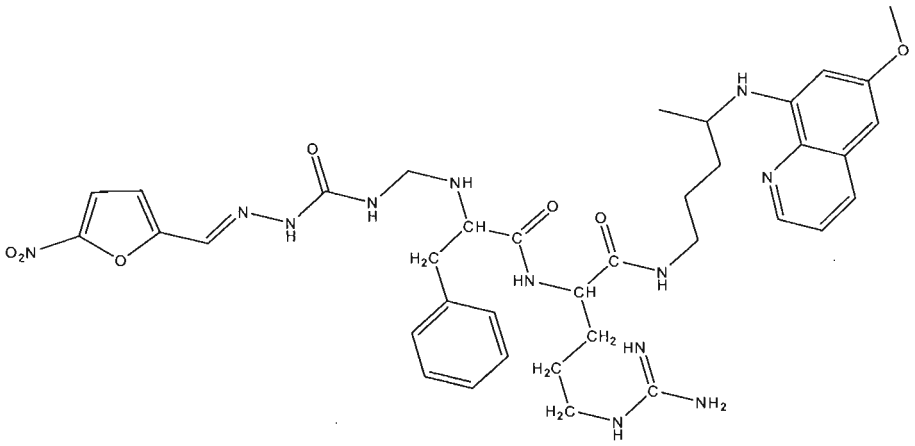


Figura 4.7 – *Docking* do NF-PheAla-PQ na cruzaína, indicando o ajuste por Phe no bolso S2.



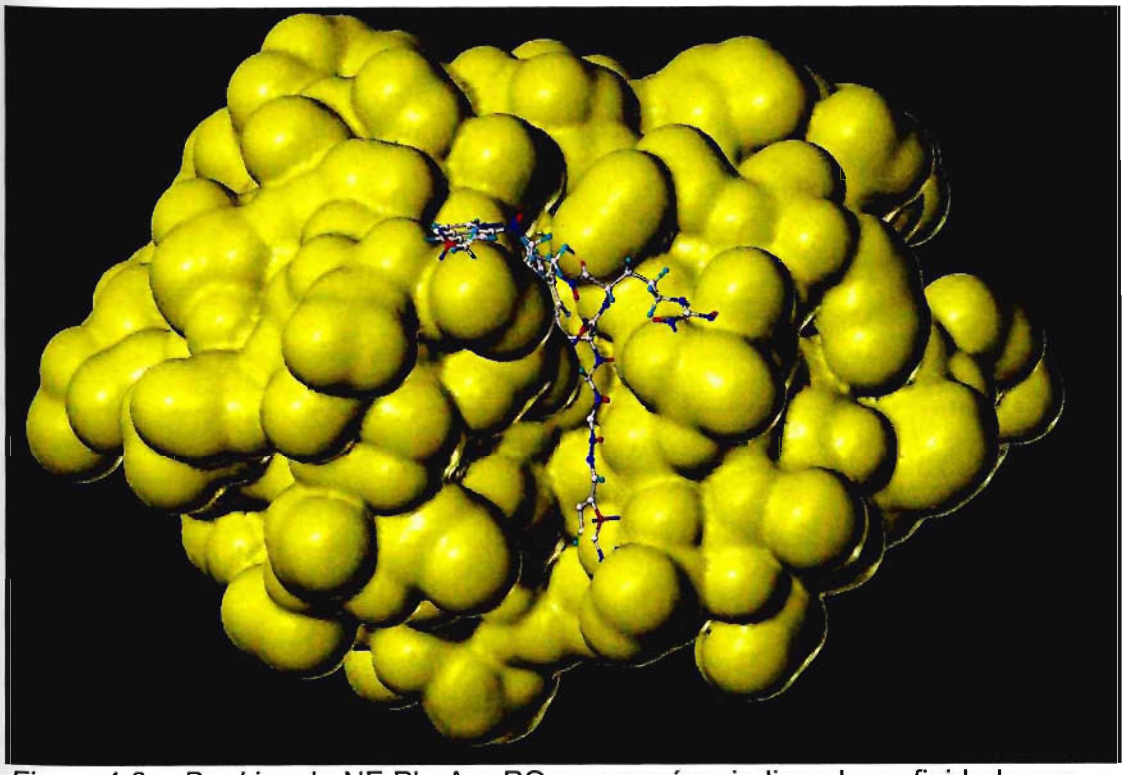


Figura 4.8 – *Docking* do NF-PheArg-PQ na cruzaína, indicando a afinidade por Phe no bolso S2 e a aproximação da carbonila da semicarbazona do NF à Cys25 da enzima.

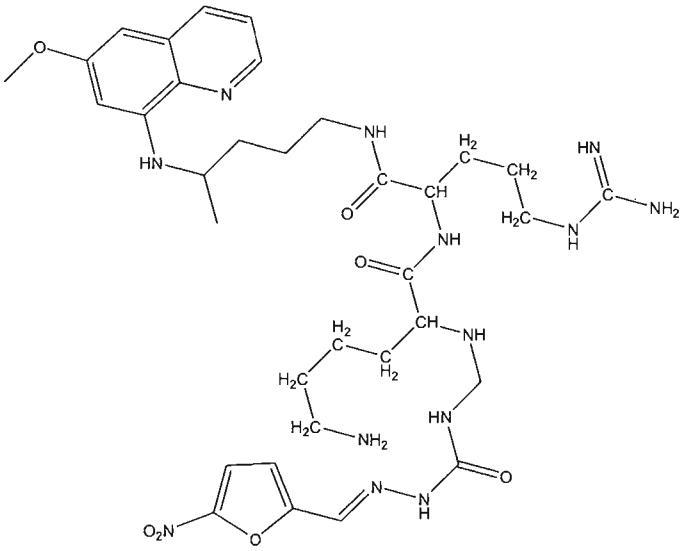


Figura 4.9 – *Docking* do NF-LysArg-PQ na cruzaína, indicando a afinidade por Phe no bolso S2 e a aproximação da carbonila da semicarbazona do NF à Cys25 da enzima.

Os estudos de *docking* se estenderam para os pró-fármacos duplos de NF,NF-LysArg-NF, NF-PheArg-NF, NF-PheAla-NF, e para NF-AlaPhe-NF, a fim de se entender sua interação, avaliando-se, em adição, a importância da seqüência a ser utilizada.Novamente, verificou-se a importância do resíduo hidrofóbico. Nos três compostos submetidos ao estudo, que apresentavam Phe na sua constituição, NF-PheAla-NF, NF-AlaPhe-NF e NF-PheArg-NF, este resíduo se acomodou no bolso S2 (Figuras 4.10, 4.11 e 4.12). A variação nos peptídios PheAla e AlaPhe nos pró-farmacos dipeptídicos duplos de NF foi realizada de modo a avaliar se a mudança na ordem do dipeptídio em relação à ligação com o fármaco, se base de Mannich ou éster, influenciaria na interação com a enzima. No entanto, a interação dos pró-fármacos não apresentou diferença considerável com a ordem dos aminoácidos.

Ao se interpretar os resultados do *docking* do NF-LysArg-NF, observou-se que, à semelhança ao pró-fármaco recíproco com PQ, a molécula se orientou por enovelamento do resíduo de Lys para acomodação no bolso hidrofóbico S2. Também, a aproximação da carbonila semicarbazônica, presente no NF, à Cys25 da cruzaína (Figura 4.13) foi observada. A possibilidade de ataque nucleofílico ao carbono carbonílico pelo enxofre da Cys foi confirmada pela a distância entre esses átomos, 3,22 Å, mais uma vez corroborando o mecanismo de ação já citado.

Em resumo, todos os derivados em estudo buscaram conformação na qual um resíduo hidrofóbico se acomoda no bolso S2 da proteína e em três dos sete pró-fármacos houve a aproximação da carbonila semicarbazônica à Cys25 da cruzaína, fortalecendo a hipótese de haver ligação entre os compostos e a enzima, com possível inibição da mesma.

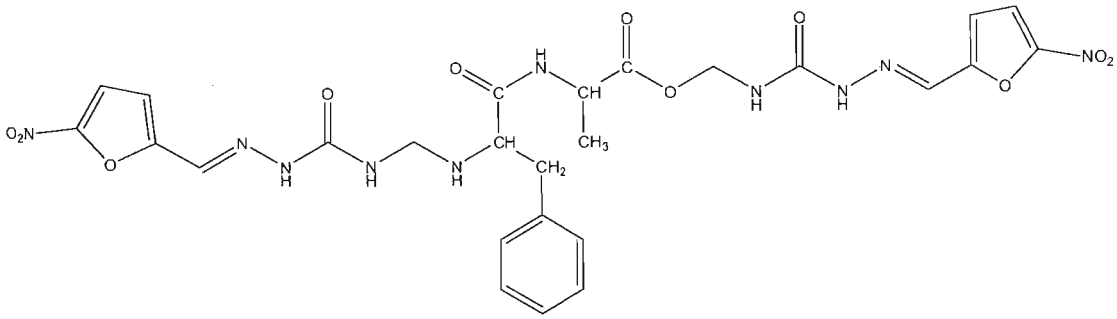


Figura 4.10 – *Docking* do NF-PheAla-NF na cruzaína, indicando a afinidade por Phe no bolso S2.

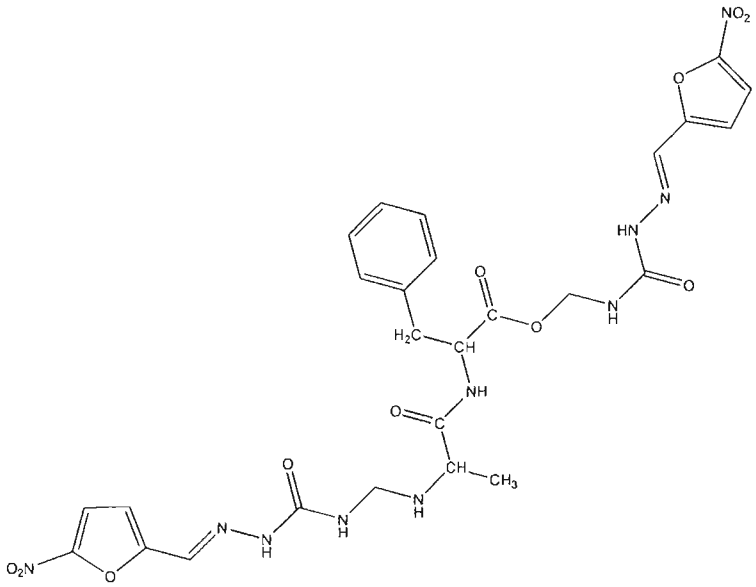
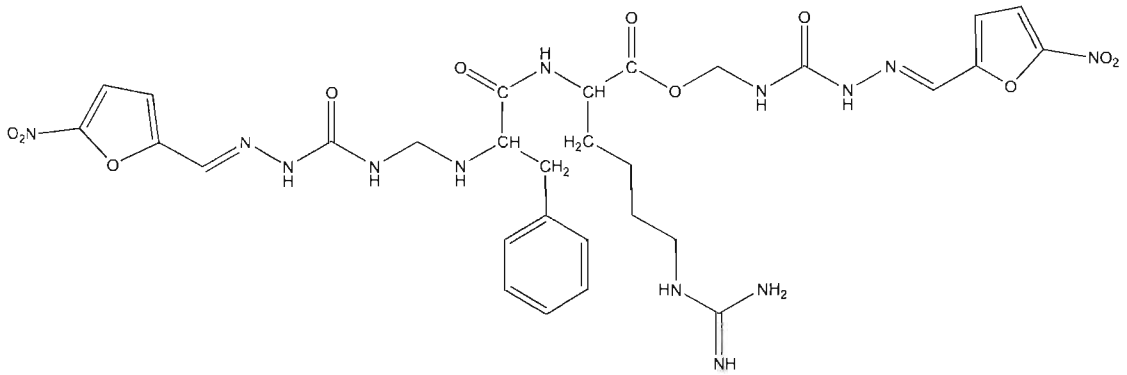


Figura 4.11 – *Docking* do NF-AlaPhe-NF na cruzaína, indicando a afinidade por Phe no bolso S2.



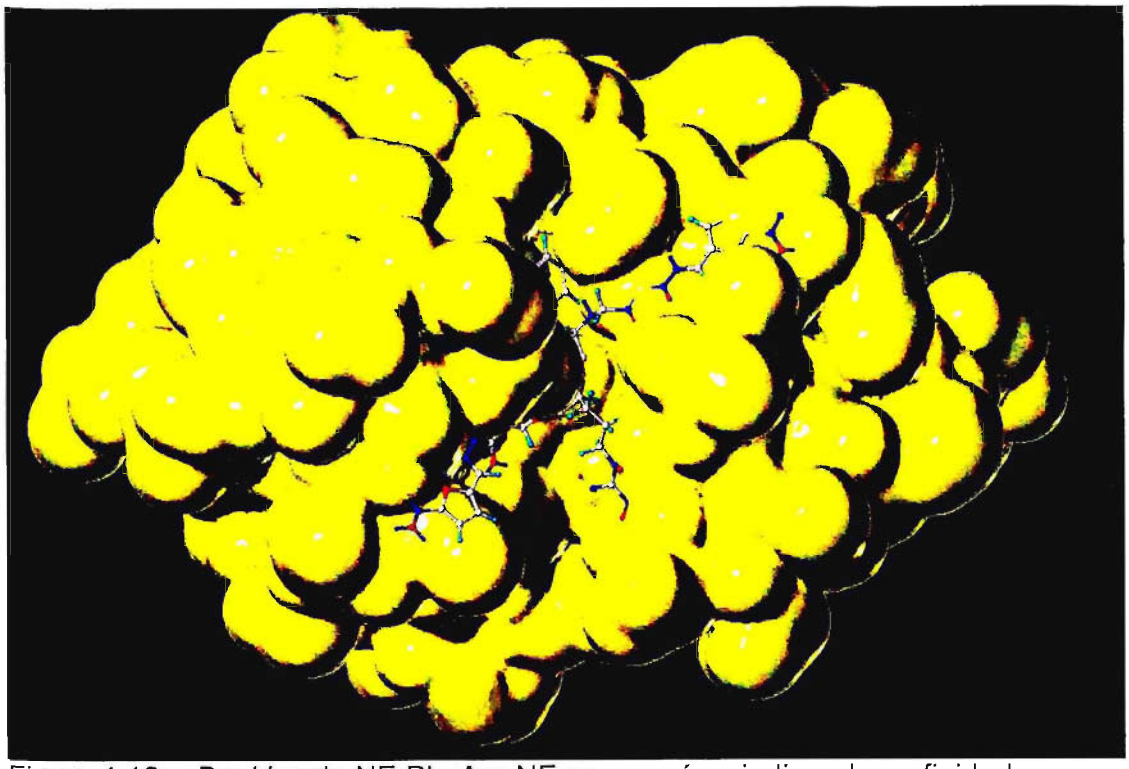
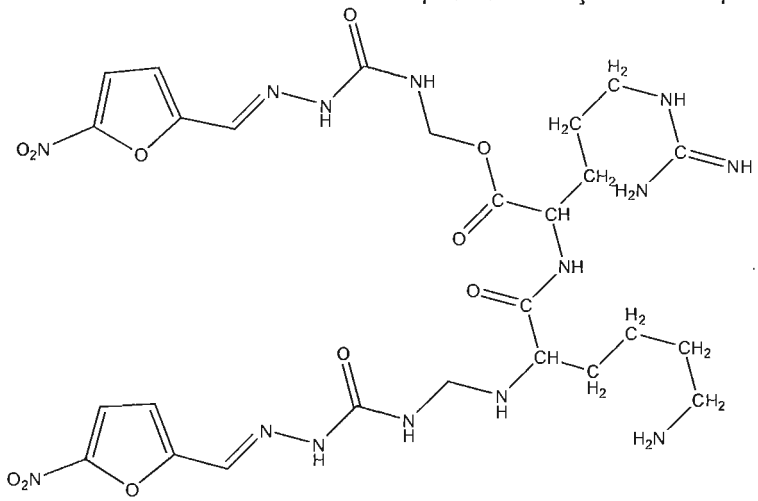


Figura 4.12 – *Docking* do NF-PheArg-NF na cruzaína, indicando a afinidade por Phe no bolso S2.



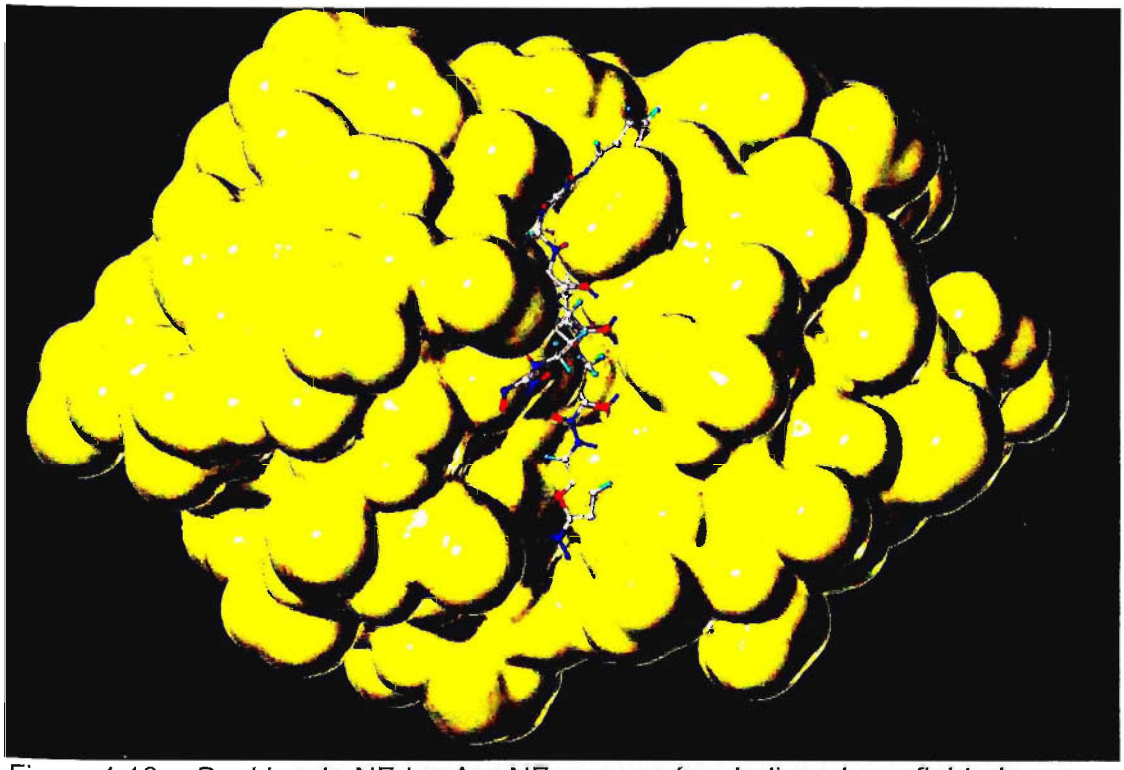


Figura 4.13 – *Docking* do NF-LysArg-NF na cruzaína, indicando a afinidade por Phe no bolso S2, e aproximação da carbonila da semicarbazona do NF à Cys25 da cruzaína.

Os estudos de *docking* realizados para os pró-fármacos peptídicos de PQ (Lys-Arg-PQ, PheAla-PQ, PheArg-PQ e Arg-PQ (CHUNG *et al.*, 1997)) foram realizados de forma a confirmar os estudos realizados anteriormente, visto a disponibilidade de dados sobre a atividade biológica desses pró-fármacos e, também, pela existência de um composto inativo (Arg-PQ). Esses estudos poderiam, ademais, auxiliar no entendimento de interação e clivagem dos pró-fármacos específicos para a enzima.

As análises dos resultados de *docking* foram realizadas utilizando-se as conformações de menor energia de formação obtida para cada um dos pró-fármacos peptídicos da PQ estudados. Verificou-se a importância de um grupo hidrofóbico em contato com o sítio S2 da cruzaína, o que pode ser observado nas figuras dos compostos cujo transportador peptídico contêm resíduo Phe (PheAla-PQ, PheArg-PQ), o qual se acomoda perfeitamente no bolso S2 da enzima. Esses resultados corroboram os resultados de *docking* de outros pró-farmacos apresentados anteriormente.

A clivagem da ligação entre o fármaco (PQ) e peptídio ou entre os aminoácidos é o ponto fundamental para a liberação do fármaco para que o mesmo exerça sua atividade biológica. Sendo assim, o planejamento destes pró-fármacos sugere o reconhecimento específico da cruzaína pelos peptídios e clivagem da ligação peptídica por meio de ataque nucleofílico da Cys25, entre os bolsos S1 e S1' dessa enzima. A atividade biológica destes pró-fármacos se apresenta da seguinte forma: Lys-Arg-PQ>PheAla-PQ>>PheArg-PQ>>>Arg-PQ (CHUNG *et al.*, 1997). Os resultados de *docking* obtidos para os pró-fármacos peptídicos da PQ estão de acordo com esses dados de atividade biológica. Ao se observar a proximidade da carbonila a ser clivada para a liberação do fármaco à Cys25, o pró-fármaco mais ativo Lys-Arg-PQ é o que apresenta maior proximidade, com distância de 2,9 Å da carbonila (Figura 4.14). Pode-se observar, ainda, que o pró-fármaco PheAla-PQ se acomoda muito bem no sítio ativo da enzima, porém a distância da carbonila à Cys25 (3,7 Å) (Figura 4.15) é maior que no Lys-Arg-PQ. A figura referente ao *docking* do pró-fármaco PheArg-PQ (Figura 4.16) mostra que a cabonila entre a PQ e o peptídio PheArg se encontra distante da Cys25 (5,6 Å), resíduo supostamente responsável pela clivagem do pró-fármaco, apesar de apresentar o resíduo Phe, que tem afinidade pela Bolso S2 da cruzaína. Já no pró-fármaco Arg-PQ

(Figura 4.17), o anel quinolínico se encaixa no bolso S2 da enzima e a carbonila a ser clivada se coloca distante (6,29 Å) do resíduo catalítico (Cys25).

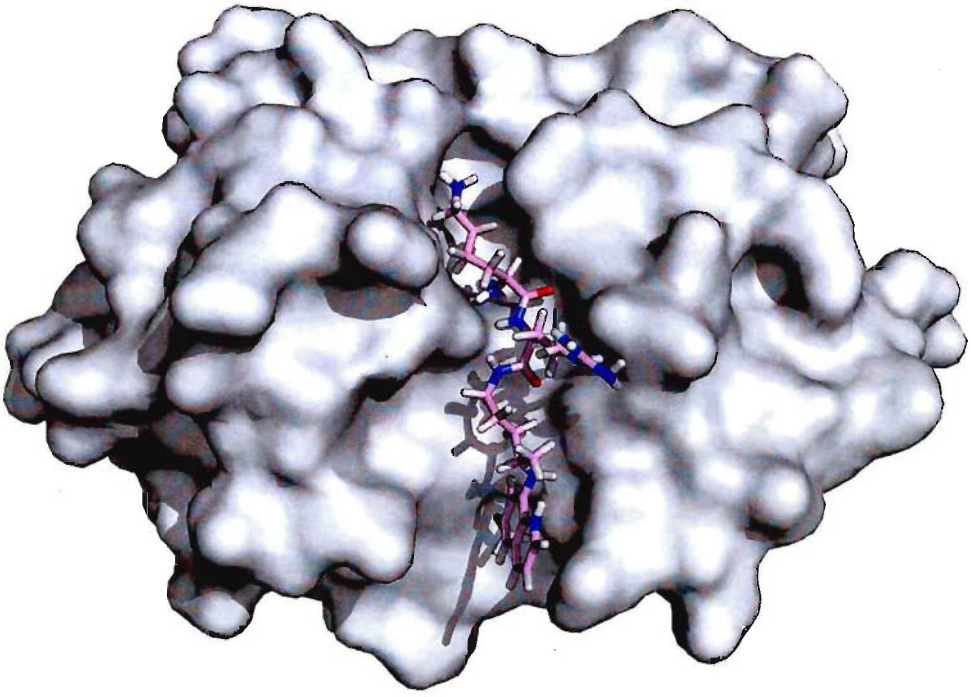


Figura 4.14 - *Docking* do LysArg-PQ na cruzaína.

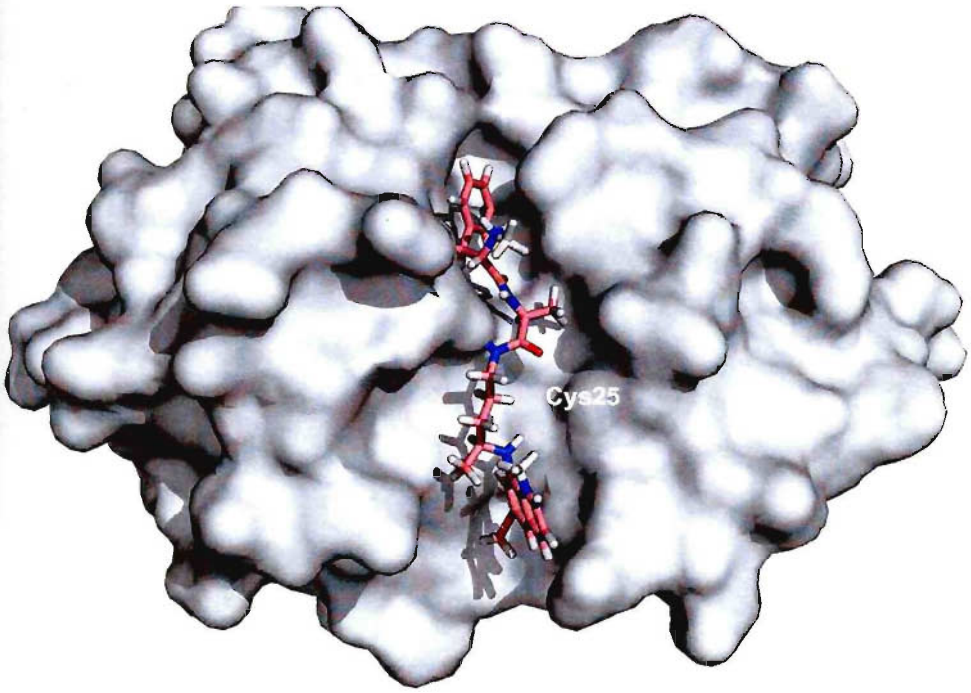


Figura 4.15 - *Docking* do PheAla-PQ na cruzaína.

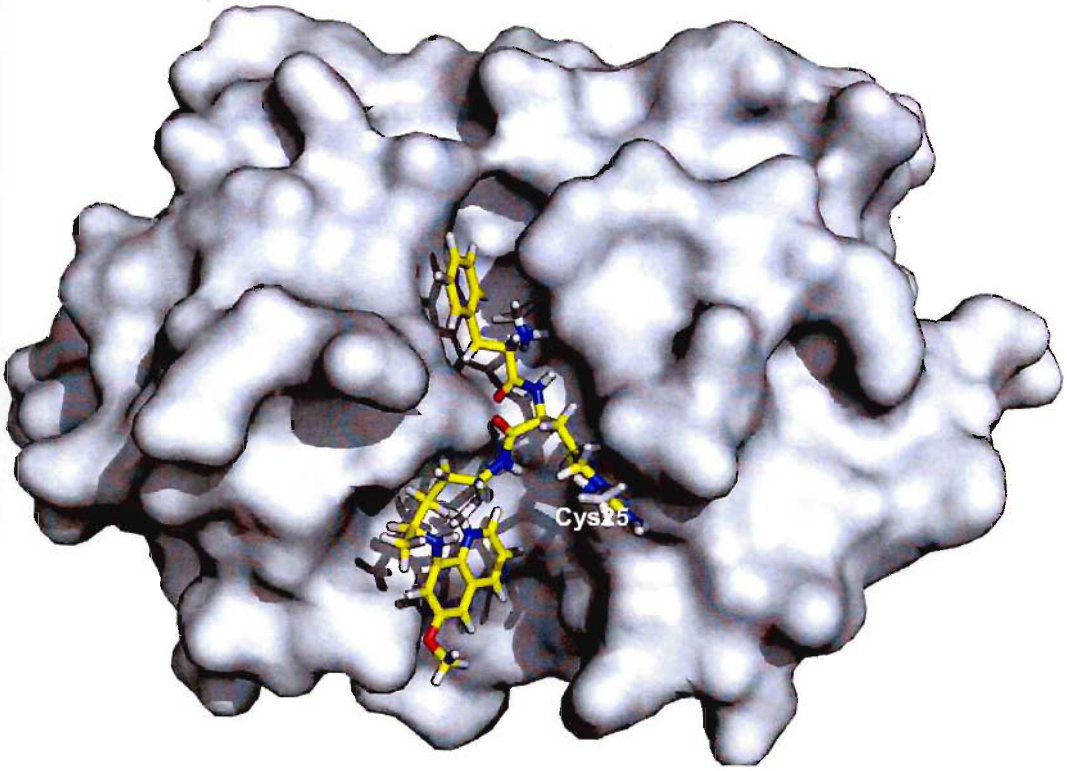


Figura 4.16 - *Docking* do PheArg-PQ na cruzaína.

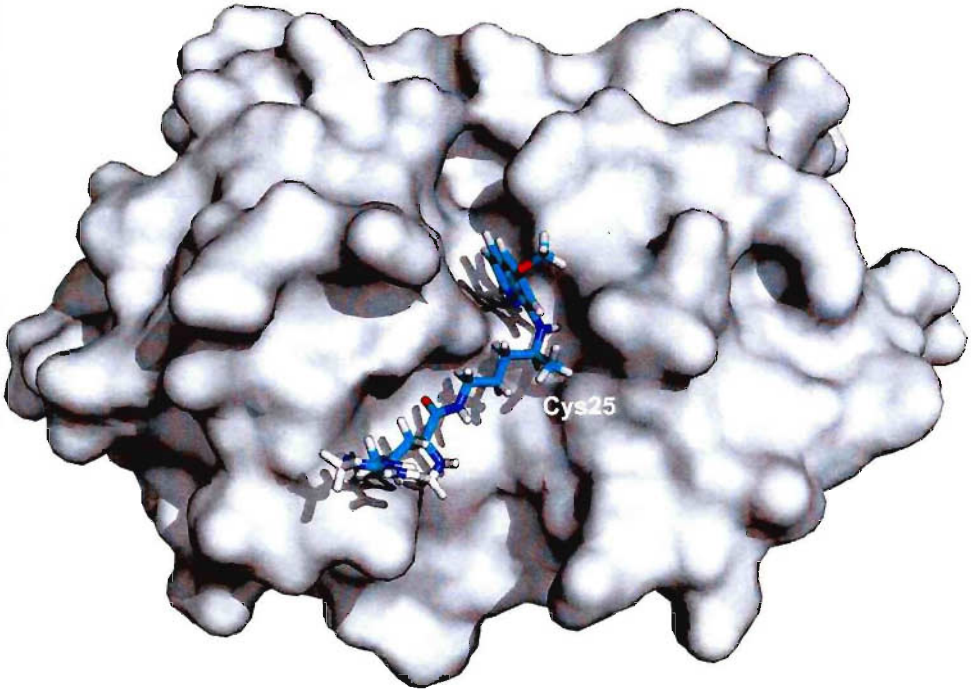


Figura 4.17 - *Docking* do Arg-PQ na cruzaína.

O método de *docking* aplicado foi validado pelos resultados obtidos para os pró-fármacos peptídio-PQ, confirmados pelas atividades biológicas. Visto que este método é o mesmo aplicado para todos os pró-fármacos estudados, acredita-se na coerência dos resultados obtidos. Porém, é imprescindível a avaliação experimental, para confirmação do ponto de clivagem e a determinação da atividade biológica *in vitro* dos pró-fármacos propostos.

4.4 *Conclusões*

- Os estudos de modelagem por método semi-emprico AM1 realizados para os espaçantes peptídicos e pró-fármacos dipeptídicos específicos para a cruzaína foram coerentes com as respectivas atividades tripanomicidas e de grande valor no entendimento do mecanismo de clivagem e liberação dos pró-fármacos;

- Nos modelos obtidos para os pró-fármacos duplos de NF (NF-LysArg-NF, NF-PheAla-NF, NF-AlaPhe-NF e NF-PheArg-NF) verificou-se maior liberdade para o ataque à carbonila peptídica no pró-fármaco NF-LysArg-NF, como demonstrado pelo modelo CPK, e condição energética favorável ao ataque nucleofílico pela Cys25 da cruzipaína, como o indicado pelos MEP;

- Nos estudos de *docking* realizados para os pró-fármacos verificou-se a afinidade da enzima por grupos lipofílicos no bolso S2;

- O estudo dos pró-fármacos peptídio-PQ foi utilizado para a validação do método utilizado. Nesses estudos o pró-fármaco inativo para Arg-PQ apresentou a maior distância da Cys25 da cruzaína. Esse resultado sugere maior dificuldade em clivagem e liberação e, conseqüentemente, menos atividade dos compostos, corroborando os resultados biológicos experimentais;

- O resultado de *docking* para os pró-fármacos peptídicos de PQ (Lys-Arg-PQ, PheAla-PQ, PheArg-PQ e Arg-PQ) são coerentes com os dados biológicos publicados.

4.5 *Referências Bibliográficas*

CHUNG, M. C.; SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GUIDO, R. V. C.; NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E. I. Avanços na latenciação de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 41, p. 155-179, 2005.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; SANTOS, J. L.; GIAROLLA, J.; RANDO, D. G.; ALMEIDA, A. E.; BOSQUESI, P. L.; MENEGON, R. F.; BLAU, L. Prodrugs for the treatment of neglected diseases. *Molecules,* v. 13, p. 616-677, 2008.

CHUNG, M. C.; GONÇALVES, M. F.; COLLI, W.; FERREIRA, E. I.; MIRANDA, M. T. M. Synthesis and *in vitro* activity of dipeptide prodrugs of primaquine potentially antichagasic. *J. Pharm. Sci.,* v. 86, p. 1127-1131, 1997.

CHUNG, M. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. T.; GÜIDO, R.V.C.; VARANDA, E.A.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K.C.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and *in vitro* antichagasic activity of hydroxymethylnitrofurazone, a prodrug of nitrofurazone, *Bioorg. Med. Chem.,* v.11, p. 4779-4783, 2003.

CHUNG, M.C. *Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos*. São Paulo, 1996, 196p. [Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

DEWAR, M. J. S; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E.F.; STEWART, J. J. P. The development and use of quantum-mechanical molecular-models .76. AM1 - a new general-purpose quantum-mechanical molecular-model. *J. Am. Chem. Soc.,* v. 107, p. 3902-3909, 1985.

DORIGUETTO, A. C.; PAULA SILVA, C. H. T.; ELLENA, J.; TROSSINI, G. H. G.; CHUNG M. C.; FERREIRA, E. I. 5-Nitro-2-furaldehyde *N*-

hydroxymethyl)semicarbazone, *Acta Crystal.* v.E-61,p.2099-2101, 2005.

MCKERROW, J. H. Cytokine induction and exploitation in schistosome infections. *Parasitology*, v.115, Suppl:S107-121, 997.

POLLI, M. C. *Antichagásicos potenciais: Síntese de pró-fármacos de megazol e primaquina,* 2003, 157 p. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

RAUTIO, J.; KUMPULAINEN, H.; HEIMBACH, T.; OLIYAI, R.; OH, D.; JÄRVINEN, T.; SAVOLAINEN, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug. Discov.* v.7, p. 255-270, 2008.

TROSSINI, G. H. G. *Antichagásicos potenciais: síntese de bases de Mannich do hidroximetilnitrofural,* 2004, 130 p. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

Capítulo 5

Análogos do nitrofural (NF) e do hidroximetilnitrofural (NFOH) com potencial atividade antichagásica

5. Análogos do NF e do NFOH com potencial atividade antichagásica

Como já exposto anteriormente, a doença de Chagas encontra-se entre as doenças tropicais negligenciadas e a busca de novos agentes quimioterápicos contra a doença de Chagas se faz necessária (WHO/TRD, 2008).

O nitrofural (NF), composto antibacteriano usado há décadas para tratamento de queimaduras, e colocado em desuso devido à sua toxicidade (KOROLKOVAS, 2007), possui atividade antichagásica comprovada (HENDERSON *et al.*, 1988). Seu derivado hidroxilado, o hidroximetilnitrofural (NFOH), foi obtido como intermediário da síntese de pró-fármacos recíprocos do NF e da primaquina (PQ), sob a forma de bases de Mannich. Este intermediário mostrou-se promissor, sendo mais ativo e possuindo toxicidade relativamente menor que o NF (CHUNG *et al.*, 2003). Inicialmente, a atividade desses compostos foi relacionada à inibição da tripanotiona redutase, enzima fundamental no processo de destoxificação do parasita (FAIRLAMB, CERAMI, 2005). Essa ação está relacionada à formação de grupos radicalares por parte do grupo nitro desses compostos. No entanto, a maior atividade do NFOH não é comprovada por esse processo, visto que experimentalmente ambos apresentaram o mesmo perfil no potencial de redução (LA-SCALEA *et al.*, 2005).

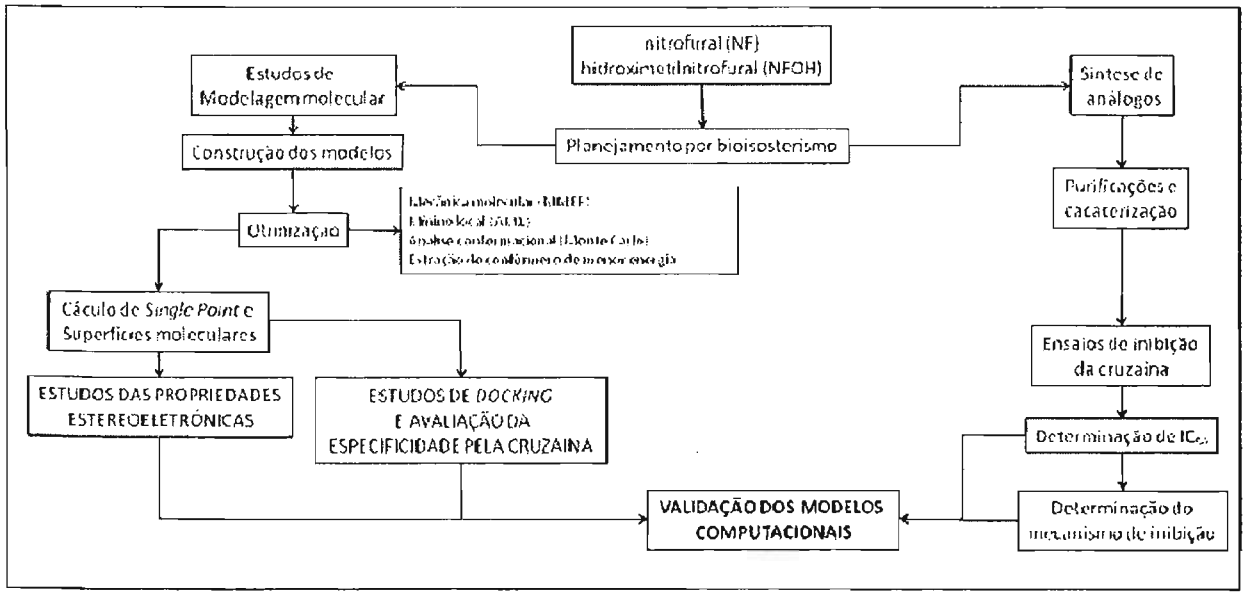
DU e colaboradores, em 2002, trabalhando com uma série de compostos relacionados a estes, contendo o grupamento (tio)semicarbazona, presente no NF e no NFOH, apresentaram a proposta de um segundo mecanismo de ação para esse tipo de compostos. Este mecanismo de ação sugere a interação do grupo (tio)semicarbazona, por ser um grupo muito reativo, com a Cys25 da cruzaína. É importante ressaltar que este é o resíduo catalítico da cruzaína e esta interação leva à inibição da enzima e à morte do parasita.

O estudo deste mecanismo vem sendo realizado para análogos do NF contendo semicarbazona e tiossemicarbazona em suas estruturas, sugerindo esse como um segundo mecanismo de ação para análogos do NF (AGUIRRE *et al.*, 2004). Trossini e colaboradores demostraram a ação do NF e do NFOH e de alguns análogos como inibidores da cruzaína corroborando com esse

mecanismo de ação (TROSSINI, MENEZES, FERREIRA, 2006; TROSSINI *et al.*, 2007).

Essas informações ressaltam o interesse no estudo do NF do NFOH e de seus análogos como antichagásicos potenciais que apresentam mais de um mecanismo de ação. Assim sendo, desenvolveu-se trabalho para a avaliação do segundo mecanismo de compostos dessa classe. Os compostos utilizados para o trabalho foram o NF e o NFOH e seus análogos sintetizados obtidos pela aplicação do bioisosterismo clássico -- enxofre e oxigênio, variando o anel aromático entre furânico e tiofênico e a grupo alifático entre tiossemicarbazona e semicarbazona.

Os estudos para avaliar o mecanismo de ação desta série de compostos foram auxiliados por modelagem molecular (AM1) para avaliação das propriedades físico-químicas, estudos de *docking* para avaliação da interação desses compostos com a cruzaína. Foram realizados, ainda, ensaios biológicos *in vitro* de inibição da cruzaína e a determinação do mecanismo de inibição da enzima por parte desses compostos. O quadro 1 apresenta um esquema geral de como foi procedido os estudos desses análogos.



Quadro 5.1 - Esquema do planejamento dos análogos do NF e do NFOH como inibidores da cruzaína.

5.1 Material e Métodos

5.1.1 Material

5.1.1.1 Reagentes e solventes

• acetona p.a. (Merck)	• dimetilsulfóxido p.a. (Merck)
• acetonitrila grau CLAE (Merck)	• etanol p.a. e CLAE (Merck)
• ácido acético p.a. (Merck)	• éter etílico p.a. (Merck)
• carbonato de sódio (Synth)	• formaldeído p.a. (Merck)
• clorofórmio p.a. (Merck)	• metanol p.a. e CLAE (Merck)
• diclorometano p.a. (Merck)	• nitrofural (Avocado)
• dimetilsulfóxido deuterado (Merck)	• propanol p.a. (Merck)
• diacetato do 5-nitrotiofilideno (Merck)	• semicarbazona (Merck)
• diacetato do 5-nitrofurfurilideno (Merck)	• sulfato de sódio anidro p.a. (Merck)
• 5-nitro-furfural (Sigma)	• tiossemicarbazona (Merck)

5.1.1.2 Equipamentos

- Aparelho capilar Büchi para determinação de ponto de fusão
- Bomba de alto vácuo, modelo E2M5 EDWARDS
- Lâmpada de radiação ultravioleta Spectroline, modelo ENF-260C
- Liofilizador Christ, modelo ALPHA 1-2
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advance DPX-300
- Espectrofotômetro de absorção no infravermelho (IV), FTIR-Bomem, modelo MB-120
- Computador PC Linux, processador AMD (64 MHz)
- Computador PC Windows (Dell XPS), processador Centrino (core duo 2)

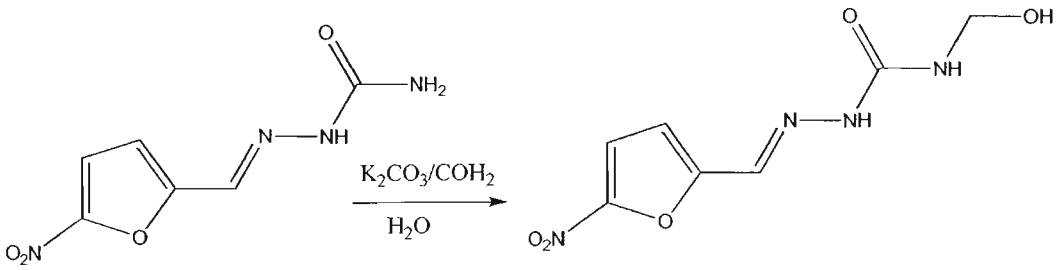
5.1.1.3 Softwares para modelagem molecular

- Sybyl 7.3 (Tripos.inc)
- Spartan O2 v.118 (Wavefunction)
- GOLD (*GOLD - Protein-Ligand Docking*) 3.0 (GlaxoSmithKline.inc),

- Flex E (Tripos.inc)
- Flex X (Tripos.inc)
- DeepView (GlaxoSmithKline R&D)
- Weblab ViewerLite (Accelrys)
- PYMOL Veiwer (Delano Scientific LLC)

5.1.2 *Métodos Sintéticos*

5.1.2.1. Síntese do NFOH



Esquema 5.1. - Síntese do NFOH.

Experimento 1

A reação de hidroximetilação do NF foi realizada, segundo metodologia descrita em TROSSINI (2004). Utilizou-se NF em meio básico de carbonato de potássio, na proporção de 1:1, com excesso de formaldeído em meio aquoso. Partindo-se de 5 mmol (0,99 g) de NF, 5 mmol (0,69 g) de carbonato de potássio, em suspensão de 10 mL, e adicionando-se o formaldeído (18 mL) em duas etapas: metade do volume logo no início da reação e outra metade no momento em que se observou por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:CH_3COOH (95:5:3), o início da formação do derivado planejado em 2,5 horas. Interrompeu-se após 5 horas de reação. Filtrou-se sob pressão reduzida, lavando-se o precipitado com água fria, até remover todo o formaldeído. Partiu-se, então, para a cristalização de MeOH/H_2O, por meio da qual se obtiveram cristais de amarelo intenso, que foram submetidos a análises de RMN ^1H, ^{13}C, IV, espectrometria de massas e difração de RX (DORIGUETTO *et al.*, 2005), caracterizando-se o produto como o NFOH.

5.1.2.2 Otimização da síntese do hidroximetilnitrofural (NFOH)

Experimento 2

- Planejamento fatorial 2^2

Realizou-se o planejamento fatorial 2^2, com quatro experimentos (TROSSINI, 2004), utilizando variáveis qualitativas, solvente (metanol e água) e meio (ácido ou básico) e, em segunda etapa, efetuou-se estudo por fatorial 2^2, com ponto central, composto de 7 experimentos. Partindo-se das melhores condições de síntese do primeiro fatorial, variaram-se fatores qualitativos, tempo de reação e quantidade de base. Os dois planejamentos foram estatisticamente avaliados utilizando o programa CHEMOMATRIX e construindo-se as respectivas matrizes de correlação, avaliando a influência de cada efeito e a importância de cada fator. Construiu-se, então, modelo estatístico linear para o segundo planejamento fatorial.

Experimento 3

- Planejamento Fatorial 3^2

Utilizou-se metodologia previamente desenvolvida por TROSSINI (2004), com adição de formaldeído em duas etapas. Variou-se o tempo de reação (4, 7, 10 e 13 horas) e a proporção NF:K_2CO_3 (1:0,5; 1:1; 1:1,5 e 1:2) de forma simétrica e quantitativa. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:CH_3COOH (95:5:3). Os produtos obtidos foram submetidos a análises de RMN ^1H, ^{13}C e IV, confirmando a formação do derivado proposto.

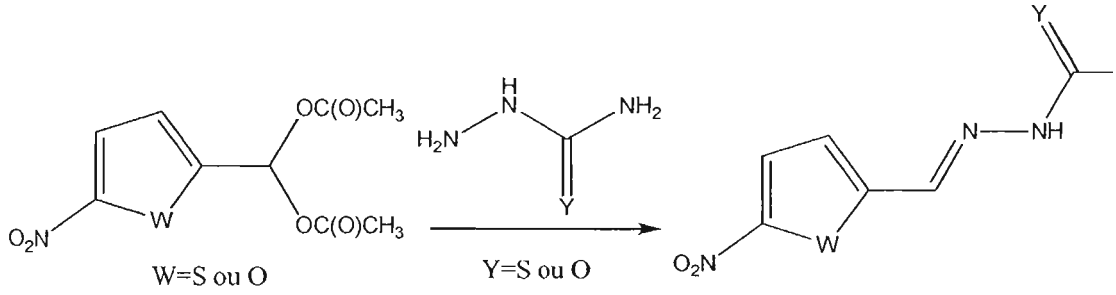
Realizou-se planejamento fatorial 3^2 com ponto central, variando-se os dois fatores (tempo e proporção NF:K_2CO_3), que apresentaram maior influência no rendimento de síntese do NFOH. Este planejamento foi composto de 9 experimentos, utilizando como ponto central o de maior rendimento obtido pelo estudo de reta de ponto máximo, sendo este em 7 horas e utilizando a proporção de NF:K_2CO_3 (1:1,5). Todos os produtos obtidos foram caracterizados como NFOH. Os resultados foram estatisticamente avaliados

utilizando o programa STATISTICA (Stasoft.Inc), construindo-se as respectivas matrizes de correlação e analisando-se a influência de cada efeito e a importância de cada fator. Por ultimo, construiram-se modelo estatístico parabólico e superfície de resposta, de modo a avaliar o ajuste do modelo aos resultados obtidos.

5.1.2.3 Síntese de Análogos de NF e do NFOH

5.1.2.3.1 Síntese de análogos do NF

Os análogos do NF foram obtidos seguindo metodologia descrita em RANDO (2005), utilizando-se os diacetatos dos nitroaldeídos, diacetato do 5-nitrotiofilideno, ou o diacetato do 5-nitrofurano, e a semicabazona ou tiossemicarbazona correspondente.



Esquema 5.2- Síntese dos análogos do NF.

Experimento 4 – Síntese do derivado NS

O experimento foi realizado utilizando-se diacetato do 5-nitrotiofilideno e a tiossemicarbazona na proporção de 1:1 em meio ácido de H_2SO_4, por 2 horas. Em um balão de 100 mL, adicionou-se 1 mmol de diacetato do 5-nitrotiofilideno, solubilizado em etanol/água (1:1), mantendo-se sob agitação magnética, e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi aquecida até refluxo. Após solubilização, adicionou-se, lentamente, a tiossemicarbazona. A reação permaneceu sob refluxo por 2 horas até a formação de precipitado. Ao final, o produto foi esfriado até temperatura ambiente, filtrado sob pressão reduzida e lavado com água. O produto obtido foi avaliado por CCD, utilizando-

se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:CH_3COOH (85:10:5). O cromatograma apresentou única mancha diferente daquela do produto de partida. Para o produto obtido, aparentemente puro, determinou-se ponto de fusão e foi realizada análise de RMN ^1H e de ^{13}C, comprovando-se a formação do produto análogo proposto.

Experimento 5 – Síntese do NSO

O experimento foi realizado utilizando-se diacetato do 5-nitrotiofilideno e a semicarbazona na proporção de 1:1 em meio ácido de H_2SO_4, por 3 horas. Em um balão de 100 mL adicionaram-se 1 mmol de diacetado de 5-nitrotiofilideno, solubilizado em etanol/água (1:1) e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, mantendo-se sob agitação magnética e refluxo até a solubilização, quando se adicionou, lentamente, a semicarbazona. A reação permaneceu sob refluxo por 3 horas até a formação de um precipitado. Ao final, o produto foi esfriado até temperatura ambiente, filtrado sob pressão reduzida e lavado com água. O produto obtido foi avaliado por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:CH_3COOH (85:10:5). O cromatograma apresentou única mancha, diferente daquela do produto de partida. Para o produto obtido determinou-se ponto de fusão e realizou-se análise de RMN ^1H e de ^{13}C, comprovando-se a formação do produto análogo proposto.

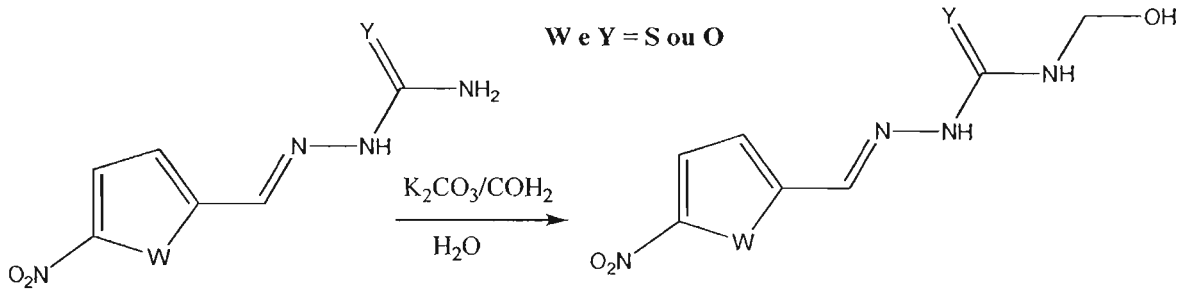
Experimento 6 – Síntese do NFS

A - O experimento foi realizado utilizando-se diacetato de 5-nitrotiofurano e a tiossemicarbazona na proporção de 1:1 em meio ácido de H_2SO_4, por 5 horas. Em um balão de 100 mL, adicionou-se 1 mmol de diacetato do 5-nitrotiofurano, solubilizado em etanol/água (1:1), juntando-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, mantendo-se sob agitação magnética e aquecendo-se até refluxo. Após solubilização, adicionou-se, lentamente, a tiossemicarbazona, mantendo-se o refluxo por 5 horas. Não havendo a formação de precipitado, o meio reacional foi esfriado até temperatura ambiente e analisado por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:CH_3COOH (85:10:5). O cromatograma mostrou a degradação do produto de partida.

B - O experimento 6 foi repetido até a dissolução do nitroaldeído quando, então, se adicionou, lentamente, a tiossemicarbazona. A reação permaneceu sob refluxo por 3 horas, até a formação de precipitado. Ao final, o produto foi esfriado até temperatura ambiente, filtrado sob pressão reduzida e lavado com água. O produto obtido foi avaliado por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:CH_3COOH (85:10:5). O cromatograma apresentou única mancha, diferente daquela do produto de partida. Para o produto obtido determinou-se o ponto de fusão e realizou-se análise de RMN ^1H e de ^{13}C, comprovando-se a formação do análogo proposto, denominado NFS.

5.1.2.3.2 Síntese dos análogos do NFOH

Realizou-se a reação de hidroximetilação, segundo metodologia descrita em TROSSINI (2004) para os análogos de NF sintetizados.



Esquema 3 – Síntese dos Análogos do NFOH.

Experimento 7 – Síntese de NSOH

A reação foi efetuada utilizando-se NS e solução de formaldeído a 37%, em meio alcalino aquoso de K_2CO_3, à temperatura ambiente, sob agitação por 24 horas. Em balão de 100 mL, adicionaram-se 1 mmol de NS (0,231 g) e 1 mmol de K_2CO_3 (0,132 g), em 2 mL de água e 3,6 mL de solução de formaldeído. A solução de formaldeído foi adicionada em duas etapas: metade da concentração logo no início da reação e outra metade no momento em que se

observou, por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:CH_3COOH (95:5:3), o início da formação do derivado planejado, ou seja, 2,5 horas. Após 24 horas de reação, filtrou-se o produto sob pressão reduzida, lavando-o com água fria, até remover todo o formaldeído. O produto obtido foi avaliado por CCD. Realizou-se a análise de RMN ^{1}H e determinou-se a faixa de fusão.

Experimento 8 – Síntese de NSOOH

A reação foi efetuada utilizando-se NSO e solução de formaldeído a 37%, em meio alcalino aquoso de K_2CO_3, à temperatura ambiente, sob agitação por 24 horas. Em balão de 100 mL, adicionaram-se 1 mmol de NSO (0,2145 g) e 1 mmol de K_2CO_3 (0,132 g), em 2 mL de água e 3,6 mL de solução de formaldeído. A solução de formaldeído foi adicionada em duas etapas: metade da concentração logo no início da reação e outra metade no momento em que se observou, por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:CH_3COOH (95:5:3), o início da formação do derivado planejado, ou seja, 3 horas. Interrompeu-se após 24 horas de reação com a formação de produto, que foi filtrado sob pressão reduzida, lavado com água fria, até remover todo o formaldeído. Analisado por CCD, o produto se apresentou aparentemente puro.Determinou-se a faixa de fusão do produto e submeteu-o a análise de RMN ^{1}H.

Experimento 9 – Síntese de NFSOH

A reação foi efetuada utilizando-se NFS e solução de formaldeído a 37% em meio alcalino aquoso de K_2CO_3, à temperatura ambiente, sob agitação por 24 horas. Em balão de 100 mL, adicionaram-se 1 mmol de NFS (0,2145 g) e 1 mmol de K_2CO_3 (0,132 g) em 2 mL de água e 3,6 mL de solução de formaldeído. A solução de formaldeído foi adicionada em duas etapas: metade da concentração logo no início da reação e outra metade após 5 horas, quando se observou, por CCD, utilizando-se como sistema solvente $CHCl_3$:MeOH:CH_3COOH (95:5:3), o início da formação do derivado planejado. Interrompeu-se a reação após 24 horas, realizando-se análise por CCD.

Analisado por CCD, o produto se apresentou aparentemente puro, determinando-se, então, a faixa de fusão e submetendo-o à análise de RMN ^{1}H.

5.1.3 *Métodos Computacionais*

5.1.3.1 Modelagem Molecular

O estudo de modelagem molecular dos análogos de NF e de NFOH por método semi-empirico AM1 foi realizado seguindo-se as etapas utilizadas no estudo para os pró-fármacos.

Os confômeros de menor energia de cada uns dos oito análogos foram submetidos a cálculo de carga de ponto único e de superficies eletrônicas. Avaliou-se a distribuição eletrônica e os mapas de potencial eletrostático, mapas de HOMO de LUMO e superficie de LUMO, com o intuito de se observar a possibilidade de ação destes compostos pelos dois mecanismos de ação possíveis: oxi-redução do grupo nitro (MORENO *et al.*, 1983) e/ou ataque nucleofílico pela Cys25 da cruzaína no grupo carbonílico ou tiocarbonílico da (tio)semicarbazona, promovendo ligação covalente e inibição da enzima (DU *et al.*, 2002).

5.1.3.2 Estudo de *docking* dos análogos do NF e do NFOH

5.1.3.2.1 FlexE

Os estudos de *docking* e utilização do programa FlexE com os análogos de NF e de NFOH sintetizados --- NF (NS, NSO, NOS) e do NFOH (NSOH, NSOOH, NOSOH) –foram realizados em estágio efetuado no LaSSBio, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, com auxilio da Dra. Nelilma Romeiro e colaboração dos Professores Doutores Carlos A. M. Fraga e Eliezer J. Barreiro.

Empregou-se o módulo de *docking* FlexE do programa Sybyl 7.2, para realização dos cálculos, e os programas Weblab ViwerLite e PyMol Viwer, para visualização e interpretação dos resultados.

As estruturas cristalográficas da cruzaína (códigos no PDB: 1ME4, 1ME3, 1AIM, 2AIM e 1F2B) foram extraídas do site http://www.pdb.org.

Procedeu-se à preparação das proteínas retirando-se o ligante e as moléculas de água pelo programa DeepView (http://www.expasy.org/spdbv/). Realizou-se, no módulo Biopolymer do programa Sybyl 7.3, o alinhamento das estruturas cristalográficas, gerando um *essembler* que foi utilizado para o *docking.*

Um banco de dados foi criado para a série de moléculas com cargas AM1, PM3, MMFF e GH, visando determinar qual delas geraria valores de ΔG teóricos mais favoráveis.

Realizou-se estudo para adequar os parâmetros para o melhor *grid* de docking, variado tamanho, entre 6 e 12 Å, e ponto central do *grid*, utilizando, em alguns casos, um *subsite,* focando a Cys25 como ponto central. Realizaram-se 8 cálculos para o banco de dados de estruturas criado. Os resultados dos 8 cálculos foram analisados cuidadosamente para todas as cargas, AM1, PM3, MMFF e GH, de modo a se obter o melhor modelo de interação entre os ligantes e a cruzaína.

5.1.3.2.2 GOLD

Os estudos de *docking* com a utilização do programa GOLD 3.0 foram aplicados aos análogos de NF (NS, NSO, NOS) e do NFOH (NSOH, NSOOH, NOSOH). Empregaram-se GOLD 3.0, para realização dos cálculos, e PYMOL (DeLano Scientific), para visualização e interpretação dos resultados.

Novamente, a estrutura cristalográfica da cruzaína utilizada foi o modelo 1ME4, a qual foi extraída do *protein data bank* (http://www.pdb.org). Procedeu-se à preparação das proteínas retirando-se o ligante e as moléculas de água por meio do programa PYMOL (DeLano Scientific).

Os modelos de estruturas utilizados para o estudo foram gerados no Programa SYBYL 7.3 e minimizados pelo método AM1. O *docking* foi realizado utilizando-se as estruturas dos análogos previamente minimizados no programa SPARTAN O2 (Wavefunc.inc) e convertidas para o formato mol2, aceito pelo programa GOLD. A proteína foi previamente preparada no programa PYMOL. O estudo foi seguido no programa GOLD, utilizando-se o *default* do programa, indicando-se o resíduo da Cys25 como centro da caixa de *docking* (*grid*), e, também, o tamanho do *grid* de 30:30:50 Å. Após estabelecer esses parâmetros, realizou-se o *docking* computacional dos modelos dos 8 análogos indicados.

5.1.4 *Ensaios biológicos*

5.1.4.1 Ensaios de inibição da cruzaína

Os ensaios de inibição da cruzaína foram realizados para o NF e seus análogos (NS, NOS, NOS) e para o NFOH e seus análogos (NSOH, NSOOH, NOSOH). A cruzaína utilizada foi a forma recombinante, extraída de cultura de *E. coli,* obtida por doação do Prof. Dr. Luiz Juliano (UNIFESP).

Os compostos foram avaliados quanto à possível inibição da enzima, segundo metodologia descrita por JUDICE e colaboradores (2001).

Os ensaios de inibição enzimática foram realizados em duas etapas:

1-ensaios de inibição do NF e do NFOH para avaliar a atividade desses compostos perante a cruzaína. Nestes ensaios, incubaram-se os compostos com a cruzaína recombinante por 5 minutos a 37 ℃, pH 6,5 (tampão fosfato, EDTA 0,2 M), procedendo-se à leitura por fluorimetria. Após a adição do substrato Bz-Phe-Arg-MCA, os valores medidos para a determinação da atividade foram a porcentagem remanescente de atividade da enzima;

2- Determinaram-se os valores de IC_{50} dos análogos de NF e de NFOH porém utilizando concentrações diferentes de inibidor.

5.3 *Resultados e discussão*

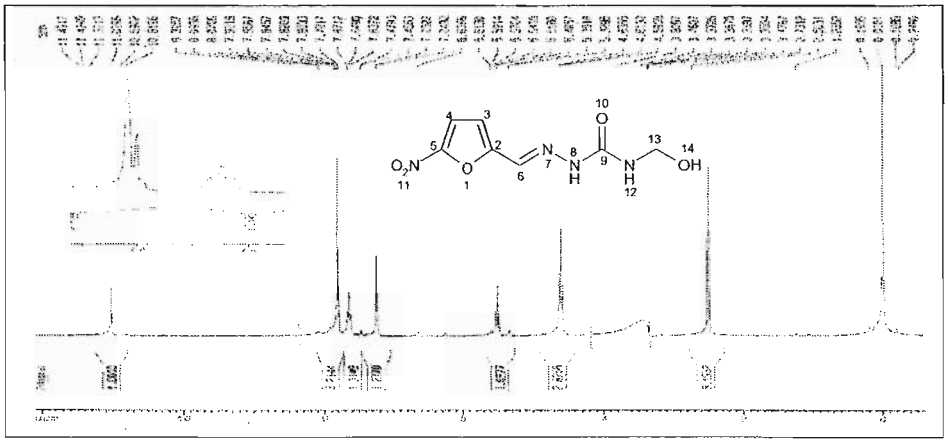
5.3.1 Sínteses

5.3.1.1 Síntese do NFOH

Experimento 1

A síntese do NFOH foi realizada com sucesso, seguindo a metodologia descrita em TROSSINI (2004). A comprovação da formação do derivado hidroximetilado se dá pelos sinais referentes à ponte metilênica em 4,61 ppm no espectro de RMN ^{1}H (Espectro 5.1) e em 63,7 ppm no espectro de RMN ^{13}C (Espectro 5.2).Realizaram-se, ainda, análises por espectrometria de massas, nas quais se pode verificar o íon molecular do NFOH em m/z 228. É importante ressaltar que na análise por espectrometria de massas, observa-se que tanto o NF quanto o NFOH apresentam o mesmo perfil a partir do íon molecular do NF,

corroborando que o derivado hidroximetilado deve retornar ao seu precursor, de acordo com a hipótese de que o NFOH se converte em NF. Realizou-se, também, a análise no infravermelho, estando as atribuições indicadas na Tabela V.1.

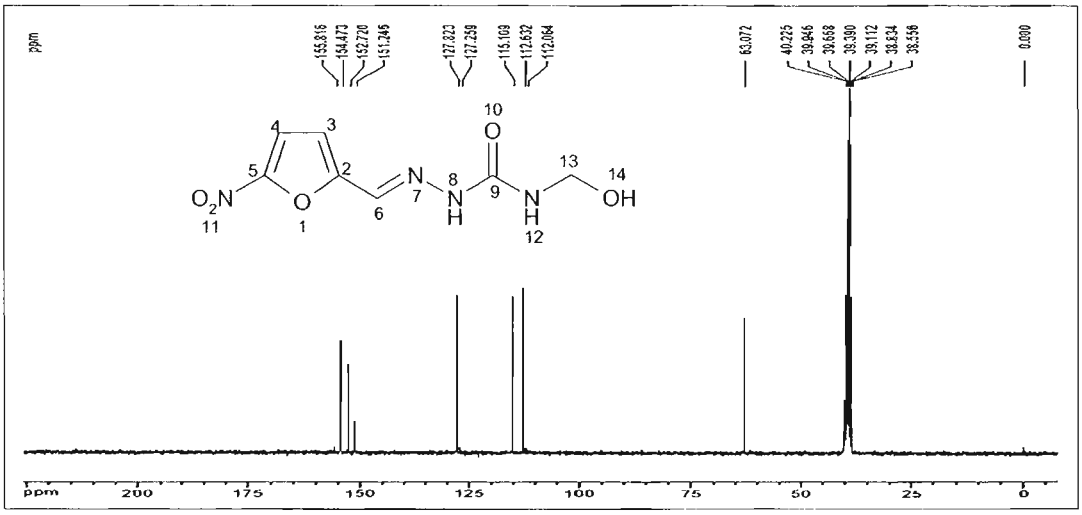


Espectro 5.1 – RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de hidroximetilnitrofural.

Tabela V.1 - Atribuições de RMN ^{1}H do NFOH

RMN ^{1}H (DMSO-d_6), 300 MHz, δ = PPM
4,61 (t, J=6,6 Hz, 2H, H_{13}); 5,57 (t, J=6,9 Hz, 1H, H_{14}); 7,25 (d, J=3,9 Hz, 1H, H_3); 7,64 (t, J=6,3 Hz, 1H, H_{12}); 7,80 (s, 1H, H_6)*; 7,81 (d,J=3,9 Hz, 1H, H_4)*; 11,02 (s, 1H, H_8)

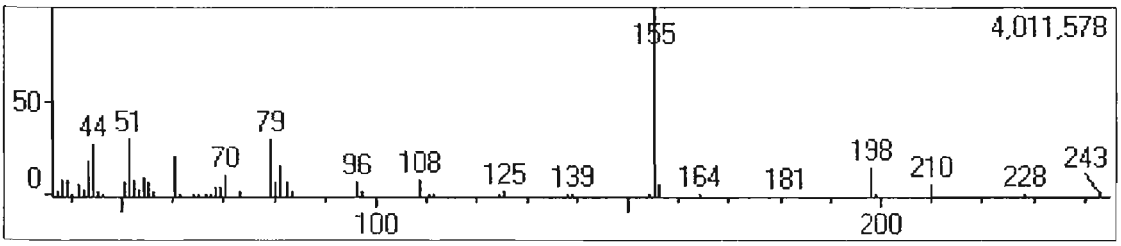
*sinais sobrepostos



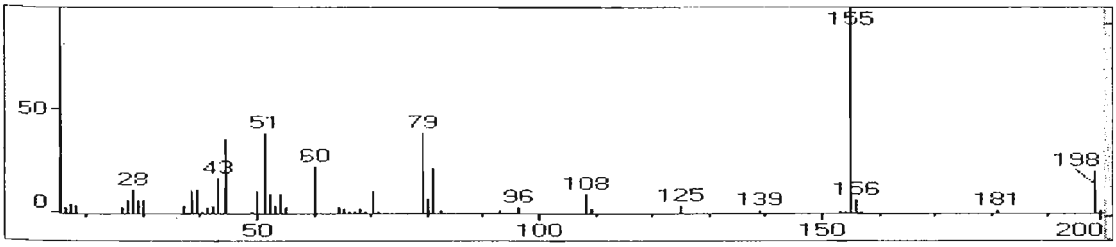
Espectro 5.2 – RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de hidroximetilnitrofural.

Tabela V.2 – Atribuições de RMN ^{13}C do NFOH

RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz, δ = PPM
39,39 (DMSO-d_6); 63,07 (C_{13}); 112,63 (C_3); 115,11 (C_4); 127,82 (C_6); 151,25 (C_2); 152,42 (C_5); 154,47 (C_9)



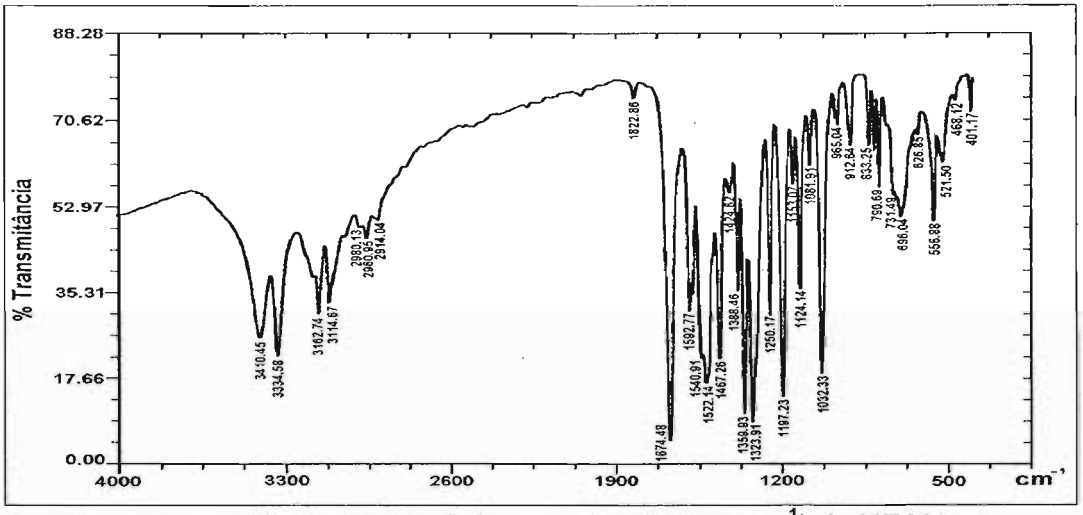
Espectro 5.3 - Espectro de massas do hidroximetilnitrofural.



Espectro 5.4 - Espectro de massas do nitrofural.

Tabela V.3 - Principais fragmentações do hidroximetilnitrofural

m/z	%	Fórmula molecular	Fragmentos
228	1,88	$C_7N_4O_4H_8$	$[M]^+$
210	7,20	$C_7N_4O_3H_6$	$[M - H_2O]^+$
198	5,80	$C_6N_4O_3H_6$	$[M - CH_2O]^+$
155	100,00	$C_6N_3O_3H_5$	$[M - CNH_3O]^+$



Espectro 5.5 - Infravermelho (KBr, ν cm^{-1}) do NFOH.

Tabela V.4 – Atribuição das bandas de absorção no IV do NFOH

$\nu_{máx}$ (KBr, ν, cm^{-1})	**Atribuição**
3450-3300	ν_{O-H} de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular
3334	ν_{N-H} assimétrica de amida secundária
3162	ν_{N-H} simétrica de amida secundária
2980 2960	ν_{C-H} de alifático
1674	$\nu_{C=O}$ de amida secundária
1592	δ_{N-H} de amida
1522	ν assimétrica de NO_2 aromático
1424	δ_{CH2} (levemente deslocado por estar entre **N** e **O**)
1388	ν_{C-N} de amida
1359	ν simétrica de NO_2 aromático
1250	ν_{C-N} de amida secundária
1124	ν_{C-O} de álcool

5.3.1.2 Otimização da síntese do NFOH

Experimento 2

- Planejamento Fatorial 2^2

Realizou-se planejamento fatorial 2^2 para otimizar o rendimento da reação da síntese do NFOH. Esse planejamento foi desenvolvido como trabalho final da disciplina de Planejamento e otimização de Experimentos (QFL5912), ministrada pelo Prof. Dr. Roy Edward Bruns, no Programa de Pós-Graduação em Química. O trabalho contou com a participação dos alunos: Leandro de Rezende, Elba Vieira Mustafá dos Santos e Claudinei Martins.

> PARTE A – Fatorial 2^2

O planejamento foi efetuado a partir de experimentos realizados em ordem aleatória, e em duplicata, seguindo metodologia descrita em TROSSINI (2004). Em um primeiro momento, os fatores analisados foram: (1) meio da reação

(ácido e básico) e (2) tipo de solvente (metanol e água), em dois níveis (Tabela V.5).

Fatores e níveis escolhidos

Fator	(-)	(+)
1	meio básico	meio ácido
2	solvente: água	solvente: metanol

Tabela V.5 - Matriz de planejamento do fatorial 2^2 com os rendimentos obtidos, média e variância

Ensaio	F1	F2	F12	Rend.(%)		Média(%)	s^2
1	-	-	+	61,4	54,8	58,10	2,78
2	-	+	-	38,6	39,3	38,95	0,25
3	+	-	-	21,1	23,2	22,15	2,21
4	+	+	+	20,6	18,4	19,50	2,42

- *Cálculo dos efeitos*

I = (+58,10 +38,95 +22,15 +19,50)/4 = 34,68

Ef(1) = (-58,10 -38,95 +22,15 +19,50)/2 = -27,70

Ef(2) = (-58,10 +38,95 -22,15 +19,50)/2 = -10,90

Ef(12) = (+58,10 -38,95 -22,15 +19,50)/2 = 8,25

- *Cálculo do erro padrão dos efeitos (s_{ef})*

Número total de graus de liberdade (ν) = 4

Variância agregada (s_p^2) = (1×21,78 + 1×0,25 + 1×2,21 + 1×2,42)/4 = 6,66

$s^2_{ef} = s_p^2/2 = 3,33 \rightarrow s_{ef} = 1,83$

- *Cálculo dos intervalos de confiança para os efeitos*

Calcularam-se os intervalos de confiança para os valores dos efeitos, no nível de confiança de 95%. O valor *t* utilizado, retirado da tabela de distribuição de Student (BARROS NETO *et al.*, 2003), foi t_4 = 2,776.

$s_{ef} \times t_4$ = 1,83×2,776 = 5,07

✓ Intervalos de confiança para os efeitos:

Ef(1): [-32,77; -22,63]

Ef(2): [-15,97; -5,83]

Ef(12): [3,18; 13,32]

- *Análise dos resultados do fatorial*

Para o efeito do fator 1 (meio da reação), obteve-se o valor de -27,7% ± 1,8, que corresponde ao decréscimo de 27,7 unidades percentuais no rendimento obtido, quando a reação é feita em meio ácido em relação àquela realizada em meio básico.

Para o efeito do fator 2 (tipo de solvente), obtve-se o valor de -10,9% ± 1,8, que corresponde ao decréscimo de 10,9 unidades percentuais no rendimento obtido, quando a reação é feita utilizando-se metanol como solvente, em relação àquela que usa água.

Verificou-se que todos os valores dos efeitos obtidos foram significativos, permanecendo dentro do intervalo de confiança de 95%. O valor do efeito de interação 1-2 (meio+solvente) calculado (8,25% ± 1,83) também foi significativo, o que implica que devemos analisar os efeitos dos dois fatores em conjunto (Gráfico 1).

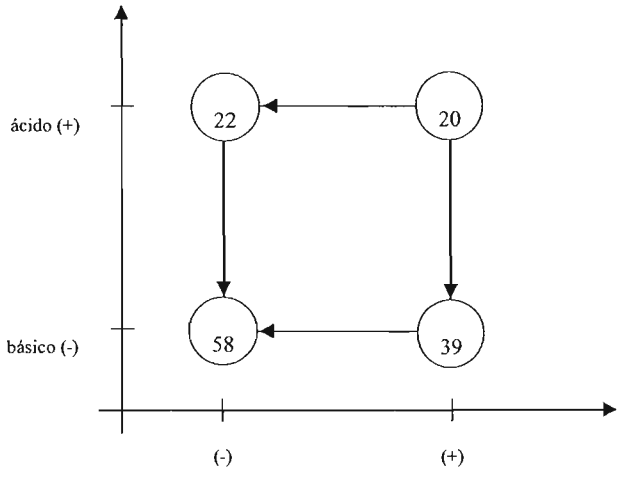


Gráfico 5.1 - Influência de cada efeito nos experimentos.

Observa-se que há aumento do rendimento quando a reação é feita em meio básico, em relação a quando se utiliza um meio ácido, mas este aumento é mais pronunciado quando o solvente é a água do que quando o solvente é o metanol.

Portanto, com os resultados dos experimentos obtidos, pode-se concluir que a condição ótima para a realização da reação é em meio básico, utilizando-se água como solvente.

- *Análise do modelo linear*

Utilizando-se o programa CHEMOMATRIX (BRUNS, 2005), gerou-se modelo linear para o fatorial, na tentativa de se obter superfície de resposta para o sistema. A equação obtida para o modelo foi $Y_P = 34,68 - 13,85*x_1 - 5,45*x_2$, cujos coeficientes das variáveis correspondem aos valores dos efeitos dos fatores 1 e 2, e a constante corresponde à média das observações.

Tabela V.6 - Análise de variância do modelo obtido

Fonte de Variação	**Soma Quadrática**	**Graus de Liberdade**	**Média Quadrática**	**Teste F**
Regressão	1772,2	2	886,1	27,22
Resíduos	162,8	5	32,6	
Falta de Ajuste	136,1	1	136,1	20,43
Erro Puro	26,7	4	6,7	
Total	1935,0	7		

Variância explicada = 91,59%

Máxima variância explicável = 98,62%

Para a regressão, a variância explicada foi de 91,6%, e o valor do teste F = 27,22, foi significativamente maior que o valor de $F_{2,5} = 5,79$ no intervalo de 95% de confiança (Tabela VI). Porém, este modelo acusou falta de ajuste, verificada pela razão entre a média quadrática da variação devida à falta de ajuste e aquela devida ao erro puro. O teste F calculado para esta razão foi de 20,43, maior que o valor tabelado $F_{1,4} = 7,71$ no intervalo de confiança de 95%, o que significa que estas médias quadráticas não são representativas da mesma fonte de variação (erro) e, portanto, há evidência de falta de ajuste.

O gráfico 2 mostra os resíduos (*e*) contra as respostas previstas (Y_P), gerado pelo CHEMOMATRIX para este modelo.

```
e    |
     |
7.4250|                                        *
     |
     |*
     |
4.0650|
     |*
     |
     |                                    *
 .7050|
     |
     |
     |
-2.6550|            *
     |                        *
     |                        *
     |          *
-6.0150|
     -+-------+-------+-------+-------+-------+-------+-------+-------+----
      15.4   20.2   25.0   29.9   34.7   39.5   44.3   49.1   54.0  Yp
```

Gráfico 5.2 - Resíduos contra as respostas previstas.

Observa-se que os resíduos não se distribuem aleatoriamente, devido à falta de ajuste já mencionada. Esta se encontra relacionada à ausência do termo cruzado b_{12}, que equivale ao meio-efeito de interação dos fatores 1 e 2, que, como o observado na análise do fatorial 2^2, foi significativo.

Modelo quadrático do tipo $Y_P = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$ não foi gerado, porque há mais parâmetros neste do que os 4 níveis analisados. Seria necessário ampliar o planejamento, porém, como neste caso, os fatores estudados foram variáveis qualitativas (meio da reação e tipo de solvente), isto não foi possível.

➢ PARTE B – Fatorial 2^2 com ponto central

Devido aos resultados do planejamento anterior, em que se obtiveram melhores resultados do rendimento da reação do NFOH em água e meio básico, realizou-se um novo planejamento fatorial 2^2 com ponto central. Esse novo planejamento foi realizado utilizando, agora, fatores quantitativos (tempo da reação (fator A) e diferentes concentrações de K_2CO_3 (fator B). Utilizaram-se as condições do nível de melhor rendimento no planejamento anterior como ponto central para este novo fatorial e realizaram-se mais cinco experimentos em ordem aleatória (Tabela VII).

Fatores e níveis escolhidos

Fator	-1	0	+1
A – Tempo de reação	3h	5h	7h
B – Proporção NF:K_2CO_3	1:0,5	1:1	1:1,5

Tabela VII - Matriz de planejamento do fatorial 2^2 com ponto central com os rendimentos obtidos

Ensaio	FA	FB	FAB	Rend(%)
1	-	-	+	22,6
2	-	+	-	71,4
3	+	-	-	41,7
4	+	+	+	85,5
5	0	0	0	61,4
6	0	0	0	54,8
7	0	0	0	60,3

- *Cálculo dos efeitos*

Ef(A) = (-22,6 -71,4 +41,7 +85,5)/2 = 16,6

Ef(B) = (-22,6 +71,4 -41,7 +85,5)/2 = 46,3

Ef(AB) = (22,6 -71,4 -41,7 +85,5)/2 = -2,5

- *Cálculo do erro padrão dos efeitos (s_{ef})*

Estimou-se o erro padrão dos efeitos a partir da triplicata do ponto central: s_{ef} = 3,54.

- *Cálculo dos intervalos de confiança para os efeitos*

Calcularam-se os intervalos de confiança para os valores dos efeitos, no nível de confiança de 95%. O valor *t* utilizado, retirado da tabela de distribuição de Student (BARROS NETO *et al.*, 2003), foi t_2 = 4,303.

$s_{ef} \times t_2$ = 3,54×4,303 = 15,2

➢ *Intervalos de confiança para os efeitos*

Ef(A): [1,4; 31,8]

Ef(B): [31,1; 61,5]

Ef(AB): [-17,7; 12,7]

➢ *Cálculo da curvatura global e seu intervalo de confiança*

Média dos pontos do fatorial Y_F = 55,3

Média dos pontos centrais Y_C = 58,8

Curvatura = $Y_F - Y_C$ = -3,5

Variância $V_{cur} = V(Y_F) + V(Y_C) = 7s^2 / 12 = 7 * 12{,}53 / 12 = 7{,}31 \rightarrow s_{cur} = 2{,}70$

$s_{cur} * t_2$ = 11,63 (95% de confiança)

O valor *t* utilizado, retirado da tabela de distribuição de Student (BARROS NETO *et al.*, 2003), foi foi 11,63 > 3,5, concluiu-se que a curvatura global não é significativa no nível de 95% de confiança.

- *Análise dos resultados do fatorial*

Para o efeito do fator A (tempo de reação), obteve-se o valor de 16,6% ± 3,54, que corresponde ao aumento de 16,6 unidades percentuais no rendimento, quando se aumenta o tempo de reação de 3 h para 7 h.

Para o efeito do fator B (relação de concentração NF:K_2CO_3), obteve-se o valor de 46,3% ± 3,54, que corresponde ao aumento de 46,3 unidades percentuais no rendimento, quando se aumenta a relação de concentração do NF:K_2CO_3 de 1:0,5 para 1:1,5. Com isto, observou-se que o rendimento da reação se mostrou bastante sensível ao aumento da concentração K_2CO_3. Obteve-se até 85% de rendimento, em 7 h de reação.

Verificou-se que os efeitos destes dois fatores foram significativos no nível de 95%, mas o efeito de interação entre eles, calculado em −2,5 ± 3,54, não foi significativo.

Observa-se que a estimativa de erro para esses experimentos foi relativamente alta, devido ao reduzido número de graus de liberdade e, principalmente, a medida realizada no ponto central, que foi mais discrepante, possivelmente produzida por alguma fonte de erro adicional, não aleatória. Para reduzir essa estimativa, mais réplicas no ponto central poderiam ser feitas, mas, considerando-se que este planejamento era uma otimização, tal medida foi suficiente.

Verificou-se que a curvatura obtida também não foi significativa, no nível de 95%, de acordo com os resultados obtidos.

- *Superfície de Resposta*

Usando o programa CHEMOMATRIX (BRUNS, 2005), gerou-se um modelo linear para o fatorial, na tentativa de se obter uma superfície de resposta para o sistema. A equação obtida foi $Y_P = 56,8 + 8,3*X_A + 23,2*X_B$, cujos coeficientes das variáveis correspondem aos valores dos meio-efeitos dos fatores A e B e a constante corresponde à média das observações.

A Tabela V.8 mostra a análise de variância do modelo obtido.

Tabela V.8 - Análise de variância do modelo obtido

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	2421,3	2	1210,7	93,05
Resíduos	52,0	4	13,0	
Falta de Ajuste	27,2	2	13,6	1,09
Erro Puro	24,9	2	12,5	
Total	2473,3	6		

Variância explicada = 97,90%

Máxima variância explicável = 98,99%

A regressão foi significativa e explicou 97,9% da variância; o valor do teste F = 93,05, foi significativamente maior que o valor de $F_{2,4}$ = 6,94 no intervalo de 95% de confiança. Analisando-se esta tabela de variância, também se verifica que neste caso o ajuste do modelo linear foi bom, com F = 1,09, menor do que o valor tabelado $F_{2,2}$ = 19,00, sugerindo que a variância devida à falta de ajuste tem a mesma fonte da variância devida ao erro puro.

O gráfico dos resíduos (*e*) contra as respostas previstas (Y_P), gerado pelo CHEMOMATRIX para este modelo, é o apresentado no Gráfico 3.

```
e    |
     |
4.5814|                    *
     |
     |                 *
     |
2.6294|
     |
     |
     |
 .6774|
     |          *                 *
     |
     |
-1.2746|
     |                 *
     |*                                   *
     |
-3.2266|
      -+-------+-------+-------+-------+-------+-------+-------+-------+----
      25.4   33.2   41.1   49.0   56.8   64.7   72.5   80.4   88.3  Yp
```

Gráfico 5.3 – Resíduos contra as respostas previstas.

Apesar de não haver falta de ajuste, observa-se que os resíduos não se distribuem totalmente de forma aleatória. Como se observou, a variância estimada para uma medida foi relativamente grande e, talvez, se houvesse mais graus de liberdade disponíveis para gerar sua estimativa, obter-se-iam intervalos de confiança menores e a curvatura seria significativa, embora pequena.

A superfície de resposta encontra-se à Figura 5.1.

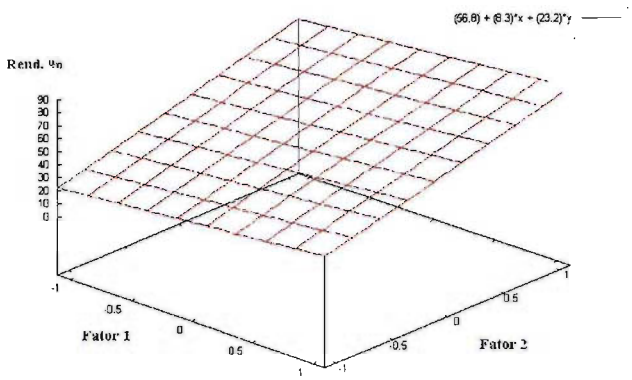


Figura 5.1 - Superfície de resposta do planejamento 2^2 com ponto central.

Experimento 3

- Planejamento Fatorial 3^2

Realizaram-se novos planejamentos estatísticos de modo a finalizar o estudo de otimização da síntese do NFOH por planejamento fatorial apresentado no Experimento 2. Este trabalho foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Roy Eduard Bruns, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Em uma primeira etapa, realizou-se série de experimentos para a determinação do caminho de máxima inclinação. Nesta etapa foram, em 4 pontos, variados os fatores tempo (3, 7, 10 e 13 horas) e a proporção NF:K_2CO_3 (1:1; 1:1,5; 1:2 e 1:2,5) de forma simétrica e aleatória para se obter a validade estatística do modelo ponto máximo. Os resultados de rendimentos dos experimentos são apresentados na Tabela IX. O ponto máximo obtido nesta série corresponde a 7 horas de reação, utilizando-se a proporção NF:K_2CO_3 1:1,5. Este resultado sugeriu este como sendo o ponto central de planejamento fatorial para a obtenção de uma superfície de resposta a fim de se interpretar a influência destes fatores (tempo e proporção NF:K_2CO_3) na síntese do NFOH.

Tabela V.9 - Experimentos realizados para determinação de caminho de máxima inclinação para a síntese do NFOH

Reação	**Tempo (h)**	**Proporção NF: K_2CO_3**	**Rendimento %**
1	3	1:1	41
2	7	1:1,5	85
3	10	1:2	46
4	13	1:2,5	55

Com base nos planejamentos fatoriais apresentados anteriormente e no estudo de determinação de caminho de ponto máximo previamente descrito foi feito planejamento fatorial 3^2, utilizando-se como ponto central a reação em 7 horas com proporção NF:K_2CO_3 1:1,5. O fatorial 3^2 é o estudo em que se variam 2 fatores: tempo, x_1 e proporção NF:K_2CO_3, x_2, em três níveis, **-1, 0, +1** (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2002). O objetivo deste planejamento (TROSSINI *et al.*, 2008) foi otimizar a reação de hidroximetilação do NF e verificar a influência dos fatores tempo de reação no resultado da síntese. A tabela V.10 apresenta os 9 experimentos desenvolvidos em duplicata e o ponto central em triplicata, além dos valores de rendimento (%) obtidos na síntese. Pode-se observar que o máximo rendimento ocorreu no ponto central.

Tabela V.10 - Planejamento fatorial 3^2 da síntese do NFOH

Exp.	Tempo de reação	Proporção NF:K_2CO_3	Rendimento$_I$ (%)	Rendimento$_{II}$ (%)	Rendimento$_{III}$ (%)	Rendimento$_m$ (%)
1	-	-	40,07	43,12	-	41,60
2	-	0	70,53	72,04	-	71,29
3	-	+	52,81	50,54	-	51,68
4	0	-	54,15	57.,28	-	55,72
5	0	0	76,14	85,53	83.,55	81,74
6	0	+	52,17	50,25	-	51,21
7	+	-	73,99	60,99	-	67,49
8	+	0	54,54	39,97	-	47,26
9	+	+	41,04	47,87	-	44,46

Níveis de tempo de reação: 3h (-); 7h (0); 11h (+). Proporção NF:K_2CO_3: 1:1 (-); 1:1.5 (0); 1:2 (+). Rendimento$_I$ e Rendimento$_{II}$ representam os valores em duplicata dos rendimentos. Rendimento$_{III}$ é o valor em triplicata para o ponto central. Rendimento$_m$ é a média dos valores.

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente utilizando-se o programa STATISTICS. Gerou-se modelo estatístico quadrático (equação 1), que melhor se adequou aos resultados obtidos. O modelo quadrático descreveu a influência de cada fator utilizado neste planejamento na resposta do modelo (rendimento). Nesta equação, o valor de $\hat{y}$ (%) está relacionado com rendimento previsto, x_1 com o tempo de reação e x_2 com proporção NF:K_2CO_3, mol/mol.

$$\hat{y} = \underset{(\pm 2.46)}{74.68} - \underset{(\pm 1.52)}{0.89}\,x_1 - \underset{(\pm 1.52)}{2.91}\,x_2 - \underset{(\pm 2.52)}{10.11}\,x_1^2 - \underset{(\pm 2.52)}{15.91}\,x_2^2 - \underset{(\pm 1.86)}{8.28}\,x_1x_2 \qquad \textbf{(Equação 1)}$$

x_1= tempo de reação.

x_2= proporção NF/K_2CO_3, mol/mol.

A análise da variância do modelo quadrático é apresentada na tabela XI. Observou-se 62% de variância (r^2= 0,62), o que é um bom resultado em se

tratando de um planejamento estatístico para síntese orgânica. Porém, o valor de 14,09 para o teste F (calculado) indica falta de ajuste do modelo para o intervalo de 95% de confiança. Realizando-se a análise de variância ANOVA em um segundo modelo (r^2 = 0,59), obteve-se F= 9,18 (quando $F_{5,10}$ = 3,33 dentro de um intervalo de confiança de 95%), novamente demonstrando falta de ajuste do modelo. Esses resultados indicam que o modelo apresenta um resíduo, não explicando totalmente os resultados obtidos, talvez relacionado a outros fatores não estudados neste planejamento.

Tabela V.11 - Análise da variância do modelo estatístico quadrático para a síntese do NFOH

Fonte de Variação	**Soma Quadrática**	**Graus de Liberdade**	**Média Quadrática**	**Teste F**	**Teste F(critico)**
Regressão	2366,1840	5	473,2367	4,2328	3,03
Resíduos	1453,4140	13	111,8011		
Falta de Ajuste	1175,3380	3	391,7792	14,0889	3,71
Erro Puro	278,0764	10	27,8076		
Total	3819,592	18			

variância máxima 61,95%; variância máxima explicada: 92,72%

A Figura 5.2 mostra a superfície de resposta do modelo quadrático para a equação 1, relacionando o rendimento previsto com as variáveis x_1 e x_2. Esta metodologia é fundamentada na construção de modelos matemáticos empíricos com funções quadráticas para descrever o planejamento estudado. Dessa maneira, origina dados que permitem a exploração (modelar e deslocar) do sistema até a sua otimização (TEÓFILO, FERREIRA, 2006). Pela representação com aspecto elíptico parabólico, observa-se que a superfície é ligeiramente inclinada para a linha central x_2, (proporção NF/K_2CO_3, mol/mol), portanto, mudanças na concentração de base podem afetar o resultado da reação. Os pontos máximos observados foram x_1 = 0,02 e x_2 = 0,19, correspondendo a valores de 6,9 horas e proporção NF:K_2CO_3 1:1,5, próximos, portanto, ao ponto central do planejamento.

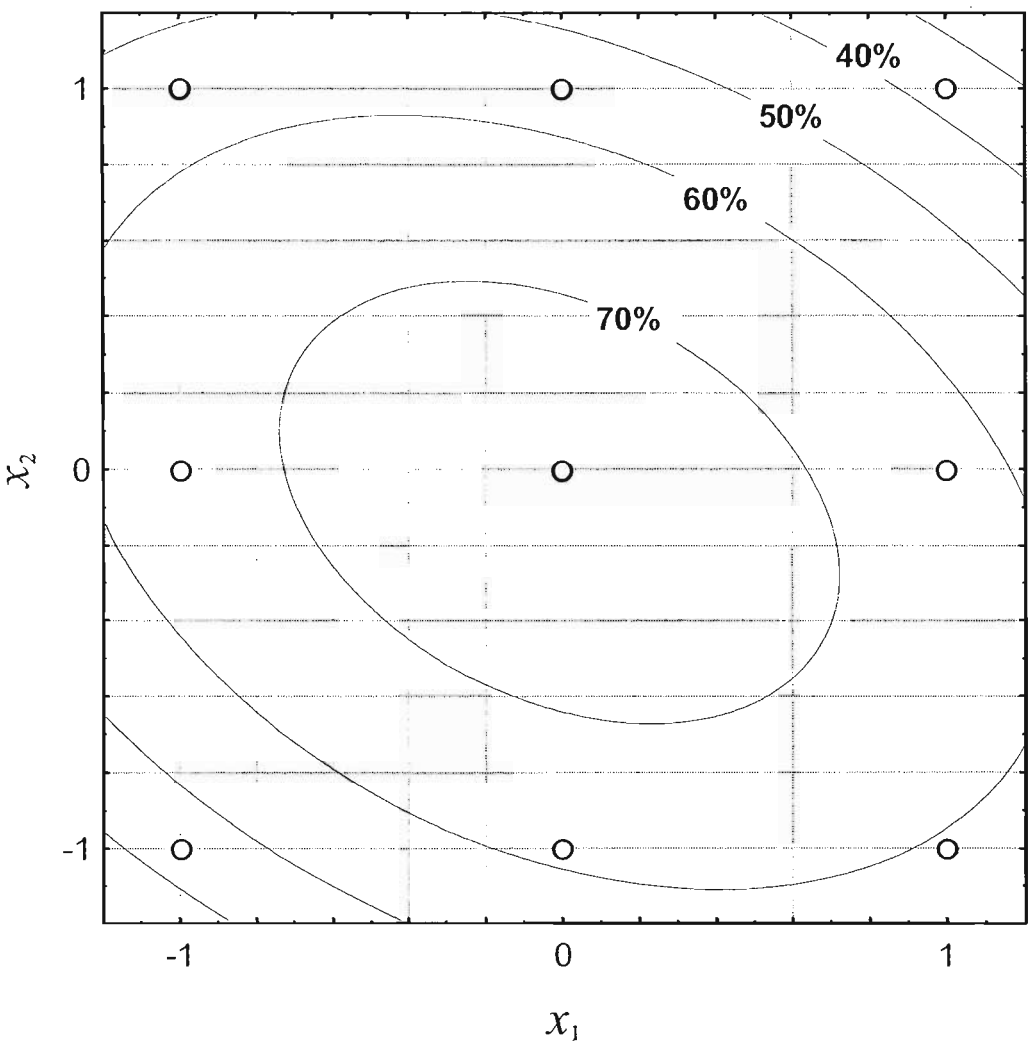


Figura 5.2 – Superfície resposta para o modelo quadrático, relacionando rendimento previsto com as varáveis x_1 (tempo de reação) e x_2 (proporção NF:K_2CO_3, mol/mol).

Sabe-se que a síntese do NFOH não aconteceria na ausência de K_2CO_3, necessário para a desprotonação da amida primária do NF (Figura 5.3 A). Porém, um excesso deste reagente (observados em todos os resultados da relação 1:2) pode ter sido o responsável pela decomposição do NFOH e queda do rendimento da reação, uma vez que a base pode atacar o H fracamente ácido da OH para a formação do ânion *N*-hidroximetil (Figura 5.3 B). Este intermediário sofre a clivagem da ligação N-C para a liberação de formaldeído e formação do material de partida, NF (FRISS, BUNDGAARD, 1996). Em adição, é importante ressaltar que, como visto no planejamento fatorial, o

tempo de reação também está relacionado à reversão do NFOH em NF, afetando os resultados de acordo com sua variação.

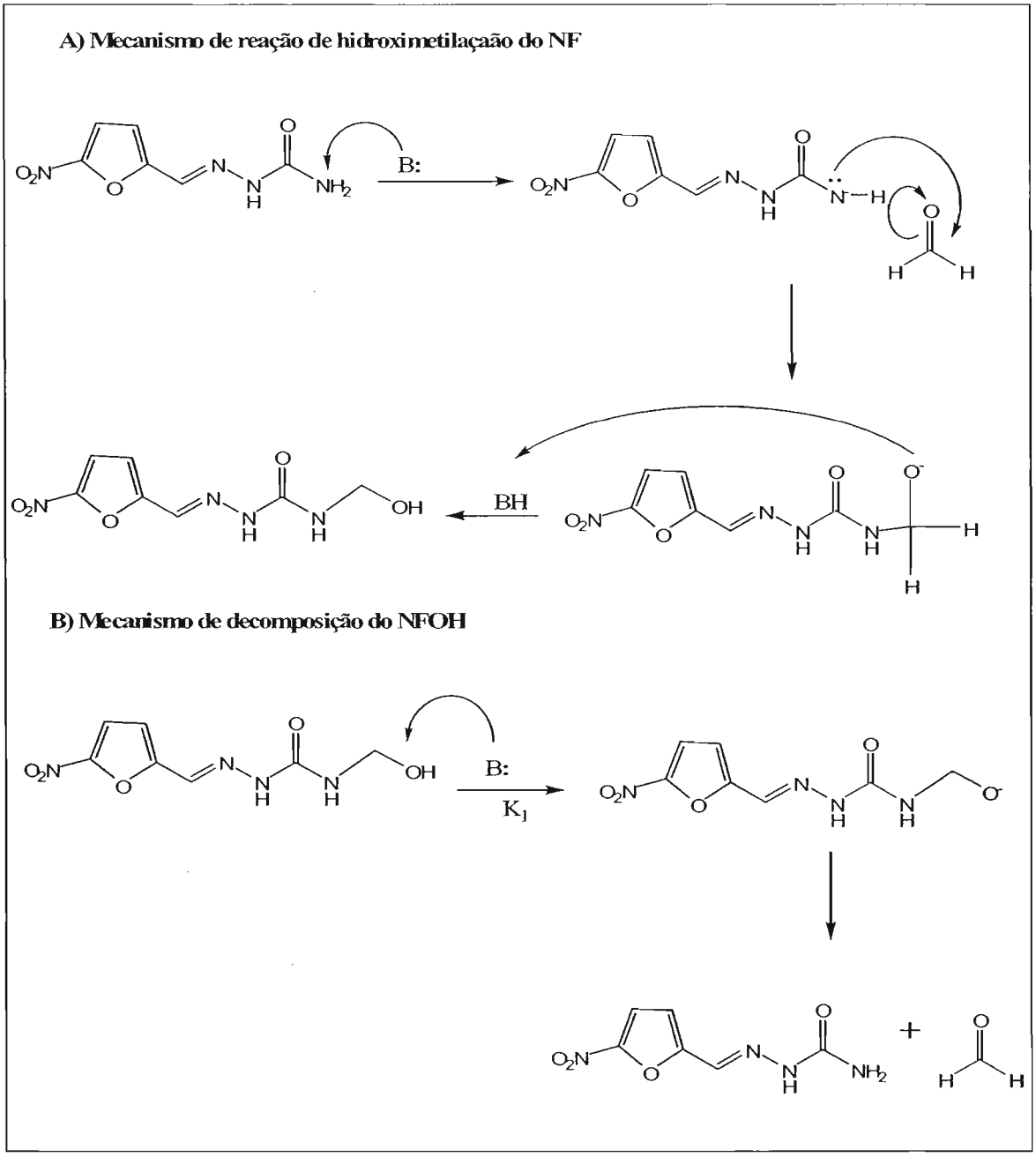


Figura 5.3 - A) Mecanismo da reação de hidroximetilação do NF. B) Mecanismo de decomposição do NFOH (adaptado de FRISS, BUNDGAARD, 1996).

5.2.1.3 Síntese de Análogos de NF e do NFOH

5.2.1.3.1 Síntese de análogos do NF

Derivados análogos do NF foram planejados com o intuito de se estudar a possibilidade de mecanismo de ação alternativo, o qual relaciona a tiocabonila da tiossemicarbazona destes análogos com um possível ataque nucleofílico do resíduo Cys25 da cruzaína, inibindo a enzima por meio de ligação covalente (DU *et al.*, 2002; AGUIRRE *et al.* 2004).

Nos análogos planejados, anteriormente sintetizados por AGUIRRE *et al.* (2004) e aqui preparados por razões de comparação com os derivados hidroximetilados correspondentes, utilizou-se o bioisoterismo para variar o anel de furânico para tiofênico e de carbonila (O) para tiocarbonila (S), resultando nas semicarbazona e tiossemicarbazonas correspondentes. Foram sintetizados três derivados para os quais se determinaram as faixas de fusão e se realizaram análises de RMN ^{1}H e de ^{13}C. A Tabela V.12 mostra esses resultados e os sinais que mais caracterizam as modificações efetuadas. As Tabelas V.13 a V.18 mostram as atribuições dos espectros de RMN relativas aos espectros de 5.8 a 5.13.

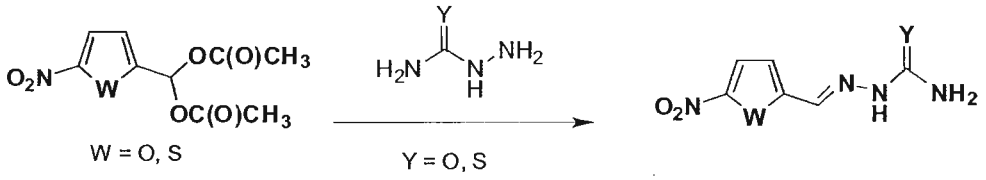
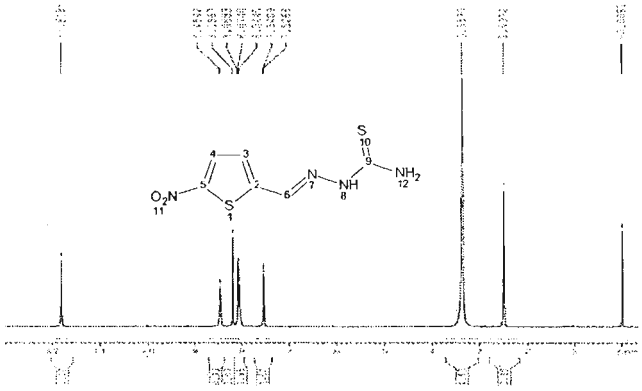


Tabela V.12 – Análises realizadas para os análogos do NF, apresentando o ponto de fusão e os sinais característicos nos espectros de RMN ^{1}H e de ^{13}C

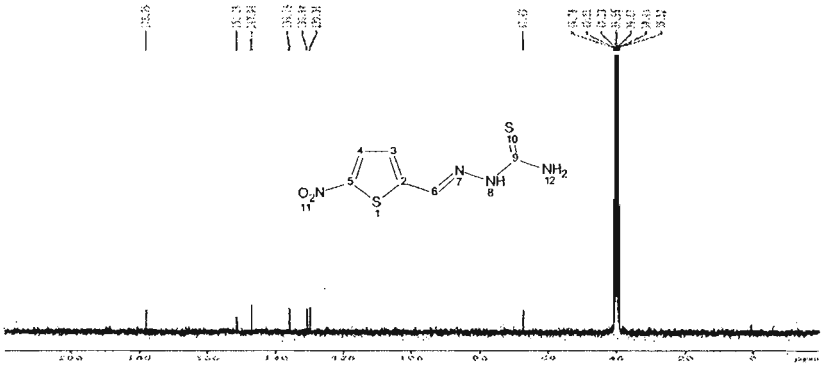
Derivado	W, Y	Experimento	Fusão (°C)	RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz, δ = ppm	RMN ^{1}H (DMSO-d_6), 300 MHz, δ = ppm	Rendimento (%)
NS	S, S	4	231-232	135,74	8,45	92
NSO	S,O	5	221-223	128,22	8,03	87
NOS	O,S	6	204-205	130,26	7,96	80



Espectro 5.6 – RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de NS.

Tabela V.13 - Atribuições de RMN ^{1}H do NS

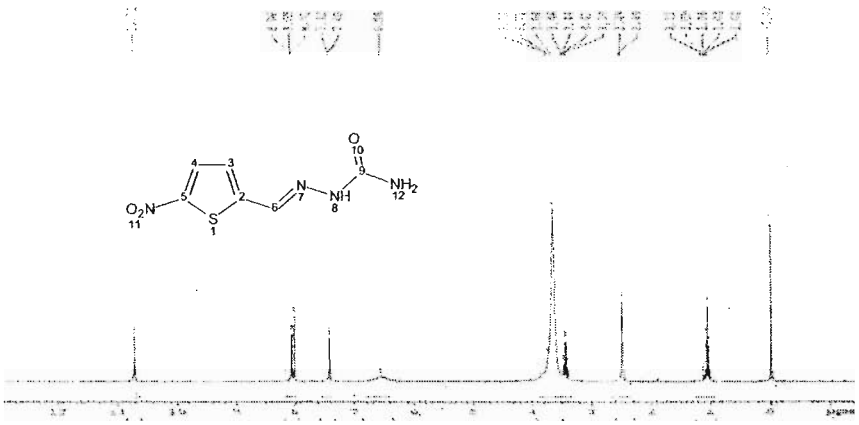
RMN ^{1}H (DMSO-d_6), 300 MHz, δ = ppm
7,53 (d, J= 4,23 Hz, 1H, H_3); 8,07 (d, 1H, J= 4,23 Hz H_4); 8,04 (s, 1H, H_{12}); 8,18 (s, 1H, H_{12}); 8,45 (s, 1H, H_6); 11,82 (s, 1H, H_8)



Espectro 5.7 – RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de NS.

Tabela V.14 - Atribuições de RMN ^{13}C do NS

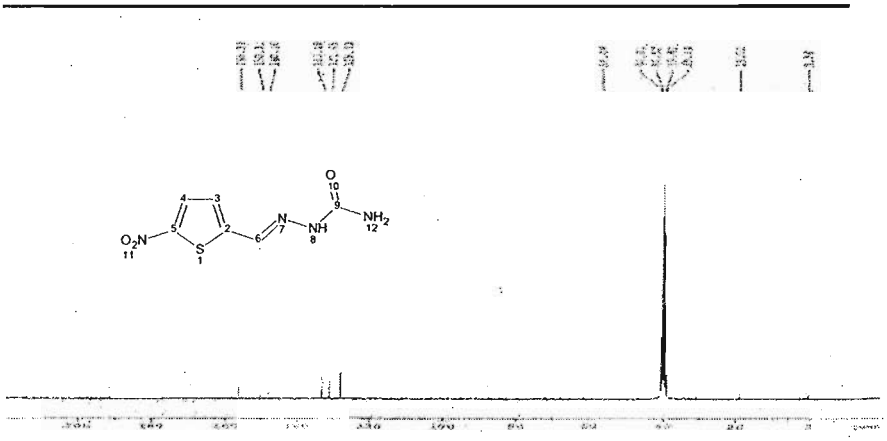
RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz, δ = ppm
39,39 (DMSO-d_6); 129,66 (C_3); 130,89 (C_4); 135,74 (C_6); 147,21 (C_2); 151,45 (C_5); 178,68 (C_9)



Espectro 5.8 – RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de NSO.

Tabela V.15 - Atribuições de RMN ^1H do NSO

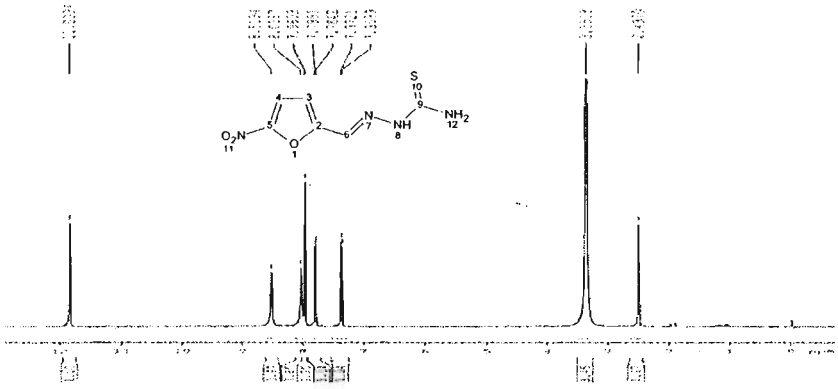
RMN ^1H (DMSO-d_6), 300 MHz, δ = ppm
6,59 (s, 2H, H_{12}); 7,43 (d, J= 3,72 Hz, 1H, H_3); 8,08 (d, 1H, J= 3,72 Hz H_4); 8,03 (s, 1H, H_6); 10,76 (s, 1H, H_8)



Espectro 5.9 – RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de NSO.

Tabela V.16 - Atribuições de RMN ^{13}C do NSO

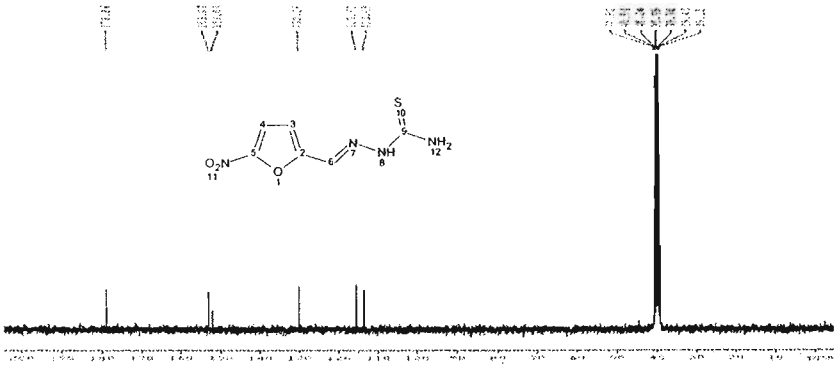
RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz, δ = ppm
39,39 (DMSO-d_6); 128,22 (C_6); 131,22 (C_3); 133,35 (C_4); 148,33 (C_2); 150,45 (C_5); 156,54 (C_9)



Espectro 5.10 - RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) deNOS.

TabelaV.17 - Atribuições de RMN ^1H do NOS

RMN ^1H (DMSO-d_6), 300 MHz, δ = ppm
7,63 (d, J= 3,66 Hz, 1H, H_3); 7,78 (d, 1H, J= 3,66 Hz, H_4); 7,96 (s, 1H, H_6); 8,02 (s,1H, H_{12}); 8,51 (s,1H, H_{12}); 11,83 (s, 1H, H_8)



Espectro 5.11 – RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de NOS.

Tabela V.18 - Atribuições de RMN ^{13}C do NOS

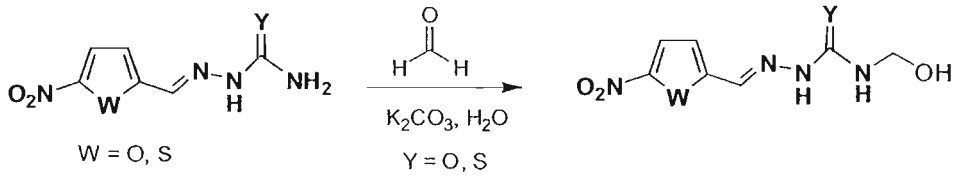
RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz, δ = ppm
39,39 (DMSO-d_6); 113,68 (C_3); 115,62 (C_4); 130,26 (C_6); 152,04 (C_2); 153,07 (C_5); 178,86 (C_9)

5.2.1.3.2 Síntese dos análogos do NFOH

Com o intuito de se compreender o mecanismo de ação de NFOH e a importância do grupamento hidroximetil para a melhor atividade que o NF contra *T. cruzi*, resolveu-se proceder à hidroximetilação dos análogos anteriormente obtidos. As reações de hidroximetilação foram realizadas por metodologia descrita por TROSSINI e colaboradores (2004), utilizando meio básico de K_2CO_3 e adição de solução de formaldeído em duas etapas. Esta metodologia de hidroximetilação foi escolhida por se mostrar a mais promissora em trabalho realizado em nosso laboratório com o intuito de otimizar a síntese do NFOH por estudo de planejamento fatorial.

Dois dos três análogos do NF hidroximetilado foram isolados, NSOH (experimento 8), NSOOH (experimento 9) e NFSOH (experimento 10) Verificou-se que a reatividade dos compostos é diferente dependendo do átomo -- O ou S -- na carbonila. Quando o composto apresenta oxigênio,

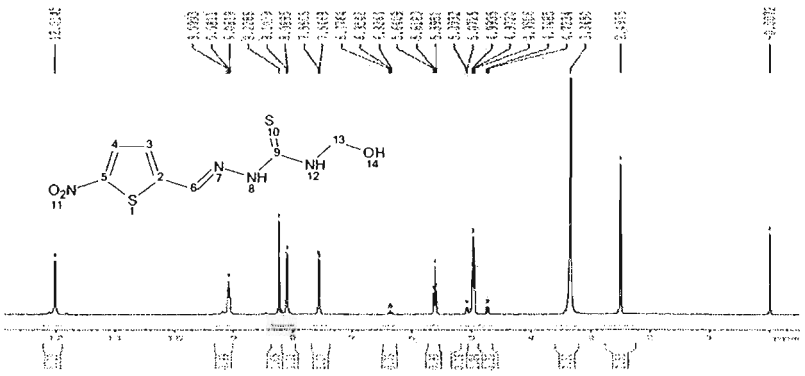
semicarbazona, há maior facilidade no seu isolamento. Tal fato é observado tanto para o NFOH, quanto para o NSOOH. Já para os derivados contendo tiocarbonila, a degradação é mais rápida e esses compostos se mostram mais sensíveis à luz.



A Tabela V.19 mostra os pontos de fusão e os sinais de RMN ^1H e ^{13}C referentes ao grupo hidroximetil introduzido nos derivados tiofênicos. As atribuições de RMN dos derivados tiofênicos hidroximetilados (espectros 12 a 15) encontram-se às Tabelas de XX a XXV.

Tabela V.19 - Análises realizadas para os derivados hidroximetilados dos análogos do NF, apresentando o ponto de fusão e os sinais característicos nos espectros de RMN ^1H e de ^{13}C

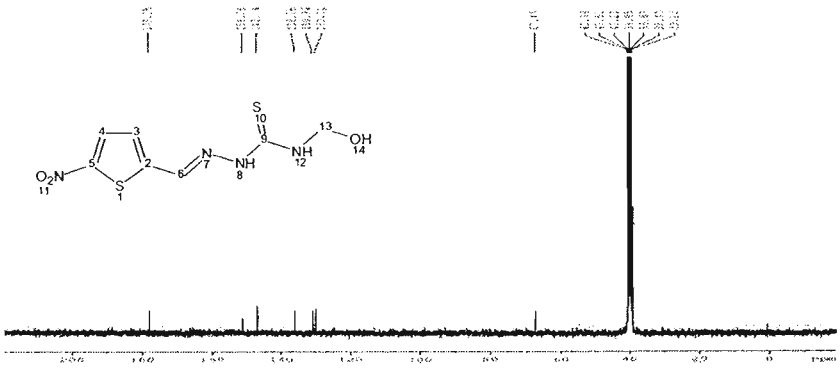
Derivado	W, Y	Experimento	Fusão (°C)	RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz, δ = ppm	RMN ^1H (DMSO-d_6), 300 MHz, δ = ppm	Rendimento (%)
NSOH	S, S	7	197-198	67,43	4,97	64
NSOOH	S, O	8	199-201	63,68	4,60	43
NFSOH	O, S	9	193-195	63,65	4.61	27



Espectro 5.12 – RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de NSOH.

Tabela V.20 – Atribuições de RMN ^{1}H do NSOH

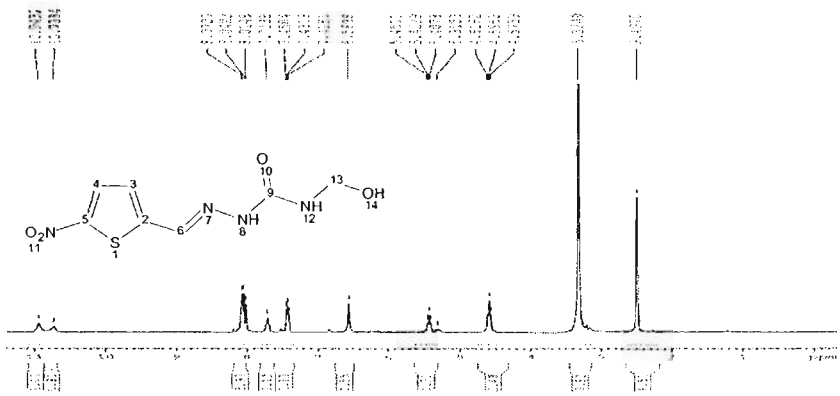
RMN ^{1}H (DMSO-d_6), 300 MHz, δ = ppm
4,97 (t, J=6,45 Hz, 2H, H_{13}); 5,61 (t, J=6,87 Hz, 1H, H_{14}); 6,36 (d, J=6,66, 1H, H_{13}) 7, 55 (d, J=3,9 Hz, 1H, H_3); 8,09 (d,J=3,9 Hz, 1H, H_4); 8,22 (s, 1H, H_6); 9,08 (t, J=5,76 Hz, 1H, H_{12}); 12,01 (s, 1H, H_8)



Espectro 5.13 – RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) NSOH.

Tabela V.21 – Atribuições de RMN ^{13}C do NSOH

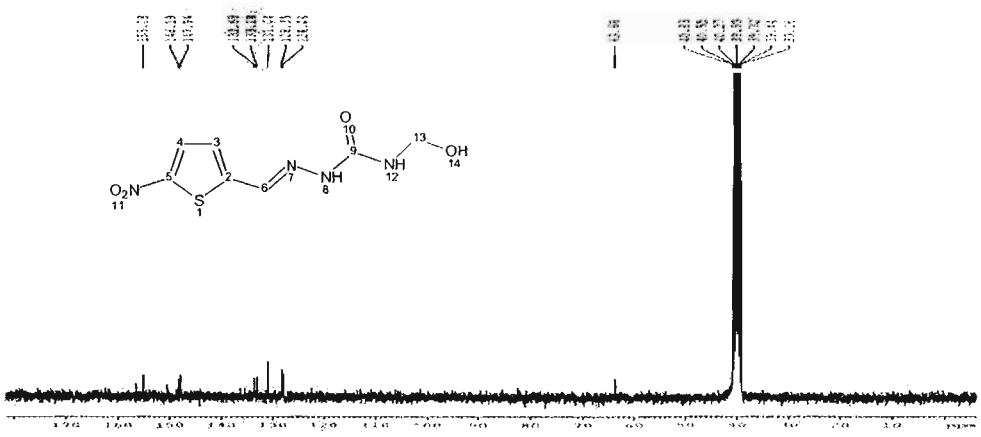
RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz, δ = ppm
39,39 (DMSO-d_6); 67,43 (C_{13}); 130,01 (C_3); 130,94 (C_4); 136,06 (C_6); 147,28 (C_2); 151,28 (C_5); 178,05 (C_9)



Espectro 5.14 – RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de NSOOH.

Tabela V.22 – Atribuições de RMN ^{1}H do NSOOH

RMN ^{1}H (DMSO-d_6), 300 MHz, δ = ppm
4,60 (t, J=6,0 Hz, 2H, H_{13}); 5,42 (t, J=6,3 Hz, 1H, H_{14}); 7,25 (d, J=3,87 Hz, 1H, H_3); 7,64 (t, J=6,3 Hz, 1H, H_{12}); 8,07 (s, 1H, H_6); 8,03 (d,J=3,87 Hz, 1H, H_4); 10,94 (s, 1H, H_8).

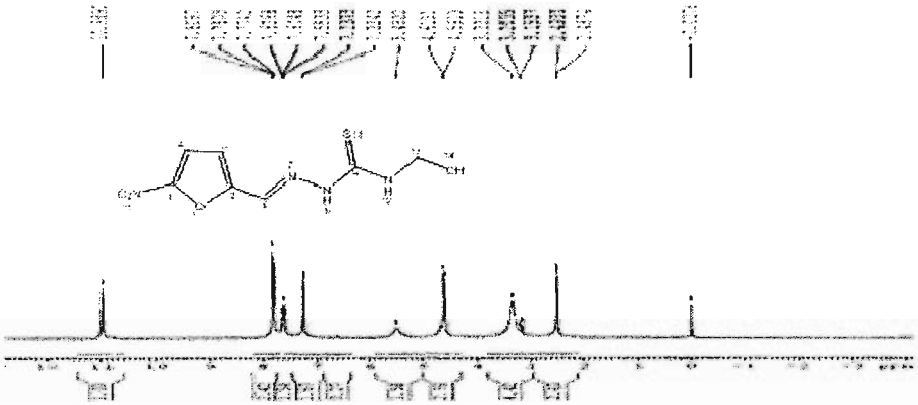


Espectro 5.15 – RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de NSOOH.

Tabela V.23 – Atribuições de RMN ^{13}C do NSOOH

RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz, δ = ppm
39,39 (DMSO-d_6); 63,68 (C_{13}); 128,04 (C_3); 128,35 (C_4); 131,04 (C_6); 133,18 (C_3)*;133,68 (C_2); 147,96 (C_5);148,19 (C_5)* 155,08 (C_9)

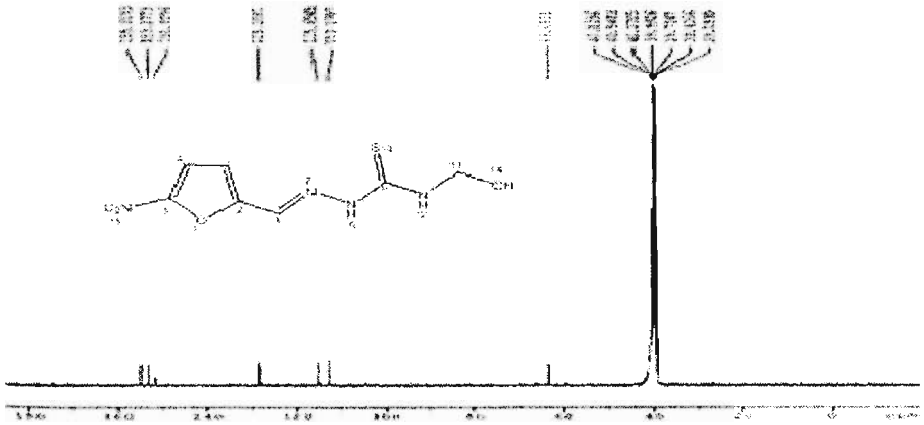
* Os sinais referentes aos carbonos C_3 e C_5 estão duplicados provavelmente dedido à isomeria S-*cis* e S-*trans* apresentada pelo composto.



Espectro 5.16 – RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de NOSOH.

Tabela V.24 – Atribuições de RMN ^1H do NOSOH

RMN ^1H (DMSO-d_6), 300 MHz, δ = ppm
4,61 (d, J=6,54 Hz, 2H, H_{13}); 5,48 (s, 1H, H_{14}); 7,23 (d, J=3,93 Hz, 1H, H_3); 7,60 (t, J=6,54 Hz, 1H, H_{12}); 7,81 (s, 1H, H_6); 7,78 (d,J=3,93 Hz, 1H, H_4); 3,20 (s, 1H, H_8).



Espectro 5.175 – RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) de NOSOH.

Tabela V.25 – Atribuições de RMN ^{13}C do NOSOH

RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz, δ = ppm
39,39 (DMSO-d_6); 63,65 (C_{13}); 113,19 (C_3); 115,65 (C_4); 128,39 (C_6); 133,18 (C_3);151,80 (C_2); 153,28 (C_5); 155,02 (C_9)

5.3.2 *Química computacional*

5.3.2.1 Estudos de Modelagem Molecular dos bioisósteros de NF e de NFOH

Utilizando o processo de bioisosterismo (WERMUTH, 2003), planejaram-se por modelagem molecular e conseqüente emprego do método semi-empírico AM1 (DEWAR, 1885), análogos do NF e do NFOH com o intuito não só de procurar esclarecer possíveis diferenças esteroeletrônicas proporcionadas pela substituição do anel furânico pelo tiofênico como também pela variação da carbonila presente na molécula do NF, característica da semicarbazona, por uma tiocarbonila, resultando na formação de uma tiossemicarbazona.

Os modelos dos análogos foram construídos e otimizados no programa SPARTAN O2. Na análise conformacional realizou-se estudo comparativo empregando-se os métodos sistemático e de Monte Carlo. Resultados semelhantes foram fornecidos, o que sugere o emprego da análise sistemática por necessitar de menor tempo de máquina. Avaliando-se os confôrmeros de

menor energia mínima dos análogos propostos, observa-se serem estes idênticos para os meios em vácuo e solvatado (método Spartan SMS94).

As superfícies eletrônicas calculadas para o NF e seus análogos construídos, NS, NFS, NSO, e seus respectivos derivados hidroximetilados, NFOH, NSOH, NFSOH, NSOOH, apresentam maior densidade eletrônica no anel heterocíclico contendo o átomo de oxigênio (Figura 5.4, através dos MEPs). Ressalta-se, assim, a maior possibilidade de formação de radicais livres nesta parte da molécula, de acordo com o mecanismo de ação proposto por oxi-redução de nitro-heterocíclicos. Por outro lado, observa-se que a presença da tiocarbonila na cadeia lateral desses derivados proporciona aumento da densidade eletrônica e conseqüente maior afinidade para o ataque nucleofílico da Cys25 da cruzaína sobre esta carbonila, o que pode ser verificado na Figura 5.4, através dos mapas de orbital e das superfícies de LUMO. Tal observação pode ser relacionada ao mecanismo de inibição da cruzaína, proposto para tiossemicarbazonas, por DU e colaboradores, em 2002. Sendo assim, poder-se-ia sugerir um duplo mecanismo de ação para os derivados aqui planejados. Ademais, pode-se prever maior atividade inibitória para o derivado contendo anel furânico e tiossemicarbazona, NFS. Para o derivado hidroximetilado correspondente, NFSOH, no qual se observa maior favorecimento quanto à distribuição do orbital de LUMO, bem como o mapa correspondente, que mostra o provável ataque nucleofílico enzimático, reitera o provável mecanismo duplo de ação.

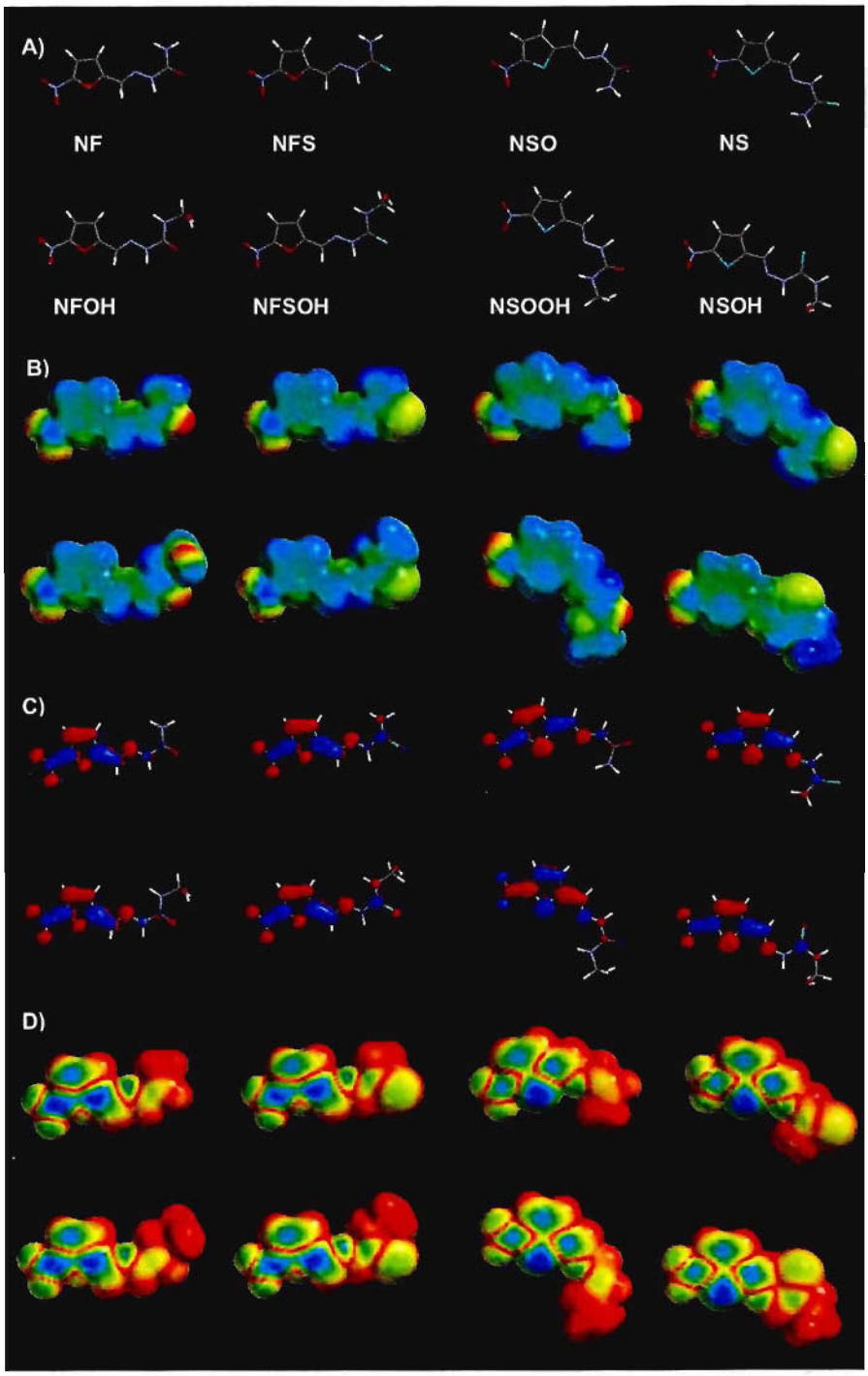


Figura 5.4 - Confôrmeros de menor energia (gás) para análogos de NF e de NFOH: A) modelo tubo; B) CPK; C) MEPs (–65 (vermelho) 30 (azul) kcal/mol) superposto na isodensidade de 0,002 e/au^3; D) orbitais LUMO; E) Mapas LUMO (0,000 (vermelho) a 0,014 (azul) kcal/mol) . Átomos nas cores: C (cinza), O (vermelho), N (azul) e H (branco).

5.3.2.2 Estudo de *docking* dos análogos do NF e do NFOH

5.3.2.2.1 Por FlexE

Para avaliar e predizer a possível interação e o posicionamento dos bioisósteros do NF (NS, NSO, NOS) e do NFOH (NSOH, NSOOH, NOSOH), na cruzaína, realizou-se estudo de *docking* no sítio catalítico dessa enzima, mais especificamente com a Cys25, sendo este o ponto de interação entre a (tio)carbonila do grupamento (tio)semicarbonila. Este estudo também teve o propósito de elucidar o mecanismo de ação proposto por DU e colaboradores (2002), no qual se baseou o planejamento destes análogos.

O trabalho foi realizado utilizando-se o módulo de *docking* FlexE do programa Sybyl 7.2, como mencionado anteriormente. Esse programa realiza o alinhamento de todas as estruturas de proteína armazenadas em um banco de dados criado para o estudo, fazendo um *assembler*, ou seja, utiliza-se a estrutura final do conjunto das proteínas alinhadas. A relação entre as estruturas é medida pela derivação da raiz quadrada média *(Weighted root mean square deviations* WRMSD). Assim sendo, as estruturas cristalográficas da cruzaína utilizadas na formação do *assembler* foram as de códigos no PDB: 1ME4, 1ME3, 1AIM, 2AIM e 1F2B. As estruturas cristalográficas foram preparadas retirando-se o ligante e as moléculas de água no programa DeepView (http://www.expasy.org/spdbv/). No módulo Biopolymer do programa Sybyl 7.2 foi realizado o alinhamento das estruturas cristalográficas, gerando um *assembler,* que apresentou WRMSD=0,0987, ou seja eram muito semelhantes. Esse *assembler* foi utilizado para o *docking*.

Gerou-se um banco de dados para a série de moléculas com cargas AM1, PM3, MMFF e GH, visando determinar qual delas resultaria em valores de ΔG teóricos mais favoráveis.

Inicialmente, realizou-se estudo para adequar os parâmetros para o melhor *grid* de docagem, variando-se o tamanho, entre 6 e 12 Å, e ponto central do *grid*, utilizando em alguns casos um *subsite* focando a Cys25 como ponto central. Em um primeiro estudo utilizou-se o *default* do programa com um *grid* de 10 Å, focando como ponto central o centro da enzima. Este primeiro

teste não foi bem-sucedido, considerando-se o elevado número de graus de liberdade, pois os ligantes não se posicionavam no sítio catalítico.

Partiu-se, então, para a segunda tentativa, utilizando-se, novamente, o *default* do programa com *grid* de 10 Å e focando como ponto central o centro da enzima, porém indicando o sítio catalítico pelos resíduos Cys25, His159, Glu205. O resultado do *docking* se apresentou de forma inadequada, sem precisão no sítio catalítico.

A terceira tentativa foi realizada novamente com *grid* de 10 Å, acrescentando-se, todavia, *subsite* de 2,1 Å. O *docking* foi realizado. Verificou-se que o tamanho do *subsite* era pequeno e partiu-se, então, para uma quarta tentativa, na qual o *subsite* utilizado foi de 3,5 Å. A acomodação dos ligantes foi, então, melhor, porém a distância do bolso catalítico da enzima ainda permaneceu desfavorável, devido, provavelmente, ao tamanho do *grid*.

Os estudos subseqüentes foram realizados modificando-se a metodologia e utilizando uma sugestão do tutorial do programa, na qual se foca o centro do *grid* no resíduo principal da catálise ennzimática, no caso da cruzaína, a Cys25. Realizou-se o *docking* com *grid* de 6,5 Å e a Cys25 como ponto central. Neste estudo, obteve-se ótima aproximação do sítio catalítico, demonstrando que o método seria promissor.

Em nova tentativa, com o intuito de melhorar ainda mais a predição realizou-se o *docking* com as mesmas condições do *grid* utilizadas no estudo anterior, considerando-se, além disso, os resíduos do sito catalítico, Cys25, His159, Glu205, obtendo-se bons resultados de predição. Este estudo foi denominado de dock6. Analisando-se os resultados do dock6 para todos os campos de força utilizados (Tabela V.26), observou-se que os melhores resultados eram predominantes para os modelos construídos com método AM1, quanto aos ΔG teóricos, sendo estes os utilizados para análise mais detalhada.

Tabela V.26 – Melhor *fitness scores* dos resultados de *docking* realizados para os análogos de NF e de NFOH no FlexE

	MMFF	GH	PM3	AM1
NF	-17,74	-17,74	-17,74	-17,74
NFOH	-22,80	-22,80	-24,91	-24,91
NFS	-15,62	-15,62	-15,62	-15,62
NFSOH	-15,71	-15,71	-15,71	-15,71
NS	-15,26	-15,26	-15,26	-15,26
NSOH	-24,07	-21,55	-21,41	-24,74
NSO	-17,74	-17,74	-17,74	-17,74
NSOOH	-20,08	-20,08	-20,08	-20,08

Apresentam-se, a seguir, as figuras referentes aos *dockings* dos oito ligantes sugeridos construídos pelo método AM1, sendo a estrutura base para visualização a estrutura cristalográfica da cruzaína de código pdb 1ME4, por ser a de melhor definição (1,2 Å). Nos resultados de docking, para todas as metodologias, que o grupo (tio)carbonila da (tio)semicarbazona presente nos ligantes se aproxima da Cys25 da cruzaína. Estes relatos fornecem indícios de que um segundo mecanismo de ação, interação com a cruzaína, pode ser sugerido para esta série de nitro-heterocíclicos. As imagens dos melhores resultados de *docking* dos 8 ligantes, calculados pelo método AM1, apresentaram interação idêntica àquelas obtidas pelos *dockings* realizados no programa GOLD. Assim sendo, optou-se por apresentar visualmente apenas os resultados do programa GOLD.

5.3.2.2.1 Por GOLD

Os estudos de *docking* foram realizados com o programa GOLD 3.0 de modo a fazer uma comparação com o FlexE, anteriormente empregado.

O estudo de *docking* efetuado para os análogos em questão apresentou, também, resultados bastante interessantes, visto que o posicionamento dos anéis tanto furânicos quanto tiofênicos e das cadeias laterais, semicarbazona

ou tiossemicarbazona, se dá na mesma região do sítio ativo da enzima (Figura 5.5). Os anéis (furânicos e tiofênicos) se posicionaram no bolso S2 do sito ativo da cruzaína, resultado que condiz com o relatado na literatura, à vista de que este bolso tem afinidade por porções hidrofóbicas, características apresentadas pelos grupos aromáticos, furânicos e tiofênicos. Outro ponto importante nesse estudo foi o posicionamento da tiocabonila ou carbonila da porção (tio)semicarbazona dos análogos de NF e de NFOH, próximas à Cys25 da cruzaína (Figuras 5.6-5.12), novamente sugerindo a interação destes compostos com este resíduo de aminoácido e o mecanismo de ação destes análogos como inibidores da enzima. Verificou-se, ainda, possibilidade de formação de ligação de hidrogênio pelos grupos OH dos derivados hidroximetilados (NFOH e seus análogos), com o resíduo Gly23 da cruzaína. Esta observação sugere a maior interação do NFOH e pode vir a ser uma explicação para a maior atividade deste derivado em relação ao seu precursor NF.

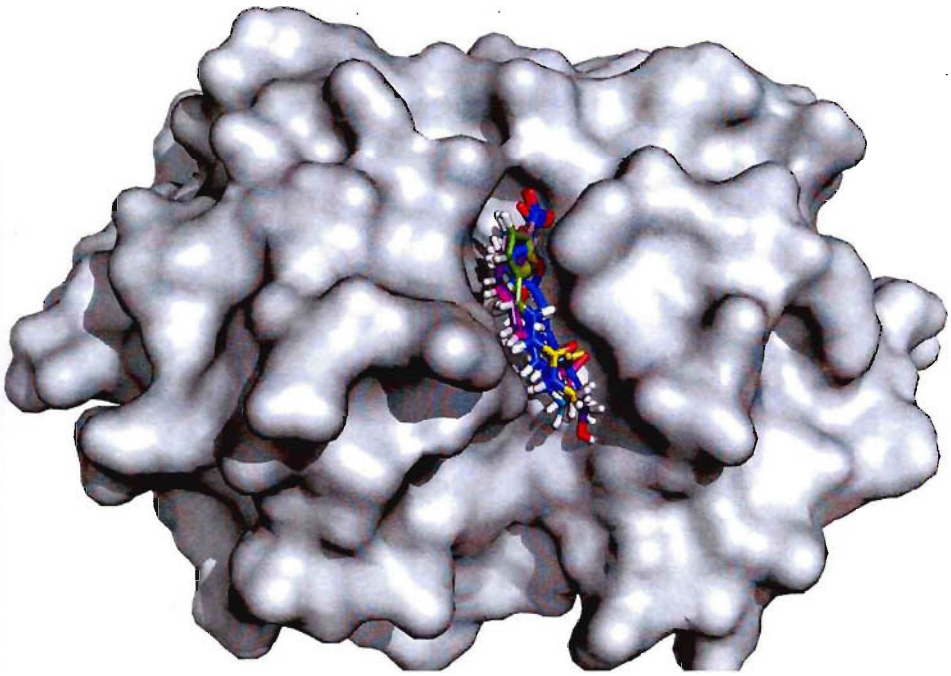


Figura 5.5 - *Docking* dos análogos do NF e do NFOH, mostrando que todos se posicionaram em uma conformação semelhante.

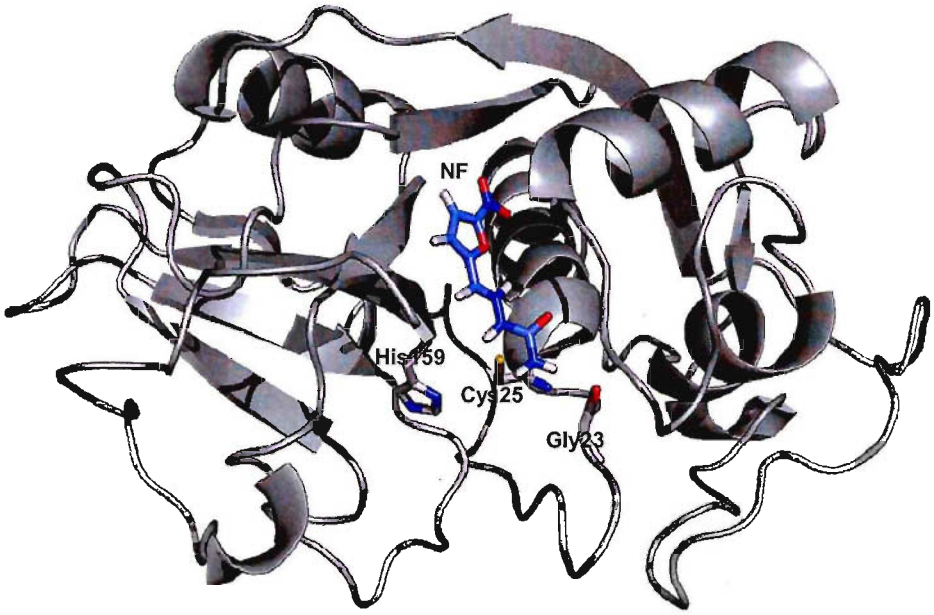


Figura 5.6 - *Docking* do NF na estrutura da cruzaína.

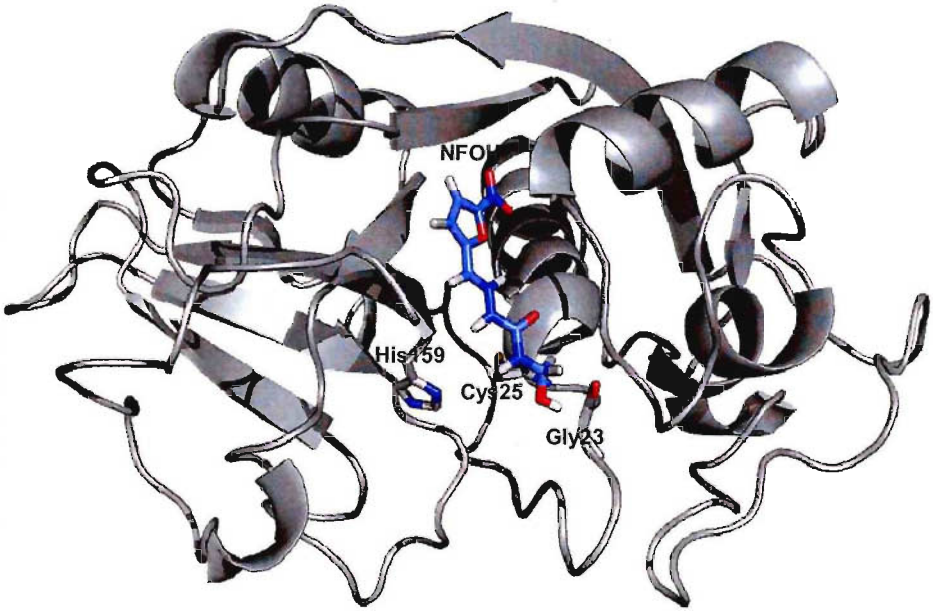


Figura 5.7 - *Docking* do NFOH na estrutura da cruzaína.

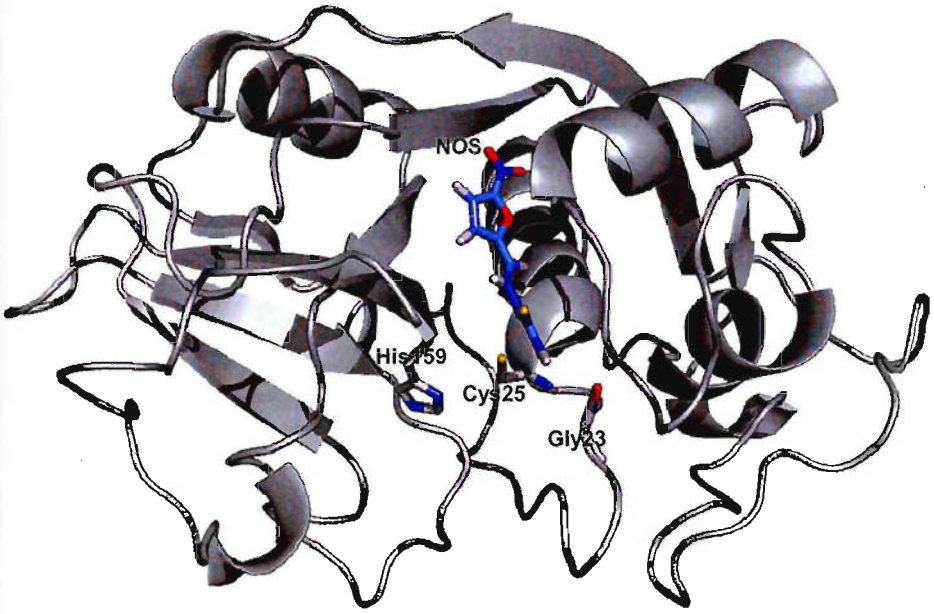


Figura 5.8 - *Docking* do NFS na estrutura da cruzaína.

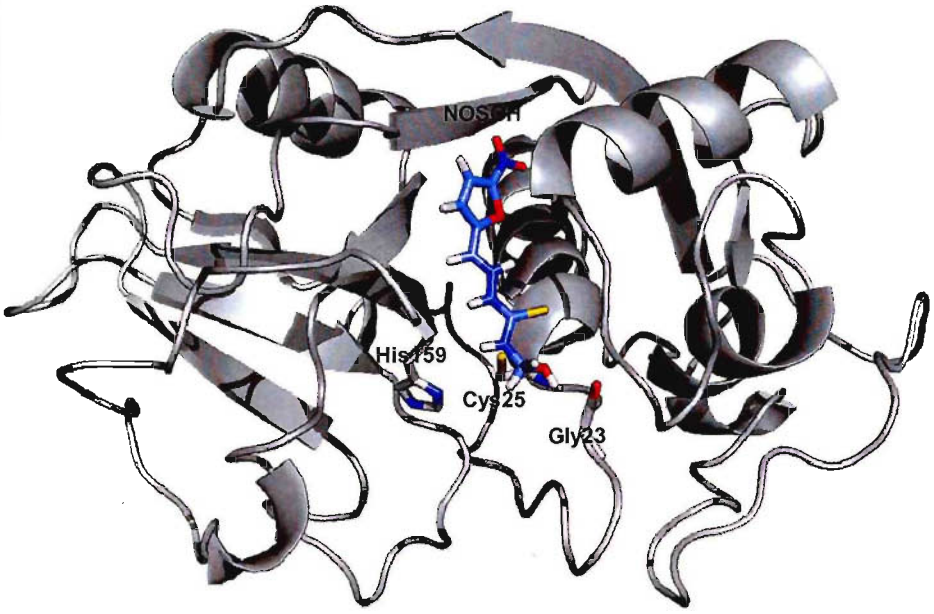


Figura 5.9 - *Docking* do NFSOH na estrutura da cruzaína.

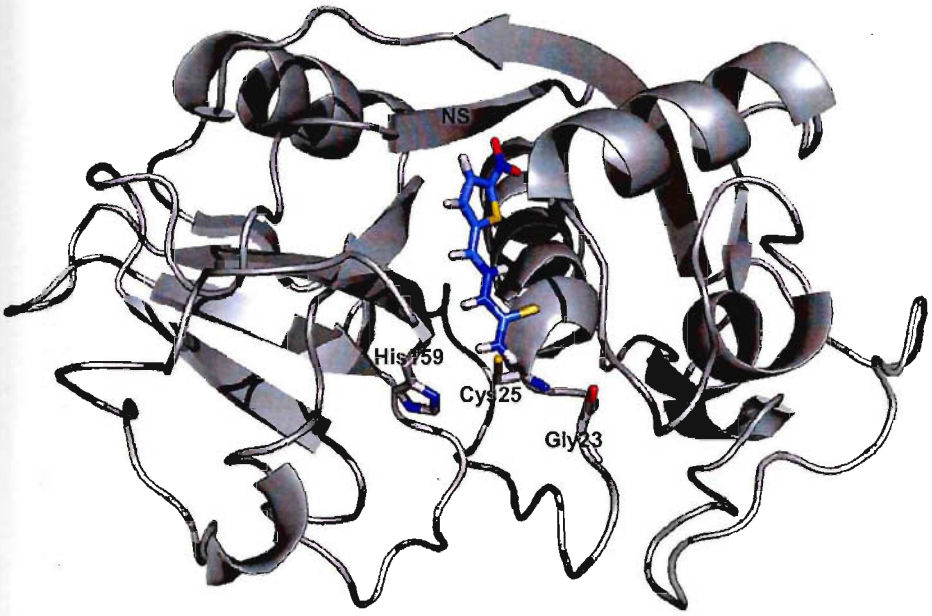


Figura 5.10 - *Docking* do NS na estrutura da cruzaína.

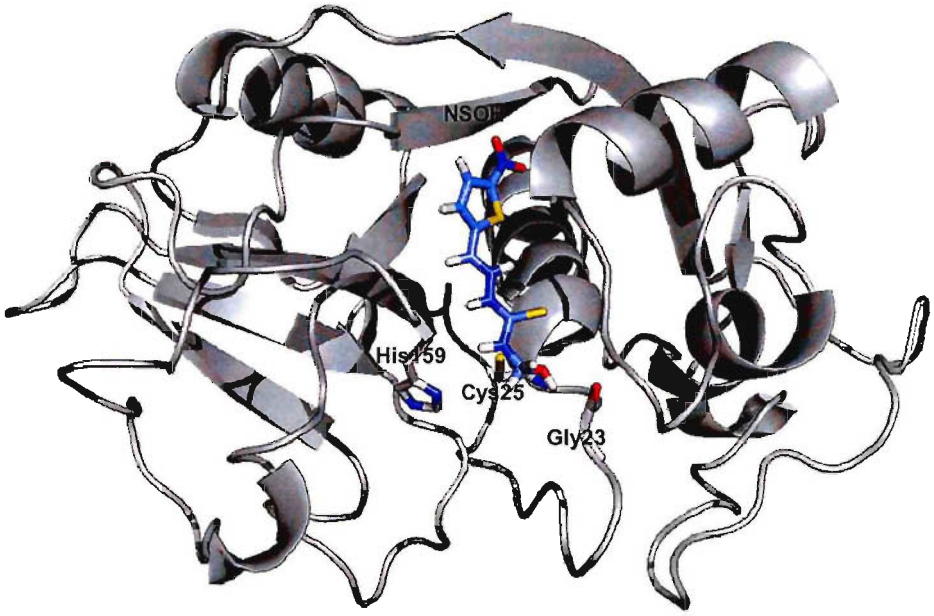


Figura 5.11 - *Docking* do NSOH na estrutura da cruzaína.

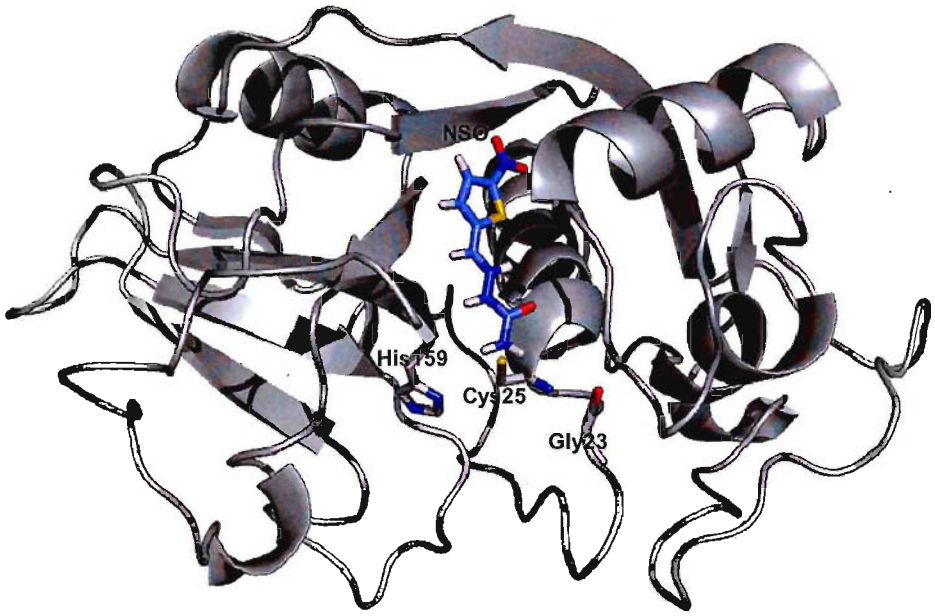


Figura 5.12 - *Docking* do NSO na estrutura da cruzaína.

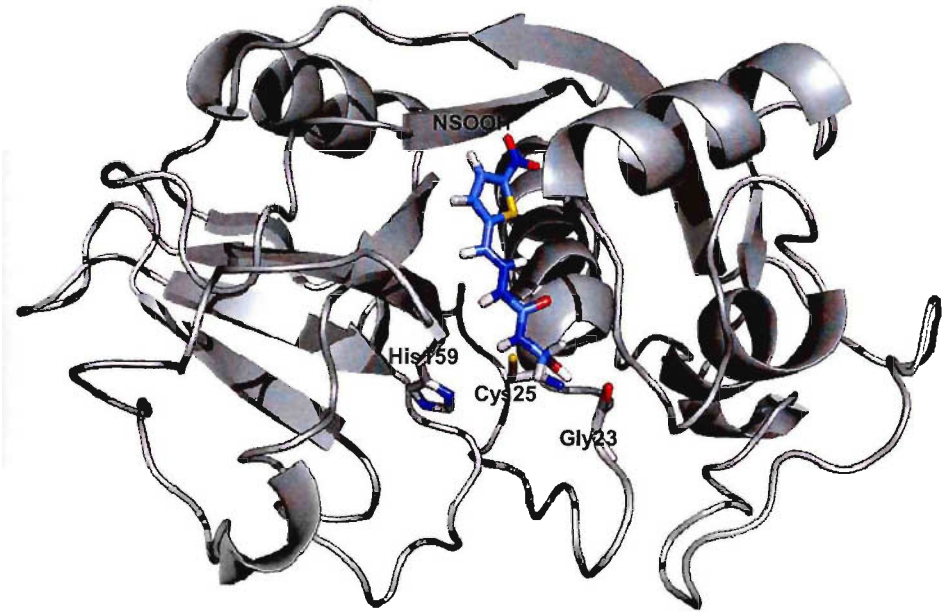


Figura 5.13 - *Docking* do NSOOH na estrutura da cruzaína.

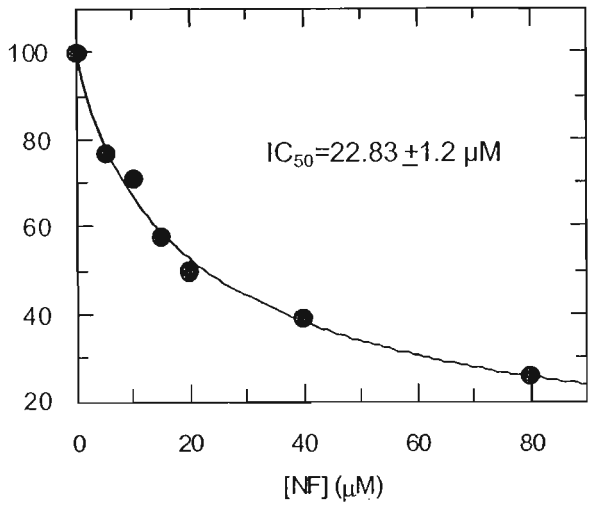
5.3.3 Ensaios biológicos

5.3.3.1 Ensaios de inibição da cruzaína

Os estudos da inibição enzimática foram realizados com o intuito de se avaliar o mecanismo de ação do NF e NFOH e de seus análogos sobre a cruzaína e, também, para a verificação do mecanismo de ação proposto por DU e colaboradores (2002), como sendo a interação do grupo (tio)semicarbazona com a Cys25 da cruzaína.

Os estudos da inibição da cruzaína foram realizados inicialmente com a determinação dos valores de IC_{50} para o NF e para o NFOH, para a verificação da possível inibição da cruzaína por esses compostos. Esse trabalho foi realizado com a colaboração do Dr. Alberto Malvezzi, do Laboratório de QSAR e Modelagem Molecular, IQ/USP. Para esta primeira parte do estudo utilizaram-se as seguintes concentrações dos dois compostos: 5, 10, 20, 40 e 80 μM. A utilização de ampla faixa de concentração do composto teve o objetivo de avaliar o potência destes compostos, visto não existirem relatos na literatura da atividade inibitória da cruzaína pelos mesmos.

Os resultados de inibição da cruzaína pelo NF e pelo NFOH mostram que esses compostos apresentam atividade inibitória , com os valores de IC_{50} de 22,83 $\pm$1,2 μM e 10,55 $\pm$0,81 μM, respectivamente, como pode ser observado na Figura 5.14. A maior atividade inibitória da cruzaína pelo NFOH corrobora os estudos de *docking* e de modelagem molecular realizados anteriormente. Esses resultados sugerem a maior interação do NFOH com a cruzaína, quando comparado com seu precursor NF. A interpretação das análises de *docking* também sugeriu a interação do grupamento hidroxila presente nos derivados hidroximetilados com a Ala30 da cruzaína, o que pode ser reforçado com os valores de atividade inibitória apresentados. No entanto, há necessidade de estudos mais acurados, como cristalografia de Raios X ou de interação por meio de RMN, para validação.



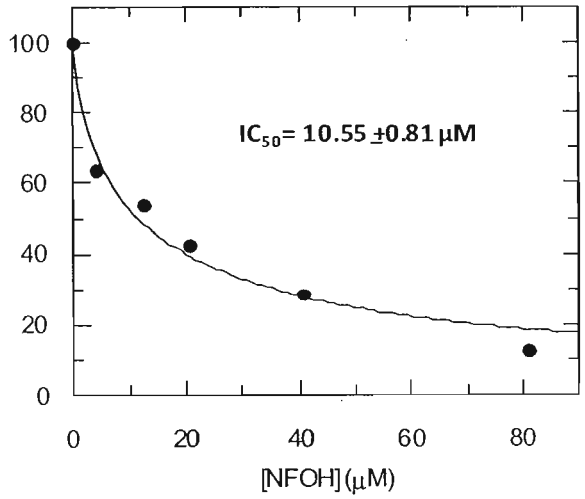


Figura 5.14 – Gráficos da determinação de inibição da cruzaína pelo NF e pelo NFOH, plotados para a determinação dos valores de IC_{50}.

Os análogos do NF (NS, NSO, NOS) e do NFOH (NS, NSO, NOS), foram submetidos a ensaios de inibição da cruzaína e os valores de IC_{50} obtidos. Esta parte da avaliação biológica dos análogos foi efetuada no departamento de Biofísica da UNIFESP, no laboratório do prof. Dr. Luiz Juliano, com a colaboração do Prof. Dr. Rodrigo L. O. R. Cunha.

O método utilizado foi o mesmo da primeira parte do trabalho, sempre com pré-incubação da enzima com os inibidores, por cinco minutos, seguida pela adição do substrato cloro-Z-benziloxi-fenilalanina-arginina aminometilcumarina (Z-FR-MCA). Este foi empregado em concentração adequada para que a enzima remanescente em cada medida estivesse em condição de $V_{máx}$, que foi de 5 μM (o K_M deste substrato para a cruzaína é de 0,6 μM (JUDACE *et al.*, 2001)). A Figura 5.15 apresenta o perfil de inibição da cruzaína para os seis análogos.

Os ensaios de inibição da cruzaína realizados indicam que todos os compostos derivados de (tio)semicarbazona apresentam atividade. O destaque foi dado para o composto NFSOH, que apresentou menor valor de IC_{50}, 2,71 μM. Esse resultado corrobora os estudos de modelagem molecular, os quais indicavam que a tiossemicarbazona presente neste composto é a mais favorável ao ataque pela Cys25 da cruzaína.

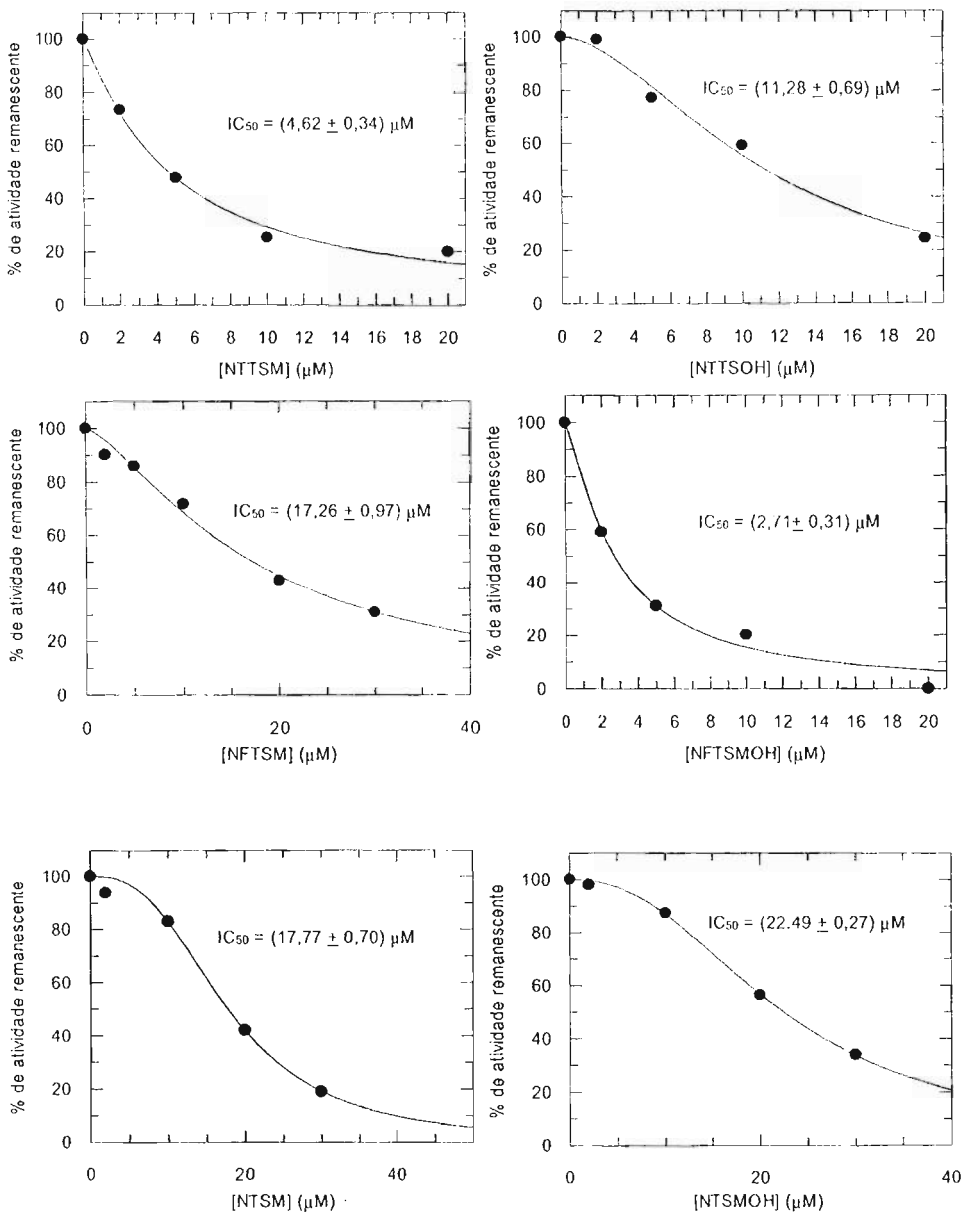


Figura 5.15 - Curvas dose-resposta para a inativação da cruzaína recombinante pelos análogos de NF e de NFOH.NTTSM = NS; NTTSMOH = NSOH; NFTSM = NFS; NFTSMOH = NFSOH; NTSM = NSO; NTSMOH = NSOOH.

Para verificar o mecanismo de inibição dos análogos de NF e de NFOH , se reversível ou irreversível há necessidade de se efetuar experimentos adicionais, que serão realizados em breve.

5.3 Conclusões

- Otimizou-se a síntese do NFOH por meio de planejamento fatorial 2^3, chegando-se a 85,5% de rendimento, utilizando-se 1:1,5 de NF: K_2CO_3, em 7 horas de reação;

- Os análogos bioisostéricos de NF foram obtidos com rendimentos de, de 80% a 92%;

- Os análogos bioisostéricos de NFOH foram obtidos com menores rendimentos, de 27% a 64%;

- Os estudos de modelagem molecular com os análogos bioisostéricos indicam as tiossemicarbazonas como mais disponíveis ao ataque nucleofílico da cys25 da cruzaína;

- Os resultados de *docking* com os análogos bioisostéricos e os protótipos NF e NFOH indicam melhor interação dos derivados hiudroximetilados com a cruzaína, devido à interação adicional da hidroxila com a Ala30 da enzima;

- Todos os análogos bioisostéricos e seus protótipos apresentaram atividade inibitória da cruzaína, sendo o mais ativo o derivado NFSOH, com IC_{50} de 2,71 μM;

- A elucidação do mecanismo de inibição dos derivados bioisostéricos e de seus protótipos conduz à necessidade de novos experimentos.

5.4 Referências bibliográficas

AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; FERNANDEZ, M.; GONZALEZ, M.;DENICOLA, A.; OTERO, L.; GAMBINO, D.; RIGOL, C.; OLEA-AZAR, C.; FAUNDEZ, M. *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.,* v.12, p. 4885-4893, 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, E. S.; BRUNS, R. E. 25 Anos de Quimiometria no Brasil.*Quim. Nova*, v.29, p.1401-1406, 2006.

BRUNS, R.E. CHEMOMATRIX [Programa computacional] (Laboratório de Campinas, SP) *www.chemomatrix.iqm.unicamp.br*, acessado em Julho de 2005.

CHUNG, M. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. T.; GÜIDO, R. V. C.; VARANDA, E. A.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and *in vitro* antichagasic activity of hydroxymethylnitrofurazone, a prodrug of nitrofurazone. *Bioorg. Med. Chem.,* v. 11, p. 4779-4783, 2003.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. The development and use of quantum-mechanical molecular-models .76. AM1 - a new general-purpose quantum-mechanical molecular-model. *J. Amer. Chem. Soc.,* v. 107, p.3902-3909, 1985.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med Chem.,* v. 45, p. 2695-2707, 2002.

FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Identification of a novel thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biol. Parasitol.*, v.14, p.187-198, 1985.

FRIIS, G. J.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U., eds. *A textbook of drug design and development.* Amsterdam: Harwood Academic, 1996. p. 351-385.

HENDERSON, G. B.; ULRICH, P.; FAIRLAMB, A. H.; ROSENBERG, I.; PEREIRA, M., SELA, M.; CERAMI, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione dissulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas´ disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, v. 85, p. 5374-5378, 1988.

JUDICE, W. A. S.; CEZARI, M .H.; LIMA, A. P. C. A.; SCHARFSTEIN, J., CHAGAS, J. R., TERSARIOL, I. L.; JULIANO, M. A., JULIANO, L. Comparison of the specificity, stability and individual rate constantaswith respective action parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinant from, cruzain, from *Trypanosoma cruzi. Eur. J. Biochem. (FEBS),* v. 268, p.6578-6586, 2001.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico Guanabara,* Ed.2007/2008, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 18.6-18.13.

LA-SCALEA, M. A.; MENEZES, C. M. D.; JULIAO, M. S. D.; CHUNG, M. C.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, E. I. Voltammetric behavior of nitrofurazone and its hydroxymethyl prodrug with potential anti-Chagas activity. *J. Braz. Chem. Soc.,* v. 16, p. 774-782, 2006.

MORENO, S.N.; MASON, R.P.; MUNIZ, R.P.A.; CRUZ, F.S.; DOCAMPO, R. Generation of free radicals from metronidazole and other nitroimidazoles by *Trichomonas foetus. J. Biol. Chem.*, v.258, p.4051-4054, 1983.

RANDO, D.G. *Quimioterápicos potencialmente ativos em endemias tropicais e tuberculose: estudos de QSAR na série de 5-nitroderivados bezidrazídicos e o planejamento de pró-fármaco de ação prolongada.* São Paulo, 2005 230p.[Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Chemometrics II: Spreadsheets for experimental design calculations, a tutorial. *Quim. Nova,* v. 29, p. 338-350, 2006.

TROSSINI, G. H. G.; MALVEZZI, A.; do-AMARAL, A. T.; MENEZES, C. M. S.; Chung, M.C.; FERREIRA, E. I. Cruzain inhibitory activity of hydroxymethylnitrofurazone. In: International Symposium on Drug Discovery and IX National Meeting of Medicinal Chemistry Professors, 2006, Araraquara, SP. International Symposium on Drug Discovery and IX National Meeting of Medicinal Chemistry Professors, 2006.

TROSSINI, G. H. G.; ROMEIRO, N. C.; MALVEZZI, A.; BRITO, C. L.; do-AMARAL, A. T.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E.J.; FERREIRA, E. I. Antichagásicos potenciais: estudo de docking e atividade inibitória de compostos na cruzaína (cruzipaína). In: 30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia, SP. 30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

TROSSINI, G. H. G. *Antichagásicos potenciais: Síntese de bases de Mannich do hidroximetilnitrofural,* 2004, 130 p. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

TROSSINI, G. H. G.; GIAROLLA, G. REZENDE, L.; DO-AMARAL, A. T.; ZAIM, M. H.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, E.I. Synthesis optimization of hydroxymethylnitrofurazone, a potential antichagasic candidate, using 3^2 factorial design. *Tetrahedron Lett.,* submetido, 2008.

WERMUTH, C.G. Molecular variations based on isosteric replacements. In: WERMUTH, C.G. (ED.) *The practice of medicinal chemistry,* 2 ed. London: Academic Press, 2003. p. 191-210.

WHO/TDR- Word Health Organization – *Special programme for research and training in tropical disease*, 2008. Disponível em: http://www.who.int/tdr/index.html. Acessado em: 23/07/2008.

Capítulo 6

Estudos de QSAR de potenciais antichagásicos derivados de (tio)semicarbazona

6. Estudos de QSAR de potenciais antichagásicos derivados de (tio)semicarbazona

Os estudos de Relações entre Estrutura Química e Atividade Biológica, do inglês *Qantitative Structure Activity Relationship, QSAR,* têm por objetivo relacionar a atividade de uma série de compostos e sua atividade biológica através da química computacional e da estatística. Os métodos de QSAR são amplamente aplicados em química medicinal, buscando novas entidades químicas a serem utilizadas como fármacos e predizendo sua atividade biológica (KUBINYI, 1993).

Os estudos de QSAR são realizados de forma comparativa entre as propriedades da série de compostos em estudo. Desta forma, é necessário que os compostos sejam quimicamente relacionados, ou seja ocupem o mesmo espaço químico, ao menos na série treinamento. Outro ponto crucial para os estudos de QSAR de qualidade é que a atividade biológica deve ser no mesmo alvo biológico e medida de forma padronizada e validada (ANDRICOPULO, MONTANARI, 2005).

Tendo em vista a necessidade de se avaliar o mecanismo de ação proposto por DU e colaboradores (2002), por meio do qual os compostos derivados de (tio)semicarbazona apresentaram atividade na cruzaína, desenvolveu-se trabalho de QSAR 2D e 3D para série desses 55 compostos. Tal estudo é importante para o entendimento da atividade biológica dos análogos de NF e NFOH apresentados anteriormente (capítulo 5).

Os estudos de QSAR foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo e com o Dr. Rafael V. C. Guido, do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

6.1 Material e Métodos

6.1.1 Material

- Computador PC Linux, processador AMD (64 MHz)
- Computador PC Windows (Dell XPS), processador Centrino (core dou 2)
- Série de compostos obtida da literatura (DU *et al.,* 2002).

6.1.2 Métodos

6.1.2.1 Estudos de QSAR

A base de dados utilizada para os estudos de QSAR foi composta de 55 compostos, tiossemicarbazonas e semicarbazonas, retirados da literatura com atividade inibitória da cruzaína determinada (DU *et al.,* 2002). Os valores de IC_{50} foram convertidos em pIC50 (-log IC_{50}) e usados como variáveis dependentes para as análises de QSAR. Os compostos foram divididos em série de treinamento, de 1-45 (Tabela I), e série de teste (Tabela II), de 46-55. Construíram-se as estruturas no programa Sybyl e estas foram minimizadas utilizando-se o campo de força Tripos (CLARK *et al.*, 1989).

Os estudos de QSAR foram divididos em duas etapas:

- *Primeira etapa*: estudos de QSAR 2D, compreendendo o estudo de QSAR clássico e o Holograma QSAR (HQSAR)
- *Segunda etapa*: estudos de QSAR 3D, por meio de COMFA e de COMSIA.

Tabela VI.1 – Inibidores de cruzaína, (tio)semicarbazonas, e respectivos valores de pIC_{50}, utilizados como série treinamento para estudos de QSAR

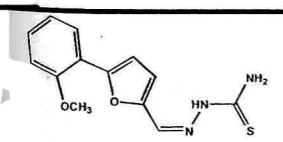
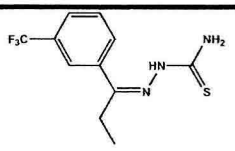
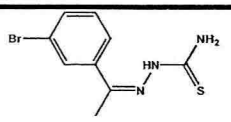
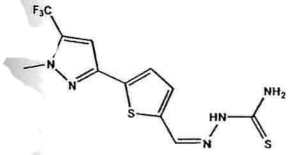
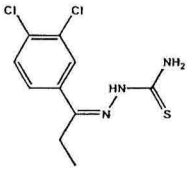
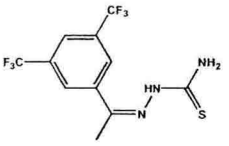
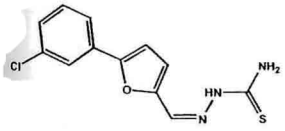
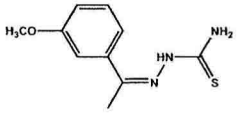
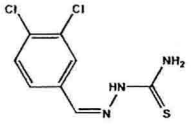
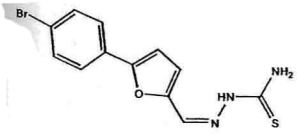
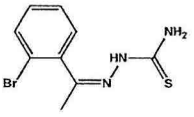
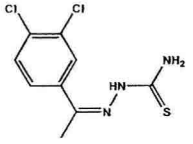
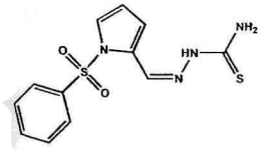
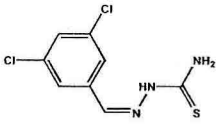
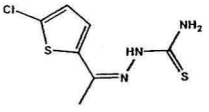
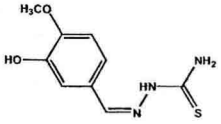
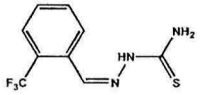
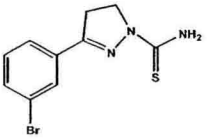
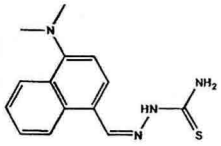
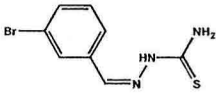
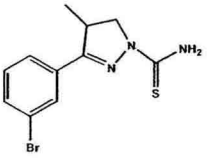
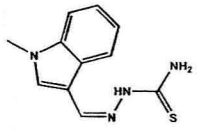
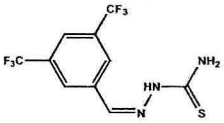
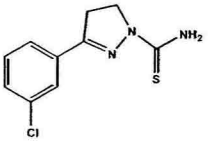
Série Treinamento								
Cpd	**Estrutura**	**pIC_{50}**	**Cpd**	**Estrutura**	**pIC_{50}**	**Cpd**	**Estrutura**	**pIC_{50}**
1		6,55	**9**		7,30	**`17**		6,70
2		5,15	**10**		7,70	**18**		7,22
3		6,85	**11**		5,00	**19**		6,34
4		6,55	**12**		5,41	**20**		7,30
5		5,55	**13**		6,25	**21**		5,72
6		5,00	**14**		5,00	**22**		6,70
7		5,00	**15**		5,89	**23**		7,10
8		5,55	**16**		6,49	**24**		6,57

Tabela VI.1 - Inibidores de cruzaína, (tio)semicarbazonas, e respectivos valores de pIC_{50}, utilizados como série treinamento para estudos de QSAR (cont.)

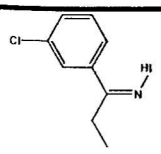
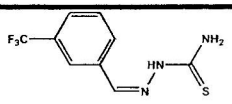
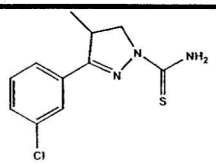
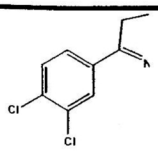
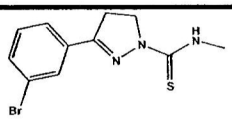
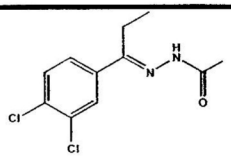
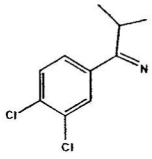
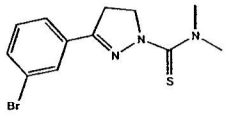
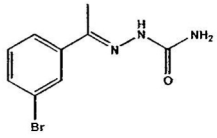
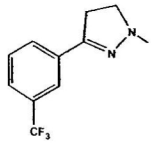
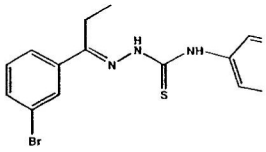
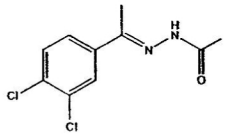
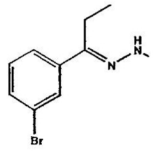
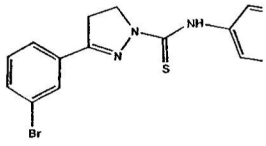
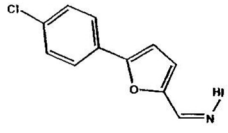
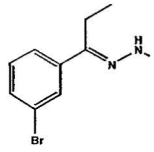
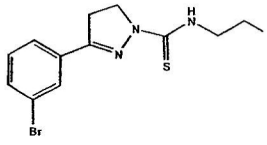
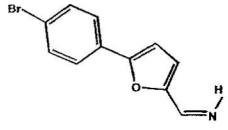
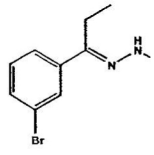
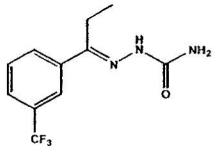
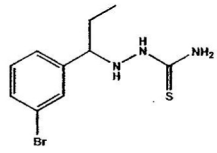
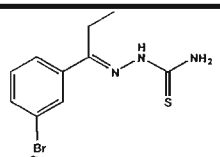
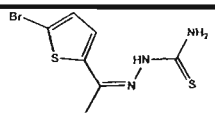
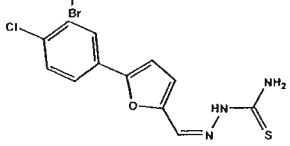
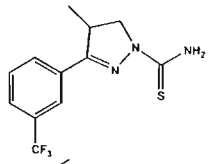
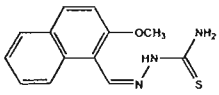
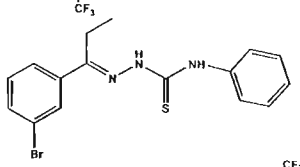
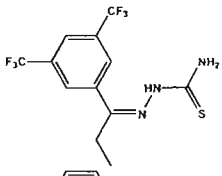
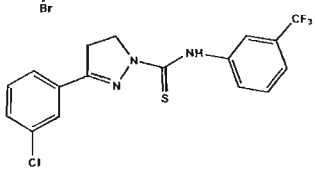
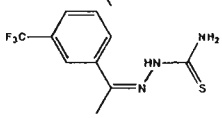
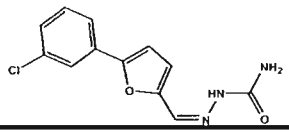
Série Treinamento								
Cpd	Estrutura	pIC_{50}	Cpd	Estrutura	pIC_{50}	Cpd	Estrutura	pIC_{50}
25		6,66	32		6,32	39		6,64
26		7,22	33		5,00	40		5,00
27		7,15	34		5,00	41		5,00
28		7,10	35		5,80	42		5,00
29		5,00	36		6,00	43		5,00
30		5,00	37		5,85	44		5,00
31		5,00	38		5,00	45		5,00

Tabela VI.2 - Inibidores de cruzaína, (tio)semicarbazonas, e respectivos valores de pIC_{50}, utilizados como série teste para estudos de QSAR

Série Teste					
	Estrutura	pIC_{50}	Cpd	Estrutura	pIC_{50}
46		7,00	**51**		5,42
47		6,52	**52**		7,40
48		6,25	**53**		5,00
49		7,70	**54**		5,77
50		6,77	**55**		5,00

6.1.2.1.1 Holograma QSAR - HQSAR

Os estudos de HQSAR foram realizados no programa SYBYL 7.3 (Tripos Inc.) em computador PC Linux (Red Hat 7.3 Linux). Basicamente, os modelos de HQSAR foram gerados a partir da combinação dos parâmetros do holograma: comprimento do holograma, tamanho e distinção do fragmento. Os parâmetros de distinção dos fragmentos considerados foram: Átomos (A), Ligações (B), Conectividade (C), Átomos de Hidrogênio (H), Quiralidade (Ch), e Doador & Aceptor de ligações de hidrogênio (DA). Realizaram-se todas as

combinações de parâmetros de distinção de fragmentos possíveis, gerando-se 16 modelos. Avaliou-se o melhor modelo construído. Outro ponto importante no estudo de HQSAR é o tamanho do fragmento para geração do melhor modelo de HQSAR e este fator foi avaliado utilizando-se seis tamanhos de fragmentos distintos (2–5, 3–6, 4–7, 5–8, 6–9 e 7–10). O comprimento do holograma (53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, e 401) que apresentou melhor modelo de HQSAR foi avaliado cruzando-se as informações (tamanho do fragmento) X (comprimento do holograma), utilizando a melhor combinação de parâmetro de distinção de fragmento. Geraram-se 6 modelos de HQSAR e avaliaram-se os mesmos quanto aos parâmetros estatísticos q^2 e r^2. Os modelos foram construídos para a série de treinamento (1-45), utilizando-se a análise de mínimos quadrados parciais, PLS*(Partial Least Squares)*, sendo validados para a série teste (46-55).

6.1.2.1.2 QSAR Clássico

Os estudos de QSAR clássico foram realizados utilizando-se os programas DRAGON 5.4 (Talette SRL, Milan, Italy), BuildQSAR e PIROUETTE 3.11 (Infometrix, Washington, USA). Calcularam-se os descritores moleculares 2D (topológicos, índice de conectividade, autocorrelação 2D, entre outros) no programa DRAGON 5.4 e estes foram utilizados como variáveis independentes nas análises de QSAR clássico. O programa DRAGON gerou 950 descritores moleculares, os quais foram submetidos a análise criteriosa, descartando-se aqueles de correlação menor que zero ou com correlações com a atividade biológica considerada inválida ($0,97>r^2<0,1$). Esta estratégia, utilizada como filtro, diminuiu o número de descritores moleculares para 247. Geraram-se, no programa BuildQSAR, modelos de Regressão Linear Múltipla (MRL) de até 4 variáveis através de algoritmo genético. O programa PIROUETTE 3.11 foi utilizado para a análise de PLS das 10 melhores Regressões Lineares Múltiplas (MLS) dos 247 descritores moleculares selecionados.

A. Validação dos modelos de QSAR 2D

Efetuou-se a análise dos modelos de QSAR 2D avaliando-se todos os r^2

(q^2) gerados pelo PLS - *cross-validation.* A validação dos modelos se efetuou por *Leave-one-out* (LOO). O *Leave-many-out* (LMO) foi aplicado com 10 (LMO10) ou 5 (LMO5) grupos selecionados e usado como teste mais rigoroso para avaliar a estabilidade e a significância estatística dos modelos. Cada corrida de validação foi repetida 25 vezes para obter valores médios para q^2. Validação externa foi conduzida empregando-se um conjunto de teste de 10 compostos, que não foram considerados para geração de modelos de QSAR.

6.1.2.1.3 Estudos de QSAR 3D

As análises de modelagem para QSAR 3D, cálculos e visualizações para CoMFA e CoMSIA foram realizadas no módulo QSAR no programa SYBYL 7.3 (Tripos Inc.). Os estudos foram realizados em estações de trabalho PC Linux. As estruturas 3D dos inibidores foram construídas e minimizadas usando-se parâmetros de padrão geométricos de *software* de modelagem molecular SYBYL (CLARK *et al.*, 1989]. As cargas atômicas parciais foram calculadas pelo método Gasteiger-Hückel (GASTEIGER, MARISILI, 1980).

O primeiro alinhamento das estruturas foi realizado ponto a ponto pela estrutura comum da série. Outro alinhamento das estruturas dos inibidores foi baseada nas conformações de menor energia obtidas pelo *docking* das estruturas utilizando-se os programas FLexX e GOLD. Os dados cristalográficos da cruzaína, cujo pdb codifica 1ME4, foram utilizados para a simulação de *docking.* O sitio ativo *para o docking* foi definido como todos os resíduos de aminoácidos em um raio de 8,0 Å ao redor do ligante cristalizado com a enzima. As conformações de menor energia foram selecionadas e realizaram-se análises para a construção do alinhamento e estudo de QSAR 3D.

As análises de CoMFA e CoMSIA foram executadas no módulo QSAR do programa SYBYL 7.3. Realizaram-se os estudos de CoMFA, utilizando-se *probe* sp3 aplicando parâmetros *default* do programa SYBYL (campo de força TRIPOS, constante dielétrico1/r, *cut off* 30 kcal/mol).

As análises de CoMSIA foram computadas para os fatores estéricos, eletrostático, hidrofóbico e ligações de hidrogênio, usando *probe* de carga +1, raio de 1, hidrofobicidade e ligações de hidrogênio +1 e fator de atenuação 0,3

para a Gaussiana da distância-função dependente. Os valores de pIC50 foram utilizados como de campo usando SAMPLS (BUSH, NACHBAR, 1993), em uma análise de validação cruzada (LOO). Determinou-se, em seguida, o número favorável de componentes e realizou-se análise de PLS com validação cruzada. Cada validação cruzada foi repetida 25 vezes para obter valores médios para q^2.

Realizaram-se várias corridas com o intuito de se obter um bom modelo estatístico. Os intervalos de confiança para cada termo foram estimados para tal procedimento, gerando medida independente e dando estabilidade para o modelo de PLS (CRAMER *et al.*, 1988; WEHRENS, VANDERLINDEN, 1997). Os mapas de CoMFA e CoMSIA foram gerados e interpretados a partir dos produtos entre os coeficientes de PLS e as divergências normais dos valores de descritores correspondentes. A validação externa foi realizada com um conjunto teste de 10 moléculas, que não foram consideradas para a geração dos modelos de QSAR 3D. Depois de geração dos modelos de PLS da série de treinamento, realizou-se a predição das variáveis dependentes da série teste, validando-se os modelos.

6.2 Resultados e discussão dos estudos de QSAR

6.2.1 QSAR

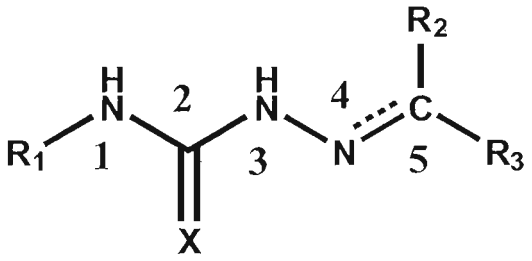
Uma vez determinada a necessidade de se estudar as relações entre a estrutura química e a atividade biológica e, conseqüentemente, o mecanismo de ação, efetuou-se treinamento em técnicas de QSAR 2D (clássico, HQSAR) e 3D (CoMFA e CoMSIA).

Os estudos de QSAR permitiram ter acesso a várias técnicas utilizadas para interpretação da relação estrutura-atividade da série escolhida de derivados de (tio)semicarbazona (DU *et al.*, 2002), cujo mecanismo de ação proposto é análogo àquele sugerido para os derivados de NF e de NFOH sintetizados. Estes estudos forneceram a base teórica para a interpretação, também, do mecanismo de inibição da cruzaína por estes derivados.

Sabe-se que o mecanismo de ação dos inibidores e o mecanismo de

clivagem catalítica da cruzaína se dá pela interação e ataque nucleofílico do grupo SH do resíduo de Cys25 (AGUIRRE *et al.,* 2004). Estudos de relação estrutura-atividade podem vir a auxiliar no entendimento do mecanismo de ação de novos ligantes com potencial atividade como inibidores da cruzaína. Tendo como base a estrutura peptídica dos pró-fármacos propostos, estudos de relação estrutura-atividade podem, também, vir a auxiliar no entendimento do mecanismo de clivagem da ligação fármaco-peptídio presente nos pró-fármacos, além da possibilidade da inibição da cruzaína por esses compostos ou parte deles formada após a clivagem.

Os modelos de QSAR foram gerados com dados de 55 derivados de tiossemicarbazonas e semicarbazonas com atividade inibitória da cruzaína apresentados nas Tabelas 6.1 e 6.2 (DU *et al.,* 2002). A série escolhida se mostrou interessante por apresentar variedade estrutural significativa e cobrir as condições mínimas para a realização de um estudo de QSAR. Os valores de IC_{50} da série se apresentavam medidos nas mesmas condições experimentais e foram transformados em pIC_{50} (-log IC_{50}). Esses valores se apresentam distribuídos de forma aceitável para os valores de propriedade, com potência entre 20 e 10.000 nM.



X = S,O

Figura 6.1 - Estrutura geral de tiossemicarbazonas e semicarbazonas.

A geração de modelos estatisticamente consistentes depende da adequação da série treinamento, a qual treina o modelo para se obter boa predição para a série teste. Essa predição é utilizada como validação externa do modelo. Para os modelos de QSAR separaram-se uma série treinamento de 45 compostos (1-45) e uma série teste de 10 compostos (46-55).

6.2.1.1 QSAR 2D

6.2.1.1.1 HQSAR

Os estudos de QSAR 2D foram realizados por dois métodos: o método clássico de QSAR e o método de holograma QSAR (HQSAR). Após a finalização dos estudos de QSAR 2D foi escrito e aceito para publicação o artigo ***"Structure-activity relationships for a class of selective inhibitors of the major cysteine protease from* Trypanosoma cruzi"** (GUIDO *et al.*, 2008).

O método de HQSAR é dependente das estruturas 2D dos compostos e de dados de atividade biológica. Neste estudo, as estruturas moleculares foram minimizadas utilizando campo de força Tripos (CLARK *et al.*, 1989) no programa SYBYL 7.3. Utilizaram-se as estruturas 3D dos compostos porque o método de HQSAR, apesar de ser bidimensional, avalia a importância da quiralidade das estruturas.

Como já descrito, os parâmetros utilizados para a geração dos fragmentos foram: tipos de átomos (A), Ligações (B), Conectividade (C), Átomos de Hidrogênio (H), Quiralidade (Ch), e Doador & Aceptor de ligações de hidrogênio (DA). Realizaram-se as análises efetuando-se a combinação entre esses parâmetros da seguinte forma: A/B, A/B/C, A/B/C/H, A/B/C/H/Ch, A/C, A/C/Ch, A/C/DA, A/C/H/Ch, A/C/Ch/DA, A/B/H, A/B/C/Ch, A/B/DA, A/B/C/DA, A/B/H/DA, A/B/C/H/DA e A/B/H/Ch/DA. Utilizando o *default* do programa com fragmentos de tamanho entre 4-7 e utilizando todos os tamanhos de holograma do *default* do programa (53-401), geraram-se modelos para todas as combinações de descritores sugeridas. Essas variações foram realizadas visando avaliar se o programa teria boa resposta à série proposta e qual seria a melhor combinação de parâmetros que geraria o melhor modelo de HQSAR. O *default* gerou 16 modelos, que foram aplicados para a série de treinamento. Como pode ser observado na Tabela 6.3, o modelo que apresentou melhor ajuste estatístico foi o que utilizou como fator de distinção de fragmentos A/C/Ch/DA apresentando valores de q^2=0,72 e de r^2=0,94.

Tendo-se em vista que a combinação dos parâmetros de fragmentos A/C/Ch/DA apresentou o melhor modelo estatístico, realizou-se a variação do

tamanho dos fragmentos visando à obtenção do melhor modelo de QSAR e uma ótima predição da atividade biológica para a série proposta. Variou-se o tamanho dos fragmentos de 3 em 3 átomos como o *default* do programa (2–5, 3–6, 4–7, 5–8, 6–9 e 7–10). Os resultados das análises de PLS são apresentados na Tabela VI.4. Pode-se observar que o melhor modelo gerado como fragmentos de tamanho em 6-9 átomos, modelo 21, apresenta bons parâmetros estatísticos (q^2 = 0,75 e r^2 = 0,96).

Tabela VI.3 - Análise de HQSAR para os varias distinções de fragmentos e suas combinações e seus parâmetros estatísticos*

Modelo	Parâmetros de fragmentos	q^2	r^2	SEE	HL	PC
1	A/B	0,45	0,83	0,39	307	6
2	A/B/C	0,54	0,87	0,35	401	6
3	A/B/C/H	0,49	0,88	0,33	353	6
4	A/B/C/H/Ch	0,57	0,88	0,33	353	6
5	A/C	0,41	0,79	0,44	199	6
6	A/C/Ch	0,41	0,83	0,38	353	6
7	A/C/DA	0,24	0,49	0,65	97	3
8	A/C/H/Ch	0,38	0,73	0,49	151	4
9	**A/C/Ch/DA**	**0,72**	**0,94**	**0,23**	**353**	**6**
10	A/B/H	0,41	0,86	0,36	401	6
11	A/B/C/Ch	0,56	0,84	0,38	53	6
12	A/B/DA	0,27	0,52	0,64	83	4
13	A/B/C/DA	0,26	0,50	0,65	307	3
14	A/B/H/DA	0,52	0,80	0,42	353	5
15	A/B/C/H/DA	0,53	0,82	0,40	353	6
16	A/B/H/Ch/DA	0,67	0,92	0,27	151	6

*Análises realizadas para os 45 compostos da série treinamento (1-45) utilizando tamanho de fragmento 4-7 (default). SEE (*standard error of estimate*); HL (*Hologram Lengths*); PC (*principal components*)

Tabela VI.4 - Análise de HQSAR avaliando a influência de diferentes tamanhos de fragmento e seus parâmetros estatísticos*

Distinção do Fragmento	Modelo	Tamanho do Fragmento	q^2	r^2	SEE	HL	PC
A/C/Ch/DA	**17**	2-5	0,67	0,86	0,36	59	6
	18	3-6	0,70	0,92	0,26	307	6
	19	4-7	0,71	0,94	0,23	353	6
	20	5-8	0,73	0,95	0,21	353	6
	21	**6-9**	**0,75**	**0,96**	**0,20**	**401**	**6**
	22	7-10	0,73	0,95	0,22	401	6

*Análises realizadas para os 45 compostos da série treinamento (1-45) SEE (*standard error of*

estimate); HL (*Hologram Lengths*); PC (*principal components*)

A consistência estatística do modelo 21 foi avaliada por validação cruzada, utilizando-se grupos de 10 e 20% da série de treinamento. O modelo se apresentou constante, confirmando sua estabilidade estatística (Figura 6.2). Realizou-se, então, a predição de atividade para os compostos da série de teste (Tabela VI.5). Os resultados de predição de atividade se mostraram satisfatórios (95%).

O modelo de representação gráfica do HQSAR foi gerado utilizando-se como base a estrutura da molécula inibidora da cruzaína mais ativa da série, estrutura **10** da série treinamento. Como podem ser verificados no mapa (Figura 6.3), dois pontos de muita contribuição para a atividade biológica são o H ligado ao N3 e ao N4. Estes pontos sugerem a interação através de ligação de hidrogênio com resíduos do sítio receptor da cruzaína. A importância do enxofre (tiossemicarbazona) é ressaltada (em amarelo) no mapa de interpretação gráfica do modelo de HQSAR, corroborando o mecanismo de ação proposto por DU e colaboradores (2002). O C5 é, também, ponto de contribuição para a atividade biológica. Essa importância se atribui aos substituintes alquila nesta posição, como pode ser visto nos compostos 9 e 10, que apresentam boa atividade biológica, quando comparados com os compostos 14 a 18.

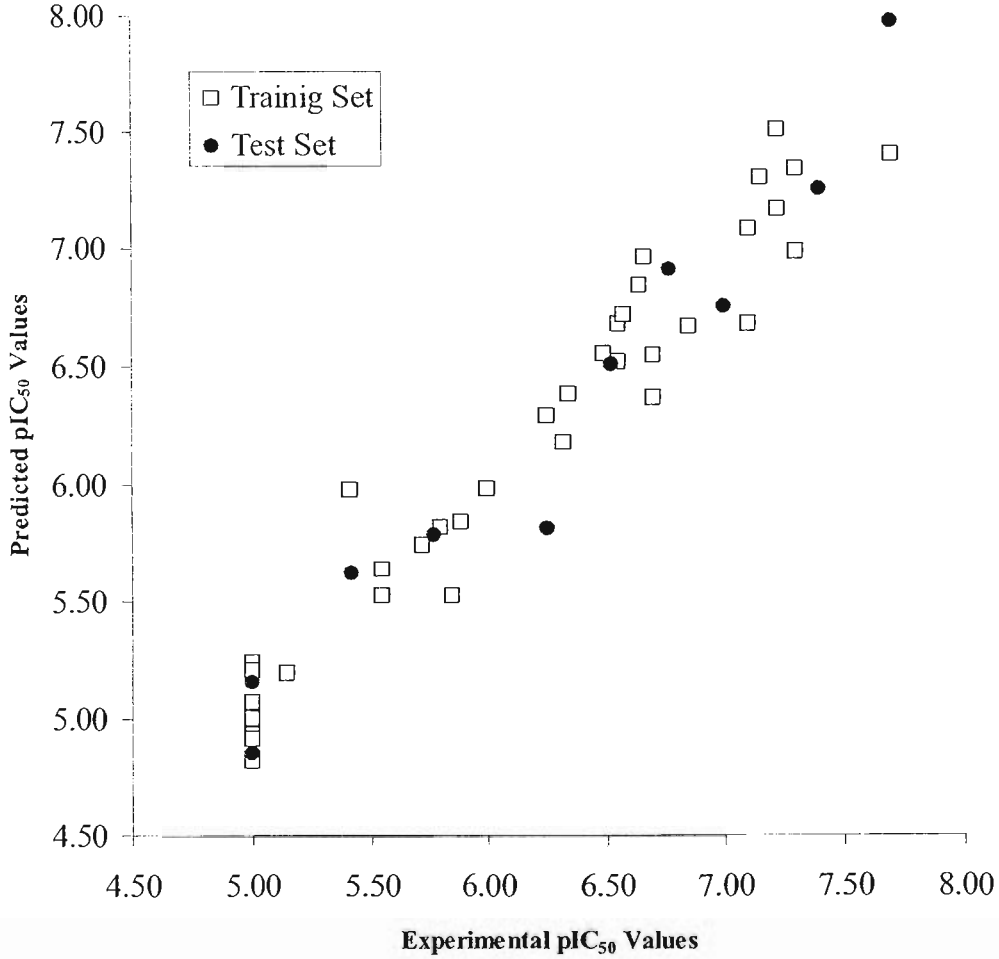


Figura 6.2 – Gráfico dos valores da predição *versus* valores de pIC_{50} experimental obtidos para o melhor modelo de HQSAR. Quadrado aberto: série de treinamento; circulo fechado: série teste.

Tabela VI.5 - Valores da atividade biológica experimental e predita e o resíduo para a série teste na análise de HQSAR

Compostos		HQSAR	
	Experimental (pIC_{50})	Predito (pIC_{50})	Resíduo
46	7,00	6,75	0,25
47	6,52	6,51	0,01
48	6,25	5,81	0,44
49	7,70	7,97	-0,27
50	6,77	6,91	-0,14
51	5,42	5,62	-0,20
52	7,40	7,25	0,15
53	5,00	4,85	0,15
54	5,77	5,78	-0,01
55	5,00	5,15	-0,15

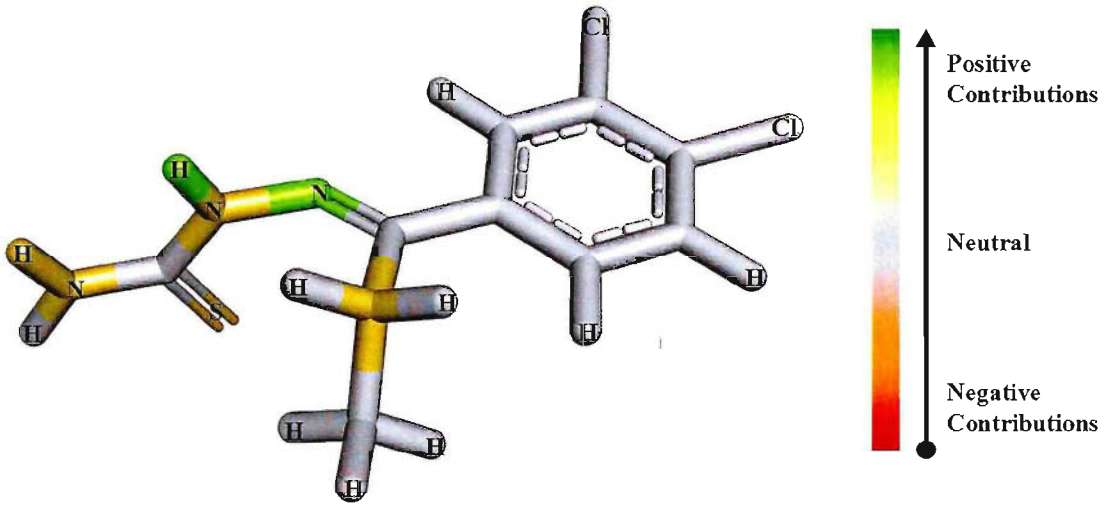


Figura 6.3 - Representação gráfica do modelo de HQSAR, mostrado na estrutura do composto 10 da série de inibidores de cruzaína (contribuições negativas=vermelho; contribuições positivas=amarelo ou verde).

6.2.1.1.2 QSAR clássico

A relação dos métodos de QSAR clássico e HQSAR em estudo de relação entre estrutura química e atividade biológica vem sendo reportada na literatura atual (CASTILHO *et al.*, 2007 a,b; FERREIRA *et al.*, 2007). Com base em tais trabalhos e com o intuito de obter mais suporte ao estudo de relação estrutura-atividade da série de inibidores da cruzaína realizou-se o estudo de QSAR clássico (2D).

Os estudos de QSAR clássico requerem a geração de descritores moleculares, que avaliam matematicamente a estrutura química e a atividade biológica. Os descritores utilizados neste trabalho foram gerados no programa DRAGON 5.4, que resultou em total de 950 descritores moleculares. Optou-se pela geração de descritores do tipo: 2D-topológicos (avaliam a topologia da molécula); 2D-**Burden eigenvalue** (descritores obtidos a partir da matriz de adjacência, quando os elementos nulos da diagonal são substituídos por características atômicas como massa atômica, volume de van der Waals, eletronegatividade e polarizabilidade); **2D-*walk* e *path* counts** (avaliam as representações gráficas das moléculas); **2D-autocorrelação** (representam valores de uma única variável entre átomos em nível 2D); **2D-índice de conectividade** (avalia a conectividade depois da retirada de átomos de hidrogênio); **2D-índices de informação**, índice de carga topológica (calculados a partir dos elementos da matriz quadrada T, na qual linhas e colunas representam átomos); e ***2D-eigenvalue-based indices*** (descritores topológicos calculados a partir da matriz simétrica originada da representação gráfica da molécula). Tais descritores foram submetidos à análise criteriosa, descartando-se aqueles de correlação menor que zero ou com correlações com a atividade biológica considerada inválida ($0,97>r^2<0,1$). Esta estratégia foi utilizada como filtro de modo a diminuir o número de variáveis e realizar o estudo de QSAR clássico com os descritores moleculares que realmente representassem influência na atividade biológica. Após esta abordagem de filtro o número de descritores moleculares diminuiu para 247, o que foi considerado um bom número para gerar os modelos de QSAR clássico.

Prosseguiram-se os estudos no programa BuildQSAR, gerando os modelos de Regressão Linear Múltipla (MRL) de até 4 variáveis através de

algoritmo genético, utilizando-se os descritores gerados no programa Dragon e previamente selecionados. O protocolo do algoritmo genético foi aplicado para geração de 50 indivíduos e avaliado por 2.000.000 de gerações, com 10% de mutação. Com este procedimento buscou-se avaliar todas as possibilidades de combinações (*cross-over*) e com isso se avaliou a influência de cada descritor molecular. Para um resultado mais robusto e modelos mais confiáveis selecionaram-se os 10 melhores modelos de MRL e avaliaram-se os descritores neles presentes. Essa estratégia gerou 12 descritores líderes, os quais foram escalados por ordem de influência e usados para o cálculo de análise de componentes principais (PCA) e análise de PLS no programa PIROUETTE 3.11.

A análise de PCA considerou variância de 91% total e os outros 9% como irrelevantes. A análise gráfica do de PCA indicou que a maioria das características moleculares pode ser satisfatoriamente descrita e todos os inibidores se apresentaram distribuídos ao longo da PCA. Estes resultados sugerem que os descritores moleculares selecionados poderiam ser usados para gerar um modelo de QSAR. Deste modo, o modelo de PLS QSAR foi gerado, utilizando-se o procedimento de validação cruzada *leave-one-out* (LOO). O melhor modelo gerado para a série de treinamento apresentou boa correlação (q^2 = 0,72 e r^2 = 0,83). A estabilidade e robustez do modelo foram avaliadas pelos procedimentos de validação cruzada *leave-many-out* (LMO). Em ambos os casos, nenhuma diferença significativa foi obtida (q^2_{10} = 0,71, com $SDEP_{10}$ = 0,52; e q^2_5 = 0,69, com $SDEP_5$ = 0,54). A habilidade de predição da atividade biológica pelo modelo foi avaliada para a série teste (compostos 46-55), demonstrando significância estatística de 95% (Tabela 6.6) (Figura 6.4). Esses resultados indicam que o modelo de QSAR clássico pode ser utilizado como ferramenta no planejamento de novos derivados de tiossemicarbazona e semicarbazona com potencial atividade inibidora de cruzaína.

TabelaVI.6 - Valores da atividade biológica experimental e predita e o resíduo para a série teste na análise de QSAR clássico

Compostos		QSAR Clássico	
	Experimental (pIC_{50})	Predito (pIC_{50})	Resíduos
46	7,00	6,59	0,41
47	6,52	6,60	-0,08
48	6,25	6,52	-0,27
49	7.70	7,53	0,17
50	6.77	6,75	0,02
51	5.42	5,62	-0,20
52	7.40	6,98	0,42
53	5.00	4,93	0,07
54	5.77	6,35	-0,58
55	5.00	4,97	0,03

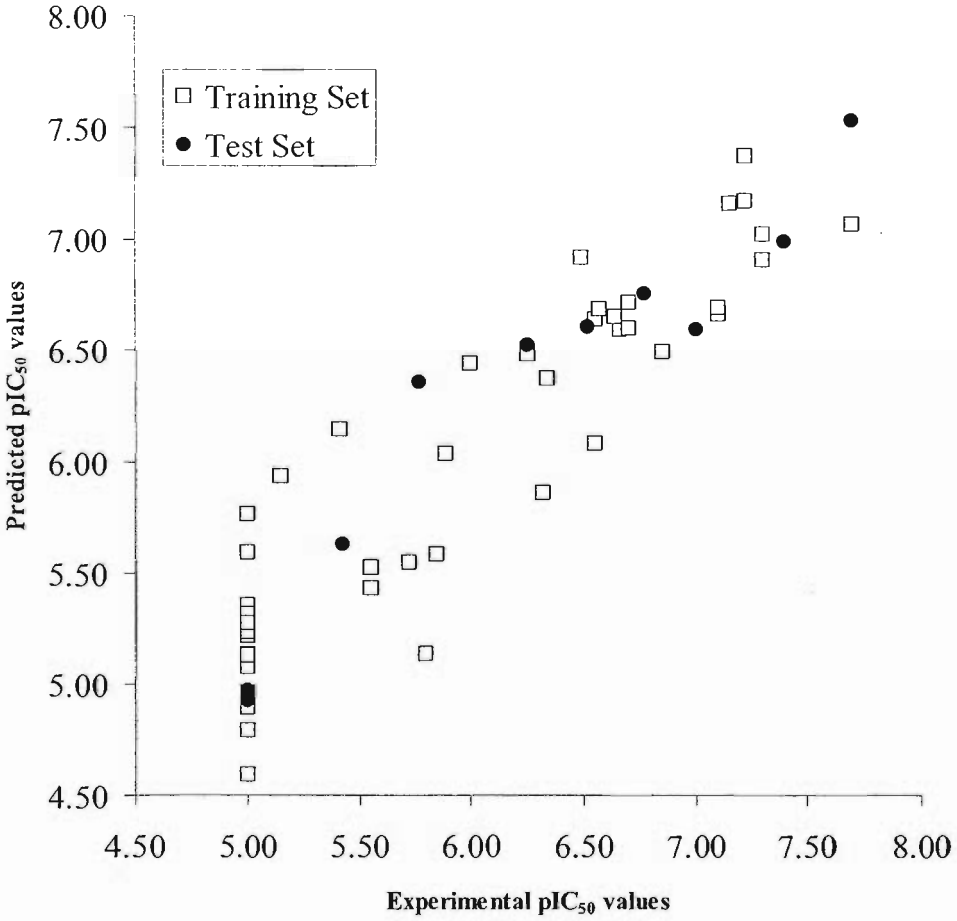


Figura 6.4 – Gráfico dos valores da predição *versus* valores de pIC_{50} experimental obtidos para o modelo de QSAR clássico. Quadrado aberto: série de treinamento; circulo fechado: série teste.

6.2.1.1.3 QSAR 3D

Os estudos de QSAR 3D, utilizando-se os métodos CoMFA e CoMSIA foram realizados para a série de tiossemicarbazonas e semicarbazonas apresentadas anteriormente nas Tabelas VI.1 (série treinamento) e VI.2 (série teste), utilizando-se como parâmetro dependente atividade biológica (pIC_{50}). As estruturas construídas no programa Sybyl foram minimizadas, utilizando-se o campo de força Tripos (CLARK *et al.,* 1989), corrigindo os ângulos e distâncias de ligação, de modo a adquirir bons modelos de estrutura. Realizou-se o cálculo das cargas parciais dos ligantes, pelo método de Gasteiger-Hückel (GASTEIGER, MARISILI, 1980), verificando-se, manualmente, a concordância dos cálculos computacionais com os valores teóricos de literaturas para os átomos de cada uma das moléculas da série.

Um alinhamento das estruturas dos inibidores da cruzaína da série em estudo foi realizado, em um primeiro momento, pela estrutura comum, ou seja, pelos átomos e ligações comuns a todas as moléculas da série (alinhamento 1). Porém, este alinhamento não se mostrou ideal devido à estrutura comum ser pequena. Visando à obtenção de melhores alinhamentos das estruturas, realizou-se o *docking* das estruturas da série na estrutura cristalizada da cruzaína (pdb=1ME4), utilizando-se os programas GOLD e FLexX. Em seguida, as conformações de menor ΔG de ligação foram isoladas. Realizou-se, por meio ΔG de ligação dos inibidores obtida, o alinhamentos das estruturas, tanto para o conjunto obtido pelo *docking* no programas GOLD como no programa FLexX. Optou-se por utilizar o alinhamento gerado pelo programa FLexX por este apresentar maior similaridade entre as conformações de mínima energia (ΔG) obtida para os ligantes (alinhamento 2) (Figura 6.5). É importante ressaltar que a maioria das 55 estruturas submetidas ao programa FlexX, em sua estrutura de menor ΔG, se posicionaram com o grupamento (tio)semicarbazona próximos e em posição favorável para o ataque nucleofílico da Cys25 e a estabilização da ligação pela His159 da cruzaína (Figura 6.6), corroborando o mecanismo de ação proposto para esses compostos (DU *et al.,* 2002).

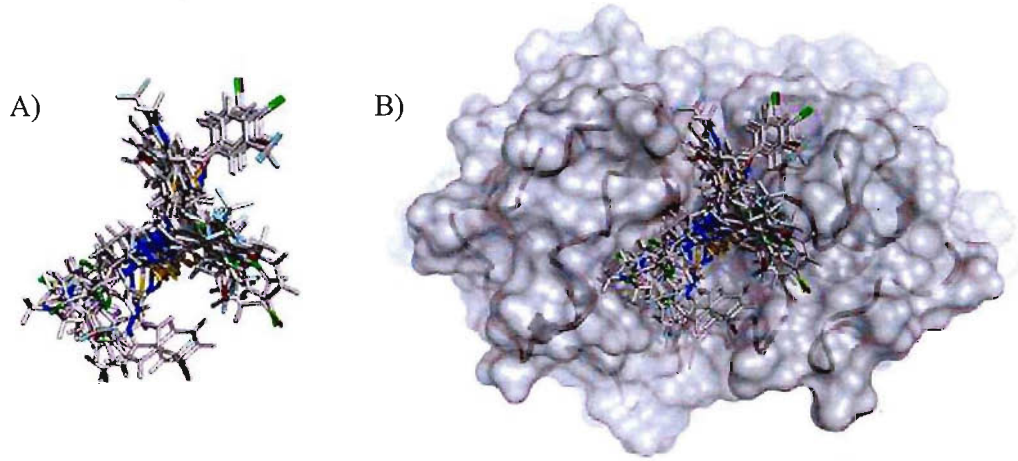


Figura 7.5 - Alinhamento do das moléculas do *data set* nas conformações de menor ΔG obtidas no *docking* utilizando o programa FlexX , alinhamento 2. (A) Alinhamento das estruturas. (B) Alinhamento das estruturas no sítio ativo da cruzaína.

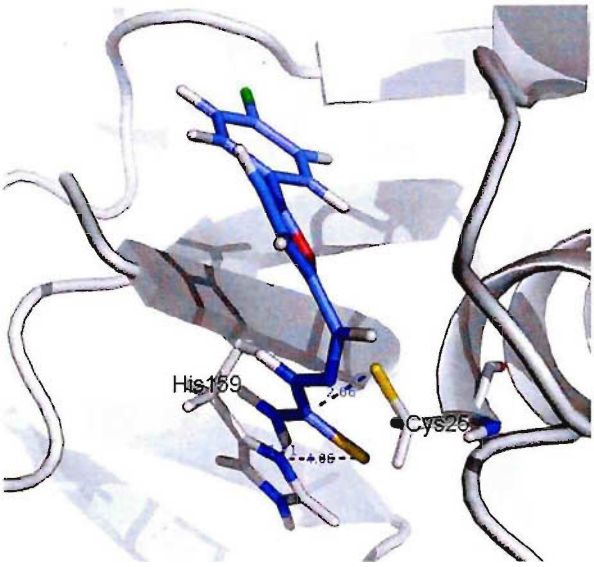


Figure 7.6 - *Docking* do composto **47** da série de teste na sua conformação de menor ΔG de ligação com a cruzaína (pdb: 1ME4). Este resultando mostra o grupo tiossemicarbazona próximo a Cys25 e Hist159, sugerindo o mecanismo de ação proposto.

Os modelos de CoMFA foram obtidos por cálculos de PLS nos dois alinhamentos obtidos por estrutura comum (alinhamento 1) e pelo *docking* no programa FLexX (alinhamento 2). O primeiro modelo gerado para o alinhamento 1 apresentou coeficientes estatísticos bons, q^2= 0,71, com boa predição de atividade para novos compostos, resultados obtidos para 5 componentes de importância. O valor de r^2=0,85 indica que o modelo apresenta razoável correlação entre a atividade biológica e os parâmetros da estrutura química estudados. Já o modelo de CoMFA construído para o alinhamento 2, realizado através dos confôrmeros de estruturas obtidos pelo *docking* utilizando o programa FlexX, foi gerado utilizando-se 6 componentes de importância e apresentando validação estatística considerada ótima. Este modelo apresentou boa capacidade de predição (q^2=0,78) e ótima correlação entre estrutura química e atividade biológica (r^2=0,95).

Devido aos resultados obtidos, optou-se pela geração dos mapas de contribuições eletrostática e estérica de CoMFA a partir do alinhamento 2. Os mapas de contribuições estéricas e eletrostáticas são apresentados na Figura 6.7. As contribuições estéricas (Figura 6.7A) apresentam contornos verdes na posições 2 e 3 do anel benzílico, o que significa contribuições estéricas favoráveis nestes posições. Em contrapartida, na posição 5 do anel benzílico pode ser observado contorno amarelo, que representa contribuição desfavorável nesta posição. Esse resultado sugere que grupos volumosos são favoráveis à atividade biológica apenas em uma das duas posições *orto*, a posição 2. Outro contorno de contribuição estérica favorável é observado próximo ao grupo alifático etila, sugerindo que substituições nesta posição são favoráveis para atividade biológica. Os mapas de contribuição eletrostáticas (Figura 6.7B) apresentam poliedros azuis ao redor dos substituintes no grupo alifático, (tio)semicarbazona, sugerindo potenciais positivos próximos à amina do grupo (tio)semicarbazona e, também, dois contornos próximos à (tio)carbonila corroborando o mecanismo de ataque nucleofílico à Cys25 da cruzaína. Contorno vermelho, indicando contribuição positiva com potencial eletrostático negativo pode ser observado na posição 2 do anel benzílico.

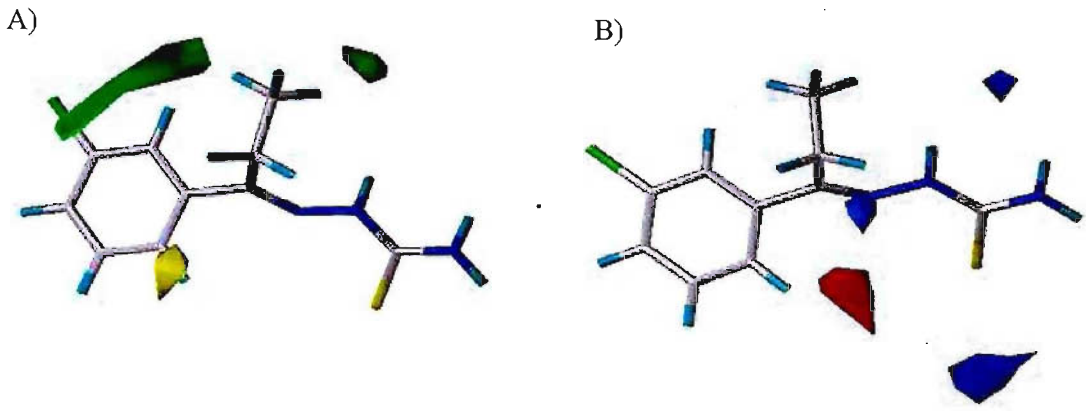


Figura 6.7- Mapa de contribuições de CoMFA representado na estrutura do composto 46 da série teste. A) estérica (Verde = presença de grupos volumosos favorável; Amarelo = desfavorável para volume); B) eletrostáticas, (Azul = potencial positivo favorável; Vermelho= potencial negativo favorável).

As análises de CoMSIA foram realizadas para o alinhamento 2, obtido a partir dos confômeros de estruturas resultantes do *docking* pelo programa FLexX. Consideraram-se nas análises de CoMSIA realizadas as contribuições estéricas, eletrostáticas, hidrofóbicas. As contribuições de ligações de hidrogênio (doadores e aceptores) foram consideradas não importantes para o modelo gerado, representando menos de 2% das contribuições. Aplicando-se o PLS, gerou-se modelo com 6 componentes de contribuição, que apresentou parâmetros estatísticos favoráveis com boa capacidade de predição (q^2=0,73) e ótima correlação entre os parâmetros avaliados e a atividade biológica (r^2=0,91). Verificaram-se, também, os valores estatísticos muito próximos aos obtidos para a análise de CoMFA, mostrando similaridade e confiabilidade em ambos os modelos gerados. A Tabela VI.7 apresenta os resultados estatísticos dos modelos de CoMFA e CoMSIA.

Tabela VI.7 – Resultados estatísticos de CoMFA e CoMSIA

Modelo	Q^2	*N*	r^2	S.E.E	*F*	Contribuição (%)		
						St	El	HY
CoMFA Alinhamento 1	0,71	5	0,84	0,276	59,876	57	43	___
CoMFA Alinhamento 2	0,78	6	0,95	0,186	170,302	54	46	-----
CoMSIA Alinhamento 2	0,73	6	0,91	0,292	65,111	26	25	48

Os mapas de contribuição eletrostática obtidos do CoMSIA são apresentados na Figura 6.8. Os mapas de CoMSIA corroboram os resultados de CoMFA e complementam o estudo de relação estrutura-atividade 3D. Observam-se dois grandes poliedros azuis ao redor do grupo (tio)semicarbazona (=N-NH) e outro contorno azul próximo à (tio)carbonila, indicando o favorecimento de potencial positivo nestas regiões. Em especial, o mapa próximo à (tio)carbonila indica a possibilidade de ataque nucleofílico, em concordância com o mecanismo de ação sugerido. Os contornos vermelhos, que indicam favorecimento de potencial eletrostático negativo para atividade biológica, são observados nas mesmas regiões dos contornos azul, porém em menor intensidade, indicando superposição dos campos com favorecimento de potencial positivo. As contribuições hidrofílicas (Figura 6.8 B) apresentam dois campos amarelos ao redor do anel benzílico (posições 3 e 5), sugerindo a presença de grupos lipofílicos nessas regiões. Pode-se observar, também, a presença de um contorno amarelo próximo ao grupo etila, sugerindo que grupos lipofílicos, nesta posição, são favoráveis para a atividade biológica. Em contra partida, próxima ao substituinte etila, pode-se, ainda, observar um campo cinza, que indica o desfavorecimento por parte de grupos lipofílicos. Esses resultados sugerem a interferência do estereoisomerismo na atividade biológica desta série de compostos.

Os mapas de contribuição estérica de CoMSIA (Figura 6.8 C) corroboram com os resultados de CoMFA e com os mapas de contribuição lipofílica de CoMSIA. Dois contornos verdes podem ser observados na região alifática da molécula indicando o favorecimento de grupos volumosos nesta

região. Um contorno amarelo pode ser observado na região contrária aos contornos verdes, indicando novamente a importância da esteroisomeria para a atividade biológica na série de compostos estudada.

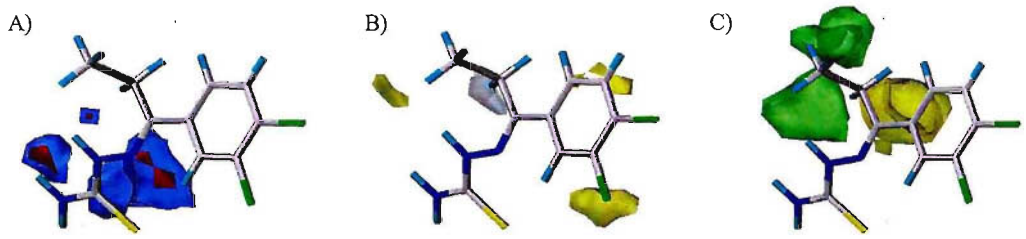


Figure 6.8 - Representação dos mapas de contribuição de CoMSIA mostrados no composto 10 da série de treinamento. (A) eletrostático (azul=potencial positivo favorável; vermelho=pontencial negativo favorável; (B) hidrofóbico (amarelo= favorável; branco=desfavorável; (C) estérico (verde=favorável; amarelo=desfavorável).

A capacidade preditiva para os modelos de CoMFA (alinhamento 2) e CoMSIA foi avaliada para a série de teste compostos de 46 a 55, Tabela VI.2, e é apresentada na Tabela VI.8. A predição para os compostos da série teste se comportou de forma idêntica à predição para os compostos da série de treinamento, como pode ser observado nas Figuras 6.9 e 6.10.

A predição de pIC_{50} para o método CoMFA é considerada boa, com todos os valores de variação abaixo de uma unidade log. A maioria dos compostos apresenta variações abaixo de 0,44 unidade log , tendo o composto 48 da série de teste valor de 0,86 unidade logarítimica de variação. Também nos modelos de CoMSIA considera-se a predição boa, com valores de variação para maioria dos compostos abaixo de uma unidade log. Porém, o composto 48 se comportou como *outlier* apresentando valor de variação de 1,44 em relação à atividade biológica experimental. Esses resultados indicam que os modelos de CoMFA e de CoMSIA são modelos consistentes e robustos e podem ser utilizados para o planejamento de novos compostos com atividade inibitória da cruzaína.

Tabela VI.8- Valores de atividade biológica(pIC_{50}) experimental e preditos pelos modelos de CoMFA e CoMSIA para os compostos da série de teste

		CoMFA		CoMSIA	
Compostos	**Experimental**	**Predito**	**Residual**	**Predito**	**Residual**
46	6,52	6,96	-0,44	6,59	-0,07
47	7,00	6,89	0,11	6,97	0,03
48	6,25	5,39	0,86	4,81	1,44
49	7,30	6,93	0,37	6,50	0,80
50	6,77	6,92	-0,15	7,03	-0,26
51	5,42	5,73	-0,31	5,53	-0,11
52	7,10	7,08	0,02	7,00	0,10
53	5,00	4,80	0,20	5,61	-0,61
54	5,77	5,95	-0,18	6,29	-0,52
55	5,00	5,34	-0,34	5,38	-0,38

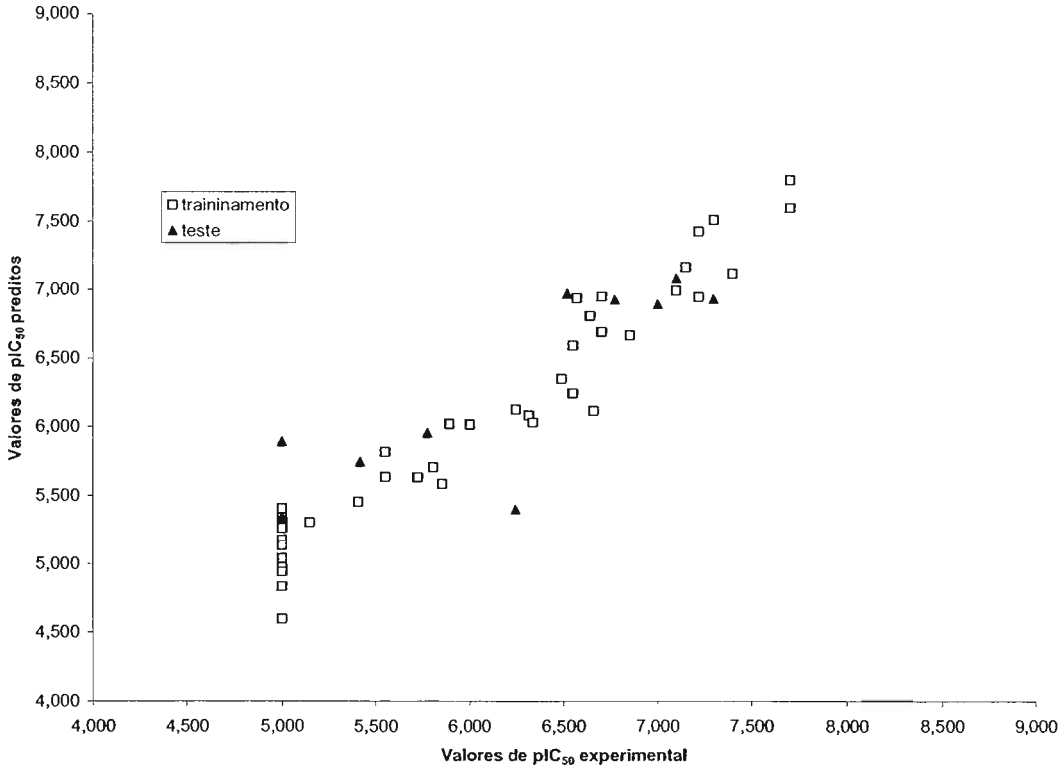


Figura 6.9 - Gráfico dos valores de atividade biológica (pIC_{50}) experimental *versus* preditos para a série de treinamento (quadrado aberto) e para a série de teste (triângulos pretos) dos compostos da série de inibidores da cruzaína no modelo de CoMFA.

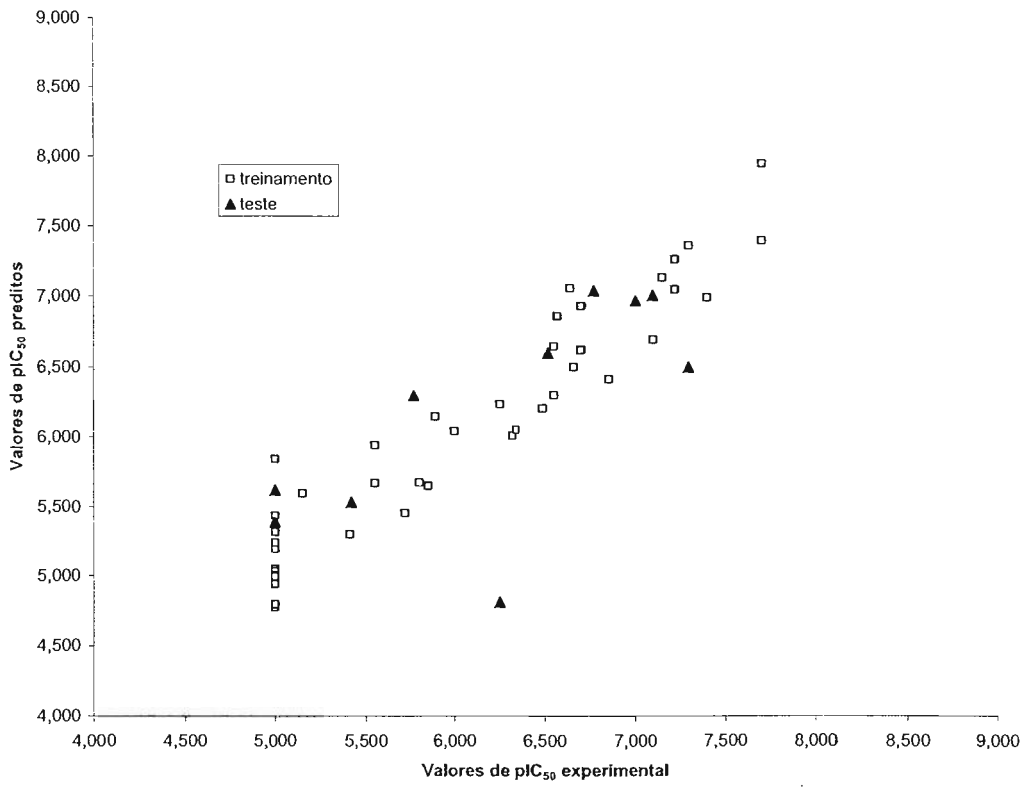


Figura 6.10 - Gráfico dos valores de atividade biológica (pIC_{50}) experimental *versus* preditos para a série de treinamento (quadrado aberto) e para a série de teste (triângulos pretos) dos compostos da série de inibidores da cruzaína no modelo de CoMSIA.

6.3 Conclusões

- Os estudos de QSAR 2D e 3D com série de compostos derivados de (tio)semicarbazona extraída da literatura (DU *et al.*, 2002) apresentaram resultados satisfatórios.

- As técnicas de QSAR 2D (Clássica e HQSAR) se mostraram coerentes e complementares na elucidação da relação estrutura-atividade para a série estudada. Os valores de q^2 e r^2 obtidos para os dois métodos (HQSAR, q^2=0,75 e r^2=0,96; QSAR clássico q^2=0,72 e r^2=0,83) demonstram a consistência e a capacidade de predição dos modelos.

- Os estudos de QSAR 3D (CoMFA e CoMSIA) se mostraram coerentes com os resultados biológicos da série;

- O alinhamento obtido por *docking* utilizando o programa FlexX (alinhamento 2) se mostrou mais eficiente para a geração dos modelos de QSAR 3D;

  Os valores estatísticos consistentes, no que se refere à robustez e predição, obtidos pelo alinhamento 2 (CoMFA q^2=0,78 e r^2=0,95, e CoMSIA q^2=0,73 e r^2=0,91) indicam esses modelos como ótima opção para planejamento de novos inibidores da cruzaína

6.4 Referências Bibliográficas

AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; FERNANDEZ, M.; GONZALEZ, M.; DENICOLA, A.; OTERO, L.; GAMBINO, D.; RIGOL, C.; OLEA-AZAR, C.; FAUNDEZ, M. *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.*, v.12, p.4885-4893, 2004.

ANDRICOPULO, A. D.; MONTANARI, C. A. Structure-activity relationships for the design of small-molecules inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* v. 5, p. 585-593, 2005.

BUSH, B.L.; NACHBAR, R.B., Sample-Distance Partial Least-Squares - PLS Optimized for many variables, with application to CoMFA. *J. Computer-Aided Mol. Design,* v.7, p. 587-619, 1993.

CASTILHO, M.S.; GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D. (a) 2D Quantitative structure activity relationship studies on a series of cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Bioorg.. Med. Chem.*, v.15, p.6242-6252, 2007.

CASTILHO, M.S.; GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.(b) Classical and hologram QSAR studies on a series of tacrine derivatives as butyryleholinesterase inhibitors. *Lett. Drug Des. Discov.*, v.4, p.106-113, 2007.

CLARK, M., CRAMER, R.D., VANOPDENBOSCH, N., Validation of the General-Purpose Tripos 5.2 Force-Field. *J. Comp. Chem.*, v.10, p.982-1012, 1989.

CRAMER III, R. D.; PATTERSON, D. E.; BUNCE, J. D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 110, p. 5959-5967, 1988.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med Chem.*, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

FERREIRA, L. G; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A; ANDRICOPULO, A. D. Hologram quantitative structure-activity relationships for a class of inhibitors of HIV-1 protease. *Lett. Drug. Des. Discov.*, v.4, p.356–364, 2007.

GASTEIGER, J.; MARISILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity: a rapid access to atomic charges.*Tetrahedron*, v.36, p. 3219-3222, 1980.

GUIDO, R.V.C.; TROSSINI, G.H.G.; CASTILHO, M.S.; OLIVA, G.; FERREIRA, E.I.; ANDRICOPULO, A.D. Structure-activity relationships for a class of selective inhibitors of the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* (**DOI:** 10.1080/14756360701810322), 2008.

KUBINYI, H., Ed. *3D QSAR* in *drug design. Theory, methods and applications.* Leiden: *ESCOM*, 1993. 759p.

WEHRENS, R.; VANDERLINDEN, W.E. Bootstrapping principal component regression models. *J. Chemometrics*, v.11, p.157-171, 1997.

Capítulo 7

Planejamento de fármacos com base na estrutura da cruzaína

7. *Planejamento de fármacos com base na estrutura da cruzaína*

O planejamento de fármacos com base na estrutura do receptor, do inglês *Structure Based Drug Design (SBDD),* se mostrou como uma alternativa para a busca de moléculas biotivas, tendo em vista os resultados aquém da expectativa, obtidos pelo método que envolve HTS (*High-Throughput Screening)* e química combinatória. Estes envolviam produção e ensaio em massa de moléculas, não resultando, porém, na introdução de tantos fármacos na terapêutica quanto o esperado (KLEBE, 2006).

O SBDD utiliza como ferramenta fundamental o método de triagem virtual de moléculas bioativas, tendo como base o conhecimento detalhado do alvo terapêutico e de seus componentes espaciais e energéticos. Esse método utiliza como ferramenta de trabalho bases de dados de moléculas, *softwares* e computadores, não precisando de enormes gastos com robos para realizar os ensaios em massa, necessários no método de HTS (KLEBE, 2006; GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2008).

Sendo a cruzaípaína enzima essencial para o desenvolvimento e diferenciação do parasita e, também, no processo invasivo e na modificação da reposta imune do hospedeiro, esta cisteína-protease mais abundante se apresenta como excelente alvo bioquímico para novos antichagásicos (DEL NERY *et al.*, 1997). Sua forma recombinante expressada em *E. colli, apresenta* e estrutura cristalográfica de ótima resolução (1,2 Å) para ser utilizanda como alvo terapeutico no planejamento racional de novos fármacos. A cruzaína, forma recombinante da cruzipaína, ainda é disponível para ensaios biológicos e validação de possíveis compostos ativos em *T. cruzi.*

Considerando-se a disponibilidade de estruturas cristalográficas de boa qualidade da cruzaína (HUANG, BRIEN, ELLMAN, 2003) e também de referências de potentes inibidores desta enzima (DU *et al.,* 2002; AGUIRRE *et al.*, 2004; JAISHANKAR *et al.,* 2008; MALVEZZI *et al.,* 2008;), optou-se por buscar novos ligantes com potencial atividade nesta enzima, utilizando o SBDD. Esse estudo também foi apoiado na estrutura dos ligantes cristalizados com as estruturas das proteínas, utlizando-se a metodologia de desenvolvimento de fármacos com base na estrutura do ligante (*Ligand Based Drug Design-LBDD).*

Esses estudos foram realizados em estágio no Exterior, no período de outubro de 2007 a fevereiro de 2008, na University of New Mexico, sob a orientação do prof. Dr. Tudor I. Oprea e com a colaboração do Dr. Andrei Leitão.

7.1 Material e métodos

7.1.1 Material

7.1.1.1 Computadores

- Computadores PC Linux, processador AMD (64 MHz)
- Computador PC Windows (Dell XPS), processador Centrino (core duo 2)

7.1.1.2 Softwares

- Sybyl 7.3 (Tripos.inc)
- GOLD (*GOLD - Protein-Ligand Docking*) 4.0 (GlaxoSmithKline.inc),
- DeepView (GlaxoSmithKline R&D)
- Weblab ViewerLite (Accelrys)
- PYMOL Viewer (Delano Scientific LLC)
- Babel 3.3 (Open Eye)
- Omega 2.2.1 (Open Eye)
- Vida (Open Eye)

7.1.1.3 Banco de dados

- Protein Data Bank (PDB)
- Wombat 2006.2
- CHEMDIV (2007)

7.1.2 Métodos

7.1.2.1 Seleção e alinhamento das estruturas das cisteíno-proteases

Visando à busca de compostos com seletividade pela cruzipaína realizou-se estudo para geração de modelo farmacofórico específico. Esse trabalho foi realizado comparando-se estruturas das seguintes cisteíno-proteases: cruzipaína, catepsina K, catepsina L e falcipaína. As estruturas cristalográficas das cisteíno-proteases (cruzipaína: 1AIM, 1EWL, 1EWP, 1EWO, 1EWP, 1F29, 1F2A, 1F2B, 1F2C, 1ME3, 1ME4, 1U9Q, 2AIM; falcipaína: 1YVB, 2GHU; catepsina k: 1MEM, 1TU6, 1VSN, 2AUX, 2AUZ, 2R6N; e catepsina L: 1ICF, 1MHW, 2NQD) foram extraídas do *Protein Data Bank* (http://www.pdb.org). As estruturas de todas as cisteíno-proteases foram avaliadas quanto à qualidade dos modelos utilizando as ferramentas de visualização da densidade eletrônica e gráfico de Ramachandran disponíveis no *site* http://www.pdb.org. Após esse procedimento, as seqüências FASTA, de cada grupo de enzima, foram alinhadas de modo a avaliar possíveis mutações e comprometimento no estudo. As enzimas que apresentaram mutação que comprometiam o sítio ativo foram excluídas. Após a exclusão das estruturas que pudessem comprometer o molelo farmacofórico, todas as estruturas de cisteíno-proteases foram alinhadas utlizando-se o programa SwissPDBviewer v.3.7.

O próximo passo do trabalho foi realizar a separação dos ligantes cristalizados com as enzimas. Esse procedimento foi realizado no programa Sybyl 7.3 e resultou na geração de dois grupos de trabalho: 1 - estruturas das enzimas sem ligantes; 2 - ligantes na conformação em que foram cristalizados. Após separação, as estruturas das enzimas que apresentavam deformação no sítio ativo foram excluídas.

7.1.2.1.1. GRID/GOLPE

Os cálculos dos campos de importância foram realizados para os dois grupos de trabalho, enzimas e ligantes, utlilizado-se o programa GRID v.22. Esse precedimento foi realizado inicialmente para os ligantes com o objetivo de

determinar a caixa de *grid* a ser utilizada no estudo das estruturas das enzimas. As sondas utilizadas para os cáculos no programa GRID v.22 foram: H_2O (hidrofílica, HBA e HBD), Dry (lipofílica), C3 (cabono sp^3), C2 (carbono sp^2), N1 doador de ligação de hidrogênio (HBD), aceptor de ligação de hidrogênio (HBO) e S1 (S=).

Tais cálculos aplicados às estruturas das enzimas realizaram-se utilizando sondas iguais às empregadas no estudo dos ligantes com uma caixa de *grid* de 22 Å x 25 Å x 22 Å e espaçamento da grade de 1 Å. Após o cálculo dos campos de importância para cada uma das sondas realizaram-se estudos de análise do componente principal (PCA) e consenso de análise do componente principal (CPCA) por meio de cálculos efetuados no programa GOLPE v.4.5 (PIRARD, MATTER, 2006).

7.1.2.1.2. Geração do modelo farmacofórico

Para a geração do modelo farmacofórico, os campos moleculares gerados no estudo com método aplicado nos programas GRID/GOLPE foram visualizados e analisados utilizando-se o programa Sybyl 7.3. Esse processo foi efetuado comparando-se os campos moleculares de importância da cruzaína em relação às outras cisteíno-proteases -- falcipaína, catepsina K e catepsina L. Os campos moleculares de importância para os ligantes também foram avaliados. Após a análise, construiram-se três modelos farmacofóricos para a cruzaína no módulo UNITY do programa Sybyl 7.3. Em um primeiro modelo utilizaram-se as informações dos campos moleculares de importância para a cruzaína na construção de um moledo farmacofórico indicando pontos especificos para a enzima. Este modelo foi denominado modelo farmacofórico específico I (MFE I). O segundo modelo farmacofórico construído foi considerado não- específico, tendo afinidade apenas por três pontos. Teve por objetivo encontrar moléculas ativas na cruzaína, mas não necessáriamente específicas. O terceiro e último modelo farmacofórico construído foi considerado específico, sendo construído com base nos campos moleculares favoráveis à cruzaína e na experiência adquirida com o alvo a ser explorado. Esse modelo foi denominado modelo farmacofórico específico para a cruzaína II (MFE II).

7.1.2.1.3. Geração de banco de dados

Para a validação dos modelos farmacofóricos obtidos, geraram-se bancos de dados de estruturas químicas que apresentam atividade inibitória da cruzaína.

Para geração de todos os bancos de dados de estruturas foram realizados os seguintes passos:

1-baixar as estruturas no formato *smile* dos seus devidos sites;

2-transformar as estruturas em formatos reconhecidos pelo programa sybyl (.mol2).

Esse procedimento foi efetuado em duas etapas: primeiro, pelo uso do programa Babel 3.3 (Open Eye), gerando, assim, estruturas no formato *smile,* que verifica conformação 3D (.ism); e em um segundo passo, utilizando o programa Omega 2.2.1 (Open Eye), para converter as estruturas em formato 3D Sybyl (mol2). O programa Omega foi utlizado com o comando *–maxconfs 1,* que seleciona unicamente a conformação de menor energia para cada estrutura.

Os bancos de dados foram gerados a partir das seguintes bases de dados de estruturas químicas:

- WOMBAT: selecionaram-se as estruturas ativas na cruzaína;
- DU: empregaram-se estruturas já utilizadas nos estudos de QSAR 2D e 3D, em que a atividade inibitória da cruzaína é conhecida (DU *et al.,* 2002).
- CHEMDIV *(Chemical Discovery)*: essa base de dados é composta por cerca de 700.000 moléculas.

7.1.2.1.4. Avaliação dos modelos farmacofóricos

A avaliação e validação dos modelos farmacofóricos foi realizada por cálculo de reconhecimento das estruturas ativas ou inativas como inibidores da cruzaína no modulo UNITY do programa Sybyl 7.3. Os cálculos foram realizados para o bancos de dados WOMBAT com o modelo fáramacofórico específico da cruzaína. Outro estudo foi realizado com o banco de dados DU

no modelo farmacofórico simples, verificando-se a interação das moléculas com este modelo e validando o modelo farmacofórico não-específico para cruzaína.

Procedeu-se, ainda, à avaliação dos modelos farmacofóricos com as séries de compostos estudadas anteriormente nesse trabalho de doutorado: pró-fármacos (Arg-PQ, LysArg-PQ, PheAla-PQ, PheArg-PQ, NF-lysArg-PQ, NF-PheAla-PQ, NF-PheArg-PQ, NF-lysArg-NF, NF-PheAla-NF, NF-AlaPhe-NF e NF-PheArg-NF) e análogos de NF e de NFOH --- NF (NS, NSO, NOS) e do NFOH (NSOH, NSOOH, NOSOH). Para os pró-fármacos específicos para cruzaína, executou-se o cáculo no modelo farmacofórico específico, enquanto para os análogos de NF e NFOH os cálculos foram realizados no modelo farmacofórico não-específico.

7.1.2.1.5. Seleção das estruturas do CHEMDIV

A seleção das estruturas do banco de dados CHEMDIV composto por aproximadamente 700.000 moléculas foi realizada utilizando o modelo farmacofórico específico para cruzaína. Para todas as estruturas gerou-se a conformação 3D, utilizando-se o programa OMEGA.

No programa UNITY, utilizando o modelo farmacofórico específico, realizou-se a pesquisa no banco de dados CHEMDIV. O programa UNITY dispõe de filtros químicos, os quais, podem ser utilizados para a pesquisa em modelos farmacofóricos. Para esse trabalho os filtros aplicados foram: 1-massa molecular entre 300 e 700; 2-LogP calculado entre -2 a 5; 3-tipos de átomos H, C, N, O, F, Cl, Br, I, P e S; 4-doadores e aceptores de ligação de hidrogênio de 2-10; grupos aromáticos 0-6.

A pesquisa virtutal foi realizada para todo o banco de dados CHEMDIV, utilizando-se as conformações 3D das molécula. O resultado foi avaliado visalmente e submetido à pesquisa de *docking*.

7.1.2.1.7 *Docking*

Para as moléculas selecionadas na pesquisa envolvendo o modelo farmacofórico específico para a cruzaína e os filtros selecionados no programa UNITY, realzou-se o *docking* virtual na estrutura cristalografica da cruzaína. Com o intuito de selecionar os melhores compostos a serem testados na enzima, utilizou-se a função de *score GOLDSCORE.*

A estrutura cristalográfica da cruzaína utilizada no estudo foi a 1ME4, pelas razões previamente explicados. A estrutura foi preparada no próprio programa GOLD 4.0, no módulo *HERMES*, com exclusão do ligante, da água de solvatação e adição de carga. A preparação e a avaliação do processo de *docking* foi realizada utilizando-se o próprio ligante cristalizando com a enzima 1ME4 (T10). Para melhor avaliar o programa de *docking* e se a pose do ligante era valida foram realizados vários ciclos, modificando-se a função de *score* e dando liberdade de rotação para os resíduos Glu205, Gln19 e Hist158, resíduos, que se mostaram importantes na interação do ligante. A conformação de *docking* do ligante obtida foi comparada com a do ligante co-cristalizado, validando o método a ser utilizado para as moléculas selecionadas no modelo farmacofórico.

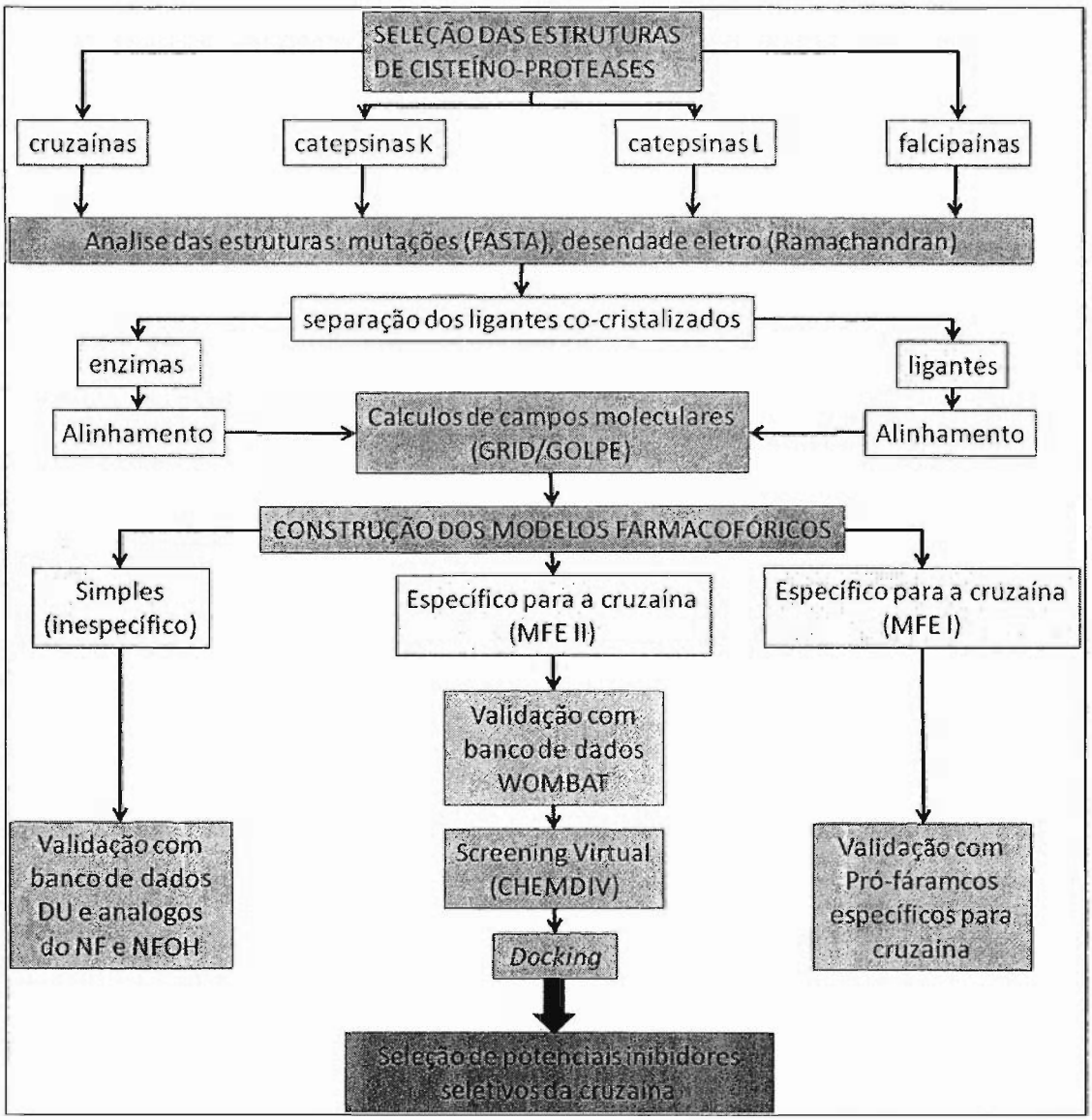


Figura 7.1 – esquema de metodologia empregada na pesquisa de inibidores seletivos pela cruzaína.

7.2 *Resultados e Discussão*

7.2.1 *Seleção e alinhamento das estruturas das cisteíno-proteases*

As cisteíno-proteases são abundantes em todos os organismos vivos. Em razão de que se elegeu a cruzipaína como alvo, é necessário que se busquem compostos seletivos para essa enzima.

Visando à consecução desse objetivo, realizou-se estudo para a geração de modelo farmacofórico específico. Esse trabalho de identificação da seletividade para cruzipaína foi realizado comparando-se estruturas das seguintes cisteíno-proteases: cruzipaína, catepsina K, catepsina L e falcipaína. As estruturas cristalográficas das cisteíno-proteases (cruzipaína: 1AIM, 1EWL, 1EWP, 1EWO, 1EWP, 1F29, 1F2A, 1F2B, 1F2C, 1ME3, 1ME4, 1U9Q, 2AIM; falcipaína: 1YVB, 2GHU; catepsina k: 1MEM, 1TU6, 1VSN, 2AUX, 2AUZ, 2R6N; e catepsina L: 1ICF, 1MHW, 2NQD) foram extraídas do *Protein Data Bank* (http://www.pdb.org).

Para a geração de um modelo farmacofórico consistente, todas as estruturas selecionadas foram avaliadas quanto à qualidade dos modelos. Esse trabalho foi realizado pela observação da densidade eletrônica dos aminoácidos que compõem toda a região do sítio atívo das proteínas e para esse processo utilizou-se um raio de corte de 10 Å.

Outra ferramenta empregada foi o gráfico de Ramachandran para a observação das corretas posições e conformações dos resíduos de aminoácidos. A análise da seqüência FASTA foi realizada por grupo verificando-se mutações nos aminoácidos que compunham o sítio ativo das proteínas, o que poderia comprometer o modelo desenvolvido. Mediante essa análise, as estruturas da 1AIM, 1TU6, 1MEM, 2VSN e 1YUB foram excluídas. Após a exclusão das estruturas que pudessem comprometer o modelo farmacóforico, todas as estruturas de cisteíno-proteases foram alinhadas, utlizando-se o programa SwissPDBviewer v.3.7, e como base a estrutura 1ME3 da cruzaína, por apresentar boa defenição. Todos os alinhamentos apresentaram valor de *Root Mean Square* (RMS) próximo a 1, demostrando que as estruturas são semelhantes e apresentam ótimo alinhamento.

A separação dos ligantes cristalizados com as enzimas foi realizada no

programa Sybyl 7.3 gerando dois grupos de trabalho, cisteíno-proteases com e sem ligantes. Novamente, foi necessária a análise da conformação dos residuos de aminoácidos do sítio ativo, verificando-se a deformação das estruturas (1USN, 2NQD e 1MHW), que foram excluídas.

7.2.1.1. GRID/GOLPE

Utilizou-se o programa GRID v.22, para realizar os cálculos de campos de importância para os dois grupos de trabalho, enzimas e ligantes. Inicialmente, calcularam-se os campos de importância para o conjunto dos ligantes, de modo a determinar a caixa de *grid,* 22 Å x 25 Å x 22 Å, com espaçamento da grade de 1 Å. Com o intutito de avaliar todas os campos de interação importantes utilizaram-se as sondas H_2O (hidrofílica, HBA e HBD), Dry (lipofílica), C3 (cabono sp^3), C2 (carbono sp^2), N1 - doador de ligação de hidrogênio (HBD), O - aceptor de ligação de hidrogênio (HBO) e S1 (S=) para os cálculos dos campos de importância dos ligantes e das enzimas.

A análise do componente principal (PCA) e consenso de análise do componente principal (CPCA) foram efetuadas por meio de cálculos realizados no programa GOLPE v.4.5 (PIRARD, MATTER, 2006), de modo a verificar a importância de cada sonda para o modelo construído e, também, para a verificação através da Análise consensual dos Compentes Principais (*Consenso Consensus Principal Conponent Analyses-CPCA*) dos campos comuns para cada uma das sondas. Deste modo, verificou-se que a sondas Dry, possuíam pouca representatividade, cerca de 5%, e estariam prejudicando o modelo, o que levou à sua exclusão. Tendo em vista a semalhança na padronização das sondas C2 e C3 e melhor separação com o uso da sonda C2, optou-se por um modelo mais simples, excluindo-se a C3. O novo modelo de PCA/CPCA foi gerado com as sondas H_2O (hidrofílica, HBA e HBD), C2 (carbono sp^2), N1- doador de ligação de hidrogênio (HBD) e O - aceptor de ligação de hidrogênio (HBO).

Na análise do novo modelo PCA gerado para as enzimas, verificou-se a ótima distribuição dos grupos de enzimas em relação à PC1 e PC2, como pode ser observado na Figura 7.2.

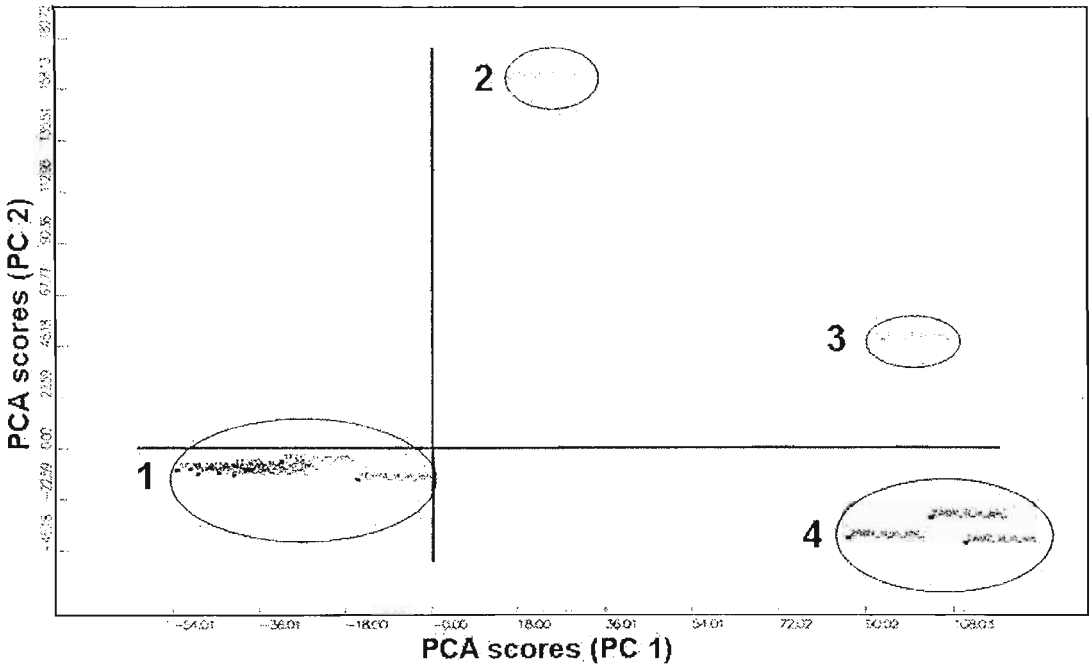


Figura 7.2 – Resultados do gráfico do PCA para as cisteíno-proteases, sendo: 1- cruzipaína, 2-falcipaína, 3-catepsina L, e 4-catepsina K.

O método de CPCA foi empregado para verificar o consenso entre os componentes principais e a avaliação dos campos de importância calculados. Estes foram avaliados para a cruzaína em relação às outras cisteíno-proteases estudadas.

Os resultados dos campos de importância para a cruzipaína em relação às outras cisteíno-proteases são apresentados nas Figuras de 7.3 a 7.5.

Na análise dos campos de importância calculados pela sonda H_2O, que avalia o favorecimento da interação de grupos que possam formar ligação de hidrôgênio, observa-se essa condição para a cruzaína, em amarelo, nos sub-sitios S2 e S3 em todas as análises. Verificam-se, também para essa sonda, campos amarelos , indicando favorecimento para cruzaína S1', quando avaliada em relação à falcipaína. A sonda C1, carbono sp^2, apresenta campos favoráveis à cruzipaína nos sub-sitios S2 e S3 em todas as análises.

É importante ressaltar que no sub-sítio S2 já era esperado esse resultado, visto ser bolso descrito como lipofílico. Também, pelos resultados de

docking apresentados anteriormente, nos quais grupos lipofílicos, como o anel aromático da Phe, nos pró-fármacos, e os anéis furânicos e/ou tiofênicos, nos anáogos de NF e NFOH, apresentaram afinidade por esse sub-sítio. Os resultados obtidos para os cálculos utilizando sonda N1, grupos doadores de ligação de hidrogênio, indicam favorecimento da cruzipaína nos sub-sítios S1 e S3 em todas as análises. Observou-se, também, favorecimento à cruzipaína no sub-sítio S2 em relação à falcipaína e à catepsina L.

Outro ponto de favorecimento que se mostrou interessante por apresentar diferente local de especificidade para a cruzipaína foi o sub-sítio S2', que pode ser obervado para as catepsinas K e L. A última sonda avaliada foi a de O, grupos aceptores de ligação de hidrogênio. Nesta análise, os campos favoráveis à cruzipaína que se considerou de maior importância podem ser observados nos sub-sítios S1 e S3.

A análise de PCA e CPCA foi realizada para os ligantes. Os resultados de PCA não apresentaram boa distribuição, à vista de que os ligantes possuem características químicas muito semelhantes. Em análise de CPCA para os ligantes (Figura 7.6), utilizando o inibidor éster piridina-4-ilmetílico do ácido [1-(3-hidroxi-2-oxo-1-fenetil-propilcarbamoil)-2-fenil-etill]carbâmico, cristalizado com a cruzipaína (pdb:1me3), também se observou perfil muito semelhante para todos eles, pelas mesmas razões. Porém, os campos favoravéis à ligação de hidrogênio observados na análise de CPCA auxiliaram na construção do modelo farmacofórico.

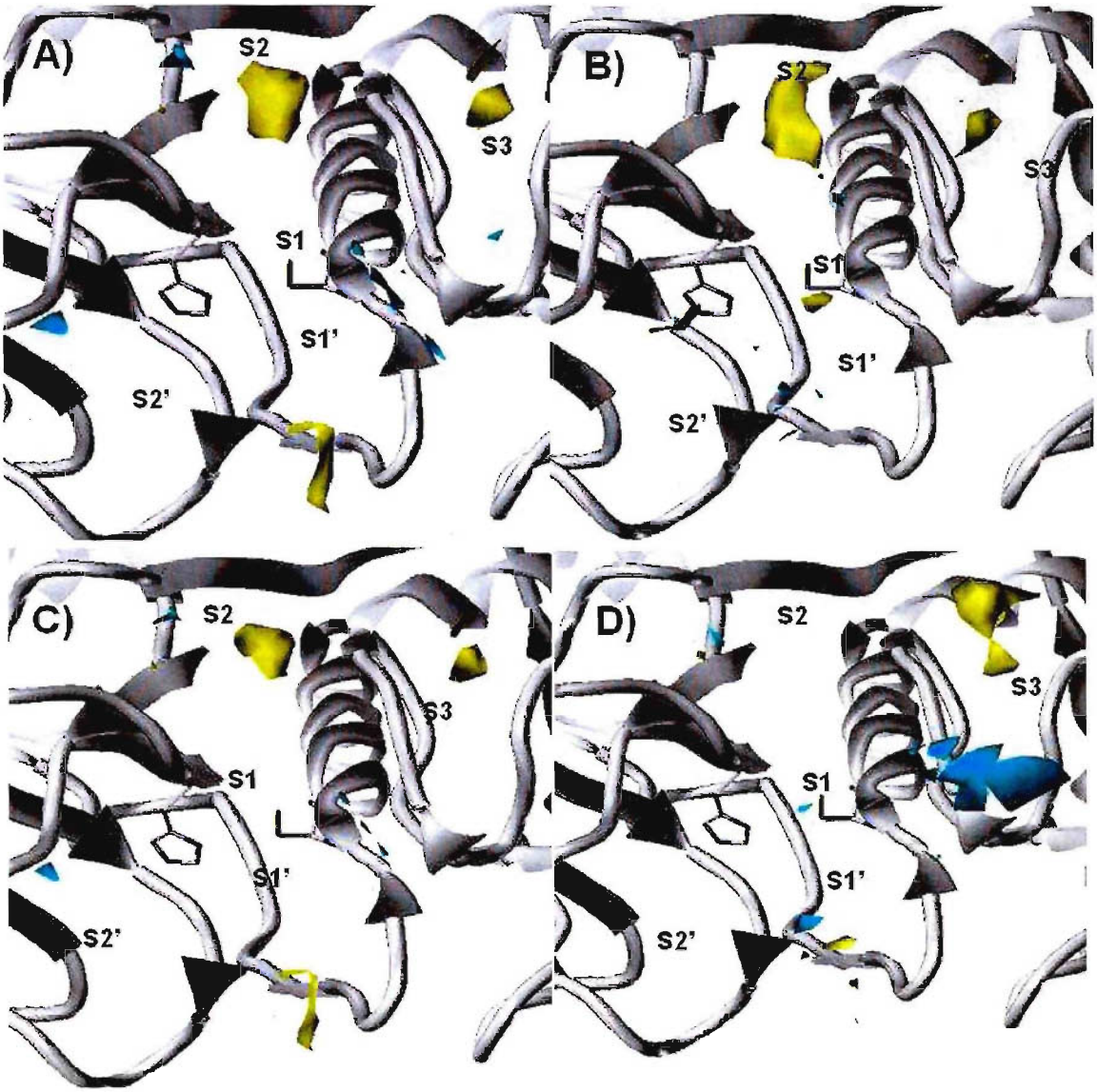


Figura 7.3 – Análise dos campos gerados por CPCA nos programas GRID/GOLPE, mostrando os campos de favorecimento para a cruzipaína (amarelo) em relação à falcipaína (ciano). A-sonda H_2O; B-sonda C1; C-sonda N1; e D-sonda O.

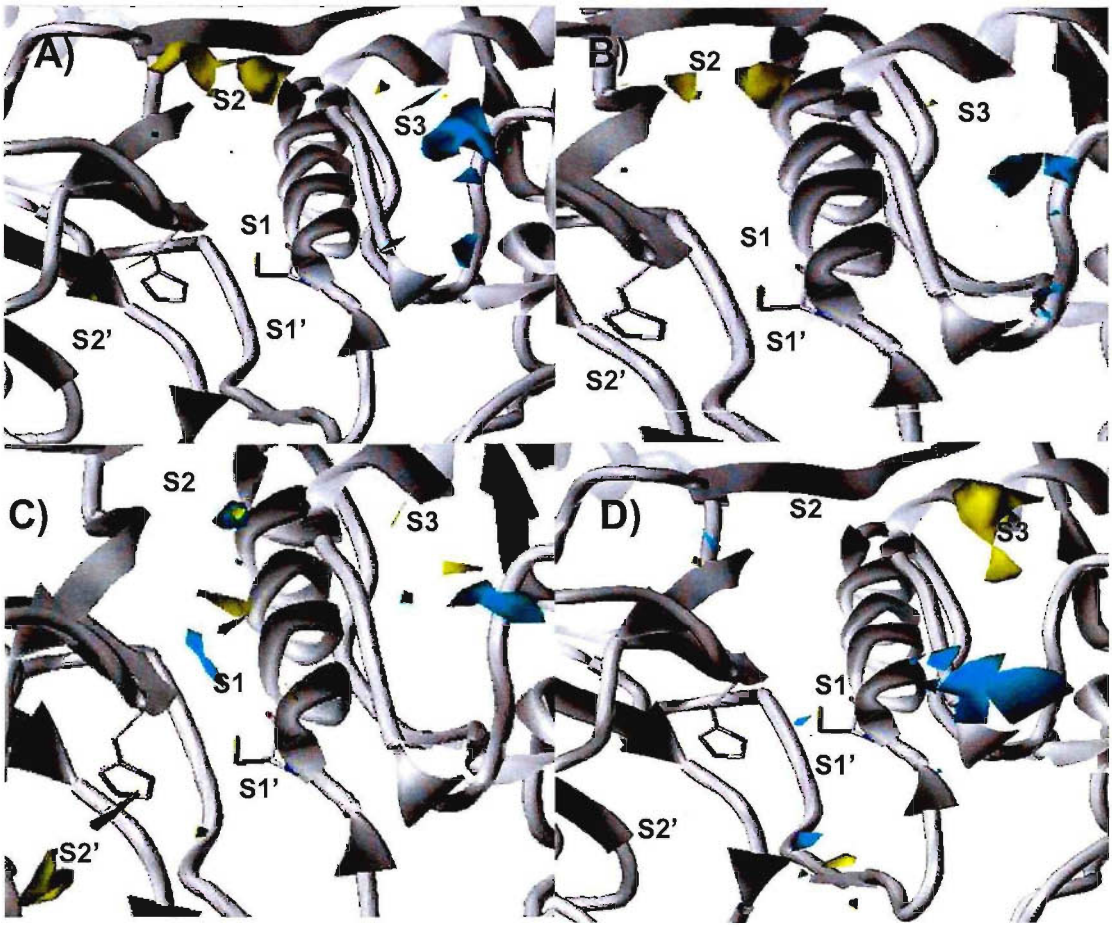


Figura 7.4 – Análise dos campos gerados por CPCA nos programas GRID/GOLPE, mostrando os campos de favorecimento para a cruzipaína (amarelo) em relação à catepsina K (ciano). A-sonda H_2O; B-sonda C1; C-sonda N1; e D-sonda O.

Figura 7.5 – Análise dos campos gerados por CPCA nos programas GRID/GOLPE mostrando os campos de favorecimento para a cruzipaína (amarelo) em relação à catepsina L (ciano). A-sonda H_2O; B-sonda C1; C-sonda N1; e D-sonda O.

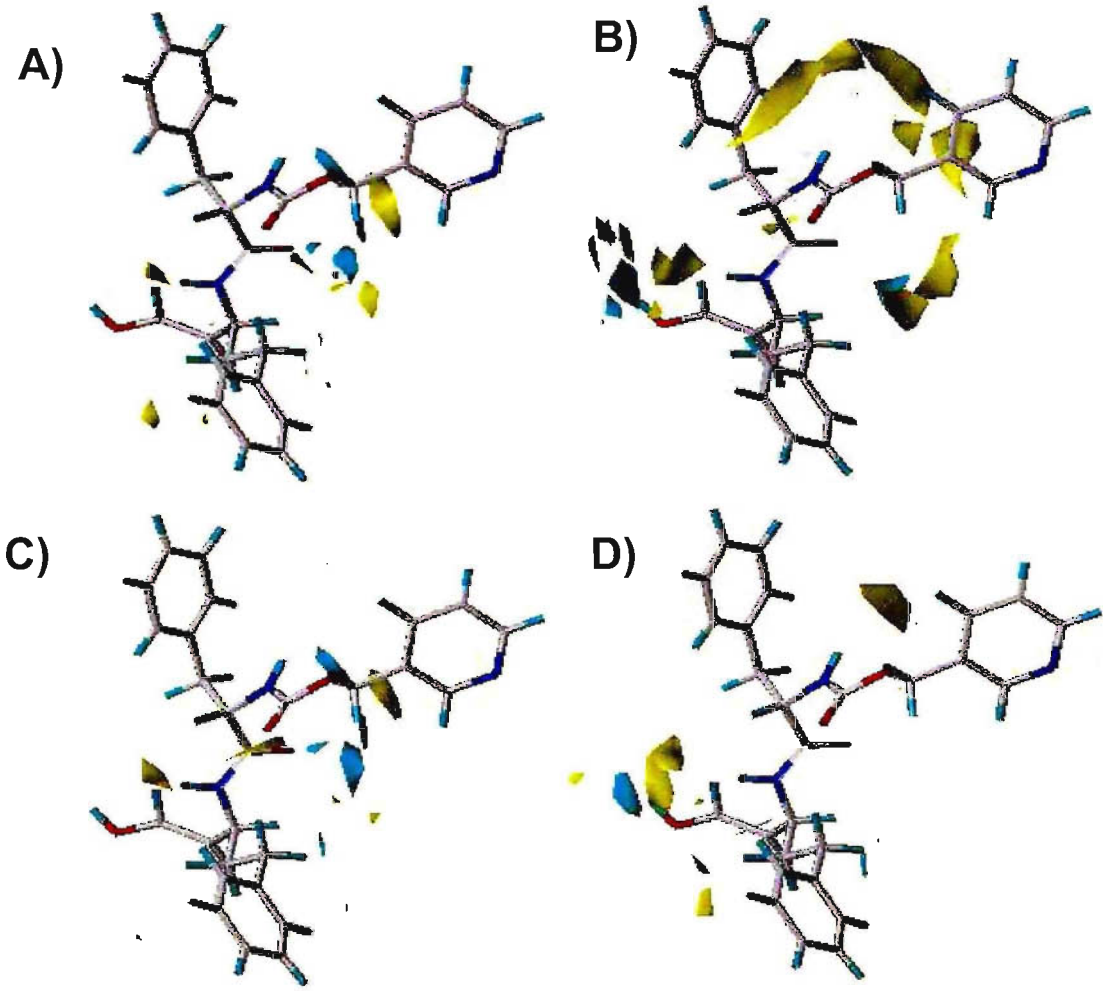


Figura 7.6 – Análise dos campos gerados por CPCA nos programas GRID/GOLPE, mostrando os campos de favorecimento ao inibidor cristalizado com a cruzaína (pdb; 1ME3)éster piridina-4-ilmetílico do ácido [1-(3-hidroxi-2-oxo-1-fenetil-propilcarbamoil)-2-fenil-etill]carbâmico, cristalizado com a cruzipaína (pdb:1me3) (em amarelo) em relação aos inibidortes das outras cisteíno-proteases (ciano). A-sonda H_2O; B-sonda C1; C-sonda N1; e D-sonda O.

7.2.1.2. Geração do modelo farmacofórico

A construção dos modelos farmacofóricos foi realizada utilizando as informações obtidas dos campos moleculares de importância gerados pelos cálculos de CPCA. Um primeiro modelo foi construído com o objetivo de se identificar especificidade para a cruzipaína e foi denominado MFE I. Este apresentou seis pontos de interação, dois lipofílicos (sub-sítios S2 e S3), três doadores de ligação de hidrogênio (sub-sítios S1, S3 e S2') e um aceptor de ligação de hidrogênio (sub-síto S1) (Figura 7.7). O síto atívo da cruzipaína foi delimitado pela ferramenta de restrição do programa Unity (Sybyl 7.3). Neste modelo avaliaram-se, principalmente, pontos nos quais a interação seria específica à cruzaína . Porém, em análise mais detalhada, observou-se que o bolso S3, muito explorado por outros pesquisadores, se apresenta na superfície da enzima. Avaliou-se tal fato como um aspecto negativo do MFE I, pois os pontos de interação podem apresentar grande influência dos solventes. Essa desvantagem do modelo conduziu à preocupação de se excluir os pontos posicionados no bolso S3, incluindo outros pontos de interação, o que foi realizado no segundo modelo farmacofórico específico para a cruzaína MFE II.

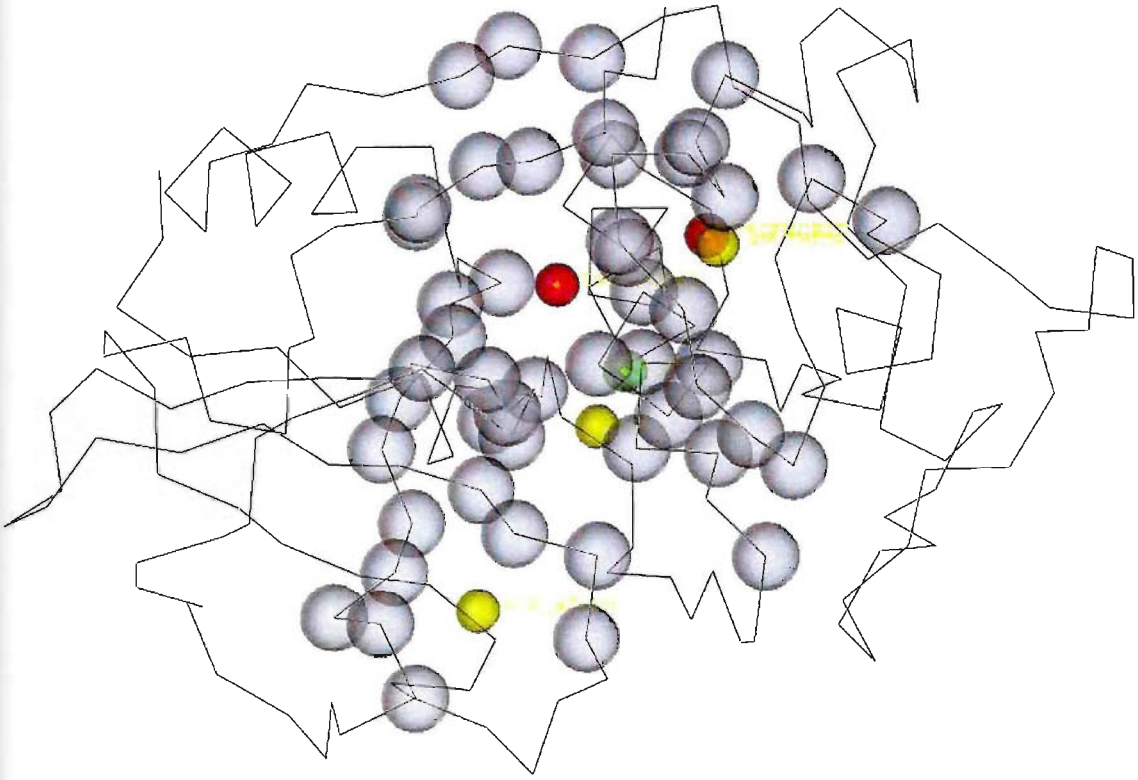


Figura 7.7 – Modelo farmacofórico específico da cruzaína (MFE I) construído no programa UNITY. Branco-delimitação do sítio ativo; Vermelho - pontos lipofílicos de ligação; Amarelo - doadores de ligação de hidrogênio e verde - aceptor de ligação de hidrogênio.

Um segundo modelo farmacofórico construído apresenta três pontos de interação, lipofílico (sub-sítio S2), doador de ligação de hidrogênio (sub-sítios S1) e aceptor de ligação de hidrogênio (sub-síto S1) (Figura 7.8). Esse modelo tem o objetivo de encontrar moléculas ativas na cruzaína, mas não necessariamente específicas. Este modelo com menor número de restrição foi construído com o objetivo de avaliar se moléculas de menor tamanho poderiam ser ativas como inibidores da cruzaína.

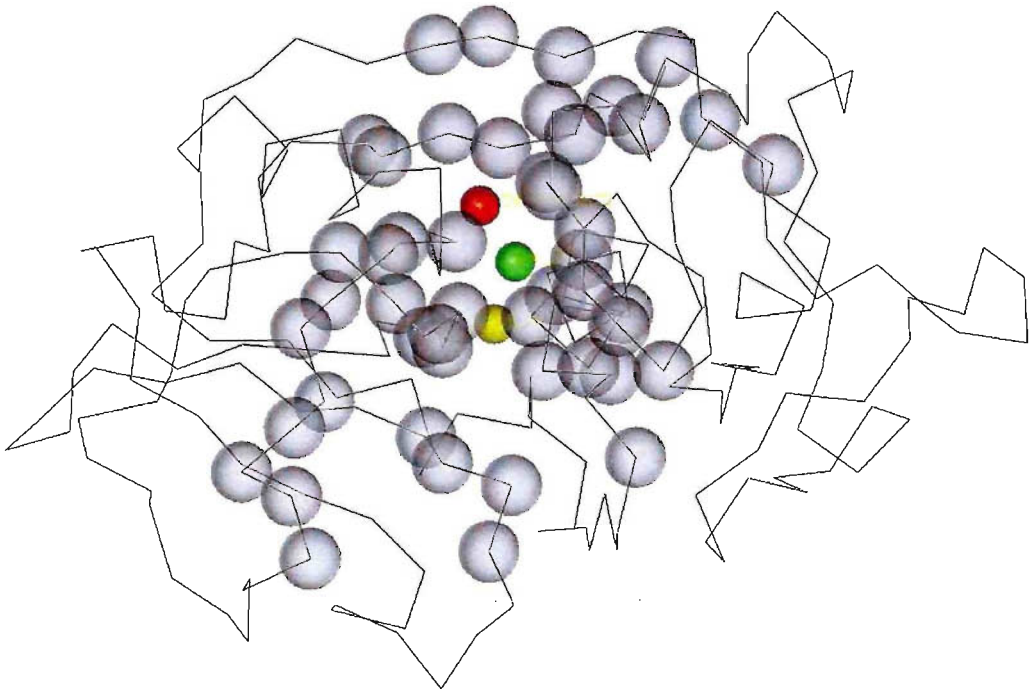


Figura 71 – Modelo farmacofórico da cruzaína com três pontos de interação. Figura 7.8 - Modelo faramcofórico não específico construído no programa UNITY Branco - delimitação do sítio ativo; Vermelho-pontos lipofílicos de ligação; Amarelo - doadores de ligação de hidrogênio e Verde - aceptor de ligação de hidrogênio.

Para o terceiro modelo farmacofórico construído, MFE II, aplicou-se abordagem utilizando os campos moleculares de importância para a cruzaína e suas características químicas e flexibilidade de resíduos, como, por exemplo, o Glu205, que apresenta grande liberdade de rotação e pode favorecer ligações de hidrôgênio. Neste modelo não se utilizaram os campos favoráveis à cruzaína localizados no bolso S3. Já no bolso S2, introduziu-se mais um ponto lipofílico, devido às caracteristicas indicadas pelos campos moleculares da sonda C1. Outra modificação realizada no bolso S2 foi a adição de um ponto para interação de grupos doadores de ligação de hidrogênio. Este ponto

é justificado pelas sondas H_2O e N1 e, também, pela flexibilidade do resíduo Glu205, favorecendo uma ligação de hidrogênio nesta posição. No bolso S1 o ponto de doador de ligação de hidrogênio foi mantido e se adicionou um ponto para ligações lipofílicas, provenientes dos campos moleculares favoravéis à cruzaína dos ligantes cristalizados. Essas interações podem ocorrer com as cadeias laterais dos resíduos Ser29 e Phe28. No bolso S3 foi retirado o ponto aceptor de ligação de hidrogênio presente no MFE I. Esse ponto de interação se apresenta intenso quanto ao favorecimento para cruzaína em relação a catepsina K, mas não em relação outras duas enzimas, catepsina L e falcipaína. Adicionou-se, assim, um ponto de ligação lipofílica relacionado à interação com os resíduos Trp184, Trp 144 e Tyr147, localizados no bolso S3 especificamente para a cruzaína .

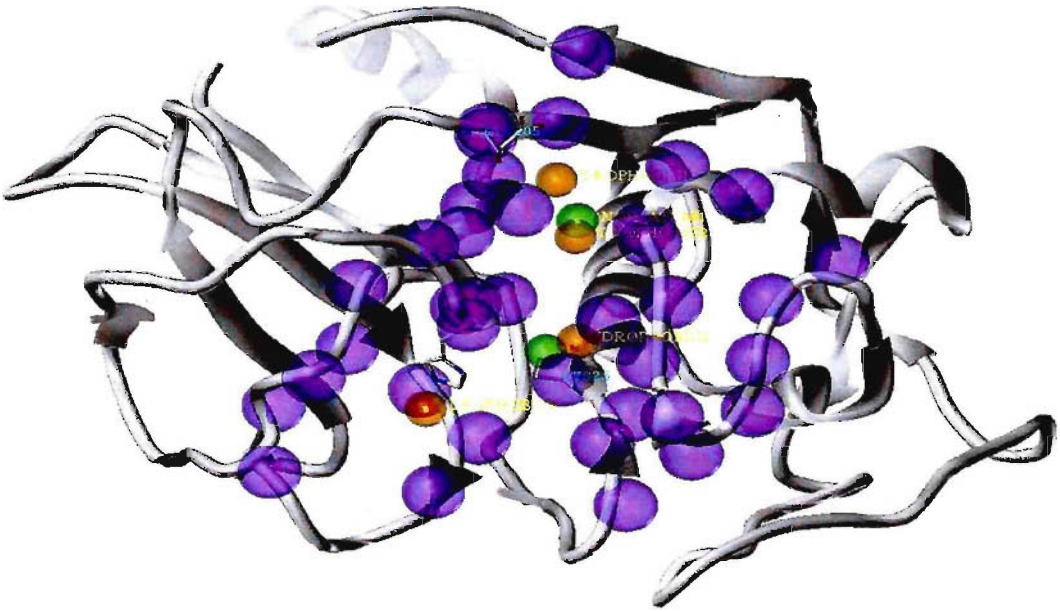


Figura 7.9 – Modelo farmacofórico específico da cruzaína II (MFE II). Violeta - delimitação do sítio ativo; Laranja - pontos de ligação lipofílicos; e Verde -- doador de ligação de hidrogênio.

O modelo MFE II se mostra como uma hipótese inovadora em estudos de SBDD por utilizar imformações referentes aos campos moleculares favoráveis à cruzaína. No bolso S2, as características lipofílicas foram exploradas em dois pontos, um, localizado no início do bolso próximo aos resíduos Ala 131 e a Phe

72, e o segundo, correspondente ao fundo do bolso, apresentando-se favorável a interações lipofílicas com os resíduos Leu 40 e Phe 39. A interação com um ponto mais profundo no bolso S2 sugere maior dificuldade de o inibidor se desligar, proporcionando, se ligado neste ponto, maior tempo de ação. Ainda no bolso S2, o ponto doador de ligação de hidrogênio explora a flexibilidade de rotação do resíduo Glu 205. O bolso S3 não foi utilizado devido à sua localização na superfície da enzima. Assim, as interações neste bolso sofrem grande influência do solvente. Com essas características, acreditamos encontrar moléculas com alta afinidade pela cruzaína e concomitantemente com alta potência de inibição. Visto ser um modelo computacional com caracteristicas peculiares, principamente no bolso S2, se faz necessária a validação por triagem virtual de inibidores com potência de inibição conhecida e, também, a validação experimental das moléculas selecionadas no estudo de SBDD.

7.2.1.3 Geração dos bancos de dados

Os bancos de dados de estruturas foram gerados com o objetivo de validar os modelos farmacofóricos (WOMBAT e DU) e para a pesquisa de novos ligantes com potencial atividade antichagásica (CHEMDIV). A geração dos banco de dados foi realizada segunda a metodologia descrita no íntem 7.1.2.1.3 deste capítulo.

Seguindo esse processo foram gerados os bancos de dados:

- WOMBAT: composto por 201 compostos com atividade de inibição da cruzaína, sendo 88 desses com atividade ≤ 1 μM;
- DU: a gereção deste banco de dados foi de fácil realização visto as estruturas já terem sido desenhadas e e empregadas nos estudos de QSAR 2 e 3D. A atividade inibitória da cruzaína desses compostos é conhecida (DU *et al.*, 2002).
- CHEMDIV *(Chemical Discovery)*: essa base de dados composta por cerca de 700.000 moléculas foi a que levou o maior tempo para ser obtidas devido ao grande número de moléculas a serem calculadas. Para a geração das conformação 3D utilizando o programa OMEGA

2.2.1 foi necessário o uso do cluster disponível na *Division of Biocomputing* da *University of New Mexico*. Esse banco de dados foi utilizado na busca de possíveis inibidores da cruzipaína.

7.2.1.4 Avaliação dos modelos farmacofóricos

Os cálculos para avaliação e validação foram realizados no módulo UNITY do programa Sybyl 7.3, utilizando os seguintes filtros moleculares previamente descrita na metodologia.

Os resultados dos modelos farmacofóricos, obtidos por meio de cálculo de reconhecimento das estruturas ativas ou inativas como inibidores da cruzipaína, foram muito bons nos três modelos farmacofóricos construídos.

Estudo para a validação do modelo farmacofórico simples, inespecífico foi realizado com o banco de dados DU. O modelo obtido encontrou todas as estruturas presentes no banco de dados, porém em se tratando de derivados de (tio)semicarbazona e de acordo com a reatividade destes grupos, não se pode avaliar a especificidade do modelo.

A série de análogos de NF e NFOH, também, foi avaliada quanto ao reconhecimento pelo modelo faramcofórico simples. Os 8 compostos utilizados nessa pesquisa foram reconhecidos. Esses resultados sugerem que esses compostos são ativos contra a cruzaína, o que foi observado, também, em ensaios enzimáticos. Tais fatos corroboram a validade do modelo.

Para se testar a validade do modelo famacofórico específico para a cruzaína (MFE I) foi efetuada pesquisa com as séries de pró-fármacos dipeptídicos e com aminoácidos como transportadores, sintetizados por CHUNG (1996): Arg-PQ, LysArg-PQ, PheAla-PQ, PheArg-PQ, NF-lysArg-PQ, NF-PheAla-PQ, NF-PheArg-PQ, NF-lysArg-NF, NF-PheAla-NF, NF-AlaPhe-NF e NF-PheArg-NF. Nestes, se estudou a especificidade pela cruzaína dos espaçantes presentes nos pró-fáramcos peptidicos, utlizando como parametro de validação a atividade biologica contra *T. cruzi*. Os resultados obtidos para os pró-fármacos específicos para cruzipaína permitiram o reconhecimento de nove dos 11 pró-fármacos, não encontrando o pró-fármacos Arg-PQ e PheArg-PQ, ambos inativos.

O MFE II foi validado utilizando-se o banco de dados WOMBAT com 201

moléculas ativas, das quais o modelo encontrou 174. Realizou-se nova busca utilizando, também, o WOMBAT, porém com moléculas que apresentavam atividade ≤ 1 μM. O MFE II encontrou 71 moléculas das 88 com atividade ≤1 μM presentes nesse banco. Tais resultados permitem concluir que o MFE II construído apresenta boa resposta na busca de moléculas ativas como inibidores da cruzipaína.

7.2.1.5 Seleção das estruturas do CHEMDIV

Esta etapa do estudo de SBDD foi realizada com o intuito de filtrar as moléculas presentes no CHEMDIV que não respeitassem as restrições impostas pelos filtros moleculares, ja descritos, adicionados à pesquisa virtual no programa UNITY e, também, não satisfizessem as restrições do modelo farmacofórico específico.

A figura 7.10 apresenta um representação esquemática do processo de busca virtual de inibidores seletivos potenciais da cruzaína. Após a construção e validação do modelo farmacofórico seletivo, a busca seguiu as seguintes etapas: 1-Aplicação de filtros moleculares e filtro farmacofórico, selecionando 3.105 moléculas que respeitavam as restrições impostas pelo modelo farmacofórico seletivo para a cruzaína; 2-*Docking* molecular, utilizando o programa GOLD, e a função de *score* GOLDSCORE, a qual foi utlizado como fator de pontuação para seleção dos 100 melhores estruturas; 3-Análise visual, a qual foi realizada pela observação das 100 melhores moléculas segundo o ranquemamento do *docking*. Nessa etapa foi de grande imortância o conhecimento do alvo, cruzaína, para avaliação da coerência dos resultados de *docking*. Ao final sugeriram-se as 20 melhores estruturas para serem testadas como inibidores seletivos da cruzaína.

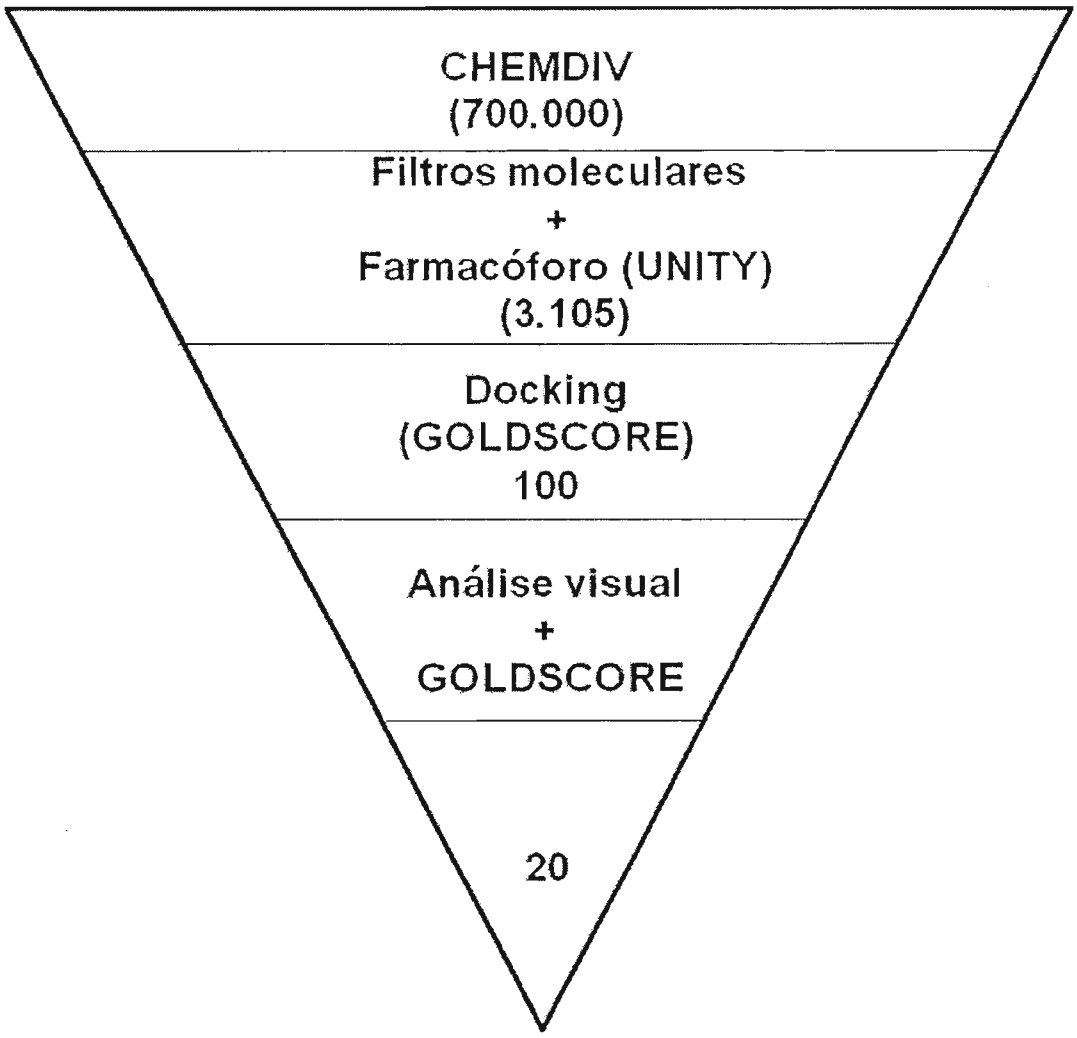


Figura 7.10 - Representação esquemática da seleção de inibidores seletivos para cruzaína a partir do banco de dados CHEMDIV.

As aproximadamente 700.000 moléculas do CHEMDIV, após serem submetidas à geração da conformação 3D no programa OMEGA, foram submetidas à pesquisa virtual no programa UNITY utlizando o MFE II e os filtros moleculares previamente estabelecidos.

Os filtros foram escolhidos e impostos com base na avaliação prévia dos inibidores de proteases ativos na cruzaína e dos ligantes co-cristalizados com as 13 estruturas da cruzaína estudadas.

O programa UNITY realiza, para cada estrutura, uma primeira análise verificando se essa estrutura se enquadra nas caracteristicas dos filtros impostos para a pesquisa. Se a molécula respeita os filtros o programa avalia se ela se encaixa nas restrições do modelo farmacofórico utilizado. No

presente estudo, das 700.000 moléculas selecionadas com caracteristicas que se enquadravam nas restrições impostas pelos filtros e pelo modelo farmacofórico total de 3.105 moléculas preenchiam os requisitos.

7.2.1.6. *Docking*

O estudo de *docking* realizado para as moléculas selecionadas na pesquisa virtual utilizando o modelo farmacofórico específico para a cruzaína e os filtros selecionados no programa UNITY foi realizado como forma de selecionar os melhores ligantes a serem testados na cruzaína, completando, assim, o trabalho pesquisa virtual de compostos bioativos com atividade específica na cruzaína.

Com o intuido de validar esse processo e, desse modo, utilizá-lo como mais um filtro para seleção de possíveis candidatos a inibidores da cruzaína, realizou-se o ancoramento do inibidor co-cristalizado com a estrutura da cruzaína 1ME4. O inibidor T10 foi submetido ao estudo, modificando-se a função de *score* e dando liberdade de rotação para os resíduos Glu205, Gln19 e Hist158, resíduos estes que se mostaram importantes no ancoramento do ligante.

O melhor resultado foi obtido com liberdade de rotação para o residuo Glu205 e Gln19, utilizando-se a função de *score GOLDSCORE*. Calculos de RMSD foram realizados entre a conformação do ligante T10 co-cristalizado e a conformação de ancoramento (Figura 7.11), apresentando o valor de 0,89. Este foi considerado um bom valor de comparação, visto o posicionamento dos grupos funcionais da estrutura serem muito semelhantes. A localização dos grupos aromáticos da conformação de *docking* nos bolsos S2, S3 e S1' é identica àquela observada no cristal. O grupo éster e os grupamentos amida no bolso S1 e hidroxila de ambas as conformações interagem de modo muito semelhante, indicando, também, as mesmas interações com a enzima. Essas observações validam o processo de ancoramento como um filtro para a escolha de possíveis inibidores da cruzaína.

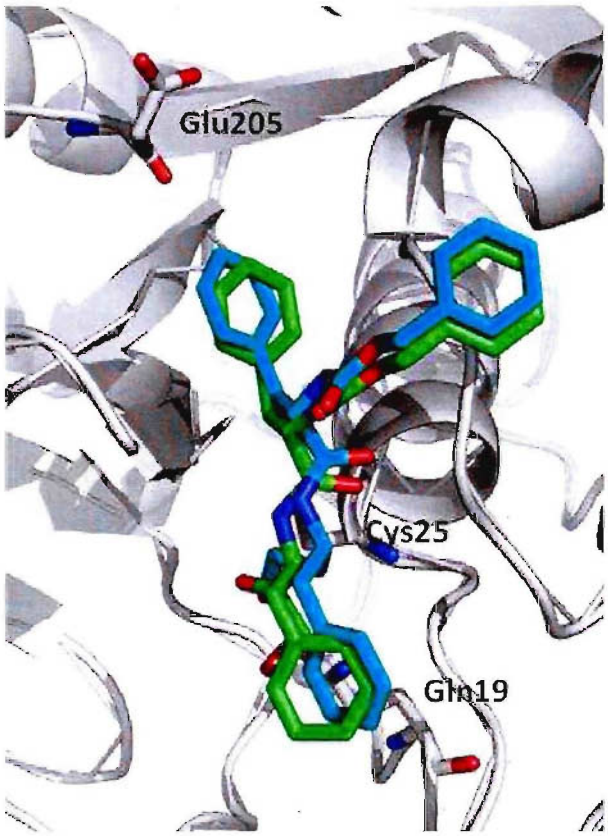


Figura 7.11 – *Docking* do T10 (verde) X T10 (azul) co-cistalizado com a estrutura da cruzaína, 1ME4.

Para os 3.105 compostos selecionados pelo modelo farmacofórico específico para cruzaína, realizou-se o *docking* com o programa GOLD 4.0, utilizando a estrutura cristalográfica da cruzaína (1ME4) de melhor definição, 1,2 Å, previamente preparada como descrito anteriormente, utilizando o método validado pelo ancoramento do ligante co-cristalizado.

A escolha dos compostos foi realizada por meio da função de *score* aplicada, *GOLDSCORE*, conjunto com a avaliação visual, observação da interação entre grupos funcionais dos ligantes e as caracteristicas dos resíduos da enzima, peresentes do ancoramento dos 100 compostos melhor ranqueados.

Esta análise foi feita para as 100 melhores moléculas, de acordo com o valor de *score*. Nesta análise observou-se a coerência no acoramento dos grupos funcionais de cada molécula e, também, se esses grupos se

posicionavam respeitando as restrições impostas pelo modelo farmacofórico. Dentre os 100 compostos 79 apresentavam caracteristicas coerentes, mostrando-se, virtualmente, como possíveis inibidores da cruzaína. Os 20 melhores de acordo com a potuação de *docking* foram selecionados e são apresentados na Figura 7.12. Observa-se que todos os compostos estão com um grupo lipofífico ancorado no sítio S2 da enzima. Outra observação importante são os grupos doadores de ligação de hidrogênio, que podem ser vistos próximos aos sítios S2 e no sítio S1. No sítio S2', a maioria das moléculas apresenta ainda um grupo lipofílico. Todas essas observações corroboram as restrições impostas pelo modelo farmacofórico específico para cruzaína, sugerindo esses compostos como possíveis inibidores seletivos desta enzima. Tais compostos serão adquiridos do banco de dados CHEMDIV e avaliados quanto à potência na inibição da cruzaína.

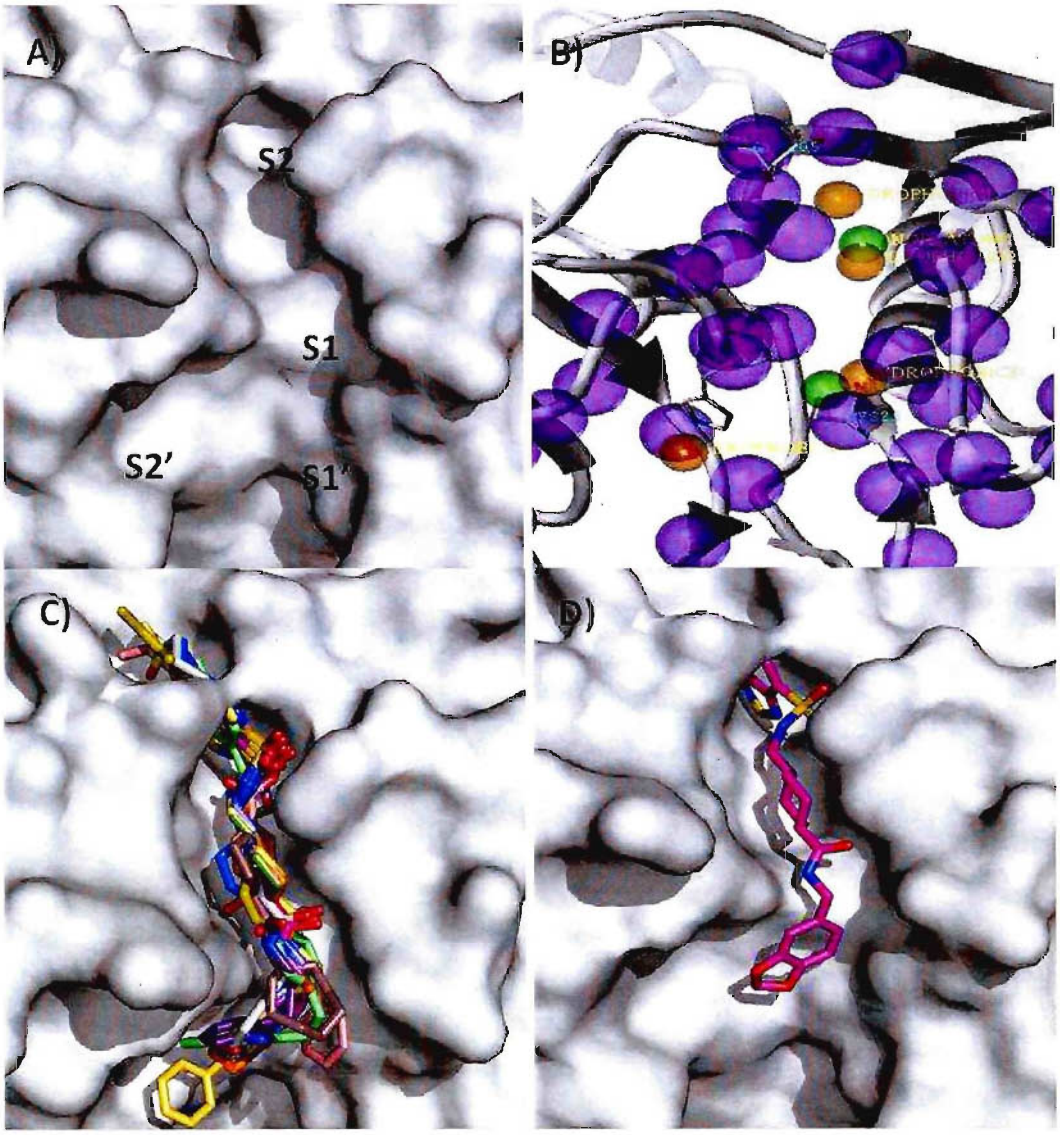


Figura 7.12- A) Representação esquemática dos bolsos da cruzaína; B) modelo farmacofórico específico da cruzaína (MFE II); C) *Docking* dos 20 compostos selecionados como inibidores; D) *Docking* do composto selecionado como inibidor da cruzaína mais bem ranqueado.

7.3 Conclusões

- Os estudos de campos de importância utilizando as sondas H_2O (hidrofílica, HBA e HBD), C2 (carbono sp^2), N1 - doador de ligação de hidrogênio (HBD) e O - aceptor de ligação de hidrogênio (HBO), realizados para a cruzipaína comparativamente às outras cisteíno-proteases (falcipaína, catepsina K e catepsina L) e para os ligantes co-cristalizados das enzimas, foram utilizados na avaliação e observação dos campos favoráveis à cruzipaína;

- Geraram-se três modelos farmacofóricos para a cruzipaína: dois específicos, contendo 6 pontos de interação cada, e outro inespecífico, contendo três pontos de interação;

- Geraram-se três bancos de dados, WOMBAT e DU para teste e CHEMDIV para a pesquisa de novos ligantes ativos na cruzaína e os modelos farmacofóricos resultantes foram validados, observando-se a adequação da maior parte das moléculas ativas dos bancos;

- Em teste realizado com os pró-fármacos específicos à clivagem pela cruzipaína Lys-Arg-PQ, PheAla-PQ, PheArg-PQ e Arg-PQ, NF-Lys-Arg-PQ, NF-PheAla-PQ, NF-PheArg-PQ, NF-LysArg-NF, NF-PheAla-NF, NF-AlaPhe-NF e NF-PheArg-NF, sintetizados por CHUNG(1996), o MFE I encontrou 9 dos 11 compostos;

- A análise do modelo farmacofórico inespecífico para os análogos do NF e NFOH permitiu que todos fossem encontrados, confirmando o mecanismo de ação sugerido por DU e colaboradores (2002);

- O modelo MFE II foi validado por meio dos compostos ativos contra a cruzaína encontrados no banco de dodos WOMBAT, reconhecendo-se grande parte deles, prinicpalmente aqueles com alta potência de inibição;

- A busca de novos ligantes ativos contra a cruzaína foi realizada utilizando os MFE II e os filtros químico pre-estabelecidos no programa UNITY no banco de dados CHEMDIV, resultando na seleção de 3.105 moléculas das 700.000 presentes no banco de dados;

- Estudo de *docking* com as 3.105 moléculas da pesquisa virtual permitiram a seleção dos 20 melhores, segundo ranqueamento e coerência de interações, para serem testados contra a cruzaína.

7.4 Referências Bibliográficas

AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; FERNANDEZ, M.; GONZALEZ, M.; DENICOLA, A.; OTERO, L.; GAMBINO, D.; RIGOL, C.; OLEA-AZAR, C.; FAUNDEZ, M. *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.,* v.12, 4885-4893, 2004.

DEL NERY, E; JULIANO, M. A.; LIMA, A. P.; SCHARFSTEIN, J.; JULIANO, L. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi. J. Biol. Chem.*, v.272, p.25713-25718, 1997.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med Chem.,* v. 45, p. 2695-2707, 2002.

GUIDO, R.V.C; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Virtual screening and Its Integration with modern drug design technologies. *Curr.. Med. Chem.* v.15, p. 37-46, 2008.

HUANG, L.; BRINEN, L.S.; ELLMAN, J.A. Crystal structures of reversible ketone-based inhibitors of the cysteine protease cruzain *Bioorg. Med. Chem.*,v. 11, p. 21-29, 2003.

JAISHANKAR, P.; HANSELL, E.; ZHAO, D.M.; DOYLE, P.S.; MCKERROW, J.H.; RENSLO, A.R. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,*. v. 18, p. 624-628, 2008.

KLEBE, G., Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today*, v.11, p. 580-594, 2006.

MALVEZZI, A.; DE REZENDE L.; IZIDORO M.A.; CEZARI, M.H.; JULIANO, L.; DO AMARAL, A. Uncovering false positives on a virtual screening search for cruzain inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.18, p. 350-4, 2008.

Capítulo 8

Perspectivas

BIBLIOTE
Faculdade de Ciências Far
Universidade de São

8. Perspectivas

8.1 Síntese dos pró-fármacos peptídicos do NFOH por métodos de Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS), com auxílio de microondas e determinação da atividade tripanomicida *in vitro*;

8.2 Realização de ensaios de inibição enzimática para os compostos sintetizados;

8.3 Realização de ensaios de inibição enzimática da cruzaína para os compostos selecionados do CHEMDIV após filtragem por *docking;*

8.4 Ensaios de liberação pela cruzaína dos pró-fármacos específicos.

Anexos

ANEXO 1

A.1 *Estudo sobre a síntese dos pró-fármacos duplos de NFOH*

Neste anexo apresentam-se os estudos realizados para a obtenção dos pró-farmacos duplos de NFOH planejados no projeto original e estudados por modelagem molecular e *docking* (Capítulo 4). Esses estudos compreendem a síntese de peptídios convencional, síntese de peptídios em fase sólida, com e sem auxílio de irradiação de microondas e a tentatíva de síntese de pró-fármacos do NFOH.

A.2 Material e Métodos

A.2.1 Material

• 1-isopropil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (DCI) (Sigma)	• clorofórmio p.a. (Merck)
• 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) (Sigma Chemical Co.)	• diclorometano p.a. (Merck)
• 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Aldrich)	•
• 4-(4-nitrobenzil)piridina (NBP)	• dimetilformamida p.a. (Merck)
• acetona p.a. (Merck)	• dimetilsulfóxido deuterado (Merck)
• acetonitrila grau CLAE (Merck)	• dimetilsulfóxido p.a. (Merck)
• ácido acético p.a. (Merck)	• etanol p.a. e CLAE (Merck)
• ácido trifluoracético p.a. (Sigma Chemical Co.)	• éter etílico p.a. (Merck)
• (Fmoc)Arg(Pbf)-OH (LCScience)	•
• (Fmoc)Lys(Boc)-OH (LCScience)	• metanol p.a. e CLAE (Merck)
• (Fmoc)Ala-OH (LCScience)	• nitrofural (FCF-USP)
• (Fmoc)Phe-OH (LCScience)	• propanol p.a. (Merck)
• Boc-Arg(Tos)-OH (Bachem)	• resina Merrifield (1% mmol/g) LSCience
• Boc-Lys(Cl-Z)-OH (Bachem)	• sulfato de sódio anidro p.a. (Merck)
• carbonato de césio (Merck)	• trietilamina p.a. (Sigma Chemical S.A.)
• carbonato de sódio (Synth)	• trifluoretanol (Sigma Chem Co.)

A.2.1 *Métodos*

A.1.1 Síntese de Peptídios

A.1.1.1 Síntese de peptídios utilizando método convencional

A.1.1.1.1 Síntese do dipeptídio Lys-ClZ-Arg(Tos)-OMe (BODANSZKY, BODANSZKY, 1984)

Experimento 1

O experimento foi realizado utilizando-se Boc-Arg(Tos)-OH e Boc-Lys-ClZ-OH por meio de condensação por EDC/DMAP. Em uma primeira etapa procedeu-se à formação do éster metílico e desproteção da amina α de Boc-Arg(Tos)-OH, por meio de $SOCl_2$ e metanol, em excesso, sob agitação à temperatura ambiente, adicionando-se, em seguida, $SOCl_2$ gota a gota, na proporção de 1:1. A reação transcorreu durante a noite. Partiu-se, então, para a condensação dos aminoácidos por meio de EDC/DMAP. O Boc-Lys-ClZ-OH em solução de metanol foi colocado em banho de gelo seco adicionando-se DMAP e, posteriormente, EDC (0,5:1). A reação permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 12 horas. O produto foi evaporado à pressão reduzida e avaliado por CCD, observando-se a formação de um produto, o qual foi analisado por RMN, confirmando a formação do dipeptídio, Boc-Lys-ClZ-Arg(Tos)-OMe. Partiu-se, então, para a desproteção da amina α do agora acoplado a Boc-Lys-ClZ-OH, resultando em Lys-ClZ-Arg(Tos)-OMe. O produto foi analisado por RMN de ^{1}H e de ^{13}C, confirmando a formação do produto desejado.

A.1.1.2 Síntese de peptídios em fase sólida

A síntese em fase sólida foi realizada com a colaboração da Profa. Dra. Vera Lucia Eifler Lima, em estágio realizado no laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, sob sua responsabilidade, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

➢ *Teste colorimétrico do NBP*

O teste colorimétrico do NBP (4-(4-nitrobenzil)piridina) é realizado para verificar o Cl do grupamento clorometilênico da resina Merrifield que não reagiu. Este método é realizado imergindo-se a resina sob análise em solução de 5% de NBP em DMC/DMF e 5% de trietilamina. O teste é realizado comparativamente entre a resina do meio reacional e a resina comercial (GALIANDO *et al.,* 2004). A cor final do teste é púrpura, se a resina apresentar gupamentos clorometil livres, e não apresenta cor, se a reação for completa.

A.1.1.2.1 Síntese do dipeptídio PheAla

a1. Acoplamento da (Fmoc)Phe-OH na resina Merrifield (Esquema 1.i)

Experimento 2

Colocou-se 1 g de resina Merrifield (1 mmol/g) em contato com o DMF seco em meio livre de oxigênio, por 10 minutos. Adicionaram-se os reagentes, (Fmoc)Phe-OH, Cs_2CO_3 e KI, em excesso de 2 equivalentes. A reação transcorreu por 12 horas, à temperatura ambiente, sob agitação moderada em *shaker*. Após esse período, o produto foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. O acoplamento foi avaliado pelo teste de colorimetria por NBP (GALINDO *et al.*, 2004).

Experimento 3

Seguiu-se o *Experimento 2*, utilizando-se forno de microondas em 9 ciclos de 1 minuto. Após esse período, o produto foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. O acoplamento foi avaliado pelo teste de colorimetria por NBP(GALINDO *et al.*, 2004).

a2. Desproteção de Fmoc (Esquema 1.ii)

Experimento 4

O produto obtido na reação de acoplamento do aminoácido protegido (Fmoc)Phe-OH foi ressuspendido em pequena quantidade de DMF seco (3 mL), em atmosfera livre de oxigênio, mantendo-se por 10 minutos nessa condição. Em seguida, adicionou-se quantidade de piperazina referente a 20% do volume do solvente. O meio reacional foi submetido a agitação moderada em *shaker* por 4 horas. O produto resultante foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. Obteve-se produto cristalino, de cor branca amarelada clara.

A.1.1.2.2. Síntese do dipeptídio Phe-(Fmoc)Ala (Esquema 4.iii)

Experimento 5

O produto obtido no *Experimento 4* foi suspenso em DMF seco (5 mL) e mantido por 10 minutos em atmosfera livre de oxigênio. Adicionaram-se os reagentes na proporção de 2:1 em relação ao substrato (Fmoc)Ala-OH, o DIC e o HOBt. A reação foi mantida à temperatura ambiente por 12 h. Em seguida, o produto foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico.

Experimento 6

Utilizaram-se as mesmas condições do *Experimento 5* e como material de partida o produto da reação de acoplamento por microondas do (Fmoc)Phe-OH, previamente desprotegido. Esse produto foi suspenso em DMF seco (5 mL) e mantido em processo de ressuspensão por 10 minutos, em atmosfera livre de oxigênio. Adicionaram-se o reagentes na proporção de 2:1 em relação ao (Fmoc)Ala-OH, DIC e HOBt. A reação foi realizada em microondas, em 9 ciclos de 1 minuto. O produto resultante foi, então, lavado com DMF, água, etanol e éter etílico.

a3. Desproteção do grupo Fmoc (Esquema 1.iv).

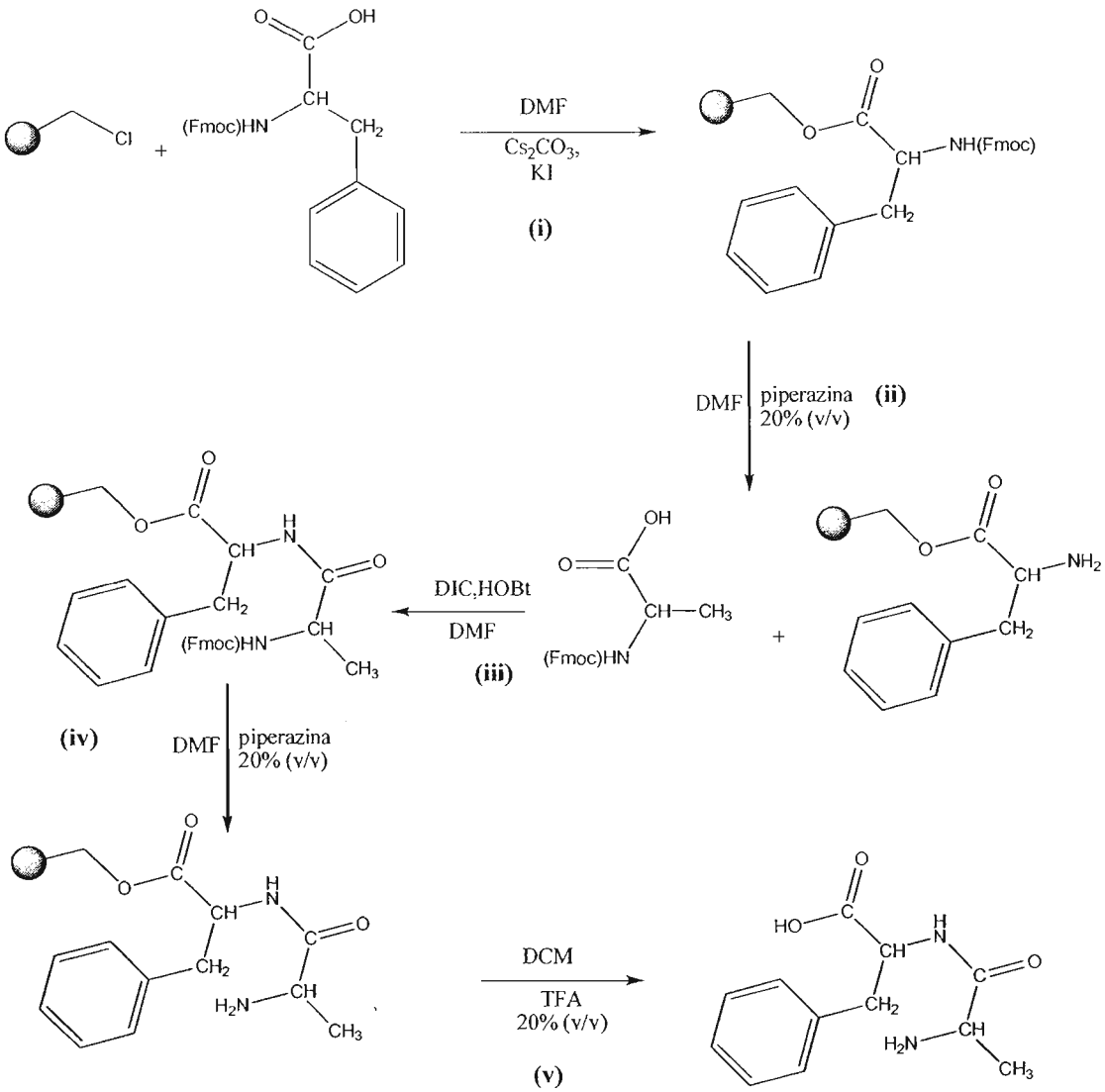
Experimento 7

A desproteção do grupo Fmoc foi realizada utilizando-se o produto obtido nos *Experimentos 5* e *6*, seguindo-se o método descrito anteriormente, *Experimento 4*, para desproteção de grupo Fmoc, utilizando 20% de piperazina (V/V) em relação ao solvente utilizado. O produto obtido foi ressuspendido em 3 mL de DMF seco e deixado em atmosfera inerte por 10 minutos. A reação ocorreu por 4 horas, sob agitação moderada em *shaker*. Em seguida, o produto foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. Obteve-se um pó cristalino branco amarelado.

a4. Clivagem do dipeptídio PheAla da resina (Esquema 1.v)

Experimento 8

O dipeptídio PheAla foi clivado da resina utilizando-se técnica descrita em Merrifield (1980) com 20% (V/V) de ácido trifluoracético (TFA). Metade do dipeptídio PheAla, ainda ligado covalentemente à resina, porém sem o grupo protetor Fmoc, retirado como descrito no *Experimento 4*, foi ressuspendido em 5 mL de diclorometano e mantido em processo de inflagem por 10 minutos. Manteve-se sob agitação em *shaker*, por 2 horas. Ao término da reação, o material foi filtrado em funil sinterizado (G3). Obteve-se pó cristalino branco e líquido transparente opaco. O líquido foi secado à pressão reduzida e reservado para futuras análises.



Esquema A.1– SOFS do dipeptídio PheAla: i) acoplamento do (Fmoc)Phe-OH; ii) desproteção do grupo Fmoc; iii) acoplamento do (Fmoc)Ala-OH; iv) desproteção do grupo Fmoc; v) clivagem do dipeptídio.

A.1.1.2.3. Síntese do dipeptídio LysArg

a5. Acoplamento da (Fmoc)Arg(Pbf)-OH na resina Merrifield (Esquema 2.i)

Experimento 9

A reação foi realizada nas condições do *Experimento 2,* utilizando-se 1 g (1 mmol/g) de resina Merrifield e os reagentes (Fmoc)Arg(Pbf)-OH, Cs_2CO_3 e

KI, na proporção (1:2) resina/reagentes. Em seguida, o produto foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. O acoplamento foi avaliado pelo teste de colorimetria por NBP (GALIANDO *et al.*, 2004).

Experimento 10

A reação foi realizada nas condições do *Experimento 3,* utilizando-se 1 g (1 mmol/g) de resina Merrifield e os reagentes (Fmoc)Arg(Pbf)-OH, Cs_2CO_3 e KI, na proporção (1:2) resina/reagentes. O produto foi, em seguida, lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. O acoplamento foi avaliado pelo teste de colorimetria por NBP (GALIANDO *et al.*, 2004).

a6. Desproteção de Fmoc (Esquema 2.ii)

Experimento 11

Seguindo o *Experimento 4,* ressuspendeu-se o (Fmoc)Arg(Pbf)-OH, em pequena quantidade de DMF seco (3 mL), mantendo-se por 10 minutos em condição livre de oxigênio. Após esse período, adicionou-se quantidade de piperazina referente a 20% do volume do solvente. Manteve-se a reação sob agitação moderada em *shaker,* por 4 horas. O produto foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico, obtendo-se composto de cor branca amarelada clara.

a7. Síntese do dipeptídio Arg(Pbf)-(Fmoc)Lys(Boc)-OH (Esquema 2.iii)

Experimento 12

O composto obtido no *Experimento 11*, com aminoácido Arg ligado à resina e após desporteção do Fmoc, conforme *Experimento 7,* foi suspenso em DMF seco (5 mL) e deixado em ressuspensão por 10 minutos, em condição livre de oxigênio. Adicionaram-se os reagentes na proporção de 2:1 em relação ao substrato, (Fmoc)Lys(Boc)-OH, o DIC e o HOBt.. A reação foi mantida por 12 h e, em seguida, o produto resultante foi lavado com DMF,

água, etanol e éter etílico.

Experimento 13

Utilizando-se as mesmas condições do *Experimento 12* e como material de partida o produto da reação de acoplamento por microondas do (Fmoc)Arg(Pbf)-OH, previamente desprotegido, suspendeu-se em DMF seco (5 mL), deixando-se por 10 minutos, em atmosfera inerte. Adicionaram-se o reagentes na proporção de 2:1 em relação ao substrato (Fmoc)Lys(Boc)-OH, o DIC e o HOBt. A reação foi realizada no microondas, em 9 ciclos de 1 minuto. Em seguida, o produto foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico.

a8. Desproteção do grupo Fmoc (Esquema 2.iv)

Experimento 14

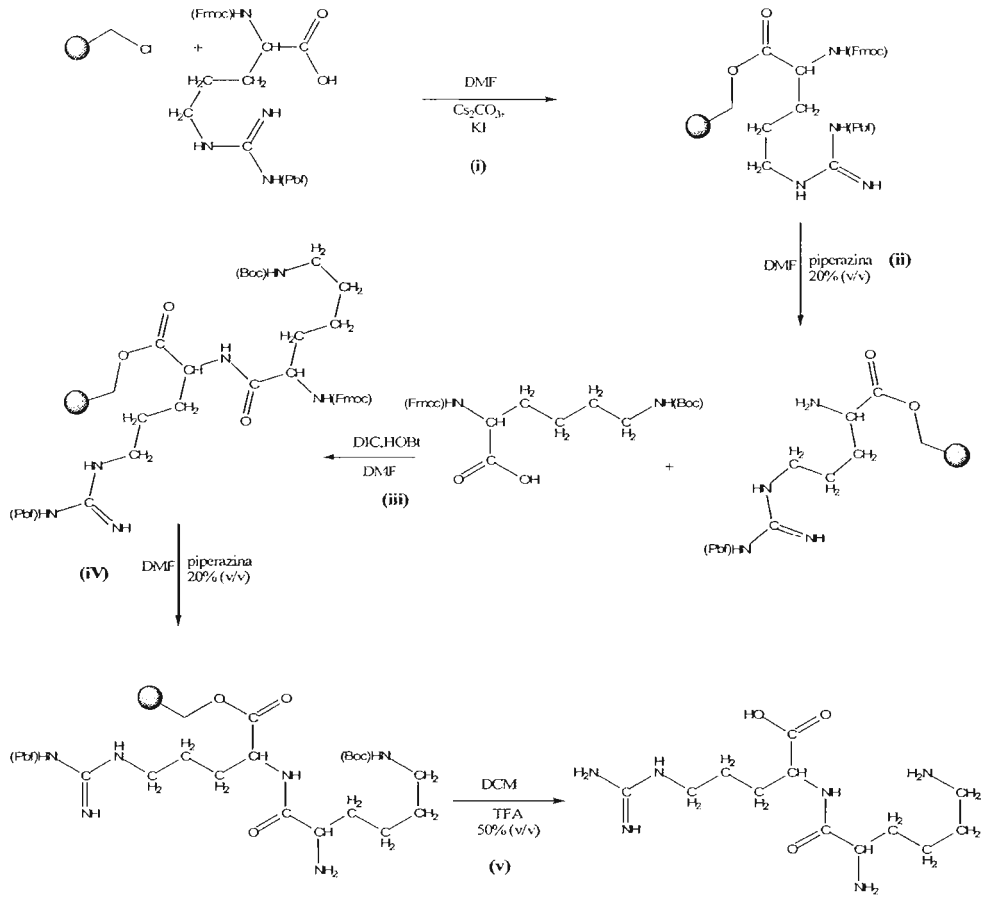
A desproteção do grupo Fmoc foi realizada utilizando-se os produtos obtidos nos *Experimentos 12* e *13*, seguindo-se o método descrito anteriormente, *nos Experimentos 4 e 7*, para desproteção de grupo Fmoc, utilizando-se 20% de piperazina (v/v) em relação ao solvente utilizado. O produto obtido foi ressuspendido em 3 mL de DMF seco e deixado em atmosfera inerte por 10 minutos. A reação ocorreu por 4 horas sob agitação moderada em *shaker*. Em seguida, o produto foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. O composto obtido foi um pó cristalino branco amarelado.

a9. Clivagem do dipeptídio LysArg da resina (Esquema 2.v)

Experimento 15

O composto obtido no *Experimento 14* foi suspenso em 5 mL de diclorometano e mantido por 10 minutos, em atmosfera inerte. Manteve-se em agitação moderada em *shaker* por 2 horas. Ao término da reação, o material foi filtrado em funil sinterizado (G3). Obteve-se pó cristalino branco e líquido transparente opaco. O líquido foi secado à pressão reduzida e reservado para

futuras análises.



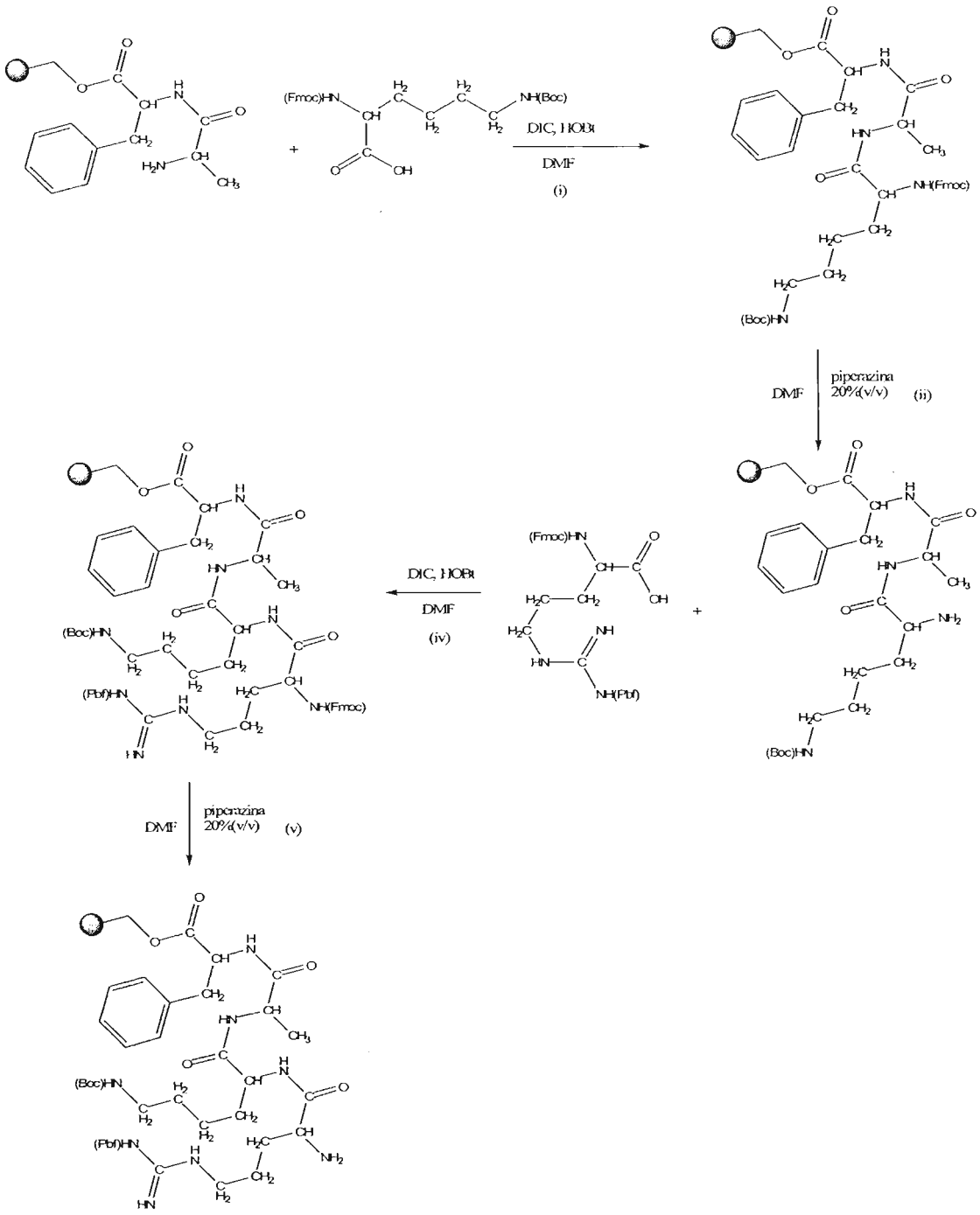
Esquema A.2 – SOFS do dipeptídio LysArg: i) acoplamento do (Fmoc)Arg(Pbf)-OH; ii) desproteção do grupo Fmoc; iii) acoplamento do (Fmoc)Lys(Boc)-OH; iv) desproteção do grupo Fmoc; v) clivagem do dipeptídio.

A.1.1.2.4. Síntese do tetrapeptídio PheAlaLysArg

Experimento 16

Parte do produto da síntese do dipeptídio PheAla foi ressuspendida em DMF (5 mL) e mantida em atmosfera inerte por 10 mim. Após essa etapa, adicionaram-se o (Fmoc)Lys(Boc)-OH e os agentes acoplantes DIC e HOBt. A reação foi mantida por 12 horas, à temperatura ambiente, sob agitação moderada em *shaker*. O produto foi filtrado e lavado com DMF, água, etanol e éter etílico em funil sinterizado. A etapa seguinte foi a desproteção do grupo

Fmoc utilizando 20% (v/v) de piperazina. Novamente, o material foi ressuspendido e mantido por 10 minutos em DMF seco, sob atmosfera inerte. O produto foi filtrado e lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. Partiu-se para o acoplamento do (Fmoc)Arg(Pbf)-OH. O produto da desproteção foi ressuspendido em DMF seco e mantido sob atmosfera inerte, por 10 minutos. A reação transcorreu por 12 horas. Ao término desse período, o produto resultante foi filtrado e lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. Realizou-se a desproteção do grupo Fmoc, por meio de piperazina 20%(v/v). O produto foi filtrado e lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. O material foi mantido ligado à resina para posterior ligação do fármaco.



Esquema A.3 – SOFS do tetrapeptídeo PheAlaArgLys: i) acoplamento do (Fmoc)Lys(Boc)-OH; ii) desproteção do grupo Fmoc; iii) acoplamento do (Fmoc)Arg(Pbf)-OH; iv) desproteção do grupo Fmoc.

a10. Comparação de SOFS em temperatura ambiente e em microondas

Nestes experimentos efetuou-se o acompanhamento cinético do acoplamento dos aminoácidos (Fmoc)Phe-OH e (Fmoc)Arg(PbF)-OH à resina Merrifield, utilizando métodos já descritos em microondas e à temperatura ambiente. O acoplamento foi acompanhado pelo método colorimétrico do NBP(GALIANDO *et al.*, 2004).

Experimento 17

Efetuaram-se, concomitantemente, as reações de acoplamento do (Fmoc)Phe-OH à resina em microondas e à temperatura ambiente.

★ À temperatura ambiente

Partindo-se de 400 mg de resina Merrifield (2,5 mmol/g) e excesso de 2 equivalentes para o (Fmoc)Phe-OH (387,4 mg); KI (498 mg); Cs_2CO_3 (977,46 mg), à temperatura ambiente, retiraram-se alíquotas de 10 mg a cada hora, avaliando-se o acoplamento pelo teste calorimétrico de NBP(GALIANDO *et al.*, 2004). A reação permaneceu sob agitação moderada em *shaker* por 12 h. O produto foi, então, filtrado e lavado com DMF, água, etanol, éter etílico.

★ Em microondas

Da reação efetuada em microondas, retirou-se uma alíquota de 10 mg e avaliou-se pelo teste colorimétrico do NBP (GALIANDO *et al.*, 2004) a cada ciclo de 1 minuto. Foram realizados 9 ciclos. Em seguida, o produto foi filtrado e lavado com DMF, água, etanol, éter etílico. O acoplamento do (Fmoc)Ala-OH foi realizado como descrito anteriormente nos dois métodos, microondas e temperatura ambiente.

Os reagentes (Fmoc)Ala-OH (583,7 mg); KI (498 mg); Cs_2CO_3 (977,46 mg) foram adicionados ao produto obtido, resina previamente inflada, na proporção de 2 equivalentes em realação ao produto obtido no acoplamento do (Fmoc)Ala-OH à resina Merrifield. As reações seguiram à temperatura

ambiente, durante 12 horas, e em microondas, em 9 ciclos de 1 minuto. Ambos os produtos passaram por processo de filtração e lavagem com DMF, água, etanol e éter etílico. Os produtos obtidos em ambas as reações foram reservados para a etapa de clivagem. A etapa de clivagem se deu pelo método já descrito utilizando-se 20% (v/v) TFA. Os produtos obtidos foram reservados para a caracterização e a avaliação de rendimento.

Experimento 18

Como no *Experimento 17*, foi realizado acompanhamento cinético do acoplamento do (Fmoc)Arg(PbF)-OH. Concomitantemente foram feitas as reações de acoplamento do (Fmoc)Arg(PbF)-OH em microondas e à temperatura ambiente.

★ À temperatura ambiente

Partindo-se de 400 mg de resina Merrifield (2,5 mmol/g) e excesso de 2 equivalentes para o (Fmoc)Arg(PbF)-OH (1296 mg); DIC (0,12 mL); HOBt (202,7 mg), à temperatura ambiente, retiraram-se alíquotas de 10 mg a cada hora, avaliando-se pelo teste colorimétrico de NBP (GALIANDO *et al.*, 2004). A reação permaneceu sob agitação moderada em *shaker* por 12 h. Em seguida, o produto foi filtrado e lavado com DMF, água, etanol, éter etilico.

★ Em microondas

Retiraram-se alíquotas de 10 mg, avaliando-se pelo teste colorimétrico de (GALINDO *et al.*, 2004) a cada ciclo de 1 minuto. Realizaram-se 9 ciclos de 1 minuto. O produto foi, então, filtrado e lavado com DMF, água, etanol, éter etílico. O acoplamento do (Fmoc)Lys(Boc)-OH foi realizado como descrito anteriormente nos dois métodos, microondas e temperatura ambiente. Ao produto obtido, previamente inflado, adicionaram-se os reagentes (Fmoc)Lys(Boc)-OH (886 mg); DIC (0,12 mL); HOBt (202,7 mg) na proporção de 1:2 equivalentes. As reações foram efetuadas à temperatura ambiente, durante 12 horas, e em microondas, em 9 ciclos de 1 minuto. Ambos os

produtos passaram por processo de filtração e lavagem com DMF, água, etanol e éter etílico.Os produtos obtidos em ambas as reações foram reservados para a etapa de clivagem. A etapa de clivagem se deu pelo método descrito anteriormente, utilizando-se 50% (v/v) TFA. Os produtos obtidos foram reservados para a caracterização e a avaliação de rendimento.

A.1.2 *Síntese dos pró-fármacos*

A.1.2.1 Síntese do pró-fármaco *NFCH$_2$-Phe*

a11. Acoplamento de (Fmoc)Phe-OH à resina de Merrifield

Experimento 19

Colocou-se 1 g de resina Merrifield (1 mmol/g) em contato com o DMF seco em meio livre de oxigênio por 10 minutos. Adicionaram-se os reagentes (Fmoc)Phe-OH, Cs_2CO_3 e KI em excesso de 2 equivalentes (esquema 4.i). A reação transcorreu em forno de microondas em 9 ciclos de 1 minuto. Após esse período, o produto foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. O acoplamento foi avaliado pelo teste de colorimetria por NBP (GALINDO *et al.*, 2004). O produto obtido na reação de acoplamento do aminoácido protegido (Fmoc)Phe-OH foi ressuspendido em pequena quantidade de DMF seco (3 mL), em condição livre de oxigênio, mantendo-se por 10 minutos nessa condição. Em seguida, adicionou-se quantidade de piperazina referente a 20% do volume do solvente e o meio reacional foi submetido a agitação moderada por 4 horas (esquema 4.ii). O produto resultante foi lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. Obteve-se produto cristalino, de cor branca amarelada clara. Esse produto foi ressuspenso em DMF seco (5 mL) e mantido por 10 minutos, em condição livre de oxigênio. Adicionaram-se os reagentes NFOH, DIC e HOBt, na proporção de 2:1 em relação ao substrato. A reação foi realizada em temperatura ambiente por 12 horas (esquema 4.iii). O produto resultante foi, então, lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. Obteve-se produto cristalino branco.

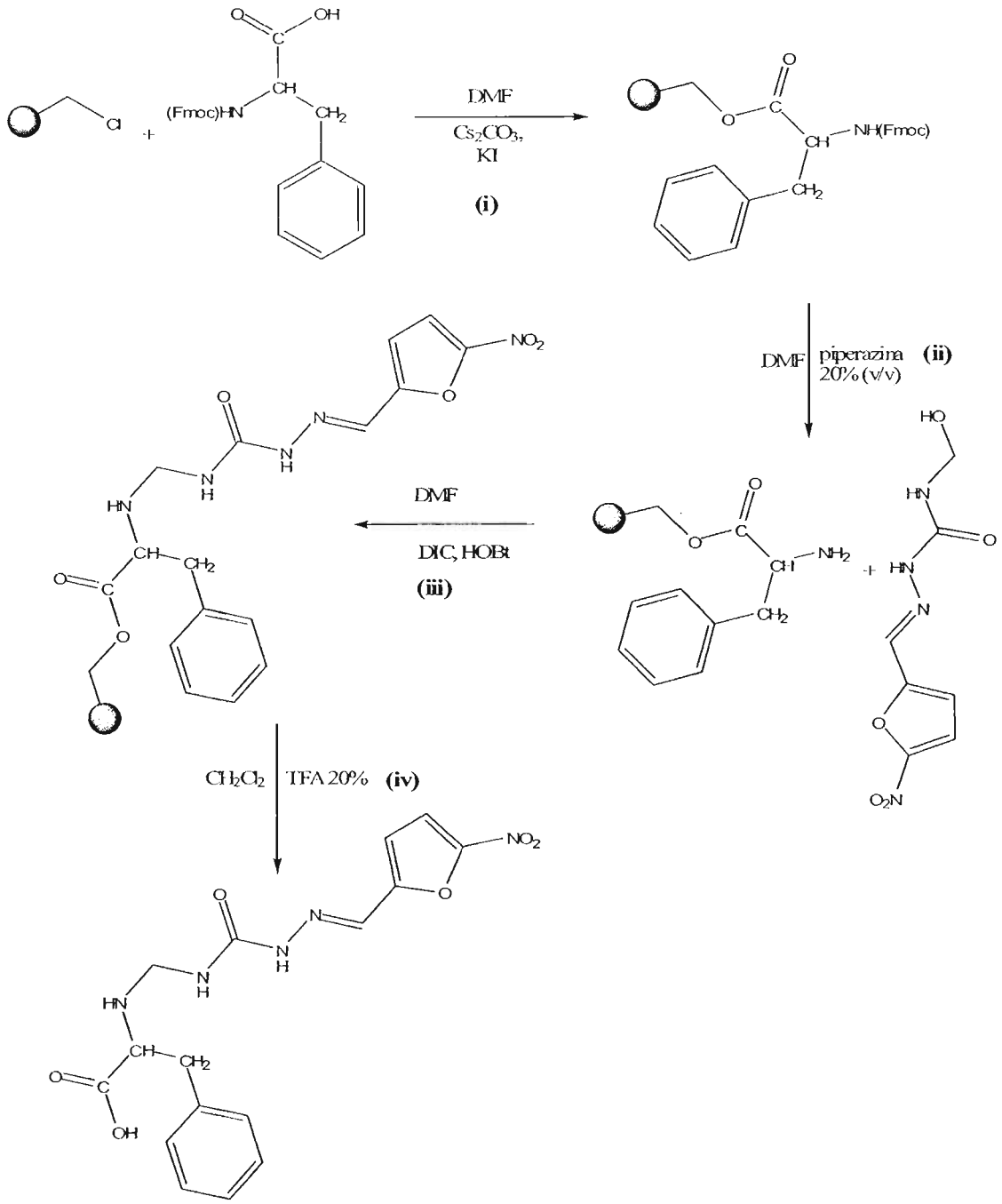
a12. Acoplamento de NFOH à Phe-OH acoplada

Experimento 20

Neste experimento, propos-se a síntese do pró-fármaco $NFCH_2$-Phe seguindo metodologia descrita nos *Experimentos de 2a* , porém o tempo de reação de acoplamento do NFOH perdurou por 48 horas (esquema 4.iii). O produto resultante foi, então, lavado com DMF, água, etanol e éter etílico. Obteve-se produto cristalino de cor amarela intensa. O produto foi suspenso em CH_2Cl_2 em condições livres de oxigênio. Em seguida, adicionou-se quantidade de TFA referente a 20% do volume do solvente e o meio reacional foi submetido a agitação moderada por 4 horas (esquema 4.iv). O produto obtido foi filtrado à pressão reduzida. Obteve-se pó cristalino branco e líquido de cor amarela intensa. O líquido foi secado à pressão reduzida. A análise por CCD do produto obtido sugeriu ter havido degradação do mesmo.

Experimento 21

O experimento foi realizado seguindo metodologia descrita no *Experimento 20*, porém alterando a etapa de clivagem do produto, utilizando-se 10% de TFA. O produto obtido foi suspenso em CH_2Cl_2, em condições livres de oxigênio. Em seguida, adicionou-se quantidade de TFA referente a 10% do volume do solvente e o meio reacional foi submetido a agitação moderada por 4 horas (esquema 4.iv). O produto obtido foi filtrado à pressão reduzida. Obteve-se pó cristalino branco e líquido de cor amarela intensa. O líquido foi secado à pressão reduzida. Em análise por CCD novamente verificou-se degradação do produto obtido.

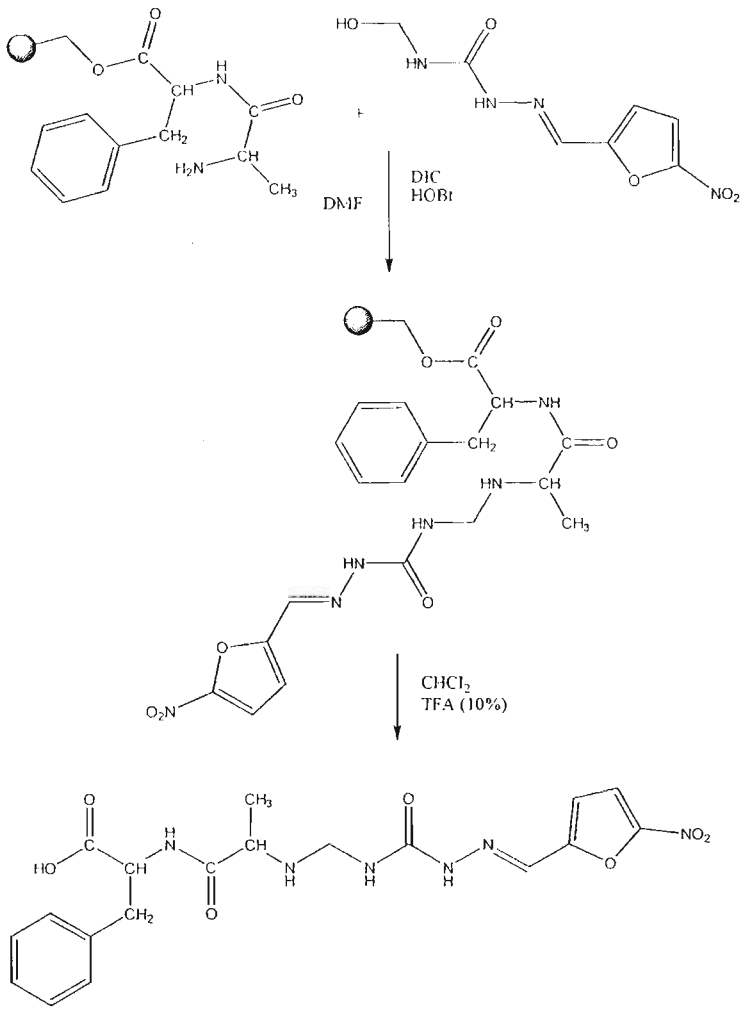


Esquema A.4 – Síntese proposta para o pró-fármaco $NFCH_2$-Phe em fase sólida.

A.1.2.2 Síntese do Pró-Fármaco PheAla-NF

Experimento 22

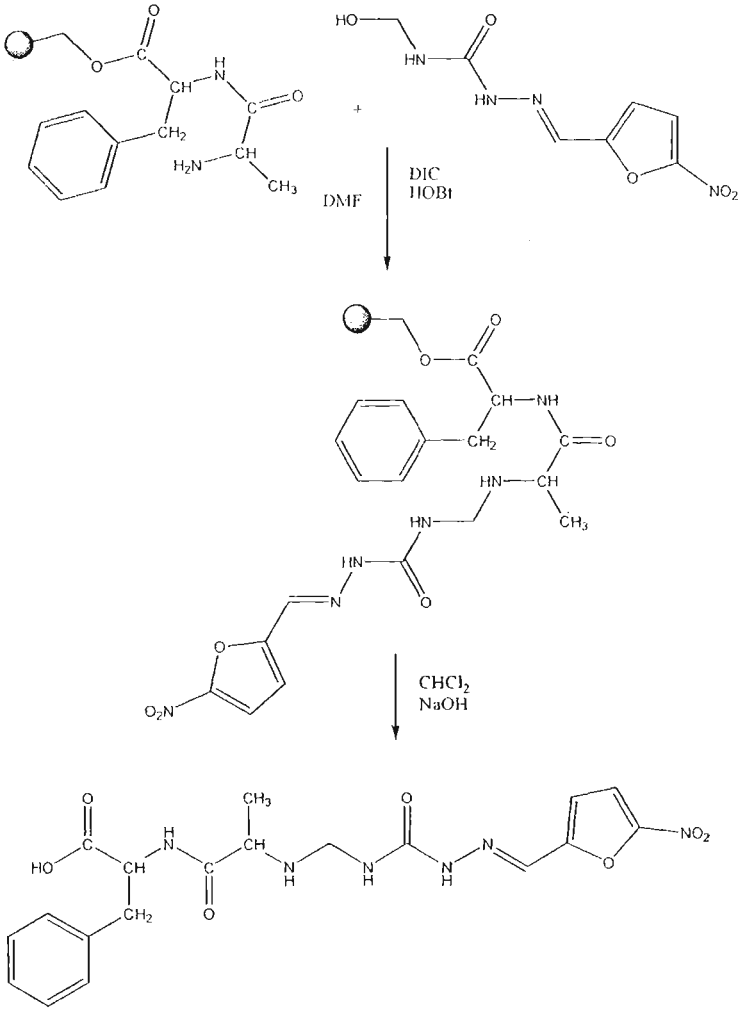
Neste experimento, propos-se a síntese do pró-fármaco $NFCH_2$-AlaPhe seguindo metodologia descrita no *Experimento 19*, porém partindo-se do dipeptídio PheAla acoplado à resina. Adicionaram-se o reagentes NFOH, DIC e HOBt, na proporção de 2:1 em relação ao substrato. A reação foi realizada em temperatura ambiente por 12 horas (esquema A.6). O produto resultante foi, então, lavado com DMF, água, etanol e éter etílico, obtendo-se pó amarelo. O produto foi suspenso em CH_2Cl_2 em condições livres de oxigênio. Em seguida, adicionou-se quantidade de TFA referente a 10% do volume do solvente e o meio reacional foi submetido a agitação moderada por 4 horas. O produto obtido foi filtrado à pressão reduzida. Obteve-se pó cristalino branco e líquido de cor amarela intensa. O líquido foi secado à pressão reduzida. A análise por CCD do produto obtido sugeriu ter havido degradação do mesmo.



Esquema A.6 - Síntese proposta para o pró-fármaco PheAla-NF.

Experimento 23

Repetiu-se o *Experimento 22*, porém modificando-se o método de clivagem, utilizando-se NaOH (esquema A.7). Ao produto obtido, $NFCH_2$-AlaPhe, ligado à resina adicionou-se solução do produto foi suspenso em CH_2Cl_2 em atmosfera livre de oxigênio. Ao produto suspenso adicionaram-se 2 mL de solução saturada de NaOH em CH_2Cl_2, mantendo-se em agitação branda por 24 horas. Obteve-se líquido amarelo leitoso, o qual foi extraído com solução saturada de NaCl. O produto obtido na extração foi liofilizado. Obteve-se um pó de amarelo intenso.



Esquema A.7 - Síntese proposta para o pró-fármaco PheAla-NF, utilizando NaOH para clivagem.

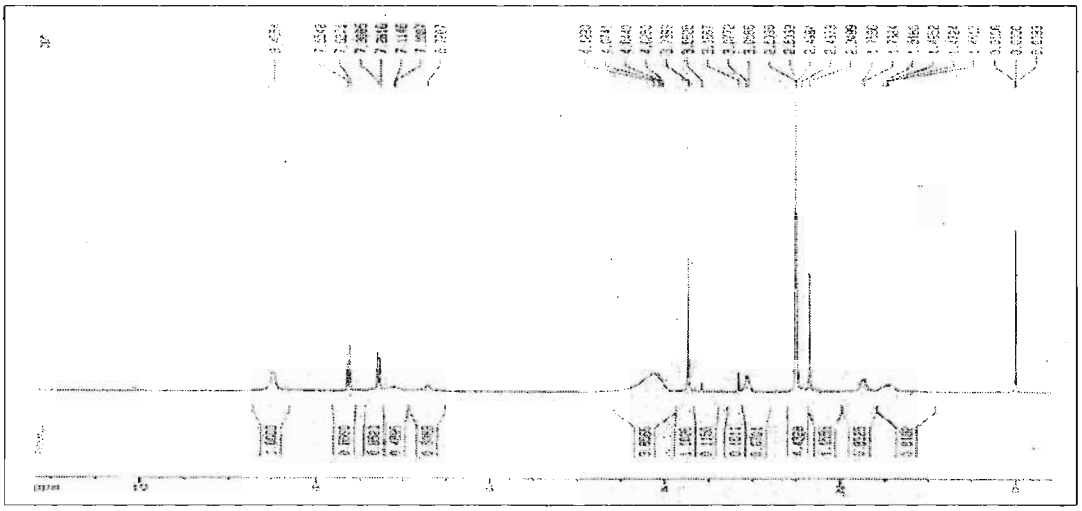
A.2 *Resultados e discussão*

A.2.1 *Síntese do dipeptídio Lys-ClZ-Arg(Tos)-OMe*

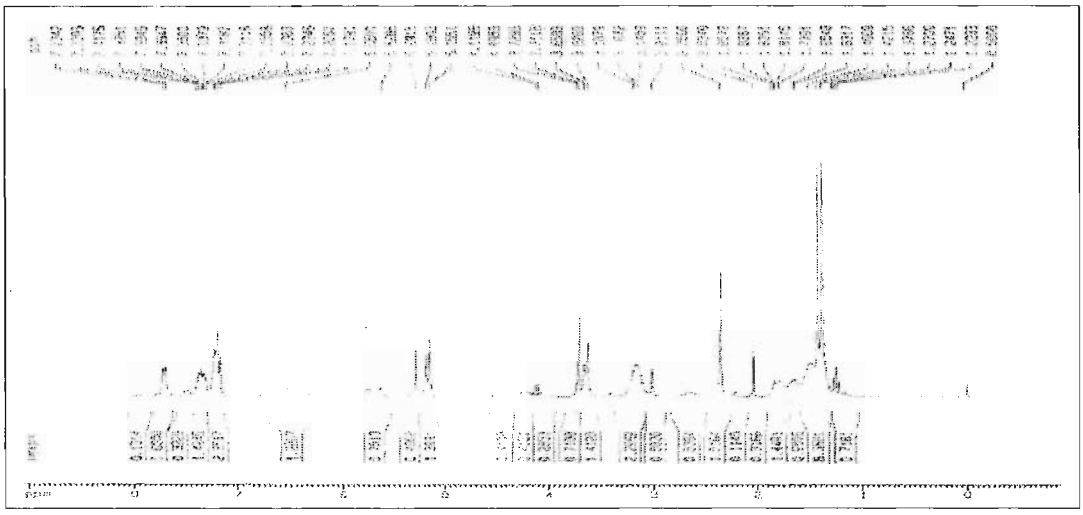
Experimento 1

Esse experimento foi realizado com o intuito de se obter o dipeptídio Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe, como intermediário de síntese de base de Mannich com o NF. Inicialmente, sintetizou-se o éster metílico do Boc-Arg(Tos)-OH, com desproteção da amina em α pela cisão do grupamento Boc. O produto obtido foi avaliado por RMN ^{1}H, comprovando-se a formação do produto obtido pela

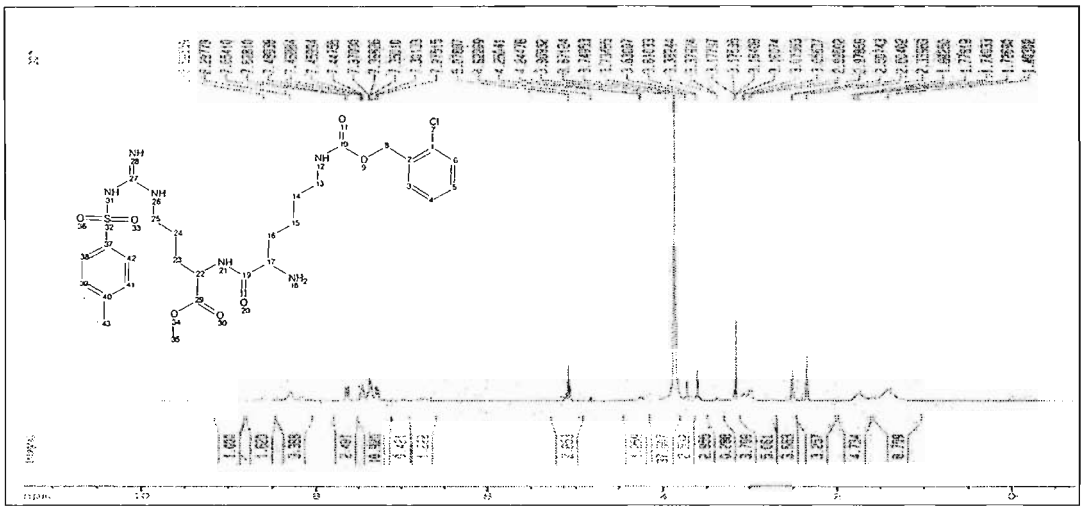
observação da ausência de sinal referente aos hidrogênios metílicos do Boc, entre 0,8 e 1,1 ppm, e, também, pelo sinal dos prótons da metoxila em 3,73 ppm (Espectro A.1). Procedeu-se, então, à reação de acoplamento com o éster obtido por meio de EDC/DMAP. Foi feita extração de DCM e acetato de etila do composto obtido, porém ambas as frações apresentaram o mesmo perfil tanto cromatográfico quanto de RMN ^{1}H e de ^{13}C. É importante ressaltar que tanto os aminoácidos quanto o éster são insolúveis em solução aquosa. Sendo assim, o material obtido nas duas extrações foi juntado e realizou-se lavagem com solução saturada de $NaHCO_3$, retirando, então, o material de partida que não havia reagido. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.2) comprova a formação do Boc-Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe devido a: duplo dupleto referente ao grupo protetor Tos em 7,6 e 7,3 ppm, sobreposto aos sinais do grupo protetor Cl-Z, ; sinal referente à metoxila, em 3,17 ppm, do éster Boc-Arg(Tos)-OMe, e sinal correspondente ao grupamento Boc em 1,22 ppm. Realizou-se, então, a desproteção do Boc da amina α do Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe. A análise por RMN ^{1}H (Espectro A.3) mostra a desproteção do peptídio pela ausência de sinal relativo ao grupamento Boc. O produto final da reação é o dipeptídio de lisina e argina protegido por éster metílico na carbonila, grupo tosila na amina, referente a amina ε da Arg e por Cl-Z, na amina referente à amina ε da lisina – Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe. As atribuições referentes aos hidrogênios do dipeptídio são apresentadas na Tabela A.1.



Espectro A.1 – RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) do Arg(Tos)-OMe.



Espectro A.2 – RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) do Boc-Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe.



Espectro A.3 – RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) H do Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe.

Tabela A.1 – Atribuições de RMN ^1H do Lys(ClZ)-Arg(Tos)-OMe

RMN ^1H (DMSO-d_6, 300 MHz, δ = ppm)
1,40-2,33 (m, 12H, H_{16}, H_{15}, H_{14}, H_{23}, H_{24} H_{25})*; 2,33 (s, 3H, H_{43}); 3,26-2,99 (m, 2H, H_{26}, H_{31}); 3,17 (s, 3H, H_{35}); 3,38 (s, 1H, H_{18}); 3,62 (s, 1H, H_{17}); 5,07 (s, 2H, H_8); 7,28 (d, J=7,8 Hz, 2H,H_{41}, H_{39})*; 7,35-7,46 (m, 4H, H_3,H_4, H_5, H_6)*; 7,63 (d, J=7,8 Hz, 2H, H_{42}, H_{38}); 8,59 (s, 1H, H_{21}); 8,29 (s, 2H, H_{12})

*sinais sobrepostos

A.2.2. *Síntese dos peptídios em fase sólida*

Visto ser uma técnica atual e, nos últimos anos, amplamente aplicada na síntese de peptídios, a Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS) foi utilizada para a obtenção dos peptídios propostos como grupos espaçantes dos pró-fármacos duplos de NF.

Nestes experimentos (de A.2 a A.17) foi proposto o acoplamento de um dos aminoácidos protegidos à resina Merrifield, seguindo-se as etapas de desproteção do grupo Fmoc, síntese de dipeptídio protegido com Fmoc, desproteção do grupo Fmoc e clivagem do dipeptídio da resina.

Inicialmente, a resina Merrifield é colocada em contato com o solvente, DMF, seco e à atmosfera inerte por 10 minutos, de modo a sofrer o processo de inflagem. Este processo é realizado de modo a expor os grupos reativos do polímero, resina, com o intuito de facilitar as reações de acoplamento.

Os reagentes foram adicionados em excesso de 2 equivalentes em relação à resina, de modo a favorecer o acoplamento. O acoplamento foi avaliado por meio do teste colorimétrico do NBP. Este apresenta boa predição de acoplamento, facilitando a análise na SOFS, o que não é rotineiro de ser feito.

A agitação, em síntese de fase sólida, deve ser moderada devido à necessidade de se manter íntegra a estrutura da resina.

O teste colorimétrico feito com 10 mg do produto obtido na reação foi realizado comparativamente a 10 mg da resina. A resina, após o teste, apresentou cor violeta intensa, devido à formação do produto entre o cloro livre e o NBP. Já a reação com os produtos das reações mantêm-se na cor branca, o que comprova a formação do produto desejado.

No processo de lavagem obteve-se no filtrado um líquido turvo, devido ao excesso de reagentes no meio reacional e, no precipitado, um pó cristalino branco, devido à ligação do aminoácido à resina.

No caso do emprego de microondas, as reações foram realizadas em 9 ciclos de 1 minuto, esfriando-se o material a cada ciclo. Este processo se deu devido ao fato de o aminoácido poder sofrer carbonização com o aumento intenso de temperatura.

Os produtos obtidos por meio de reações à temperatura ambiente e em microondas são macroscopicamente iguais, o que leva à conclusão de que elas se processam da mesma forma numa e outra condição, com a vantagem de que em microondas o tempo é muito menor.

A síntese do tetrapeptídio foi efetuada com parte dos dipeptídios reservada para sua obtenção. Não se efetuou a clivagem do tetrapeptídio da resina, em razão de que se pretende proceder à síntese do pró-fármaco final, também, em fase sólida. Dessa forma, haverá necessidade de se estabelecer as melhores condições, considerando-se a estabilidade da ligação do peptídio com o fármaco em relação à retirada dos grupos protetores.

Os derivados serão submetidos à espectrometria de massas, além da análise por RMN ^{1}H e ^{13}C, após completa purificação.

A.2.2.1 Comparação de SOFS à temperatura ambiente e em microondas

A comparação do método de SOFS à temperatura ambiente e com utilização do forno de microondas (Experimentos A.18 e A.19) foi proposta após a verificação do acoplamento em ambos os métodos e a perspectiva de, com o uso do forno de microondas, se realizar a síntese mais rapidamente e de

forma otimizada. Sendo assim, propuseram-se experimentos nos quais foi realizado o acompanhamento cinético do acoplamento dos aminoácidos (Fmoc)Phe-OH e (Fmoc)Arg(PbF)-OH à resina Merrifield, utilizando métodos já descritos em microondas e em temperatura ambiente. O acompanhamento analítico das reações de acoplamento foi realizado por meio do método colorimétrico do NBP. A análise do acoplamento foi realizada retirando-se alíquotas de 10 mg do produto da reação e procedendo ao teste. Para a síntese à temperatura ambiente as alíquotas foram retiradas de hora em hora. Já para a síntese em forno de microondas, as alíquotas foram retiradas a cada ciclo de um minuto.

As Figuras A.1 e A.2 mostram como se efetua o acompanhamento da síntese por meio do teste de NBP. A observação da Figura A.1, sendo os tubos: B=branco e os de 1 a 12 indicando os tempos de reação, em horas, o acoplamento total do aminoácido apenas no tubo 11, onze horas de reação. Já para a síntese em microondas, Figura A.2, observa-se que no terceiro minuto de reação, inicia-se a mudança na cor e até o sexto minuto ainda há vestígios de cor púrpura, sendo a reação completada a partir do sétimo minuto.

A partir da comparação entre a síntese à temperatura ambiente e em forno de microondas, verificou-se a formação mais rápida do produto, como já esperado. Após o término da reação, o produto foi filtrado e lavado com DMF, água, etanol, éter etílico.

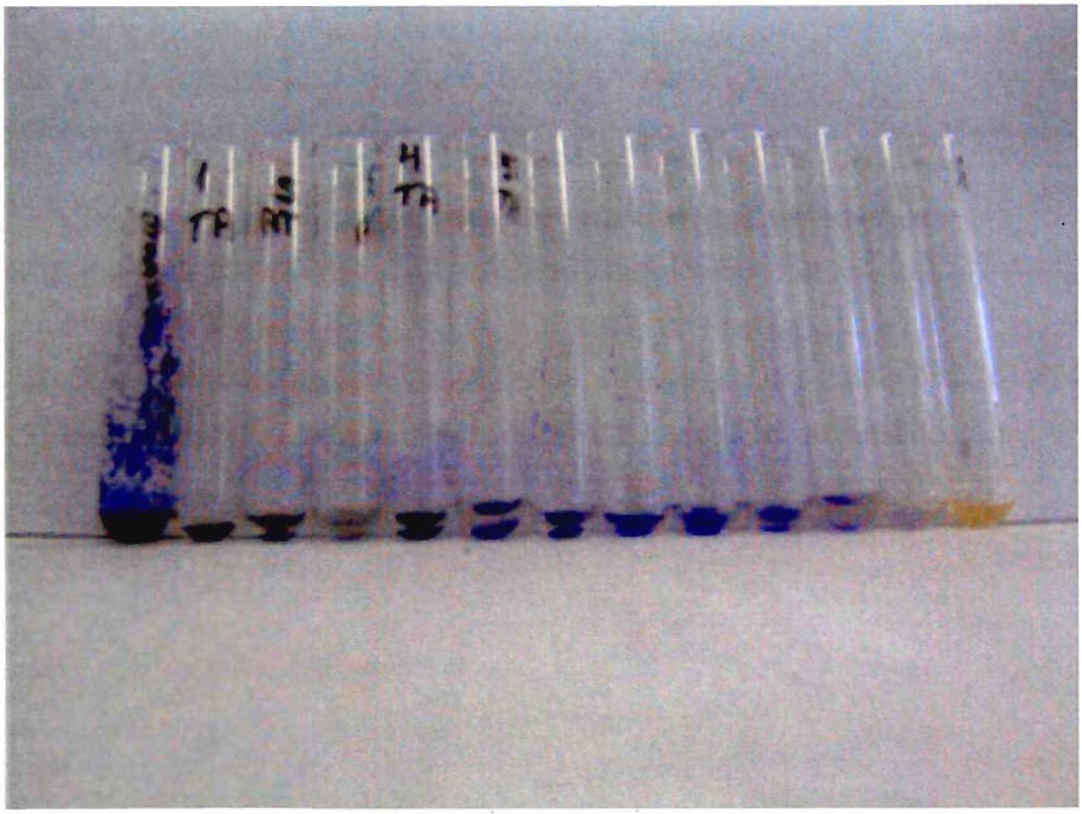


Figura A.1 – Acompanhamento da reação de acoplamento do (Fmoc)Phe-OH à resina Merrifield, realizada à temperatura ambiente, por meio do método calorimétrico do NBP. B=branco e, de 1 a 12, os tempos de análise da síntese em horas.

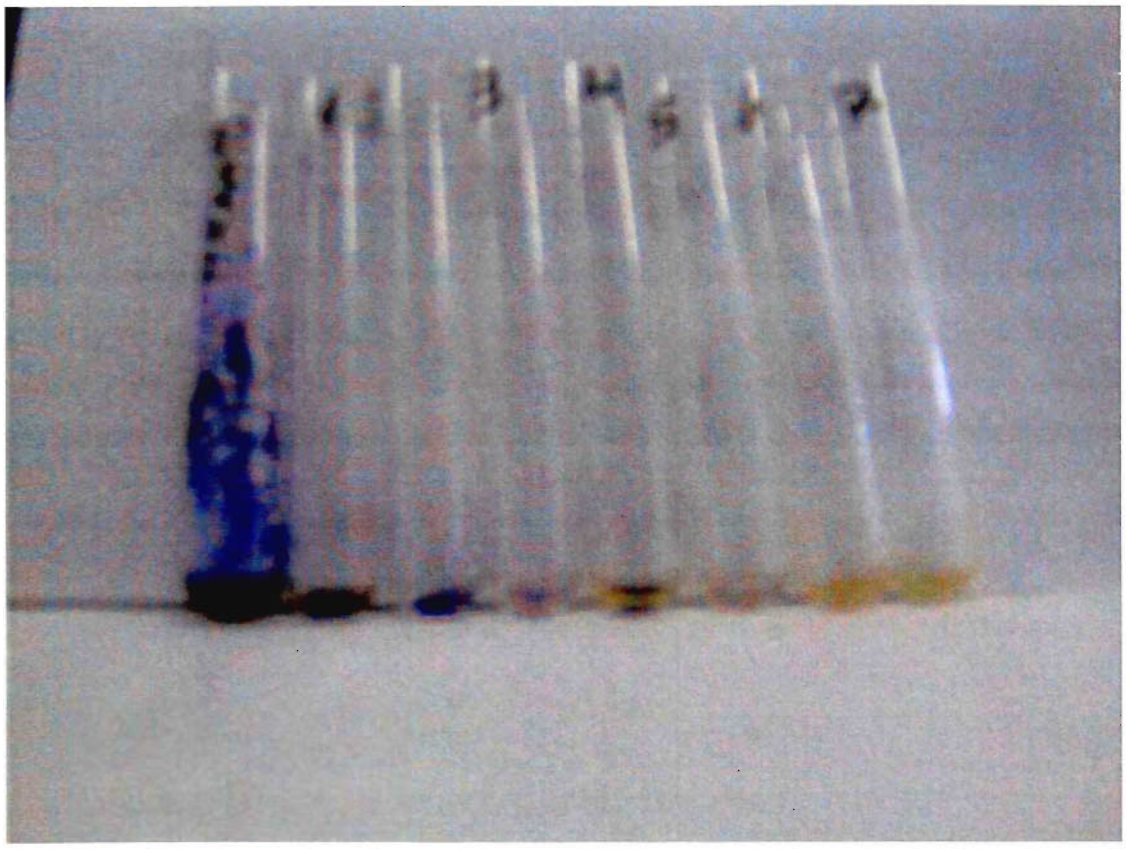


Figura A.2 – Apresentando o acompanhamento da reação de acoplamento do (Fmoc)Phe-OH à resina Merrifield, realizada em microondas, por meio do método colorimetrico do NBP. B=branco e, de 1 a 7, os tempos de análise da síntese, em minutos.

Pode-se observar, pela Figura A.2, que a reação de acoplamento efetuada em microondas é mais rápida, com o clareamento da cor do meio reacional a partir do tubo 5.

A Tabela A.2I mostra, comparativamente, as condições reacionais da síntese dos peptídios PheAla e LysArg à temperatura ambiente e em microondas. Comprova-se a redução do tempo reacional com o uso de microondas.

Tabela A.2 – Comparação entre o método de síntese do PheAla e do LysArg à temperatura ambiente e em forno de microondas

	PheAla	**PheAla**	**LysArg**	**LysArg**
1°aminoácido	(Fmoc)Phe-OH	(Fmoc)Phe-OH	(Fmoc)Arg(Pbf)-OH	(Fmoc)Arg(Pbf)-OH
Reação em	T.A.	microondas	T.A.	microondas
Tempo	12 h	9 min	12 h	9 min
Retirar Fmoc	4 h	4 h	4 h	4 h
2°aminoácido	(Fmoc)Ala-OH	(Fmoc)Ala-OH	(Fmoc)lys(Boc)-OH	(Fmoc)lys(Boc)-OH
Tempo	12 h	9 min	12 h	9 min
Retirar Fmoc	4 h	4 h	4 h	4 h
Clivagem	2 h	2 h	2 h	2 h
Tempo total	34 h	10h e 18 min	34 h	10h e18 mn

A.2.3 *Síntese de pró-fármacos do NF*

A.2.3.1_*Síntese do NFCH$_2$-Phe*

Para a síntese do pró-fármaco NFCH$_2$-Phe foi utilizado o método de Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS). Essa tentativa foi efetuada devido ao fato de que o método permite síntese limpa e o fácil isolamento do produto obtido.

Nestes experimentos, realizados em SOFS, foi proposto o acoplamento de um dos aminoácidos protegidos à resina Merrifield, seguindo-se as etapas de desproteção do grupo Fmoc, síntese do pró-fármaco do NFOH por meio de reação de acoplamento e clivagem do pró-fármaco da resina.

O acoplamento do aminoácido protegido foi realizado por meio de irradiação de microondas utilizando 9 ciclos de 1 minuto, como descrito anteriormente, método já validado em nosso laboratório. O acoplamento foi avaliado por meio do teste colorimétrico do NBP. A reação de acoplamento do derivado NFOH se deu com o uso de DIC e HOBt. Novamente, os reagentes foram adicionados em excesso de 2 equivalentes.

Na primeira tentativa (experimento A.20) de síntese do pró-fármaco $NFCH_2$-Phe a reação permaneceu sob agitação moderada por 12 horas, tempo este que foi considerado insuficiente após o termino da reação e avaliação do produto formado, sólido branco e cristalino. Este resultado sugeriu que produto desejado não se formou, tendo-se em vista que os compostos nitrados como o NFOH são amarelos.

Em uma segunda tentativa (experimento A.21), o tempo de reação de acoplamento do NFOH perdurou por 48 h. O produto obtido, de cor amarelo intenso, sugere o acoplamento do NF ao produto ligado à resina. Partiu-se, então, para a reação de clivagem do produto. Esta foi realizada em CH_2Cl_2, utilizando-se TFA referente a 20% do volume do solvente no meio reacional. A reação perdurou por 4 horas. O produto foi filtrado em funil sinterizado e secado, apresentando cor castanho- amarelada. O produto obtido no filtrado da reação foi avaliado por CCD, observando-se várias manchas, que sugerem a degradação do produto formado.

Foi realizada, ainda, a tentativa (experimento A.22) de clivagem do produto de reação, utilizando-se TFA referente a 10% do volume do solvente meio reacional com o intuito de ter uma condição mais branda. O produto obtido ao ser avaliado por CCD novamente apresentou sinais de degradação.

A.2.3.2 Síntese do pró-fármaco PheAla-NF

Nos experimentos A.22 e A.23 foram realizadas diferentes tentativas para a obtenção do pró-farmaco PheAla-NF. Este composto será utilizando como intermediário de síntese de pró-fármaco duplo de NFOH utilizando como espaçante o dipeptídio PheAla. Outro objetivo destes experimentos foi estabelecer condições sintéticas em fase sólida para outros pró-fármacos peptídicos a serem sintetizados.

Na primeira parte dos experimentos, efetuaram-se reações de acoplamento de aminoácidos e desproteção, como descrito anteriormente. O acoplamento do primeiro aminoácido foi avaliado pelo teste do NBP e, também, pela mudança na massa do produto após seca. Já o acoplamento do segundo aminoácido foi avaliado unicamente pela mudança do massa do produto obtido. Outros metodos colorimétricos para a avaliação do acoplamento do segundo

aminoácido, Ala, foram testados, porém, sem sucesso. O acoplamento do NFOH foi avaliado pela modificação da massa do produto obtido e, também, na mudança das características do produto. O produto obtido após o acoplamento do NFOH apresentou cor amarela intensa, diferente da cor branca do produto contendo somente os peptídios.

A diferença entre os dois experimentos, A.22 e A.23, foi a modificação do reagente utilizado na clivagem do porduto obtido. Para o experimento A.22 utilizou-se o TFA para a clivagem. Na análise por CCD do produto obtido após a clivagem observou-se degradação, constatando que este processo é muito drástico para o produdo para a síntese dos produtos desejados.

No experimento A.23, optou-se por utilizar o NaOH como reagente para a clivagem do produto formado (MERRIFIELD, 1997). Esse reagente foi escolhido, entre outros fatores, por que o NFOH é mais estável em meio básico do que em meio ácido. Após o processo de clivagem, obteve-se líquido amarelo leitoso, que foi submetido a extração com solução de NaCl saturada. O produto da extração foi liofilizado, obtendo-se pó amarelo, que, submetido a análise por CCD, apresentou uma única mancha.

O processo de clivagem utilizando NaOH se mostra promissor para a síntese do composto planejado, mas são necessários outros ajustes ao método, pois o rendimento da reação é baixo, em torno de 1%, dificultando as análises para caracterização do produto.

A.3 Referências Bibliográficas

BODANSZKY, M.; BODANSZKY, A. *The practice of peptide synthesis.* Cleveland: Springer-Verlag, Berlin, 1984. 179. p.

GALIANDO, F.; ALTAVA, B.; BURGUETE, M. I.; GAVARA, R.; LUIS, S. V. A sensiteve colorimetric method for the study of polystyrene Merrifield resins and chloromethyllated macroporous polymers. *J. Comb. Chem.,* v. 6, p. 859-861, 2004.

MERRIFIELD, B.; Concept and early development of solid-phase peptide syntesis. *Methods Enzymol., v.*308, p.3-13, 1997.

ANEXO 2

A.2 Colaborações e Estágios realizados

- Estágio no LaSSBio, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Eliezer J. L. Barreiro, no período 11 a 14 de dezembro de 2006, para treinamento no programa de Modelagem Molecular Flex E.

- Estágio no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Vera Lucia Eifler de Lima, no período de 18 de janeiro a 9 de fevereiro de 2007 para treinamento em síntese em fase sólida.

- Treinamento em modelagem molecular, estudos de QSAR 2D e 3D no grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, durante o período de 13 a 18 de agosto de 2007. O estágio foi realizado sob a supervisão do Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo.

- Estágio "sanduíche", realizado na University of New México – USA, supervisionado pelo Prof. Dr. Tudor I. Oprea. Durante o estágio, no período de 23 de outubro de 2007 a 2 de março de 2008, foi desenvolvido o projeto de pesquisa de novos antichagásicos seletivos baseada na estrutura da cruzaína.

- Estudos de *docking* utilizando o programa GOLD e ensaios enzimáticos foram realizados no laboratório de QSAR e Modelagem Molecular, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, coordenado pela Profa. Dra. Antônia Tavares do Amaral, e com a colaboração do Dr. Alberto Malvezzi e de Leandro de Rezende;

Ensaios de inibição da cruzaína foram realizados no Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo-SP (UNIFESP-SP), coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto e com a colaboração do Prof. Dr. Rodrigo L. O. R. Cunha.

Trabalhos resultantes da tese

Artigo submetido

TROSSINI, G. H. G.; GIAROLLA, G. REZENDE, L.; DO-AMARAL, A. T.; ZAIM, M. H.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, E.I. Synthesis optimization of hydroxymethylnitrofurazone, a potential antichagasic candidate, using 3^2 factorial design. *Tetrahedron Lett.,* submetido.

Artigos em preparação

- Artigo de QSAR 3D com os resultados de CoMFA e CoMSIA para os compostos derivados de (tio)semicarbazona com atividade inibitória da cruzaína, intitulado: ***Three-Dimensional Structure-Activity Relationships Studies on Trypanosoma cruzi Cruzain Inhibitors;*** Autores: TROSSINI, G. H. G.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D.

- artigo de estudo das propriedades estereoeletrônicas por modelagem molecular de derivados 5-nitro-heterociclicos intitulado: ***Theoretical and electrochemical investigations of properties of 5-nitroheterocyclic derivatives with potential anti-trypanosomal activity;*** Autores: PAULA, F. R.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I.; SERANO, S. H. P.; MENEZES, C. M.; TAVARES, L. C.

- Artigo do estudo das propriedades estereoeletrônicas e *docking* dos pró-fármacos dipeptídicos de primaquina com atividade antichagásica, intitulado: ***Molecular modeling study suggests cruzain specificity of peptide primaquine prodrugs;*** Autores: TROSSINI, G. H. G.; MENEZES, C. M.; FERREIRA, E. I.

- Artigo de modelagem molecular e estudos de inibição da cruzaína do NF e do NFOH, intitulado: ***AM1 molecular modeling study and cruzain inhibitory activity by hydroxymethylnitrofurazone, a nitrofurazone derivative;*** Autores: TROSSINI, G. H. G.; MALVEZZI, A. do-AMARAL, A. T., RANGEL-YAGUI, C. O.; IZIDORO, M.; CEZANI, M. H., JULIANO, L.; FERREIRA, E. I.

- Em colaboraçao com o prof. Dr. Mauro A. LaSacela entre outros, artigo sobre as propriedades oxi-redutoras do NF e do NFOH;

- Em colaboração com a doutoranda Jeanine Giarolla, entre outros, artigo sobre as propriedades de termodegradação e fotodegradação do NFOH.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DOS TRABALHOS NESTE ARQUIVO