

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

LUAN CARVALHO MARTINS

**Síntese, ensaios *in vitro* e estudos computacionais de aminoquinolinas
possíveis inibidoras da cruzaina e rodesaina**

Belo Horizonte – MG

2016

Luan Carvalho Martins

**Síntese, ensaios *in vitro* e estudos computacionais de
aminoquinolinas possíveis inibidoras da cruzaina e rodesaina**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

Orientadora: Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Rafaela Salgado Ferreira

Belo Horizonte – MG

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha amada esposa Di pelo carinho, pelo apoio, pela paciência e por tantas outras coisas. Obrigado por me dar a força e a vontade para continuar todos os dias.

Agradeço a meus pais e minhas irmãs que sempre me apoiaram e me incentivaram.

A professora Renata, pela paciência, pela dedicação e por toda a orientação ao longo destes dois anos. A professora Rafaela, pela paciência, pelo incentivo e pelo papel fundamental neste trabalho. Ao professor Ricardo pela sabedoria. Ao professor Pedro Pascutti por ter aberto as portas do laboratório e por toda a ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Química Farmacêutica pela companhia, pela solicitude, pelo café e pela ciência. Saulo, Marcela, Bruno, Stefânia, Raquel, Mara, Lucas, Dayara, Aline, Vítor, Flaviano e Renata, obrigado a todos vocês.

Aos amigos dos PPG em Bioquímica e PPG em Bioinformática Elany, Viviane, Rafael, Moema, Lucas e Francielly pela companhia, pela ajuda, pelas ideias e pelos bons momentos. Agradeço, especialmente, a Gláécia pela amizade e pela ajuda em tantos momentos.

Aos amigos do Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular da UFRJ que me receberam de braços abertos: Tácio, Priscila, Diego, Dani, Reinaldo, Rosemberg e Laura. Agradeço, especialmente, ao Pedro Torres por ter me orientado diretamente e contribuído tanto para este trabalho.

Finalmente, agradeço aos amigos que, de longe ou perto, me apoiaram: Érica, Kamila, Érick, Caio, André, Gustavo, Lucas, Halley, Eliezer, Patrícia, Nicole.

RESUMO

Este estudo relata a síntese, estudos *in vitro* e computacionais de aminoquinolinas potenciais inibidoras das enzimas cruzaina e rodesaina com possível atividade tripanossomicida. A doença de Chagas, cujo agente etiológico é o *Trypanossoma cruzi*, afeta cerca de oito milhões de pessoas em todo o mundo. A tripanossomíase africana humana, cujo agente etiológico é o *Trypanossoma brucei*, é um grave problema de saúde pública na África. A quimioterapia atualmente disponível para estas doenças apresenta eficiência limitada e toxicidade significativa. As cisteína proteases cruzaina e rodesaina, principais proteases do *T. cruzi* e *T. brucei*, respectivamente, são alvos farmacológicos validados. Uma série de possíveis inibidores da cruzaina e da rodesaina foram planejados com base em protótipo inibidor da cruzaina ($CI_{50} = 2,5 \mu\text{M}$) da classe das indol-pirimidinas. As substâncias sintetizadas possuem um grupo 7-cloro-4-aminoquinolina e variações no comprimento, basicidade e substituintes das cadeias laterais foram exploradas. Dezesesseis substâncias foram obtidas utilizando métodos eficientes com rendimentos variando de 16% a 99%. Os ensaios enzimáticos demonstraram que os compostos desta série inibem a cruzaina com CI_{50} de até $13,2 \mu\text{M}$ e a rodesaina com CI_{50} de até $33,3 \mu\text{M}$. O modo de inibição da substância mais potente contra a cruzaina foi determinado como competitivo. Foi avaliada também a atividade tripanossomicida da série contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e a citotoxicidade sobre fibroblastos não infectados. Foram identificadas três substâncias com CI_{50} menor do que $50 \mu\text{M}$, porém com baixo índice de seletividade. Estudos de ancoragem molecular utilizando estruturas cristalográficas da cruzaina e rodesaina foram realizados. Os resultados de ancoragem na cruzaina sugerem que o anel quinolínico pode ocupar o subsítio hidrofóbico S2 e a cadeia lateral, mais flexível, pode interagir com resíduos dos subsítios S3 ou S1'. Estudos de dinâmica molecular foram conduzidos e sugerem que o modo de ligação da substância mais potente contra a cruzaina pode ser dissimilar ao modo de ligação de ligantes cristalográficos possuindo grupos semelhantes. Os resultados sugerem que aminoquinolinas podem ser promissoras na busca por inibidores da cruzaina e rodesaina.

Palavras chave: cruzaina, rodesaina, aminoquinolinas, ancoragem molecular, dinâmica molecular

ABSTRACT

In this work a series of aminoquinolines, potential inhibitors of cruzain and rhodesain, was synthesized, evaluated on *in vitro* assays and studied by *in silico* methods. Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and about 8 million are estimated to be infected worldwide. Human African trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei* is a major health problem in Africa. Current drugs used in treatment of both diseases shows high toxicity and low efficacy. Cysteine proteases cruzain and rhodesain, major proteases of *T. cruzi* and *T. brucei* respectively, are validated drug targets. A series of potential inhibitors of cruzain and rhodesain was planned based on a lead indole-pyrimidine cruzain inhibitor ($IC_{50} = 2.5 \mu\text{M}$). The synthesized series contains a 7-chloro-4-aminoquinoline motif and various side chain lengths and basicity was explored. Sixteen compounds were prepared employing straightforward procedures with yields from 16% to 99%. Enzymatic assays showed that this series inhibited cruzain with CI_{50} as low as $13,2 \mu\text{M}$ and rhodesain with IC_{50} as low as $33,3 \mu\text{M}$. The most potent cruzain inhibitor, aminoquinoline **20b**, was found to be a competitive inhibitor. The activity of the compounds was evaluated *in vitro* against intracellular amastigotes *T. cruzi* and cytotoxicity on the normal fibroblast was evaluated. Among the compounds evaluated, three of them showed an IC_{50} lower than $50 \mu\text{M}$, however low selectivity indexes were found. Docking studies against crystallographic structures of cruzain and rhodesain were conducted. The results of these studies suggest that the quinoline moiety can occupy the S2 pocket while the more flexible side chain can explore either S3 or S1' pockets. In order to gain further insight on binding mode of the aminoquinoline **20b**, molecular dynamics were performed. The analysis of results suggests that the binding mode of this compound may differ from crystallographic binding modes of ligands containing similar groups. The results as a whole show that aminoquinolines may be a promising class in further investigations of cruzain and rhodesain inhibitors.

Keywords: cruzain, rhodesain, aminoquinolines, docking, molecular dynamics

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** – Ciclo de vida o *Trypanosoma cruzi*. 23
- Figura 1.2** – Estrutura química dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol. 26
- Figura 1.3** – Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. 29
- Figura 1.4** – Estrutura do atoxyl, primeira substância identificada com atividade tripanossomicida sobre o *T. brucei*, utilizado em humanos a partir de 1905. 30
- Figura 1.5** – Estrutura dos fármacos disponíveis para tratamento da Tripanossomíase Africana Humana. 31
- Figura 1.6** – Proposta do mecanismo de hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma cisteíno-protease. 35
- Figura 1.7** – (a) Representação da nomenclatura dos subsítios da cruzaina e dos resíduos complementares do substrato; (b) Representação dos subsítios em uma proteína da família da papaína. 36
- Figura 1.8** – Estrutura da vinilsulfona K11777 ou K777. 38
- Figura 1.9** – Sobreposição das estruturas cristaligráficas da cruzaina (estrutura 3KKU) e rodesaina (estrutura 2P86), em verde e ciano, respectivamente. O alinhamento foi executado exclusivamente utilizando os carbonos α da proteína. Figura preparada com o PyMOL. 41
- Figura 1.10** – Estrutura da vinilsulfona **1**, preparada por Bryant e colaboradores (2010) 43
- Figura 1.11** – Proposta de formação do intermediário o-quinonometídeo por transferência de próton a partir da alcil-hidrazina **2**. 43
- Figura 1.12** – Estruturas químicas de alguns inibidores não peptídicos da cruzaina (**3**, **4**, **5** e **6**) e rodesaina (**6**) 44
- Figura 1.13** – Estruturas químicas de alguns inibidores não peptídicos da rodesaina (**8** e **9**) e cruzaina e rodesaina (**7**). 46
- Figura 1.14** – Estruturas químicas da substância **10**, inibidor reversível da rodesaina, e do Neq176, inibidor competitivo da cruzaina. 47
- Figura 1.15** – Estrutura química de duas triazino-nitrilas **11** e **12**, inibidores competitivos da rodesaina e cruzaina. 48

Figura 1.16 – Estrutura química da criptolepina 13, preparada por Lavrado e colaboradores (2012), e de dois inibidores competitivos da cruzaina 14 e 15, identificados por Ferreira e colaboradores (2009) e Ferreira e colaboradores (2010).	49
Figura 2.1 – Esquema do planejamento de possíveis inibidores da cruzaina partindo do protótipo 15.	50
Figura 2.2 – Rota de síntese proposta para obtenção das substâncias 16a a 21b.	51
Figura 2.3 – Rota de síntese proposta para obtenção das substâncias 20b, 22, 23, 24 e 25.	52
Figura 4.1 – Ligantes cristalográficos da (a) estrutura 3KKU da cruzaina, B95, e (b) estrutura 2P86 da rodesaina, VS1	90
Figura 4.2 – Estrutura da substância 20b, para a qual foram gerados parâmetros compatíveis com o campo de força Amber.	91
Figura 5.1 – Mecanismo geral da reação de substituição nucleofílica aromática com a 4,7-dicloroquinolina.	96
Figura 5.2 – Rota sintética para obtenção da amina 28.	98
Figura 5.3 – Estrutura de ressonância de uma 4-amino-quinolina, ressaltando aumento da densidade eletrônica no nitrogênio do anel quinolínico.	103
Figura 5.4 – Mecanismo proposto para a redução do grupo azida com trifetilfosfina.	104
Figura 5.5 – Estrutura da N-(fenilacetil)-morfolina, substância estudada por RMN de ¹³ C por Bazzargani e Tafarzzoli (2013).	119
Figura 5.6 – Estruturas químicas da substância 20b, mais ativa da série contra a cruzaina, e da indol-pirimidina 15, protótipo do estudo.	128
Figura 5.7 – Estruturas químicas das substâncias 20a e 23.	130
Figura 5.8 – Gráfico de Michaelis-Menten da substância 20b contra a cruzaina com regressão não linear de modo de inibição competitivo.	131
Figura 5.9 – Gráfico duplo-recíproco de dados de 20b.	133
Figura 5.10 – Variação do K _m aparente para diferentes concentrações de inibidor.	134
Figura 5.11 – Comparação entre atividade tripanossomicida e atividade inibitória frente à cruzaina.	137

Figura 5.12 – Relação entre logD e atividade tripanossomicida. Valores de logD calculados utilizando a suíte ChemAxon Marvin 139

Figura 5.13 – (a) Sobreposição de estruturas cristalográficas da cruzaina (3KKU) e rodesaina (2P86), baseado em alinhamento dos carbonos alfa; (b) Mesmo alinhamento, ressaltando Glu208, Asn69 e Leu67 da estrutura cristalográfica da cruzaina em azul. Superfície da rodesaina em rosa. Resíduos Cys25, Leu67, Asn69 e Ala208 da rodesaina representados com carbonos em cinza. Figuras preparadas no PyMOL. 141

Figura 5.14 – Potencial eletrostático na superfície das enzimas cruzaina e rodesaina. Potencial eletrostático calculado utilizando o programa APBS (BAKER et al, 2001), figura preparada com a suíte AutoDockTools. 143

Figura 5.15 – Ligantes cristalográficos da (a) estrutura 3KKU da cruzaina, B95, e (b) estrutura 2P86 da rodesaina, VS1. 144

Figura 5.16 – (a) Sobreposição da estrutura cristalográfica do ligante B95, com carbonos em roxo, e das poses com melhor pontuação de ancoragem; pose A com carbonos em verde, pose B com carbonos em amarelo e pose C com carbonos em laranja. (b) Sobreposição da estrutura cristalográfica do ligante B95, em com carbonos em roxo, e da pose D, com menor RMSD em relação à estrutura cristalográfica, com carbonos em vermelho. 145

Figura 5.17 – Poses mais representativas obtidas no estudo de redocking da rodesaina, estrutura 2P86. Ligante cristalográfico VS1 representado em roxo, três poses obtidas representadas em laranja, verde e amarelo. Oxigênios em vermelho, nitrogênios e azul e hidrogênios polares em branco. 147

Figura 5.18 - Principais poses de ancoragem da indolpirimidina **15**: (a) poses do grupo A, com carbonos em diferentes tons de verde; (b) pose B, com carbonos em roxo e contatos polares; (c) poses do grupo A, vista em ângulo, ressaltando interações polares. (d) Estrutura química da indolpirimidina **15**. 148

Figura 5.19 – Sobreposição de todas as poses representativas para todas as substâncias sintetizadas ancoradas à enzima cruzaina. Os ligantes com três carbonos na cadeia lateral aparecem em azul, aqueles com dois carbonos em vermelho e **22** e **24** em verde. (a) poses nas quais a cadeia lateral interage com S1 e S1'. (b) poses nas quais a cadeia lateral interage com S3. (c) poses nas quais a cadeia lateral interage com a borda de S2, sobre Glu208. (d) todas as poses calculadas, em evidência a região da superfície da cruzaina explorada pelas substâncias ancoradas. 150

Figura 5.20 – Relação entre atividade das substâncias sintetizadas e sua pontuação de ancoragem para a cruzaina. Barras de erro indicam o desvio padrão dos ensaios. 151

Figura 5.21 – Representação dos dois grupos de poses de menor energia da molécula **20b** ancorada na cruzaina: (a) cadeia lateral de **20b** interagindo com S1'; (b) cadeia lateral de **20b** interagindo com S3. Figuras preparada no PyMOL; (c) estrutura química de **20b**. 153

Figura 5.22 – Sobreposição de pose de ancoragem de **20b** sobreposto às duas estruturas cristalográficas de inibidores contendo um anel morfolínico. A substância **20b** está representada com carbonos em verde e hidrogênios polares em branco. O ligante da estrutura depositada no PDB sob código 1EWP está representada com carbonos em azul claro. O ligante da estrutura depositada no PDB sob código 1F29 está representada com carbonos em bonina. Átomos de oxigênio estão representados em vermelho, átomos de nitrogênio em azul escuro e átomos de enxofre em amarelo. O alinhamento estrutural foi feito exclusivamente com os carbonos alfa da proteína. Figura preparada no PyMOL. 154

Figura 5.23 – Estrutura química das substâncias OI5, cocrystalizada com a cruzaina na estrutura 1EWP, e VS1, cocrystalizada com a cruzaina na estrutura 1F29. 154

Figura 5.24 – Sobreposição das poses de ancoragem de **20b**, com carbonos em laranja, e da indolpirimidina **15**, com carbonos em verde. Nitrogênios estão representados em azul, oxigênios em vermelho, hidrogênios polares em branco e interações de hidrogênio preditas em traços amarelos. 155

Figura 5.25 – (a) Estrutura química de **20a**; (b) Estrutura química de **21b**; sobreposição das poses de ancoragem na cruzaina nas quais a cadeia lateral ocupa S3 para as substâncias **20b** e (c) **20a** e (d) **21b**. A substância **20b** está representada com carbonos em laranja, a substância **20a** com carbonos em roxo e a substância **21b** com carbonos em ciano. Nitrogênios estão representados em azul, oxigênios em vermelho, cloro em verde e hidrogênios polares em branco. Figuras preparadas com PyMOL. 156

Figura 5.26 – (a) Estrutura química da substância **20a**; (b) Estrutura química da substância **23**; sobreposição de poses das moléculas **20a** (carbonos em roxo) e **23** (carbonos em verde) ancoradas na cruzaina, nas quais as cadeias laterais exploram (c) S3 e (d) S1'. Átomos de oxigênio estão representados em vermelho, nitrogênios em azul, e hidrogênios polares em branco. Figuras (c) e (d) preparadas com PyMOL. 157

Figura 5.27 – (a) Estrutura química da substância **16b**; (a) Única pose de ancoragem prevista para **16b** na enzima cruzaina. Carbonos de **16b** estão representados em rosa e carbonos das cadeias laterais da proteína em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e hidrogênios polares em branco. Em destaque duas possíveis interações de hidrogênio intermoleculares. 158

Figura 5.28 – (a) Estrutura química da substância **22**; poses de melhor pontuação de ancoragem para **22** na cruzaina, nas quais se observa o grupo benzilamina posicionado em (b) S1' ou (c) S3. Carbonos de **22** estão representados em rosa, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e hidrogênios polares em branco. 159

Figura 5.29 – (a) Sítio ativo da rodesaina com triade catalítica em destaque; (b) Sítio ativo com subsítios assinalados. Modelo gerado baseado na estrutura cristalográfica depositada no RSCB PDB sob código 2P86. 160

Figura 5.30 – (a) Vinilsulfona VS1, cocrystalizada com a cruzaina (1F29) e rodesaina (2p86); (b) Sobreposição das estruturas cristalográficas 1F29 e 1EWP ressaltando

similaridade a posição do ligante. Superfície da rodesaína em cinza. Carbonos do ligante da estrutura 1F29 em salmão, carbonos do ligante da estrutura 1EWP em roxo, carbonos de resíduos da rodesaína em cinza. Oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, enxofres em amarelo. 161

Figura 5.31 – Sobreposição das poses representativas para todos os ligantes ancorados na rodesaína, após verificação manual. Figura preparada com PyMOL. 161

Figura 5.32 – Relação entre atividade das substâncias sintetizados e sua pontuação de ancoragem para a rodesaína. Barras de erro indicam o desvio padrão dos ensaios. 162

Figura 5.33 – Poses de menor energia para substâncias (a) **22** e (b) **23**, ambas ancorados na rodesaína. Figura preparada no PyMOL. 163

Figura 5.34 – Comparação de modos de ligação propostos para (a) **17a** e (b) **17b** ancorados na rodesaína; em destaque possíveis interações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares com Ser210. Figura preparada com PyMOL. 164

Figura 5.35 – Comparação da pose predita para **20b** ancorado às enzimas (a) cruzaina e (b) rodesaína, com destaque para uma possível interação de hidrogênio com Ala210. Carbonos de **20b** em laranja, carbonos das cadeias laterais da proteína em cinza, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho. Figura preparada com PyMOL. 165

Figura 5.36 – Estrutura química da substância **20b**. 166

Figura 5.37 – Resultado do agrupamento UPGMA utilizando limiares de corte de 13 Å (acima) e 7 Å (abaixo). Cores utilizadas para ressaltar separação entre os grupos. Figura preparada com a biblioteca Matplotlib. 167

Figura 5.38 – Prevalência de interações de hidrogênio entre moléculas de água e a substância **20b** utilizando dois conjuntos de carga atômica gerados. 168

Figura 5.39 – Sobreposição de quadros igualmente espaçados da trajetória de **20b** em água. Figura preparada com VMD. 170

Figura 5.40 – Raio de giração das duas réplicas das dinâmicas da (a) cruzaina e (b) rodesaína. 171

Figura 5.41 – RMSF dos resíduos da (a) cruzaina e (b) rodesaína avaliados ao longo de 200 ns de dinâmica. 172

Figura 5.42 – Evolução temporal da distância do centro de massa da cruzaina e do ligante **20b** para ambas a (a) réplica 1 e (b) réplica 2. 173

Figura 5.43 – Sobreposição de quadros igualmente espaçados dos primeiros 110 ns da trajetória da dinâmica de **20b** com a cruzaina. Conformações mais frequentes são

representadas em tons vermelhos e menos frequentes em tons brancos. Figura preparada no VMD. 174

Figura 5.44 – Gráfico de RMSD bidimensional para o ligante **20b** ao longo dos primeiros 110 ns da trajetória da dinâmica com a cruzaina. Regiões mais claras indicam valores maiores de RMSD. 174

Figura 5.45 – Gráficos da (a) distância do centro de massa da rodeaina e ligante **20b** e (b) RMSD do ligante **20b**. 175

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Comparação dos parâmetros epidemiológicos da Doença de Chagas de 1990 a 2006. Adaptado de Organização Mundial da Saúde, <i>Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas</i> (WHO, 2007)	25
Tabela 4.1 – RMN de ^1H de 16a (200MHz, DMSO-d6)	56
Tabela 4.2 – RMN de ^{13}C de 16a (50MHz, DMSO-d6)	56
Tabela 4.3 – RMN de ^1H de 16b (200MHz, DMSO-d6)	57
Tabela 4.4 – RMN de ^{13}C de 16b (50MHz, DMSO-d6)	58
Tabela 4.5 – RMN de ^1H de 17a (200MHz, DMSO-d6)	60
Tabela 4.6 – RMN de ^{13}C de 17a (50MHz, DMSO-d6)	61
Tabela 4.7 – RMN de ^1H de 17b (200MHz, DMSO-d6)	62
Tabela 4.8 – RMN de ^{13}C de 17b (50MHz, DMSO-d6)	62
Tabela 4.9 – RMN de ^1H de 18a (200MHz, CDCl3)	64
Tabela 4.10 – RMN de ^{13}C de 18a (50MHz, CDCl3)	64
Tabela 4.11 – RMN de ^1H de 18b (200MHz, CDCl3)	66
Tabela 4.12 – RMN de ^{13}C de 18b (50MHz, CDCl3)	66
Tabela 4.13 – RMN de ^1H de 19a (200MHz, D2O)	68
Tabela 4.14 – RMN de ^{13}C de 19a (50MHz, D2O)	68
Tabela 4.15 – RMN de ^1H de 19b (200MHz, D2O)	69
Tabela 4.16 – RMN de ^{13}C de 19b (50MHz, D2O)	70
Tabela 4.17 – RMN de ^1H de 20a (200MHz, DMSO-d6)	71
Tabela 4.18 – RMN de ^{13}C de 20a (50MHz, DMSO-d6)	72
Tabela 4.19 – RMN de ^1H de 21a (200MHz, DMSO-d6)	73

Tabela 4.20 – RMN de ^{13}C de 21a (50MHz, DMSO-d6)	73
Tabela 4.21 – RMN de ^1H de 21b (200MHz, DMSO-d6)	75
Tabela 4.22 – RMN de ^{13}C de 21b (50MHz, DMSO-d6)	75
Tabela 4.23 – RMN de ^1H de 20b (400MHz, DMSO-d6)	77
Tabela 4.24 – RMN de ^{13}C de 20b (50MHz, DMSO-d6)	77
Tabela 4.25 – RMN de ^1H de 22 (200MHz, CDCl_3)	80
Tabela 4.26 – RMN de ^{13}C de 22 (50MHz, CDCl_3)	80
Tabela 4.27 – RMN de ^1H de 23 (200MHz, DMSO-d6)	82
Tabela 4.28 – RMN de ^{13}C de 23 (50MHz, DMSO-d6)	82
Tabela 4.29 – RMN de ^1H de 24 (200MHz, DMSO-d6)	84
Tabela 4.30 – RMN de ^{13}C de 24 (50MHz, DMSO-d6)	84
Tabela 4.31 – RMN de ^1H de 25 (200MHz, CDCl_3)	86
Tabela 4.32 – RMN de ^{13}C de 25 (50 MHz, CDCl_3)	86
Tabela 5.1 – Comparação de rendimentos para diferentes condições empregadas para síntese de 22 .	97
Tabela 5.2 – Faixas de fusão determinadas para as substâncias sintetizadas e faixas de fusão relatadas na literatura	106
Tabela 5.3 – Números de onda de algumas bandas selecionadas nos espectros no infravermelho de 16a , 16b , 20b , 22 , 23 , 24 e 25 .	107
Tabela 5.4 – Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios do anel quinolínico nos espectros de RMN de ^1H das substâncias preparadas neste trabalho.	109
Tabela 5.5 – Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos carbonos do anel quinolínico observados nos espectros de RMN de ^{13}C das substâncias preparadas neste trabalho.	111
Tabela 5.6 – Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios das cadeias laterais das substâncias 16a , 16b , 20b , 22 , 23 , 24 e 25 .	116

Tabela 5.7 – Deslocamento químico dos sinais referentes aos carbonos das cadeias laterais de 16a , 16b , 20b , 22 , 23 , 24 e 25 .	117
Tabela 5.8 – Comparação dos deslocamentos químicos do sinal referente ao carbono ligado ao oxigênio nos alcoóis de partida 16a e 16b em relação aos compostos mesilados 17a e 17b .	120
Tabela 5.9 – Comparação dos deslocamentos químicos dos sinais referente aos hidrogênios e carbonos ligados aos grupos metanosulfonila em 17a e 17b em relação aos derivados azido 18a e 18b .	121
Tabela 5.10 – Deslocamento químico dos sinais referentes aos carbonos e hidrogênios evidenciando a formação dos produtos 20a , 21a e 21b .	124
Tabela 5.11 – Inibição da atividade das enzimas cruzaina e rodesaina e CI50 dos compostos mais ativos.	126
Tabela 5.12 – Estatística da regressão não linear do modelo de inibição competitivo.	132
Tabela 5.13 – Parâmetros cinéticos para as curvas de Michaelis-Menten em diferentes concentrações de inibidor.	132
Tabela 5.14 – Estatística da regressão linear para dados da Figura 6.3 .	134
Tabela 5.15 – Resultados de atividade tripanossomicida contra forma amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade contra fibroblastos murinos.	135
Tabela 5.16 – Valores de logD para cada uma das substância sintetizadas. logD calculados utilizando a suíte ChemAxon Marvin.	139
Tabela 5.17 – Dados estatísticos do alinhamento das estruturas cristaligráficas da cruzaina (estrutura 3KKU) e rodesaina (estrutura 2P86) utilizando os carbonos α . Alinhamento da sequência executado com algoritmo descrito por Smith e Waterman (SMITH; WATERMAN, 1981), matriz de pontuação BLOSUM80	142
Tabela 5.18 – Decomposição da energia livre de ligação predita para a pose A, com melhor pontuação de ancoragem, e pose D, com RMSD mais próximo ao ligante cristalográfico.	146
Tabela 5.19 – Individualização das contribuições para a pontuação das duas poses de ancoragem de 17a e 17b representas na Figura 5.29 . Valores extraídos do resultado do AutoDock 4.2.	164
Tabela 5.20 – Dados estatísticos para os agrupamentos executados com diferentes limiares para formação de grupos.	167

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 4.1 – Equação do fator de Boltzman	92
Equação 4.2 – Função de potencial torcional de diedros de Ryckaert-Bellemans	93
Equação 5.1 – Equação de Michaelis-Menten	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
arom.	Aromático
Asn	Asparagina
assim.	Assimétrico
BHC	Barreira hematoencefálica
CAM	Molibdato Cérico de Amônio
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCS	Cromatografia em coluna de sílica
CI ₅₀	Concentração de um inibidor requerida para inibir a atividade de uma enzima em 50%
Cys	Cisteína
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FF	Faixa de Fusão
FM	Fórmula molecular
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
HAT	Tripanossomíase africana humana
HF	Hatree-Fock
His	Histidina
Ile	Isoleucina
IS	Índice de Seletividade
IV	Infravermelho

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (Continuação)

Leu	Leucina
lit.	Literatura
Lys	Lisina
m	Mutipleto
Met	Metionina
MM	Massa molar
MsCl	Cloreto de metanosulfonila
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.	Página
p/v	Peso por volume
Pd/C	Paládio 5% (p/p) em carvão ativado
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
pKa	Constante de dissociação ácida
ppm	Partes por milhão
Pro	Prolina
q	Quarteto
quint	Quinteto
Rend.	Rendimento
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RMSF	<i>Root mean square fluctuation</i>
s	Simpleto
Ser	Serina
sim.	Simétrico

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (Conclusão)

S _N 2	Substituição nucleofílica bimolecular
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
TEA	Trietilamina
Temp.	Temperatura
THF	Tetraidrofurano
Thr	Treonina
TMS	Tetrametilsilano
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
v/v	Volume por volume
Val	Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Doença de Chagas	22
1.2 Tripanossomíase Africana Humana	28
1.3 Cisteíno-protease cruzaina como alvo no desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da doença de Chagas	33
1.4 Cisteíno-protease rodesaina como alvo no desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da Tripanossomíase Africana Humana	39
1.5 Planejamento de inibidores das cisteíno proteases cruzaina e rodesaina com potencial tripanossomicida	41
2 PLANO DE SÍNTESE	50
3 OBJETIVOS	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 Síntese	54
4.1.1 Método geral para síntese da 7-cloro-4-(2-hidroxiethylamino) quinolina (16a) e 7-cloro-4-(3-hidroxiethylamino) quinolina (16b)	54
4.1.1.1 7-cloro-4-(2-hidroxiethylamino) quinolina (16a)	55
4.1.1.2 7-cloro-4-(3-hidroxiethylamino)-quinolina (16b)	57
4.1.2 Método geral para síntese de 7-cloro-4-[(2-metanosulfoniloxietil)amino] quinolina (17a) e 7-cloro-4-[(2-metanosulfoniloxipropil)amino] quinolina (17b)	58
4.1.2.1 7-cloro-4-[(2-metanosulfoniloxietil)amino] quinolina (17a)	59
4.1.2.2 7-cloro-4-[(2-metanosulfoniloxipropil)amino] quinolina (17b)	61
4.1.3 Método geral para síntese de 7-cloro-4-(2-azidoethylamino) quinolina (18a) e 7-cloro-4-(3-azidopropilamino) quinolina (18b)	63
4.1.3.1 7-cloro-4-(2-azidoethylamino) quinolina (18a)	63
4.1.3.2 7-cloro-4-(3-azidopropilamino) quinolina (18b).....	65
4.1.4 Método geral para síntese de 7-cloro-4-(2-aminoethylamino) quinolina (19a) e 7-cloro-4-(3-aminopropilamino) quinolina (19b)	66
4.1.4.1 Cloridrato de 7-cloro-4-(2-aminoethylamino)-quinolina (19a)	67
4.1.4.2 Cloridrato de 7-cloro-4-(3-aminopropilamino) quinolina (19b)	69
4.1.5 Método geral para síntese de 7-cloro-4-[2-(1-morfolinil)ethylamino]-quinolina (20a), 7-cloro-4-[2-(1-piperidinil)ethylamino]-quinolina (21a), 7-cloro-4-[3-(1-piperidinil)propilamino]-quinolina (21b)	70

4.1.5.1 7-cloro-4-[2-(1-morfolinil)etilamino] quinolina(20a)	71
4.1.5.2 7-cloro-4-[2-(1-piperidinil)etilamino] quinolina (21a).....	72
4.1.5.3 7-cloro-4-[3-(1-piperidinil)propilamino] quinolina (21b)	74
4.1.6 7-cloro-4-[3-(1-morfolinil)propilamino] quinolina (20b).....	76
4.1.7 7-cloro-N-(fenilmetil)-4-quinolinamina (22).....	78
4.1.8 Método geral para síntese de 2-[(4-cloroquinolin-4-il)amino]-1-(morfolin-4-il)etanona (23) e 2-[4-(7-cloro-4-quinolinil)-1-piperazinil]etanol (24)	80
4.1.8.1 2-[(4-cloroquinolin-4-il)amino]-1-(morfolin-4-il)etanona (23).....	81
4.1.8.2 2-[4-(7-cloro-4-quinolinil)-1-piperazinil]etanol (24)	83
4.1.9 7-cloro-N-propil-4-quinolinamina (25).....	85
4.2 Ensaio enzimáticos	86
4.3 Ensaio de atividade dos compostos sobre as formas amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	87
4.4 Estudos de ancoragem molecular.....	88
4.5 Dinâmica molecular.....	90
4.5.1 Parametrização	90
4.5.2 Dinâmica molecular	93
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
5.1 Síntese	95
5.1.1 Síntese de 16a, 16b, 20b, 22, 23, 24 e 25.....	95
5.1.2 Síntese de 17b e 17a	99
5.1.3 Síntese de 18b e 18a	100
5.1.4 Síntese de 19b e 19a	101
5.1.5 Síntese de 20a, 21a e 21b	104
5.2 Caracterização das substâncias sintetizadas.....	105
5.2.1 Caracterização das substâncias pela faixa de fusão	105
5.2.2 Caracterização das substâncias por infravermelho	107
5.2.3 Caracterização das substâncias por RMN.....	109
5.2.3.1 Dados de RMN do anel quinolínico.....	109
5.2.3.2 Dados de RMN dos substituintes da cadeia lateral.....	115
de 16a, 16b, 20b, 22, 23, 24 e 25	115
5.2.3.3 Dados de RMN dos substituintes da cadeia lateral de 17a e 17b	119
5.2.3.4 Dados de RMN dos substituintes da cadeia lateral de 18a e 18b	120
5.2.3.5 Dados de RMN dos substituintes da cadeia lateral de 19a e 19b	122
5.2.3.6 Dados de RMN dos substituintes da cadeia lateral de 20a, 21a e 21b	123
5.3 Resultados de inibição enzimática	125
5.4 Modo de inibição de 20b	131

5.5 Atividade tripanossomicida contra forma amastigotas e tripoamastigotas de <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade	134
5.6 Estudos de ancoragem molecular.....	140
<u>5.6.1 Comparação das estruturas cristalográficas das enzimas cruzaina e rodesaina</u>	<u>140</u>
<u>5.6.2 Resultados dos estudos de <i>redocking</i> utilizando as enzimas cruzaina e rodesaina</u>	<u>143</u>
<u>5.6.3 Resultados de ancoragem molecular utilizando a enzima cruzaina.....</u>	<u>149</u>
<u>5.6.4 Resultados de ancoragem molecular utilizando a enzima rodesaina</u>	<u>159</u>
<u>5.6.3 Comparação dos resultados de ancoragem molecular utilizando ambas as</u>	
<u>enzimas</u>	<u>164</u>
5.7 Resultados de dinâmica molecular.....	Erro! Indicador não definido.
<u>5.7.1 Parametrização</u>	<u>165</u>
<u>5.7.2 Dinâmicas moleculares</u>	<u>170</u>
6 CONCLUSÃO.....	176
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178
ANEXO A - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO E DE	
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H E ¹³C E SUBESPECTROS	
DEPT-135	189
ANEXO B - DADOS DA PARAMETRIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 20B.....	213

1 INTRODUÇÃO

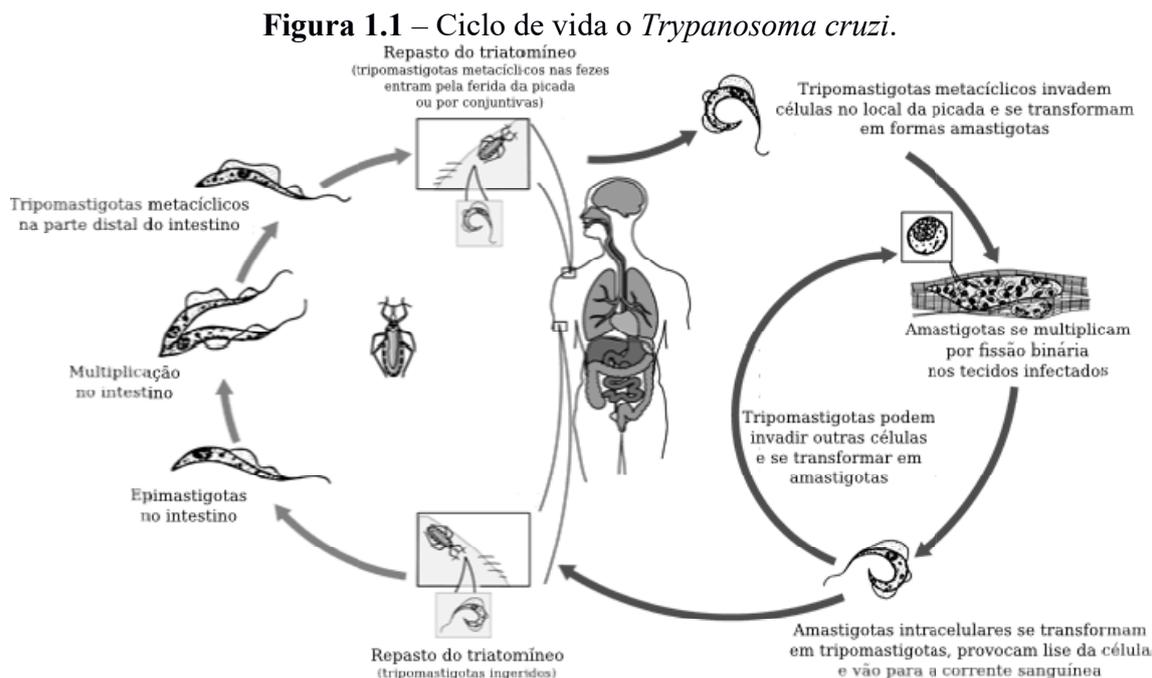
1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma parasitose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, da classe *Kinetoplastida*. Esta classe apresenta uma estrutura única, o cineplasto: uma estrutura de k-DNA, contendo entre 20% e 25% do total de DNA da célula (DIAS, J. C. P.; COURA, 2012). Esta estrutura codifica, basicamente, proteínas mitocondriais e possui um sistema complexo de regulação e modificações pós-transcricionais (LUKES *et al.*, 2002). A principal forma de transmissão da doença é vetorial, pela picada de insetos da subfamília *Triatominae*, conhecidos popularmente como barbeiro.

O protozoário *T. cruzi* possui três formas em seu ciclo de vida. Na região anterior do intestino do vetor estão presentes as formas epimastigotas, com formato fusiforme, presença de flagelo e membrana ondulante e cinetoplasto próximo ao núcleo. Quando o parasito chega à porção final do intestino se converte em formas tripomastigotas metacíclicas, não replicantes, com formato alongado, membrana e flagelo presentes e cinetoplasto na região posterior da célula. Esta forma possui grande motilidade e é infectante para humanos. Uma vez na corrente sanguínea humana as formas tripomastigotas invadem células e se convertem em amastigotas, sem flagelo ou membrana ondulante e de formato globular. Nenhuma das formas do parasito parece afetar o vetor.

O ciclo de vida do parasito inicia-se pela picada do inseto que deposita fezes contaminadas com o parasito na superfície da pele do hospedeiro. Na corrente sanguínea, as formas tripomastigotas invadem prontamente células do sistema fagocitário mononuclear, células nervosas e musculares, porém todas as células nucleadas são alvos potenciais de invasão na fase aguda (RASSI; RASSI; MARINETO, 2010). A invasão da célula pelo parasito ocorre via fusão de lisossomos ou por invaginação direta da membrana no sítio de ligação do parasito. No primeiro caso acredita-se que ocorra a migração de lisossomos para o ponto de invasão do parasito por mecanismo sinalizado por Ca^{2+} e dependente de microtúbulos. No segundo caso, ainda que a invasão em si seja independente de lisossomos, acredita-se que a fusão de lisossomos e acidificação do vacúolo sejam fundamentais para uma infecção produtiva

(EPTING; COATES; ENGMAN, 2010). Dentro do lisossomo, o parasito sofre conversão para a forma amastigota, com a perda do flagelo e membrana ondulante e adquirindo formato globular. Esta forma de baixa motilidade se multiplica até ocupar completamente a célula hospedeira. Neste momento, o protozoário converte-se novamente em tripomastigota, causa lise da célula e cai na corrente sanguínea (**Figura 1.1**).



Fonte: adaptado de Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

A doença de Chagas se manifesta em três fases clínicas: fase aguda, fase indefinida e fase crônica. A manifestação aguda se inicia após a infecção e dura algumas semanas, sendo caracterizada por alta parasitemia, quadro clínico de curta duração e reações inflamatórias agudas no local da picada, conhecida como Chagoma (DIAS, 1984). Esta fase é assintomática ou apresenta quadro clínico leve de febre, mal estar e linfadenopatia. A gravidade relativamente baixa dos sintomas da fase aguda parece derivada da resposta imune celular e humoral. Em alguns indivíduos – especialmente crianças – se instala um quadro agudo de hepatoesplenomegalia, meningocefalite e miocardite (HABERLAND *et al.*, 2013). A fase aguda apresenta 5% a 10% de taxa de letalidade, sendo que tal quadro é responsável pela maioria dos óbitos (PRATA, 2001). Com o tempo, a eficácia da resposta imune é reduzida. Estudos indicam que mediadores e mecanismos do parasito, redução autolimitada da resposta imune ou uma combinação

de ambos são determinantes para a não erradicação dos tripanossomas e consequente evolução da doença ou para a fase crônica ou para a fase indefinida (DUTRA; GOLLOB, 2008).

A fase indefinida é assintomática e ocorre em 70% dos pacientes. Nestes indivíduos testes sorológicos e parasitológicos indicam a presença do parasito, porém manifestações clínicas não são observadas. Alterações no eletrocardiograma foram relatadas por Ianni e colaboradores (2001) em 21% de 160 pacientes avaliados ao longo de 15 anos com a forma indefinida da doença de Chagas. Este resultado, segundo os autores, pode estar superestimado por alterações não relacionadas à doença (IANNI *et al.*, 2001). Miocardite focal, discreta e disseminada foi observada em modelos caninos (SCALABRINI *et al.*, 1996) e em humanos (LOPES; CHAPADEIRO, 1983). Embora ainda haja controvérsia sobre os efeitos dos achados histopatológicos sobre a funcionalidade do músculo cardíaco (ANDRADE, 2007), a sobrevida elevada e bom prognóstico são bem estabelecidos. Entretanto, em 30% dos pacientes que se encontram nessa fase, ocorre evolução para uma forma cardíaca leve com bom prognóstico.

A evolução para a fase crônica da doença ocorre em 30% dos pacientes e, ao longo de décadas, pode afetar gravemente o coração (90% dos casos) ou produzir desordens gastrointestinais ou sintomas neurológicos (10% dos casos), sendo que mais de uma complicação pode ser observada em um mesmo paciente. As manifestações cardíacas incluem miocardite crônica, eventos tromboembólicos, insuficiência cardíaca congestiva e infarto súbito do miocárdio. Arritmias, dilatação das câmaras, fibrose e presença de infiltrado inflamatório também são observados. As manifestações gastrointestinais são principalmente megaesôfago, megacólon, megaestômago e megajejuno. Desnutrição, refluxo, dificuldade de deglutir, constipação e dores abdominais são os sintomas mais característicos. As manifestações neurológicas no sistema nervoso central são mal estabelecidas. Cerca de 20% dos pacientes crônicos apresentam alterações no eletroencefalograma e atrofia e lesões na substância branca cerebral também já foram verificadas. As alterações periféricas observadas incluem parestesia, redução de reflexos de contração, neuropatia periférica com perda de mielinização e perda axonal. A combinação das lesões agudas e crônicas determinam uma prevalência de lesões cardíacas, nervosas ou digestivas em 20 a 30 % dos pacientes infectados.

Estratégias de controle/eliminação da doença de Chagas (Iniciativa do Cone Sul de 1991, Iniciativa do Pacto Andino de 1997 e Iniciativa da América Central de 1999) foram responsáveis pela expressiva redução de novos casos. Esses esforços foram focados no controle do vetor e na obrigatoriedade de testes em bancos de sangue. Efetivamente, Uruguai desde 1997, Chile desde 1999 e Brasil desde 2006 estão livres da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se a ocorrência de 12.500 óbitos e 41.200 novos casos em 2006 na América Latina, o que representa uma redução substancial em relação aos dados de 1990 (700.000 novos casos e 50.000 óbitos) (**Tabela 1.1**) (WHO, 2007).

Tabela 1.1 – Comparação dos parâmetros epidemiológicos da Doença de Chagas de 1990 a 2006. Adaptado de Organização Mundial da Saúde, Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas (WHO, 2007)

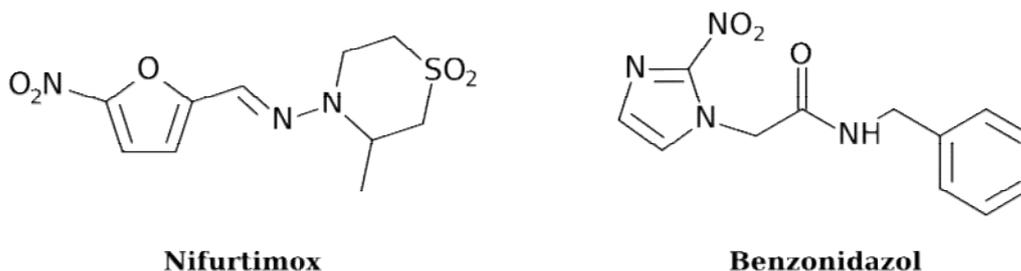
<i>Parâmetro epidemiológico</i>	<i>1990</i>	<i>2000</i>	<i>2006</i>
<i>Mortes anuais</i>	Mais de 45.000	21.000	12.500
<i>População infectada</i>	30 milhões	18 milhões	15 milhões
<i>Novos casos anuais</i>	700.000	200.000	41.200
<i>População em risco</i>	100 milhões	40 milhões	28 milhões
<i>Número de países</i>	21	21	21

A redução da transmissão vetorial em áreas endêmicas veio, entretanto, acompanhada de um aumento da complexidade epidemiológica da doença de Chagas. A transmissão congênita e oral, por ingestão de alimentos contaminados, tornou-se mais importante. Em um estudo de 2009 foi verificada a prevalência da doença de Chagas em 0,5 % das grávidas em Minas Gerais (GONTIJO *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos estima-se que hajam cerca de 300.000 indivíduos infectados, em sua maioria imigrantes da América Latina. Na Espanha estudos sugerem a existência de 47.738 a 67.423 infectados (GASCON; BERN; PINAZO, 2010). Em boa parte da Europa, Canadá, Japão e Austrália a doença de Chagas já é um problema de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Com relação ao arsenal terapêutico, nifurtimox e benznidazol (**Figura 1.2**) são os dois únicos fármacos disponíveis para o tratamento de pacientes com doença de Chagas.

Ambos são indicados na fase aguda da doença, em infecção reativada e após infecção congênita. Entretanto, algumas variantes do *T. cruzi* podem apresentar resistência a estes fármacos, de forma que somente 50% dos pacientes respondem ao tratamento (HABERLAND *et al.*, 2013).

Figura 1.2 – Estrutura química dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol.



O nifurtimox é rapidamente absorvido por via oral e metabolizado extensamente no fígado. A concentração plasmática do fármaco atinge seu máximo em 1 hora e a meia vida é de 3 horas. O mecanismo de ação é via redução do grupo nitro a ânion nitro radical que reage rapidamente produzindo metabólitos altamente tóxicos (peróxidos, superóxidos). O *T. cruzi* é mais sensível ao estresse oxidativo do que células de vertebrados, devido à deficiência parcial de sistemas celulares de neutralização de radicais livres (BERN *et al.*, 2007). Este fármaco, entretanto, apresenta segurança limitada. Os efeitos adversos mais frequentes são anorexia, perda de peso, alterações mentais, sonolência, excitabilidade, náusea, vômitos, cólica e diarreia (COURA; CASTRO, 2002). A eficácia do tratamento é variável. No estágio agudo da doença, Nifurtimox reduz a severidade e duração dos sintomas e, possivelmente, a mortalidade (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Cura parasitológica ocorre em 70 % dos casos. Atualmente o nifurtimox não está disponível no Brasil.

O benznidazol é também bem absorvido por via oral, tem meia vida de cerca de 12 horas e é eliminado principalmente por via renal (BERN *et al.*, 2007). O principal mecanismo de ação do benznidazol parece não estar relacionado ao estresse oxidativo (DOCAMPO, 1990) ainda que tenha sido relatada a capacidade deste fármaco de produzir estresse oxidativo em hepatócitos (PEDROSA *et al.*, 2001). Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado. O benznidazol pode agir via formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos que seriam gerados pela redução enzimática de

seu grupo nitro (**Figura 1.2**). Acredita-se que metabólitos reduzidos do benznidazol também possam se ligar à macromoléculas do parasito (RAJÃO *et al.*, 2014). O benznidazol também provoca aumento da fagocitose, aumentando eficiência da resposta imune contra o *Trypanosoma* por meio da indução de produção de interferon- γ e da inibição da NADH-fumarato redutase do *T. cruzi* (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Cerca de 30% dos pacientes apresentam efeitos adversos cutâneos e também manifestam neuropatia dose dependente, geralmente reversível, porém, lentamente. Anorexia, perda de peso, náusea, vômitos, insônia e disgeusia são também relatadas. As duas complicações mais sérias, entretanto, são agranulocitose e púrpura trombocitopênica (COURA; CASTRO, 2002). O tratamento com Benznidazol na fase aguda produz cura parasitológica a longo prazo em 70% dos pacientes (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Comparado ao nifurtimox, o benznidazol apresenta perfil de segurança e eficácia superiores e tempo de tratamento menor (60 dias contra 90 dias), que determinam o seu uso como primeira escolha terapêutica (BERN *et al.*, 2007).

O BENFIT é um estudo recente aleatório, controlado e duplo cego que avaliou a eficácia e segurança do fármaco benznidazol. Este estudo consistiu no acompanhamento de 2.854 pacientes portadores da doença de Chagas na fase crônica com cardiomiopatia desenvolvido entre 2004 e 2011 em cinco países. O grupo teste (n=1.431) recebeu benznidazol em período variável entre 40 e 80 dias e o grupo controle (n=1.423) recebeu placebo. O estudo concluiu que o grupo submetido ao tratamento com o fármaco teve redução dos parasitas na corrente sanguínea identificáveis por ensaio de reação em cadeia da polimerase contra o DNA do cinetoplasto. Esta possível redução da parasitemia, entretanto, não produziu diferença estatística significativa na progressão clínica cardíaca entre o grupo tratado e o grupo controle (MORILLO *et al.*, 2015).

Tendo em vista as limitações da quimioterapia atual de acordo com o exposto acima, a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012) afirma que a prioridade geral para a pesquisa em doença de Chagas deve ser a produção de novos fármacos com tempo de tratamento mais curto, menos efeitos adversos e o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica pediátrica. A descoberta de fármacos ativos na fase crônica da doença também é uma necessidade.

Diversos centros, parcerias público-privadas, e a própria Organização Mundial da Saúde estão trabalhando na busca de novos tratamentos para doença de Chagas (MCKERROW *et al.*, 2009). É importante destacar que, dentre os avanços alcançados na busca por novas alternativas terapêuticas, o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* (EL-SAYED, 2005) abre possibilidades de descoberta de novos alvos moleculares. As principais tendências nesse sentido estão sendo avaliadas por vários grupos de pesquisa (BUCKNER; NAVABI, 2010; CROFT, 1999; DIAS, L. *et al.*, 2009; RENSLO; MCKERROW, 2006; URBINA, 2001).

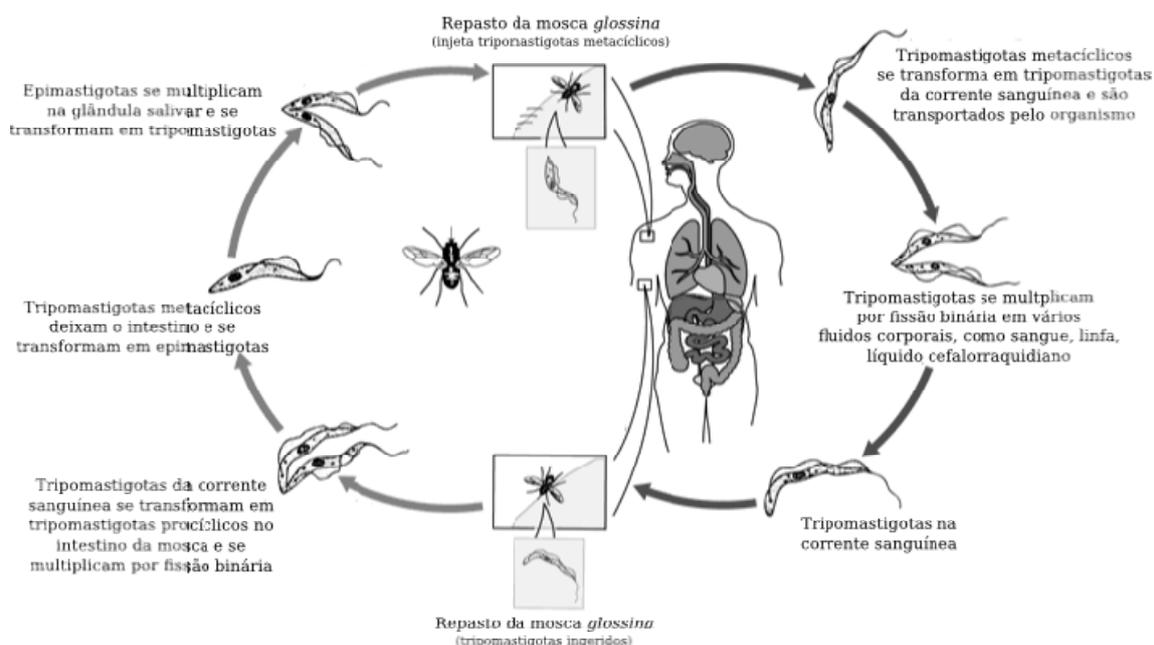
1.2 Tripanossomíase Africana Humana

A Tripanossomíase Africana Humana (HAT), também conhecida como doença do sono, é causada pelo protozoário *Trypanosoma brucei* da mesma classe do *T. cruzi*. Duas subespécies morfologicamente indistinguíveis causam duas variantes da doença em humanos: *T. b. gambiense* na África central e oeste, *T. b. rhodesiense* no oeste e sul do continente africano. Uma terceira espécie, *T. brucei brucei*, não infecta humanos. A principal forma de transmissão é vetorial, por moscas do gênero *Glossina*, com mais de 30 espécies, porém o *T. b. gambiense* é transmitido quase que exclusivamente por apenas duas espécies: *G. fuscipes s.l.* e *G. palpalis s.l.* (SOLANO; RAVEL; DE MEEÛS, 2010).

Diferente do *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* é um parasito exclusivamente extracelular. Apesar da grande mobilidade, possui um armadura de microtúbulos que confere forma e resistência à célula. O parasito possui um único flagelo que é inserido na porção posterior da célula, próximo ao cinetoplasto. No trato gastrointestinal superior das moscas estão presentes formas tripomastigotas pró-cíclicas que se dividem por fissão e mantêm uma infecção no intestino do vetor. Após no mínimo três dias de infecção, parte dos parasitos atravessa a barreira ectoperitrofica e migra pelo tubo digestivo até a glândula salivar da mosca. Neste processo a célula do *T. brucei* se torna mais alongada, adquirindo mais motilidade, transformando-se nas formas epimastigotas, que migram até a glândula salivar da mosca, onde estabelecem infecção e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, uma forma não replicativa, curta, de grande mobilidade e infectante para humanos (OOI; BASTIN, 2013). Durante o repasto do inseto, estas formas são injetadas no hospedeiro e migram para a corrente sanguínea, onde se

diferenciam em tripomastigotas, que se multiplicam e alcançam outros fluidos do corpo, como a linfa e líquido cefalorraquidiano (**Figura 1.3**). Os parasitos no sangue estão presentes em duas formas, uma alongada com flagelo livre, núcleo central e cinetoplasto próximo à extremidade posterior da célula; outra compacta curta, geralmente sem flagelo, com extremidades arredondadas.

Figura 1.3 – Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*.



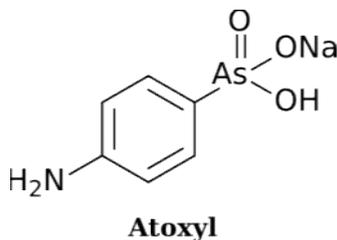
Fonte: adaptado de Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>

A Tripanossomíase Africana apresenta dois estágios clínicos: um primeiro denominado hemolítico, quando o parasita está restrito ao sangue e linfa e outro dito meningocefálico, quando o parasito atravessa a barreira hematoencefálica (BHC). Os sintomas provocados pelo *T. b. rhodesiense*, entretanto, se manifestam como uma febre séptica aguda e não há separação clara entre os estágios (MALVY; CHAPPUIS, 2011). A infecção no sistema nervoso central em geral se estabelece entre três semanas e dois meses de infecção, com 80% dos casos fatais nos primeiros seis meses. A letalidade da doença tratada é de 6% (ODIIT; KANSIIME; ENYARU, 1997). A maioria dos pacientes desenvolve febre intermitente, resultado das ondas de invasão do sangue pelo parasito (VINCENDEAU; BOUTEILLE, 2006). Os episódios de febre podem vir acompanhados de cefaleia, dores musculares e nas articulações, anorexia, anemia e hiperestesia. Linfadenopatia, prurido e alterações do humor também são observadas.

Em alguns pacientes uma lesão com necrose ocorre no local da picada da mosca tsé-tsé. No segundo estágio os sintomas clássicos apresentados pelos pacientes são insônia noturna e sonolência durante o dia. Novamente, na infecção pelo *T. b. rhodesiense* os estágios não são bem definidos. Alguns autores apontam que uma fragmentação dos períodos de sono e disfunção do ciclo circadiano são mais comuns do que a inversão do sono propriamente dita (KENNEDY, 2006). Outros sintomas observados são cefaleia, parestesia, confusão, alteração do humor e desordens mentais variadas. Na fase terminal da doença ocorre desmielinização e atrofia do SNC causando distúrbios de consciência, demência e morte. Em algum ponto deste processo, lesões irreversíveis se desenvolvem, de forma que sequelas psiquiátricas e neurológicas são frequentes. Pacientes não tratados evoluem para óbito.

Entre 1896 a 1906 uma grande epidemia de HAT atingiu a África, especialmente Uganda e Congo. Os impactos econômicos deste evento levaram administradores coloniais a financiar missões científicas e pesquisas visando investigar a epidemiologia da doença e a busca por fármacos para seu tratamento. Em 1901 e 1902 a relação entre um tripanossomatídeo e a doença foi estabelecida. Em 1903 evidências conclusivas da transmissão da doença por moscas *Glossina* foram encontradas e em 1905 o atoxyl (**Figura 1.4**), uma organo arsênico, teve suas propriedades tripanossomicidas descobertas e começou a ser utilizado no tratamento da HAT (STEVERDING, DIETMAR, 2008). De Raadt (2005), discutindo a história da HAT, ressalta que em um intervalo de apenas quatro anos foram identificados o agente etiológico, o vetor e o primeiro fármaco (RAADT, 2005).

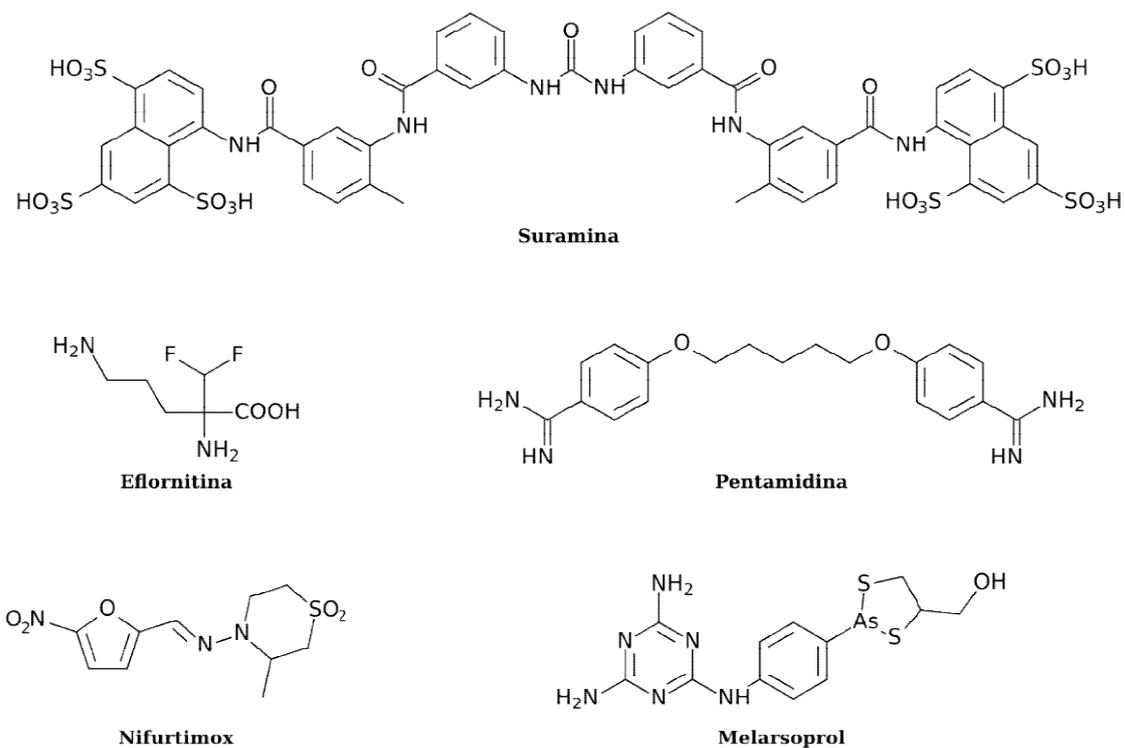
Figura 1.4 – Estrutura do atoxyl, primeira substância identificada com atividade tripanossomicida sobre o *T. brucei*, utilizado em humanos a partir de 1905.



Uma segunda epidemia na década de 1920 atingiu novamente o continente africano. Combinando estratégias de saúde pública e o uso da suramina (**Figura 1.5**) a epidemia

foi controlada. A continuidade de ações de vigilância e uso de inseticidas para controle do vetor praticamente interrompeu a transmissão na década de 1960 (SIMARRO; JANNIN; CATTAND, 2008). O enfraquecimento do controle, junto à deterioração dos sistemas de saúde de vários países africanos, resultaram em um aumento no número de casos, levando à nova epidemia iniciada em 1970. Os esforços de programas de controle nacionais da Organização Mundial da Saúde e de organizações não governamentais foram capazes de conter a doença no final da década da 1990. Steverding (2008) ressaltou o papel da eflornitina (**Figura 1.5**) na contenção desta epidemia (STEVERDING, DIETMAR, 2008).

Figura 1.5 – Estrutura dos fármacos disponíveis para tratamento da Tripanossomíase Africana Humana



Atualmente cinco fármacos estão disponíveis para o tratamento da HAT (**Figura 1.5**). Todos os tratamentos requerem administração por via parenteral, com posologia complexa e necessidade de equipe treinada. Desde 2001 todos os medicamentos são doados pelos fabricantes para a OMS como parte de um programa de controle e erradicação da doença (WHO, 2015).

A suramina, descoberta em 1920, é o fármaco de escolha para a primeira fase da doença

causada pelo *T. b. rhodesiense*. O esquema de dose é complexo e o tratamento dura até 30 dias. Além dessas limitações, o fármaco é instável e requer diluição e aplicação imediata (BRUN et al., 2010). O tratamento com esse fármaco pode resultar em nefrotoxicidade, neuropatia periférica, agranulocitose e trombocitopenia, sendo todos esses efeitos geralmente reversíveis. Reações de hipersensibilidade aguda e tardia também podem ocorrer, porém mais raramente.

A pentamidina está em uso contra o *T. brucei* desde a década de 1930. Este fármaco tem a capacidade de ligar-se aos ácidos nucléicos e provavelmente provoca a destruição do cinetoplasto. Outros mecanismos provavelmente também são importantes, pois certas cepas viáveis com cinetoplasto ausente são sensíveis a este fármaco. O acúmulo seletivo deste composto no citosol do parasito parece fundamental para a atividade (BAKER, NICOLA et al., 2013). A pentamidina não atinge concentrações efetivas no líquido cefalorraquidiano, porém é o tratamento de escolha para *T. b. gambiense* no primeiro estágio da infecção.

O melarsoprol, descoberto em 1949, é um organoarsênico com toxicidade severa, porém é a única alternativa terapêutica para tratamento da segunda fase da doença provocada tanto pelo *T. b. rhodesiense* quanto pelo *T. b. gambiense* em países onde a eflornitina não está disponível. Acredita-se que o metabólito ativo seja o óxido melarsênico, que é transportado ativamente pelo tripanossoma e reage irreversivelmente com a tripanotonia (BAKER, NICOLA et al., 2013). Os efeitos adversos são severos, sendo comuns prurido e erupções cutâneas. Neuropatia também é relatada. O efeito mais relevante, entretanto, é a síndrome encefalopática. A incidência deste efeito adverso varia entre 1,5 % e 28 %, com mortalidade média de 50 % (LUTJE; SEIXAS; KENNEDY, 2013). O melarsoprol é bastante lipofílico, insolúvel em água e atravessa a BHC. A preparação, estritamente parenteral, precisa ser feita utilizando propilenoglicol como veículo, que é irritante para os tecidos. Além disso, o índice de falha terapêutica chega à 30% (BRUN et al., 2010; LUTJE; SEIXAS; KENNEDY, 2013).

A eflornitina, registrada para uso contra HAT em 1990, é ativa contra o *T. b. gambiense* na primeira e segunda fases da doença, mas inativa contra *T. b. rhodesiense*. Este fármaco é um inibidor específico irreversível da ornitina descarboxilase, enzima da via sintética das poliaminas. Apresenta um perfil de segurança melhor quando comparado

ao melarsoprol, sendo que as reações adversas mais comuns são anemia, leucopenia, sintomas gastrointestinais e, mais raramente, convulsões. Um esquema de tratamento com combinação de eflornitina e nifurtimox desenvolvido em 2009, permitiu uma redução da duração do tratamento e simplificação do esquema posológico. Esta combinação é a primeira escolha para o tratamento da forma gambiense, segundo recomendação da OMS (WHO, 2015).

A organização *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) foi fundada em 2003 com o objetivo de atender as necessidades dos pacientes portadores das doenças mais negligenciadas. Trata-se de uma organização de pesquisa e desenvolvimento colaborativa, voltada para as necessidades dos pacientes e sem fins lucrativos. Baseado na discussão com várias partes interessadas do desenvolvimento de novas terapias para a HAT, esta organização delineou um Perfil de Produto Alvo, incluindo as características ideais e aceitáveis para um novo fármaco para tratamento desta doença. Neste documento propõe-se como ideal uma formulação oral, eficaz contra ambas as formas da HAT, que não requeira hospitalização para o tratamento e com eficácia clínica de ao menos 95% (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2014a).

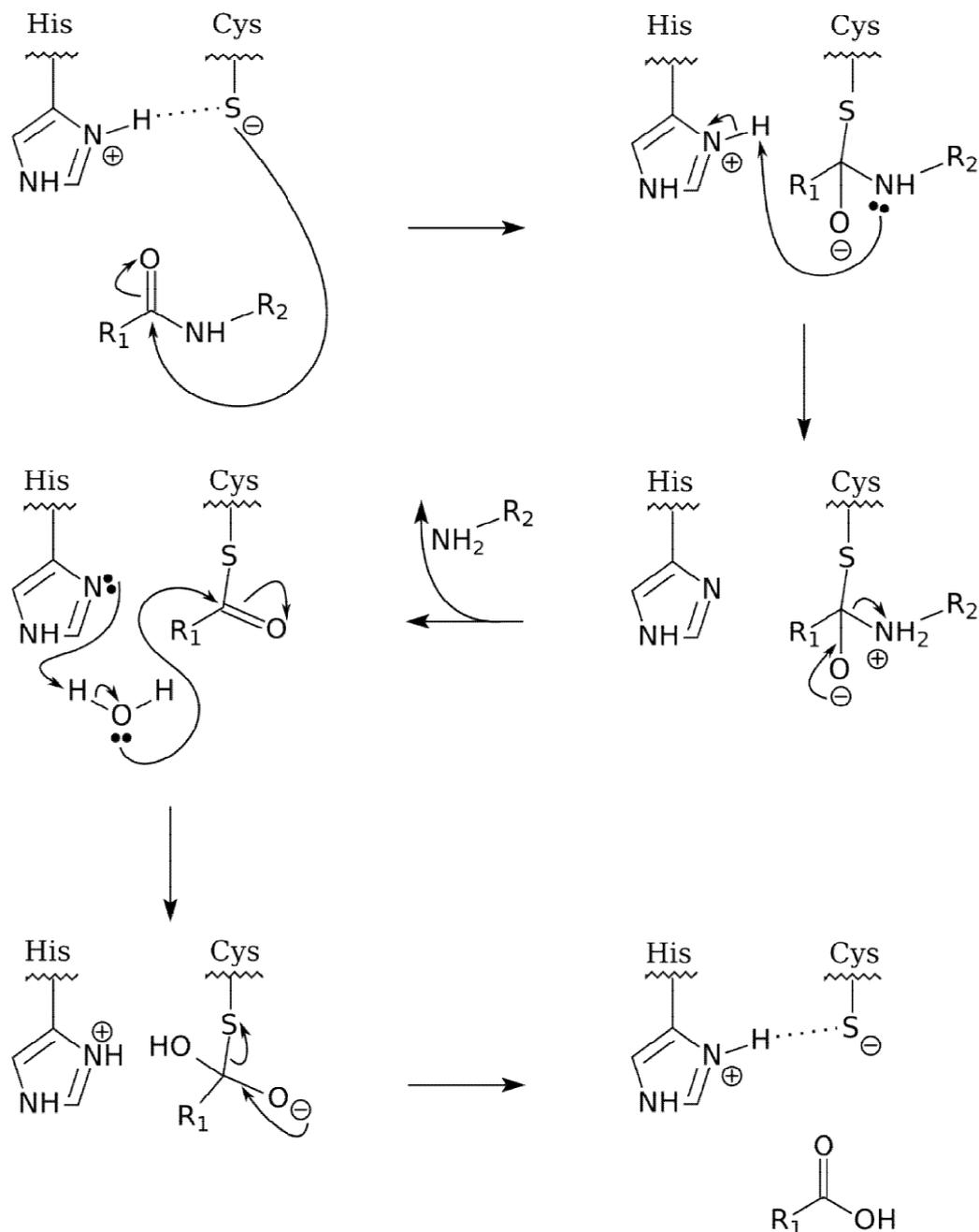
1.3 Cisteíno-protease cruzaina como alvo no desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da doença de Chagas

Proteases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, regulando variadas vias bioquímicas. No *T. cruzi* a protease mais relevante é a cruzaina, uma catepsina L, associada a imunoevasão, invasão celular e crescimento do parasito (SAJID; MCKERROW, 2002).

Originalmente o nome catepsina foi utilizado para designar proteases ativas em meio levemente ácido, em geral presentes nos lisossomos. Atualmente se sabe que esta família de proteínas está presente em diferentes compartimentos e tem papel de regulação e sinalização em grande número de processos biológicos (TURK *et al.*, 2012). As proteases são subdivididas com base nos resíduos catalíticos, sendo as catepsinas B e L cisteíno-proteases. Nas cisteíno-proteases o ataque nucleofílico que leva à hidrólise da ligação peptídica é executado por uma cisteína.

O grupo tiol da cisteína, quando neutro, é um nucleófilo mais fraco quando comparado à sua forma ionizada. A proposta mais aceita atualmente envolve a transferência de um próton da cisteína para a histidina da tríade catalítica, formando um par iônico tiolato–imidazol protonado. Um terceiro aminoácido, uma asparagina ou aspartato, estabelece uma interação de hidrogênio com a histidina, estabilizando a conformação catalítica e a carga sobre o anel imidazólico (POLGÁR, 2013; SAJID; MCKERROW, 2002). Na **Figura 1.6** está representado esquematicamente a proposta do mecanismo de hidrólise catalisado por uma cisteíno-protease, ressaltando o par iônico.

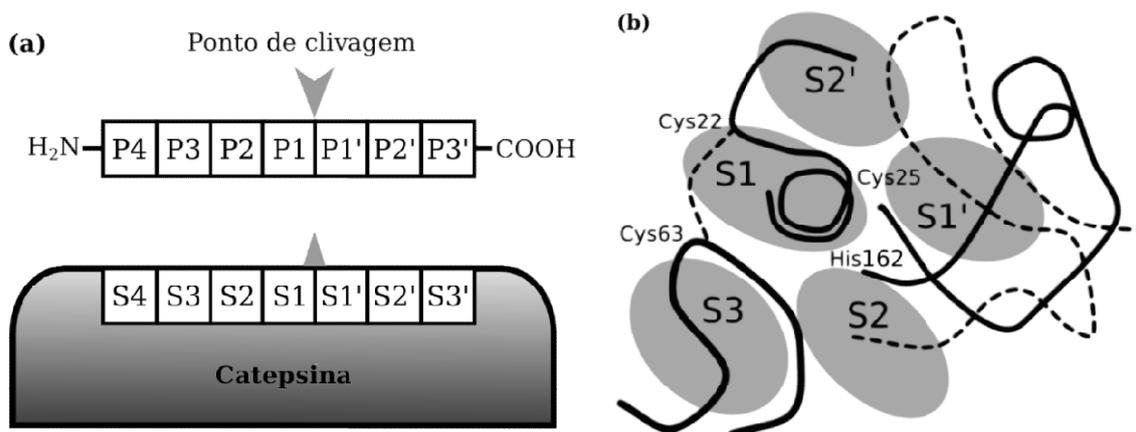
Figura 1.6 – Proposta do mecanismo de hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma cisteíno-protease



A superfície das proteases apresenta regiões de identificação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do substrato, o que confere especificidade. As regiões da proteína que interagem com a cadeia lateral dos resíduos do peptídeo hidrolisado durante a catálise foram nomeadas subsítios. Os subsítios são numerados S3, S2, S1, S1', S2' e assim sucessivamente. A clivagem ocorre sempre entre S1 e S1' e os subsítios são numerados em sequência (**Figura 1.7**).

Esta nomenclatura foi proposta por Schechter e Berger (SCHECHTER; BERGER, 1967) e indica a complementariedade dos resíduos do substrato em relação ao sítio ativo. No substrato os resíduos são nomeados P1, P2, P3, P1', P2' e assim sucessivamente. A clivagem ocorre entre os resíduos P1 e P1', gerando um novo C-terminal no resíduo P1 e um novo N-terminal no resíduo P1'.

Figura 1.7 – (a) Representação da nomenclatura dos subsítios da cruzaina e dos resíduos complementares do substrato; (b) Representação dos subsítios em uma proteína da família da papaína



Fonte: (a) elaborado pelo autor, baseado em Schechter e Berger (1967); (b) adaptado de Turk e colaboradores (2012), artigo sob licença aberta CC BY-NC-ND 3.0

A localização celular da cruzaina varia ao longo do ciclo de vida do parasito. Na forma amastigota a cruzaina é expressa na superfície da célula, enquanto em epimastigotas é encontrada nos reservossomos (HUETE-PÉREZ *et al.*, 1999). A produção de organismos *knockout*, mutantes incapazes de expressar uma proteína de interesse, é um método importante para validação de um alvo farmacológico. Até o momento cepas *knockout* para cruzaina não se mostraram viáveis. Entretanto, estudos têm demonstrado que parasitos expressando menos de 1% da atividade de protease não são capazes de infectar camundongos imunocompetentes, porém o fizeram em modelos murinos *knockout* para o gene RAG 1 (MCKERROW *et al.*, 2009). Estes animais são severamente imunodeficientes, uma vez que RAG1 é necessário para a recombinação somática e sua deleção leva à incapacidade de produzir linfócitos T e B maduros (MOMBAERTS *et al.*, 1992).

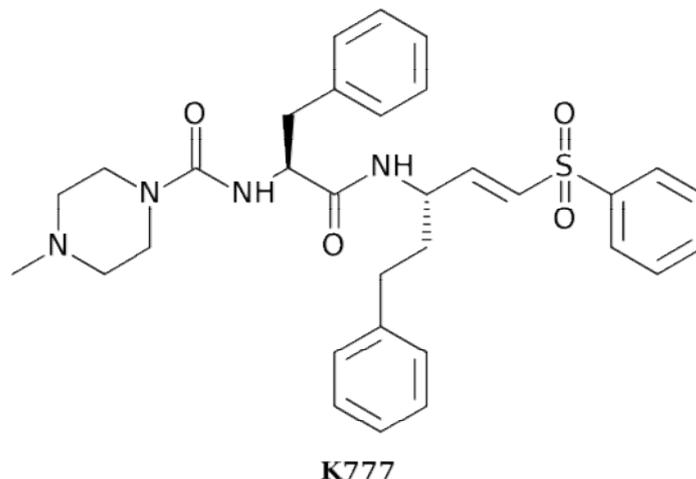
Diversos grupos realizaram estudos buscando estabelecer a importância da cruzaina como alvo farmacológico assim como as funções desta enzima na infecção pelo *T.*

cruzi. Tomas, Miles e Kelly, em estudo de 1997, demonstraram que o aumento da expressão da cruzaina eleva a metaciclologênese, aumentando a formação de tripomastigotas metacíclicas a partir de epimastigotas *in vitro*. Entretanto, as cepas transformadas com expressão aumentada de cruzaina não apresentaram modificação na parasitemia ou letalidade em modelos murinos (TOMAS; MILES; KELLY, 1997). Duschak e colaboradores (2001) avaliaram a atividade enzimática da cruzaina expressa em três pares de cepas de *T. cruzi*. Cada par utilizado no estudo era composto por uma variante infectante para camundongos e uma variante não infectante, ambas decedentes de uma cultura ancestral comum. O estudo concluiu que as cepas não infectantes possuíam atividade e expressão de cruzaina reduzidas (DUSCHAK *et al.*, 2001). Estes dois resultados sugerem que a cruzaina é necessária para o ciclo do parasito e para a infectividade das formas extracelulares.

A possibilidade de uso de inibidores da cruzaina como protótipos de fármacos foi inicialmente explorada por Ashall e colaboradores (1990), que demonstram que fluorometil-cetonas, capazes de inibir a atividade da cruzaina, são letais contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (ASHALL; ANGLIKER; SHAW, 1990). Em 1992, Meirelles e colaboradores avaliaram inibidores diazometil-peptídeos da cruzaina em culturas de miócitos infectados com *T. cruzi* e contra parasitos livres. Os autores observaram a capacidade destas substâncias de reduzirem a infectividade das formas extracelulares e efeitos tripanossomicidas sobre formas extra e intracelulares (MEIRELLES *et al.*, 1992). A cura de modelos murinos foi primeiramente relatada por Engel e colaboradores (1998). Neste estudo os autores avaliaram diferentes inibidores irreversíveis da cruzaina em ensaios *in vitro* em macrófagos e modelos murinos infectados com *T. cruzi* (ENGEL *et al.*, 1998). Os resultados deste estudo demonstraram a capacidade de inibidores da cruzaina de atingir as formas amastigotas intracelulares, reduzirem a parasitemia e induzirem cura nos modelos estudados.

Os efeitos de inibidores da cruzaina sobre as manifestações clínicas da doença de Chagas foram estudados por Barr e colaboradores (2005). Neste estudo os autores avaliaram os efeitos da administração oral da vinilsulfona K777 (**Figura 1.8**), um inibidor irreversível da cruzaina, sobre cães infectados com *T. cruzi*. Uma dose de 50 mg/kg a cada 12 horas por 14 dias produziu melhora em indicadores de dano cardíaco e redução na lesão evidenciada em análise histopatológica (BARR *et al.*, 2005).

Figura 1.8 – Estrutura da vinilsulfona K11777 ou K777



Estes resultados, analisados em conjunto, indicam que a cruzaina é um alvo terapêutico para pesquisa de novas substâncias com potencial tripanossomicida.

A identificação e elucidação da estrutura cristalográfica da cruzaina foi um avanço importante para o planejamento de inibidores dessa enzima (MCGRATH *et al.*, 1995). A cruzaina é uma catepsina L similar à papaína, cujo domínio catalítico é composto por uma cadeia polipeptídica com 215 resíduos de aminoácidos. As catepsinas apresentam duas subunidades: L, com predomínio de α -hélices, e R, com extensas folhas- β antiparalelas. O sítio ativo se encontra na cavidade entre as duas subunidades. A tríade catalítica é composta por três resíduos: cisteína 25, histidina 162 e asparagina 182, com evidências da formação de um par iônico tiolato-imidazol protonado entre Cys25 e His162, conforme já ilustrado na **Figura 1.6**. Asn182 participa de uma interação de hidrogênio com o imidazol protonado de His162, estabilizando a carga deste resíduo.

O subsítio S2, fundamental para a especificidade em relação aos substratos, apresenta a capacidade de acomodar tanto resíduos hidrofóbicos quanto básicos, aceitando tanto Arg quanto Leu ou Phe. O banco de dados MEROPS reúne informações relativas à especificidade de substratos para um grande número de proteases. A ordem de especificidade anotada neste banco de dados para o sítio S2 da cruzaina é Leu>Phe>Val>Tyr, indicando uma preferência por resíduos hidrofóbicos. A cruzaina hidrolisa um substrato contendo Phe em P2 com velocidade 15 vezes maior em comparação ao mesmo peptídeo com Arg em P2 (MCGRATH *et al.*, 1995).

O resíduo Glu-208, na base de S2, é fundamental para a possibilidade de interação com grupos de diferentes naturezas. Quando um grupo com possibilidade de realizar uma interação de hidrogênio ocupa o subsítio S2, Glu-208 pode interagir com tal grupo e girar para dentro do bolsão. Quando um grupo hidrofóbico ocupa a mesma posição, Glu-208 pode sofrer uma mudança conformacional para fora de S2 e interagir com moléculas de solvente (GILLMOR, S. A; CRAIK; FLETTERICK, 1997). Entretanto, em algumas estruturas cristalográficas nas quais a cruzaina foi cocristalizada com ligantes apresentando grupos hidrofóbicos em S2 este padrão não é observado. Glu208 aparece direcionado para o interior da proteína, mesmo sem interagir com grupos do ligante. As estruturas cristalográficas depositadas no PDB sob códigos 2OZ2 (KERR *et al.*, 2009) e 3KKU (FERREIRA *et al.*, 2010) são exemplos deste caso.

1.4 Cisteíno-protease rodesaína como alvo no desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da Tripanossomíase Africana Humana

O *T. brucei rhodesiense* expressa duas proteases principais: em maior quantidade a TbCatL, uma catepsina L conhecida como rodesaína; em menor quantidade, porém essencial, a TbCatB, uma catepsina B.

A rodesaína e a TbCatB são cisteíno-proteases com alta similaridade estrutural. Ambas possuem a mesma tríade catalítica e um sítio ativo similar (KERR *et al.*, 2010). A característica única das catepsinas B é a presença de um *loop* de oclusão: uma estrutura móvel que pode interagir com o sítio ativo modificando a atividade enzimática. As catepsinas B apresentam tanto atividade de endopeptidase quanto de exopeptidase. No primeiro caso o substrato parece interagir com a enzima com o *loop* de oclusão aberto, permitindo ligação com todo o sítio ativo. No segundo caso, acredita-se que o *loop* de oclusão se fecha sobre o sítio, permitindo a ligação da extremidade C-terminal do substrato e levando à clivagem do dipeptídeo C-terminal (ILLY *et al.*, 1997).

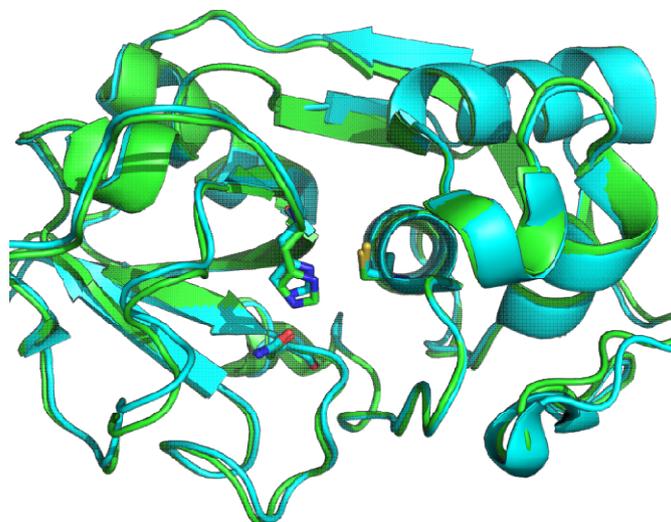
Atualmente é aceito na literatura que a rodesaína é a cisteíno-protease alvo de inibidores tripanossomicidas. Em 2008, Abdulla e colaboradores utilizaram a técnica de *Ribonucleic Acid interference* (RNAi) para silenciar seletivamente a TbCatL ou a TbCatB. A redução da expressão da rodesaína não foi capaz de induzir cura em animais experimentais, entretanto a vida média foi prolongada e houve redução da capacidade

do parasito de cruzar a BHC. A redução da expressão da TbCatB, por outro lado, produziu cura no mesmo modelo. Este resultado levou os autores a concluir que a TbCatB fosse o provável alvo de pequenas moléculas inibidoras de proteases capazes de induzir a cura em modelos experimentais (ABDULLA *et al.*, 2008).

No entanto, em 2012, Steverding e colaboradores argumentaram que a técnica de RNAi foi capaz de reduzir somente cerca de 60% da expressão da rodesaína no estudo realizado por Abdulla e colaboradores (2018) e que, portanto, os resultados não seriam conclusivos. Para esclarecer essa questão, o grupo de Steverding utilizou uma série de inibidores seletivos para TbCatB e rodesaína e observou que a inibição completa de TbCatB não levou à morte dos parasitos *in vitro*. Ao contrário, a inibição completada rodesaína teve efeito tripanossomicida. A inibição parcial da atividade da rodesaína não apresentou este efeito. Portanto, a partir desses resultados foi sugerido que a rodesaína e não a TbCatB é o alvo farmacológico de maior relevância (STEVERDING, DIETMAR *et al.*, 2012).

A rodesaína foi cocristalizada e teve sua estrutura resolvida em 2008, entretanto ainda não foi relatada a cocristalização com inibidor não covalente (KERR *et al.*, 2009). A rodesaína possui estrutura bastante similar à da cruzaina e seu domínio catalítico também apresenta 215 resíduos de aminoácidos, a mesma tríade catalítica Cys-His-Asn e o par iônico tiolato-imidazol protonado. Na **Figura 1.9** está apresentada a sobreposição das estruturas cristalográficas da cruzaina e rodesaína, com destaque para o sítio ativo.

Figura 1.9 – Sobreposição das estruturas cristaligráficas da cruzaina (estrutura 3KKU) e rodesaina (estrutura 2P86), em verde e ciano, respectivamente. O alinhamento foi executado exclusivamente utilizando os carbonos α da proteína. Figura preparada com o PyMOL.



1.5 Planejamento de inibidores das cisteíno proteases cruzaina e rodesaina com potencial tripanossomicida

Diversas pequenas moléculas inibidoras de cisteíno proteases foram relatadas na literatura. O mecanismo de ação mais comum observado está relacionado ao ataque do resíduo de Cys25 a algum centro eletrofílico do inibidor, levando à inibição irreversível da enzima.

Vários inibidores dipeptídicos, análogos ao substrato, apresentando um centro eletrofílico, foram capazes de inibir irreversivelmente a atividade das enzimas cruzaina e rodesaina. Nestas moléculas o segmento peptídico é necessário para o reconhecimento do inibidor pela enzima, interagindo com os subsítios (STEVERDING, D; CAFFREY; SAJID, 2006). Entretanto, o uso de peptídeos como fármacos é limitado pela baixa biodisponibilidade oral destas substâncias, em razão da presença de diferentes proteases ao longo do trato gastrointestinal capazes de hidrolisar ligações peptídicas. Além disso, peptídeos atravessam membranas celulares em pequena extensão devido à polaridade e, para polipeptídeos, devido ao peso molecular elevado. Mesmo a fração absorvida das substâncias com caráter peptídico tem meia vida limitada, devido tanto a ação de

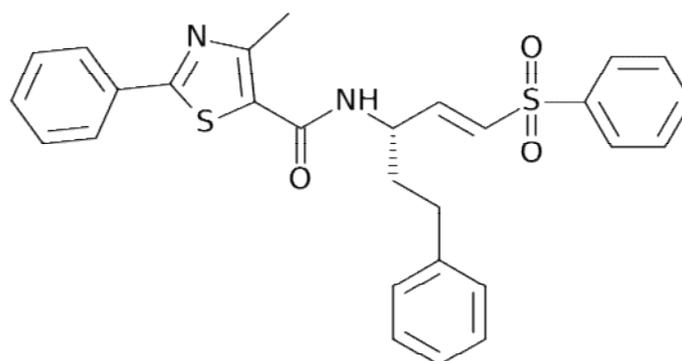
peptidases quanto a filtração glomerular (SILVA *et al.*, 2002).

No intuito de superar as limitações dos inibidores peptídicos, a busca por substâncias não peptídicas levou ao planejamento de vários protótipos. Em geral, estas substâncias apresentam um grupo eletrofilico que é atacado pela Cys-25, levando à formação de uma ligação covalente e à inibição irreversível da enzima. Entre os grupos eletrofilicos explorados no planejamento de inibidores da cruzaina e rodesaina podem-se citar: vinilsulfonas (BRYANT *et al.*, 2009; ENGEL *et al.*, 1998), hidrazinas (IFA *et al.*, 2000; ZANATTA *et al.*, 2008), heretociclos triazólicos (BRAK *et al.*, 2008), tiossemiarbazonas (DU *et al.*, 2002; FUJII *et al.*, 2005; MALLARI *et al.*, 2008) e nitrilas (MOTT *et al.*, 2010). Embora poucos inibidores não peptídicos tenham sido testados em modelos animais, os resultados demonstram a capacidade destas substâncias em reduzir a parasitemia e indicam que este é um campo aberto para mais investigações (STEVERDING, D; CAFFREY; SAJID, 2006).

Possivelmente as vinilsulfonas foram a classe química mais explorada na busca por inibidores da cruzaina. Um exemplo de candidato a novo fármaco para tratamento da doença de Chagas em estudos mais avançados é a vinilsulfona K777 (**Figura 1.8**). Esta substância induziu cura em modelos murinos, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença, na dose de 100 mg/kg/dia, por via intraperitoneal (ENGEL *et al.*, 1998). A dose de 50 mg/kg de K777 por via oral foi capaz de reduzir o dano cardíaco em cães (BARR *et al.*, 2005). Estudos de segurança em animais foram conduzidos e nenhuma alteração no eletrocardiograma ou na função respiratória foram verificados (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2014b). Estudos clínicos serão iniciados em breve com esta substância.

A classe das vinilsulfonas também foi explorada para o desenvolvimento de substâncias ativas contra *T. brucei*. Bryant e colaboradores (2009) prepararam a vinilsulfona peptideomimética **1** (**Figura 1.10**), a qual apresentou CI₅₀ contra a cruzaina e a rodesaina de 1 µM e 0,01 µM, respectivamente. A vinilsulfona **1** também foi testada contra o parasito *T. brucei brucei in vitro*, apresentando CI₅₀ de 7 µM, demonstrando, assim, uma boa correlação entre a atividade contra a enzima e contra o parasito. Vale ressaltar que esta substância não apresentou citotoxicidade frente à linhagem de células leucêmicas Jurkat (BRYANT *et al.*, 2009).

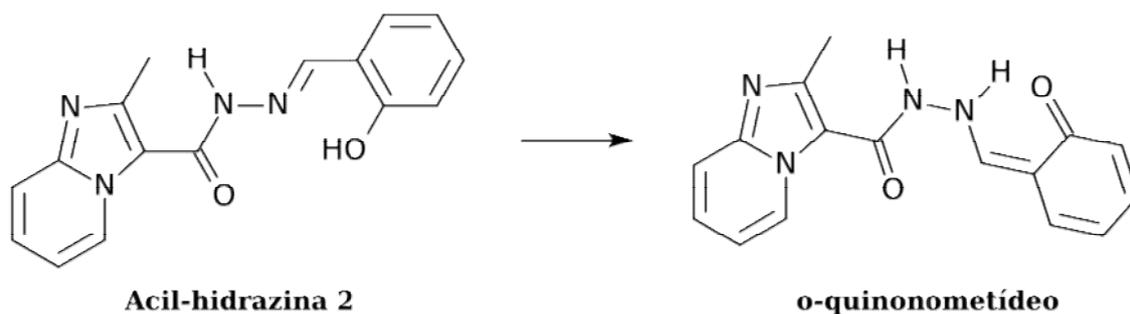
Figura 1.10 – Estrutura da vinilsulfona **1**, preparada por Bryant e colaboradores (2010)



Vinilsulfona 1

A classe das alcil-hidrazonas foi explorada como inibidores de cisteína proteases por Ifa e colaboradores (2000). A partir de estudos computacionais e experimentais este grupo investigou uma série de substâncias com similaridade estrutural e atividades inibitórias muito diferentes frente à cruzaina. A única substância que apresentou atividade inibitória da série foi a alcil-hidrazona **2** (**Figura 1.11**). Acreditando que somente as diferenças estruturais não poderiam explicar a diferença de atividade, os autores recorreram a métodos computacionais para avaliar a estrutura eletrônica das substâncias. Entretanto, as propriedades eletrônicas avaliadas, tais como a energia de transição HOMO-LUMO, a carga parcial nos átomos e mapas de densidade eletrônica, também não foram suficientes para explicar a diferença de atividade desta série. Como uma possível racionalização para a atividade da substância **2**, os autores propuseram a formação de um intermediário *o*-quinonometídeo, extremamente reativo (**Figura 1.11**), capaz de alquilar o resíduo nucleofílico Cys25. Este intermediário tem propriedades eletrônicas que poderiam justificar a inibição da atividade da cruzaina e somente a substância **2** da série estudada poderia gerar um intermediário *o*-quinonometídeo (IFA *et al.*, 2000).

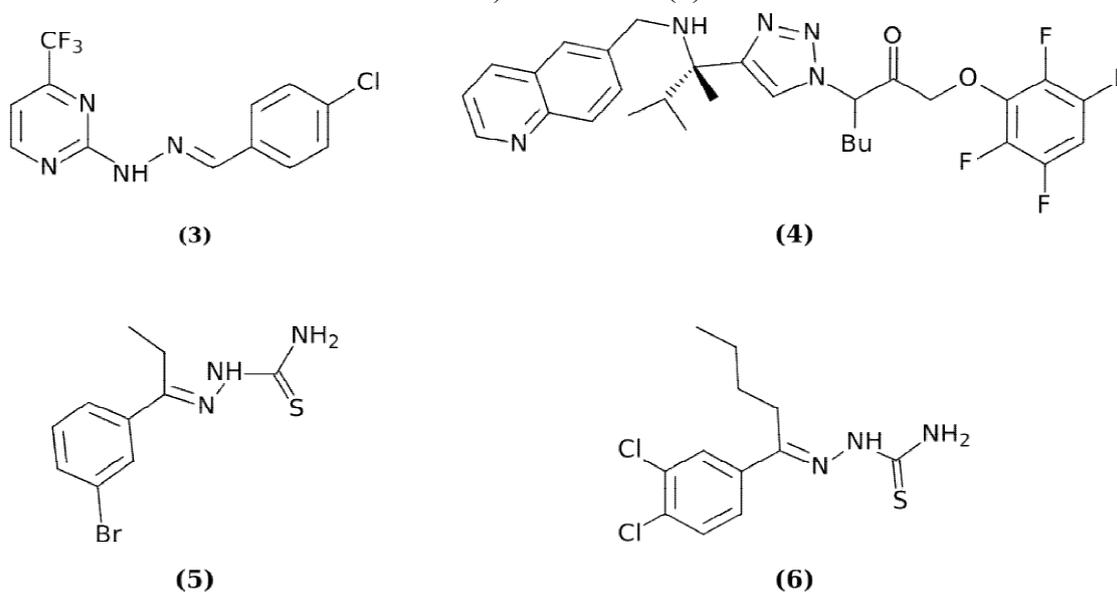
Figura 1.11 – Proposta de formação do intermediário *o*-quinonometídeo por transferência de próton a partir da alcil-hidrazona **2**



Fonte: adaptado de Ifa e colaboradores (2000)

A classe das hidrazinas também foi explorada por Zanatta e colaboradores (2008). A substância **3** (Figura 1.12) foi a mais potente dentre a série de 27 hidrazinas preparadas e testadas contra a enzima cruzaina, apresentando uma CI_{50} de $85 \pm 7 \mu\text{M}$. Os resultados de modelagem molecular deste estudo sugerem que o anel trifluoropirimidínico deste inibidor ocupe o bolsão S2, com o grupo hidrazina próximo a Cys25 e o anel cloro-benzeno em S1' (ZANATTA *et al.*, 2008).

Figura 1.12 – Estruturas químicas de alguns inibidores não peptídicos da cruzaina (**3**, **4**, **5** e **6**) e rodesaina (**6**)



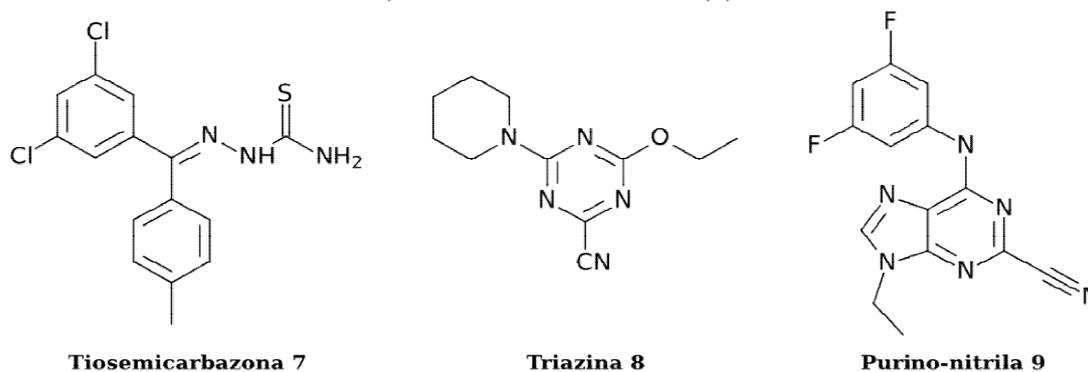
A classe dos heterociclos triazólicos é bastante empregada em química medicinal, em razão de sua fácil acessibilidade sintética assim como da variedade de atividades farmacológicas que apresentam (-H. ZHOU; WANG, 2012). O derivado triazólico **4** foi preparado por Brak e colaboradores (2008) e demonstrou atividade contra a cruzaina. Foi determinado que esta substância é um inibidor irreversível da enzima com constante

de inibição de segunda ordem de $147.000 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Os autores propõe que a Cys25 ataque o carbono α -carbonila deslocando o grupo 2,3,5,6-tetraflúor-fenol. Adicionalmente, testes contra *T. cruzi* em cultura de macrófagos demonstraram a capacidade de **4** de erradicar os parasitos sem apresentar citotoxicidade às células do hospedeiro (BRAK *et al.*, 2008).

A classe das tiosemicarbazonas foi uma das mais exploradas na busca por inibidores das cisteíno proteases cruzaiína e rodesaiína. A tiosemicarbazona **5** foi preparada por Du e colaboradores (2002) em um dos primeiros trabalhos relatando o uso desta classe química como inibidores covalentes reversíveis da cruzaiína. Esta substância apresentou uma CI_{50} contra cruzaiína de 100 nM, assim como atividade tripanossomicida *in vitro* (DU *et al.*, 2002). A classe das tiosemicarbazonas foi também explorada por Fujii e colaboradores (2005) que prepararam, dentre outras, a substância **6**. A série sintetizada em tal trabalho apresentou atividade contra cruzaiína, rodesaiína e falcipaína, sendo a última uma cisteíno-protease do *Plasmodium falciparum*. A substância **6** especificamente apresentou CI_{50} de 19 nM, 60 nM e 620 nM contra as três enzimas, respectivamente. Adicionalmente essa substância foi capaz de inibir a proliferação de *T. cruzi* e *T. brucei in vitro* (FUJII *et al.*, 2005).

Tiossemicarbazonas com atividade tripanossomicida também foram preparadas por Mallari e colaboradores (2008). Estes pesquisadores testaram uma série de substâncias contra as enzimas rodesaiína e TbCatB e contra culturas de *T. brucei*. A tiossemicarbazona **7** (**Figura 1.13**) apresentou CI_{50} contra rodesaiína, TbCatB e parasito de 0,046 μM , 6 μM e 1,1 μM , respectivamente. Neste estudo, os pesquisadores observaram substâncias inibidoras seletivas da rodesaiína com fraca correlação estatística entre esta inibição e atividade tripanossomicida. A inibição da TbCatB, por outro lado, não apresentou correlação com a atividade sobre o parasito (MALLARI *et al.*, 2008).

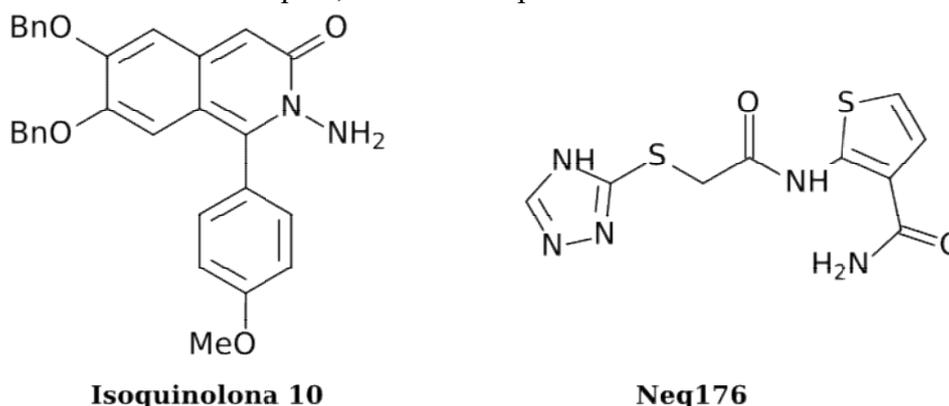
Figura 1.13 – Estruturas químicas de alguns inibidores não peptídicos da rodesaína (**8** e **9**) e cruzaina e rodesaína (**7**)



Mott e colaboradores (2010) identificaram a triazina **8**, ativa contra a rodesaína com CI_{50} na faixa de nanomolar (**Figura 1.13**), por triagem de alta performance. Esta estrutura serviu como protótipo para a preparação de uma série ativa contra a cruzaina. A purino-nitrila **9** (**Figura 1.13**) foi um dos compostos desta série e apresentou CI_{50} de 0,2 nM contra a cruzaina e menor que 6 nM contra a rodesaína. A substância **9** também apresentou atividade tripanossomicida ($CI_{50} = 25 \mu M$) e foi cocristalizada com a cruzaina e depositada no RCSB PDB sob o código 3I06. Esta estrutura cristalográfica evidencia a ligação covalente entre Cys25 e o inibidor (MOTT *et al.*, 2010).

A isoquinolina **10** (**Figura 1.14**) foi preparada por Micale e colaboradores (2009) partindo de protótipos derivados de produtos naturais. A substância **10** apresentou CI_{50} de 4,0 μM contra a rodesaína e 2,3 μM contra a falcipaína. O estudo determinou que a inibição exercida é do tipo reversível contra ambas as enzimas. Entretanto, as substâncias preparadas apresentaram baixa seletividade frente à catepsinas humanas B e K (MICALE *et al.*, 2009).

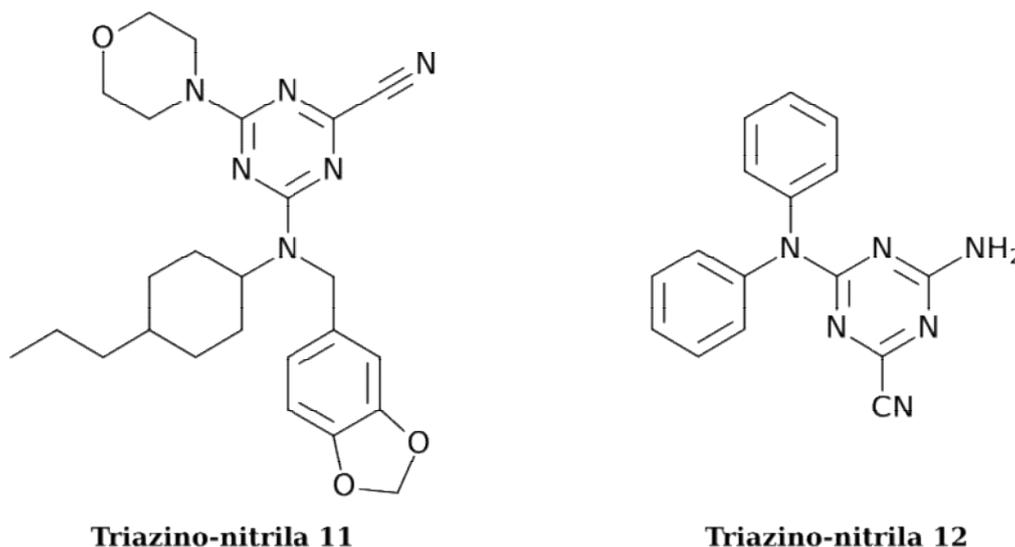
Figura 1.14 – Estruturas químicas da substância **10**, inibidor reversível da rodesaína, e do Neq176, inibidor competitivo da cruzaina.



Poucos inibidores competitivos da cruzaina foram relatados na literatura. Combinando triagem virtual baseada em ligantes e na estrutura do alvo, Wiggers e colaboradores (2010) chegaram à substância Neq176 (**Figura 1.14**), inibidor competitivo da cruzaina com CI_{50} de 68,5 μ M. A cruzaina foi cocristalizada com esta substância e teve sua estrutura resolvida pelos autores e depositada no RCSB PDB sob o código 4KLB. A estrutura depositada confirma a ausência de ligação covalente do inibidor com a proteína. Adicionalmente, a estrutura cristalográfica mostra que **Neq176** se liga aos bolsões S2 e S3 da cruzaina, realizando interações de de hidrogênio com Ser61, Gly66, Asp161 (WIGGERS *et al.*, 2013).

A triazino-nitrila **11** (**Figura 1.15**) foi preparada por Ehmke e colaboradores (2011) e apresentou atividade inibitória contra rodesaína, com K_i de 2 nM, e contra a falcipaina, com K_i de 1030 nM. O modo de inibição foi determinado como competitivo contra ambas as enzimas (EHMKE *et al.*, 2011). A classe das triazino-nitrilas também foi explorada por Mott e colaboradores (2010) no mesmo estudo que identificou a triazina **8** (**Figura 1.13**). Nesse estudo foram relatados resultados de triagem de alta performance que levaram à identificação de **12** como um potencial inibidor de cisteíno proteases. Esta substância apresentou CI_{50} de 0,07 μ M contra a cruzaina e maior do que 10 μ M contra a rodesaína. Adicionalmente, estudo do modo de inibição frente à esta enzima demonstrou uma inibição competitiva (MOTT *et al.*, 2010).

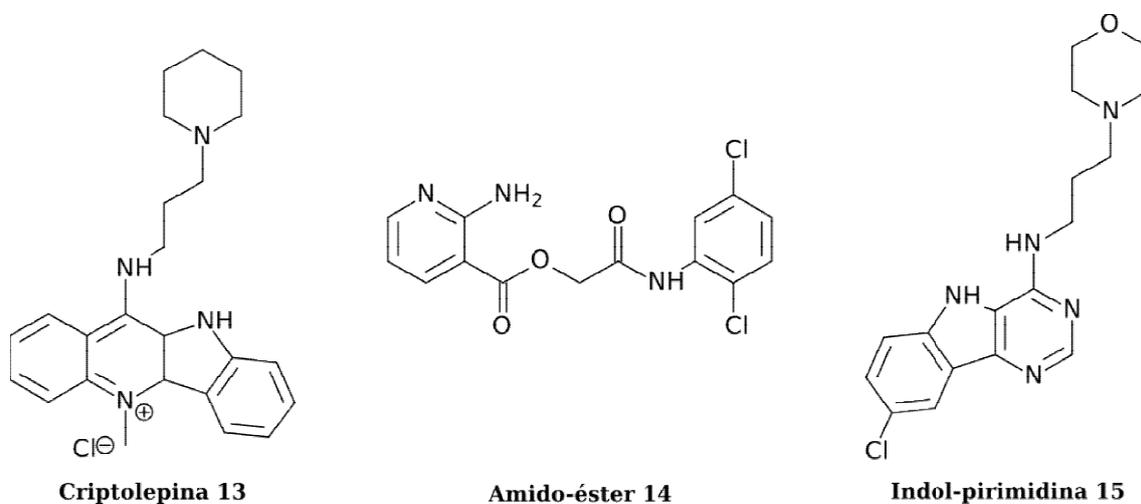
Figura 1.15 – Estrutura química de triazino-nitrilas **11** e **12** inibidores competitivos da rodesaína e cruzaina



A substância **13** (**Figura 1.16**) foi preparada por Lavrado e colaboradores (2012) em uma série de análogos à um produto natural alcalóide. Esta substância foi testada contra cepas de *T. brucei*, contra a cruzaina, rodesaína e TbCatB e apresentou CI_{50} de 0,06 μM , 11 μM , 5 μM e 60 μM , respectivamente. Os autores, entretanto, não determinaram o modo de inibição de nenhuma das substâncias da série. Neste estudo foi observada correlação entre a inibição da cruzaina e da rodesaína ($r^2 = 0,90$). (LAVRADO *et al.*, 2012).

Ferreira e colaboradores (2009) relatam a identificação da substância **14** (**Figura 1.16**) como um potencial inibidor para a cruzaina a partir de estudos de triagem virtual. O modo de inibição de **14** foi determinado como competitivo, com K_i de 32 μM contra a cruzaina (FERREIRA *et al.*, 2009). Esses mesmos pesquisadores (FERREIRA *et al.*, 2010), em um novo estudo computacional e experimental envolvendo a avaliação de 197.861 substâncias por triagem de alta performance, identificaram um conjunto de inibidores reversíveis, da classe das indolpirimidinas, apresentando CI_{50} de até 0,3 μM . A indolpirimidina **15** é especialmente interessante, devido à relativa acessibilidade sintética e peso molecular e alta constante de afinidade pela cruzaina ($K_i = 2 \mu\text{M}$) (**Figura 1.16**) (FERREIRA *et al.*, 2010).

Figura 1.16 – Estrutura química da criptolepina **13**, preparada por Lavrado e colaboradores (2012), e de dois inibidores competitivos da cruzaina **14** e **15**, identificados por Ferreira e colaboradores (2009) e Ferreira e colaboradores (2010).

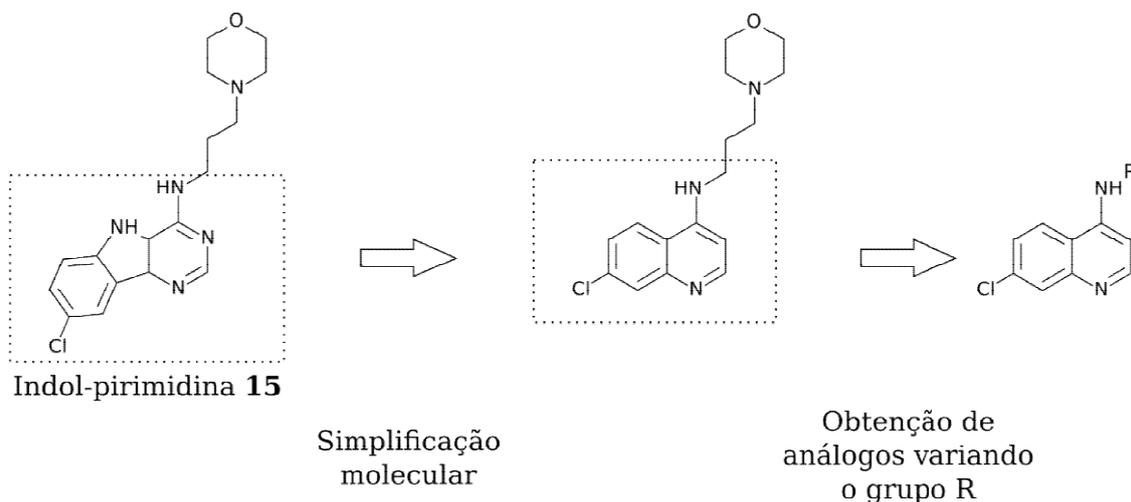


Com base nos exemplos ilustrados, fica claro que o planejamento de inibidores para a cruzaina e rodesaina é uma estratégia promissora na busca por novos candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas e da HAT. Diferentes estudos também mostram a viabilidade da busca combinada de substâncias ativas contra estas enzimas em uma mesma série sintética. A descoberta da classe das indolpirimidinas como inibidoras da cruzaina abre novas perspectivas para o desenvolvimento de análogos, tendo em vista a escassez de inibidores competitivos relatados e a diversidade de possíveis modificações a serem exploradas. A substância **15**, da classe das indolpirimidinas, foi escolhida como protótipo para os estudos realizados nesta dissertação.

2 PLANO DE SÍNTESE

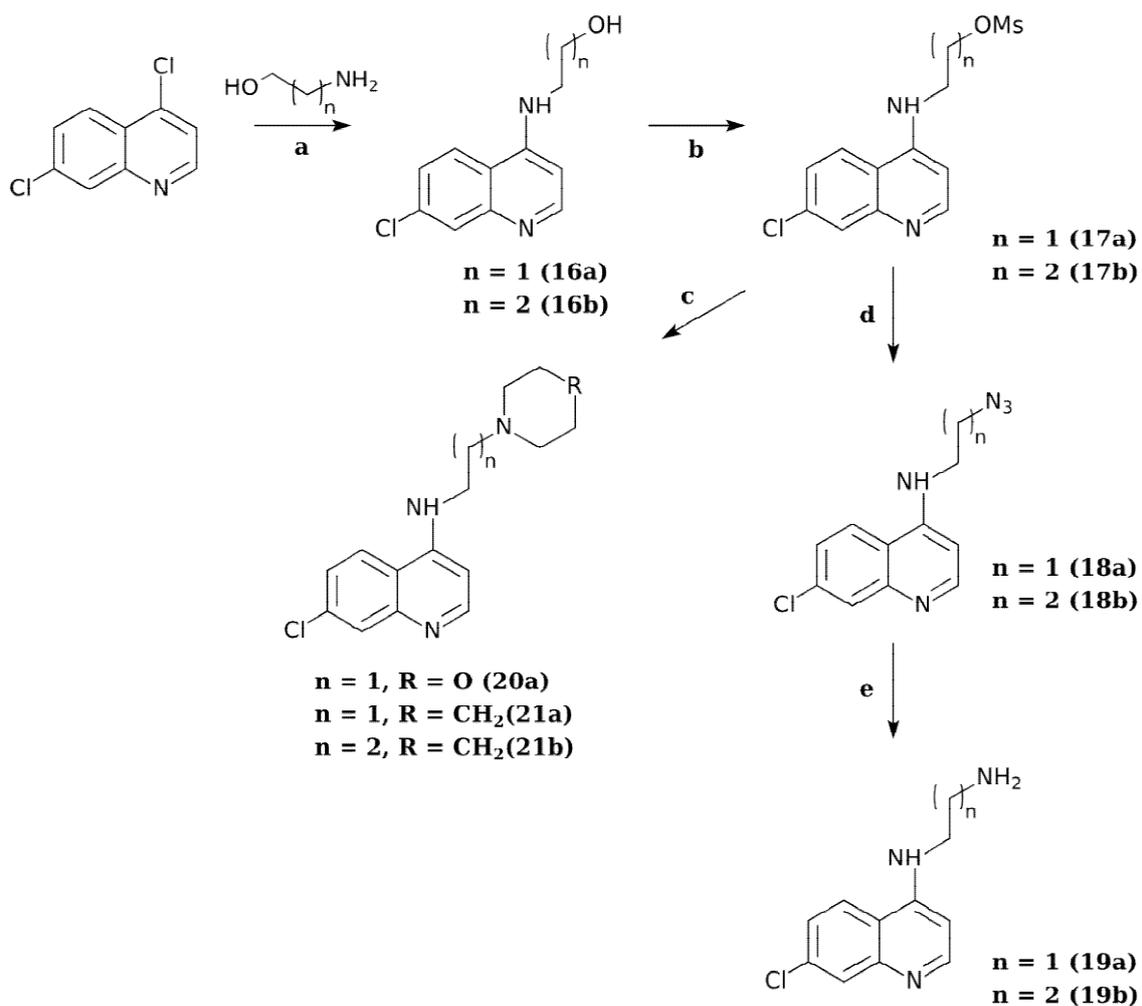
A síntese de derivados da indol-pirimidina **15** (**Figura 2.1**) foi planejada utilizando a estratégia de simplificação molecular. A substituição do núcleo indol-pirimidínico de **15** por um grupo 4,7-dicloro-quinolina resulta na obtenção de analogos mais acessíveis sinteticamente, o que é de grande interesse em química medicinal, principalmente quando se trata de desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas. A variação do tamanho, basicidade e substituintes da cadeia lateral permite explorar possíveis interações na superfície da enzima e construir um esboço de relação estrutura atividade.

Figura 2.1 – Esquema do planejamento de possíveis inibidores da cruzaina partindo do protótipo **15**



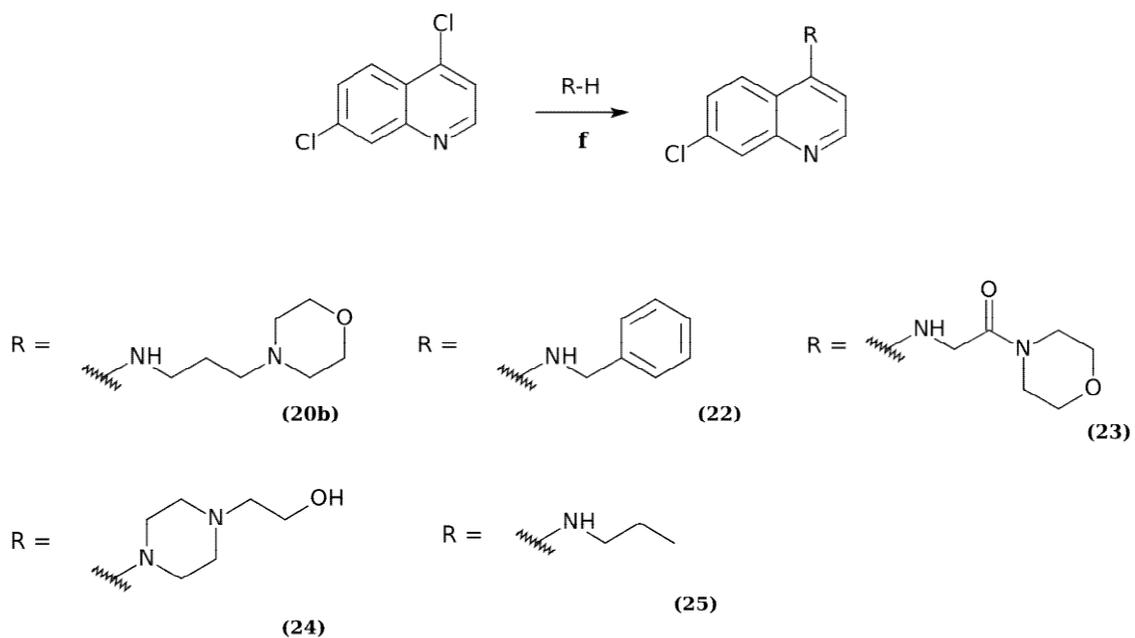
A síntese das substâncias **16a** a **21b** foi planejada partindo da 4,7-dicloro-quinolina por reação com o aminoálcool correspondente resultando na obtenção dos derivados alcoóis **16a** e **16b** (**Figura 2.2**), que foram então mesilados gerando as substâncias **17a** e **17b**. O deslocamento do grupo metanosulfonato por azida de sódio resultou na formação dos derivados azido **18a** e **18b**. A redução do grupo azida à amina em **18a** e **18b** originou as substâncias **19a** e **19b**. Alternativamente, o deslocamento do grupo metanosulfonato de **17a** e **17b** por diferentes aminas heterocíclicas levou às substâncias **20a**, **21a** e **21b**.

Figura 2.2 – Rota de síntese proposta para obtenção das substâncias **16a** a **21b**



A obtenção das substâncias **20b**, **22**, **23**, **24** e **25** foi realizada por reação direta da 4,7-dicloro-quinolina com diferentes aminas (**Figura 2.3**).

Figura 2.3 – Rota de síntese proposta para obtenção das substâncias **20b**, **22**, **23**, **24** e **25**.



3 OBJETIVOS

Objetivou-se neste trabalho o desenvolvimento de inibidores potenciais da cruzaina e rodesaina, com atividade tripanossomicida, baseado na estrutura da indolpirimidina **15** (Figura 1.16). Para alcançar este objetivo geral, buscou-se, como objetivos específicos:

1. sintetizar uma série de análogos da arilpirimidina **15**, substituindo o núcleo indolpirimidínico por um anel quinolínico;
2. avaliar a capacidade das substâncias sintetizadas em inibirem as enzimas cruzaina e rodesaina em testes *in vitro*;
3. avaliar a atividade tripanossomicida das substâncias sintetizadas em testes *in vitro* contra forma amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*;
4. avaliar a citotoxicidade das substâncias sintetizadas em células não infectadas e calcular o índice de seletividade;
5. avaliar possíveis modos de ligação de cada uma das substâncias sintetizadas frente às enzimas por meio de estudos de ancoragem molecular;
6. avaliar a estabilidade dos complexos proteína-ligante e obter mais informações sobre os possíveis modos de ligação por meio de dinâmicas moleculares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho Microquímica MQAPF 301 no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG e não foram corrigidas. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

Os espectros na região do infravermelho foram determinados em espectrômetro FT-IR Spectrum One Perkin Elmer no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os espectros na região do infravermelho das substâncias **20b** e **25** foram determinados em espectrômetro IRPrestige-21 Shimadzu no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e sub-espectro DEPT-135 foram registrados em aparelhos Bruker Avance DPX-200 e Bruker Avance DRX-400 no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução – LAREMAR do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG.

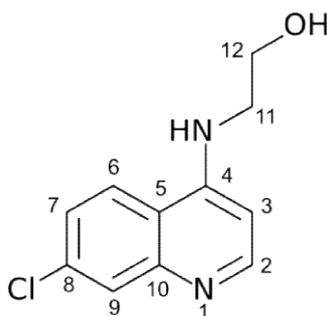
Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se sílica gel 60 G Merck® em camadas de 0,25 mm de espessura sobre placas de vidro. Como reveladores utilizou-se vapor de iodo, solução etanólica de ninhidrina 0,3% p/v e solução de sulfato de cério IV 1% p/v, molibdato de amônio 5% p/v em solução de H_2SO_4 10% v/v. Para cromatografia em coluna de sílica (CCS) utilizou-se sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/70-230 mesh) Merck®.

Para as reações utilizou-se solventes padrão analítico sem tratamento prévio.

4.1.1 Método geral para síntese da 7-cloro-4-(2-hidroxiethylamino) quinolina (**16a**) e 7-cloro-4-(3-hidroxiethylamino) quinolina (**16b**)

A um balão de fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador de refluxo e fechado com tubo de CaCl₂, foram adicionados um equivalente de 4,7-dicloroquinolina, três equivalentes do aminoálcool correspondente, 3 equivalentes de trietilamina (TEA) e 5 mL de etanol absoluto. A reação foi mantida em banho de óleo a 90 °C sob agitação magnética. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 9:1; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) ninhidrina, seguido de aquecimento) até evidência do consumo total do material de partida. Após término da reação, foram adicionados 50 mL de solução saturada de NaHCO₃, sob banho de gelo e agitação. O precipitado formado foi filtrado e lavado com solução saturada de NaHCO₃. Adaptado de Sashidhara e colaboradores (SASHIDHARA *et al.*, 2012)

4.1.1.1 7-cloro-4-(2-hidroxiethylamino) quinolina (**16a**)



16a

Seguindo o método geral descrito na seção 4.1.1 foram obtidos 558 mg (99% de rendimento) de **16a**, na forma de um sólido branco, após 10 horas de reação.

FM: C₁₁H₁₁ClN₂O

MM: 222,67g/mol

FF: 212,8 – 214,5 °C; FF lit.: 213 – 215 °C (MELATO *et al.*, 2007)

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3306 (N-H); 3066 (sp^2 C-H); 2964, 2923 (sp^3 C-H); 1614, 1538 (sp^2 C=C); 1334 (sp^2 C-N); 1063 (C-O).

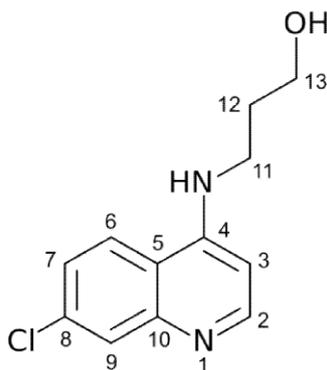
Tabela 4.1 – RMN de ^1H de **16a** (200 MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	^NJ (Hz)
H-2	d	8,34	1	$^3J_{1,2} = 5,4$
H-6	d	8,29	1	$^3J_{5,6} = 9,0$
H-9	d	7,79	1	$^4J_{8,6} = 2,2$
H-7	dd	7,45	1	$^3J_{6,5} = 9,0$ $^4J_{6,8} = 2,2$
N-H	t	7,32	1	$^3J_{\text{NH},10} = 5,3$
H-3	d	6,50	1	$^3J_{2,1} = 5,4$
O-H	sl	4,93	1	-
H-12	m	3,70 – 3,60	2	-
H-11	m	3,40 – 3,30	ND*	-

*ND: não determinado – sinal sobreposto ao sinal de água do DMSO- d_6

Tabela 4.2 – RMN de ^{13}C de **16a** (50 MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	153,6	CH
C-4 ou C-10	152,0	C_{ipso}
C-4 ou C-10	150,8	C_{ipso}
C-8	135,1	C_{ipso}
C-9	129,2	CH
C-6 ou C-7	125,9	CH
C-6 ou C-7	125,7	CH
C-5	119,2	C_{ipso}
C-3	100,4	CH
C-12	60,5	CH_2
C-11	46,9	CH_2

4.1.1.2 7-cloro-4-(3-hidroxiopropilamino)-quinolina (**16b**)**16b**

Seguindo o método geral descrito na seção 4.1.1 foram obtidos 486 mg (99% de rendimento) de **16b**, na forma de um sólido branco, após 14 horas de reação.

FM: C₁₂H₁₃ClN₂O

MM: 236,70g/mol

FF: 148,8 – 150,1 °C; FF lit.: 140 – 142 °C(SOLOMON; HU; LEE, 2010)

IV($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3317 (N-H); 3070 (sp^2 C-H); 2881 (sp^3 C-H); 1610, 1543 (sp^2 C=C); 1382 (sp^2 C-N); 1065 (C-O).

Tabela 4.3 – RMN de ¹H de **16b** (200 MHz, DMSO-d₆) (continua)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	ⁿ <i>J</i> (Hz)
H-2	d	8,37	1	³ <i>J</i> _{1,2} = 5,4
H-6	d	8,23	1	³ <i>J</i> _{5,6} = 9,0
H-9	d	7,78	1	⁴ <i>J</i> _{8,6} = 2,2
H-7	dd	7,42	1	³ <i>J</i> _{6,5} = 9,0 ⁴ <i>J</i> _{6,8} = 2,2
N-H	t	7,32	1	³ <i>J</i> _{NH,10} = 5,2
H-3	d	6,46	1	³ <i>J</i> _{2,1} = 5,4
H-13	ND	3,57	ND	ND*

Tabela 4.3 – RMN de ^1H de **16b** (200 MHz, DMSO- d_6) (conclusão)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	nJ (Hz)
H-11	m	3,25 – 3,40	2	-
H-12	quint	1,80	2	$^3J_{11,10} = ^3J_{11,12}$ = 6,6

*ND: não determinado – sinal sobreposto ao sinal de água do DMSO- d_6

Tabela 4.4 – RMN de ^{13}C de **16b** (50 MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	151,8	CH
C-4 ou C-10	150,2	C _{ipso}
C-4 ou C-10	148,9	C _{ipso}
C-8	133,4	C _{ipso}
C-9	127,3	CH
C-6 ou C-7	124,00	CH
C-6 ou C-7	124,0	CH
C-5	117,4	C _{ipso}
C-3	98,5	CH
C-13	58,5	CH ₂
C-11	39,5	CH ₂
C-12	30,9	CH ₂

4.1.2 Método geral para síntese de 7-cloro-4-[(2-metanosulfoniloxietil)amino] quinolina (**17a**) e 7-cloro-4-[(2-metanosulfoniloxipropil)amino] quinolina (**17b**)

Método A

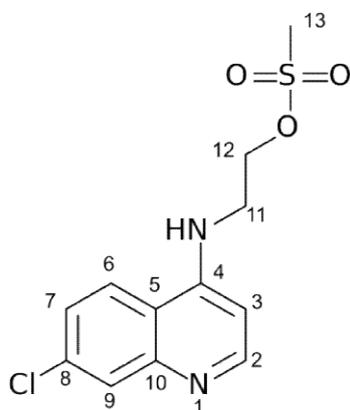
A um balão de fundo redondo de 50 mL, fechado com rolha de plástico, foram adicionados um equivalente do derivado aminoálcool-quinolina, três equivalentes de K_2CO_3 e 15 mL de diclorometano. A mistura de reação foi mantida sob banho de gelo e agitação magnética e, em seguida, foram adicionados, lentamente, 1,1 equivalentes de

cloreto de metanosulfonila. A mistura de reação foi lentamente aquecida até temperatura ambiente. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila metanol 95:5; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) molibdato cérico de amônio (CAM), seguido de aquecimento) até evidência do consumo total do material de partida. Após término da reação, a mistura foi transferida para um funil de separação e lavada com 3x10mL de água. A fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ anidro e, em seguida, filtrada. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório.

Método B

A um balão de fundo redondo de 50 mL, fechado com rolha de plástico, foram adicionados um equivalente do derivado aminoálcool-quinolina, três equivalentes de K₂CO₃ e 15 mL de diclorometano. A mistura de reação foi mantida sob banho de gelo e agitação magnética e, em seguida, foram adicionados, lentamente, 1,1 equivalentes de cloreto de metanosulfonila. A reação foi lentamente aquecida até temperatura ambiente. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila metanol 95:5; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) CAM, seguido de aquecimento) até evidência do consumo total do material de partida. Após término da reação, foram lentamente adicionadas cerca de 20 gotas de água, sob agitação magnética intensa, até solubilização completa do precipitado. Adicionou-se, então, Na₂SO₄ anidro e, em seguida, filtrou-se. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório.

4.1.2.1 7-cloro-4-[(2-metanosulfonilo)etil]amino] quinolina (**17a**)



17a

Seguindo o método A descrito na seção 4.1.2 foram obtidos 46 mg (54% de rendimento) de **17a**, na forma de um sólido branco, após 24 horas de reação. Seguindo o método B descrito na seção 4.1.2 foram obtidos 301 mg (94% de rendimento) de **17a**, na forma de um sólido branco, após 20 horas de reação.

FM: C₁₂H₁₃ClN₂O₃S

MM: 300,77g/mol

FF: 140,4 – 142,0 °C; FF lit.: 138 – 140 °C (CHIYANZU *et al.*, 2005)

IV($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3208 (N-H); 3031 (sp^2 C-H); 2962 (sp^3 C-H); 1610, 1538 (C=C arom.); 1325 (arom. C-N); 1343, 1168 (S=O); 1142 (C-O).

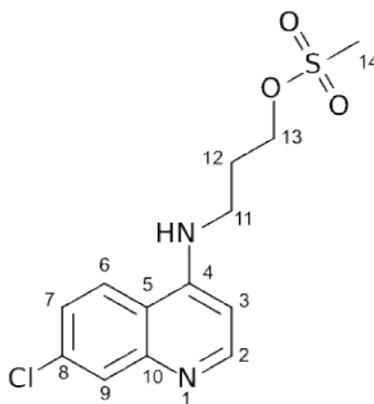
Tabela 4.5 – RMN de ¹H de **17a** (200 MHz, DMSO-d₆)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	$^N J$ (Hz)
H-2	d	8,43	1	$^3 J_{1,2} = 5,5$
H-6	d	8,26	1	$^3 J_{5,6} = 9,0$
H-9	d	7,81	1	$^4 J_{8,6} = 2,0$
N-H	m	7,60	1	-
H-7	dd	7,48	1	$^3 J_{6,5} = 9,0$ $^3 J_{6,8} = 2,0$
H-3	d	6,60	1	$^3 J_{2,1} = 5,5$
H-12	t	4,43	2	$^3 J_{11,10} = 5,2$
H-11	m	3,67	2	-
H-13	s	3,16	3	-

Tabela 4.6 – RMN de ^{13}C de **17a** (50 MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	151,8	CH
C-4 ou C-10	150,5	C _{ipso}
C-4 ou C-10	148,9	C _{ipso}
C-8	134,2	C _{ipso}
C-9	127,5	CH
C-6 ou C-7	124,9	CH
C-6 ou C-7	124,4	CH
C-5	117,7	C _{ipso}
C-3	99,3	CH
C-12	68,2	CH ₂
C-11	41,9	CH ₂
C-13	37,1	CH ₃

4.1.2.2 7-cloro-4-[(2-metanosulfoniloxipropil)amino] quinolina (**17b**)

**17b**

Seguindo o método A descrito na seção 4.1.2 foram obtidos 125 mg (55% de rendimento) de **17b**, na forma de um sólido branco, após 24 horas de reação. Seguindo o método B descrito na seção 4.2 foram obtidos 64 mg (97% de rendimento) de **17b**, na forma de um sólido branco, após 23 horas de reação.

FM: C₁₃H₁₅ClN₂O₃S

MM: 314,79g/mol

FF: 124,0 – 126,2 °C; FF lit.: 124 – 126 °C (SOLOMON; HU; LEE, 2010)

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3232 (N-H); 3067 (sp^2 C-H); 3018, 2967 (sp^3 C-H); 1610, 1539 (sp^2 C=C); 1332 (arom. C-N); 1345, 1166 (S=O); 1136 (C-O).

Tabela 4.7 – RMN de ^1H de **17b** (200 MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	^NJ (Hz)
H-2	d	8,44	1	$^3J_{1,2} = 5,6$
H-6	d	8,30	1	$^3J_{5,6} = 9,0$
H-9	s	7,81	1	-
N-H	sl	7,64	1	-
H-7	d	7,50	1	$^3J_{5,6} = 9,0$
H-3	d	6,57	1	$^3J_{2,1} = 5,7$
H-13	t	4,36	2	$^3J_{12,11} = 6,1$
H-11	d	3,42	2	$^3J_{10,11} = 5,3$
H-14	s	3,20	3	-
H-12	m	2,09	2	-

Tabela 4.8 – RMN de ^{13}C de **17b** (50 MHz, DMSO- d_6) (continua)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	151,2	CH
C-4 ou C-10	151,0	C_{ipso}
C-4 ou C-10	147,8	C_{ipso}
C-8	134,5	C_{ipso}
C-9	126,6	CH
C-6 ou C-7	124,9	CH
C-6 ou C-7	124,7	CH
C-5	117,5	C_{ipso}
C-3	99,1	CH
C-13	68,7	CH_2
C-11	39,2	CH_2

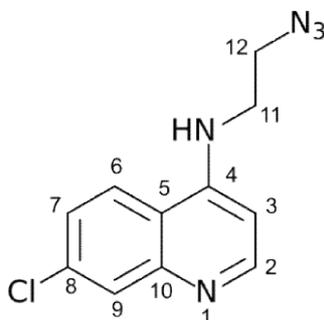
Tabela 4.8 – RMN de ^{13}C de **17b** (50 MHz, DMSO- d_6) (conclusão)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-14	37,0	CH ₃
C-12	27,8	CH ₂

4.1.3 Método geral para síntese de 7-cloro-4-(2-azidoetilamino) quinolina (**18a**) e 7-cloro-4-(3-azidopropilamino) quinolina (**18b**)

A síntese de **18a** e **18b** foi executada conforme Raj e colaboradores (RAJ *et al.*, 2013). A um balão de fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador de refluxo, foram adicionados um equivalente do produto mesilado correspondente, cinco equivalentes de azida de sódio e 2 mL de DMF. A mistura de reação foi mantida sob agitação magnética e em banho de óleo a 110 °C . O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 95:5; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) ninhidrina, seguido de aquecimento) até evidência do consumo total do material de partida. Após término da reação o solvente foi eliminado sob jato de ar e o sólido resultante foi ressuscendido em 25 mL de diclorometano. A mistura foi extraída com 3 x 25 mL de água. A fase orgânica foi secada com Na₂SO₄, filtrou-se e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. O sólido formado foi purificado por CCS usando diclorometano com 2,5 % de metanol como eluente.

*4.1.3.1 7-cloro-4-(2-azidoetilamino) quinolina (**18a**)*

**18a**

Seguindo o método geral descrito na seção 4.1.3 foram obtidos 194mg (79% de

rendimento) de **18a**, na forma de um sólido amarelo claro, após 5 horas de reação.

FM: C₁₁H₁₀ClN₅

MM: 247,68 g/mol

FF: 152,3 – 154,9; FF lit.:145 – 147 °C(DE SOUZA *et al.*, 2009)

IV($\bar{\nu}$ /cm⁻¹): 3229 (N-H); 3066 (*sp*² C-H); 2962 (*sp*³C-H); 2125, 2092 (N=N⁺=N⁻); 1611, 1549 (C=C arom.); 1327 (*sp*² C-N).

Tabela 4.9 – RMN de ¹H de **18a** (200 MHz, CDCl₃)

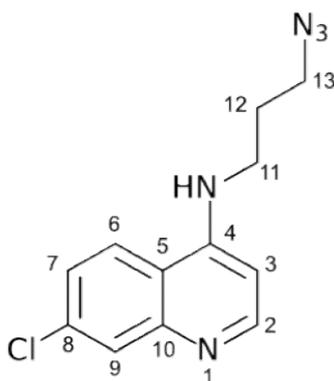
<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	<i>^NJ (Hz)</i>
H-2	d	8,52	1	³ J _{1,2} = 5,3
H-9	d	7,95	1	⁴ J _{8,6} = 2,0
H-6	d	7,71	1	³ J _{5,6} = 9,0
H-7	dd	7,34	1	³ J _{6,5} = 9,0 ⁴ J _{6,8} = 2,0
H-3	d	6,40	1	³ J _{2,1} = 5,3
N-H	sl	5,53	1	-
H-12	t	3,66	2	³ J _{11,10} = 5,2
H-11	t	3,52	2	³ J _{10,11} = 5,2

Tabela 4.10 – RMN de ¹³C de **18a** (50 MHz, CDCl₃) (continua)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	151,0	CH
C-10 ou C-4	149,5	C _{ipso}
C-4 ou C-10	149,3	C _{ipso}
C-8	135,4	C _{ipso}
C-9	128,9	CH
C-6	125,9	CH
C-7	121,3	CH
C-5	117,5	C _{ipso}

Tabela 4.10 – RMN de ^{13}C de **18a** (50 MHz, CDCl_3) (conclusão)

C-3	99,4	CH
C-12	50,0	CH_2
C-11	42,4	CH_2

4.1.3.2 7-cloro-4-(3-azidopropilamino) quinolina (**18b**)**18b**

Seguindo o método geral descrito na seção 4.1.3 foram obtidos 140mg (70% de rendimento) de **18b**, na forma de um sólido amarelo claro, após 5 horas de reação.

FM: $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$

MM: 261,71 g/mol

FF: 144,4 – 146,0 °C; FF lit.: 144 °C (FISHER *et al.*, 2014)

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3234 (N-H); 3065 (sp^2 C-H); 2945 (sp^3 C-H); 2098 ($\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$); 1612 (C=C arom.).

Tabela 4.11 – RMN de ^1H de **18b** (200 MHz, CDCl_3)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	^NJ (Hz)
H-2	d	8,52	1	$^3J_{1,2} = 5,4$
H-9	d	7,94	1	$^4J_{8,6} = 2,1$
H-6	d	7,66	1	$^3J_{5,6} = 9,0$
H-7	dd	7,34	1	$^3J_{6,5} = 9,0$ $^4J_{6,8} = 2,1$
H-3	d	6,40	1	$^3J_{2,1} = 5,4$
N-H	sl	5,39	1	-
H-13	t	3,52	2	$^3J_{12,11} = 6,3$
H-11	t	3,42	2	$^3J_{10,11} = 6,3$
H-12	quint	2,00	2	$^3J_{11,12} = ^3J_{11,10} = 6,3$

Tabela 4.12 – RMN de ^{13}C de **18b** (50 MHz, CDCl_3)

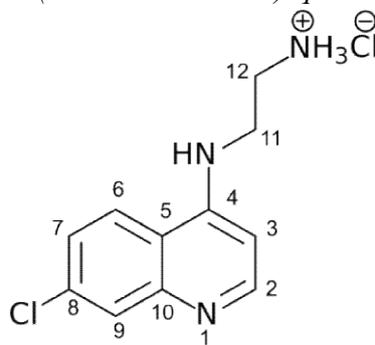
<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	152,0	CH
C-10 ou C-4	149,6	C_{ipso}
C-4 ou C-10	149,1	C_{ipso}
C-8	135,0	C_{ipso}
C-9	128,8	CH
C-6	125,5	CH
C-7	121,0	CH
C-5	117,2	C_{ipso}
C-3	99,0	CH
C-13	49,6	CH_2
C-11	41,0	CH_2
C-12	27,9	CH_2

4.1.4 Método geral para síntese de 7-cloro-4-(2-aminoetilamino) quinolina (**19a**) e 7-cloro-4-(3-aminopropilamino) quinolina (**19b**)

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados um equivalente do derivado

azido correspondente, 3 equivalentes de trifenilfosfina, 10 mL de THF e 1 mL de água. O balão foi fechado com septo de borracha e a mistura de reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 95:5; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) ninhidrina, seguido de aquecimento) até evidência do consumo total do material de partida. Após o término da reação o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. O sólido formado foi ressuspenso em 25 mL de diclorometano e extraído com 3 x 25 mL de solução de HCl 1 mol/L. A fase aquosa foi reunida e o solvente evaporado sob jato de ar.

4.1.4.1 Cloridrato de 7-cloro-4-(2-aminoetilamino)-quinolina (**19a**)



19a

Seguindo o método geral descrito na seção 4.1.4 obteve-se 43 mg (40% de rendimento) de **19a**, na forma de um sólido branco, após 24 horas de reação.

FM: C₁₁H₁₃Cl₂N₃

MM: 258,15 g/mol

FF: 209,5 – 211,7 °C

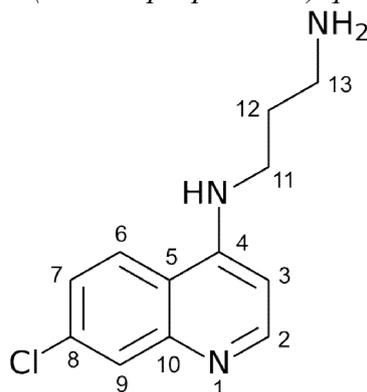
IV($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3415 (N-H); 3063 (sp^2 C-H); 2875 (NH₃⁺); 1589 (C=C arom.); 1611, 1532(def. angular NH₃⁺ assimétrica e simétrica) 1355 (sp^2 C-N).

Tabela 4.13 – RMN de ^1H de **19a** (200 MHz, D_2O)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	^NJ (Hz)
H-2	d	8,24	1	$^3J_{1,2} = 7,1$
H-6	d	7,93	1	$^3J_{5,6} = 9,1$
H-9	d	7,61	1	$^4J_{8,6} = 1,3$
H-7	dd	7,45	1	$^3J_{6,5} = 9,1$ $^4J_{8,6} = 1,3$
H-3	d	6,74	1	$^3J_{2,1} = 7,1$
H-11	t	3,84	2	$^3J_{10,11} = 6,2$
H-12	t	3,31	2	$^3J_{11,10} = 6,2$

Tabela 4.14 – RMN de ^{13}C de **19a** (50 MHz, D_2O)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-4	157,3	C_{ipso}
C-2	144,0	CH
C-8 ou C-10	140,8	C_{ipso}
C-8 ou C-10	139,0	C_{ipso}
C-9	129,0	CH
C-6	125,3	CH
C-7	120,3	CH
C-5	116,4	C_{ipso}
C-3	99,7	CH
C-11	41,6	CH_2
C-12	38,7	CH_2

4.1.4.2 Cloridrato de 7-cloro-4-(3-aminopropilamino) quinolina (**19b**)**19b**

Seguindo o método geral descrito na seção 4.1.4 foram obtidos 108 mg (77% de rendimento) de **19b**, na forma de um sólido branco, após 24 horas de reação.

FM: C₁₂H₁₅Cl₂N₃

MM: 272,17 g/mol

FF: 198,8 – 201,1 °C

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3404 (N-H); 3055 (sp^2 C-H); 2953 (NH₃⁺); 1596 (C=C arom.); 1619 (def. angular NH₃⁺)

Tabela 4.15 – RMN de ¹H de **19b** (200 MHz, D₂O)

Atribuição	Multiplicidade	δ (ppm)	Área relativa	^N J (Hz)
H-2	d	8,15	1	³ J _{1,2} = 7,1
H-6	d	7,88	1	³ J _{5,6} = 9,1
H-9	d	7,57	1	⁴ J _{8,6} = 2,0
H-7	dd	7,40	1	³ J _{6,5} = 9,1 ⁴ J _{6,8} = 2,0
H-3	d	6,66	1	³ J _{2,1} = 7,1
H-11	t	3,56	2	³ J _{10,11} = 7,1
H-13	t	3,04	2	³ J _{12,11} = 7,8
H-12	m	2,03	2	

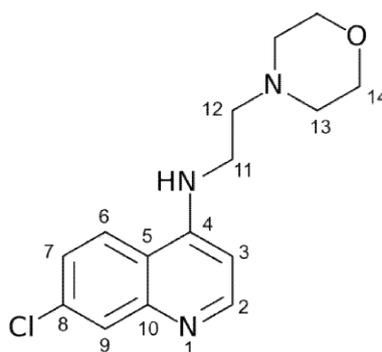
Tabela 4.16 – RMN de ^{13}C de **19b** (50 MHz, D_2O)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-4	155,7	C_{ipso}
C-2	142,1	CH
C-8 ou C-10	139,2	C_{ipso}
C-8 ou C-10	137,6	C_{ipso}
C-9	127,7	CH
C-6	123,8	CH
C-7	118,8	CH
C-5	114,9	C_{ipso}
C-3	98,2	CH
C-11	40,2	CH_2
C-13	37,0	CH_2
C-12	25,4	CH_2

4.1.5 Método geral para síntese de 7-cloro-4-[2-(1-morfolinil)etilamino]-quinolina (**20a**), 7-cloro-4-[2-(1-piperidinil)etilamino]-quinolina (**21a**), 7-cloro-4-[3-(1-piperidinil)propilamino]-quinolina (**21b**)

As reações de obtenção de **20a**, **21a** e **21b** foram executadas conforme Solomon e colaboradores (SOLOMON; HU; LEE, 2010). A um balão de fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador de refluxo fechado com tubo de CaCl_2 , foram adicionados um equivalente do derivado mesilado correspondente, três equivalentes da amina correspondente e 5 mL de THF grau HPLC. A mistura de reação foi mantida sob agitação magnética e em banho de óleo a 50 °C. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila metanol 95:5; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) ninhidrina, seguido de aquecimento) até evidência do consumo total do material de partida. Após o término da reação o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. O sólido resultante foi purificado por CCS usando como eluente acetato de etila:metanol 99:1 seguido por acetato de etila:metanol: NH_4OH 94:5:1

4.1.5.1 7-cloro-4-[2-(1-morfolinil)etilamino] quinolina(20a)

**20a**

Seguindo o método geral descrito na seção 4.1.5 foram obtidos 100 mg (28% de rendimento) de **20a**, na forma de um sólido amarelo, após 40 horas de reação.

FM: C₁₅H₁₈ClN₃O

MM: 291,78 g/mol

FF: 142,5 – 144,1 °C

IV($\bar{\nu}$ /cm⁻¹): 3204 (N-H); 3061 (sp² C-H); 1610, 1578 (C=C arom.); 1116 (C-O).

Tabela 4.17 – RMN de ¹H de **20a** (200MHz, DMSO-d₆) (continua)

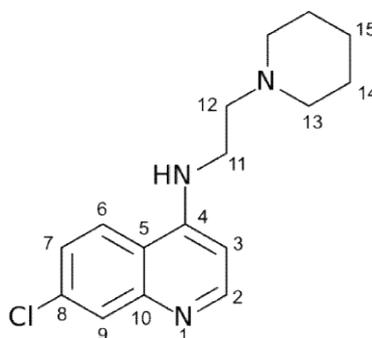
<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	<i>^NJ (Hz)</i>
H-2	d	8,39	1	³ J _{1,2} = 5,3
H-6	d	8,22	1	³ J _{5,6} = 8,9
H-9	d	7,78	1	⁴ J _{8,6} = 1,9
H-7	dd	7,45	1	³ J _{6,5} = 8,9 ⁴ J _{6,8} = 1,9
N-H	sl	7,25	1	-
H-3	d	6,49	1	³ J _{2,1} = 5,3
H-14	m	3,57	4	-
H-11	m	3,39	2	-

Tabela 4.17 – RMN de ^1H de **20a** (200MHz, DMSO- d_6) (conclusão)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	^NJ (Hz)
H-12	t	2,59	2	$^3J_{10,11} = 6,8$
H-13	t	2,44	4	$^3J_{13,14} = 4,4$

Tabela 4.18 – RMN de ^{13}C de **20a** (50MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	152,1	CH
C-4 ou C-10	150,5	C _{ipso}
C-4 ou C-10	149,2	C _{ipso}
C-8	133,9	C _{ipso}
C-9	127,7	CH
C-9 ou C-7	124,5	CH
C-7 ou C-9	124,2	CH
C-5	117,7	C _{ipso}
C-3	99,1	CH
C-14	66,6	CH ₂
C-12	56,5	CH ₂
C-13	53,7	CH ₂
C-11	40,1	CH ₂

4.1.5.2 7-cloro-4-[2-(1-piperidinil)etilamino] quinolina (**21a**)**21a**

Seguindo o método geral descrito na seção 4.1.5 foram obtidos 97 mg (83% de rendimento) de **21a**, na forma de um sólido amarelo claro, após 40 horas de reação.

FM: C₁₆H₂₀ClN₃

MM: 289,80 g/mol

FF: 136,5 – 139,0 °C

IV($\bar{\nu}$ /cm⁻¹): 3392 (N-H); 3100 (*sp*² C-H); 3021, 2939 (*sp*³C-H); 1609, 1590 (C=C arom.); 1450 (N-C).

Tabela 4.19 – RMN de ¹H de **21a** (200MHz, DMSO-d₆)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	<i>^NJ (Hz)</i>
H-2	d	8,39	1	³ J _{1,2} = 5,4
H-6	d	8,20	1	³ J _{5,6} = 9,1
H-9	d	7,77	1	⁴ J _{8,6} = 2,2
H-7	dd	7,44	1	³ J _{6,5} = 9,1 ⁴ J _{6,8} = 2,2
N-H	t	7,19	1	³ J _{NH,10} = 5,2
H-3	d	6,48	1	³ J _{2,1} = 5,4
H-12				
H-11	m	2,30 – 2,60	8	-
H-13				
H-14 e H-15	m	1,60-1,30	6	

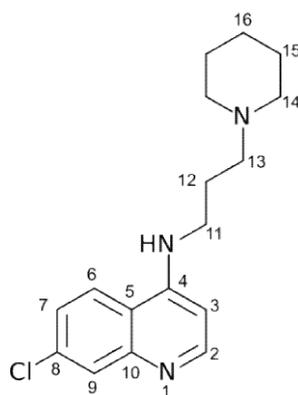
Tabela 4.20 – RMN de ¹³C de **21a** (50MHz, DMSO-d₆) (continua)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	153,7	CH
C-4 ou C-10	151,8	C _{ipso}
C-4 ou C-10	150,8	C _{ipso}
C-8	135,1	C _{ipso}
C-9	129,6	CH

Tabela 4.20 – RMN de ^{13}C de **21a** (50MHz, DMSO- d_6) (conclusão)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-6 ou C-7	125,9	CH
C-6 ou C-7	125,6	CH
C-5	119,2	C _{ipso}
C-3	100,5	CH
C-12 ou C-13	58,2	CH ₂
C-11	55,9	CH ₂
C-12 ou C-13	27,3	CH ₂
C-14	25,8	CH ₂
C-15	24,2	CH ₂

4.1.5.3 7-cloro-4-[3-(1-piperidinil)propilamino] quinolina (**21b**)

**21b**

Seguindo o método geral descrita na seção 4.1.5 foram obtidos 30 mg (19 % de rendimento) de **21b**, na forma de um sólido creme.

FM: C₁₆H₂₀ClN₃

MM: 303,83 g/mol

FF: 107,6 – 109,4 °C

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3227 (N-H); 2934, 2819 ($sp^3\text{CH}_2$); 1613, 1584 (C=C arom.); 1474 (C-N)

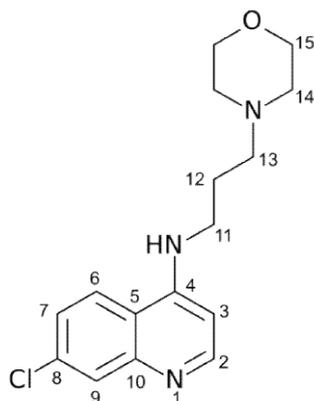
Tabela 4.21 – RMN de ^1H de **21b** (200 MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	$^N J$ (Hz)
H-2	d	8,37	1	$^3 J_{1,2} = 5,4$
H-6	d	8,20	1	$^3 J_{5,6} = 9,0$
H-9	d	7,77	1	$^4 J_{8,6} = 2,1$
H-7 e N-H	m	7,42	2	$^3 J_{6,5} = 9,0$ $^4 J_{8,6} = 2,1$
H-3	d	6,44	1	$^4 J_{2,1} = 5,4$
H-11	m	3,20 – 3,40	2	-
H-13 e H-14	m	2,20 – 2,45	6	-
H-12	quint	1,77	2	$^3 J_{11,10} = ^3 J_{11,12}$ $= 6,7$
H-15 e H-16	m	1,30 – 1,60	6	-

Tabela 4.22 – RMN de ^{13}C de **21b** (50 MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	152,3	CH
C-4 ou C-10	150,5	C_{ipso}
C-4 ou C-10	149,4	C_{ipso}
C-8	133,7	C_{ipso}
C-9	127,8	CH
C-6 e C-7	124,3	CH
C-5	117,8	C_{ipso}
C-3	98,9	CH
C-13	56,9	CH_2
C-14	54,5	CH_2
C-11	41,6	CH_2
C-15	26,0	CH_2
C-12	25,3	CH_2
C-16	24,5	CH_2

4.1.6 7-cloro-4-[3-(1-morfolinil)propilamino] quinolina (**20b**)



20b

A um balão de fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador de refluxo fechado com tubo de CaCl_2 , foram adicionados 144 mg (3,0 mmol) de 3-(1-morfolinil)propilamina, 203 mg (1,0 mmol) de 4,7-dicloroquinolina e 2,0 mL de etanol absoluto. A reação foi mantida sob agitação magnética em banho de óleo a $85\text{ }^\circ\text{C}$. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila metanol 95:5; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) ninhidrina, seguido de aquecimento). A reação foi interrompida após 72 horas. Foram adicionados à mistura de reação, 30 mL de solução saturada de NaHCO_3 sob banho de acetona e gelo. O precipitado formado foi filtrado e lavado com solução saturada de NaHCO_3 . Foram obtidos 175 mg (57% de rendimento) de **20b** como sólido marrom.

FM: $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}$

MM: 305,80 g/mol

FF: $129,6 - 130,8\text{ }^\circ\text{C}$; FF lit.: $118 - 120\text{ }^\circ\text{C}$ (SOLOMON; HU; LEE, 2010)

IV($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3210 (N-H); 3058 (sp^2 C-H); 2949, 2854 (sp^3 CH_2); 1575, 1565 (C=C arom.); 1429 (C-N); 1112 (C-O)

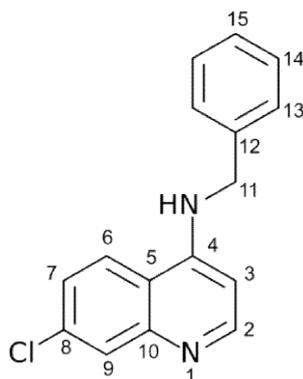
Tabela 4.23 – RMN de ^1H de **20b** (400 MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	$^N J$ (Hz)
H-2	d	8,38	1	$^3 J_{1,2} = 5,3$
H-6	d	8,23	1	$^3 J_{5,6} = 9,1$
H-9	s	7,77	1	-
H-7	d	7,44	1	$^3 J_{6,5} = 9,1$
N-H	sl	7,37	1	-
H-3	d	6,47	1	$^3 J_{2,1} = 5,3$
H-15	m	3,50 – 3,70	4	-
H-11	m	3,29	2	
H-13 e H-14	m	2,40-2,35	6	-
H-12	m	1,80	2	

Tabela 4.24 – RMN de ^{13}C de **20b** (50 MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	153,4	CH
C-4 ou C-10	152,0	C_{ipso}
C-4 ou C-10	150,5	C_{ipso}
C-8	135,6	C_{ipso}
C-9	129,0	CH
C-6 ou C-7	125,9	CH
C-6 ou C-7	125,8	CH
C-5	119,1	C_{ipso}
C-3	100,4	CH
C-15	68,0	CH_2
C-14	58,0	CH_2
C-13	55,2	CH_2
C-11	42,5	CH_2
C-12	25,5	CH_2

4.1.7 7-cloro-*N*-(fenilmetil)-4-quinolinamina (**22**)



22

Método A

A um balão de 50mL acoplado a um condensador de refluxo fechado com tubo de CaCl₂ contendo 226mg (1,1 mmol) de 4,7-dicloroquinolina solubilizados em 2mL de etanol foram adicionados 370 μL (3,3 mmol) de benzilamina. A mistura de reação foi mantida sob agitação magnética em banho de óleo a 85 °C. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila:hexano 1:1; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) ninhidrina, seguido de aquecimento) até consumo total do material de partida. Após 96 horas, o solvente foi removido em evaporador rotatório. O sólido resultante foi purificado por CCS utilizando como eluente acetato de etila:hexano 1:1. Foram obtidos 85 mg (28% de rendimento) de **22**, na forma de um sólido amarelo.

Método B

O método B foi executado conforme Ruiz e colaboradores (ROJAS RUIZ *et al.*, 2011) A um balão de 50mL acoplado a um condensador de refluxo fechado com tubo de CaCl₂ contendo 118mg (0,6 mmol) de 4,7-dicloroquinolina solubilizados em 2mL de DMF foram adicionados 200 μL (1,8 mmol) de benzilamina e 229mg (1,8 mmol) de K₂CO₃. A reação foi mantida sob agitação magnética em banho de óleo a 140 °C. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila:hexano 1:1; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) ninhidrina, seguido de aquecimento) até consumo total do material de partida. Após 48 horas, o solvente foi removido sob jato de ar. O sólido resultante foi

purificado por CCS utilizando como eluente acetato de etila:hexano 1:1. Foram obtidos 49 mg (30% de rendimento) de **22**, na forma de um sólido amarelo.

Método C

A um balão de 50mL acoplado a um condensador de refluxo fechado com tubo de CaCl_2 contendo 200mg (1,0 mmol) de 4,7-dicloroquinolina foram adicionados 2 mL (18 mmol) de benzilamina. A reação foi mantida sob agitação magnética em banho de óleo a 140 °C. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila:hexano 1:1; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) ninhidrina, seguido de aquecimento) até consumo total do material de partida. Após 24 horas, o excesso de benzilamina foi evaporado sob jato de ar. O sólido resultante foi purificado por CCS utilizando como eluente acetato de etila:hexano 1:1. Foram obtidos 206 mg (76% de rendimento) de **22**, na forma de um sólido amarelo.

FM: $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2$

MM: 267,74 g/mol

FF: 126,6 – 128,3 °C; FF lit.: 128 – 130 °C (MOTIWALA; KUMAR; CHAKRABORTI, 2007)

IV(VKUM^{-1}): 3210 (N-H); 3061 (sp^2 C-H); 3021, 2933 (sp^3 C-H) 1577 (C=C arom.); 1431 (sp^2 C-N); 768, 746 (benzeno monosubstituído).

Tabela 4.25 – RMN de ^1H de **22** (200 MHz, CDCl_3)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	$^N J$ (Hz)
H-2	d	8,50	1	$^3J_{1,2} = 5,4$
H-9	d	7,98	1	$^4J_{8,6} = 2,2$
H-6	d	7,76	1	$^3J_{5,6} = 9,0$
H-7				
H-13				
H-14	m	7,50 - 7,30	6	-
H-15				
H-3	d	6,44	1	$^3J_{2,1} = 5,4$
N-H	sl	5,69	1	-
H-11	d	4,54	2	$^3J_{10,\text{NH}} = 4,9$

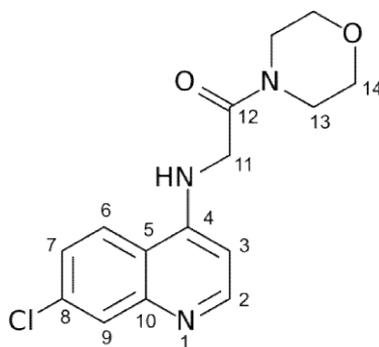
Tabela 4.26 – RMN de ^{13}C de **22** (50 MHz, CDCl_3)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	151,7	CH
C-4 ou C-10	149,8	C_{ipso}
C-4 ou C-10	148,8	C_{ipso}
C-12	137,2	C_{ipso}
C-8	135,1	C_{ipso}
C-13	129,00	CH
C-9 ou C-15	128,5	CH
C-9 ou C-15	128,0	CH
C-14	127,5	CH
C-6 ou C-7	125,6	CH
C-6 ou C-7	121,2	CH
C-5	117,1	C_{ipso}
C-3	99,7	CH
C-11	47,5	CH_2

4.1.8 Método geral para síntese de 2-[(4-cloroquinolin-4-il)amino]-1-(morfolin-4-il)etanona (**23**) e 2-[4-(7-cloro-4-quinolinil)-1-piperazinil]etanol (**24**)

A um balão de fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador de refluxo fechado com tubo de CaCl₂, foram adicionados um equivalente de 4,7-dicloroquinolina, três equivalentes da amina correspondente, 3 equivalentes de trietilamina e 2 mL de etanol. A reação foi mantida sob agitação magnética e em banho de óleo a 80 °C. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila:metanol 95:5; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) ninhidrina, seguido de aquecimento) até evidência do consumo total do material de partida. Após término da reação o solvente foi eliminado em evaporador rotatório e o sólido resultante foi purificado por CCS.

4.1.8.1 2-[(4-cloroquinolin-4-il)amino]-1-(morfolin-4-il)etanona (**23**)



23

Seguindo o método geral descrito na seção 4.1.8, utilizando como eluente na CCS acetato de etila:metanol:NH₄OH 97:2:1, foram obtidos 168 mg (48% de rendimento) de **23**, na forma de um sólido amarelo claro, após 6 dias de reação.

FM: C₁₃H₁₇Cl₂N₃

MM: 286,20 g/mol

FF: 183,8 – 185,6 °C

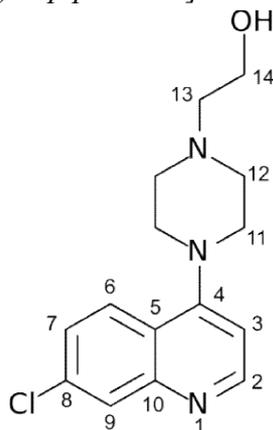
IV($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3200 (N-H); 3060 (*sp*² C-H); 3008 (*sp*³C-H); 1651 (C=O amida), 1580 (C=C arom.); 1107 (C-O).

Tabela 4.27 – RMN de ^1H de **23** (200MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	^NJ (Hz)
H-2	D	8,40	1	$^3J_{1,2} = 5,3$
H-6	D	8,19	1	$^3J_{5,6} = 9,0$
H-9	D	7,82	1	$^4J_{8,6} = 1,8$
H-7	Dd	7,47	1	$^3J_{6,5} = 9,0$ $^4J_{6,8} = 1,8$
N-H	Sl	7,34	1	-
H-3	D	6,42	1	$^3J_{2,1} = 5,3$
H-11	D	4,20	2	$^3J_{10,\text{NH}} = 4,0$
H-13				
H-14	M	3,30 – 3,80	8	

Tabela 4.28 – RMN de ^{13}C de **23** (50MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-12	167,3	C_{ipso}
C-2	152,2	CH
C-4 ou C-10	150,7	C_{ipso}
C-4 ou C-10	149,2	C_{ipso}
C-8	133,8	C_{ipso}
C-9	127,9	CH
C-6 ou C-7	124,8	CH
C-6 ou C-7	124,1	CH
C-5	117,7	C_{ipso}
C-3	100,1	CH
C-14	66,4	CH_2
C-11 ou C-13	45,0	CH_2
C-11 ou C-13	44,1	CH_2
C-11 ou C-13	42,3	CH_2

4.1.8.2 2-[4-(7-cloro-4-quinolinil)-1-piperazinil]etanol (**24**)**24**

Seguindo o método geral descrito na seção 4.1.8, utilizando como eluente na CCS acetato de etila:metanol:NH₄OH 94:5:1, foram obtidos 216 mg (74% de rendimento) de **24**, na forma de um sólido amarelo, após 24 horas de reação.

FM: C₁₅H₁₈ClN₃O

MM: 291,78

FF:117,0 – 119,1 °C; FF lit.: 111 – 112 °C(GUANTAI *et al.*, 2011)

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3216 (O-H); 2903 ($sp^3\text{C-H}$); 2835 (N-CH₂); 1606, 1568 (C=C arom.); 1423 (C-N); 1051 (C-O).

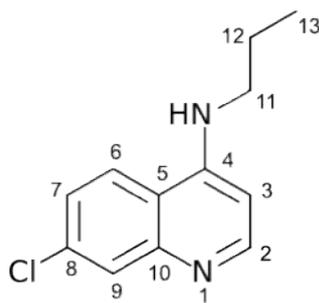
Tabela 4.29 – RMN de ^1H de **24** (200MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	$^N J$ (Hz)
H-2	d	8,68	1	$^3J_{1,2} = 5,0$
H-6	m	7,90 – 8,10	2	-
H-9				
H-7	dd	7,51	1	$^3J_{6,5} = 8,9$ $^4J_{6,8} = 2,1$
H-3	d	6,95	1	$^3J_{1,2} = 5,0$
H-14	m	3,30 – 3,60	6	-
H-11				
H-12	sl	3,14	4	-
H-13	t	2,47	2	$^3J_{12,13} = 6,1$

Tabela 4.30 – RMN de ^{13}C de **24** (50MHz, DMSO- d_6)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-4	156,7	C_{ipso}
C-2	152,5	CH
C-10	150,0	C_{ipso}
C-8	133,9	C_{ipso}
C-9	128,4	CH
C-6 ou C-7	126,4	CH
C-6 ou C-7	126,0	CH
C-5	121,7	CH
C-3	109,6	CH
C-14	60,5	CH_2
C-13	58,9	CH_2
C-11	53,3	CH_2
C-12	52,1	CH_2

4.1.9 7-cloro-*N*-propil-4-quinolinamina (**25**)



25

A um balão de fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador de refluxo fechado com tubo de CaCl₂, foram adicionados um equivalente de 4,7-dicloroquinolina e 2 mL de *n*-propilamina. A reação foi mantida sob agitação magnética e em banho de óleo a 45 °C. O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: acetato de etila:hexano 1:1; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) ninhidrina, seguido de aquecimento). Após 72 horas de reação, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório e o sólido resultante foi purificado por CCS (eluente acetato de etila:hexano 1:4 → 3:2). Foram obtidos 19mg (15%) de **25** como um sólido branco.

FM: C₁₂H₁₃ClN₂

MM: 220,70 g/mol

FF: 118,1 – 120,8 °C; FF lit.: 123 – 125 °C (DE SOUZA *et al.*, 2009)

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3259 (N-H); 3063 (*sp*²C-H); 2940 (*sp*³ C-H); 1613, 1583 (C=C arom.); 1451 (C-N).

Tabela 4.31 – RMN de ^1H de **25** (200MHz, CDCl_3)

<i>Atribuição</i>	<i>Multiplicidade</i>	δ (ppm)	<i>Área relativa</i>	$^N J$ (Hz)
H-2	d	8,42	1	$^3 J_{1,2} = 5,6$
H-9	d	7,92	1	$^4 J_{8,6} = 1,8$
H-6	d	7,88	1	$^3 J_{5,6} = 9,0$
H-7	dd	7,33	1	$^3 J_{6,5} = 9,0$ $^4 J_{6,8} = 1,8$
H-3	d	6,39	1	$^3 J_{2,1} = 5,6$
N-H	sl	4,75	1	-
H-11	m	3,36-3,26	2	-
H-12	sexteto	1,80	2	$^3 J_{11,12} = ^3 J_{11,10}$ $= 7,4$
H-13	t	1,06	3	$^3 J_{12,11} = 7,4$

Tabela 4.32 – RMN de ^{13}C de **25** (50 MHz, CDCl_3)

<i>Atribuição</i>	δ (ppm)	
C-2	150,8	CH
C-4 ou C-10	149,9	C_{ipso}
C-4 ou C-10	147,0	C_{ipso}
C-8	135,6	C_{ipso}
C-9	126,8	CH
C-6 ou C-7	125,5	CH
C-6 ou C-7	121,8	CH
C-5	116,7	C_{ipso}
C-3	98,6	CH
C-11	45,0	CH_2
C-13	21,9	CH_2
C-12	11,5	CH_3

4.2 Ensaio enzimáticos

A atividade das enzimas cruzaina e rodesaina foi medida pela clivagem do substrato fluorescente Z-Phe-Arg-Aminometilcumarina (Z-FR-AMC) em um fluorímetro Biotec

Synergy 2 no Centro de Citometria de Fluxo do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os ensaios foram executados em placas de 96 poços, para um volume final de 200µL de solução tampão pH 5,5 de acetato de sódio 0,1 M em presença de 0,1mM de β-mercaptoetanol, 0,01% de Triton-X100, cerca de 0,5nM de enzima e 2,5µM de Z-FR-AMC ($K_m= 0,65 \mu\text{M}$ para cruzaina; $K_m = 0,12 \mu\text{M}$ para rodesaina) (FERREIRA *et al.*, 2009; KERR *et al.*, 2009). Inicialmente os compostos foram avaliados em uma concentração de 100 µM. Cada ensaio foi executado em triplicata e acompanhado durante 5 minutos. A atividade enzimática foi determinada em comparação ao controle de DMSO, baseado nas velocidades iniciais de reação. O composto E64 em concentração de 100 µM foi utilizado como controle positivo do ensaio. Todos os ensaios foram executados sem pré-incubação com a enzima. O resultado apresentado é a média das triplicatas e o desvio padrão.

As curvas de CI_{50} foram construídas em dois experimentos independentes, cada um deles com ao menos 7 concentrações de inibidor em triplicata. As curvas de CI_{50} foram determinadas por regressão não-linear no programa Graph Pad Prism 5.03. O resultado apresentado é a média dos valores obtidos em cada experimento independente e o desvio padrão dos valores. O modo de inibição foi determinado em duplicata, com 7 concentrações de substrato (20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM, 0,3125 µM), cinco concentrações de inibidor (50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM) e na ausência deste. Análises estatísticas foram executadas no programa Graph Pad Prism 5.03.

4.3 Ensaio de atividade dos compostos sobre as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*

Os ensaios foram realizados em colaboração com o Dr. Policarpo Ademar Sales Júnior, da equipe do Dr. Alvaro José Romanha do Centro de Pesquisas René Rachou. Foi utilizada a cepa Tulahuen de *T. cruzi* transformada para expressar β-galactosidase, enzima que é capaz de catalisar uma reação colorimétrica quando o β-D-galactopiranosídeo de vermelho de p-clorofenila (CPRG) é utilizado como substrato (BUCKNER *et al.*, 1996). Células de fibroblastos L929 foram semeadas em placas de 96 poços, 4.000 células por poço, seguido de incubação *overnight* em estufa a 37°C para a adesão da célula à superfície. Após incubação, a infecção foi feita com 10

parasitas/célula durante 2 h. Após esse período, o meio contendo os parasitos extracelulares foi substituído por um novo meio e a placa novamente incubada a 37° C durante 48 h. O meio de cultura foi substituído por 160 µL de meio novo, além dos compostos diluídos numa concentração de 100 µM em 40 µL de DMSO 5 % em meio, e a placa incubada a 37 °C por 96 h. Após esse período, foi adicionado o substrato CPRG aos poços, a placa incubada a 37°C, e a leitura realizada após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando um filtro de 570 nm. Em paralelo, foram utilizados os seguintes controles: células não infectadas, para avaliação da citotoxicidade das substâncias, células infectadas não tratadas, benznidazol (1 µg/mL) como controle positivo e DMSO diluído em meio a uma concentração final de 1 % (controle negativo). Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução da absorbância dos poços experimentais em comparação com a absorbância dos poços com células infectadas não tratadas.

4.4 Estudos de ancoragem molecular

Os estudos de ancoragem molecular foram realizados utilizando-se o programa Autodock 4.2, auxiliado pela interface gráfica e programas auxiliares presentes no AutoDockTools 1.5 (MORRIS *et al.*, 2009).

A estrutura cristalográfica da cruzaina depositada no RCSB Protein Data Bank (PDB) sob o código 3KKU (FERREIRA *et al.*, 2010) foi utilizada. Esta estrutura foi escolhida devido a cocrystalização com um ligante não covalente aliado a qualidade dos dados e do modelo cristalográfico. A estrutura depositada apresenta resolução de 1,28 Å, completude dos dados muito boa, com 99,9 % dos dados presentes e valores do parâmetro R baixos e próximos de R livre, 0,116 e 0,144, respectivamente. Adicionalmente a densidade eletrônica no sítio ativo foi verificada por inspeção visual no programa PyMol utilizando os mapas de densidade eletrônica direta e os mapas de diferença de densidade Fo-Fc.

A estrutura cristalográfica da rodesaina depositada no PDB sob o código 2P86 foi utilizada. As três estruturas cristalográficas depositadas desta enzima foram cocrystalizadas com ligantes covalentes. A estrutura escolhida foi a de menor resolução, preservando bons indicadores de qualidade da regressão e aquisição. A densidade

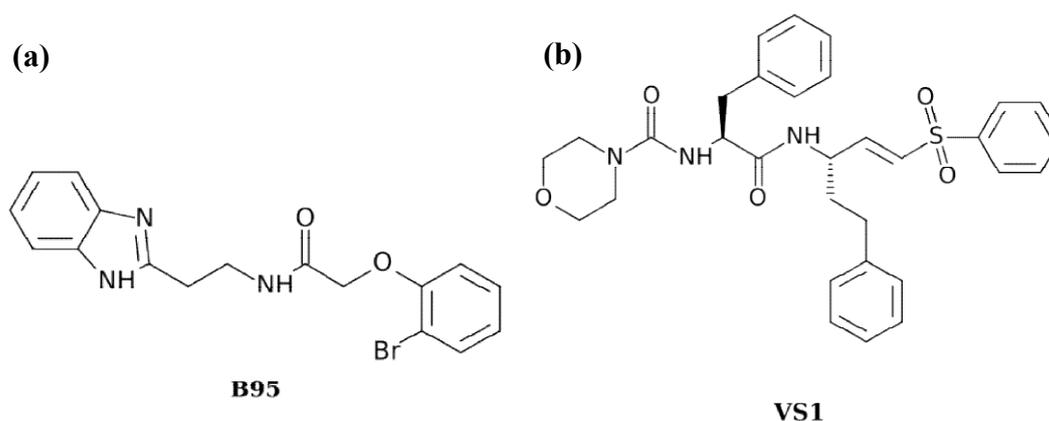
eletrônica no sítio ativo foi verificada por inspeção visual. Foi observado que, embora a densidade eletrônica não defina claramente o ligante, os resíduos do sítio ativo estão bem definidos.

As macromoléculas foram preparadas pela remoção das moléculas de água e ligantes. Em seguida, no caso de resíduos cujas cadeias laterais apresentaram duas conformações, as conformações de menor ocupância foram removidas. Foram adicionados hidrogênios à cada uma das enzimas e calculadas cargas atômicas utilizando o método de Gasteiger, ambos pela implementação contida na biblioteca OpenBabel via AutoDockTools. Foi verificado manualmente que a cisteína catalítica (Cys25) estivesse desprotonada e a histidina catalítica (His162) protonada. Em seguida foram construídos mapas de potencial por tipo atômico utilizando o programa AutoGrid, parte do AutoDock. Um cubo foi utilizado para construção do mapa, centrado no ponto central da posição ocupada pelo ligante cristalográfico, com espaçamento entre pontos de 0,375 Å e lado de 50 pontos. Em todos os cálculos executados a proteína foi considerada rígida.

Em todos os cálculos de ancoragem foi utilizado um algoritmo genético Lamarckiano (MORRIS *et al.*, 1998). Uma população de 1.500 indivíduos foi avaliada por 2.700 gerações com máximo de 25.000.000 de cálculos de energia. Os resultados foram inspecionados visualmente quanto ao posicionamento e conformação do ligante. As poses de menor energia obtidas foram agrupadas utilizando o método implementado no AutoDock 4.2. Este método simplesmente compara o *Root-mean-square Deviation* (RMSD) entre duas poses. Caso o RMSD seja menor do que a tolerância, as poses são agrupadas. O valor da tolerância utilizada neste estudo foi de 2Å, valor padrão do pacote AutoDock 4.2. Possíveis interações de hidrogênio e contatos polares foram calculados para as principais poses utilizando, novamente, o programa auxiliar AutoDockTools.

Para os estudos de redocking os ligantes B95 (**Figura 4.1a**), cocrystalizado com a cruzaina, e VS1 (**Figura 4.1b**), cocrystalizado com a rodesaina, foram extraídos das respectivas estruturas cristalográficas e preparados pela adição de hidrogênios e geração de cargas atômicas. Os mínimos obtidos foram agrupados utilizando o agrupamento descrito acima.

Figura 4.1 – Ligantes cristalográficos da (a) estrutura 3KKU da cruzaina, **B95**, e (b) estrutura 2P86 da rodesaína, **VS1**.



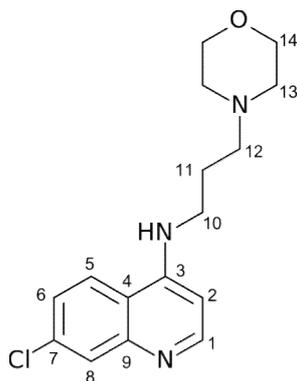
Para os estudos de ancoragem das substâncias sintetizadas, a estrutura previamente construída e otimizada de cada um dos ligantes foi processada por meio de rotinas auxiliares do pacote AutoDockTools para cálculo de cargas atômicas e determinação de ligações rotacionáveis. Todos os possíveis estados de protonação dos ligantes foram calculados. Nas análises foi considerado o estado mais provável de protonação na condição do ensaio.

4.5 Dinâmica molecular

4.5.1 Parametrização

A parametrização da estrutura da substância **20b** (Figura 4.2) no campo de força Amber foi executada baseado em uma modificação do procedimento descrito por Hanson e colaboradores (2010). Assim como executado pelo grupo de Hanson, a parametrização foi dividida em duas etapas: a obtenção de cargas atômicas, seguida pela regressão de parâmetros dos ângulos de diedro (HANSSON *et al.*, 2010). Para a primeira etapa gerou-se um conjunto de conformações, mínimos locais representativos do espaço conformacional. Estes mínimos foram utilizados para gerar cargas atômicas para os núcleos por regressão de um mapa de potencial eletrostático. Na segunda etapa foram obtidos parâmetros para os diedros da molécula de forma a reproduzir um perfil de potencial obtido por cálculos *ab initio* com método Hartree-Fock restrito (HF), base 6-31G*. O conjunto de parâmetros foi completado com as distâncias e ângulos de ligação extraídos de um mínimo de baixa energia, também obtido por cálculos *ab initio* com mesmo método e base.

Figura 4.2 – Estrutura da substância **20b**, para a qual foram gerados parâmetros compatíveis com o campo de força Amber.



Inicialmente uma busca conformacional exaustiva foi executada com o algoritmo *basing hopping* implementado no programa Tinker utilizando como campo de força o *Merck Molecular Force Field* versão 1994 (MMFF94) (HALGREN, 1996) e definindo um máximo de 5 ligações rotacionáveis. Esta busca conformacional trabalha da seguinte forma: (a) uma estrutura da molécula é minimizada; (b) a matriz Hessiana é calculada; (c) ao longo de cada um dos n modos normais com maiores autovalores associados, um passo de mudança conformacional é executado; (d) cada estrutura obtida neste passo é submetida ao item a. Quando nenhum novo mínimo é encontrado o algoritmo termina. (PAPPU; HART; PONDER, 1988).

As estruturas obtidas foram submetidas a agrupamento hierárquico pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) utilizando o RMSD das estruturas alinhadas como medida de dissimilaridade. Foram testados diferentes limiares de corte para a separação de grupos. Limiares de 13 Å e 7 Å foram utilizados. Para cada um dos grupos construído, o elemento mais representativo foi determinado como sendo aquele com menor RMSD médio para todos os outros elementos do grupo.

Cada um dos elementos mais representativos de cada grupo foi otimizado em nível *ab initio* utilizando o programa MPQC 2.3.1 (JANSSEN *et al.*, 2008) com algoritmo de otimização do tipo quase-Newton, método HF e base STO-3G. Os critérios de convergência foram módulo de todas as primeiras derivadas parciais menores que 10^{-4} Å e deslocamento no último passo de otimização menor do que 10^{-4} Å. As estruturas obtidas foram novamente otimizadas com os mesmos parâmetros, porém com base 6-31G*.

Os mínimos locais obtidos foram então utilizados para geração de mapas de potencial eletrostático com o método HF, base 6-31G*, algoritmo de Conolly (CONNOLLY, 1983), utilizando o programa Gamess 2014 (GORDON; SCHMIDT, 2005). Este método e parâmetros para geração do mapa de potencial seguem a parametrização do próprio campo de força Amber (LINDORFF-LARSEN *et al.*, 2010; PONDER; CASE, 2003). As estruturas e seus respectivos mapas de potencial eletrostático foram utilizadas para regressão de cargas atômicas, primeiramente com peso igual para todas as estruturas e depois regressão pesada pela abundância relativa dada pela equação de Boltzmann (**Equação 4.1**). A regressão foi executada utilizando o programa Resp 2.4, parte do pacote Amertools, uma suíte de ferramentas ligada ao programa Amber (CASE *et al.*, 2015). O método RESP, implementado no programa Resp 2.4, determina cargas centradas nos núcleos por regressão múltipla para reproduzir o potencial eletrostático na vizinhança da molécula.

$$\frac{P_1}{P_2} = e^{\frac{E_1 - E_2}{kT}} \quad \text{(Equação 4.1)}$$

Onde P₁: probabilidade do estado 1; P₂: probabilidade do estado 2; E₁: energia do estado 1; E₂: energia do estado 2; k: constante de Boltzmann; T: temperatura absoluta.

Para a preparação dos parâmetros de diedro foi necessário obter o perfil do potencial torcional das cinco ligações rotacionáveis da molécula com cálculos quânticos. Inicialmente uma geometria simétrica com a cadeia lateral estendida foi construída e otimizada de acordo com os mesmos cálculos acima descritos. Esta geometria foi utilizada como ponto de partida para preparação das geometrias iniciais para as otimizações ao longo dos ângulos de diedro. A simetria C_s da molécula implica em um perfil de energia de rotação simétrico em torno de 180°, uma vez que, a cada geometria no intervalo 0°-180° existe uma correspondente no intervalo 180°-360° com mesma energia. Por isso foi possível obter a curva de potencial torcional em menor tempo de cálculo varrendo o intervalo 0° a 180°. Foi utilizado incremento de 10°. Cada estrutura gerada desta forma foi submetida a uma otimização com mesmo cálculo acima descrito, porém mantendo a coordenada transformada do diedro fixa. As energias *ab initio* de cada mínimo, calculada com o mesmo método e base supradescritas, foram utilizadas para a construção do perfil de rotação dos cinco diedros.

Utilizando as cargas geradas conforme descrito acima, uma topologia inicial foi gerada automaticamente utilizando o programa AcPype (SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012), uma interface para ferramentas do AmberTools. Esta topologia foi utilizada para determinação do perfil torcional dos mesmos ângulos de diedro calculados em nível *ab initio* (método HF, base 6-31G*). Os parâmetros do diedro gerados automaticamente para as ligações rotacionáveis foram removidos.. Coeficientes de uma função de Ryckaert-Bellemans (**Equação 4.2**) foram regredidos para gerar uma complementação do potencial clássico em relação ao potencial quântico. Os parâmetros regredidos foram utilizados para construir uma nova topologia, gerar um novo potencial clássico e regredir novos coeficientes para a equação.

$$V_{RB}(\psi_{ijkl}) = \sum_{n=0}^5 C_n \cos^n(\psi) \quad (\text{equação 4.2})$$

Onde $V_{RB}(\Psi_{ijkl})$: potencial torcional dos átomos i, j, k e l ; C_n : n -ésimo coeficiente; Ψ : ângulo diedral entre i, j, k, l

Finalmente, os valores de distâncias de ligação e ângulos foram transpostos da geometria de mínimo com menor energia entre as estruturas utilizadas para determinar as cargas. Estas informações foram utilizadas para construir a topologia final do ligante.

4.5.2 Dinâmica molecular

A preparação dos sistemas, cálculos de dinâmica molecular e processamento dos dados foram executados com os programas do pacote GROMACS 4.6.2 (PRONK *et al.*, 2013). Os cálculos foram executados no supercomputador do Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

As estruturas cristalográficas da cruzaina, código PDB 3KKU, e da rodesaina, código PDB 2P86, foram preparadas pela remoção de ligantes e moléculas de água e adição de átomos de hidrogênio. O cálculo de estados de protonação foi, então, executado no servidor PDB2PQR (DOLINSKY *et al.*, 2004) e foi verificado que a cisteína catalítica estivesse desprotonada e a histidina catalítica protonada. A estrutura com hidrogênios

foi utilizada como entrada para a ferramenta *pdb2gmx* do pacote GROMACS, gerando uma topologia para o campo de força Amber99-ILDN (LINDORFF-LARSEN *et al.*, 2010). Foi construída uma caixa de água com parametrização TIP3P com formato dodecaédrico se estendendo por 10 Å ao redor da macromolécula.

Quatro sistemas foram construídos: (a) sistema contendo a cruzaina em água; (b) sistema contendo rodesaina em água; (c) sistema contendo a molécula **20b** complexada à cruzaina em água; (d) sistema contendo a molécula **20b** complexada à rodesaina em água. Foram utilizadas como geometria inicial dos complexos poses obtidas por docking contra cruzaina e rodesaina. A pose de menor energia livre predita para a rodesaina foi escolhida.

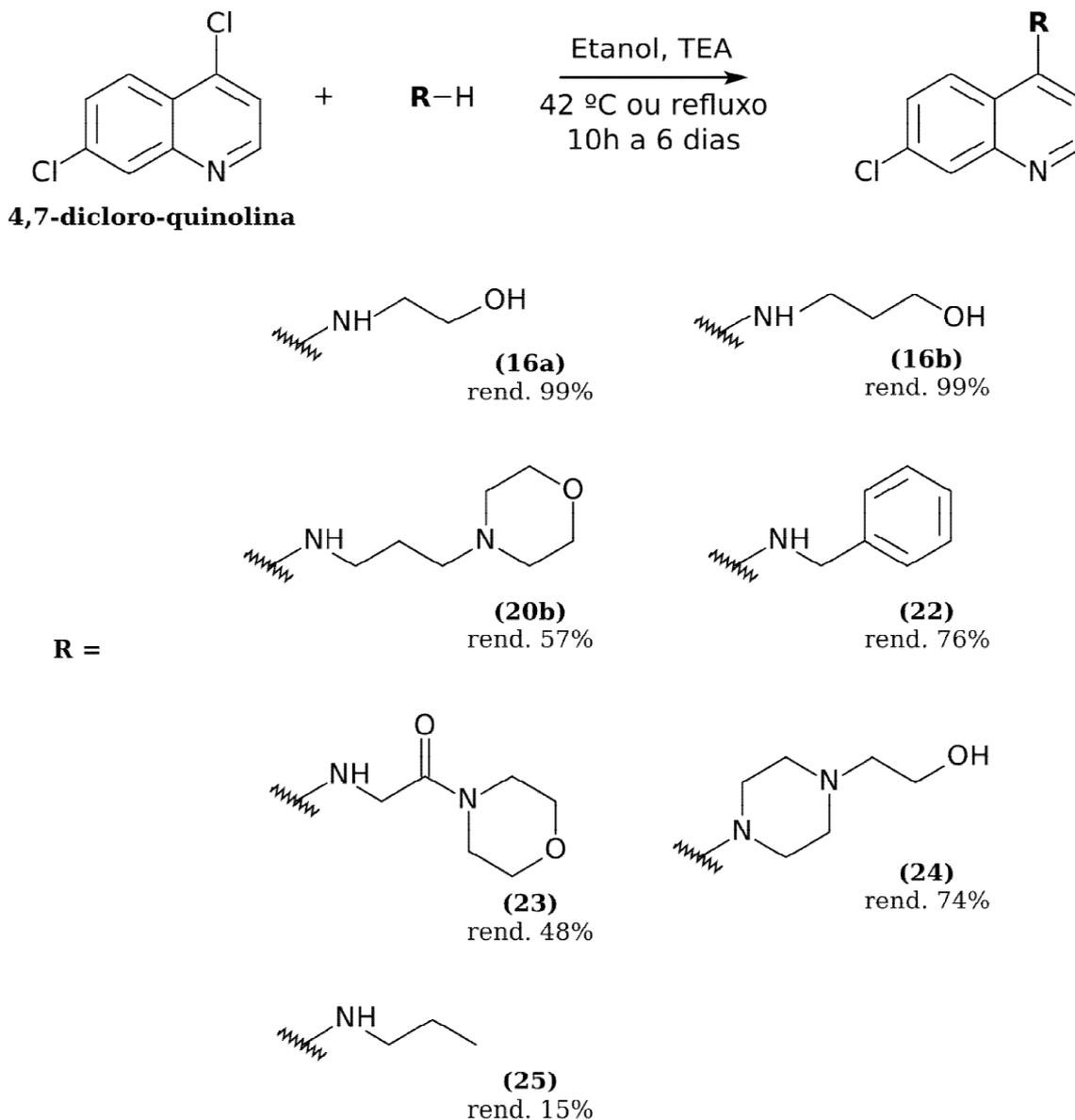
A dinâmica foi executada com condições periódicas de contorno utilizando *Particle Mesh Ewald* (PME) para cálculo de interações eletrostáticas. Onde aplicável, o sistema foi acoplado a um termostato de Berendsen com temperatura de referência de 300 K e também acoplado a um pressostato de Parrinello-Rahman com pressão de referência de 1,0 bar. As equações de escalonamento da energia cinética do termostato foram acopladas ao solvente e, separadamente à proteína ou proteína e ligante.

Inicialmente restrições posicionais foram aplicadas sobre o ligante e a proteína. Os sistemas foram otimizados utilizando um algoritmo de busca local. Em seguida cada sistema foi equilibrado em duplicata, com diferentes iniciadores para a distribuição de velocidades. Primeiro uma simulação de energia constante (NVE) foi executada por 1ns. Então o sistema foi equilibrado em temperatura constante (NVT) por mais 1ns. Por último as restrições posicionais foram removidas e o sistema foi equilibrado por mais 1ns com temperatura e pressão constantes (NPT). Cada duplicata de cada sistema foi, então, simulada ao longo de 200ns em amostragem NPT. A análise de dados foi efetuada utilizando ferramentas da suíte GROMACS e ferramentas desenvolvidas no Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese

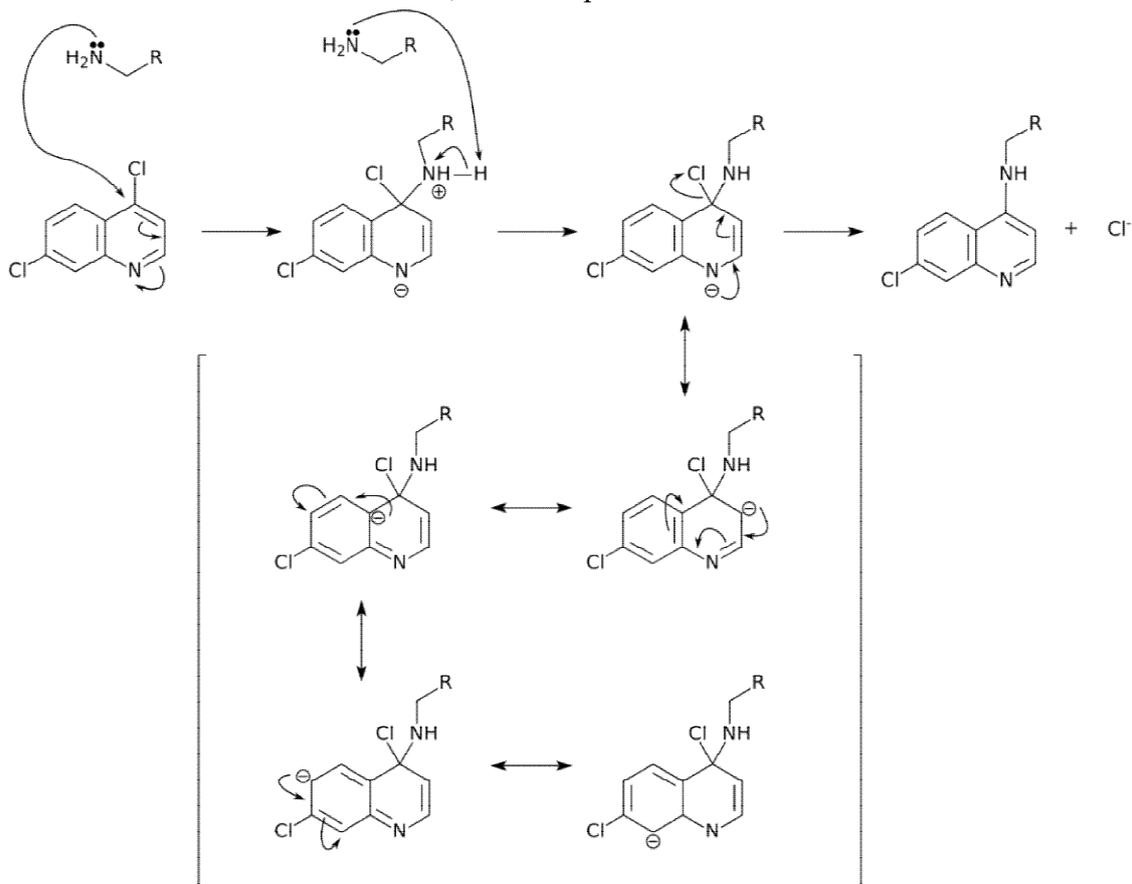
5.1.1 Síntese de **16a**, **16b**, **20b**, **22**, **23**, **24** e **25**



As reações para obtenção de **16a**, **16b**, **20b**, **22**, **23**, **24** e **25** consistiram de reações de substituição nucleofílica aromática (**Figura 5.1**). Em geral, reações de substituição nucleofílica aromática requerem um anel aromático deficiente em elétrons, altas temperaturas e, na maioria dos casos, avançam lentamente. O mecanismo geral proposto para estas reações passa por um estado de transição de alta energia no qual um ataque angular do nucleófilo leva à perda da aromaticidade com adição do nucleófilo ao

carbono eletrofílico. Este estado de transição evolui para um intermediário de adição não-aromático, também de alta energia, que, rapidamente, sofre decomposição química com a eliminação do grupo abandonador. Deste modo é necessária uma alta energia de ativação para atingir o estado de transição. Este mecanismo é também chamado adição-eliminação (CAREY; SUNDBERG, 2007).

Figura 5.1 – Mecanismo geral da reação de substituição nucleofílica aromática com a 4,7-dicloroquinolina.



O ataque da amina nucleofílica à posição 4 da 4,7-dicloroquinolina é favorecido, nesse caso, em razão da possibilidade de ressonância, com o deslocamento dos elétrons até o átomo de nitrogênio do anel quinolínico. O nitrogênio tem maior capacidade de acomodar carga negativa do que o carbono, assim esta estrutura de ressonância tem grande contribuição para o híbrido do intermediário de alta energia. A acomodação da carga sobre um centro mais eletronegativo estabiliza o estado de transição e facilita a reação. Por este motivo, as posições 2 e 4 da 4,7-dicloroquinolina são mais reativas frente a substituições nucleofílicas aromáticas.

A aminoquinolina **16b** foi inicialmente obtida com rendimento de 74%, utilizando a técnica descrita por Pretorius e colaboradores (PRETORIUS *et al.*, 2013). Nessa técnica o solvente da reação é a própria amina utilizada em excesso. Este método, entretanto, utiliza 10 equivalentes da amina para cada equivalente de produto, o que pode ser visto como uma desvantagem, já que implica em maior gasto do reagente.

Alternativamente, foi testada uma metodologia descrita por Kumar e colaboradores (KUMAR *et al.* 2010), com adaptações, utilizando etanol como solvente. Nesta técnica foram empregados apenas 3 equivalentes da amina, resultando em melhores rendimentos. As aminoquinolinas **16a**, **16b**, **20b** e **24** foram obtidas utilizando essa técnica com rendimentos de 99%, 99%, 57% e 74%, respectivamente.

A síntese de **22** foi inicialmente executada utilizando etanol como solvente, porém com baixo rendimento. Alternativamente, a reação foi testada utilizando DMF como solvente e K₂CO₃ como base (ROJAS RUIZ *et al.*, 2011) e em sistema livre de solvente, com excesso de benzilamina. Na **Tabela 5.1** está mostrada uma comparação das condições de cada reação, com os respectivos rendimentos obtidos.

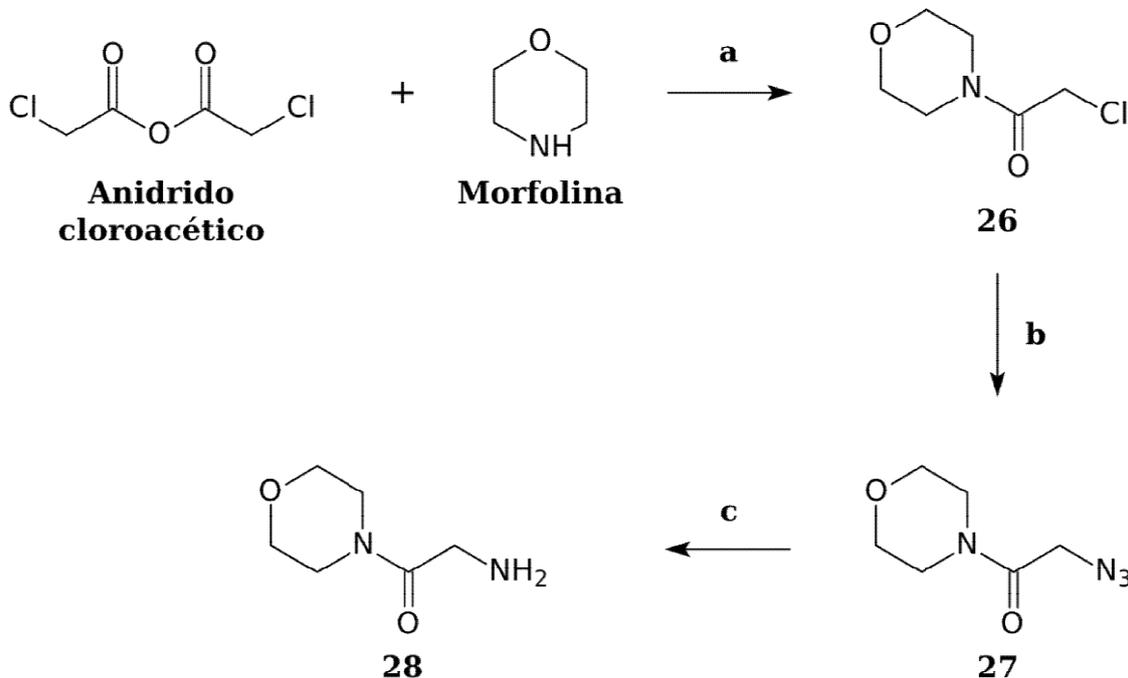
Tabela 5.1 – Comparação de rendimentos para diferentes condições empregadas para síntese de **22**

<i>Condição</i>	<i>Tempo de reação</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Rendimento</i>
Solvente etanol	96 horas	Refluxo	28%
Solvente DMF	48 horas	140° C	30%
Solvente benzilamina	24 horas	140° C	76%

Para obtenção da aminoquinolina **23**, apresentando um grupo amida na cadeia lateral, foi utilizada a amina **28** (**Figura 5.2**), previamente sintetizada em nosso laboratório pela aluna de iniciação científica Jéssica de Brito Macedo. A amina **28** foi preparada em três etapas: a) reação do anidrido cloroacético com a morfolina originou a α -cloro-amida **26** na forma de um óleo com 95% de rendimento; b) reação de substituição nucleofílica do átomo de cloro de **26** por azida de sódio levou ao derivado azido **27** na forma de um sólido branco com 79% de rendimento; c) redução do grupo azido de **27** à amina **28**,

obtido na forma de cloridrato como um sólido amarelado com 44% de rendimento. Para fins de ilustração, a rota de síntese para obtenção de **28** está mostrada na **Figura 5.2**.

Figura 5.2 – Rota sintética para obtenção da amina **28**



Reagentes e condições: a) THF, t.a., 24h; b) DMF, NaN₃, 80°C, 8h; c) THF, H₂, Pd/C, 24h.

A primeira tentativa para obtenção de **23** foi realizada em um sistema isento de solvente. Nesse caso, o solvente da reação foi a própria quinolina utilizada como material de partida, a qual funde no meio reacional em temperaturas acima de 80 °C. Foi verificado que, quando o sistema atingia uma temperatura de cerca de 80 °C, ocorria formação de um sólido nas paredes e boca do balão de reação. O sólido foi caracterizado como sendo a 4,7-dicloro-quinolina por meio da análise por CCD e determinação de sua faixa de fusão: valor medido 85 – 89 °C, literatura: 86,4 – 87,4 °C (DRAKE *et al.*, 1946). Essas observações sugerem a ocorrência de sublimação da 4,7-dicloro-quinolina da mistura reacional. A execução da reação utilizando etanol como solvente foi, então, a alternativa utilizada e, nesse caso, o produto foi obtido com 47% de rendimento. A aminoquinolina **23** é inédita.

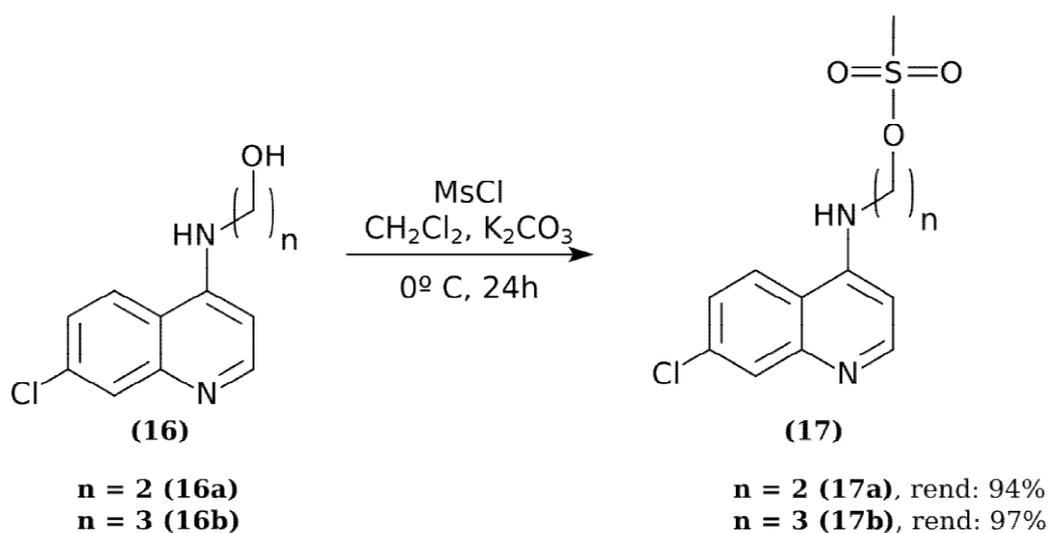
A síntese de **25** foi inicialmente testada utilizando etanol como solvente, conforme relatado para as aminoquinolinas anteriores. Entretanto, nesse caso, devido à baixa temperatura de ebulição da propilamina (48 °C), em relação a temperatura do meio

reacional (80 °C). observou-se que ocorreu a perda dessa amina durante o tempo de reação, o que impossibilitou a síntese de **25** por essa técnica. Para contornar essa limitação, a reação foi repetida seguindo-se o método descrito por De Souza e colaboradores (2009), utilizando trietilamina (TEA) como solvente e temperatura de reação de 80 °C (DE SOUZA *et al.*, 2009). Infelizmente, nessas condições, também se observou a perda de parte da propilamina.

Finalmente foi feita mais uma tentativa de síntese utilizando excesso de propilamina como solvente, com temperatura do meio reacional próximo da temperatura de ebulição dessa amina. A reação avançou lentamente, de forma que só foi possível obter 15% de rendimento e recuperação de 55% do material de partida.

Conforme o mecanismo proposto para a reação de substituição nucleofílica aromática (**Figura 5.1**) a etapa limitante da velocidade é a formação do intermediário de adição não-aromático. Esta etapa requer energia de ativação alta. A temperatura do meio reacional empregado para a síntese de **25** foi de 45 °C. Nesta temperatura a quantidade de choques com energia suficiente para vencer a barreira de ativação para formação do intermediário de alta energia é pequeno se comparado às temperaturas de reação em refluxo de etanol (80 °C). Acredita-se que, por este motivo, a reação de obtenção de **25** avançou mais lentamente.

5.1.2 Síntese de **17b** e **17a**



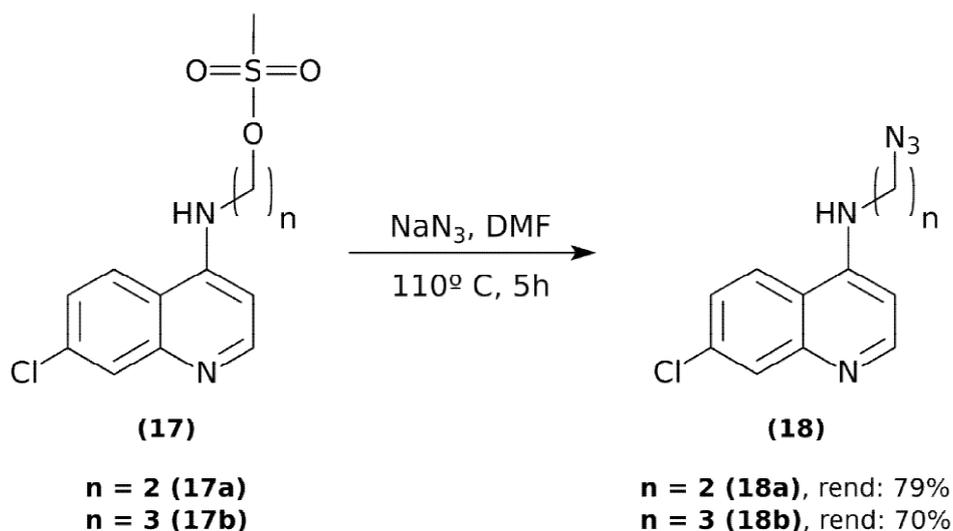
A mesilação seletiva da hidroxila de **16b** foi primeiramente tentada utilizando cloreto de

mesila, trietilamina em excesso e THF como solvente. Foi observado que a reação é muito sensível à quantidade de cloreto de mesila adicionada. A reação com 1 equivalente deste reagente levou ao consumo parcial do álcool. A adição de mais 0,5 equivalente levou ao consumo do álcool e a formação de um subproduto menos polar. Durante tentativa de purificação tal subproduto degradou na coluna, não sendo possível isolá-lo. Os derivados mesilados **17a** e **17b** foram obtidos por esse técnica, porém com baixos rendimentos (35-40 %). A provável causa disto é que, durante a elaboração, a trietilamina não é facilmente separada por extração, permanecendo parte na fase orgânica. Extrações adicionais são necessárias para aumentar o rendimento, porém o derivado mesilado é um parcialmente solúvel em água, de forma que parte dele é perdido na fase aquosa.

Como alternativa foi tentada uma metodologia adaptada que utiliza carbonato de potássio como base e CH_2Cl_2 como solvente. Desta forma foi possível simplificar a purificação, já que, na ausência de TEA, pouco volume de água foi suficiente para lavar a fase orgânica durante a extração, o que aumentou o rendimento para 54% e 55% de **17a** e **17b**, respectivamente.

Finalmente, foi testada mais uma alternativa na etapa de elaboração que consistiu em adicionar somente algumas gotas de água direto na mistura de reação, suficiente apenas para solubilizar o K_2CO_3 . A mistura reacional foi, então, seca com Na_2SO_4 e o solvente evaporado. Com esta modificação o rendimento obtido foi de 94% e 97% de **17a** e **17b**, respectivamente

5.1.3 Síntese de **18b** e **18a**

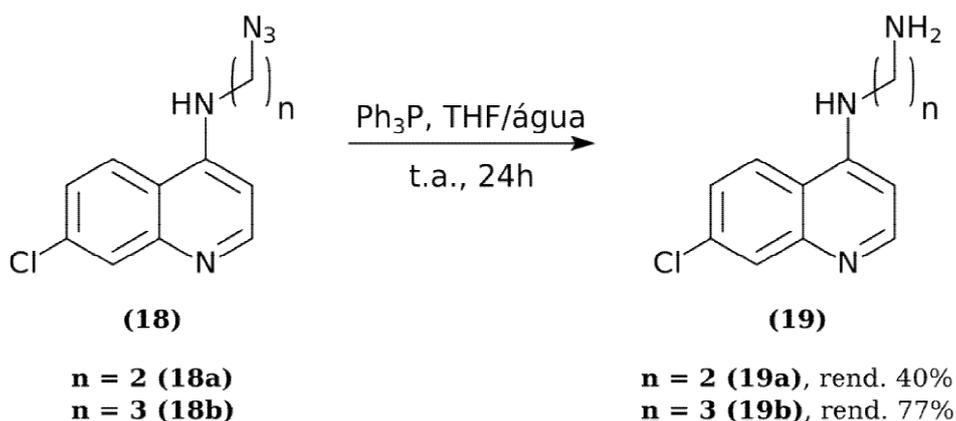


A síntese dos derivados azido **18a** e **18b** foi realizada de acordo com o método descrito por Raj e colaboradores (RAJ *et al.*, 2013), com bons rendimentos.

A reação para obtenção de **18a** e **18b** ocorre por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular S_N2 . Neste mecanismo a reação ocorre em uma única etapa, com a formação da ligação entre o nucleófilo e o carbono e a quebra da ligação entre este e o grupo abandonador simultânea. A velocidade da reação é afetada pela força do nucleófilo, facilidade de quebra da ligação do grupo abandonador e escolha do solvente adequado.

Na reação para obtenção de **18a** e **18b** o nucleófilo utilizado, azida de sódio, é forte, capaz de deslocar facilmente o grupo metanossulfonato que é um bom grupo abandonador. Adicionalmente a *N,N*-dimetilformamida, um solvente polar aprótico, quando utilizada como solvente em reações S_N2 aumenta a velocidade de reação. A DMF solvata bem cátions porém, solvata ânions com menos eficiência, de forma que nucleófilos carregados negativamente ficam mais disponíveis para o ataque. Isto aumenta a energia livre dos reagentes, reduzindo a energia de ativação da reação. A combinação de um bom nucleófilo, bom grupo abandonador e solvente polar aprótico foram importantes para o sucesso da reação de obtenção de **18a** e **18b**.

5.1.4 Síntese de **19b** e **19a**



A síntese das aminas **19a** e **19b** é descrita na literatura pela reação direta da diamina correspondente com a 4,7-dicloroquinolina. Neste trabalho a obtenção destas substâncias foi planejada via redução dos intermediários azido correspondentes **18a** e **18b**, já que a etilenodiamina e o 1,3-diaminopropano não estavam disponíveis no laboratório.

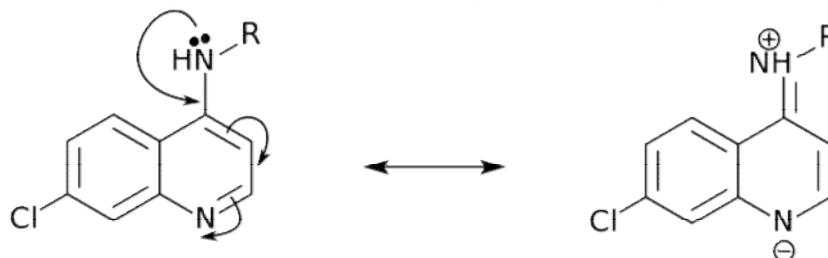
Primeiramente foi feita uma tentativa de redução do grupo azido por hidrogenação utilizando 10% de massa do catalisador Pd/C em relação a massa do material de partida. Entretanto, após 24 horas de reação não havia evidência de formação de produto por CCD. A adição de quantidades adicionais do catalisador não foi eficaz. Após 96 horas de reação, observou-se por CCD que o material de partida não havia sido totalmente consumido, além da formação de vários subprodutos.

Especula-se que a baixa velocidade da reação pode estar relacionada ao envenenamento do catalisador pelo anel quinolínico do material de partida. É sabido que o par de elétrons não ligantes de aminas é capaz de interagir com o catalisador, reduzindo a velocidade da reação ou modificando a seletividade (MALLAT; BAIKER, 2000). Diferentes aminas são adicionadas a meios reacionais de hidrogenação catalisada por paládio e outros metais de transição para modular a catálise. A quinolina é utilizada para modular a hidrogenação de alquinos à alquenos *cis* e existe evidência experimental de que este efeito se deve à estabilização da ligação paládio-hidrogênio na superfície do catalisador (YU; WHITNEY; SPENCER, 1999).

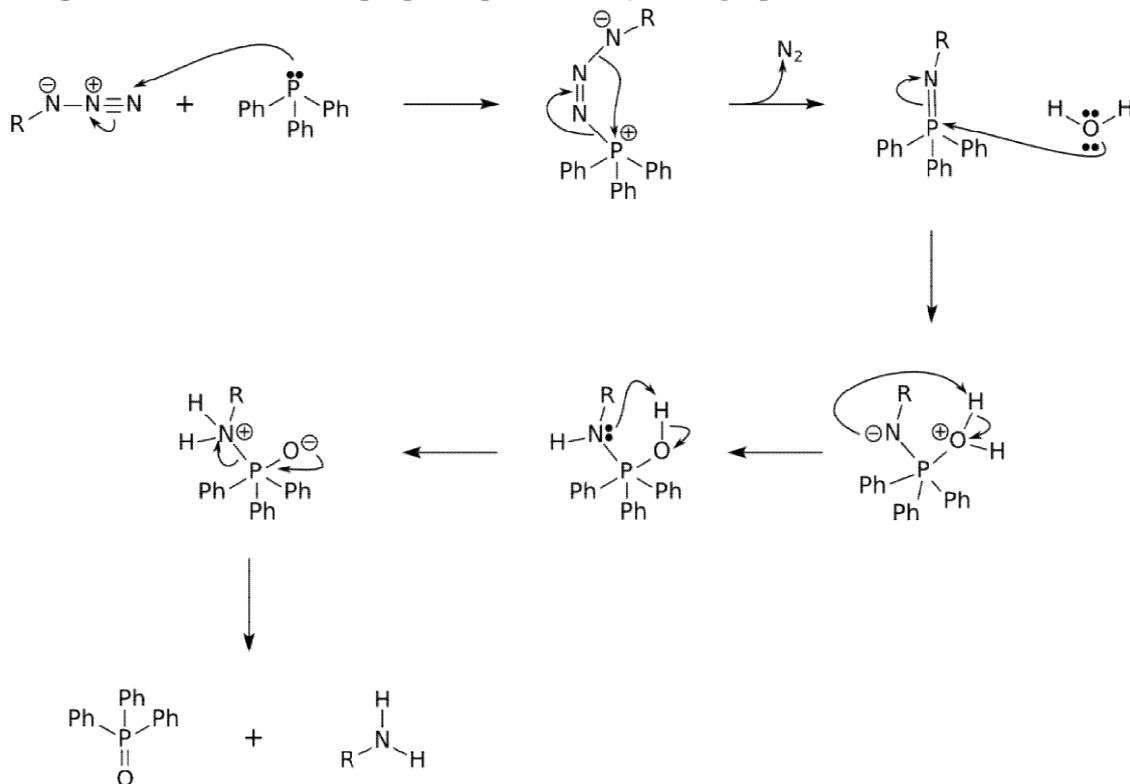
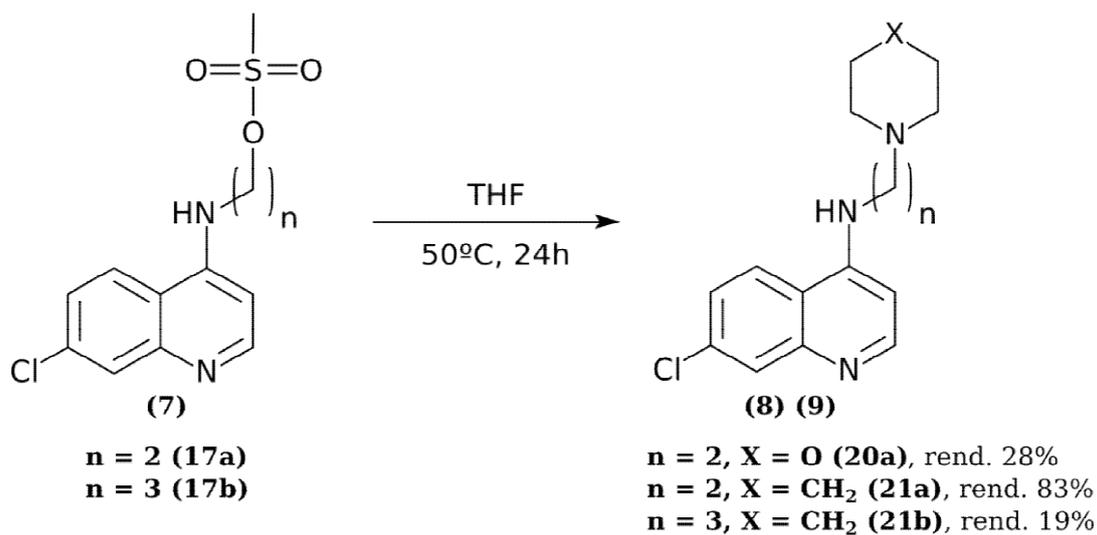
Nos materiais de partida **18a** e **18b**, o par de elétrons do nitrogênio do anel quinolínico está especialmente disponível devido ao efeito da ressonância dos elétrons da amina na

posição 4 (**Figura 5.3**). Dessa forma, o par de elétrons não ligantes do nitrogênio do anel quinolínico está mais disponível para interagir com a superfície do catalisador, reduzindo, assim, a velocidade da reação. Possivelmente a baixa eficiência da redução pela técnica de hidrogenação catalisada por Pd/C está relacionada à influência do anel quinolínico.

Figura 5.3 – Estrutura de ressonância de uma 4-aminoquinolina, ressaltando aumento da densidade eletrônica no nitrogênio do anel quinolínico



Como alternativa para redução do grupo azido foi empregada a reação de Staudinger, que consiste na redução de azida por trifenilfosfina em presença de água. O mecanismo posposto para a reação (**Figura 5.4**) envolve, inicialmente, o ataque do par de elétrons do fósforo ao nitrogênio externo do grupo azido, levando à formação de um intermediário íldio que recebe prótons da água do meio reacional, resultando, ao final, na formação da amina e óxido de trifenilfosfina (LIN *et al.*, 2005). A utilização desta técnica permitiu obter as aminas **19a** e **19b** com rendimentos de 40 % e 77 %, respectivamente.

Figura 5.4 – Mecanismo proposto para a redução do grupo azida com trifetilfosfina**5.1.5 Síntese de 20a, 21a e 21b**

A síntese das aminoquinolinas **20a**, **21a** e **21b** foi realizada a partir da reação do derivado mesilado correspondente **17a** ou **17b** com a morfolina ou a piperidina, conforme técnica descrita por Solomon e colaboradores (SOLOMON; HU; LEE, 2010). Essa reação consiste em uma substituição nucleofílica do tipo S_N2 , conforme já

discutido anteriormente para os derivados azido **18a** e **18b**. Nesse caso, os nucleófilos são as aminas cíclicas morfolina e piperidina, que apresentam um par de elétrons disponível para atacar o carbono ligado ao grupo abandonador mesila.

5.2 Caracterização das substâncias sintetizadas

Todas as substâncias sintetizadas foram caracterizadas pela determinação da faixa de fusão, quando sólidas, e análise de seus espectros no infravermelho e de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , juntamente à análise do subspectro DEPT-135. Os principais dados utilizados para caracterizar inequivocamente cada produto serão discutidos a seguir.

5.2.1 Caracterização das substâncias pela faixa de fusão

Na **Tabela 5.2** está ilustrada uma comparação das faixas de fusão medidas para as substâncias preparadas neste trabalho com as faixas de fusão relatadas na literatura. Na maioria dos casos, as faixas de fusão determinadas são próximas aos dados da literatura, como, por exemplo, para as substâncias **16a**, **22** e **25**. Para as substâncias **16b** e **20b** os valores encontrados foram maiores do que os relatados por Solomon e colaboradores (SOLOMON; HU; LEE, 2010) e isso pode estar relacionado às condições de cristalização e possível formação de diferentes polimorfos.

Os pontos de fusão das substâncias **19a** e **19b** na forma de cloridrato não foram comparados aos valores descritos na literatura, uma vez que as sínteses relatadas via reação da 4,7-dicloro-quinolina com a diamina correspondente levam ao produto na forma de amina não protonada. Embora as substâncias **20a**, **21a** e **21b** não sejam inéditas, suas faixas de fusão não foram relatadas na literatura.

Tabela 5.2 – Faixas de fusão determinadas para as substâncias sintetizadas e faixas de fusão relacionadas na literatura (continua)

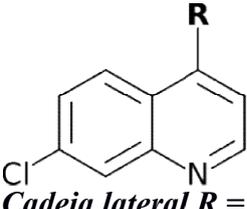
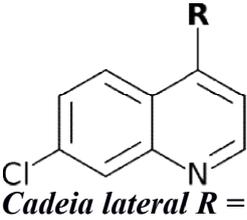
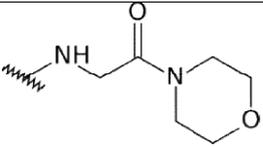
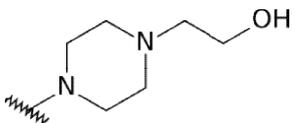
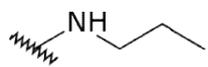
<i>Código</i>	 <i>Cadeia lateral R =</i>	<i>Ponto de fusão medido (°C)</i>	<i>Ponto de fusão relatado na literatura (°C)</i>	<i>Referência</i>
16a		212,8 – 214,5	213 – 215	(MELATO <i>et al.</i> , 2007)
16b		148,8 – 150,1	140 – 142	(SOLOMON; HU; LEE, 2010)
17a		139,5 – 141,7	138 – 140	(CHIYANZU <i>et al.</i> , 2005)
17b		124,0 – 126,2	124 – 126	(SOLOMON; HU; LEE, 2010)
18a		152,3 – 154,9	145 – 147	(DE SOUZA <i>et al.</i> , 2009)
18b		144,4 – 146,0	144	(FISHER <i>et al.</i> , 2014)
19a		209,5 – 211,7	Não relatada na forma de cloridrato	
19b		198,8 – 201,1	Não relatada na forma de cloridrato	
20a		142,5 – 144,1	Não relatada	
20b		129,6 – 130,8	118 – 120	(SOLOMON; HU; LEE, 2010)
21a		136,5 – 139,0	Não relatada	
21b		107,6 – 109,4	Não relatada na forma de base livre	
22		126,6 – 128,3	128 – 130	(MOTIWALA; KUMAR; CHAKRABORTI, 2007)

Tabela 5.2 – Faixas de fusão determinadas para as substâncias sintetizadas e faixas de fusão relatadas na literatura (conclusão)

<i>Código</i>	 <i>Cadeia lateral R =</i>	<i>Ponto de fusão medido (°C)</i>	<i>Ponto de fusão relatado na literatura (°C)</i>	<i>Referência</i>
23		183,8 – 185,6	Substância inédita	
24		117 – 119,1	111 – 112	(GUANTAI <i>et al.</i> , 2011)
25		118,1 – 120,8	123 – 125	(DE SOUZA <i>et al.</i> , 2009)

5.2.2 Caracterização das substâncias por infravermelho

Na análise do espectro na região do infravermelho de **16a**, **16b**, **20b**, **22**, **23**, **24** e **25** são observadas bandas referentes aos deformações axiais de N-H e C-H alifáticos e deformação axial C-O (**Tabela 5.3**). Estas bandas evidenciam a formação dos compostos, já que constituem as principais diferenças na estrutura quando comparado ao material de partida.

Tabela 5.3 – Números de onda de algumas bandas selecionadas nos espectros no infravermelho de **16a**, **16b**, **20b**, **22**, **23**, **24** e **25**

<i>Atribuição</i>	<i>Número de onda $\bar{\nu}$ (cm⁻¹)</i>						
	<i>16b</i>	<i>16a</i>	<i>20b</i>	<i>22</i>	<i>23</i>	<i>24</i>	<i>25</i>
<i>N-H</i>	3317	3306	3210	3210	3200		3259
<i>sp³ C-H</i>	2881	2964, 2923	2949, 2854	3021, 2933	3008	2903	2940
<i>C-N</i>			1429	1431		2835	1451
<i>C-O</i>	1065	1063	1112		1107	1051	

No espectro no infravermelho das substâncias **16a** e **16b** a banda larga de deformação axial da hidroxila aparece sobreposta a banda de deformação axial de N-H. No espectro no infravermelho da substância **22** observam-se, além das bandas características apresentadas na **Tabela 5.3**, duas bandas de intensidade similar em 746 cm^{-1} e 768 cm^{-1} , caracterizando um padrão de benzeno monosubstituído. No espectro no infravermelho de **23** observa-se uma banda intensa em 1651 cm^{-1} , característica de deformação axial de carbonila de amida e uma banda em 1107 cm^{-1} , característica de deformação axial de C-O. A presença destas bandas, junto às bandas características de N-H e C-H sp^3 , em comparação ao espectro do material de partida, são evidências da formação do produto desejado.

Na análise do espectro no infravermelho de **17a** e **17b** observa-se a ausência da banda larga característica de deformação axial de O-H presente nos espectros de **16a** e **16b**, ainda que sobrepostas. Adicionalmente, observam-se duas bandas intensas, características de deformação axial simétrica e assimétrica de S=O. Estas bandas apresentaram máximos de absorção em 1343 cm^{-1} e 1168 cm^{-1} para **17a** e 1345 cm^{-1} e 1666 cm^{-1} para **17b**.

No espectro no infravermelho de **18a** e **18b** não estão presentes as bandas características de grupos sulfonila, que, aliado à presença de bandas intensas características de deformação axial do grupo azido em 2125 cm^{-1} e 2092 cm^{-1} para **18a** e 2098 cm^{-1} para **18b**, são indícios da formação dos produtos desejados.

A ausência das bandas de deformação axial do grupo azida nos espectros no infravermelho de **19a** e **19b** são bom indicativo da redução desse grupo. Adicionalmente, observam-se bandas características de amina primária protonada como uma banda larga em 2875 cm^{-1} no espectro de **19a** e em 2973 cm^{-1} no espectro de **19b**.

Na análise do espectro na região do infravermelho de **20a**, **21a** e **21b** verifica-se a ausência das bandas características de grupos sulfonila em comparação com os materiais de partida **17a** e **17b**. Nos espectros de **21a** e **21b** verifica-se também a ausência das bandas de deformação axial C-O presentes nos materiais de partida **17a** e **17b**. Estas alterações nos espectros na região do infravermelho das substâncias **20a**, **21a** e **21b** em relação aos espectros dos materiais de partida indicam que o grupo

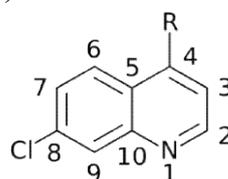
metanosulfonila foi deslocado com sucesso.

5.2.3 Caracterização das substâncias por RMN

5.2.3.1 Dados de RMN do anel quinolínico

Os deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios do sistema quinolínico das substâncias sintetizadas neste trabalho estão descritos na **Tabela 5.4**.

Tabela 5.4 – Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios do anel quinolínico nos espectros de RMN de ^1H das substâncias preparadas neste trabalho (continua)



Deslocamento químico (ppm)

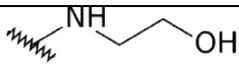
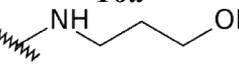
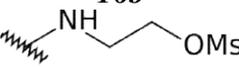
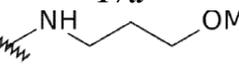
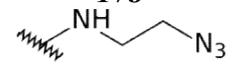
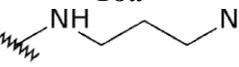
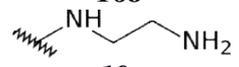
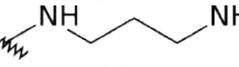
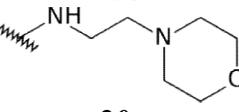
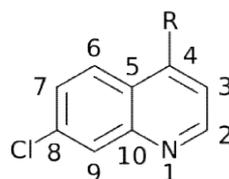
Cadeia lateral R =	H-2	H-3	H-6	H-7	H-9
 16a	8,34	6,50	8,29	7,45	7,79
 16b	8,37	6,46	8,23	7,42	7,78
 17a	8,43	6,60	8,26	7,48	7,81
 17b	8,44	6,57	8,30	7,50	7,81
 18a	8,52	6,40	7,71	7,34	7,95
 18b	8,52	6,40	7,66	7,34	7,94
 19a	8,24	6,74	7,93	7,45	7,61
 19b	8,15	6,66	7,88	7,40	7,57
 20a	8,39	6,49	8,22	7,45	7,78

Tabela 5.4 – Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios do anel quinolínico nos espectros de RMN de ^1H das substâncias preparadas neste trabalho (conclusão)



Deslocamento químico (ppm)

Cadeia lateral R =	H-2	H-3	H-6	H-7	H-9
 20b	8,38	6,47	8,23	7,44	7,77
 21a	8,39	6,48	8,20	7,44	7,77
 21b	8,37	6,44	8,20	7,42	7,77
 22	8,50	6,44	7,76	m	7,98
 23	8,40	6,42	8,19	7,47	7,82
 24	8,48	7,17	7,93	7,56	7,80
 25	8,38	6,47	8,23	7,44	7,77

O sinal referente ao hidrogênio **H-2** aparece como um duplete entre δ 8,15 ppm e 8,50 ppm, sendo o sinal com maior deslocamento químico em todos os espectros obtidos. Este hidrogênio é desprotegido pelo efeito anisotrópico do anel aromático e pelo efeito indutivo retirador de elétrons do nitrogênio vizinho. Em todos os espectros obtidos o sinal referente a **H-2** está acoplado ao sinal referente a **H-3**, resultando em um duplete com constante de acoplamento de, aproximadamente, 5 a 7 Hz. O sinal referente a **H-3** aparece entre δ 6,42 ppm e δ 7,11 ppm, consistindo no sinal mais protegido do sistema

quinolínico.

Os sinais referentes aos hidrogênios **H-6** e **H-7** aparecem entre δ 7,66 ppm e δ 8,30 ppm e δ 7,34 ppm e δ 7,50 ppm, respectivamente. Em todos os espectros obtidos foi verificado acoplamento entre **H-6** e **H-7** com constantes calculadas entre 8,9 Hz e 9,1 Hz. Nos espectros das substâncias **20b**, **23** e **24** o sinal referente ao hidrogênio **H-7** aparece como um duplete largo. Em todos os outros espectros o sinal referente a **H-7** aparece como um duplete duplo, com uma constante de acoplamento *J* com **H-9** de 2,2 Hz a 1,2 Hz. O valor da constante de acoplamento entre os hidrogênios **H-7** e **H-9** é típico de hidrogênios aromáticos em relação *meta*.

O sinal referente ao hidrogênio **H-9** aparece entre δ 7,57 Hz e 7,98 Hz. Nos espectros obtidos das substâncias **16b**, **17b**, **18a** e **22** o sinal referente a **H-9** aparece como um simpleto. Em todos os outros espectros o mesmo sinal aparece como um duplete em razão do acoplamento com o sinal de **H-7**, conforme já descrito.

Os deslocamentos químicos dos sinais referentes aos carbonos do sistema quinólico das substâncias sintetizadas neste trabalho estão ilustrados na **Tabela 5.5**.

Tabela 5.5 – Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos carbonos do anel quinolínico observados nos espectros de RMN de ^{13}C das substâncias preparadas neste trabalho (continua)

Cadeia lateral R =	Deslocamento químico (ppm)						
	C-2 (CH)	C-3 (CH)	C-4 ou C-10 (C _{ipso})	C-5 (C _{ipso})	C-6 ou C-7 (CH)	C-8 (C _{ipso})	C-9 (CH)
	153,6	100,4	152,0 ou	119,2	125,9 ou	135,1	129,2
16a			150,8		125,7		
	151,8	98,5	150,2 ou	117,4	124,0 ou	133,4	127,3
16b			148,9		124,0		

Tabela 5.5 – Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos carbonos do anel quinolínico observados nos espectros de RMN de ^{13}C das substâncias preparadas neste trabalho (continuação)

Cadeia lateral R =	Deslocamento químico (ppm)						
	C-2 (CH)	C-3 (CH)	C-4 ou C-10 (C _{ipso})	C-5 (C _{ipso})	C-6 ou C-7 (CH)	C-8 (C _{ipso})	C-9 (CH)
17a	151,8	99,3	150,5 ou 148,9	117,7	124,9 ou 124,4	134,2	127,5
17b	151,2	99,1	151,0 ou 147,8	117,5	124,9 ou 124,7	134,5	126,6
18a	151,0	99,4	149,5 ou 149,2	117,5	125,9 ou 121,8	135,4	128,9
18b	152,0	99,0	149,9 ou 149,1	117,1	125,5 ou 121,0	135,0	128,8
19a	144,0	99,7	157,3 (C-3) ou 140,8	116,4	125,3 (C-5) 120,3 (C-6)	140,8 ou 139,0	129,0
19b	142,1	98,2	155,7 (C-3) 139,2 ou 137,6 (C-9)	114,9	123,8 (C-5) 118,8 (C-6)	139,2 ou 137,6	127,3
20a	152,1	99,1	150,5 ou 149,2	117,7	124,5 ou 124,2	133,9	127,7
20b	153,4	100,4	152,0 ou 150,5	119,1	125,9 ou 125,8	135,3	129,0

Tabela 5.5 – Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos carbonos do anel quinolínico observados nos espectros de RMN de ^{13}C das substâncias preparadas neste trabalho (conclusão)

Cadeia lateral R =	Deslocamento químico (ppm)						
	C-2 (CH)	C-3 (CH)	C-4 ou C-10 (C _{ipso})	C-5 (C _{ipso})	C-6 ou C-7 (CH)	C-8 (C _{ipso})	C-9 (CH)
 21a	153,7	100,5	151,8 ou 150,8	119,2	125,9 ou 125,6	135,1	129,3
 21b	152,3	98,9	150,4 ou 149,4	117,8	124,3 ou 127,8	133,7	127,8
 22	151,7	99,7	149,8 ou 148,8	117,1	125,6 ou 121,2	135,1	128,5 ou 128,0
 23	152,2	100,1	150,4 ou 149,2	117,7	124,8 ou 124,1	133,8	127,9
 24	152,5	109,6	156,7 (C-3) ou 150,0 (C-9)	121,7	126,4 ou 126,0	133,9	128,4
 25	150,8	98,6	149,9 ou 147,0	116,7	125,5 ou 121,8	135,6	126,8

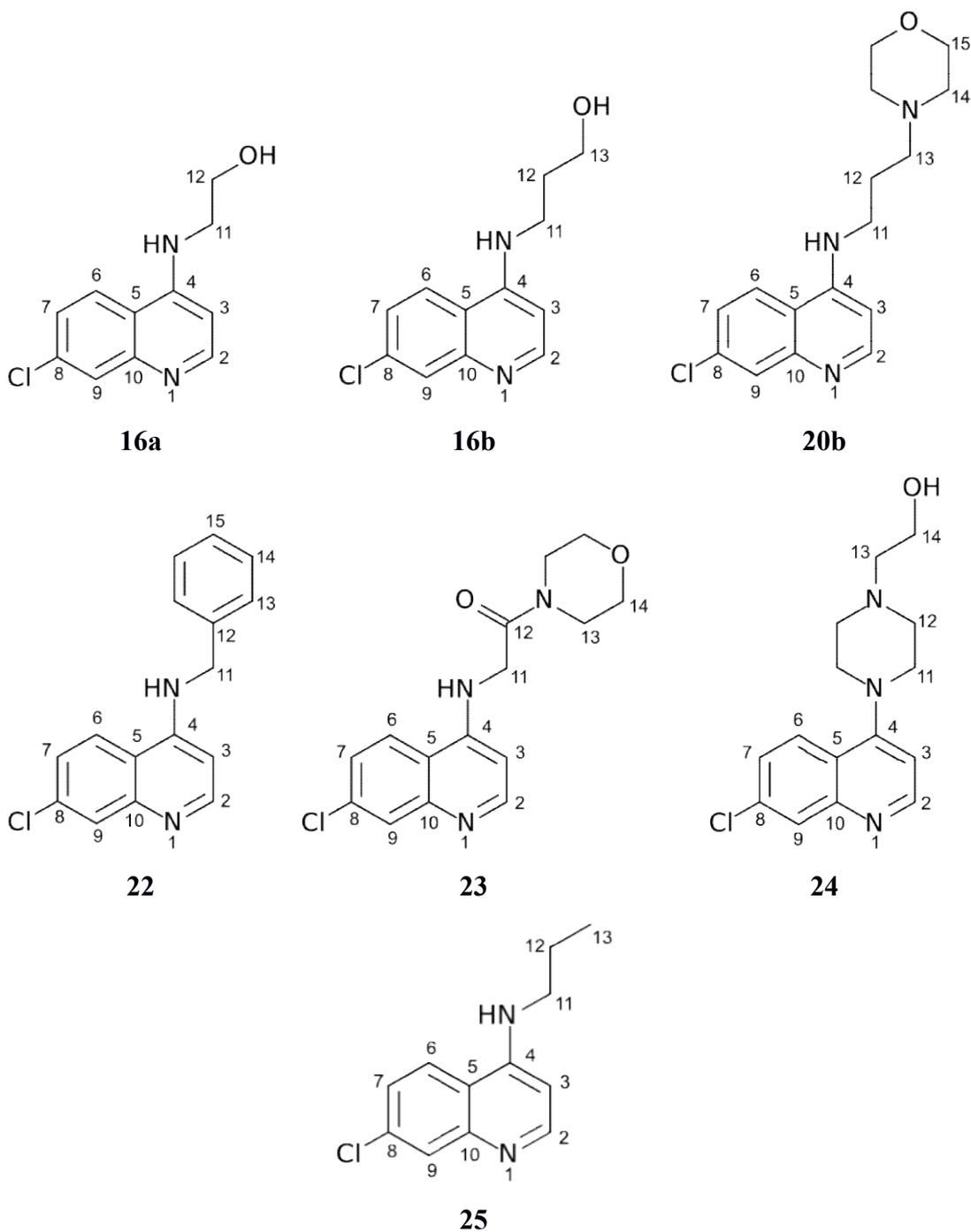
O sinal referente ao carbono C-2 é observado entre δ 142,1 ppm e δ 153,7 ppm, sendo o sinal mais desprotegido do sistema quinolínico, exceto nos espectros das substâncias **19a**, **19b** e **24**. A explicação para essa diferença de deslocamento químico de C-2 está relacionada ao fato das substâncias **19a** e **19b** terem sido isoladas na forma de cloridrato. A presença de um nitrogênio protonado vizinho a C-2 exerceu um efeito de

proteção sob esse carbono. O sinal referente ao carbono **C-3** aparece entre δ 98,5 ppm e δ 100,5 ppm. Este é o sinal mais protegido do anel quinolínico em todos os espectros obtidos.

Os sinais referentes aos carbonos **C-4** e **C-10** aparecem entre δ 149,5 ppm e δ 152,0 ppm e não puderam ser inequivocamente atribuídos em razão da proximidade de seus deslocamentos químicos. Os sinais referentes aos carbonos **C-4** e **C-10** são mais desprotegidos pelo efeito indutivo do nitrogênio vizinho a esses carbonos. Os sinais referentes aos carbonos **C-6** e **C-7** entre δ 121,0 ppm e δ 125,9 ppm também não puderam ser inequivocamente atribuídos. Nesse caso seriam necessários experimentos adicionais para atribuição inequívoca. Experimentos como o *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence* (HMQC) e *Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy* (HSQC), que constroem curvas de nível de correlação entre dois núcleos – em geral entre prótons e carbonos – poderiam, por exemplo, ser utilizados.

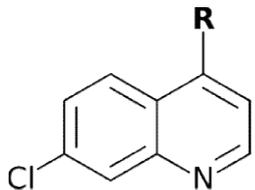
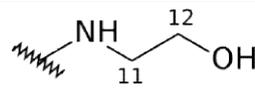
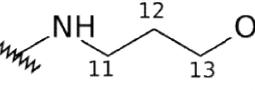
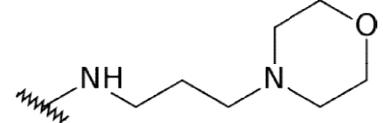
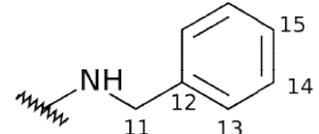
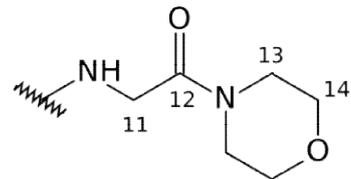
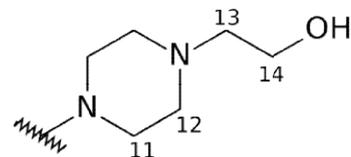
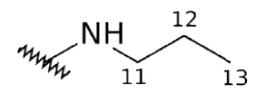
O sinal referente ao carbono **C-8** aparece entre δ 133,4 ppm e δ 135,6 ppm, desprotegido pelo efeito indutivo do cloro. A análise do subspectro DEPT-135 permitiu diferenciar este sinal do sinal referente ao carbono **C-9**, já que **C-8** é um carbono não hidrogenado (ausência de sinal no subspectro DEPT-135) e **C-9** constitui um carbono metínico (sinal positivo no subspectro DEPT-135).

5.2.3.2 Dados de RMN dos substituintes da cadeia lateral de **16a**, **16b**, **20b**, **22**, **23**, **24**, **25**



Os sinais referentes aos hidrogênios presentes nas cadeias laterais das substâncias **16a**, **16b**, **20b**, **22**, **23**, **24** e **25** observados no espectro de RMN de ^1H estão resumidos na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios das cadeias laterais das substâncias **16a**, **16b**, **20b**, **22**, **23**, **24** e **25**

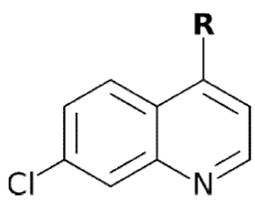
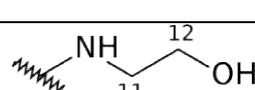
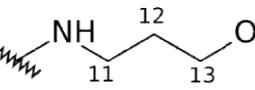
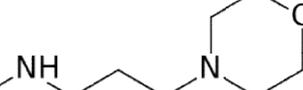
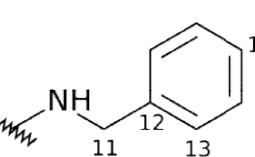
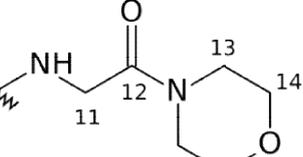
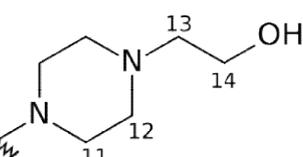
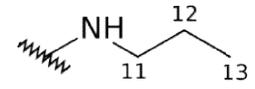
		Deslocamento químico (ppm)					
R =		<i>N-H</i>	<i>H-11</i>	<i>H-12</i>	<i>H-13</i>	<i>H-14</i>	<i>H-15</i>
16a		7,32	3,30 – 3,40	3,60 – 3,70	-	-	-
16b		7,32	3,25 – 3,40	1,80	3,57	-	-
20a		7,37	3,29	1,80	2,35 – 2,40	2,35 – 2,40	3,50 – 3,70
22		5,69	4,54	-	7,30 – 7,50	7,30 – 7,50	7,30 – 7,50
23		7,34	4,20	-	3,20 – 3,70	3,20 – 3,70	-
24		-	3,30 – 3,60	3,14	2,47	3,30 – 3,60	-
25		4,75	3,26 – 3,36	1,80	1,06	-	-

Nos espectros de RMN de ^1H de **16a**, **16b**, **20b** e **23** observa-se o sinal referente ao hidrogênio **N-H** na região de δ 7,30 – 7,40 ppm. Nos espectros de **16a** e **16b** sinal referente ao **N-H**, com área relativa de uma unidade, aparece como um tripleto acoplado ao sinal referente aos hidrogênios metilênicos **H-11**. Nos espectros de **20b** e **23** o sinal referente ao **N-H** aparece como um tripleto não resolvido em δ 7,37 ppm e 7,34 ppm, respectivamente. Estes espectros foram obtidos em DMSO deuterado, solvente capaz de interagir com hidrogênios capazes de participar de interações de hidrogênio. A interação dos oxigênios do DMSO com o hidrogênio **N-H** da molécula reduz a liberdade de movimentação do núcleo do hidrogênio, facilitando a detecção pelo

aparelho do sinal referente ao átomo e de possíveis acoplamentos. Nos espectros de **22** e **25**, ambos obtidos em deuteroformio, o sinal referente ao hidrogênio N-H, com integral com valor relativo de 1, foi observado como um simpleto largo em δ 5,69 ppm e 4,75 ppm, respectivamente.

Os deslocamentos químicos dos sinais referentes aos carbonos das cadeias laterais de **16a**, **16b**, **20b**, **22**, **23**, **24** e **25** observados nos espectros de RMN de ^{13}C estão apresentados na **Tabela 5.7**.

Tabela 5.7 – Deslocamento químico dos sinais referentes aos carbonos das cadeias laterais de **16a**, **16b**, **20b**, **22**, **23**, **24** e **25**.

	 R =	Deslocamento químico (ppm)				
		C-11	C-12	C-13	C-14	C-15
16a		46,9	60,5	-	-	-
16b		39,5	30,9	58,5	-	-
20a		42,5	25,5	55,2	57,8	68,0
22		47,5	137,2	129,0	127,5	128,0
23		45,0 ou 44,1 ou 42,3	167,9	45,0 ou 44,1 ou 42,3	66,4	-
24		53,3	52,1	58,9	60,5	-
25		45,0	11,5	21,9	-	-

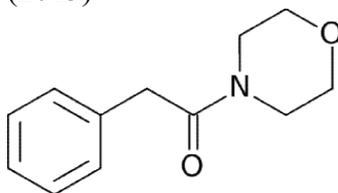
Na análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subspectro de DEPT-135 das substâncias **16a**, **16b**, e **20b** observam-se sinais referentes aos carbonos metilênicos da cadeia lateral entre δ 25 ppm e 70 ppm. Os sinais mais desprotegidos da cadeia lateral aparecem em δ 58,52 ppm, 60,47 ppm e 67,95 ppm e são característicos de carbonos metilênicos ligados à oxigênios.

No espectro de RMN de ^{13}C de **22** podem ser observados sinais na região de carbonos aromáticos entre δ 128 ppm e δ 138 ppm. Dois sinais de maior intensidade em δ 129,00 ppm e δ 127,54 ppm são referentes aos carbonos **C-13** e **C-14**, respectivamente e um sinal de intensidade menor em aproximadamente δ 128 ppm refere-se ao carbono **C-15**. Esses sinais são característicos de grupo fenila monosubstituído e evidenciam a formação da substância **22** (PAVIA *et al.*, 2008).

No espectro de RMN de ^{13}C da substância **23** observa-se um sinal referente ao carbono **C-14** em δ 66,44 ppm, deslocamento característico de carbono metilênico ligado a oxigênio. O carbono da carbonila **C-12** aparece em δ 167,28 ppm, fortemente desprotegido pelo efeito indutivo do oxigênio. Os sinais em δ 42,27 ppm, δ 44,14 ppm e δ 45,00 ppm são referentes aos carbonos **C-11**, **C-13a** e **C-13b**, mas não puderam ser inequivocamente atribuídos. A energia de ativação para a rotação da ligação C-N de uma amida é grande o suficiente para que a velocidade desta rotação seja mais lenta do que o tempo do experimento de RMN. Assim, durante a sequência de pulso eletromagnético, relaxação e aquisição, os núcleos dos carbonos **C-13a** e **C-13b** estão submetidos a um ambiente magnético diferente, o que resulta em um deslocamento químico diferente. O mesmo efeito não pôde ser observado no espectro de RMN de ^1H devido à sobreposição dos sinais referentes aos hidrogênios **H-13** entre si e sobreposição também com o sinal referente a **H-14**. Bazargani e Tafarzzoli (2013) utilizaram espectros de RMN de ^{13}C para determinar a energia de ativação da rotação da ligação C-N na 4-(fenil-acetil)-morfolina (**Figura 5.5**), obtendo o valor de 97,4 kJ/mol (BAZARGANI; TAFARZZOLI, 2013). A *N*-(fenilacetil)-morfolina possui similaridade estrutural com a substância inédita **23**. Assim é possível que a rotação da ligação C-N da amida de **23** também seja lenta o suficiente para serem observados sinais distintos referentes aos carbonos **C-13a** e **C-13b**. O sinal referente a **H-14** aparece como um único sinal em δ 66,44 ppm. A influência do efeito de anisotrópico gerado pela

carbonila sobre o deslocamento químico do sinal de um núcleo está diretamente relacionada à distância que os separa. Assim, **H-14** não é afetado em extensão suficiente para provocar o desdobramento dos sinais.

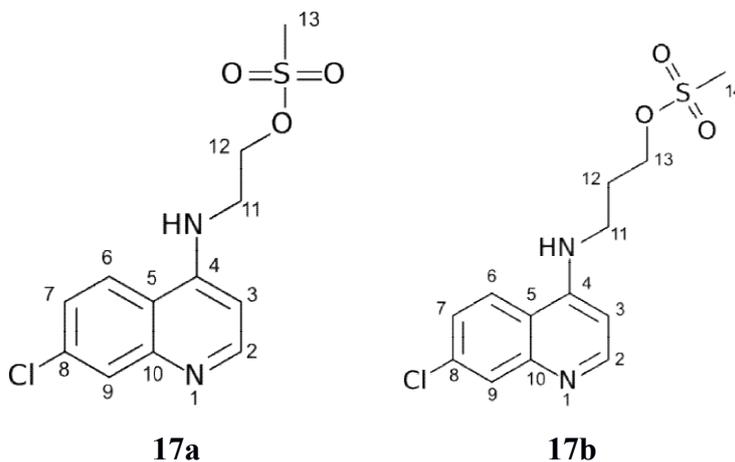
Figura 5.5 – Estrutura da *N*-(fenilacetil)-morfolina, substância estudada por RMN de ^{13}C por Bazargani e Tafarzoli (2013)



O sinal referente ao carbono **C-14** aparece como um único sinal para ambos os núcleos, pela mesma razão discutida para o sinal referente a **H-14**.

No subespectro DEPT-135 de **25** observam-se dois sinais de carbonos metilênicos (sinais negativos) em δ 45,01 ppm e δ 21,90 ppm e um sinal de carbono metílico (sinal positivo) em δ 11,51 ppm. Estes sinais, com deslocamentos químicos característicos do grupo propila ligado à nitrogênio, evidenciam a formação do produto desejado.

5.2.3.3 Dados de RMN dos substituintes da cadeia lateral de **17a** e **17b**

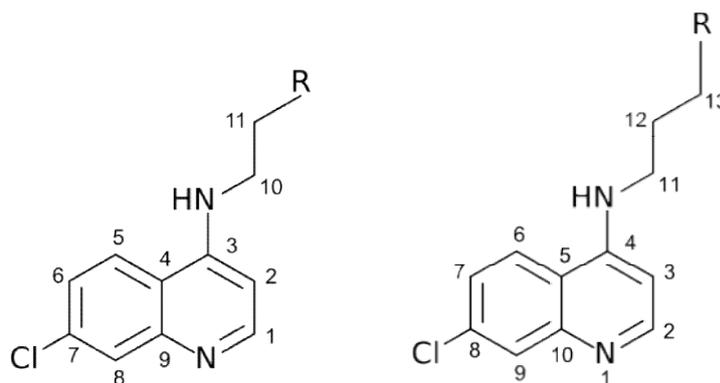


No espectro de RMN de ^1H de **17a** e **17b** observam-se sinais referentes aos hidrogênios do grupo metanosulfonila como simpletos em 3,16 ppm e 3,20 ppm, respectivamente.

Na análise dos espectros de RMN de ^{13}C , juntamente à análise dos subespectros de

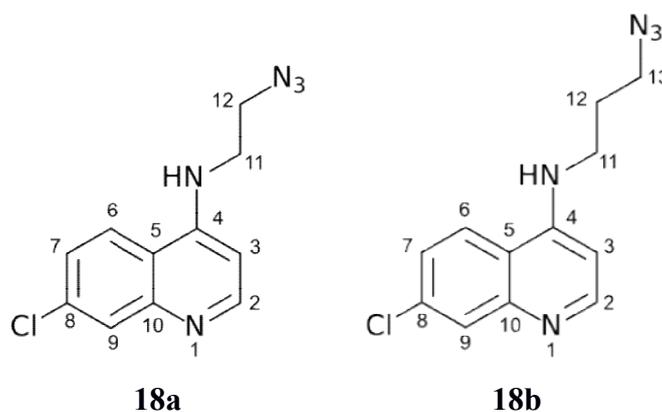
DEPT-135, de **17a** e **17b** observam-se sinais referentes aos carbonos do grupo metila em δ 37,11 ppm e δ 36,96 ppm, respectivamente. Adicionalmente, os sinais referentes aos carbonos ligados ao oxigênio apresentaram deslocamento químico maior nos espectros dos compostos mesilados **17a** e **17b** em comparação aos dos materiais de partida **16a** e **16b** (Tabela 5.8). Esta alteração é compatível com o maior efeito indutivo retirador de elétrons do grupo metanosulfonila em comparação à hidroxila.

Tabela 5.8 – Comparação dos deslocamentos químicos do sinal referente ao carbono ligado ao oxigênio nos alcoóis de partida **16a** e **16b** em relação aos compostos mesilados **17a** e **17b**



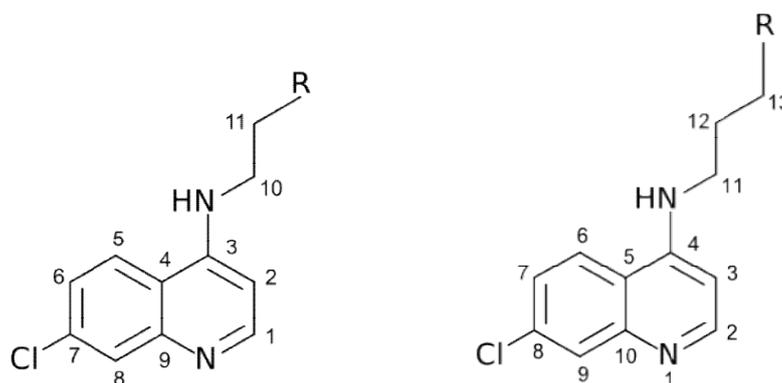
Substância	Deslocamento químico (ppm)	
	C-12	C-13
R=		
-OH	58,5	60,5
-OSO ₂ CH ₃	68,7	68,2

5.2.3.4 Dados de RMN dos substituintes da cadeia lateral de **18a** e **18b**



Na análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135 de **18a** e **18b** verifica-se a ausência dos sinais referentes aos hidrogênios e carbonos de grupos metila. Verifica-se também a mudança de deslocamentos químicos dos carbonos ligados ao grupo azido em **18a** e **18b** em comparação aos carbonos ligados ao grupo metanosulfonila em **17a** e **17b** (Tabela 5.9).

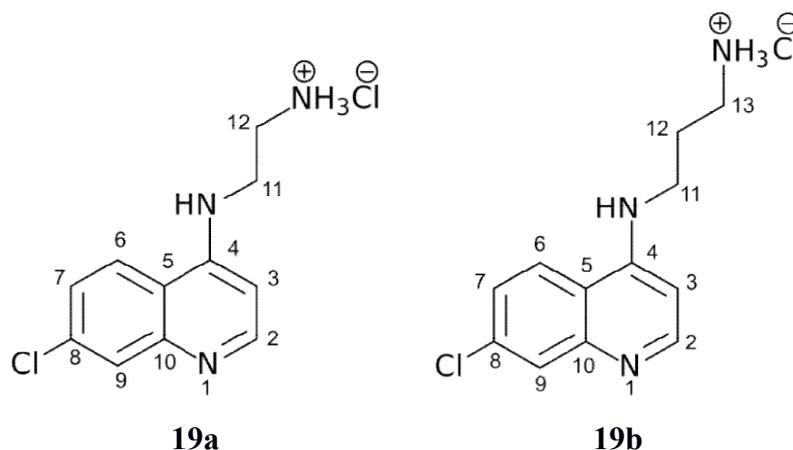
Tabela 5.9 – Comparação dos deslocamentos químicos dos sinais referente aos hidrogênios e carbonos ligados aos grupos metanosulfonila em **17a** e **17b** em relação aos derivados azido **18a** e **18b**



Substância	Deslocamento químico (ppm)				
	R=	C-12	H-12	C-13	H-13
-OSO ₂ CH ₃		68,2	4,4	68,7	4,4
-N ₃		50,0	3,7	49,6	3,5

Com base nos dados apresentados na Tabela 5.9 pode-se observar a diferença de deslocamento químico dos sinais referentes aos hidrogênios e carbonos vizinhos aos grupos metanosulfonila e azido das substâncias **17a**, **17b** e **18a**, **18b**, respectivamente. Os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos vizinhos ao grupo metanosulfonila são mais desprotegidos do que aqueles ligados ao grupo azido em ambas as substâncias. O efeito retirador de elétrons do nitrogênio é menor do que o mesmo efeito do oxigênio, devido à diferença de eletronegatividade.

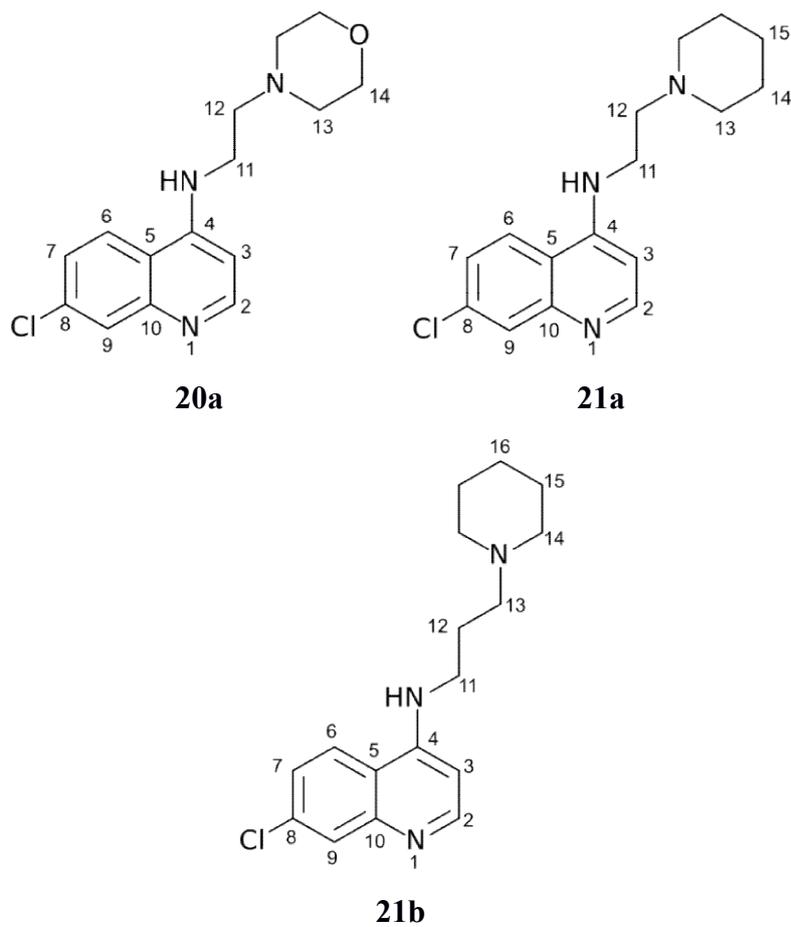
5.2.3.5 Dados de RMN dos substituintes da cadeia lateral de **19a** e **19b**



Nos espectros de RMN de ^1H de **19a** e **19b** na forma protonada observam-se que os sinais referentes ao hidrogênios vizinhos ao grupo amino encontram-se mais desprotegidos quando comparados aos dos derivados azido correspondentes. Em **18a**, o sinal referente a **H-12** aparece como um tripleto em δ 3,66 ppm, já no espectro de **18a** o sinal do hidrogênio correspondente aparece como um tripleto em δ 3,31 ppm. Os mesmos núcleos das moléculas de **18b** e **19b** aparecem como tripletos em δ 3,52 ppm e δ 3,04 ppm, respectivamente.

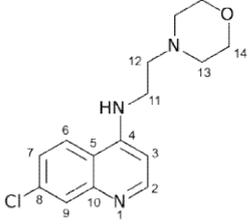
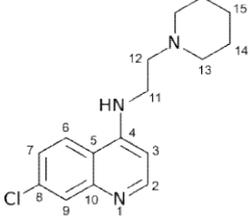
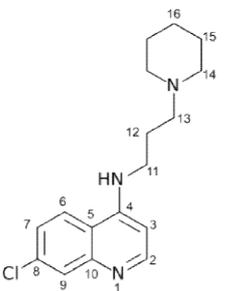
Finalmente, os espectros de RMN de ^1H das substâncias **19a** e **19b** foram obtidos em D_2O e não se observam sinais dos hidrogênios ligados à nitrogênio. Isto ocorre devido à troca dos hidrogênios ácidos por núcleos de deutério oriundos do solvente. O núcleo de deutério ressoa em uma frequência muito diferente em comparação ao hidrogênio e não é detectado no experimento de RMN de ^1H . A ausência dos sinais dos hidrogênios **N-H** dos espectros das substâncias **19a** e **19b** modificou a multiplicidade do sinal referente ao hidrogênio **H-11** em comparação aos espectros obtidos em DMSO-d_6 .

5.2.3.6 Dados de RMN dos substituintes da cadeia lateral de **20a**, **21a** e **21b**



Na **Tabela 5.10** estão apresentados os sinais referentes aos carbonos e hidrogênios que evidenciam a formação das substâncias **20a**, **21a** e **21b**.

Tabela 5.10 – Deslocamento químico dos sinais referentes aos carbonos e hidrogênios evidenciando a formação dos produtos **20a**, **21a** e **21b**.

<i>Substância</i>	<i>Deslocamento químico (ppm)</i>	<i>Deslocamento químico (ppm)</i>
 <p>20a</p>	H-13 2,44	C-13 53,7
	H-14 3,57	C-14 66,6
 <p>21a</p>	H-13 2,30 – 2,60	C-13 58,2
	H-14 1,30 – 1,60	C-14 25,8
	H-15 1,30 – 1,60	C-15 24,2
 <p>21b</p>	H-14 3,20 – 3,40	C-14 54,5
	H-15 3,20 – 3,40	C-15 26,0
	H-16 1,30 – 1,60	C-16 24,5

Na análise dos espectros de RMN de ^1H de **20a**, **21a** e **21b** observa-se, inicialmente, a ausência dos sinais referentes aos carbonos CH_3 dos grupos mesil, presentes nos espectros das substâncias **17a** e **17b**. Isto sugere que o grupo metanosulfonato foi deslocado.

Os sinais referentes aos hidrogênios dos anéis piperidínicos em **21a** e **21b** e morfolínico em **20b** aparecerem entre cerca de δ 3,5 ppm e δ 1,3 ppm. Observa-se, especialmente, o sinal referente a **H-14** no espectro de **20b**, que aparece em δ 3,57 ppm devido ao efeito indutivo do oxigênio. Nos espectros de **21a** e **21b** observam-se os sinais referentes aos

hidrogênios **H-15** e **H-16**, respectivamente, que aparecem como multipletos entre δ 1,30 ppm e δ 1,60 ppm, mais protegidos de ambos os espectros.

Na análise dos espectros de RMN de ^{13}C de **20a**, **21a** e **21b** observa-se, similarmente, a ausência dos sinais referentes aos carbonos CH_3 dos grupos mesil, também sugerindo que o grupo metanosulfonato tenha sido deslocado. Os sinais referentes aos carbonos dos anéis morfolinico e piperidínico podem ser observados. Os sinais referentes aos carbonos do anel morfolinico aparecem em δ 53,7 ppm, δ 58,2 ppm e δ 66,6 ppm no espectro de **20a**. Os sinais referentes aos carbonos do anel piperidínico aparecem em δ 58,2 ppm, δ 25,8 ppm e δ 24,2 ppm no espectro de **21a** e δ 54,5 ppm, δ 26,0 ppm e δ 24,5 ppm no espectro de **21b**.

5.3 Resultados de inibição enzimática

Os derivados quinolínicos sintetizados **16a** a **25** foram avaliados, na concentração de 100 μM , em ensaios bioquímicos contra as enzimas cruzaina e rodesaina. Na **Tabela 5.11** estão apresentados os resultados obtidos. Para os compostos que foram capazes de inibir a atividade da enzima em mais que 60%, a CI_{50} foi determinada.

Tabela 5.11 – Inibição da atividade das enzimas cruzaina e rodesaina e CI_{50} dos compostos mais ativos. (continua)

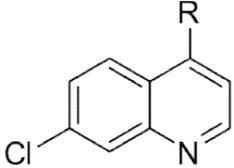
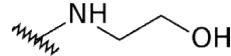
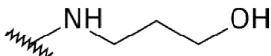
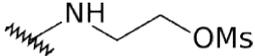
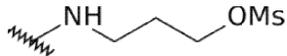
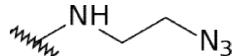
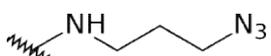
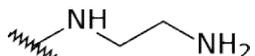
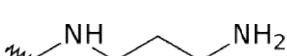
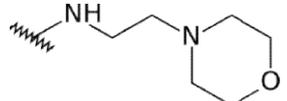
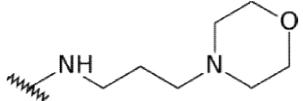
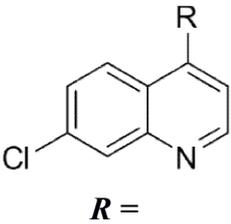
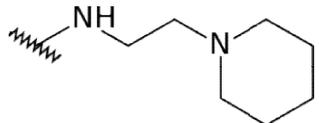
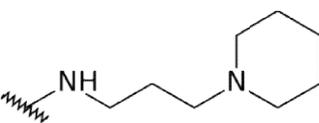
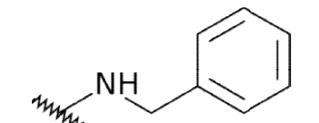
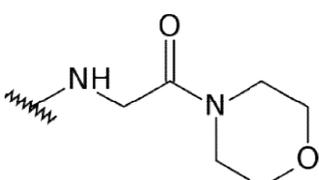
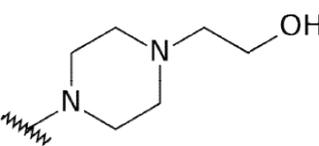
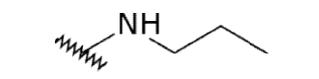
 $R =$	<i>Cruzaina</i>		<i>Rodesaina</i>	
	<i>Inibição a</i>		<i>Inibição a</i>	
	$100 \mu M$ (%)	CI_{50} (μM)	$100 \mu M$ (%)	CI_{50} (μM)
16a 	59,7 ± 1,1	61,8 ± 3,8	60,6 ± 4,7	57,8 ± 11,8
16b 	67,1 ± 4,5	27,8 ± 9,7	62,7 ± 4,4	71,6 ± 3,9
17a 	56,7 ± 5,6	-	66,2 ± 3,6	65,0 ± 10,6
17b 	48,4 ± 1,7	-	48,1 ± 3,0	-
18a 	57,7 ± 0,9	-	67,4 ± 3,4	49,7 ± 8,0
18b 	66,9 ± 11,1	54,7 ± 12,4	62,5 ± 4,8	74,4 ± 11,5
19a* 	43,9 ± 1,7	-	61,9 ± 8,1	125,5 ± 0,4
19b* 	39,1 ± 3,9	-	53,0 ± 4,4	-
20a 	56,1 ± 7,5	40,8 ± 2,7	60,7 ± 3,8	60,8 ± 3,3
20b 	88,2 ± 1,3	14,7 ± 1,5	50,6 ± 4,9	-

Tabela 5.11 – Inibição da atividade das enzimas cruzaina e rodessaína e CI_{50} dos compostos mais ativos. (conclusão)

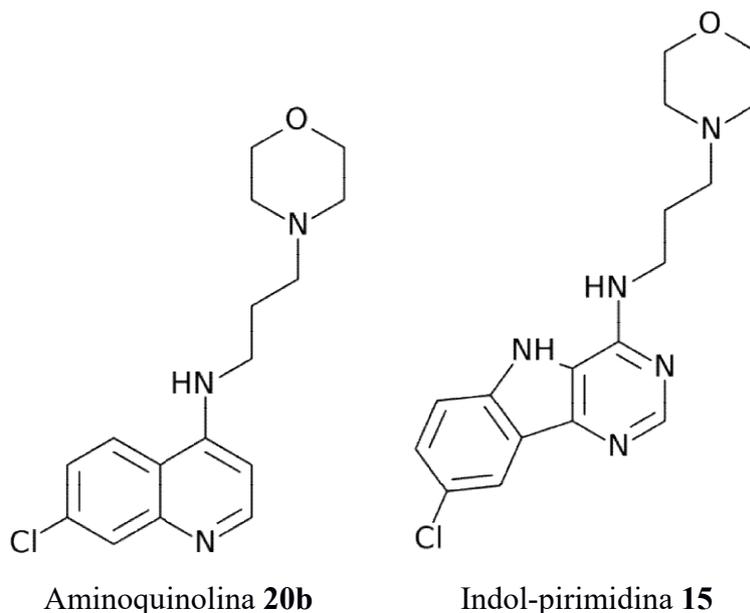
		<i>Cruzaína</i>		<i>Rodessaína</i>	
		<i>Inibição a</i> $100 \mu M$ (%)	$CI_{50} (\mu M)$	<i>Inibição a</i> $100 \mu M$ (%)	$CI_{50} (\mu M)$
21a		43,3 ± 3,8	-	56,1 ± 4,7	-
21b		53,4 ± 3,9	-	60,8 ± 2,7	-
22		65,1 ± 4,6	43,9 ± 7,7	71,2 ± 3,8	34,2 ± 0,1
23		55,0 ± 3,4	-	61,1 ± 4,6	47,5 ± 5,9
24*		42,6 ± 0,4	-	52,5 ± 4,9	-
25		53,4 ± 6,0	-	49,2 ± 3,5	-

*: amostras solubilizadas em tampão acetato de sódio 1M pH 5,5. Para tais compostos, todos os controles de inibição negativa foram feitos com a mesma solução tampão.

Cinco compostos, **16a**, **16b**, **18b**, **20b** e **22**, dentre os 16 testados, tiveram a CI_{50} contra cruzaina determinada. Dentre estes destaca-se a aminoquinolina **20b**, com a estrutura mais próxima do do protótipo das indolpirimidinas (**Figura 5.6**) e CI_{50} de 14,7 μM . Comparando-se esse dado com o valor de CI_{50} do protótipo, de 2,5 μM , verifica-se que a estratégia de simplificação proposta reduziu um pouco a potência. Por outro lado, verificou-se que a redução da CI_{50} foi de cerca de 5 vezes, uma perda de potência

aceitável em estágios iniciais de desenvolvimento de protótipos bioativos. A aminoquinolina **16b**, a segunda mais ativa com CI_{50} de 27,8 μM , apresenta uma atividade próxima à **20b**, com uma estrutura ainda mais simples, já que não apresenta o anel morfolina.

Figura 5.6 – Estruturas químicas da substância **20b**, mais ativa da série contra a cruzaina, e da indol-pirimidina **15**, protótipo do estudo.



Comparando as estruturas de **20b**, **16b** e **18b** com **20a**, **16a** e **18a**, verifica-se a importância do comprimento da cadeia lateral para a atividade nesta série. A redução da cadeia de três para dois átomos de carbono resultou em uma redução significativa da atividade com uma capacidade de inibição de 88% a 100 μM para **20b** para uma substância pouco ativa a 100 μM (56% de inibição para **20a**). Similarmente, as substâncias apresentando uma hidroxila demonstraram a mesma tendência na atividade com a variação do tamanho da cadeia, sendo que **16b** apresentou CI_{50} de 27,8 μM e **16a** apresentou CI_{50} de 61,8 μM , uma perda de potência de quatro vezes.

A comparação das estruturas e atividades de **20b** com **21b** mostra também a importância da presença de um átomo de oxigênio no anel ligado à cadeia lateral. A substância **20b** apresentou inibição de 88% a 100 μM enquanto **21b** inibiu 53% na mesma concentração. A substituição da morfolina pela piperidina, portanto, resulta numa perda da atividade. A mesma análise pode ser aplicada para as substâncias **20a** e **21a**, só que, nesse caso, menos evidente, já que ambas apresentaram atividade reduzida.

A presença da hidroxila na cadeia lateral também parece contribuir. Comparando **16b** e **16a** com **19b** e **19a**, onde a hidroxila é substituída por uma amina primária, verifica-se redução do percentual de inibição a 100 μM de 67 % para 39 % e 60 % para 44 %, respectivamente. Mais um indício da importância da presença do grupo hidroxila na cadeia lateral pode ser evidenciado comparando-se a atividade de **16b**, que possui hidroxila na cadeia, com a atividade de **25**, que não possui este substituinte. Nesse caso, verifica-se, também, uma pequena redução relativa de na atividade.

A presença de um grupo amida na cadeia lateral de **23** resulta em uma rigidificação da estrutura em relação à **20a**, que apresenta uma amina nessa posição. Essa modificação estrutural não afetou a atividade de **23** em relação à **20a** (55% de inibição contra 56%). Adicionalmente, o nitrogênio do grupo amida de **23** é muito pouco básico e não estará protonado na condição de ensaio (pH = 5,5). O nitrogênio da amina terciária de **20a**, por outro lado, é básico e, provavelmente, estará protonado na condição de ensaio. A atividade inibitória muito similar de ambas as substâncias pode indicar que a protonação no nitrogênio da cadeia não é fundamental para a interação destas substâncias com a enzima. Mais variações precisam ser testadas para reforçar ou refutar esta proposta.

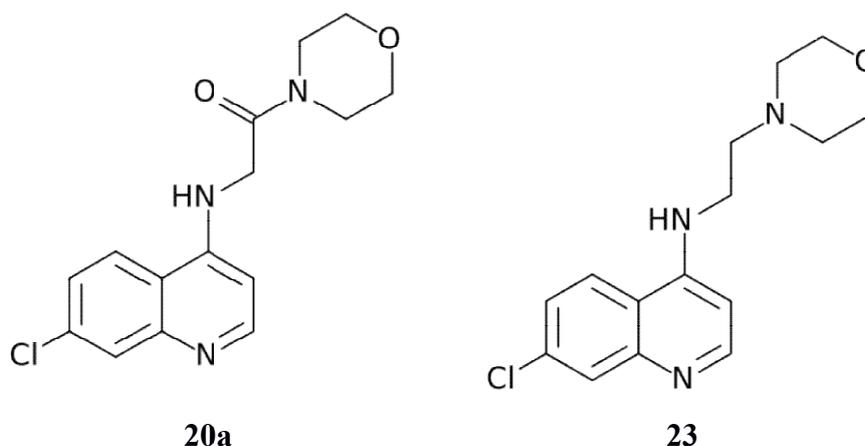
A partir dos resultados de inibição para a rodesaína é possível observar que toda a série, de uma maneira geral, foi mais ativa contra esta enzima. A inibição média a 100 μM para todas as substâncias foi de 60 %. Comparativamente, somente cinco substâncias atingiram 60% de inibição à 100 μM contra a cruzaina, enquanto que contra a rodesaína um total de dez substâncias apresentaram atividade nessa mesma concentração. É possível que esta diferença esteja ligada ao menor impedimento do sítio ativo da rodesaína, especialmente no subsítio S2, possível local de interação das substâncias da série.

A redução do grupo azido em **18a** ($\text{CI}_{50} = 49,7 \mu\text{M}$) para amina em **19a** ($\text{CI}_{50} = 125,5 \mu\text{M}$) resultou em uma redução de 2,7 vezes na atividade. O composto **18a** foi o terceiro mais ativo da série contra a rodesaína.

Similarmente ao efeito observado para a cruzaina, a substituição de uma amina terciária pela amida terciária correspondente praticamente não influenciou na atividade de **23** em relação à **20a** (Figura 5.7). A substância **23**, a única inédita da série, apresentou

atividade moderada contra a rodesaína, com CI_{50} de 47,5 μM .

Figura 5.7 – Estruturas químicas das substâncias **20a** e **23**.



Comparando os resultados das mesmas substâncias contra ambas as enzimas ressalta-se, primeiramente, a atividade apresentada pela substância **22**. Esta foi a substância mais ativa da série contra a rodesaína e apresentou atividade também contra cruzaina, com CI_{50} de 34,2 μM e 43,9 μM respectivamente. Nesse caso, a atividade de **22** contra ambas as enzimas foi muito semelhante. O composto **16a** apresentou padrão similar, com atividade próxima, porém menor, para ambas as enzimas: CI_{50} de 61,8 μM contra a cruzaina e CI_{50} de 57,9 μM .

Algumas variações de atividade das substâncias contra as enzimas também são expressivas, como a inibição bastante seletiva de **20b** e **16b** contra cruzaina. A substância **20b** apresentou inibição de 88% a 100 μM contra cruzaina e 51% na mesma concentração contra a rodesaína. A substância **16b** apresentou uma CI_{50} de 27,8 μM contra a cruzaina e CI_{50} de 71,6 μM contra rodesaína, uma diferença de 2,5 vezes.

Por outro lado, **19b** e **19a** apresentaram atividade maior contra rodesaína. A substância **19b** apresentou inibição percentual a 100 μM de 39% e 52% contra cruzaina e rodesaína, respectivamente, enquanto que a substância **19a** apresentou inibição percentual de 44 % e 62 % contra cruzaina e rodesaína, respectivamente. O valor da CI_{50} de **19a** contra a rodesaína, entretanto, foi de 125,5 μM , a mais alta entre as CI_{50} determinadas neste estudo.

5.4 Modo de inibição de 20b

Dentre as substâncias testadas contra as enzimas cruzaína e rodesaína neste estudo, **20b** apresentou a melhor atividade. Esta substância inibiu a cruzaína em ensaio sem incubação apresentando inibição à 100 μM de 88 % e CI_{50} de 14,7 μM contra esta enzima. Adicionalmente, a substância **20b** é a mais similar à indol-pirimidina **15**, protótipo da série. Por estes motivos, esta substância foi escolhida para experimentos de determinação do modo de inibição contra a enzima cruzaína.

Quatro concentrações de inibidor (3,125 μM , 6,25 μM , 12,5 μM e 25 μM) foram utilizadas, de forma que cada valor é o dobro do anterior. Um dos ensaios é feito na ausência de inibidor. Estas concentrações foram escolhidas de forma que duas são menores do que a CI_{50} (14,7 μM), uma delas é próxima a este valor e duas são maiores. Esta faixa permite explorar desde situações de inibição quase total até nenhuma inibição.

Na **Figura 5.8** está apresentado o resultado deste experimento num gráfico de Michaelis-Menten, com curvas de regressão não-linear para um modelo competitivo, enquanto na **Tabela 5.12** estão representados os resultados desta regressão e na **Tabela 5.13** os dados individualizados para cada concentração de inibidor.

Figura 5.8 – Gráfico de Michaelis-Menten da substância **20b** contra a cruzaína com regressão não linear de modo de inibição competitivo

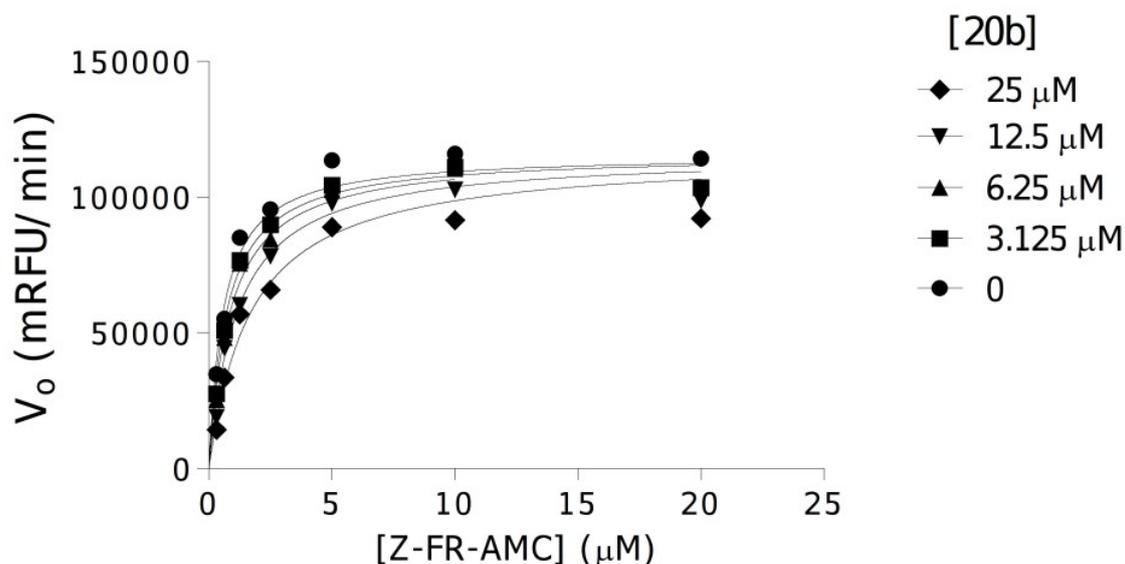


Tabela 5.12 – Estatística da regressão não linear do modelo de inibição competitivo para todos os dados de **20b**

	<i>Valor</i>	<i>Desvio padrão</i>
K_m	0,5793	0,06215
K_i	12,69	2,70
V_{max}	115621	2156

Tabela 5.13 – Parâmetros cinéticos para as curvas de Michaelis-Menten em diferentes concentrações de inibidor

<i>Concentração de inibidor (μM)</i>	V_{max}	<i>Desvio padrão</i>	K_m <i>aparente</i>	<i>Desvio padrão</i>
<i>0</i>	123587	3388	0,6990	0,0853
<i>3,125</i>	115751	4152	0,7594	0,1161
<i>6,25</i>	121410	4679	0,9444	0,1266
<i>12,5</i>	110622	4269	1,029	0,1563
<i>25</i>	102418	4631	1,215	0,2073

Para inibidores competitivos, a ligação deste e a ligação do substrato a um alvo são eventos mutuamente exclusivos. Isto pode significar que ambos os compostos se liguem ao mesmo sítio. Uma vez que altas concentrações do substrato deslocam o inibidor do sítio e vice versa, somente os termos dependentes da constante de Michaelis aparente sofrem alteração (HANS, 2008). Logo, a velocidade máxima, observada no *plateau* da **Figura 5.8** não muda com o aumento da concentração de substrato, assim como a excentricidade da hipérbole é alterada pela mesma variação.

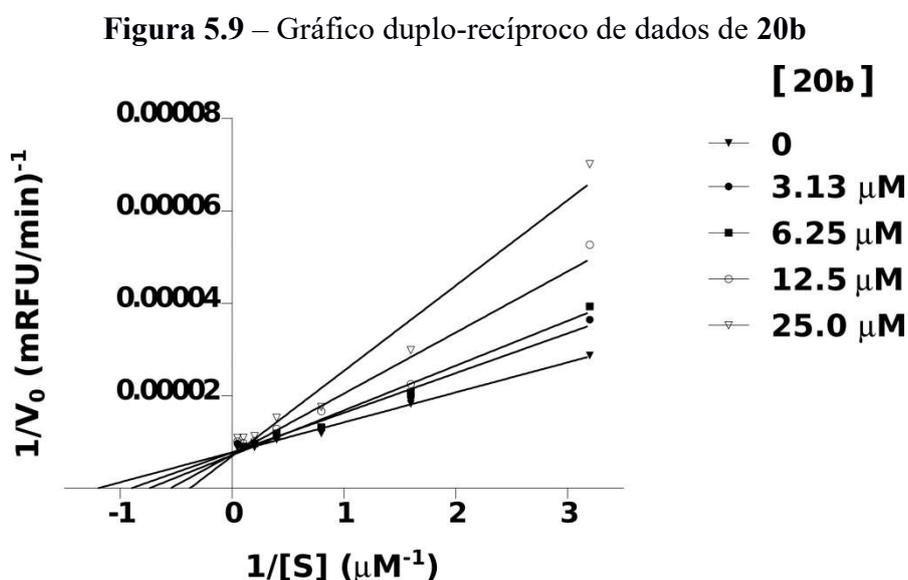
Na análise da **Tabela 5.13** observa-se que o K_m aparente aumenta com o aumento da concentração de inibidor. A constante de Michaelis (K_m) é inversamente proporcional a afinidade da enzima pelo substrato. Uma vez que um inibidor competitivo somente se liga a enzima livre, a afinidade aparente da enzima em solução será reduzida, aumentando o valor de K_m aparente, como observado. A velocidade máxima V_{max} , por outro lado, sofre pequena alteração com o aumento da concentração de **20b**. Uma vez

que um inibidor competitivo pode ser deslocado da enzima, uma concentração suficientemente alta de substrato levará o sistema a velocidade máxima de reação.

Os efeitos observados na **Figura 5.8** também podem ser visualizados na **Figura 5.9**, que apresenta a regressão dos dados de **20b** para o modelo de Lineweaver-Burk. A inclinação das retas depende do K_m aparente, porém o intercepto em y, igual à V^{-1} não depende (**Equação 5.1**). Logo, observa-se um padrão de retas com mesmo intercepto em y, o que ocorre quando a atividade do substrato $[S]$ tende a 0. O padrão observado neste gráfico é um forte indício apontando para uma inibição competitiva.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}[S]} \quad (\text{Equação 5.1})$$

Onde v_0 : velocidade inicial; V_{\max} : velocidade máxima da reação catalisada; K_m : constante de Michalis; $[S]$: concentração do substrato



Na **Figura 5.10** está representado o gráfico da variação de K_m aparente, obtido por regressão linear no gráfico de Lineweaver-Burk, para diferentes séries de concentração de inibidor, e na **Tabela 5.14** estão apresentados os dados de regressão para este gráfico. Para um inibidor com um mecanismo competitivo espera-se que esta relação seja expressa por uma equação linear e que o intercepto da reta em x seja $-K_i$. O K_i calculado por este método foi de $12,1 \mu\text{M}$ (**Tabela 5.14**), comparável ao K_i

determinado por regressão não-linear, com valor de 12,7 μM (Tabela 5.12).

Figura 5.10 – Variação do K_m aparente para diferentes concentrações de inibidor

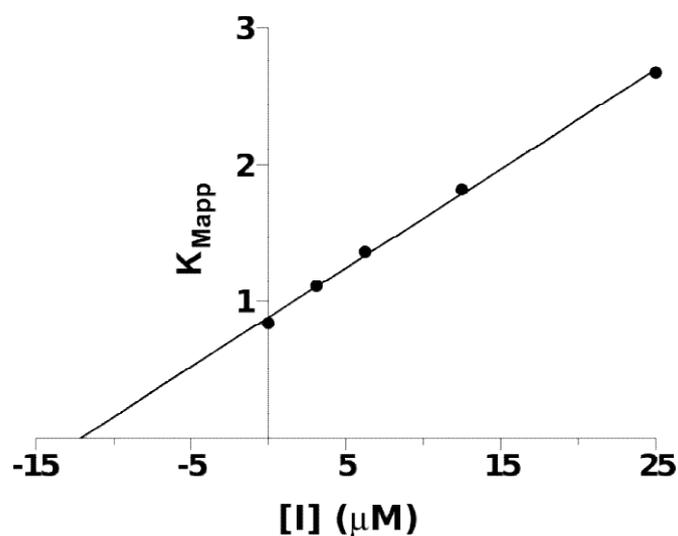


Tabela 5.14 – Estatística da regressão linear para dados da Figura 6.3

	<i>Valor</i>	<i>Desvio padrão</i>
<i>Inclinação</i>	0,07256	0,001847
<i>Intercepto em X</i>	-12,12	-
R^2	0,9981	-

5.5 Atividade tripanossomicida contra forma amastigotas e tripoamastigotas de *T. cruzi* e citotoxicidade

Na Tabela 5.15 estão mostrados os resultados da atividade tripanossomicida contra cepas Tulahuen de *T. cruzi* assim como os testes de citotoxicidade contra fibroblastos L929 não infectados.

Tabela 5.15 – Resultados de atividade tripanossomicida contra forma amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e citotoxicidade contra fibroblastos murinos. (continua)

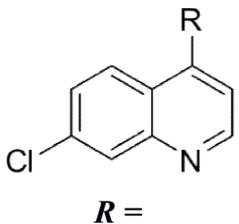
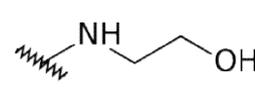
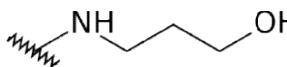
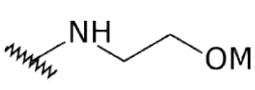
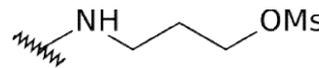
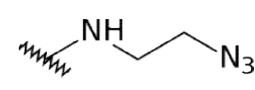
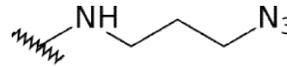
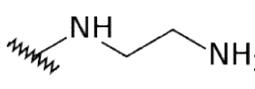
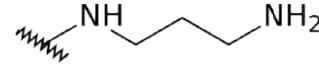
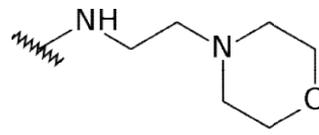
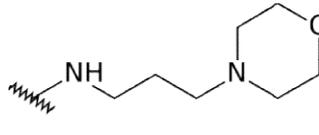
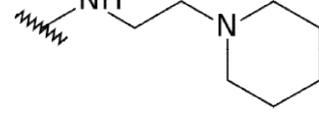
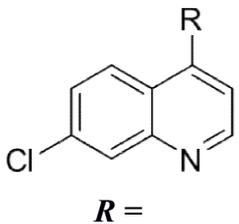
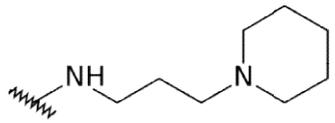
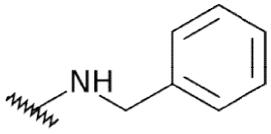
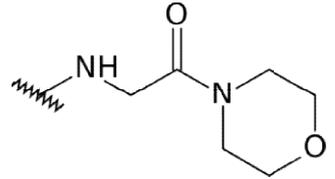
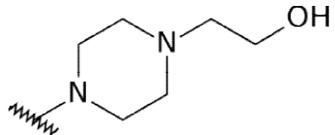
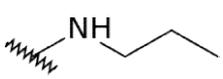
	 $R =$	CI_{50} sobre <i>T. cruzi</i> (μM)	CI_{50} sobre fibroblastos linhagem L929 (μM)	Índice de Seletividade (IS)*
16a		Inativo	ND [#]	-
16b		Inativo	ND	-
17a		126,4 ± 7,8	332,49	> 1,4
17b		17,5 ± 2,1	79,4	4,5
18a		Inativo	201,9	-
18b		137,9 ± 51,6	215,8	1,6
19a		77,5 ± 11,6	< 193,7	< 2,1
19b		Inativo	ND	-
20a		Inativo	ND	-
20b		67,7 ± 2,6	122,6 ± 57,9	1,8
21a		62,3 ± 29,1	69,7 ± 32,8	1,1

Tabela 5.15 – Resultados de atividade tripanossomicida contra forma amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e citotoxicidade contra fibroblastos murinos. (conclusão)

		<i>CI</i> ₅₀ sobre <i>T. cruzi</i> (μM)	<i>CI</i> ₅₀ sobre fibroblastos linhagem L929 (μM)	Índice de Seletividade (IS)*
21b		38,2 ± 3,9	61,5 ± 29,0	1,6
22		37,2 ± 4,8	46,5	1,25
23		Inativo	ND	-
24		Inativo	ND	-
25		125,1 ± 54,8	228,2 ± 80,2	2,3
	Benznidazol	3,81	2.381	625

* Índice de seletividade: razão entre *CI*₅₀ sobre *T. cruzi* e *CI*₅₀ sobre fibroblastos; # Não determinada

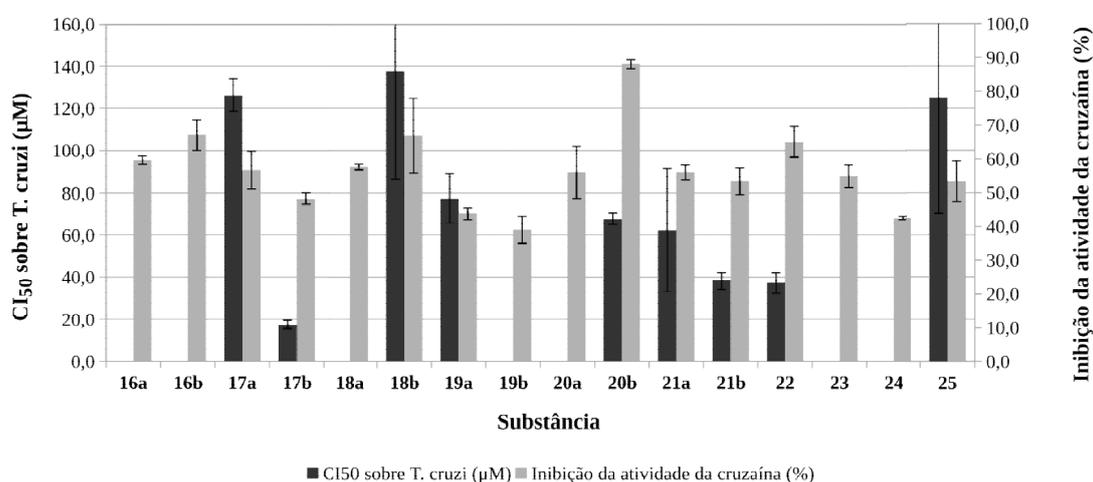
Com base nos resultados mostrados na **Tabela 5.15** verifica-se, inicialmente, uma atividade tripanossomicida significativa de três substâncias dessa série, **17b**, **21b** e **22**, com *CI*₅₀ contra o parasito na região de micromolar baixo. As substâncias **21b** e **22** apresentaram *CI*₅₀ de 38,2 μM e 37,2 μM, respectivamente, uma potência cerca de dez vezes menor em comparação ao benznidazol, fármaco utilizado como controle positivo. A substância **17b** foi a mais ativa da série e apresentou *CI*₅₀ de 17,50 μM, 4,5 vezes menos potente se comparado benznidazol. Verifica-se também a atividade interessante

de **20b**, com CI_{50} de 66,1 μM .

Por outro lado todos os compostos foram citotóxicos contra fibroblastos L929, com índices de seletividade de, no máximo, 4,5 para **17b** e, no mínimo de 1,1 para **21a**. Mais estudos são necessários para caracterizar o mecanismo de citotoxicidade de tais compostos.

A comparação da atividade tripanossomicida com a atividade inibitória contra a cruzaina (Figura 5.11) mostra que é possível que algumas das substâncias da série apresentem outro mecanismo de ação que não a inibição desta enzima. Verifica-se, por exemplo, a divergência entre as atividades de **17b** e **19a** que apresentaram os valores de CI_{50} contra o parasito de 17,50 μM , 69,3 μM , respectivamente, porém apresentaram baixa atividade inibitória contra a cruzaina a 100 μM , com valores de 48,4 % e 43,9 %, respectivamente. Ao mesmo tempo, observa-se a ausência de atividade tripanossomicida de **16a** e **16b**, substâncias que apresentaram CI_{50} contra a cruzaina de 61,78 μM e 27,8 μM , respectivamente.

Figura 5.11 – Comparação entre atividade tripanossomicida e atividade inibitória frente à cruzaina



Entretanto, em alguns casos, observou-se uma boa correlação entre as atividades, como, por exemplo, para a substância **20b** que apresentou CI_{50} contra a cruzaina de 14,7 μM e CI_{50} contra o parasito de 67,7 μM . De forma similar, a substância **22** apresentou CI_{50} contra a cruzaina de 43,9 μM e CI_{50} contra o parasito de 135 μM . É possível que o mecanismo de ação antiparasitária destas substâncias seja a inibição da cruzaina. Neste

caso, a potência tripanossomicida *in vitro* de ambas sugere que esta série pode ser promissora em estudos adicionais.

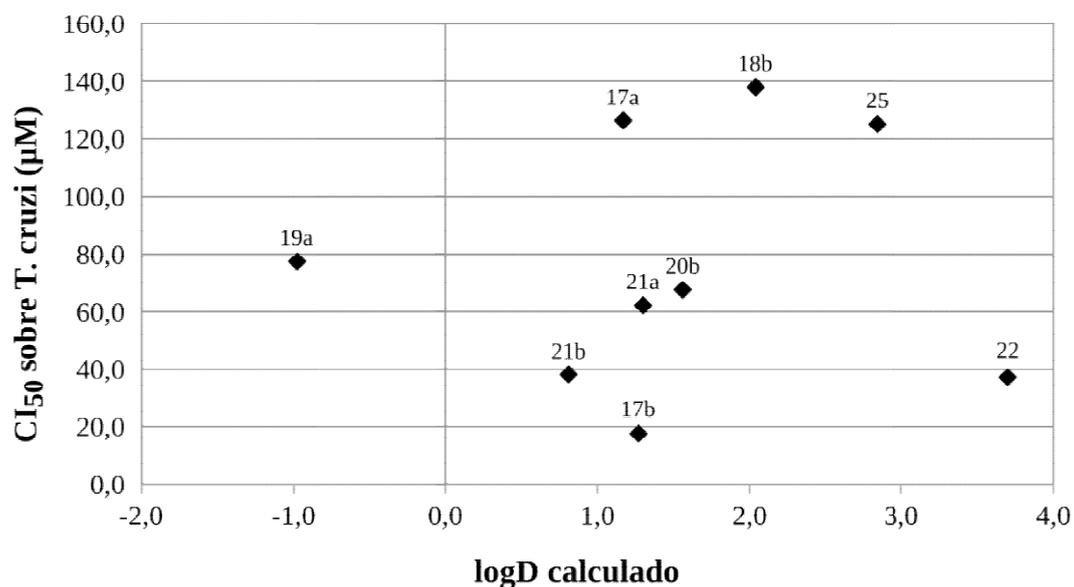
A substância **22** foi preparada e testada contra *T. cruzi* em estudo de Fonseca-Berzal e colaboradores (2014). No trabalho conduzido por esses autores foi observada atividade contra formas epimastigotas do parasito, com CI_{50} de 6,55 μ M, porém também foi observada citotoxicidade contra fibroblastos NCTC-929, com IS de 3,71. Os resultados relatados por Fonseca-Berzal e colaboradores são consistentes com os obtidos no presente trabalho (FONSECA-BERZAL *et al.*, 2014).

As formas amastigotas de *T. cruzi* são encontradas em lisossomos de células nucleadas, separadas de substâncias com potencial tripanossomicida presentes no meio de cultura por diversas barreiras biológicas. O coeficiente de partição n-octanol/água é frequentemente utilizado como uma medida da capacidade de uma substância de atravessar membranas biológicas (GIAGINIS; TSANTILI-KAKOULIDOU, 2008). O coeficiente de partição 1-octanol/água calculados para as substâncias preparadas neste trabalho, considerando meio aquoso tamponado em pH fisiológico, estão apresentadas na **Tabela 5.16**. Os cálculos foram executados utilizando a suíte Marvin, Marvin 5.9.21.0, 2015, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). Uma comparação entre estes coeficientes calculados e a atividade tripanossomicida está apresentada na **Figura 5.12**.

Tabela 5.16 – Valores de logD para cada uma das substância sintetizadas. logD calculados utilizando a suíte ChemAxon Marvin.

<i>Código</i>	<i>logD_{calc}</i>	<i>Código</i>	<i>logD_{calc}</i>
<i>16a</i>	1,28	<i>20a</i>	1,67
<i>16b</i>	1,34	<i>20b</i>	1,56
<i>17a</i>	1,17	<i>21a</i>	1,30
<i>17b</i>	1,27	<i>21b</i>	0,81
<i>18a</i>	1,98	<i>22</i>	3,70
<i>18b</i>	2,04	<i>23</i>	0,89
<i>19a</i>	-0,98	<i>24</i>	1,35
<i>19b</i>	-1,10	<i>25</i>	2,84

Figura 5.12 – Relação entre logD e atividade tripanossomicida. Valores de logD calculados utilizando a suíte ChemAxon Marvin



Observa-se que não há correlação entre o logD_{calc} e a atividade tripanossomicida para esta série. Tanto substâncias bastante hidrofílicas, como **19a** e **21b**, quanto as duas mais hidrofóbicas da série, **22** e **25**, apresentaram atividade contra *T. cruzi*.

Observa-se que a substância **22**, mais ativa contra a enzima rodesaína é também aquela que apresenta o maior $\log D_{\text{calc}}$, com valor de 3,70. Considerando o estabelecimento de uma infecção no SNC pelo *T. b. rhodesiense*, um protótipo com baixo peso molecular e possível penetração na BHC seria de interesse. Pajouhesh e Lenz (2005) propõe alguns critérios para uma substância atravessar a BHC em extensão apreciável. Dentre estes critérios estão uma massa molar menor do que 450 Da, ClogP menor do que cinco e a ausência de grupos ácidos (PAJOUHESH; LENZ, 2005). A substância **22** atende a estes critérios, de forma que é possível que esta substância apresente penetração na BHC.

5.6 Estudos de ancoragem molecular

5.6.1 Comparação das estruturas cristalográficas das enzimas cruzaina e rodesaína

Na **Figura 5.12** está ilustrada a sobreposição entre estruturas tridimensionais e os sítios ativos cristalográficos da cruzaina, estrutura PDB 3KKU, e rodesaína, estrutura PDB 2P86, após preparadas para os estudos de ancoragem molecular. Na **Tabela 5.17** estão apresentados dados relativos ao alinhamento da sequência e estrutural das mesmas estruturas cristalográficas. Observa-se na **Figura 5.12a** a grande similaridade da estrutura terciária entre as duas enzimas, incluindo o posicionamento e orientação da tríade catalítica. Na **Figura 5.12b** estão ressaltadas as duas principais diferenças de volume da região dos subsítios S1', S1, S2 e S3. Observa-se o efeito da mutação de Glu208 na cruzaina para Ala208 na rodesaína. Adicionalmente na posição 69 da rodesaína observa-se um resíduo de Asn e na cruzaina um resíduo de Asp, voltado para a fenda catalítica. Essas diferenças entre as duas enzimas resultam em um sítio ativo mais impedido para a cruzaina, com um subsítio S2 mais profundo e hidrofóbico. Ainda assim, pode-se dizer que, para ambas as enzimas, os sítios ativos são bastante expostos, especialmente os subsítios S1, S1' e S3. Na **Tabela 5.17** pode-se observar também uma grande similaridade e identidade da sequência e alinhamento excelente, com RMSD residual abaixo de 0,5 Å.

Figura 5.13 – (a) Sobreposição de estruturas cristalográficas da cruzaina (3KKU) e rodesaína (2P86), baseado em alinhamento dos carbonos alfa; (b) Mesmo alinhamento, ressaltando Glu208, Asn69 e Leu67 da estrutura cristalográfica da cruzaina em azul. Superfície da rodesaína em rosa. Resíduos Cys25, Leu67, Asn69 e Ala208 da rodesaína representados com carbonos em cinza. Figuras preparadas no PyMOL.

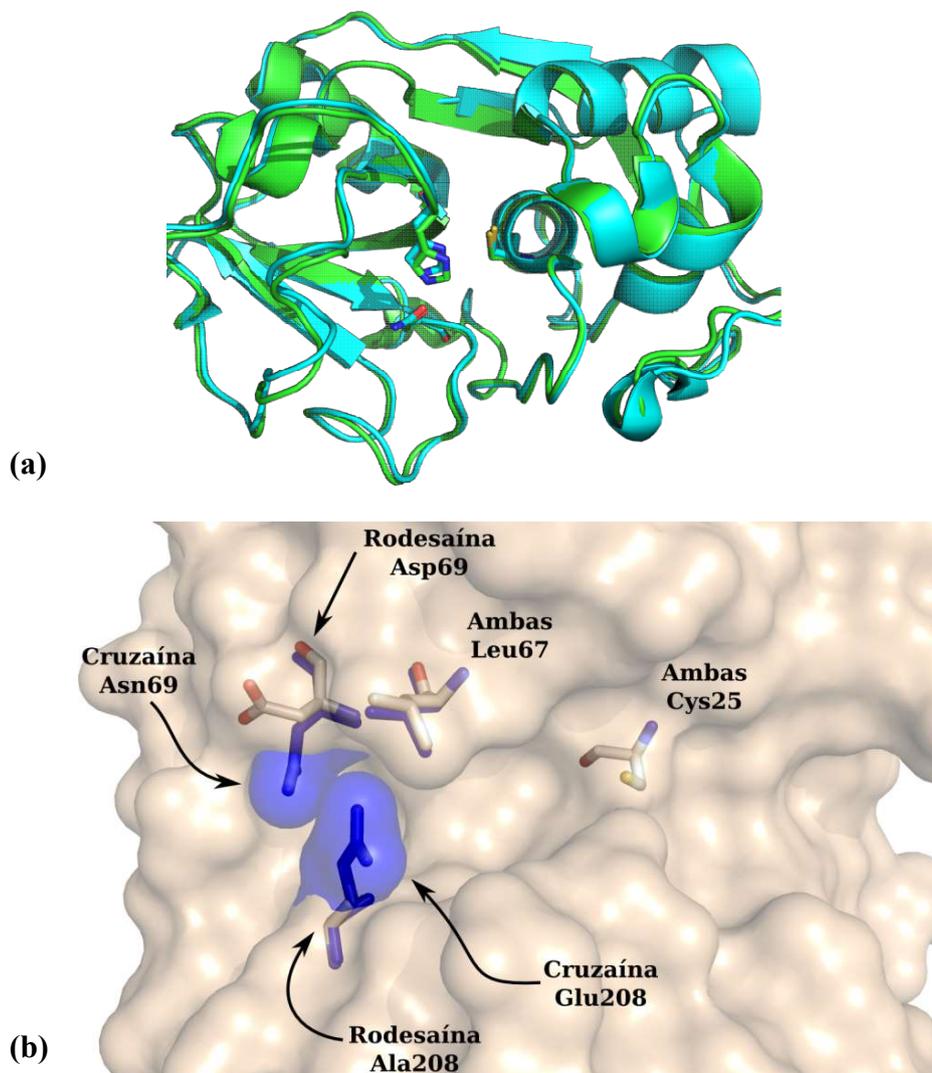
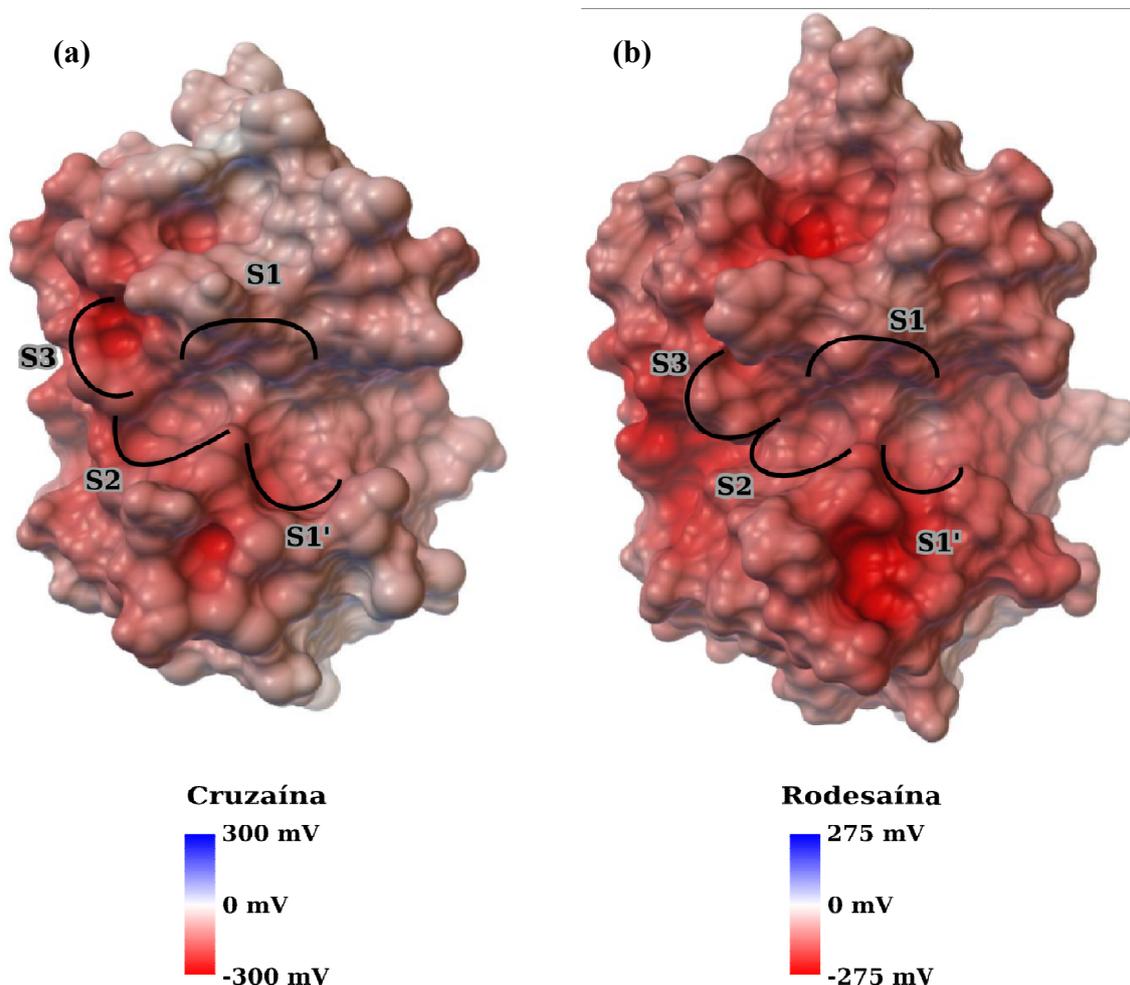


Tabela 5.17 – Dados estatísticos do alinhamento das estruturas cristaligráficas da cruzaina (estrutura 3KKU) e rodesaina (estrutura 2P86) utilizando os carbonos α . Alinhamento da sequência executado com algoritmo descrito por Smith e Waterman (SMITH; WATERMAN, 1981), matriz de pontuação BLOSUM80

<i>Dado</i>	<i>Valor</i>
Identidade da sequência	70,2 %
Similaridade da sequência	87,4 %
Pontuação BLOSUM80	846
<i>Root-mean square distance (RMSD)</i> após alinhamento estrutural	0,496

Adicionalmente, na **Figura 5.13** está representado o potencial eletrostático na superfície das enzimas cruzaina (**Figura 5.13a**) e rodesaina (**Figura 5.13b**). Verifica-se que existe uma densidade maior de carga negativa no subsítio S3 da cruzaina e no S1' da rodesaina, porém a tendência eletrostática é bastante similar. Em ambas as figuras está representado o resultado do cálculo de potencial eletrostático para as mesmas protonações utilizadas nos cálculos.

Figura 5.14 – Potencial eletrostático na superfície das enzimas cruzaina e rodesaina. Potencial eletrostático calculado utilizando o programa APBS (BAKER, N A *et al.*, 2001), figura preparada com a suíte AutoDockTools.



5.6.2 Resultados dos estudos de *redocking* utilizando as enzimas cruzaina e rodesaina e ancoragem do protótipo

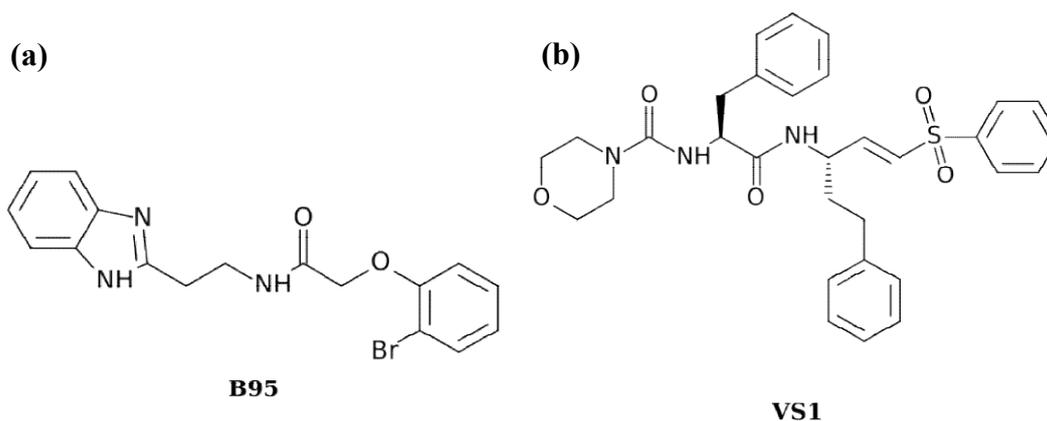
Estudos de *redocking* são comumente utilizados na literatura para aferir a capacidade de um programa de ancoragem molecular de prever poses de ligantes cristalográficos. Programas de ancoragem modernos são capazes de prever poses cristalográficas na maior parte dos alvos, com critérios de corte de 2 Å de RMSD sendo comumente empregados (LEACH; SHOICHET; PEISHOFF, 2006).

A estrutura cristalográfica da cruzaina 3KKU complexada ao ligante B95 (**Figura 5.15a**) apresenta uma particularidade: no trabalho de Ferreira e colaboradores, que depositou a estrutura cristalográfica, foram também realizados estudos de ancoragem

molecular. As poses de ancoragem obtidas foram muito diversas àquela determinada experimentalmente (FERREIRA *et al.*, 2010). Os estudos de redocking para este alvo dificilmente seriam capazes de encontrar poses próximas às cristalográficas.

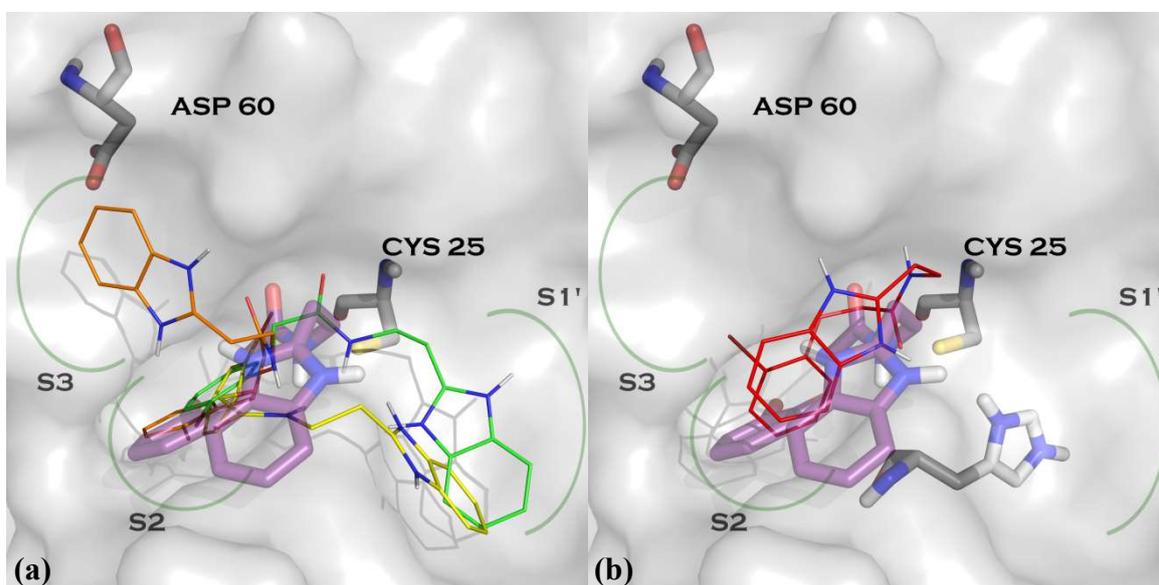
Na **Figura 5.15** estão representadas as estruturas químicas dos ligantes cristalográficos B95, cocrystalizado com a cruzaina, e VS1, cocrystalizado com a rodesaina.

Figura 5.15 – Ligantes cristalográficos da (a) estrutura 3KKU da cruzaina, **B95**, e (b) estrutura 2P86 da rodesaina, **VS1**



Na **Figura 5.16a** estão apresentadas as poses melhor pontuação de ancoragem e na **Figura 5.16b** a pose com menor RMSD em relação a estrutura cristalográfica, ambas para rodesaina. Observa-se que a previsão de posicionamento do grupo bromo-fenil interagindo com S2 foi reproduzida nas poses, entretanto o posicionamento do anel indol-pirimidínico não. O programa Autodock 4.2, assim como o programa Dock, utilizado no estudo de Ferreira e colaboradores (2010) não foi capaz de prever a pose cristalográfica. Observa-se, entretanto, que a pose de melhor pontuação relatada pelos autores daquele estudo é similar a pose B (estrutura representada com carbonos em amarelo na **Figura 5.16a**) e parcialmente similar a pose A (estrutura representada com carbonos em verde na **Figura 5.16a**). As poses A e B foram as mais bem pontuadas, com -7,64 e -6,96 respectivamente, e A representou 27% da população de poses. Isto é um indício que os programas de ancoragem utilizados neste estudo e por Ferreira e colaboradores (2010) apresentam limitação similares. Observa-se, também, que na pose C (estrutura representada com carbonos em laranja na **Figura 5.16a**) o núcleo benzimidazólico foi predito no bolsão S3.

Figura 5.16 – (a) Sobreposição da estrutura cristalográfica do ligante B95, com carbonos em roxo, e das poses com melhor pontuação de ancoragem; pose A com carbonos em verde, pose B com carbonos em amarelo e pose C com carbonos em laranja. (b) Sobreposição da estrutura cristalográfica do ligante B95, em com carbonos em roxo, e da pose D, com menor RMSD em relação à estrutura cristalográfica, com carbonos em vermelho.



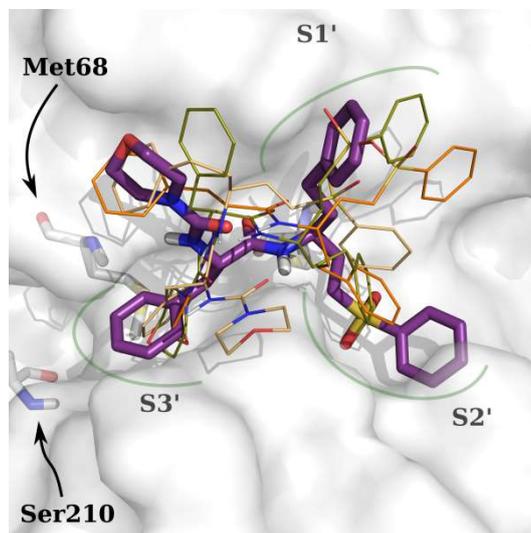
Na **Tabela 5.18** está apresentada a decomposição da pontuação de ancoragem da pose A (estrutura representada com carbonos em verde na **Figura 5.15a**) e da pose D (**Figura 5.15b**). Observa-se que a diferença de energia se deve, majoritariamente, a predição menos favorável de interações de hidrogênio, van der Waals e entalpia de desolvatação. Isto sugere que, assim como verificado no estudo de Ferreira e colaboradores (2010), a amostragem conformacional foi capaz de localizar mínimos próximos à estrutura experimental, porém a função de pontuação que descreve a interação ligante-receptor não foi capaz de ordenar corretamente as poses.

Tabela 5.18 – Decomposição da energia livre de ligação predita para a pose A, com melhor pontuação de ancoragem, e pose D, com RMSD mais próximo ao ligante cristalográfico

<i>Termo</i>	<i>Valor para pose A</i>	<i>Valor para pose D</i>
<i>Van der Waals + interações de hidrogênio + dessolvatação</i>	-8,57	-6,55
<i>Energia eletrostática</i>	-0,86	-0,75
<i>Energia interna total</i>	-1,14	-2,31
<i>Energia livre torsional</i>	+1,79	+1,79
<i>Energia do ligante livre</i>	+1,14	+2,31
<i>Total</i>	-7,64	-5,51

Na **Figura 5.17** estão apresentadas as poses mais representativas em relação a estrutura cristalográfica obtidas na ancoragem na rodesaína. Verifica-se que as poses captam de forma superficial a tendência de interação das cadeias laterais do ligante com os bolsões da protease, entretanto não há previsão correta das interações com cada subsítio. Uma das limitações do *redocking* de VS1 é a natureza covalente da ligação formada pelo ataque de Cys25 ao carbono eletrofilico do ligante. O programa Autodock 4.2 não é capaz de executar ancoragem covalente, o que pode ajudar a racionalizar os resultados ruins para este ligante. Adicionalmente, o aumento da liberdade conformacional do ligante aumenta exponencialmente o problema da amostragem. Em certo grau de complexidade a população e número de gerações utilizadas no algoritmo genético não são capazes de amostrar bem o espaço conformacional em cada corrida. Assim, o número de grupos aumenta. A abundância de mínimos dissimilares obtidos no *redocking* de VS1 sugere que esta substância é excessivamente flexível para ser estudada por este conjunto de programa e método.

Figura 5.17 – Poses mais representativas obtidas no estudo de *redocking* da rodesaína, estrutura 2P86. Ligante cristalográfico **VS1** representado em roxo, três poses obtidas representadas em laranja, verde e amarelo. Oxigênios em vermelho, nitrogênios e azul e hidrogênios polares em branco.

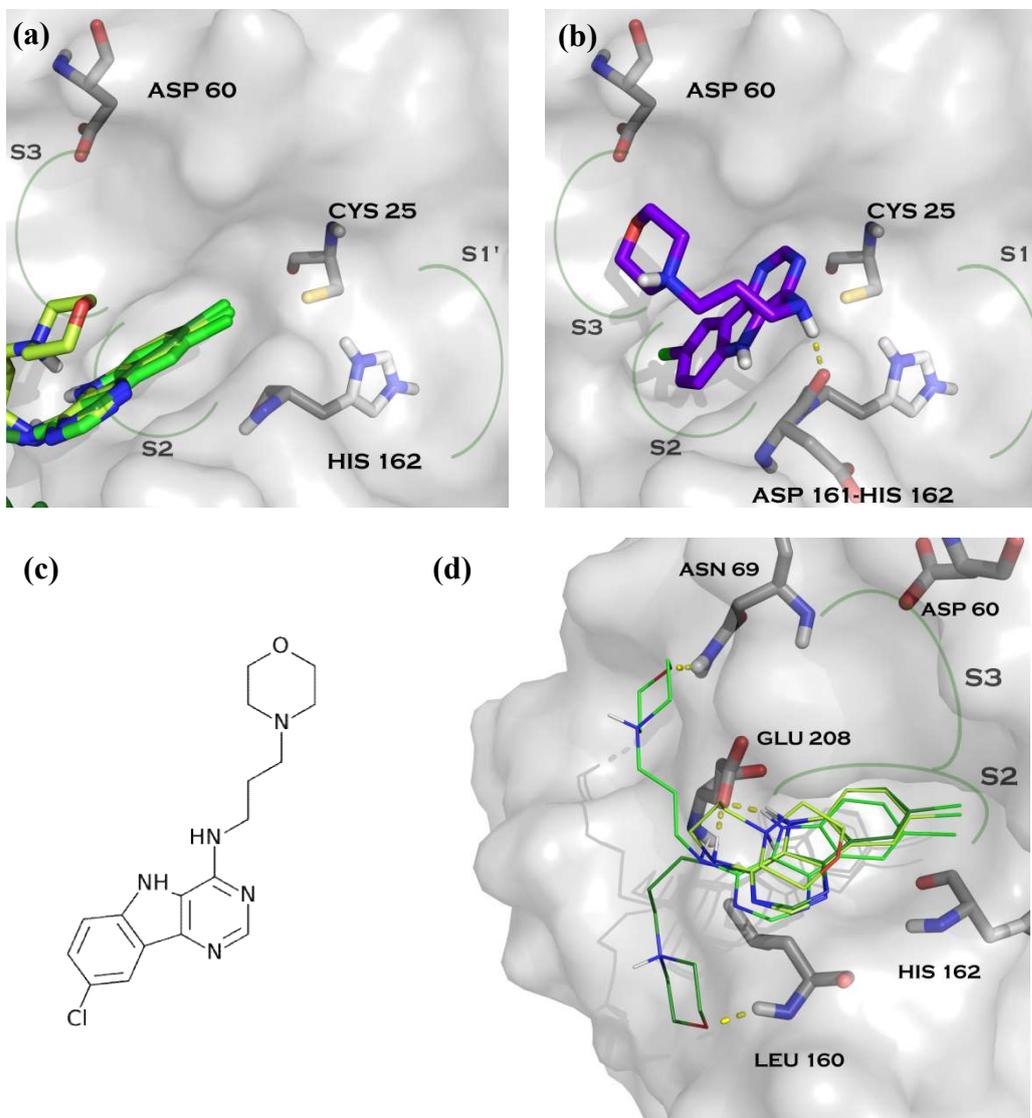


É importante observar que as substâncias preparadas neste trabalho foram modeladas com até cinco ligações rotacionáveis, apresentando um problema mais simples para o programa de ancoragem molecular.

Mesmo com os resultados limitados do *redocking* das estruturas cristalográficas 3KKU e 2P86 acredita-se que, devido às diferenças importantes das estruturas dos ligantes cristalográficos e daqueles preparados neste estudo, as poses de ancoragem molecular podem ser ferramenta útil para entender possíveis modos de ligação.

Nas **Figuras 5.18a** e **5.18b** estão representados os dois grupos de pose mais representativos para a ancoragem do protótipo empregado neste estudo, a Indolpirimidina **15**, cuja estrutura química está representada na **Figura 5.18c**.

Figura 5.18 - Principais poses de ancoragem da indolpirimidina **15**: (a) poses do grupo A, com carbonos em diferentes tons de verde; (b) pose B, com carbonos em roxo e contatos polares ; (c) poses do grupo A, vista em ângulo, ressaltando interações polares. (d) Estrutura química da indolpirimidina **15**.



Observa-se que nestas das poses o núcleo indolpirimidínico foi predito interagindo com S2 e as cadeias laterais com S4 na **Figura 5.18a** e S1' na **Figura 5.18b**. Analisando as interações em cada pose, podemos observar que a poses do grupo A são estabilizadas por possíveis interações de hidrogênio no núcleo indolpirimidínico com Glu208, em destaque na **Figura 5.18d**, enquanto a pose B é estabilizada por uma possível interação com Asp161 (**Figura 5.18b**). Nas poses do grupo A, em destaque na **Figura 5.18d**, observa-se três possíveis posicionamentos da cadeia lateral com mínima variação do núcleo indolpirimidínico (RMSD de 0,001 Å). Nas possibilidades de posicionamento

representadas com carbonos em verde escuro e verde médio na **Figura 5.18d**, possíveis interações de hidrogênio entre o oxigênio da morfolina e os resíduos Leu160 e Asn69 podem estabilizar a interação. Em ambos os grupos de poses A e B predição do núcleo indolpirimidínico em S2 é consistente com observações experimentais da presença de grupos hidrofóbicos neste subsítio, inclusive na estrutura cristalográfica de referência, 3KKU.

5.6.3 Resultados de ancoragem molecular utilizando a enzima cruzaina

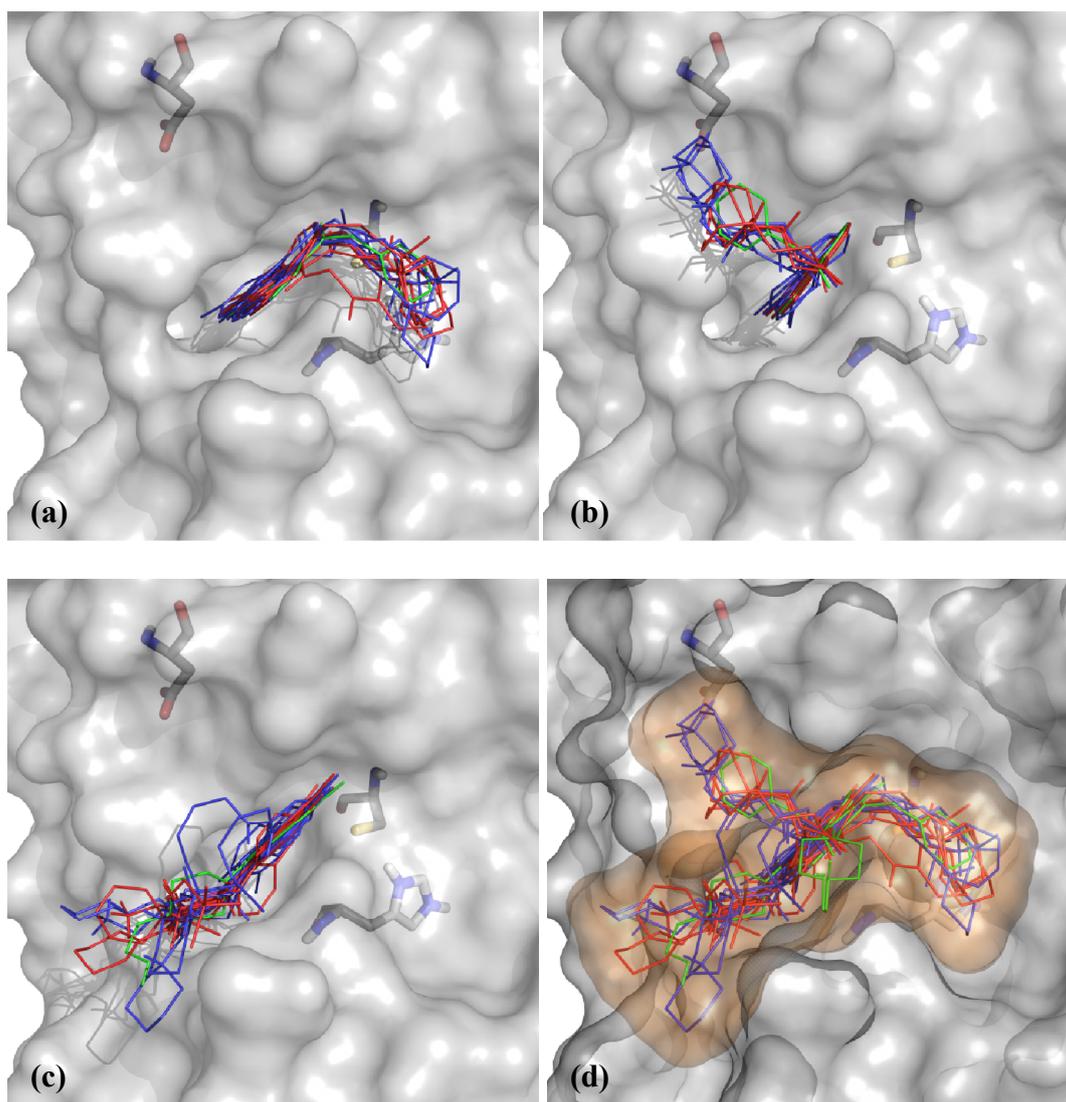
A principal limitação dos programas que realizam cálculos de ancoragem molecular é a função de pontuação. Esta função é constituída por um conjunto de equações matemáticas que relacionam a posição dos átomos com a afinidade relativa da substância pelo alvo. Em geral a magnitude da pontuação da ancoragem ou o ordenamento dos ligantes não pode ser utilizada como critério discricional para atividade (HUANG, N.; SHOICHET; IRWIN, 2006). Tal limitação é derivada das aproximações necessárias para tornar os estudos de ancoragem acessíveis computacionalmente.

Várias simplificações são utilizadas em cálculos de ancoragem molecular. A utilização de um modelo de solvente implícito simplifica a influência das moléculas de água e não simula orientação, formação de *clusters* de água e polarização do solvente. Neste modelo a energia de dessolvatação é aproximada por um termo matemático muito simples (MORRIS *et al.*, 1998). A ancoragem em receptor rígido descarta qualquer efeito da flexibilidade dos resíduos da proteína. Finalmente a ausência de amostragem de microestados impede que a entropia seja considerada de forma completa no cálculo. O conjunto de aproximações empregadas em um cálculo de ancoragem molecular, portanto, a capacidade da função de pontuação refletir tendências experimentais de afinidade.

Neste sentido, a análise realizada neste trabalho sobre afinidades preditas pelos cálculos de ancoragem é limitada. A maior parte da discussão está focada nas poses preditas pelo Autodock 4.2, nas possíveis interações de hidrogênio e eletrostáticas entre ligante e proteína e na correlação destes com a afinidade experimental.

Na **Figura 5.19** está ilustrada a superposição das poses com maior afinidade predita em cada um dos grupos obtidos pelo agrupamento de poses do cálculo de ancoragem.

Figura 5.19 – Sobreposição de todas as poses representativas para todas as substâncias sintetizadas ancoradas à enzima cruzaina. Os ligantes com três carbonos na cadeia lateral aparecem em azul, aqueles com dois carbonos em vermelho e **22** e **24** em verde. (a) poses nas quais a cadeia lateral interage com S1 e S1'. (b) poses nas quais a cadeia lateral interage com S3. (c) poses nas quais a cadeia lateral interage com a borda de S2, sobre Glu208). (d) todas as poses calculadas, em evidência a região da superfície da cruzaina explorada pelas substâncias ancoradas.

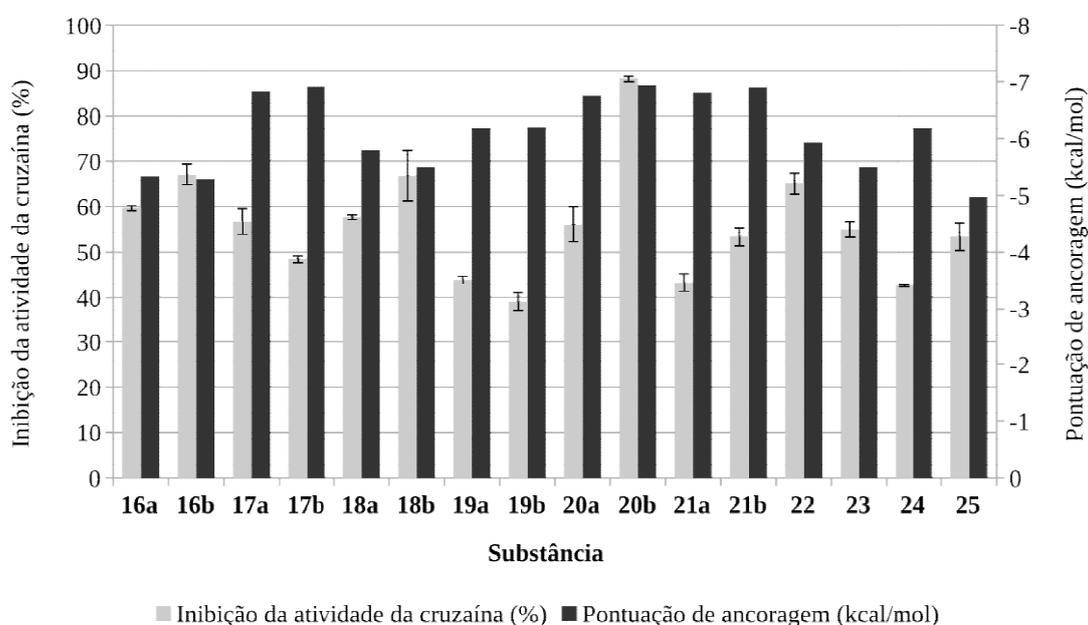


Observa-se que existe uma forte tendência à predição do núcleo quinolínico posicionado no bolsão S2, consistente com a possibilidade deste subsítio acomodar grupos apolares, como Phe. Comparativamente, na estrutura cristalográfica 3KKU um grupo bromofenil ocupa S2.

Na análise das poses de melhor pontuação de ancoragem observa-se uma tendência à predição das cadeias laterais no substítio S1'; ou voltadas para fora de S2. No primeiro caso estão as substâncias **16b**, **20b**, **21a**, **21b**, **22**, **23** - das quais **16b**, **20b**, **22** foram as mais ativas da série. Esta previsão de posicionamento não parece estar ligada à interações de hidrogênio, já que, dentre as estruturas citadas, somente para **16b** e **23** apresentam grupos na cadeia lateral capazes de fazer interações de hidrogênio. Nas outras estruturas a cadeia lateral ocupa a borda de S2, próximo a Glu208. Dentre as substâncias citadas, **17a**, **17b**, **18a** e **18b** têm a possibilidade prevista de fazer uma interação de hidrogênio com Leu160.

Na **Figura 5.20** estão relacionados os valores preditos de afinidade para a pose de melhor pontuação com a atividade experimental das substâncias (**Tabela 5.11**). Pode-se observar que a função de pontuação do AutoDock 4.2 não foi capaz de reproduzir a tendência experimental observada, classificando mal quatro dos cinco compostos mais ativos. Este não é um resultado inesperado considerando a similaridade estrutural da série e a atividade moderada da maior parte das substâncias. O problema apresentado é um desafio para funções de pontuação.

Figura 5.20 – Relação entre atividade das substâncias sintetizadas e sua pontuação de ancoragem para a cruzaina. Barras de erro indicam o desvio padrão dos ensaios

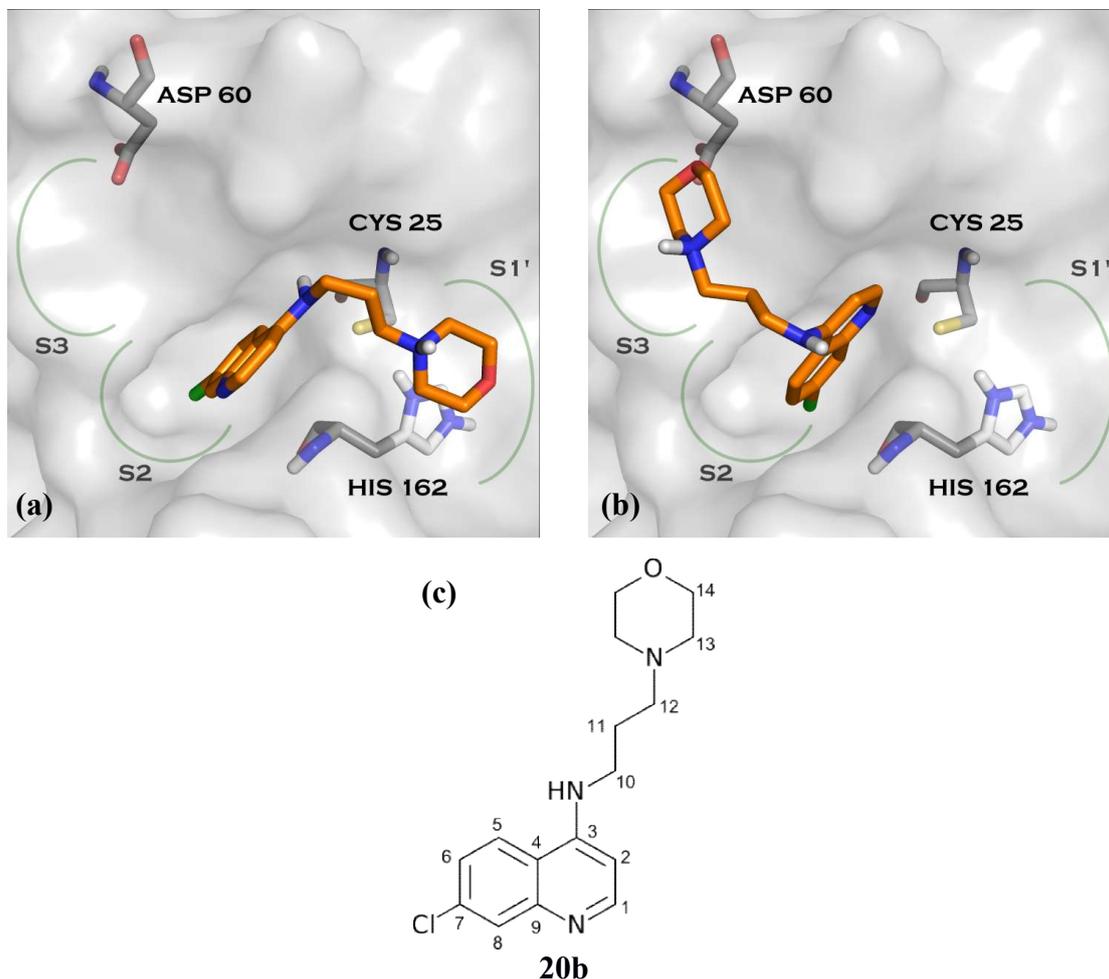


Além de uma análise global das poses, algumas estruturas foram analisadas em maior

detalhe, na perspectiva de explicar as tendências observadas na relação estrutura atividade e na seletividade das substâncias.

A substância mais potente, **20b**, apresenta dois principais grupos de poses: a Pose 1 (**Figura 5.21a**) com pontuação de -6,60 kcal/mol e a Pose 2 (**Figura 5.21b**) com pontuação de -6,34 kcal/mol. Observa-se que as pontuações de ambas as poses são muito similares. A Pose 1 representa o núcleo quinolínico ancorado no bolsão S2, com a cadeia lateral sobre S1'. Para esta pose o programa auxiliar AutoDockTools não propõe contatos polares específicos. A distância calculada entre o enxofre desprotonado de Cys25 e o hidrogênio da amina aromática foi de 3,2 Å, sugerindo a possibilidade de haver uma interação entre ambos. No segundo modo de ligação proposto, Pose 2, (**Figura 5.21b**) o núcleo quinolínico está novamente posicionado em S2, porém a cadeia lateral foi predita estendida sobre S3.

Figura 5.21 – Representação dos dois grupos de poses de menor energia da molécula **20b** ancorada na cruzaina: (a) cadeia lateral de **20b** interagindo com S1'; (b) cadeia lateral de **20b** interagindo com S3. Figuras preparada no PyMOL; (c) estrutura química de **20b**



Na **Figura 5.22** está representada uma sobreposição alinhada das estruturas cristalográficas depositadas no RSCB Protein Data Bank sob os códigos 1EWP (GILLMOR, S. A., 1998) e 1F29 (BRINEN *et al.*, 2000) com a estrutura utilizada para os estudos de ancoragem 3KKU. Estes ligantes cristalográficos, assim como a substância **20b** sintetizada, apresentam um anel morfolínico em sua estrutura. Destaca-se que, em ambos os ligantes cristalográficos, a morfolina está ligada a um grupo ureia, modificando a basicidade do nitrogênio do anel. Os ligantes de 1EWP e 1F29 estão apresentados em destaque, evidenciando sua similaridade com a pose de ancoragem do composto **20b**. Na **Figura 5.23** está representada a estrutura química dos ligantes de 1EWP e 1F29.

Figura 5.22 – Pose de ancoragem de **20b** sobreposto às duas estruturas cristalográficas de inibidores contendo um anel morfolínico. A substância **20b** está representada com carbonos em verde e hidrogênios polares em branco. O ligante da estrutura depositada no PDB sob código 1EWP está representada com carbonos em azul claro. O ligante da estrutura depositada no PDB sob código 1F29 está representada com carbonos em bonina. Átomos de oxigênio estão representados em vermelho, átomos de nitrogênio em azul escuro e átomos de enxofre em amarelo. O alinhamento estrutural foi feito exclusivamente com os carbonos alfa da proteína. Figura preparada no PyMOL.

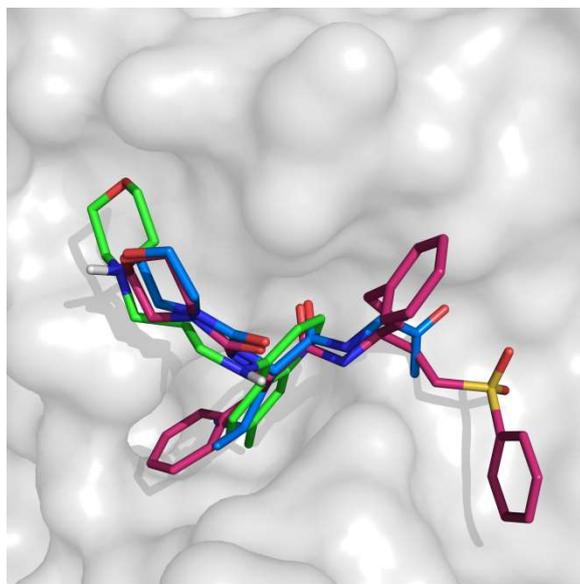
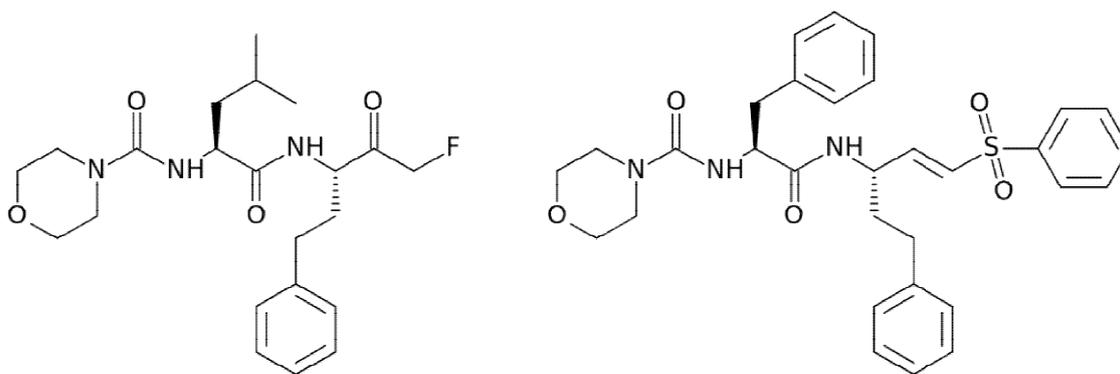


Figura 5.23 – Estrutura química das substâncias **015**, cocrystalizada com a cruzaina na estrutura 1EWP, e **VS1**, cocrystalizada com a cruzaina na estrutura 1F29.



015

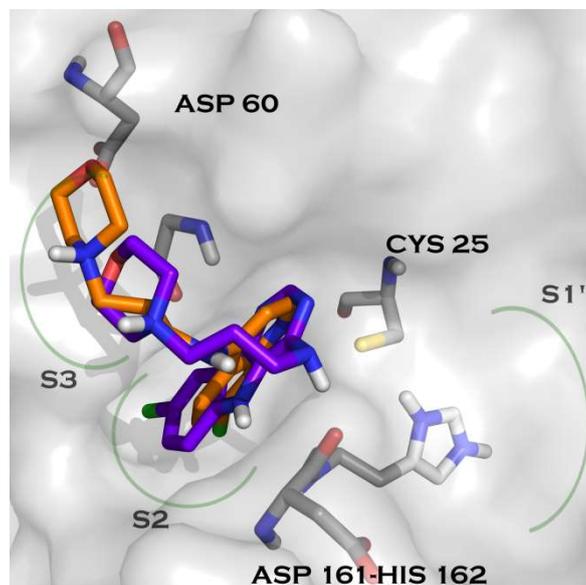
Ligante da estrutura 1EWP

VS1

Ligante da estrutura 1F29

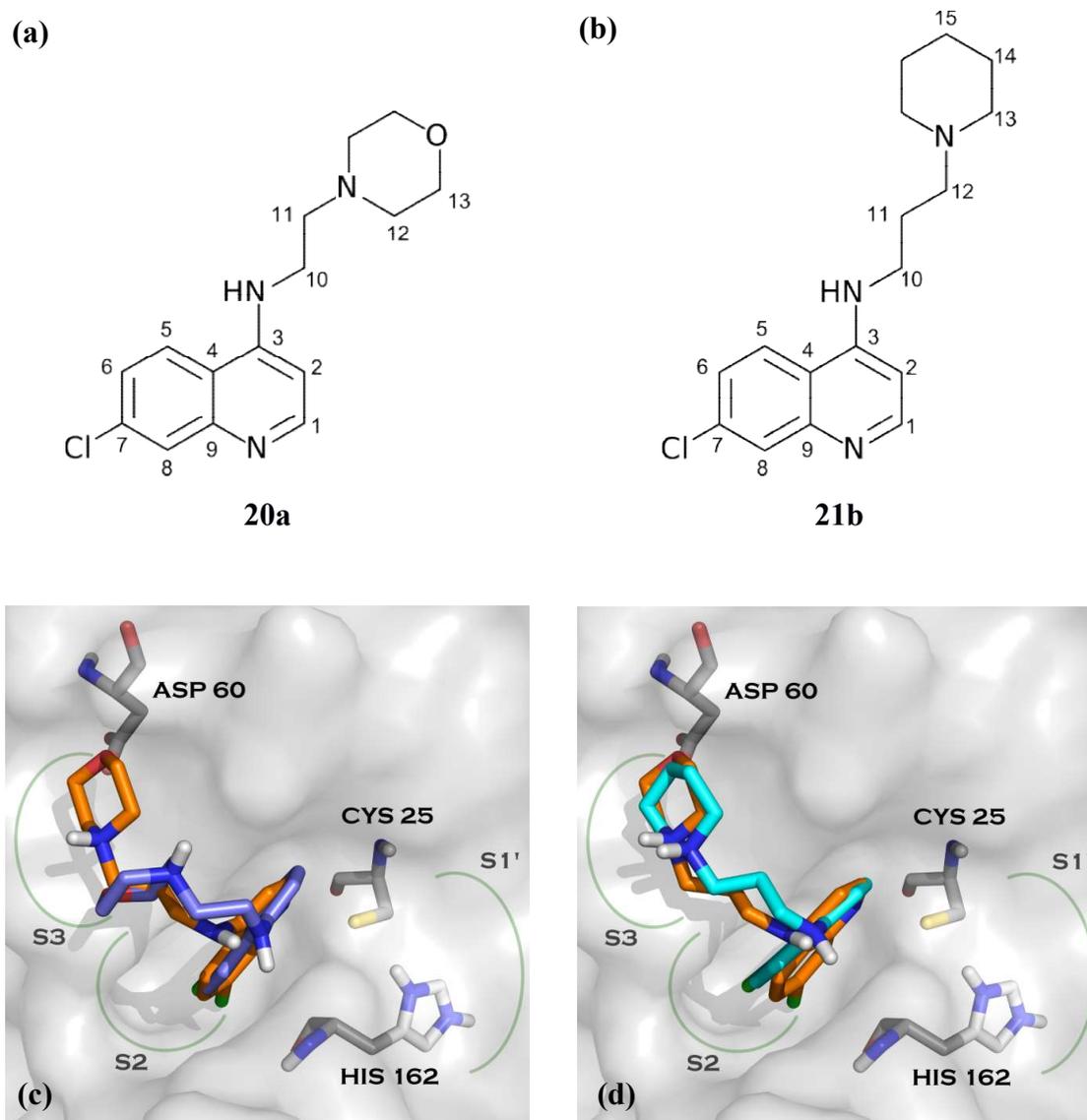
Na **Figura 5.24** são comparadas as poses de ancoragem obtidas para a estrutura protótipo do estudo, a indolpirimidina **15**, e a substância **20b**. Observa-se similaridade dos posicionamentos, com as cadeias laterais ocupando S3 e a região aromática S2.

Figura 5.24 – Sobreposição das poses de acoragem de **20b**, com carbonos em laranja, e da indolpirimidina **15**, com carbonos em roxo. Nitrogênios estão representados em azul, oxigênios em vermelho e hidrogênios polares em branco.



Uma das poses previstas para **20a** (**Figura 5.25a**) sugere uma racionalização para a diferença entre a atividade observada para **20b** (**Figura 5.21c**) e **20a**, de 88,2 % e 56,1 % de inibição da cruzaina a 100 μM , respectivamente. O anel morfolínico em **20b** pode ocupar uma posição mais afastada em S3, enquanto a cadeia lateral de **20a** não é longa o suficiente para permitir que o grupo morfolínico ocupe esta mesma região (**Figura 5.25c**). Relacionando a mesma pose de **20b** com pose semelhante de **21b** (**Figura 5.25b**), verifica-se que os anéis morfolínico e piperidínico foram previstos em posição muito similar (**Figura 5.25d**). A substância **21b** apresentou inibição de 53,4 % a 100 μM . É possível que o oxigênio de **20b** realize interações de hidrogênio, reduzindo a energia livre do complexo, o que pode explicar a atividade maior desta substância.

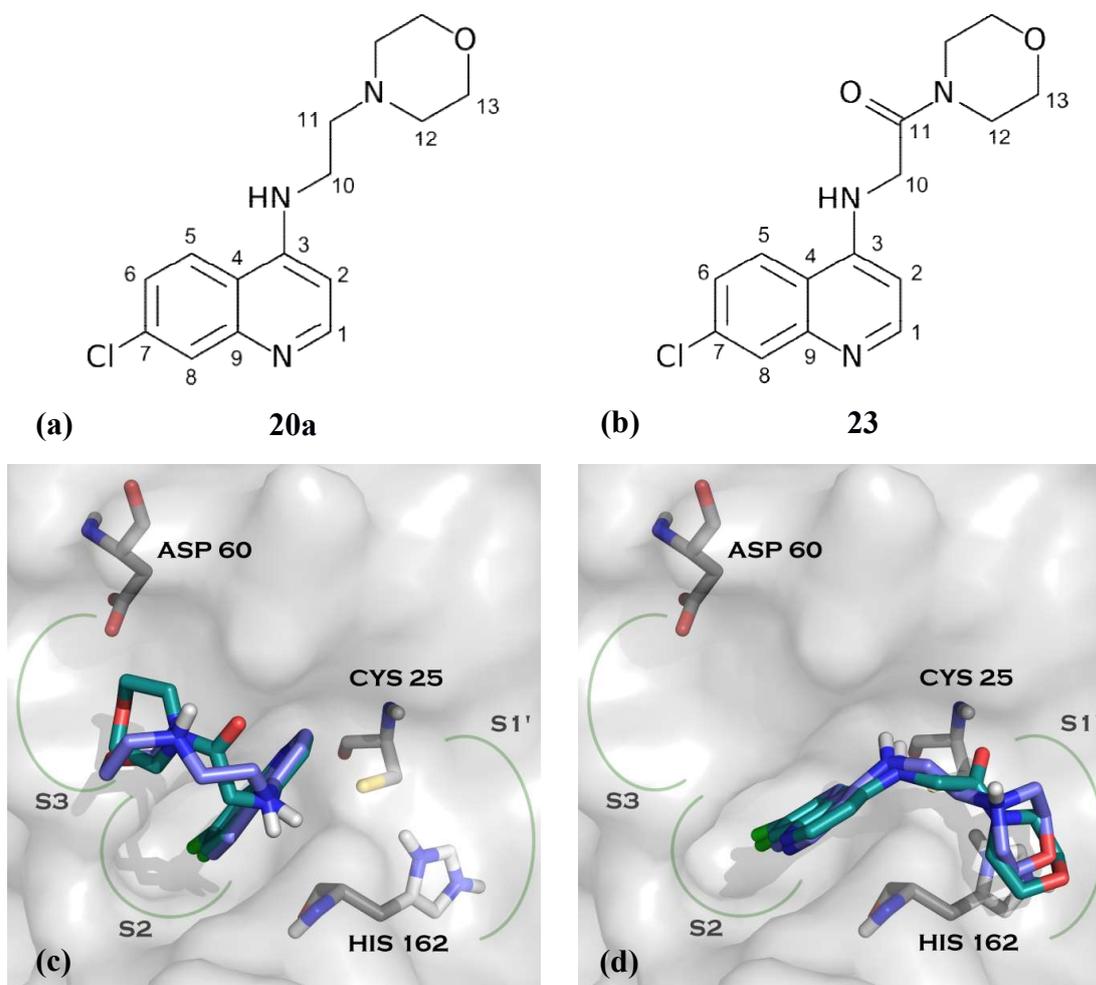
Figura 5.25 – (a) Estrutura química de **20a**; (b) Estrutura química de **21b**; sobreposição das poses de ancoragem na cruzaína nas quais a cadeia lateral ocupa S3 para as substâncias **20b** e (c) **20a** e (d) **21b**. A substância **20b** está representada com carbonos em laranja, a substância **20a** com carbonos em roxo e a substância **21b** com carbonos em ciano. Nitrogênios estão representados em azul, oxigênios em vermelho, cloro em verde e hidrogênios polares em branco. Figuras preparadas com PyMOL



A conservação relativa da atividade pela mudança da amina terciária em **20a** (**Figura 5.26a**) para amida terciária em **23** (**Figura 5.26b**) também pode ser relacionada às poses de ancoragem destas estruturas (**Figura 5.26c** e **Figura 5.25d**). As substâncias **20a** e **23** apresentaram inibição à 100 μM contra a cruzaína de 56,1% e 55,0%, respectivamente. O anel morfolínico foi previsto em posição muito similar em ambas as poses, que são, como um todo, muito próximas. O nitrogênio da amida em **23** é pouco básico e provavelmente não estará protonado na condição de ensaio, por outro lado o nitrogênio da

amina em **20a** provavelmente estará protonado. É possível que a região que o nitrogênio do anel morfolínico ocupa em ambas as poses faça com que a modificação da carga entre as duas estruturas tenha pouco efeito na afinidade. Ou seja, o modo de ligação de ambas as moléculas pode ser similar, mesmo com a mudança estrutural introduzida.

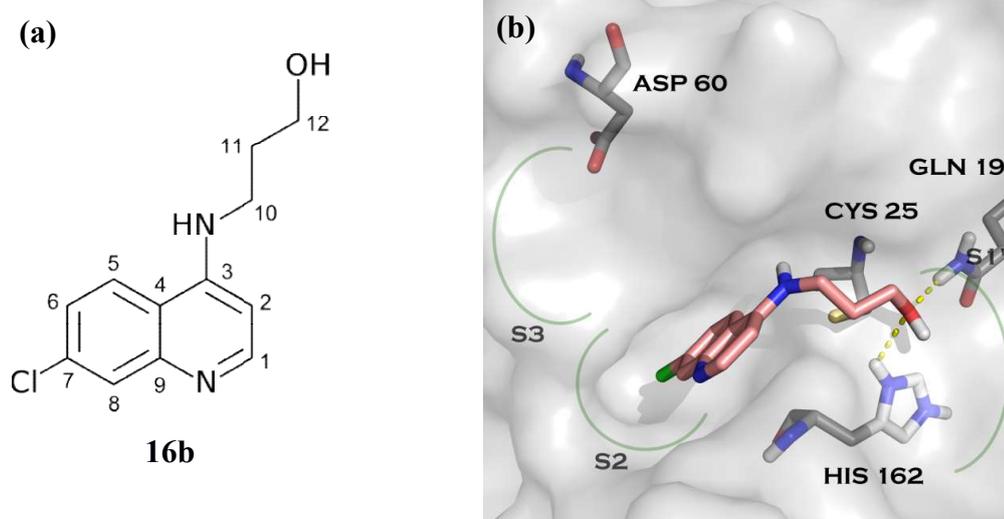
Figura 5.26 – (a) Estrutura química da substância **20a**; (b) Estrutura química da substância **23**; sobreposição de poses das moléculas **20a** (carbonos em roxo) e **23** (carbonos em verde) ancoradas na cruzaina, nas quais as cadeias laterais exploram (c) S3 e (d) S1'. Átomos de oxigênio estão representados em vermelho, nitrogênios em azul, e hidrogênios polares em branco. Figuras (c) e (d) preparadas com PyMOL.



Parte das tendências de atividade experimental não puderam ser completamente relacionadas com os resultados de ancoragem. Na **Figura 5.27b** está apresentada a única pose predita para o composto **16b** (**Figura 5.27a**), que apresentou CI_{50} de 17,1 μ M contra a cruzaina. Observa-se que existe a possibilidade de duas interações de hidrogênio da hidroxila da cadeia com os resíduos His162 e Gln19 da superfície da

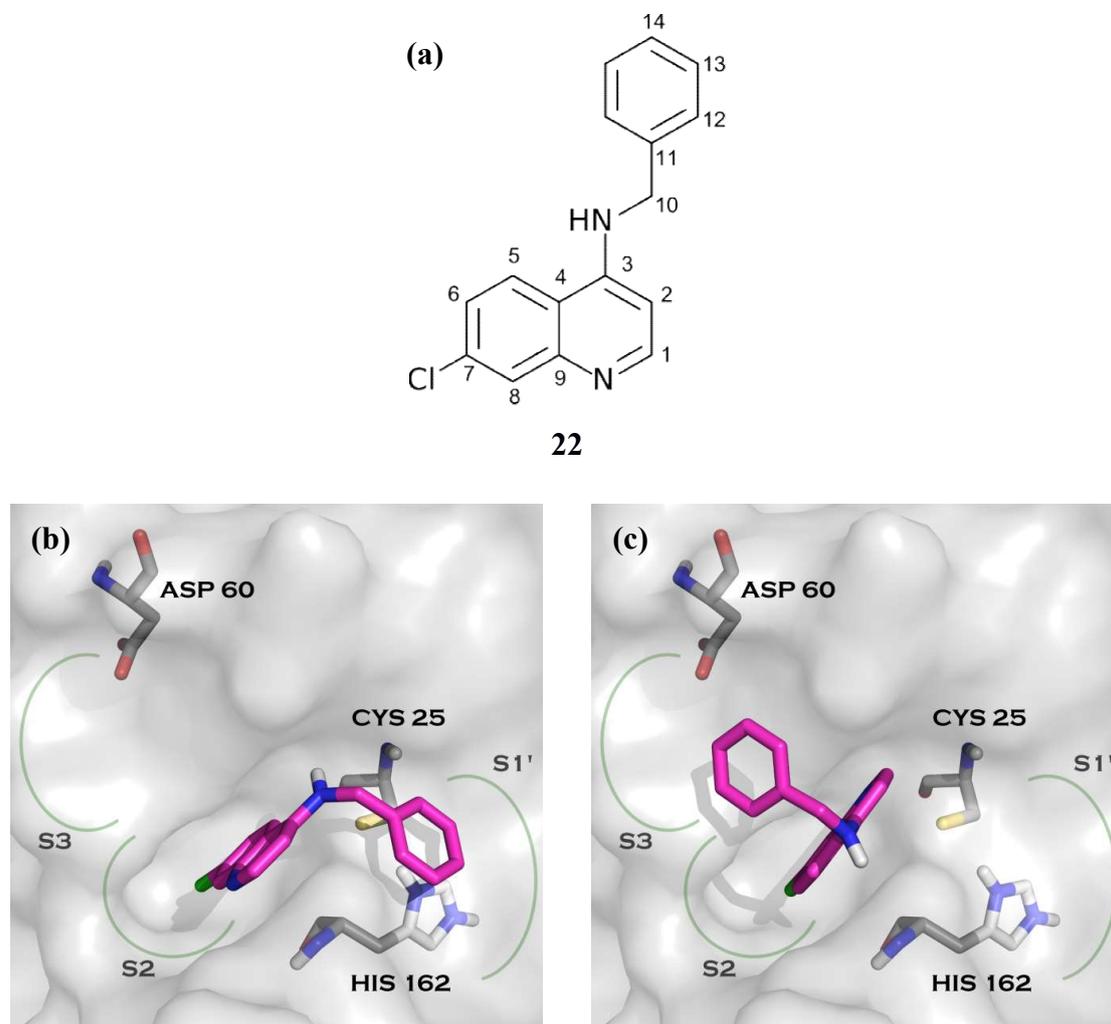
proteína. Entretanto, mais estudos, como, por exemplo, estudos de dinâmica molecular ou a cocristalização da cruzaina com a substância **16b**, são necessários para avaliar a confiabilidade destas poses.

Figura 5.27 – (a) Estrutura química da substância **16b**; (a) Única pose de ancoragem prevista para **16b** na enzima cruzaina. Carbonos de **16b** estão representados em rosa e carbonos das cadeias laterais da proteína em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e hidrogênios polares em branco. Em destaque duas possíveis interações de hidrogênio intermoleculares.



As poses previstas para **22** (**Figura 5.28a**) estão representadas na **Figura 5.28**. Observa-se que o anel quinolínico foi previsto interagindo com subsítio S2 e o grupo benzilamino posicionado em S1' (**Figura 5.28b**) ou S3 (**Figura 5.28c**). A complementariedade da estrutura da substância **22** em relação à superfície do sítio pode ser parte da racionalização da atividade desta substância, que apresentou CI_{50} contra a cruzaina de 35,4 μM .

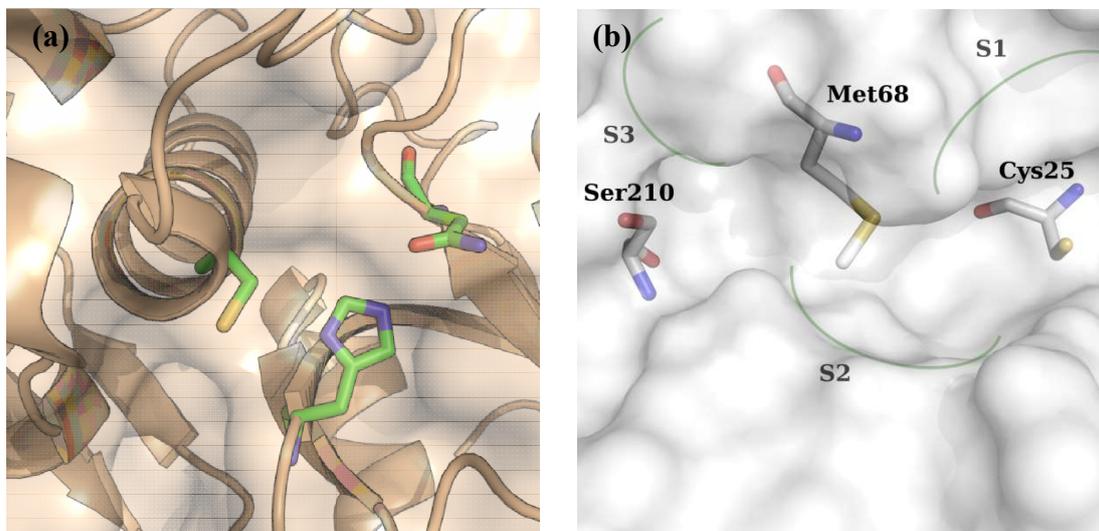
Figura 5.28 – (a) Estrutura química da substância **22**; poses de melhor pontuação de ancoragem para **22** na cruzaína, nas quais se observa o grupo benzilamina posicionado em (b) S1' ou (c) S3. Carbonos de **22** estão representados em rosa, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e hidrogênios polares em branco.



5.6.4 Resultados de ancoragem molecular utilizando a enzima rodesaína

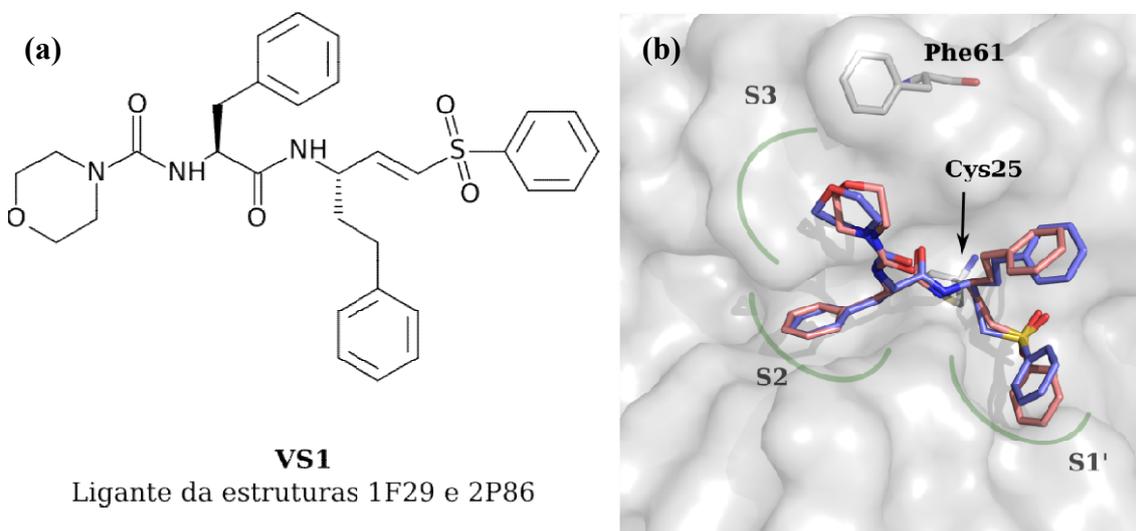
Na **Figura 5.29** está representado o sítio ativo da rodesaína, com a tríade catalítica em destaque. Na **Figura 5.29b** os subsítios visíveis estão assinalados. A exemplo da cruzaína, o sítio ativo desta enzima também é muito exposto, com o bolsão S2 ainda mais acessível ao solvente.

Figura 5.29 – (a) Sítio ativo da rodesaína com triade catalítica em destaque; (b) Sítio ativo com subsítios assinalados. Modelo gerado baseado na estrutura cristalográfica depositada no RSCB PDB sob código 2P86.



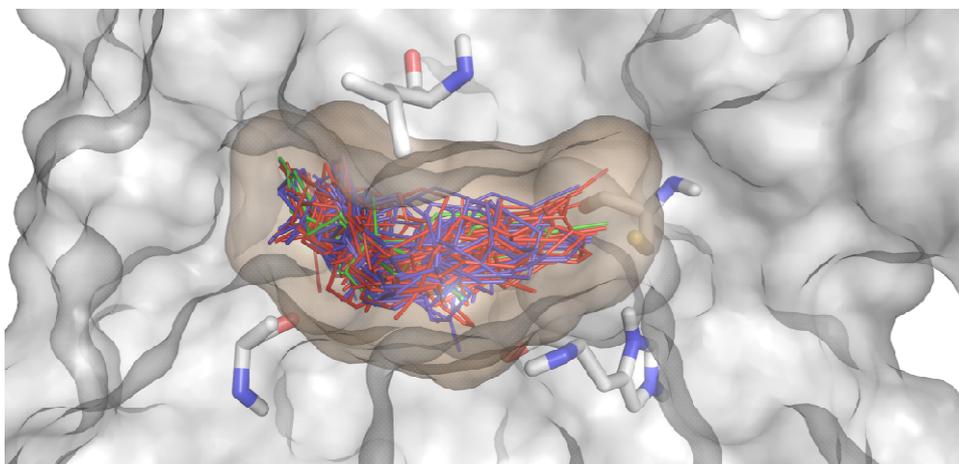
O ligante (**Figura 5.30a**) cocrystalizado com a estrutura da rodesaína utilizada neste trabalho também foi cocrystalizado com a cruzaina na estrutura depositada no PDB sob código 1F29 (BRINEN *et al.*, 2000). Em ambas as estruturas cristalográficas o ligante ocupa posição similar (**Figura 5.30b**). Observa-se que na estrutura 1F29 um grupo hidrofóbico benzil ocupa S2 e Glu208 está voltado para o solvente.

Figura 5.30 – (a) Vinilsulfona **VS1**, cocrystalizada com a cruzaina (1F29) e rodesaína (2p86); (b) Sobreposição das estruturas cristalográficas 1F29 e 1EWP ressaltando similaridade a posição do ligante. Superfície da rodesaína em cinza. Carbonos do ligante da estrutura 1F29 em salmão, carbonos do ligante da estrutura 1EWP em roxo, carbonos de resíduos da rodesaína em cinza. Oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, enxofres em amarelo.



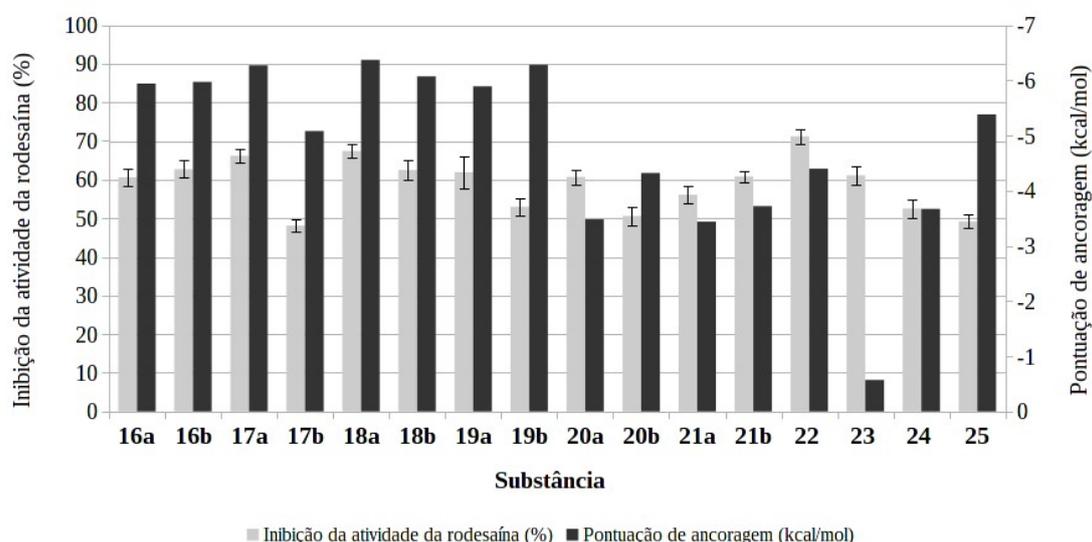
Na **Figura 5.31** está apresentada a sobreposição da pose de melhor pontuação para cada grupo de poses para todos os ligantes. Pode-se observar que todas as poses previstas estão posicionadas no subsítio S2, com variação principalmente em relação à orientação do ligante. Ancoragens no S1' e o S3 não foram previstas como estáveis, diferente daquilo observado para cruzaina.

Figura 5.31 – Sobreposição das poses representativas para todos os ligantes ancorados na rodesaína, após verificação manual. Figura preparada com PyMOL.



Na **Figura 5.32** estão relacionados os valores preditos de afinidade com a atividade experimental das substâncias (ver também **Tabela 5.11**). A combinação de previsão de poses próximas de ancoragem e a atividade experimental similar das substâncias sugere que dificilmente a função de pontuação do AutoDock seria capaz de diferir as substâncias mais e menos ativos. Destaque para a pontuação muito dissimilar de **23** em relação às outras substâncias e a má pontuação do ligante mais ativo **22**.

Figura 5.32 – Relação entre atividade das substâncias sintetizados e sua pontuação de ancoragem para a rodesaína. Barras de erro indicam o desvio padrão dos ensaios

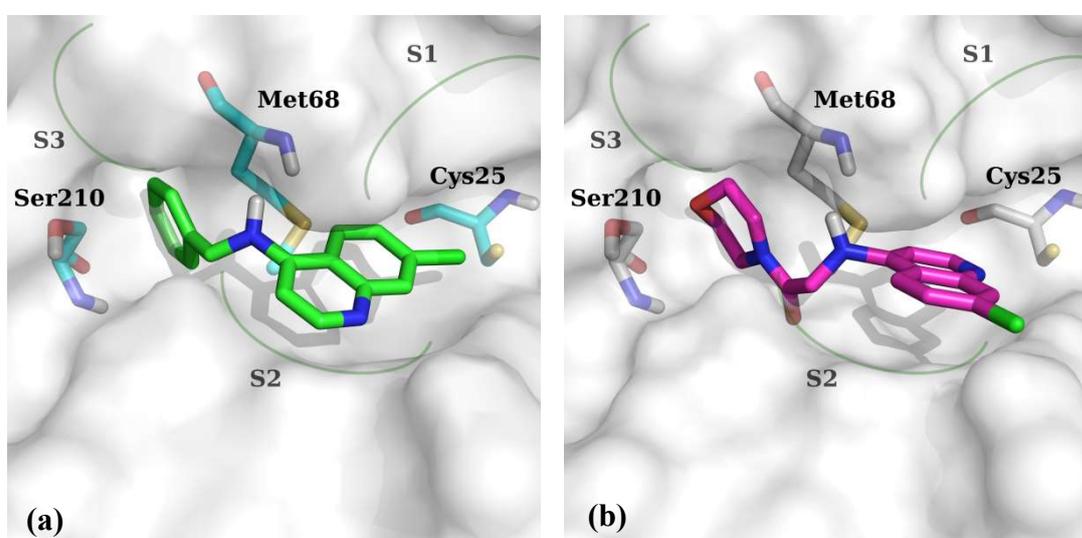


Na **Figura 5.33a** está representada a pose de melhor pontuação calculada para **22**. O núcleo quinolínico foi previsto interagindo com S2. Nenhuma interação de hidrogênio foi predita para esta estrutura. Não parecem haver contatos polares localizados que estabilizem esta pose. O termo de Van der Waals é responsável por $-6,13$ kcal/mol na pontuação da pose apresentada na **Figura 5.33a**, enquanto o termo de energia eletrostática é praticamente nulo ($-0,01$ kcal/mol). O termo da energia interna do ligante contribui com mais $-0,37$ kcal/mol, e os termos de perda de liberdade torcional e a energia livre do estado não ligado penalizam em $+0,89$ kcal/mol e $+0,29$ kcal/mol, respectivamente. A pontuação final é de $-5,32$ kcal/mol, sugerindo uma estabilização principalmente hidrofóbica para esta pose.

Na **Figura 5.33b** está mostrada a única pose de docking prevista para **23**. Esta

substância apresentou uma pontuação muito diferente de todas as outras da série, porém a pose predita é bastante similar. A carbonila do ligante está posicionada enterrada na superfície da proteína, de forma que o oxigênio da carbonila sozinho foi responsável por uma penalidade de +1,25 pontos da pontuação de ancoragem pelo termo de Van der Waals. Em parte, esse fato pode justificar a predição de afinidade tão dispar desta estrutura em comparação com a série estudada.

Figura 5.33 – Poses de menor energia para as substâncias (a) **22** e (b) **23**, ambas ancorados na rodesaína. Figura preparada no PyMOL.



Na **Figura 5.34** estão mostradas as poses de ancoragem para as substâncias **17a** (**Figura 5.34a**) e **17b** (**Figura 5.34b**). Observa-se que os grupos sulfonila ocupam posição similar em ambas as predições, com RMSD de 0,498 Å. O núcleo quinolínico, embora em conformação diferente, apresenta o grupo 4-amino em posição equivalente. Daí verifica-se que a cadeia com três carbonos de **17b** sofre uma torção para manter o posicionamento dos grupos, o que a cadeia com dois carbonos de **17a** faz com aparente menor penalidade. Na **Tabela 5.19** estão apresentadas as estruturas químicas das substâncias **17a** e **17b** e individualizações da energia de ancoragem relevantes nesta análise.

Figura 5.34 – Comparação de modos de ligação propostos para (a) **17a** e (b) **17b** ancorados na rodesaína; em destaque possíveis interações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares com Ser210. Figura preparada com PyMOL.

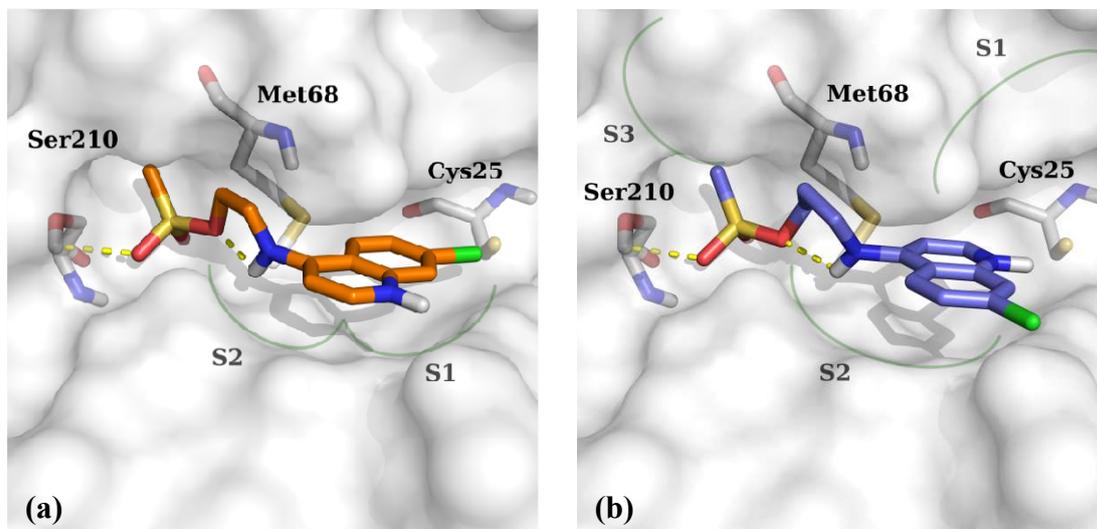


Tabela 5.19 – Individualização das contribuições para a pontuação das duas poses de ancoragem de **17a** e **17b** representas na **Figura 5.29**. Valores extraídos do resultado do AutoDock 4.2.

<i>Termo (unidades de pontuação)</i>	 17a	 17b
<i>Energia interna</i>	-1.13	-0.95
<i>Energia livre torsional</i>	+1.49	+1.79
<i>Contribuição parcial</i>	+0,36	+0,84
<i>Pontuação total</i>	-5,88	-4,69

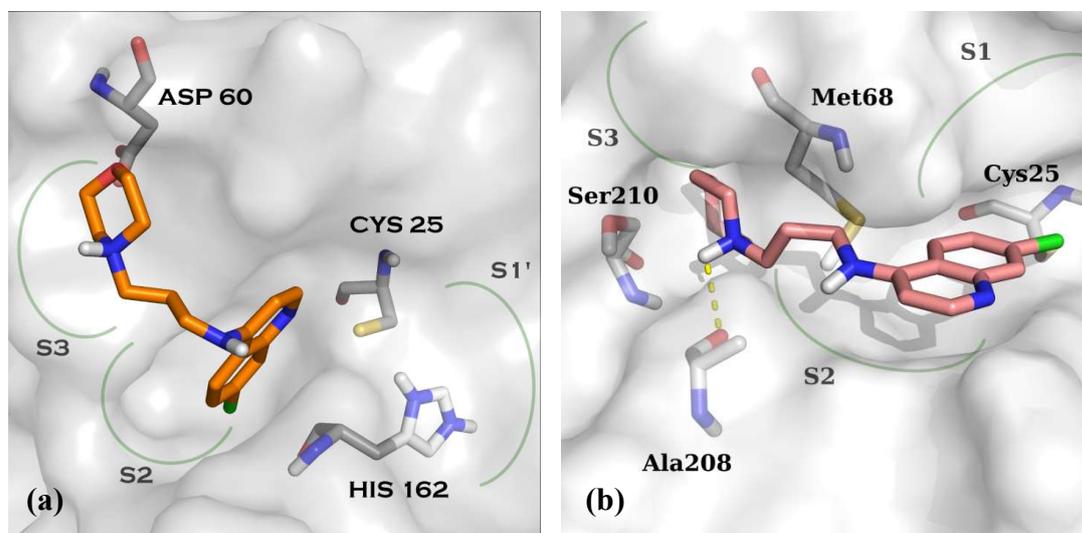
5.6.3 Comparação dos resultados de ancoragem molecular utilizando ambas as enzimas

Comparando os resultados de ancoragem molecular entre as enzimas cruzaína e rodesaína são observadas algumas tendências que podem ajudar a explicar a seletividade da substância **20b** para a cruzaína. Esta substância inibiu 88% da atividade

da cruzaina a 100 μM e 51% da atividade da rodesaina a mesma concentração. Na **Figura 5.29** está representada uma comparação das poses de **20b** para a cruzaina (**Figura 5.35a**) e rodesaina (**Figura 5.35b**). Observa-se que na pose predita para interação com a rodesaina o anel morfolínico está dentro da fenda catalítica, posicionado próximo à Ser210. Este posicionamento provavelmente foi favorecido pela predição de uma interação de hidrogênio com Ala208, ressaltando que a função de pontuação do AutoDock 4.2 possui um termo explícito para interações desta natureza (MORRIS *et al.*, 2009). Esta posição é muito diferente daquela observada para o anel morfolínico do ligante da enzima rodesaina na estrutura cristalográfica utilizada neste estudo (**Figura 5.30**). Por outro lado, a pose predita para a estrutura **20b** no sítio ativo da cruzaina propõe o anel morfolínico em S3, similar ao observado para o ligante cristalográfico desta enzima (**Figura 5.22**). Esta pode ser uma base para racionalização da seletividade experimental desta substância.

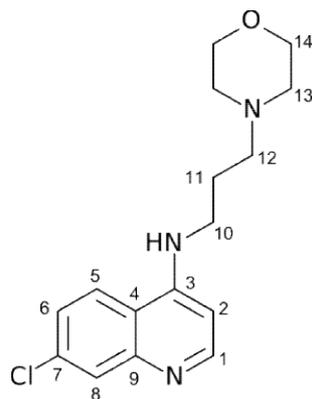
Figura 5.35 – Comparação da pose predita para **20b** ancorado às enzimas (a) cruzaina e (b) rodesaina, com destaque para uma possível interação de hidrogênio com Ala210.

Carbonos de 20b em laranja, carbonos das cadeias laterais da proteína em cinza, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho. Figura preparada com PyMOL



5.7.1 Parametrização

Neste trabalho executou-se a parametrização da substância **20b** (**Figura 5.36**) utilizando o método descrito por Bayly e colaboradores (1993) para a geração de cargas, combinado ao método descrito por Hansson e colaboradores (2010) para a regressão de diedros (BAYLY *et al.*, 1993; HANSSON *et al.*, 2010).

Figura 5.36 – Estrutura química da substância **20b**

Inicialmente uma geometria de mínimo obtida por mecânica molecular foi submetida a um algoritmo de otimização global. (PONDER, 2011). Ao final do processo de busca, 808 mínimos locais foram encontrados. Em seguida, estes mínimos foram agrupados utilizando o algoritmo UPGMA.

Algoritmos hierárquicos foram utilizados para agrupamento de conformações por Huang e colaboradores para classificação de motivos estruturais em DNA (HUANG, H.-C.; NAGASWAMY; FOX, 2005). De Paris e colaboradores, em um trabalho comparando diferentes métodos de agrupamentos para uma trajetória da enoíl-redutase de *Mycobacterium tuberculosis*, concluíram que métodos hierárquicos, inclusive o UPGMA, superaram *k-means* e *k-medoids* em recuperação de dados (DE PARIS *et al.*, 2015).

Para comparar a importância da amostragem conformacional no cálculo de cargas, foram preparados dois conjuntos de grupos. Para transformar um agrupamento hierárquico em um agrupamento plano foi utilizado um algoritmo que agrupa elementos pela distância cofenética. Esta medida é definida como a distância entre os dois maiores grupos que contém os dois elementos individualmente quando estes grupos são unidos em um grupo contendo ambos os elementos (HOLGERSSON, 1977). Diferentes limiares de distância cofenética foram utilizados como critério de corte para geração de grupos, buscando equilíbrio entre o número de grupos e o tamanhos destes. Dois limiares de corte foram escolhidos para testar a qualidade da amostragem do espaço conformacional.

Utilizando limiar de corte igual a 7 Å foram obtidos 42 grupos e utilizando um limiar de

13 Å, 8 grupos. Na **Figura 5.37** está apresentado o resultado do agrupamento hierárquico. Na **Tabela 5.20** estão apresentados alguns dados estatísticos dos agrupamentos.

Figura 5.37 – Resultado do agrupamento UPGMA utilizando limiares de corte de 13 Å (acima) e 7 Å (abaixo). Cores utilizadas para ressaltar separação entre os grupos. Figura preparada com a biblioteca Matplotlib.

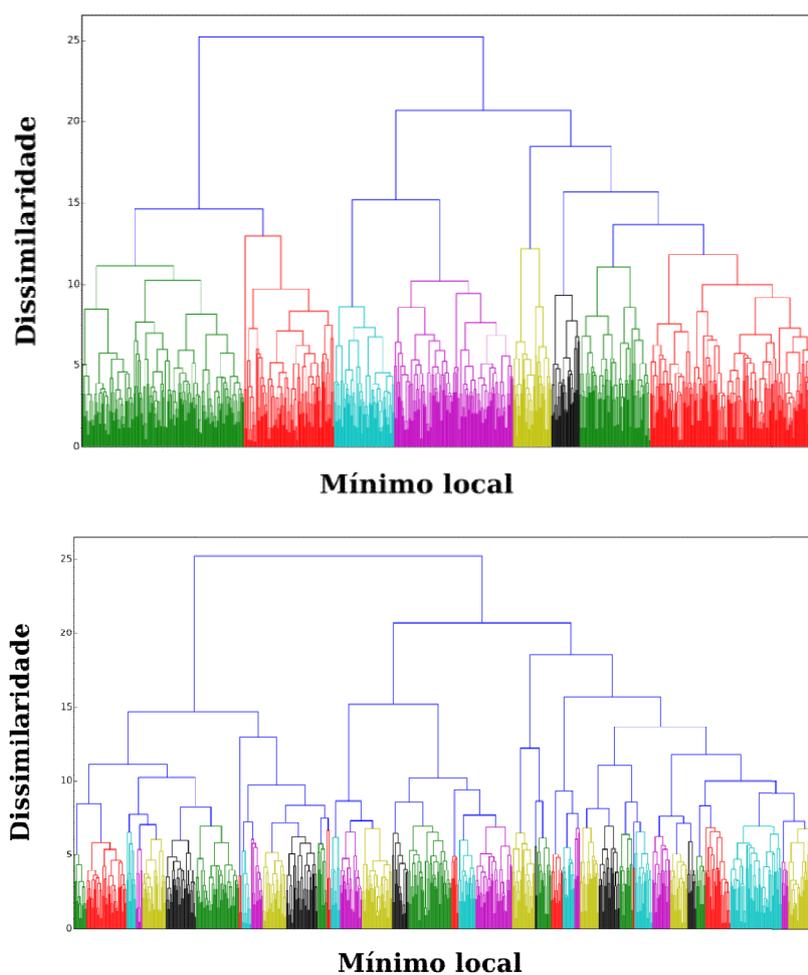


Tabela 5.20 – Dados estatísticos para os agrupamentos executados com diferentes limiares para formação de grupos

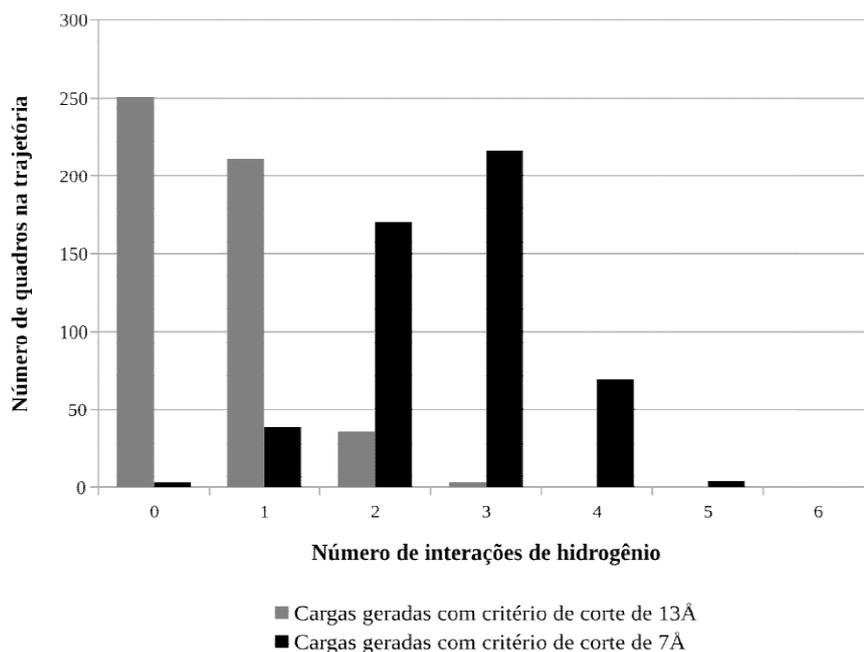
	<i>Limiar de corte 7Å</i>	<i>Limiar de corte 13Å</i>
<i>Número de grupos</i>	42	8
<i>Média de elementos</i>	19,7	101
<i>Desvio padrão</i>	13,5	58,3

Para cada um dos grupos formados o centróide foi determinado e sua estrutura

submetida à otimização por métodos *ab initio*. Em sequência foram calculados mapas de potencial eletrostático seguindo metodologia totalmente compatível com o campo de força Amber. Foram utilizados pesos para regressão, conforme a razão de Boltzmann (equação 4.1) e as energias originadas dos cálculos *ab initio*.

A qualidade das cargas geradas por estes dois métodos foi comparada em uma dinâmica de uma molécula da substância **20b** em água, propagada por 1 ns. Para esta dinâmica de teste foram utilizados parâmetros gerados pela ferramenta AcPype (SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012). Para avaliar a qualidade das cargas geradas comparou-se a capacidade do modelo de prever interações de hidrogênio da molécula com o solvente. A prevalência de interações de hidrogênio ao longo de toda a trajetória foi avaliada (Figura 5.32).

Figura 5.38 – Prevalência de interações de hidrogênio entre moléculas de água e a substância **20b** utilizando dois conjuntos de carga atômica gerados.



Verifica-se que as cargas geradas utilizando um critério de corte de 7 Å apresentaram um padrão de interação de hidrogênio mais plausível: a estrutura de **20b** tem 6 possíveis pontos de interações de hidrogênio e, em solvente prótico, espera-se que a maioria destes pontos efetue interações de hidrogênio. As cargas geradas por este critério de corte (ver **Figura B.1** do **Anexo B**) foram utilizadas em etapas subsequentes da

parametrização e nas simulações de dinâmica molecular.

Com as cargas atômicas preparadas, foi procedida a obtenção de parâmetros de ângulos de diedro. Uma das dificuldades deste procedimento foi a obtenção de curvas de energia por ângulo de diedro contínuas. Alguns dos pontos gerados inicialmente apresentavam descontinuidade em relação à curva devido a alterações conformacionais em outras partes da molécula que não o ângulo de diedro em estudo, alterando a energia total. Este efeito foi corrigido otimizando os pontos problemáticos partindo da geometria otimizada do ponto anterior, seguida de alteração do diedro.

Ocorreram também problemas de convergência da função de onda em alguns dos diedros, em geral quando a geometria de partida era de alta energia. A utilização da base STO-3G* como base auxiliar, seguida da projeção da densidade para a base 6-31G* foi efetiva para levar à convergência.

Durante as primeiras regressões múltiplas houve a preocupação de que a função a ser regressada pudesse ser não convergente ou possuir múltiplos mínimos. Logo, inicialmente foi utilizado um algoritmo genético para produzir parâmetros aproximados da regressão que foram então utilizados para a regressão não-linear pelo método de soma dos mínimos quadrados. Todos os pontos de partida levaram rapidamente à convergência para o mesmo mínimo. De fato, mesmo utilizando vetores nulos, unitários ou aleatórios como ponto de partida, a convergência foi repetidamente obtida em poucas iterações.

Uma dinâmica de teste em água modelo TIP4P foi executada considerando os parâmetros completos da molécula. Foi visualmente observado que a molécula apresentou liberdade conformacional em todos os diedros, e que os anéis quinolínico e morfolínico ficaram estáveis, com o segundo apresentando alguma variação torcional (**Figura 5.39**). É importante ressaltar que durante a simulação não é possível ocorrer a interconversão entre as conformações do anel morfolínico, pois isto requer a inversão da posição do próton ligado ao nitrogênio. A impossibilidade de quebra e formação de ligações é uma limitação do modelo de campo de força utilizado. Uma vez que o anel é simétrico e gira livremente, efeito análogo a interconversão pôde ser observado.

Figura 5.39 – Sobreposição de quadros igualmente espaçados da trajetória de **20b** em água. Figura preparada com VMD.



5.7.2 Dinâmicas moleculares

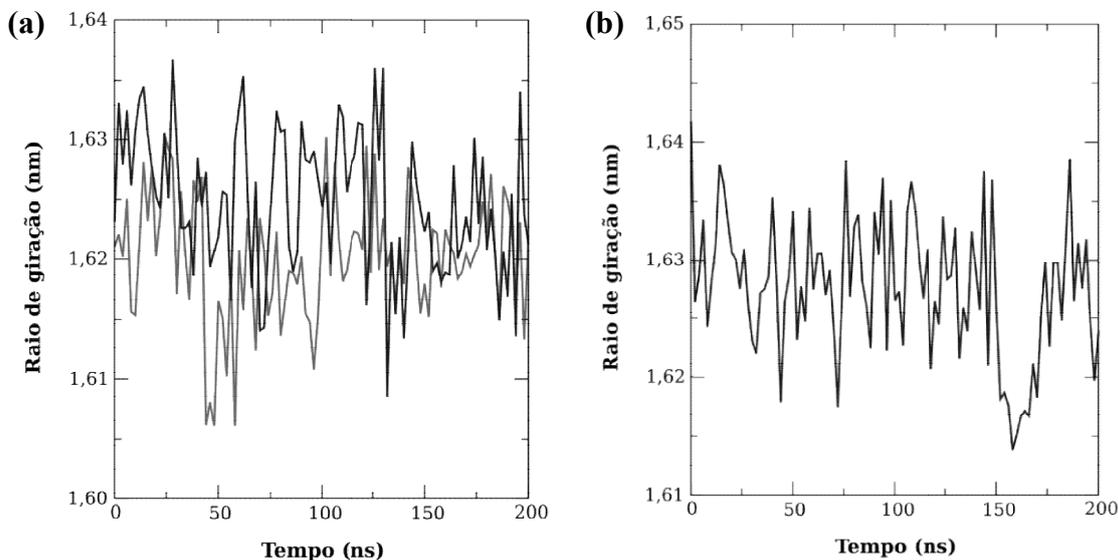
Quatro sistemas moleculares foram construídos e simulados neste trabalho, com duas réplicas cada. Foram preparados os seguintes sistemas: (a) proteína cruzaina complexada ao ligante **20b**; (b) proteína cruzaina livre; (c) proteína rodesaina complexada ao ligante **20b**; (d) proteína rodesaina livre. Em todos os sistemas foi utilizada água TIP3P como solvente e cloretos como contra-íons.

As trajetórias foram analisadas pelo RMSD em relação à conformação inicial, distância entre o centro de massa da proteína e do ligante, raio de giração da proteína e flutuação de posição dos resíduos. Adicionalmente, todas as dinâmicas foram verificadas visualmente utilizando o programa VMD.

Inicialmente, analisando as dinâmicas da cruzaina e rodesaina livres, observa-se a estabilidade conformacional de ambas as proteínas. A análise do raio de giração da cruzaina (**Figura 6.40a**) e rodesaina (**Figura 6.40b**) mostra a estabilidade da compactação estrutural de ambas (LOBANOV; BOGATYREVA; GALZITSKAIA,

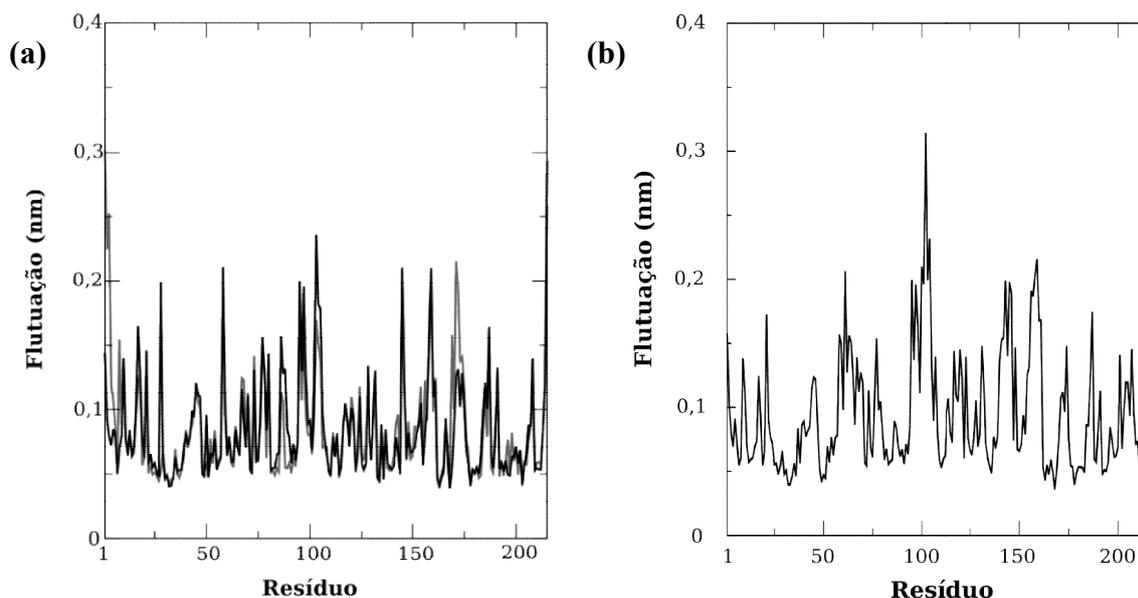
2008). Observa-se que os valores flutuam em menos de 0,4 Å para a cruzaina.

Figura 5.40 – Raio de giração das duas réplicas das dinâmicas da (a) cruzaina e (b) rodesaina.



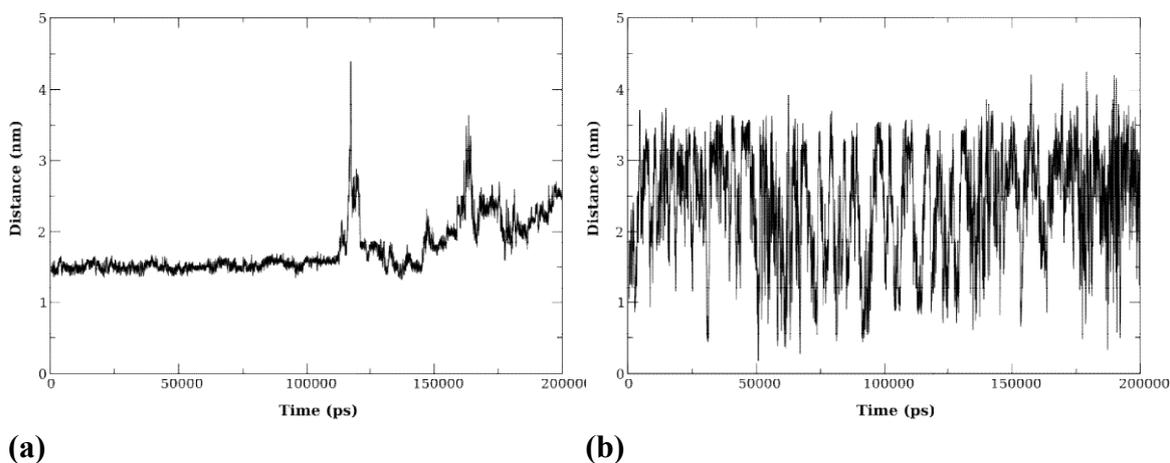
A medida de *root mean square fluctuation* (RMSF) permite avaliar a variação da posição de um grupo ao longo do tempo. Espera-se que, em sistemas estáveis, a maior parte dos resíduos apresentem baixos valores de RMSF e apenas regiões muito flexíveis fujam deste padrão. A análise do gráfico de RMSF (**Figura 5.41**) indica uma estabilidade estrutural. Na dinâmica da cruzaina (**Figura 5.41a**) a maior flutuação de posição ocorre nos resíduos C- e N- terminais e em alguns resíduos muito expostos ao solvente, como Thr103, Lys58 e Asn170. Na dinâmica da rodesaina (**Figura 5.41b**) a maior flutuação de posição ocorre na sequência Gln100-Cys101-Gln102-Met103-Asn104, uma região muito exposta ao solvente na extremidade do domínio de α -hélicas, e em resíduos bastante expostos ao solvente como Phe61, Asn95, Glu97 e Gln159.

Figura 5.41 – RMSF dos resíduos da (a) cruzaina e (b) rodesaina avaliados ao longo de 200 ns de trajetória.



Em relação a dinâmica do ligante complexado a cruzaina, baseado na atividade experimental e semelhança relativa da pose utilizada como geometria de partida com ligantes cristalográficos, esperava-se que o ligante explorasse algumas conformações interagindo com o sítio ativo, porém com pouca liberdade conformacional. Isto não foi observado. Na **Figura 5.42** estão mostrados os gráficos da distância do centro de massa da cruzaina e do ligante em ambas as réplicas. Na réplica 1 (**Figura 5.42a**) o ligante, de fato, se manteve no sítio ativo e explorou o espaço conformacional, porém, em cerca de 110 ns a molécula deixa o sítio ativo e passa a interagir com o solvente e outras regiões da proteína. Na réplica 2 (**Figura 5.42b**) o ligante sai do sítio nos primeiros nanossegundos da simulação.

Figura 5.42 – Evolução temporal da distância do centro de massa da cruzaina e do ligante **20b** para ambas a (a) réplica 1 e (b) réplica 2.



Analisando a amostragem conformacional da trajetória 1 durante os primeiros 110 ns de simulação observa-se que, nos primeiros nanossegundos de trajetória o ligante sofre uma mudança conformacional em relação à pose de ancoragem. O núcleo quinolínico se mantém posicionado em S2, porém a cadeia lateral se afasta de S3 e passa a interagir ora com o solvente, ora com a entrada de S3, ora com Asp161 (**Figura 5.43**). A previsão de interação com Asp161 está relacionada à carga positiva sobre o nitrogênio do anel morfolínico e a carga negativa da cadeia lateral de Asp161. A análise do gráfico de RMSD bidimensional do ligante (**Figura 5.44**) mostra que estas duas possibilidades de interação são repetidamente visitadas pelo sistema ao longo da trajetória ligada. A rápida alternância entre os dois estados sugere que a barreira de energia é pequena.

Figura 5.43 – Sobreposição de quadros igualmente espaçados dos primeiros 110 ns da trajetória da dinâmica de **20b** com a cruzaina. Conformações mais frequentes são representadas em tons vermelhos e menos frequentes em tons brancos. Figura preparada no programa VMD.

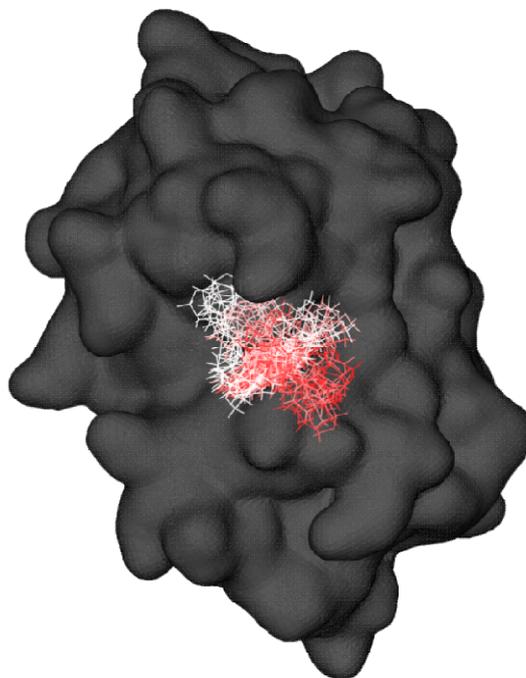
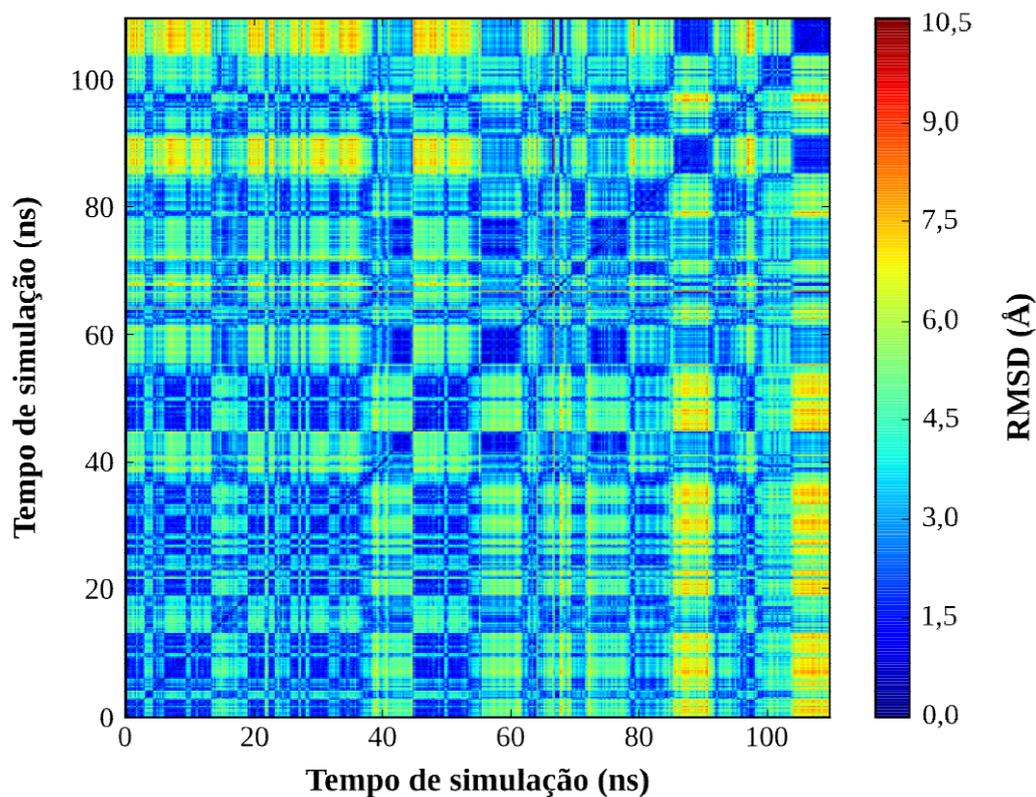


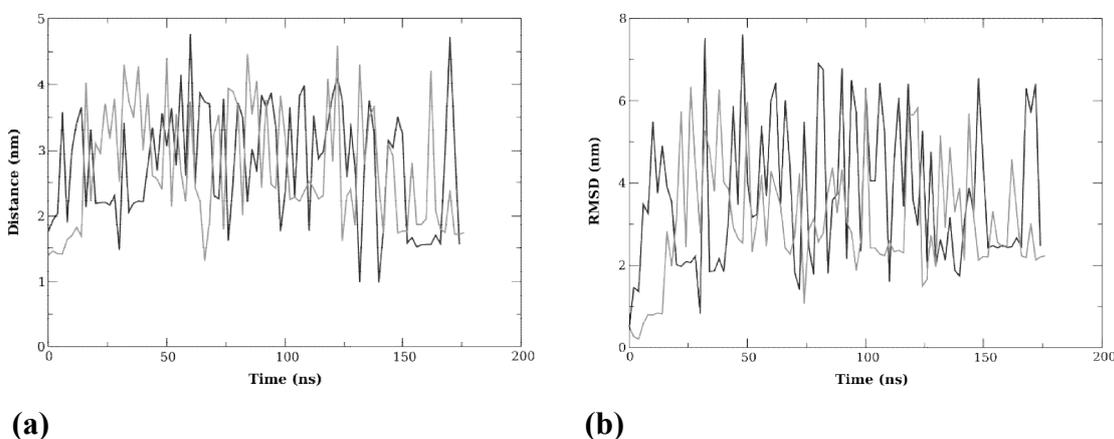
Figura 5.44 – Gráfico de RMSD bidimensional para o ligante **20b** ao longo dos primeiros 110 ns da trajetória da dinâmica de **20b** com a cruzaina. Regiões mais claras indicam valores maiores de RMSD.



A mudança conformacional no início da dinâmica aliada à saída do ligante do sítio em ambas as réplicas sugere que a pose utilizada como conformação inicial para a simulação não é uma pose estável. Uma possível explicação é que as aproximações com as quais os cálculos de ancoragem trabalham levaram a um mínimo local de alta energia. Durante a dinâmica, a energia cinética das partículas permite que o sistema supere barreiras de energia. Em ambas as réplicas o sistema deixou o provável mínimo local, em uma delas se afastando rapidamente do sítio.

Em relação à dinâmica do ligante **20b** ancorado à proteína rodesaína, seria de se esperar, baseado na fraca atividade experimental, que o complexo formado fosse menos estável. As trajetórias, efetivamente, mostraram a saída do ligante do sítio em ambas as réplicas. Os dois gráficos mostrados na **Figura 5.45** apresentam um perfil compatível com o rápido afastamento do ligante logo nos primeiros 5 ns de simulação. O sítio muito exposto, combinada à baixa complementariedade tornam as interações da molécula de **20b** com o solvente mais favoráveis, levando ao deslocamento da molécula do sítio.

Figura 5.45 – Gráficos da (a) distância do centro de massa da rodesaína e ligante **20b** e (b) RMSD do ligante **20b**



Os resultados da dinâmica de **20b** complexada a rodesaína sugerem que a pose obtida por ancoragem molecular é um mínimo local de alta energia e, aliada a fraca atividade experimental desta substância, indica que a interação do ligante com o sítio ativo não é estável.

6 CONCLUSÃO

Quinze aminoquinolinas **16a** a **24** foram sintetizadas utilizando materiais de partida acessíveis e metodologias sintéticas eficientes, com rendimentos de 28% a 99%. A substância **25**, entretanto, foi obtida com baixo rendimento (16%).

Os resultados dos ensaios enzimáticos contra cruzaina identificaram cinco substâncias ativas, capazes inibir mais do que 60% da atividade enzimática a 100 μM . Destas cinco substâncias destacam-se **16b**, **20b** e **22**, com CI_{50} de 17,1 μM , 13,2 μM e 35,4 μM , respectivamente. A potência de **20b** foi cerca de 5 vezes menor do que a potência do protótipo ($\text{CI}_{50} = 2,5 \mu\text{M}$), porém com acessibilidade sintética marcadamente melhor. A análise das atividades inibitórias da série sugerem que o comprimento da cadeia lateral é importante para a atividade. Adicionalmente, o modo de inibição de **20b** foi determinado como competitivo.

Os ensaios enzimáticos contra rodesaina identificaram dez substâncias ativas, capazes inibir mais do que 60% da atividade enzimática a 100 μM . Destas dez substâncias destacam-se **22**, **18a** e **16a**, com CI_{50} de 33,3 μM , 46,5 μM e 53,5 μM , respectivamente. A substância **22** se mostrou capaz de inibir ambas as enzimas com potência similar.

Os ensaios *in vitro* de atividade tripanossomicida contra cepas Tulahuen de *T. cruzi* e a citotoxicidade sobre fibroblastos L929 não infectados identificaram nove substâncias ativas, três delas com CI_{50} menor do que 50 μM . As substâncias **17b**, **21b** e **22** apresentaram CI_{50} de 17,5 μM , 38,2 μM e 37,2 μM , respectivamente. As nove substâncias ativas apresentaram, entretanto, baixo índice de seletividade, de até 1,25 para **22**.

A análise dos resultados de ancoragem molecular na cruzaina sugerem a possibilidade de que o anel quinolínico ocupe o subsítio S2 da enzima enquanto a cadeia lateral, mais flexível, pode interagir com S3 ou S1'. Em parte das poses obtidas para a substância **20b** o anel morfolínico é predito interagindo no subsítio S3. Em ligantes cocrystalizados com a cruzaina contendo anéis morfolínicos observa-se que este grupo pode ocupar uma posição similar em comparação com a pose predita por ancoragem para **20b**.

As simulações de dinâmica molecular mostraram a saída da substância **20b** do sítio ativo da cruzaina em duas réplicas executadas. Este resultado sugere que a pose predita para **20b** com a cadeia lateral em S3 pode não ser um modo de ligação estável. Mais estudos estão em execução para propor um modo de ligação para esta substância. Na dinâmica desta mesma substância com a rodesaina observou-se a saída rápida do ligante do sítio ativo, consistente com a baixa atividade experimentalmente determinada e os resultados de ancoragem molecular.

Os resultados deste trabalho sugerem que substâncias da classe das aminoquinolinas podem ser protótipos promissores na busca por novos inibidores da cruzaina e rodesaina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA, M.-H. *et al.* RNA Interference of *Trypanosoma brucei* Cathepsin B and L Affects Disease Progression in a Mouse Model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 9, p. e298, 24 set. 2008. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000298>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

ANDRADE, Z. A. A FORMA INDETERMINADA DA DOENÇA DE CHAGASEM TEMPOS DE CONTROLE DO *Triatoma infestans*. *Revista de Patologia Tropical*, v. 34, n. 2, p. 147–148, 19 out. 2007. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/1915>>.

ASHALL, F.; ANGLIKER, H.; SHAW, E. Lysis of trypanosomes by peptidyl fluoromethyl ketones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 170, n. 2, p. 923–929, jul. 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X90921794>>.

BAKER, N. *et al.* Drug resistance in African trypanosomiasis: the melarsoprol and pentamidine story. *Trends in parasitology*, v. 29, n. 3, p. 110–8, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492213000020>>.

BAKER, N. A *et al.* Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 18, p. 10037–41, 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/98/18/10037.abstract>>.

BARR, S. C. *et al.* A Cysteine Protease Inhibitor Protects Dogs from Cardiac Damage during Infection by *Trypanosoma cruzi*. *A Cysteine Protease Inhibitor Protects Dogs from Cardiac Damage during Infection by Trypanosoma cruzi*. v. 49, n. 12, p. 5160–5162, 2005.

BAYLY, C. I. *et al.* A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 97, n. 40, p. 10269–10280, out. 1993. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100142a004>>.

BAZARGANI, M.; TAFAZZOLI, M. Dynamic NMR and Theoretical Study of Hindered Internal Rotation about the C-N Bond in 4-(phenyl) acetyl Morpholine. v. 7, p. 145–150, 2013.

BERN, C. *et al.* Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. *JAMA*, v. 298, n. 18, p. 2171, 14 nov. 2007. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.298.18.2171>>.

BRAK, K. *et al.* Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n. 20, p. 6404–10, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ja710254m>>.

BRINEN, L. S. *et al.* A target within the target: probing cruzain's P1' site to define structural determinants for the Chagas' disease protease. *Structure*, v. 8, n. 8, p. 831–840, 15 ago. 2000. Disponível em:

<<http://www.cell.com/article/S0969212600001738/fulltext>>. Acesso em: 9 fev. 2016.

BRUN, R. *et al.* Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, v. 375, n. 9709, p. 148–159, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60829-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60829-1)>.

BRYANT, C. *et al.* Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, n. 21, p. 6218–6221, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.098>>.

BUCKNER, F. S. *et al.* Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=163582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009–2010. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 23, n. 6, p. 609–616, dez. 2010. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001432-201012000-00012>>.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms*. [S.l: s.n.], 2007. Disponível em: <<http://www.springer.com/chemistry/organic+chemistry/book/978-0-387-44897-8>>.

CASE, D. A. *et al.* *AMBER 2015*. . San Francisco, Estados Unidos da América: University of California. , 2015

CHIYANZU, I. *et al.* Design, synthesis and anti-plasmodial evaluation in vitro of new 4-aminoquinoline isatin derivatives. v. 13, p. 3249–3261, 2005.

CONNOLLY, M. L. Analytical molecular surface calculation. *Journal of Applied Crystallography*, v. 16, n. 5, p. 548–558, 1 out. 1983. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889883010985>>.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 3–24, jan. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

CROFT, S. L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 2, p. 215–220, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224531>>. Acesso em: 5 fev. 2016.

DE PARIS, R. *et al.* An Effective Approach for Clustering InhA Molecular Dynamics Trajectory Using Substrate-Binding Cavity Features. *Plos One*, v. 10, n. 7, p. e0133172, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0133172>>.

DE SOUZA, M. V. N. *et al.* Synthesis and in vitro antitubercular activity of a series of quinoline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 4, p. 1474–1480, fev. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.013>>.

- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*. [S.l.]: Editora FIOCRUZ, 2012. v. 30. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821997000300019&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- DIAS, L. *et al.* Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim. Nova*, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n9/v32n9a38.pdf>>.
- DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-biological interactions*, v. 73, p. 1–27, 1990.
- DOLINSKY, T. J. *et al.* PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. WEB SERVER ISS., 2004.
- DRAKE, N. L. *et al.* Synthetic Antimalarials. The Preparation and Properties of 7-Chloro-4-(4-diethylamino-1-methylbutylamino)-quinoline (SN-7618) 1,2. *Journal of the American Chemical Society*, v. 68, n. 7, p. 1214–1216, jul. 1946. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ja01211a022>>. Acesso em: 5 fev. 2016.
- DRUGS FOR NEGLETED DISEASES INITIATIVE. *DNDi Human African Trypanosomiasis Fact-sheet*. . Genebra, Suíça: [s.n.], 2014a. Disponível em: <http://www.dndi.org/wp-content/uploads/2009/03/DNDi_HAT_factsheet.pdf>. Acesso em: 8 dez. 2015.
- DRUGS FOR NEGLETED DISEASES INITIATIVE. *K777 (Chagas) – DNDi*. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/k777/>>. Acesso em: 11 dez. 2015b.
- DU, X. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 13, p. 2695–2707, 2002.
- DUSCHAK, V. G. *et al.* ENZYMATIC ACTIVITY, PROTEIN EXPRESSION, AND GENE SEQUENCE OF CRUZIPAIN IN VIRULENT AND ATTENUATED TRYPANOSOMA CRUZI STRAINS. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 5, p. 1016–1022, out. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11695358>>.
- DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 21, n. 3, p. 287–292, jun. 2008. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001432-200806000-00012>>. Acesso em: 2 mar. 2016.
- EHMKE, V. *et al.* Potent and Selective Inhibition of Cysteine Proteases from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei*. *ChemMedChem*, v. 6, n. 2, p. 273–278, 7 fev. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cmdc.201000449>>.
- EL-SAYED, N. M. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1112631>>.

ENGEL, J. C. *et al.* Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 188, n. 4, p. 725–734, 1998.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 126, n. 3, p. 283–291, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.023>>.

FERREIRA, R. S. *et al.* Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 13, p. 4891–4905, 2010.

FERREIRA, R. S. *et al.* Divergent Modes of Enzyme Inhibition in a Homologous Structure–Activity Series. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, n. 16, p. 5005–5008, 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm9009229>>.

FISHER, G. M. *et al.* Synthesis and Evaluation of Antimalarial Properties of Novel 4-Aminoquinoline Hybrid Compounds. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 84, n. 4, p. 462–472, out. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cbdd.12335>>.

FONSECA-BERZAL, C. *et al.* In vitro phenotypic screening of 7-chloro-4-amino(oxy)quinoline derivatives as putative anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, n. 4, p. 1209–1213, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.071>>.

FUJII, N. *et al.* Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 1, p. 121–123, jan. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X0401251X>>.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica*, v. 115, n. 1-2, p. 22–27, 2010.

GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Alternative Measures of Lipophilicity: From Octanol–Water Partitioning to IAM Retention. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 8, p. 2984–3004, ago. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916326600>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. *Protein Science*, v. 6, n. 8, p. 1603–1611, ago. 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pro.5560060801>>.

GILLMOR, S. A. Chapter 3: X-ray Structures of Complexes of Cruzain with Designed Covalent Inhibitors. *Enzyme-ligand Interactions, Inhibition and Specificity*, p. 50–80, 1998. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1ewp>>. Acesso em: 9 fev. 2016.

GONTIJO, E. D. *et al.* Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. *Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil*, v. 18, n. 3, p. 243–254, 2009.

GORDON, M. S.; SCHMIDT, M. W. Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later. *Theory and Applications of Computational Chemistry*. [S.l.:

s.n.], 2005. p. 1167–1189.

GUANTAI, E. M. *et al.* Enone– and Chalcone–Chloroquinoline Hybrid Analogues: In Silico Guided Design, Synthesis, Antiplasmodial Activity, in Vitro Metabolism, and Mechanistic Studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, n. 10, p. 3637–3649, 26 maio 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm200149e>>.

-H. ZHOU, C.; WANG, Y. Recent Researches in Triazole Compounds as Medicinal Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 2, p. 239–280, 1 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=19&issue=2&spage=239>>.

HABERLAND, A. *et al.* Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 51, n. 2, p. 271–94, 1 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045386>>.

HALGREN, T. A. Merck Molecular Force Field. *J. Comput. Chem.*, v. 17, p. 490–519, 1996.

HANSSON, A. *et al.* CHARMM force field parameterization of rosiglitazone. *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 111, n. 7-8, p. 1346–1354, jun. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/qua.22638>>.

HOLGERSSON, M. THE LIMITED VALUE OF COPHENETIC CORRELATION AS A CLUSTERING CRITERION. *Pattern Recognition*, v. 10, p. 287–295, 1977.

HUANG, H.-C.; NAGASWAMY, U.; FOX, G. E. The application of cluster analysis in the intercomparison of loop structures in RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, v. 11, n. 4, p. 412–23, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1370731&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HUANG, N.; SHOICHET, B. K.; IRWIN, J. J. Benchmarking sets for molecular docking. *Journal of medicinal chemistry*, v. 49, n. 23, p. 6789–801, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3383317&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HUETE-PÉREZ, J. A. *et al.* Protease Trafficking in Two Primitive Eukaryotes Is Mediated by a Prodomain Protein Motif. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 23, p. 16249–16256, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347181>>.

IANNI, B. M. *et al.* Chagas' heart disease: evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 77, n. 1, p. 59–62, jul. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2001000700006&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 5 fev. 2016.

IFA, D. . *et al.* A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde N-acylhydrazones and related compounds. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v. 505, n. 1-3, p. 11–17, jun. 2000. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166128099003073>>.

ILLY, C. *et al.* Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 2, p. 1197–1202, 1997.

JANSSEN, C. L. *et al.* *The Massively Parallel Quantum Chemistry Program (MPQC)*. . Livermore, Estados Unidos da América: Sandia National Laboratories. , 2008

KENNEDY, P. G. E. Human African trypanosomiasis-neurological aspects. *Journal of Neurology*, v. 253, p. 411–416, 2006.

KERR, I. D. *et al.* Crystal Structures of TbCatB and Rhodesain, Potential Chemotherapeutic Targets and Major Cysteine Proteases of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 6, p. e701, 8 jun. 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000701>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

KERR, I. D. *et al.* Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 38, p. 25697–25703, 2009.

LAVRADO, J. *et al.* Antitrypanosomal and cysteine protease inhibitory activities of alkyldiamine cryptolepine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, n. 19, p. 6256–6260, 2012.

LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: Successes and gaps. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 20, p. 5851–5855, out. 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm060999m>>. Acesso em: 5 abr. 2016.

LIN, F. L. *et al.* Mechanistic Investigation of the Staudinger Ligation. *Journal of the American Chemical Society*, From Duplicate 1 (Mechanistic Investigation of the Staudinger Ligation - Fiona L. Lin, †; Helen M. Hoyt, †; van Halbeek, †; Robert G. Bergman, †; and Carolyn R. Bertozzi* †, ‡ §) PMID: 15725026, v. 127, n. 8, p. 2686–2695, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ja044461m>>.

LINDORFF-LARSEN, K. *et al.* Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, v. 78, n. 8, p. 1950–1958, 2010.

LOBANOV, M. I.; BOGATYREVA, N. S.; GALZITSKAIA, O. V. Radius of gyration is indicator of compactness of protein structure. *Molekuliarnaia biologiya*, v. 42, n. 4, p. 701–706, 2008.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Morte súbita em área endêmica da doença de Chagas. , 1983, p. 79–84. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v16n2/03.pdf>>. Acesso em: 5 fev. 2016.

LUKES, J. *et al.* Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryotic cell*, v. 1, n. 4, p. 495–502, 2002.

LUTJE, V.; SEIXAS, J.; KENNEDY, A. Chemotherapy for second-stage Human African trypanosomiasis (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 6,

2013.

MALLARI, J. P. *et al.* Discovery of trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and TbcA. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 18, n. 9, p. 2883–2885, 2008.

MALLAT, T.; BAIKER, A. Selectivity enhancement in heterogeneous catalysis induced by reaction modifiers. v. 200, p. 3–22, 2000.

MALVY, D.; CHAPPUIS, F. Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, n. 7, p. 986–995, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03536.x>>.

MCGRATH, M. E. *et al.* The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *Journal of molecular biology*, v. 247, n. 2, p. 251–259, 1995.

MCKERROW, J. H. *et al.* Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104 Suppl , p. 263–9, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4156466&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MEIRELLES, M. N. *et al.* Inhibitors 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, n. 2, p. 175–184, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1620157>.

MELATO, S. *et al.* Novel 4-Aminoquinolines through Microwave-Assisted S N Ar Reactions: a Practical Route to Antimalarial Agents. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2007, n. 36, p. 6118–6123, dez. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ejoc.200700612>>.

MICALE, N. *et al.* Novel 2H-isoquinolin-3-ones as antiplasmodial falcipain-2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 18, p. 6505–6511, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.08.013>>.

MOMBAERTS, P. *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, v. 68, n. 5, p. 869–877, mar. 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749290030G>>. Acesso em: 16 nov. 2015.

MORILLO, C. A. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, out. 2015. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1507574>>.

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.21256>>.

MORRIS, G. M. *et al.* Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry*, v.

19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.

MOTIWALA, H. F.; KUMAR, R.; CHAKRABORTI, A. K. Microwave-Accelerated Solvent- and Catalyst-Free Synthesis of 4-Aminoaryl/alkyl-7-chloroquinolines and 2-Aminoaryl/alkylbenzothiazoles. *Australian Journal of Chemistry*, v. 60, n. 5, p. 369, 2007. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=CH06391>>.

MOTT, B. T. *et al.* Identification and optimization of inhibitors of trypanosomal cysteine proteases: Cruzain, rhodesain, and TbCatB. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 1, p. 52–60, 2010.

ODIIT, M.; KANSIIME, F.; ENYARU, J. C. Duration of symptoms and case fatality of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei rhodesiense* in Tororo, Uganda. *East Afr Med J*, v. 74, n. 12, p. 792–795, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9557424>.

OLIVEIRA, M. D. F. *et al.* Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 37, n. 3, p. 209–228, 2008. Disponível em: <http://www.ufg.br/this2/uploads/files/62/2008_37_3_209_228.pdf>.

OOI, C.-P.; BASTIN, P. More than meets the eye: understanding *Trypanosoma brucei* morphology in the tsetse. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, n. November, p. 71, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2013.00071/abstract>>.

PAJOUHESH, H.; LENZ, G. R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRX*, v. 2, n. 4, p. 541–553, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489364>>. Acesso em: 16 maio 2016.

PAPPU, R. V.; HART, R. K.; PONDER, J. W. Tinker: a package for molecular dynamics simulation. *J. Phys. Chem. B*, v. 102, p. 9725–42, 1988.

PAVIA, D. L. *et al.* *Introduction to Spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*. 5^a. ed. [S.l.]: Brooks Cole, 2008.

PEDROSA, R. C. *et al.* Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Report*, doi: 10.1179/135100001101536328, v. 6, n. 4, p. 265–270, 1 ago. 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1179/135100001101536328>>.

POLGÁR, L. A. A. Catalytic Mechanisms of Cysteine Peptidases. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. [S.l.: s.n.], 2013. v. 2. p. 1773–1784.

PONDER, J. W.; CASE, D. A. Force fields for protein simulations. *Advances in Protein Chemistry*, v. 66, p. 27–85, 2003.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious diseases*, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309901000652>>.

PRETORIUS, S. I. *et al.* Synthesis, characterization and antimalarial activity of quinoline-pyrimidine hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 1, p.

269–277, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.10.019>>.

PRONK, S. *et al.* GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, v. 29, n. 7, p. 845–854, 2013.

RAADT, P. DE. *The history of sleeping sickness. Fourth International Cours on African Trypanosomoses*. [S.l.]: World Health Organization, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/trypanosomiasis_african/country/history/en/print.html>. Acesso em: 5 fev. 2016.

RAJ, R. *et al.* Azide-alkyne cycloaddition en route to 1H-1,2,3-triazole-tethered 7-chloroquinoline-isatin chimeras: Synthesis and antimalarial evaluation. *EJMECH*, v. 62, p. 590–596, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.032>>.

RAJÃO, M. A. *et al.* Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 55, n. 4, p. 309–321, maio 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/em.21839>>.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *The Lancet*, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067361060061X>>.

RENSLO, A. R.; MCKERROW, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nature Chemical Biology*, v. 2, n. 12, p. 701–710, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nchembio837>>.

ROJAS RUIZ, F. A. *et al.* Synthesis and antimalarial activity of new heterocyclic hybrids based on chloroquine and thiazolidinone scaffolds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 15, p. 4562–4573, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.025>>.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms☆. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 120, n. 1, p. 1–21, mar. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685101004388>>.

SASHIDHARA, K. V. *et al.* Antiplasmodial activity of novel keto-enamine chalcone-chloroquine based hybrid pharmacophores. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 9, p. 2971–2981, maio 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089612001903>>. Acesso em: 3 mar. 2016.

SCALABRINI, A. *et al.* Correlação clínico-patológica na forma indeterminada da doença de Chagas experimental do cão. *Arq Bras Cardiol*, v. 67, n. 6, p. 385–388, 1996. Disponível em: <<http://publicacoes.cardiol.br/abc/1996/6706/67060005.pdf>>.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. Reprint of “On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 27, n. 2, p. 157–162, ago. 1967. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X12015124>>.

SILVA, C. *et al.* Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para

aumento da biodisponibilidade oral. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 2, p. 125–140, 2002.

SIMARRO, P. P.; JANNIN, J.; CATTAND, P. Eliminating human African trypanosomiasis: Where do we stand and what comes next? *PLoS Medicine*, v. 5, n. 2, p. 0174–0180, 2008.

SMITH, T. F.; WATERMAN, M. S. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*, v. 147, n. 1, p. 195–197, mar. 1981. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283681900875>>. Acesso em: 27 jan. 2015.

SOLANO, P.; RAVEL, S.; DE MEEÛS, T. How can tsetse population genetics contribute to African trypanosomiasis control? *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 5, p. 255–263, maio 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492210000279>>.

SOLOMON, V. R.; HU, C.; LEE, H. Design and synthesis of chloroquine analogs with anti-breast cancer property. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 3916–3923, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.05.046>>.

SOUSA DA SILVA, A. W.; VRANKEN, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC research notes*, v. 5, n. 1, p. 367, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/367>>.

STEVERDING, D. The history of African trypanosomiasis. *Parasites & vectors*, v. 1, n. 1, p. 3, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2270819&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

STEVERDING, D. *et al.* Trypanosoma brucei: Chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug target. *International Journal for Parasitology*, v. 42, n. 5, p. 481–488, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.03.009>>.

STEVERDING, D.; CAFFREY, C. R.; SAJID, M. Cysteine proteinase inhibitors as therapy for parasitic diseases: advances in inhibitor design. *Mini Rev Med Chem*, v. 6, n. 9, p. 1025–1032, 2006.

TOMAS, A. M.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi, is associated with enhanced metacyclogenesis. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 244, n. 2, p. 596–603, 1997.

TURK, V. *et al.* Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1824, n. 1, p. 68–88, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963911002706>>.

URBINA, J. A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin Infect Dis*, v. 14, n. 6, p. 733–741, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11964893>.

VINCENDEAU, P.; BOUTEILLE, B. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 78, n. 4, p. 645–665, dez. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652006000400004&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

WHO. *Fact sheet 259 -Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness)*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>>. Acesso em: 8 dez. 2015.

WHO. *Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico.: Geneva: World Health organization, TDR/SWG/09*. Buenos Aires: [s.n.], 2007.

WIGGERS, H. J. *et al*. Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 8, p. e2370, 22 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84883431785&partnerID=tZOtx3y1>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. . Geneva: [s.n.], 2012.

YU, J.; WHITNEY, P.; SPENCER, J. B. Direct comparison between the mechanism of hydrometalation and b -elimination in heterogeneous and homogeneous hydrogenation. p. 199–210, 1999.

ZANATTA, N. *et al*. Convergent synthesis and cruzain inhibitory activity of novel 2-(N'-benzylidenehydrazino)-4-trifluoromethyl-pyrimidines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 24, p. 10236–10243, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.052>>.

ANEXO A - Espectros na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e subespectros DEPT-135

Figura A.1 - Espectro no infravermelho de 16a

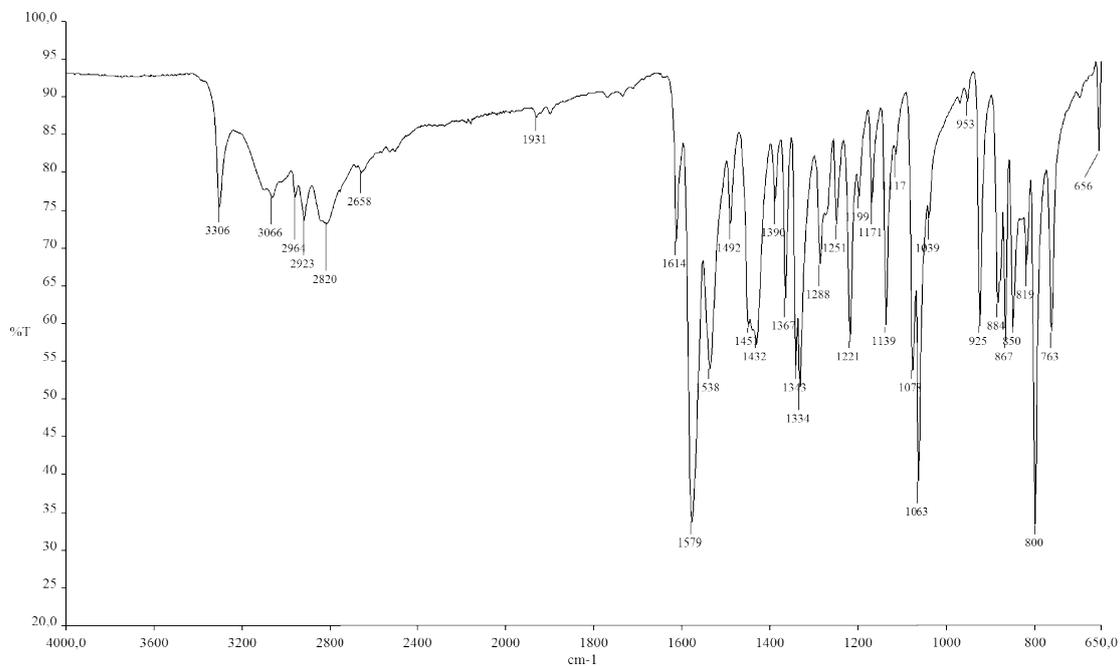


Figura A.2 - Espectro de RMN de ^1H de 16a (200MHz, DMSO-d₆)

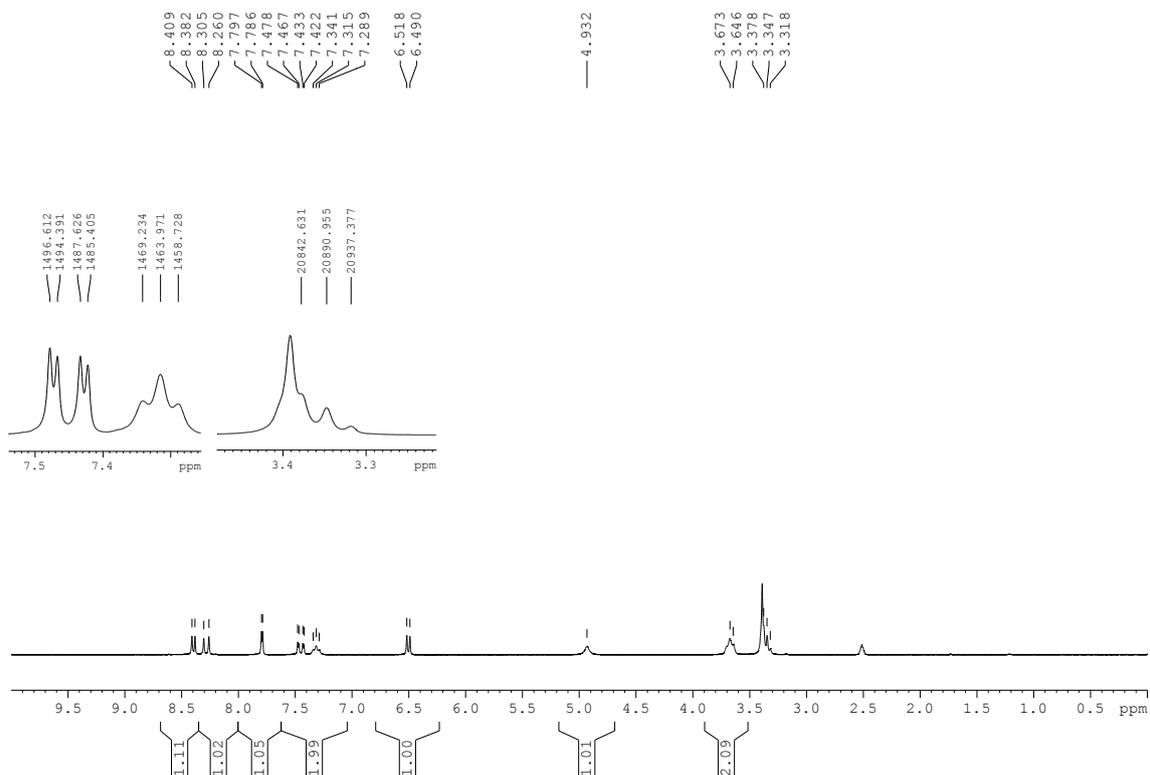


Figura A.3 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **16a** (50MHz, DMSO- d_6)

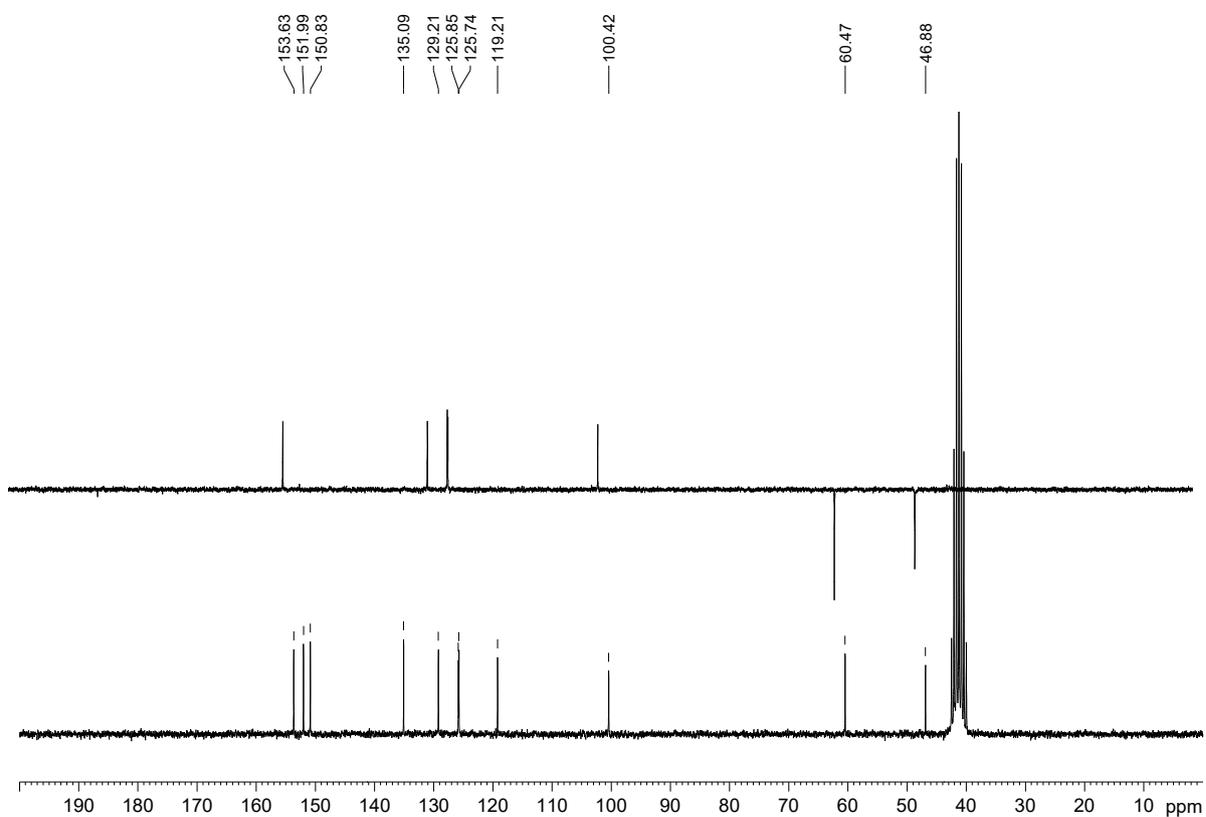


Figura A.4 - Espectro no infravermelho de **16b**

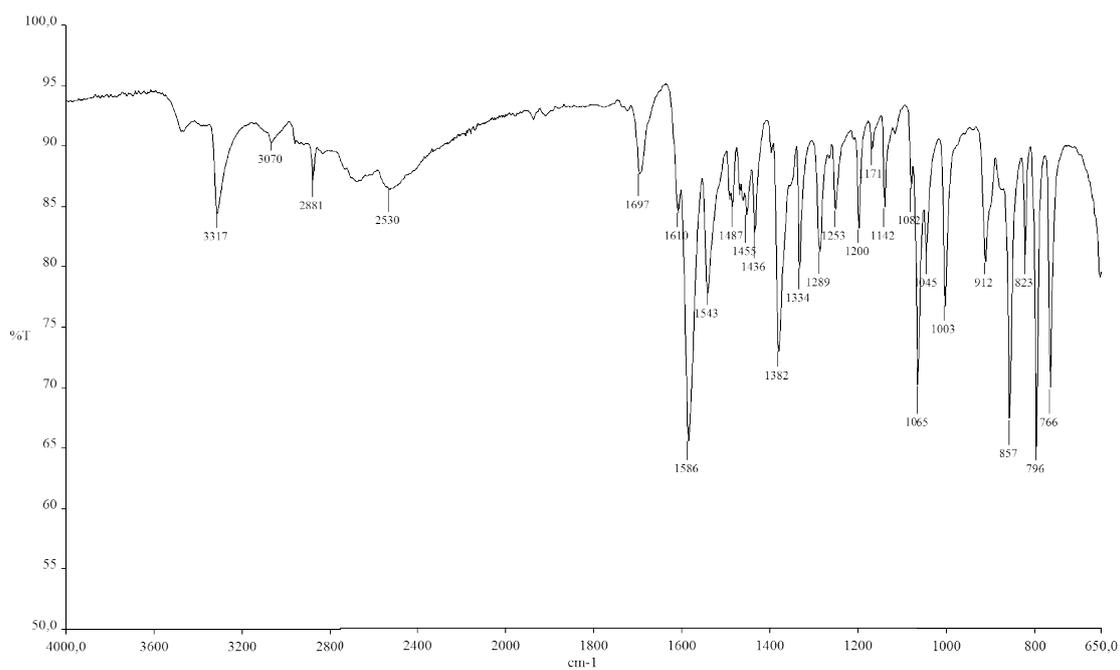


Figura A.5 - Espectro de RMN de ^1H de **16b** (200MHz, DMSO- d_6)

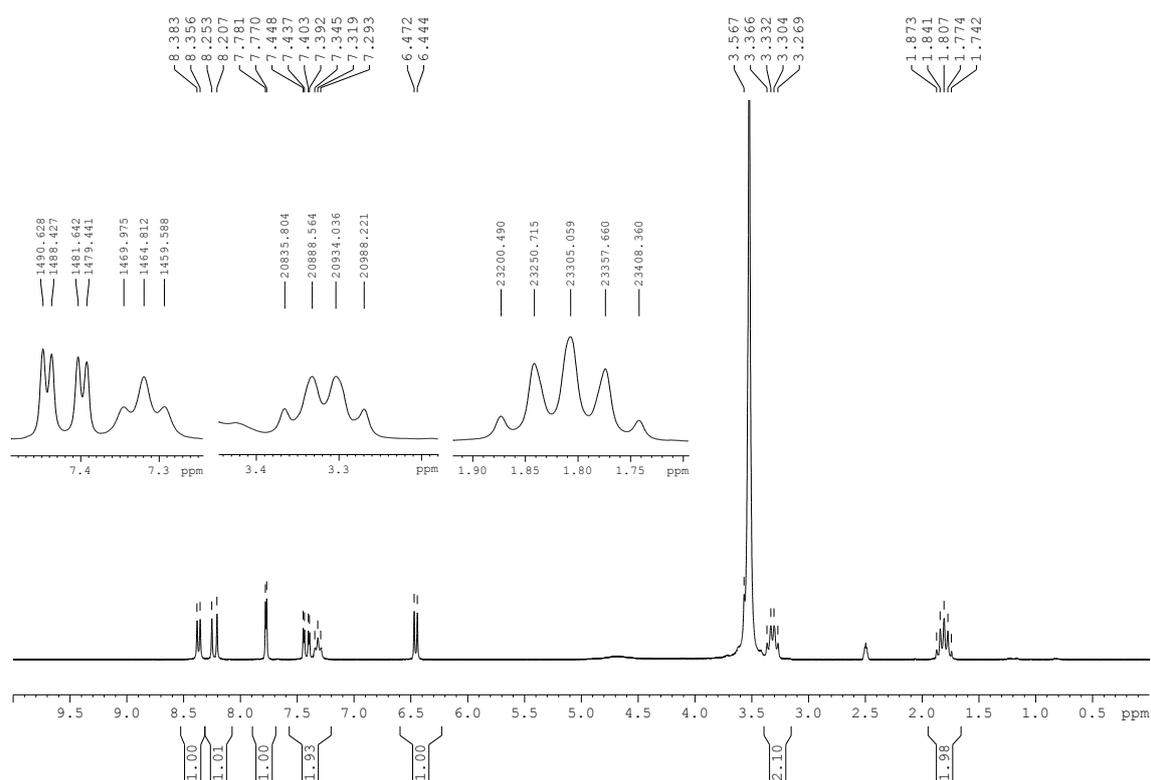


Figura A.6 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **16b** (50MHz, DMSO- d_6)

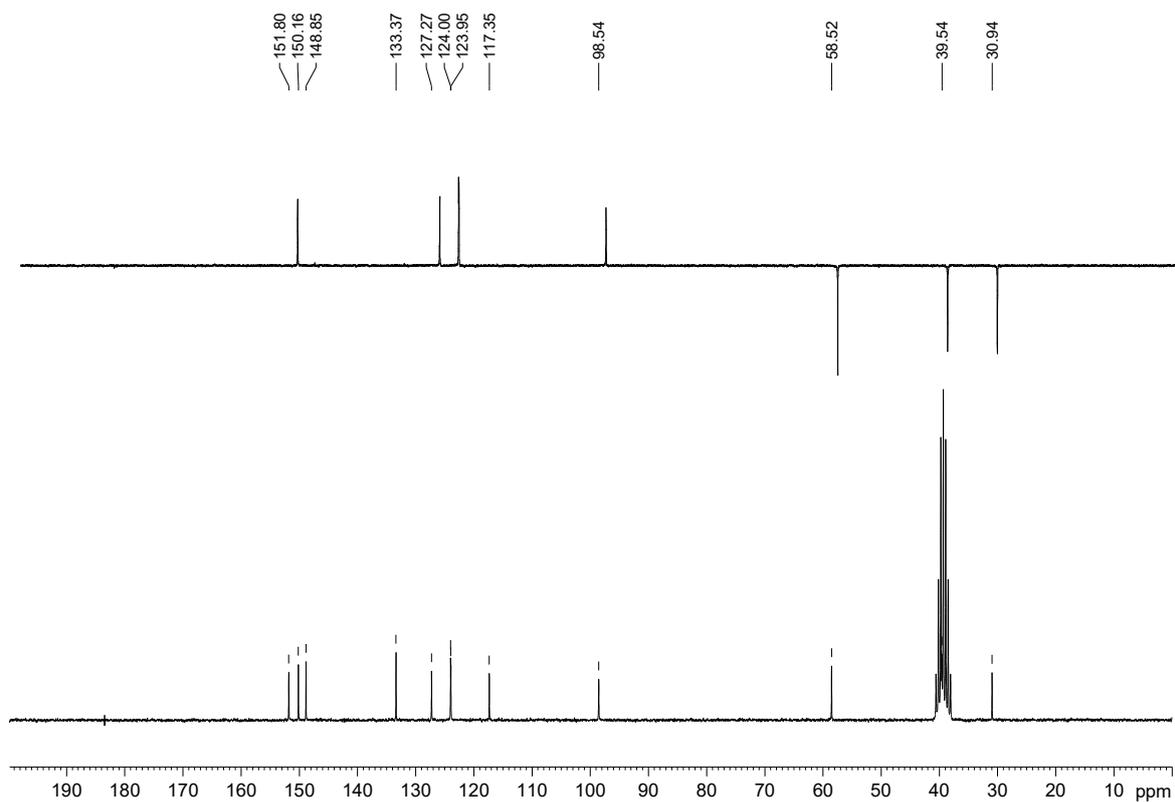


Figura A.7 - Espectro no infravermelho de 17a

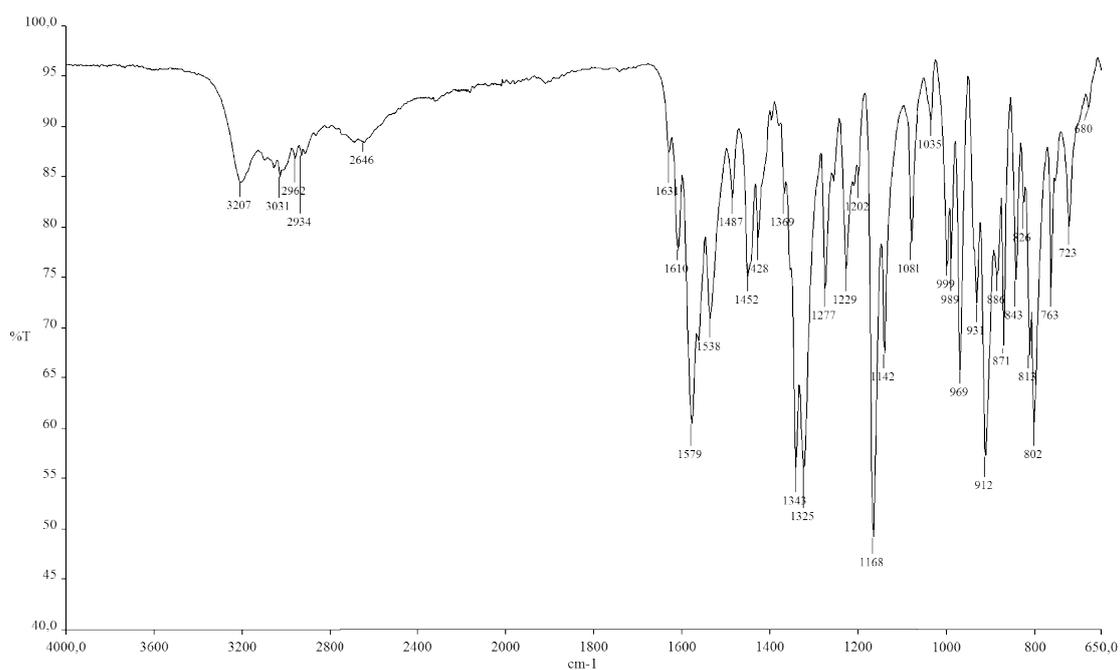


Figura A.8 - Espectro de RMN de ¹H de 17a (200MHz, DMSO-d₆)

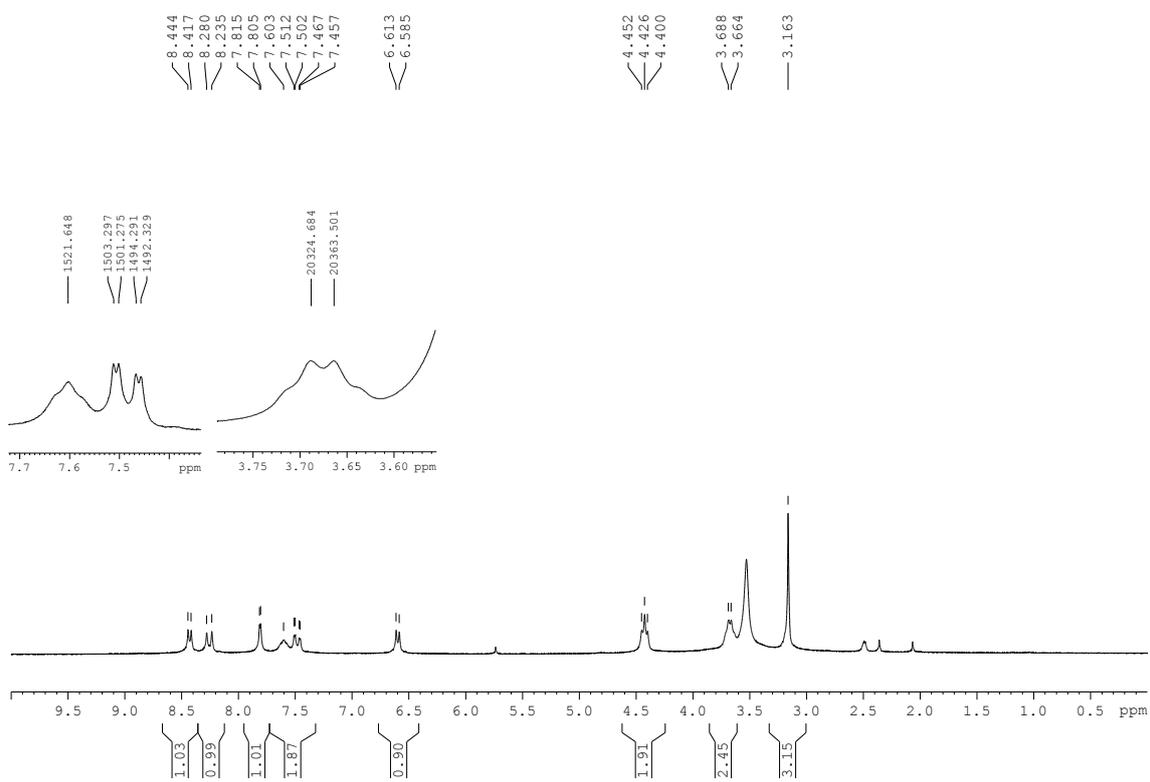


Figura A.9 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **17a** (50MHz, DMSO- d_6)

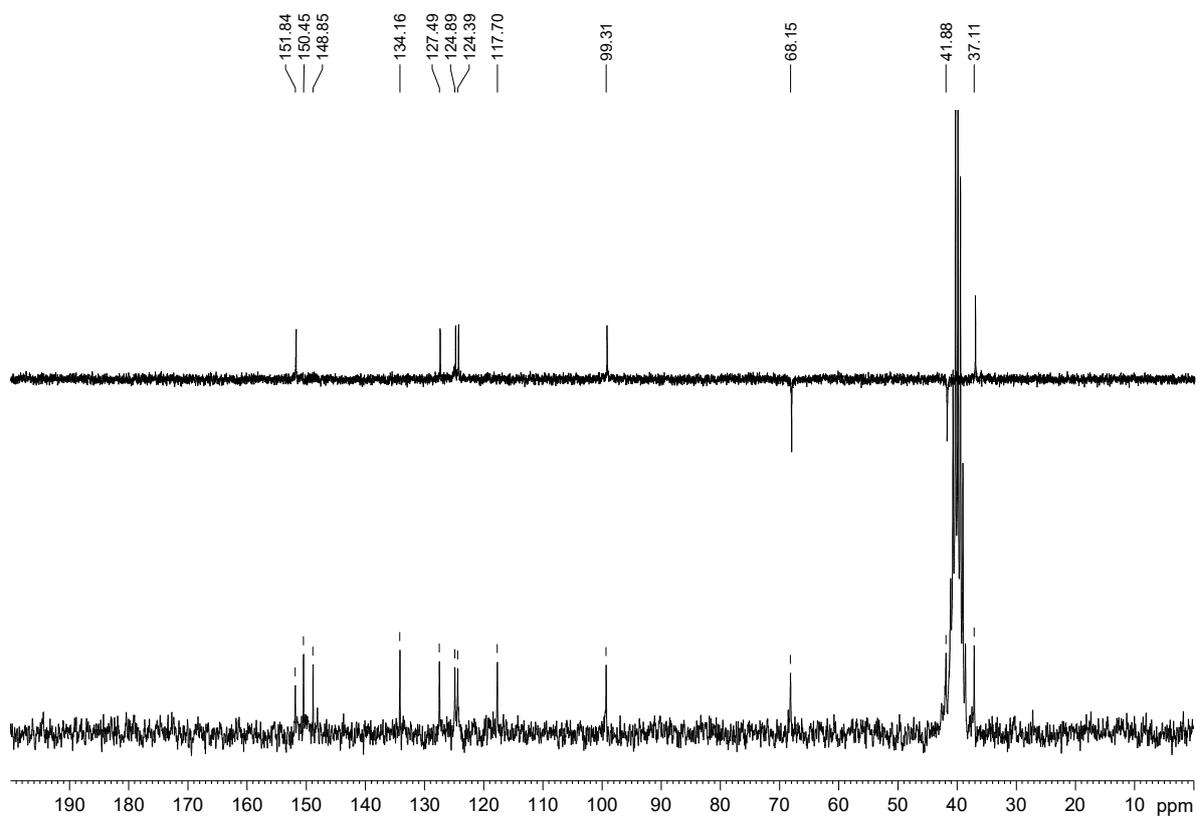


Figura A.10 - Espectro no infravermelho de **17b**

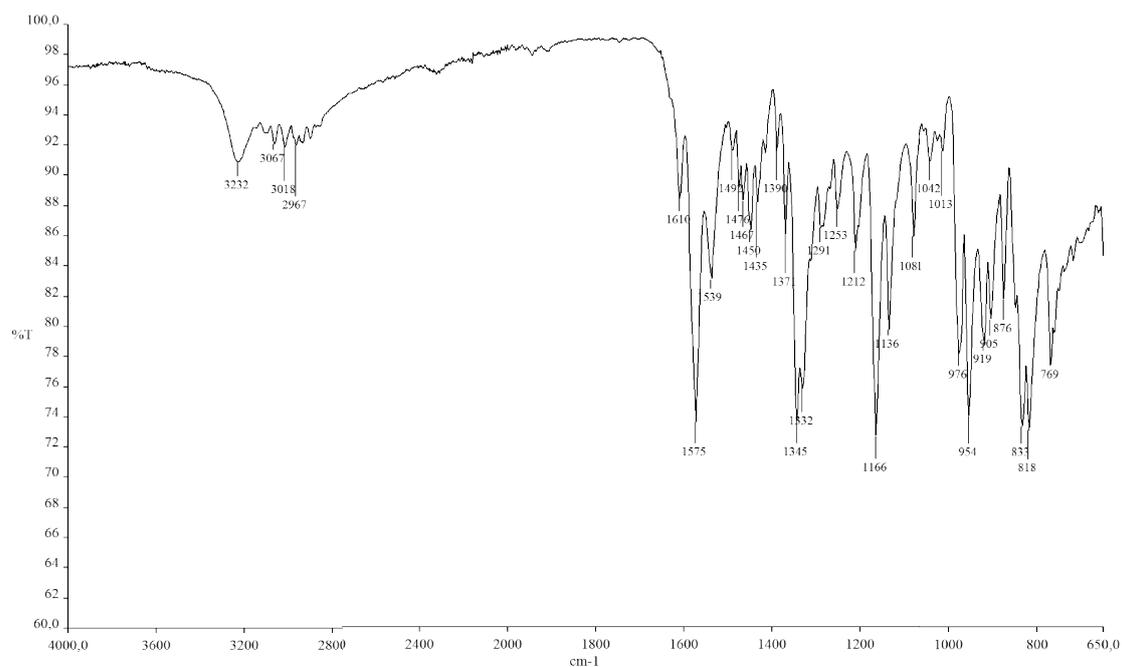


Figura A.11 - Espectro de RMN de ^1H de **17b** (200MHz, DMSO- d_6)

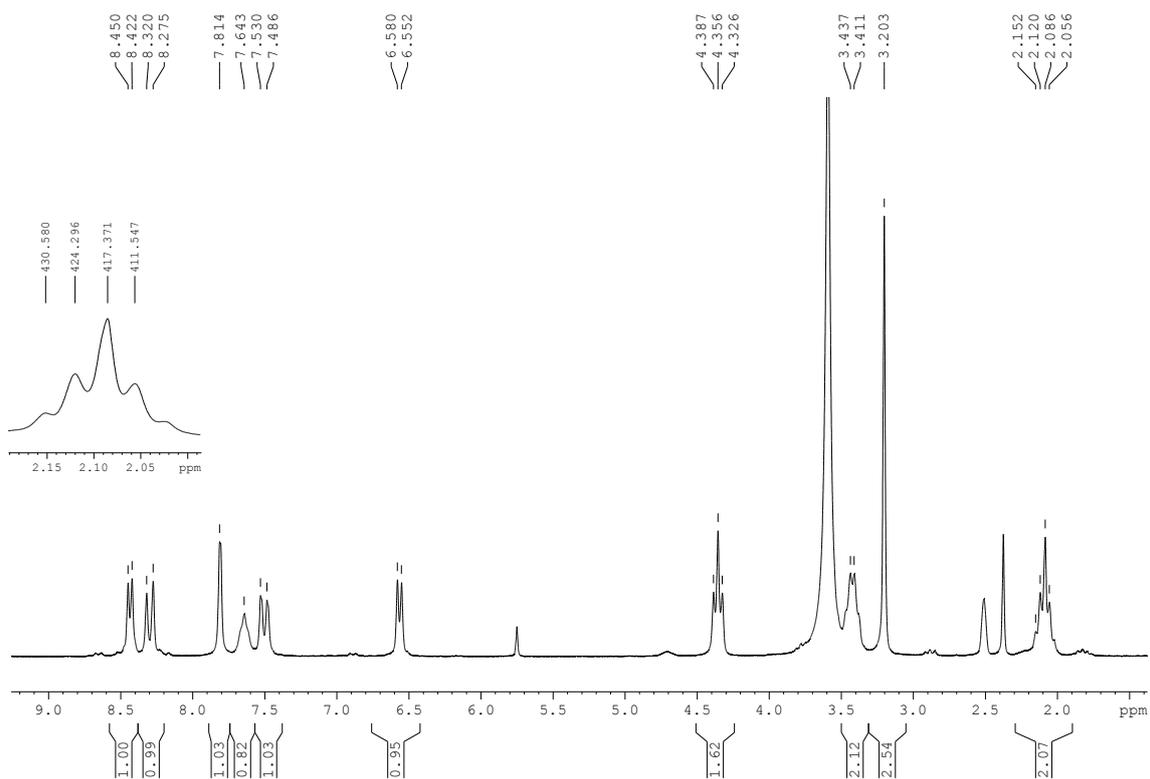


Figura A.12 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **17b** (50MHz, DMSO- d_6)

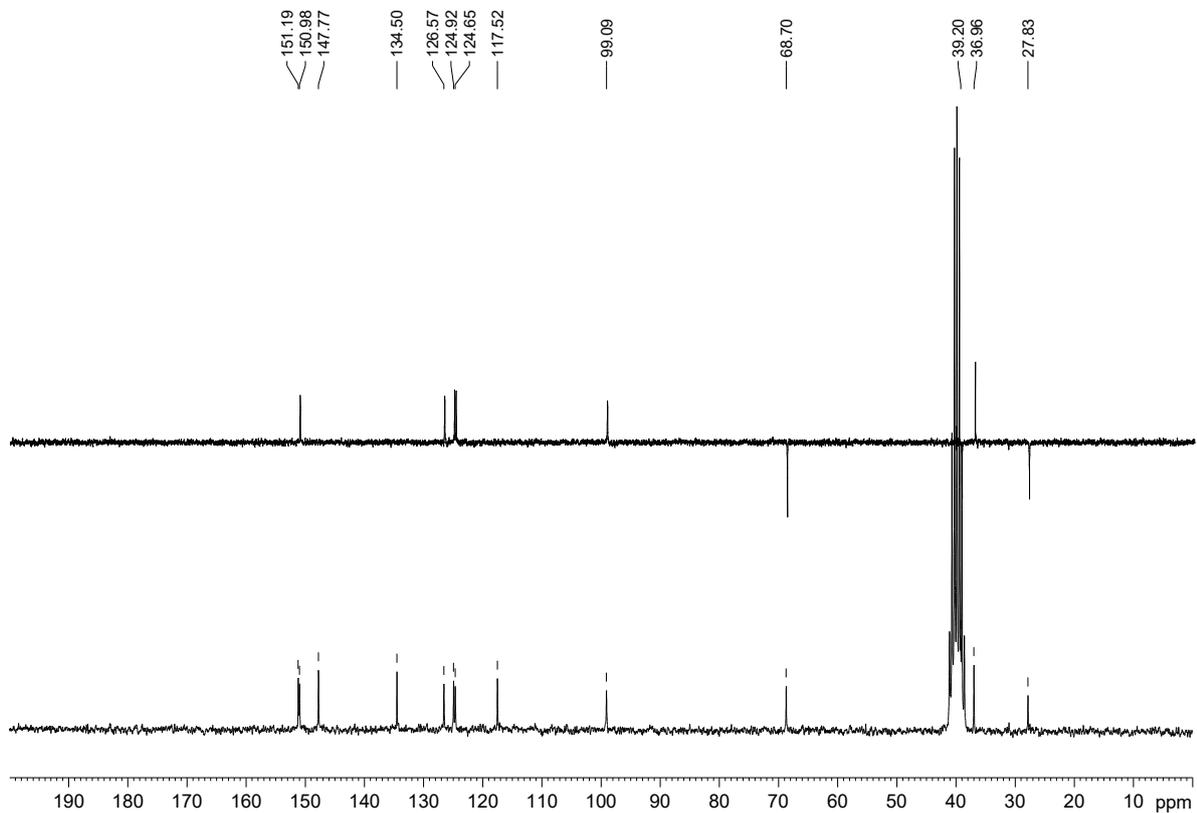


Figura A.13 - Espectro no infravermelho de 18a

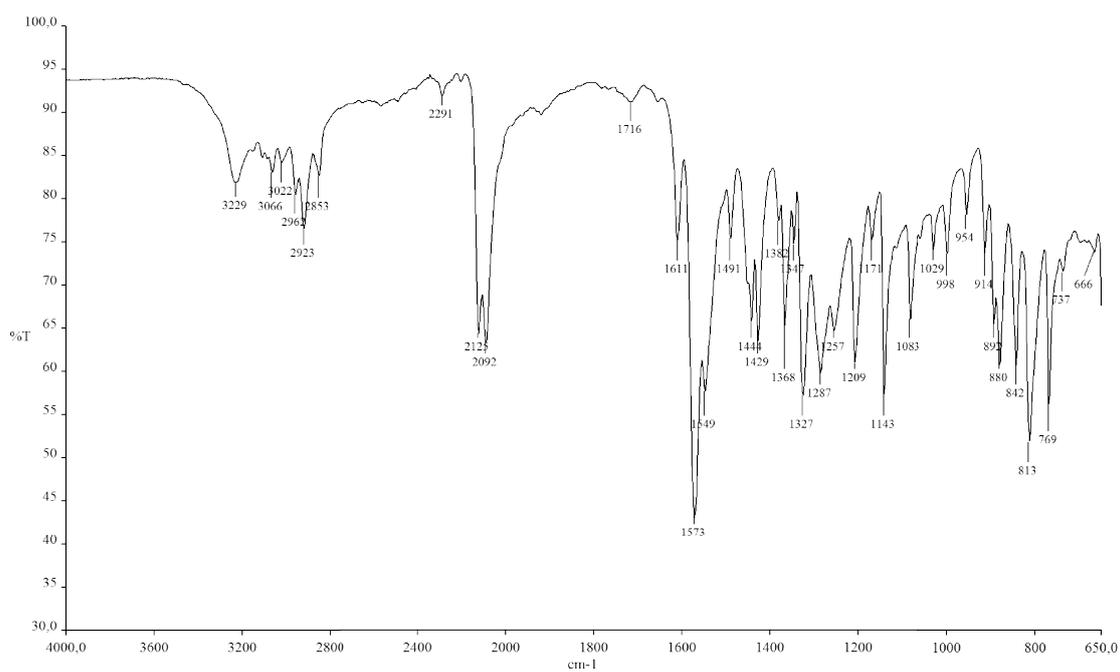


Figura A.14 - Espectro de RMN de ¹H de 18a (200MHz, CDCl₃)

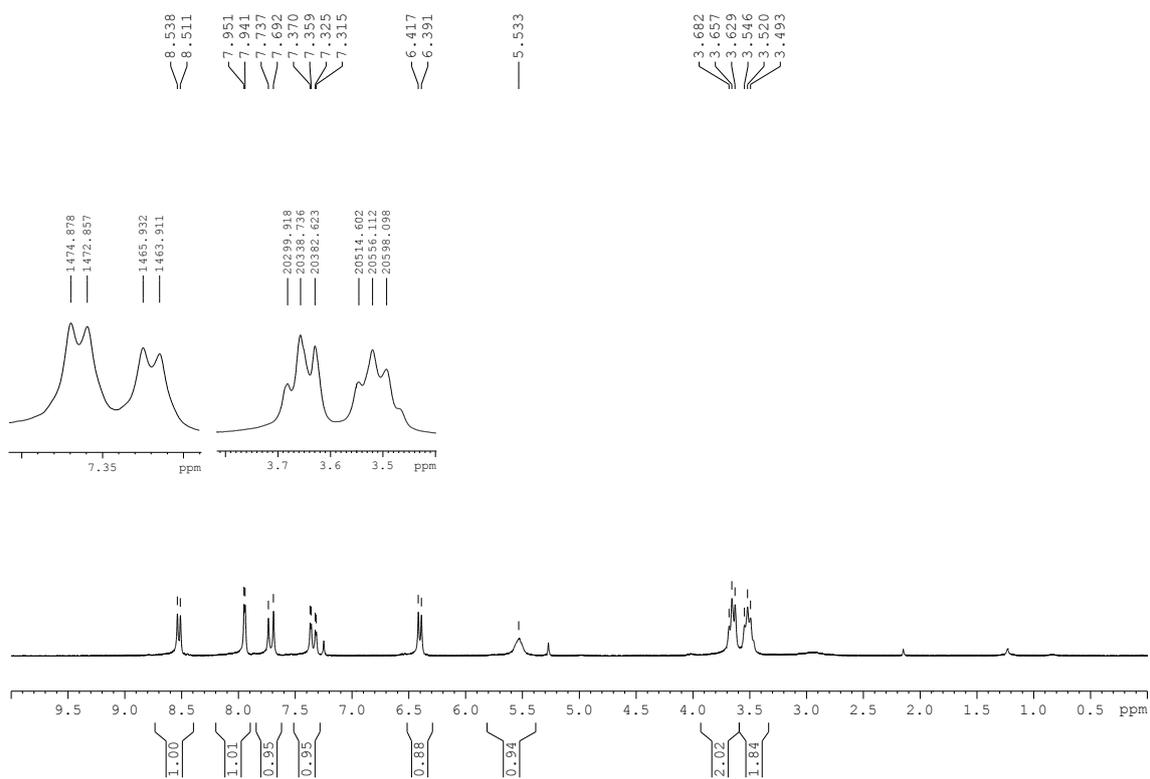


Figura A.15 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **18a** (50MHz, CDCl_3)

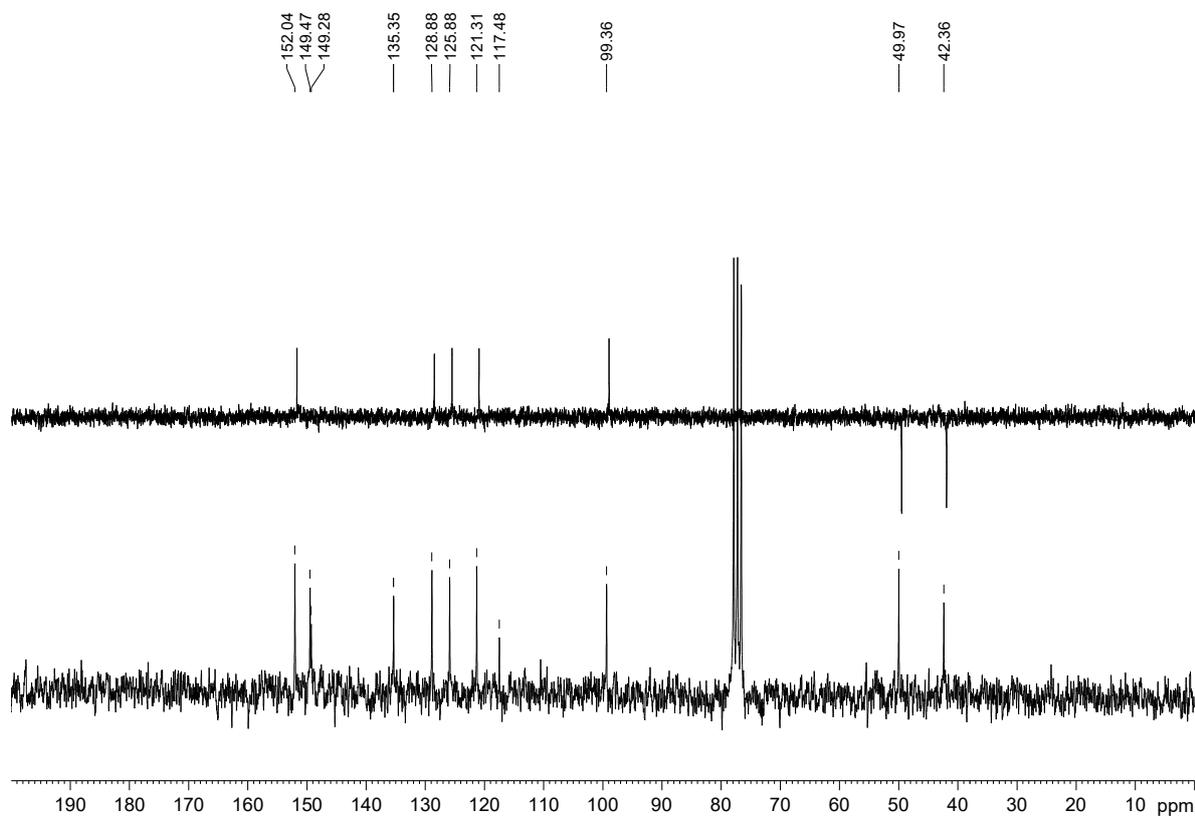


Figura A.16 - Espectro no infravermelho de **18b**

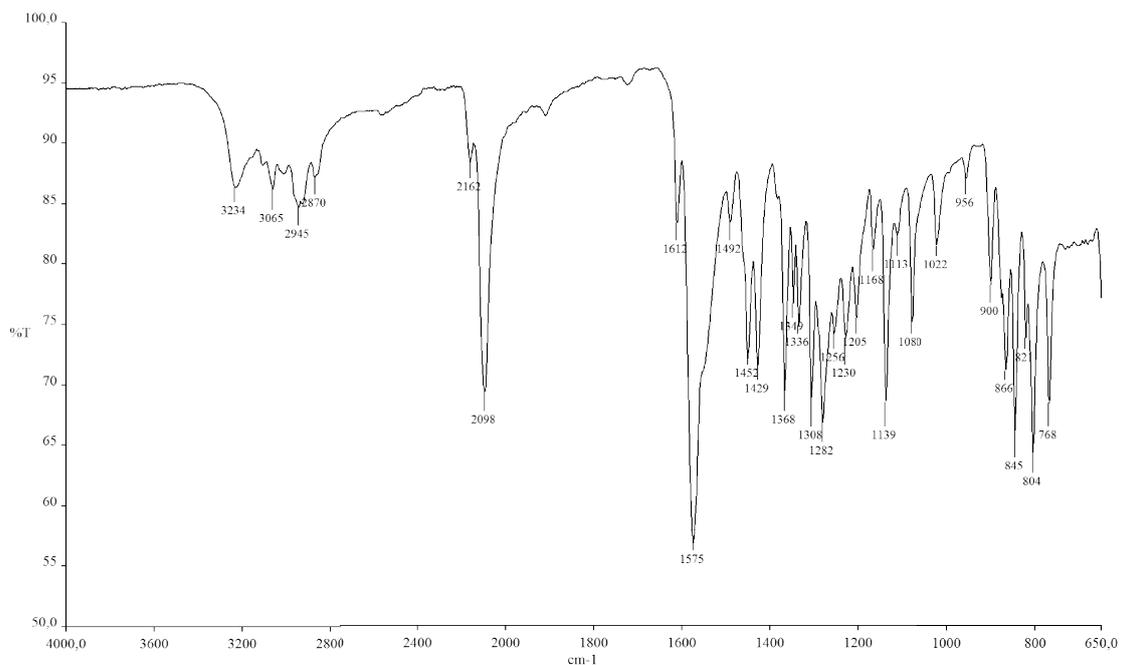


Figura A.17 - Espectro de RMN de ^1H de **18b** (200MHz, CDCl_3)

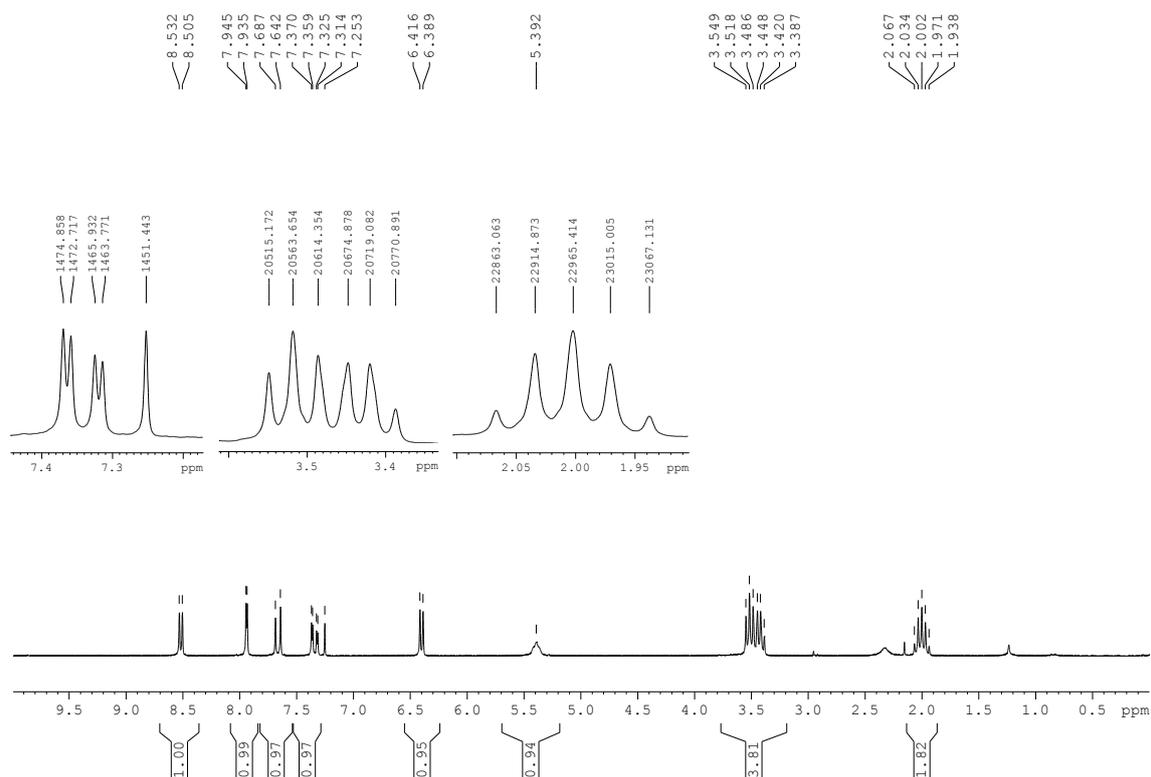


Figura A.18 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **18b** (50MHz, CDCl_3)

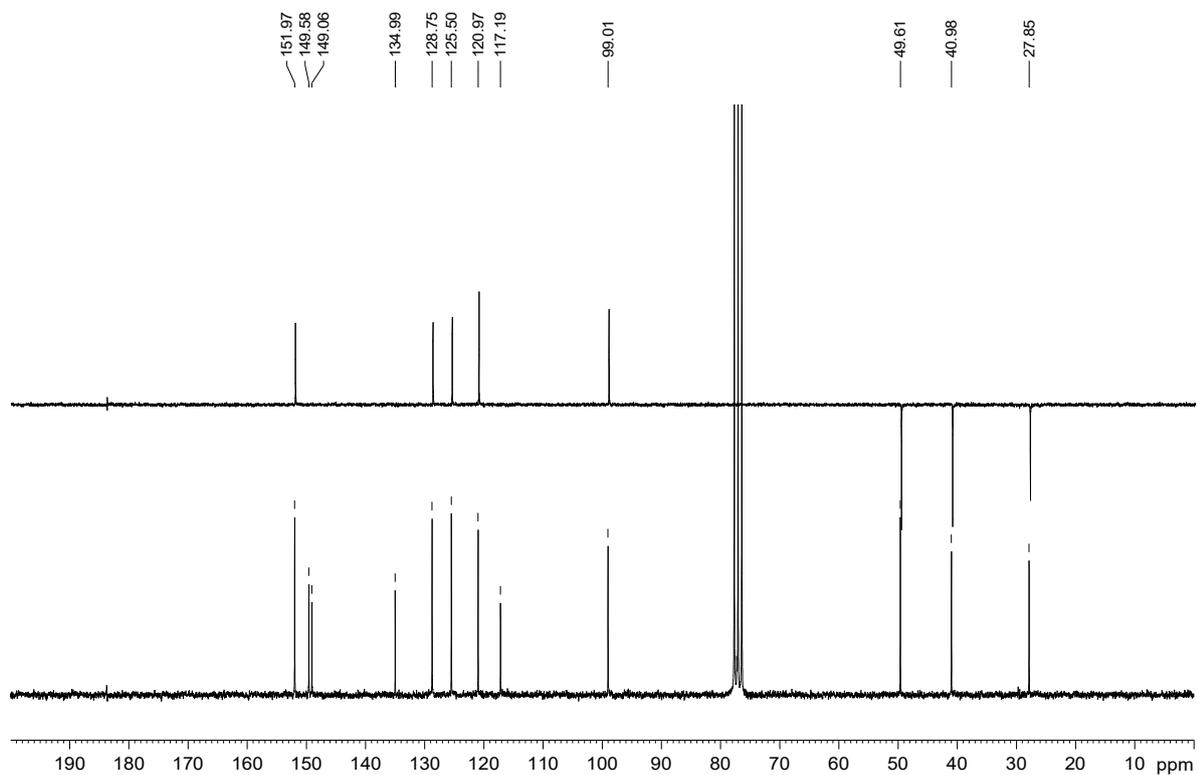


Figura A.19 - Espectro no infravermelho de 19a

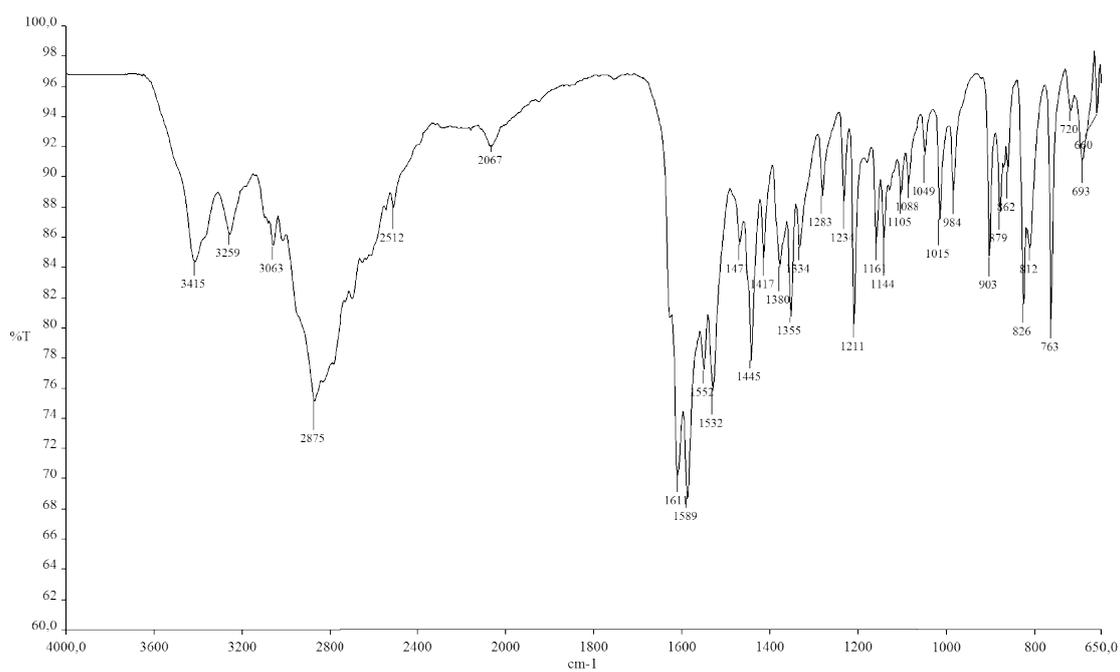


Figura A.20 - Espectro de RMN de ¹H de 19a (200MHz, D₂O)

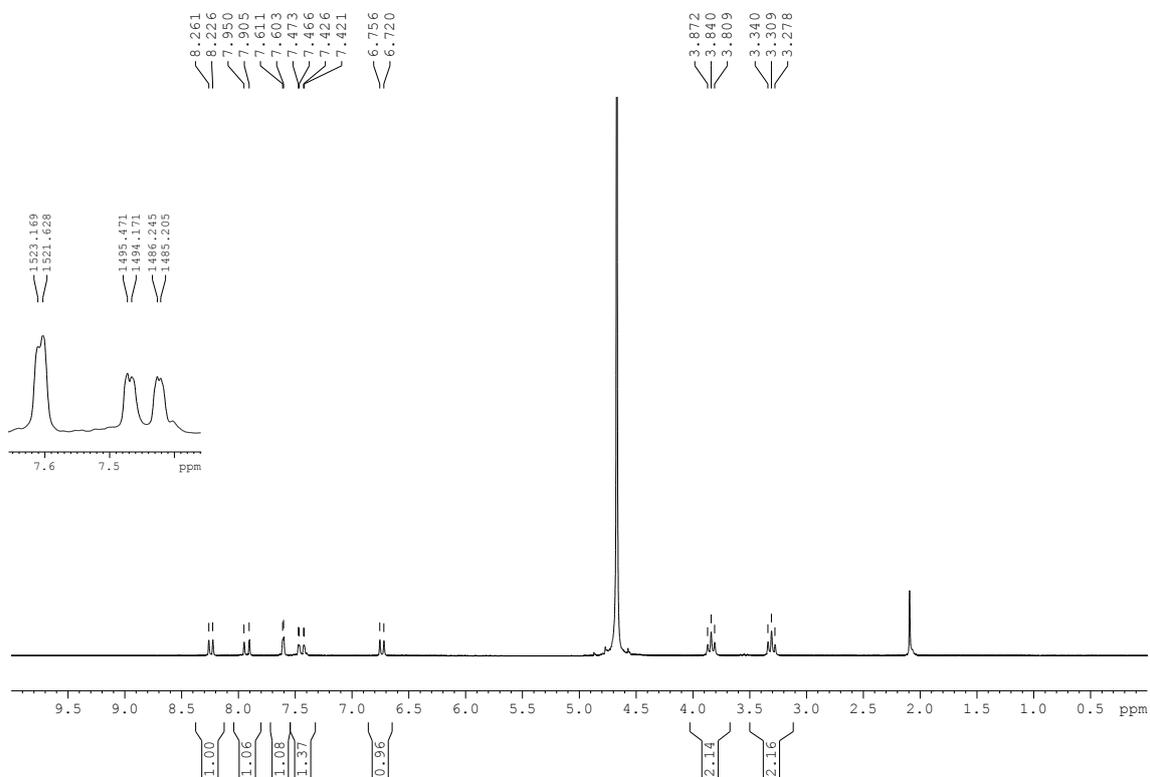


Figura A.21 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **19a** (50MHz, D_2O)

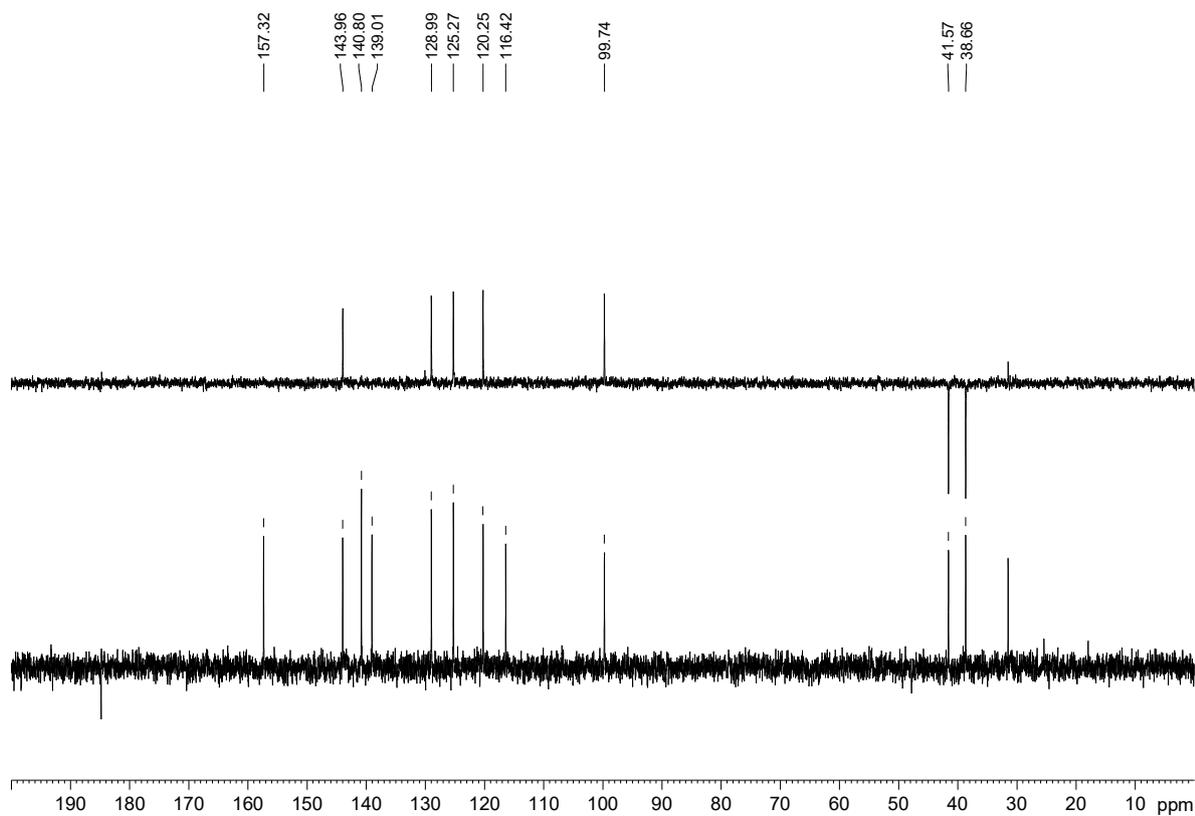


Figura A.22 - Espectro no infravermelho de **19b**

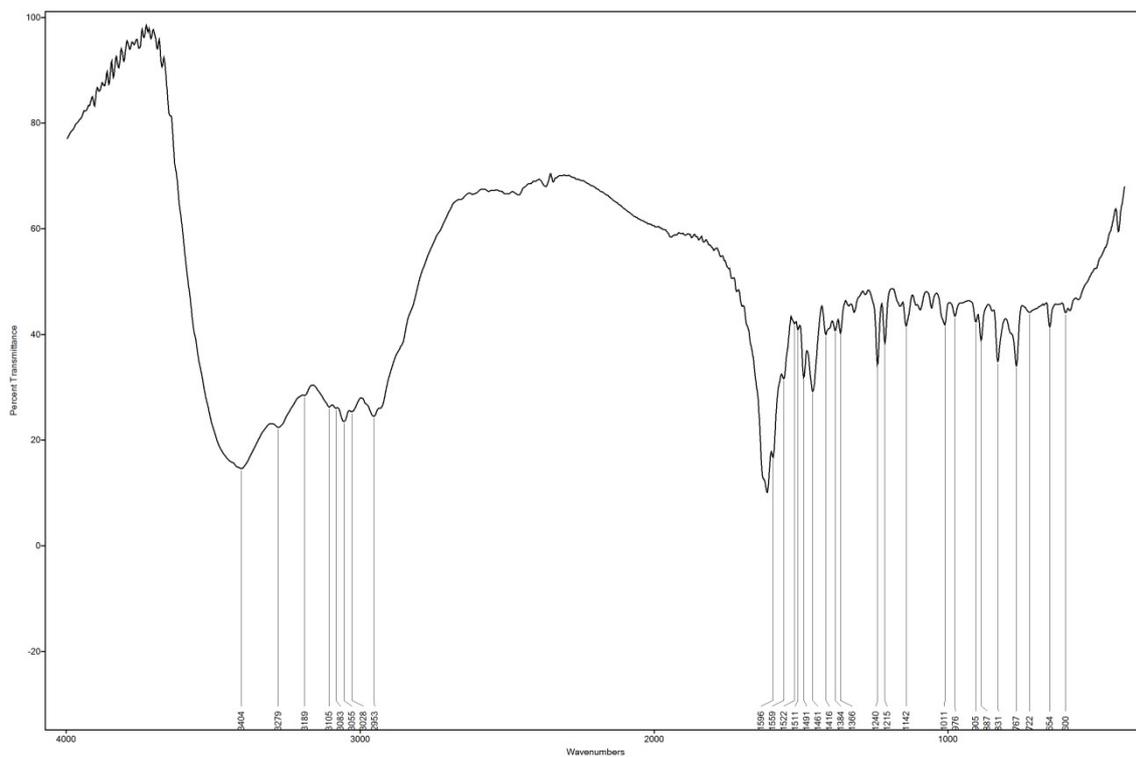


Figura A.23 - Espectro de RMN de ^1H de **19b (200MHz, D_2O)**

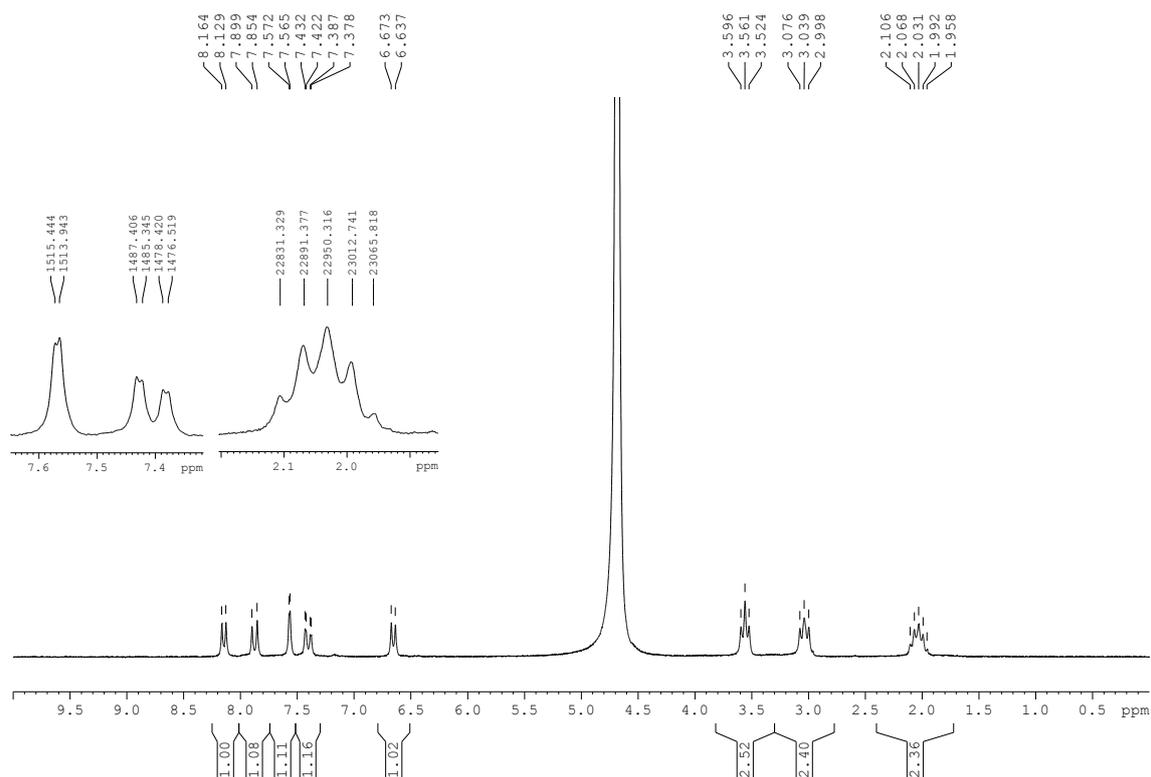


Figura A.24 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **19b (50MHz, D_2O)**

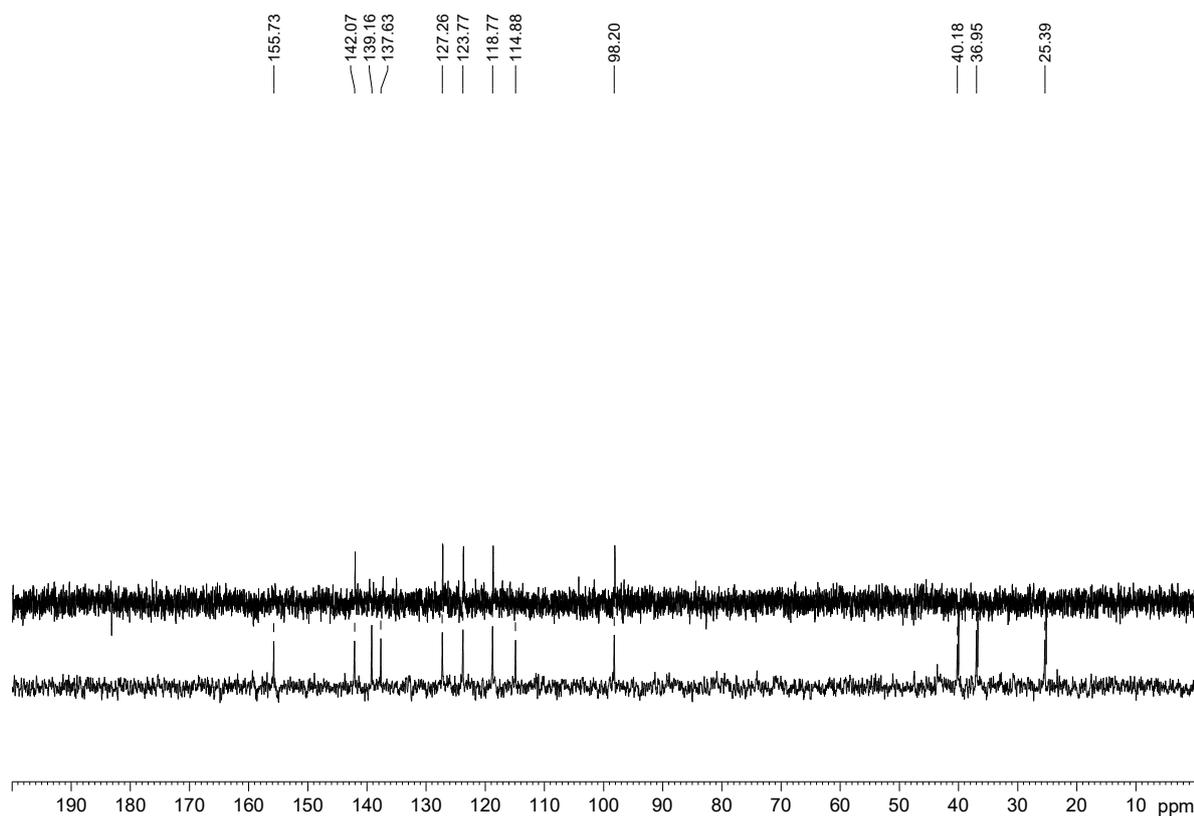


Figura A.25 - Espectro no infravermelho de 20a

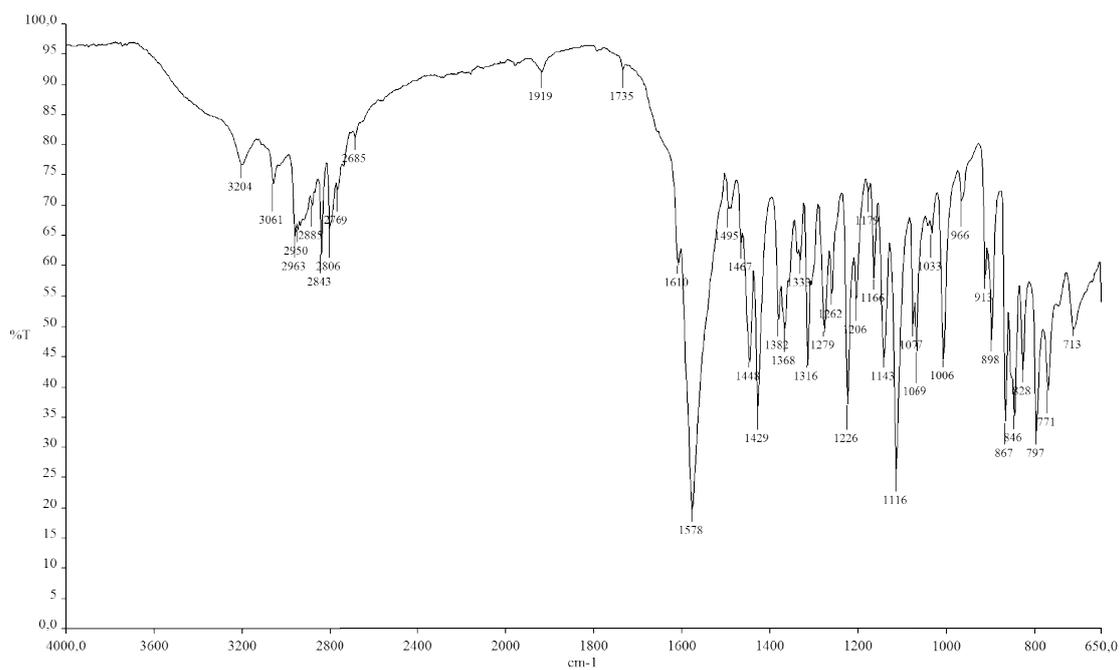


Figura A.26 - Espectro de RMN de ^1H de 20a (200MHz, DMSO- d_6)

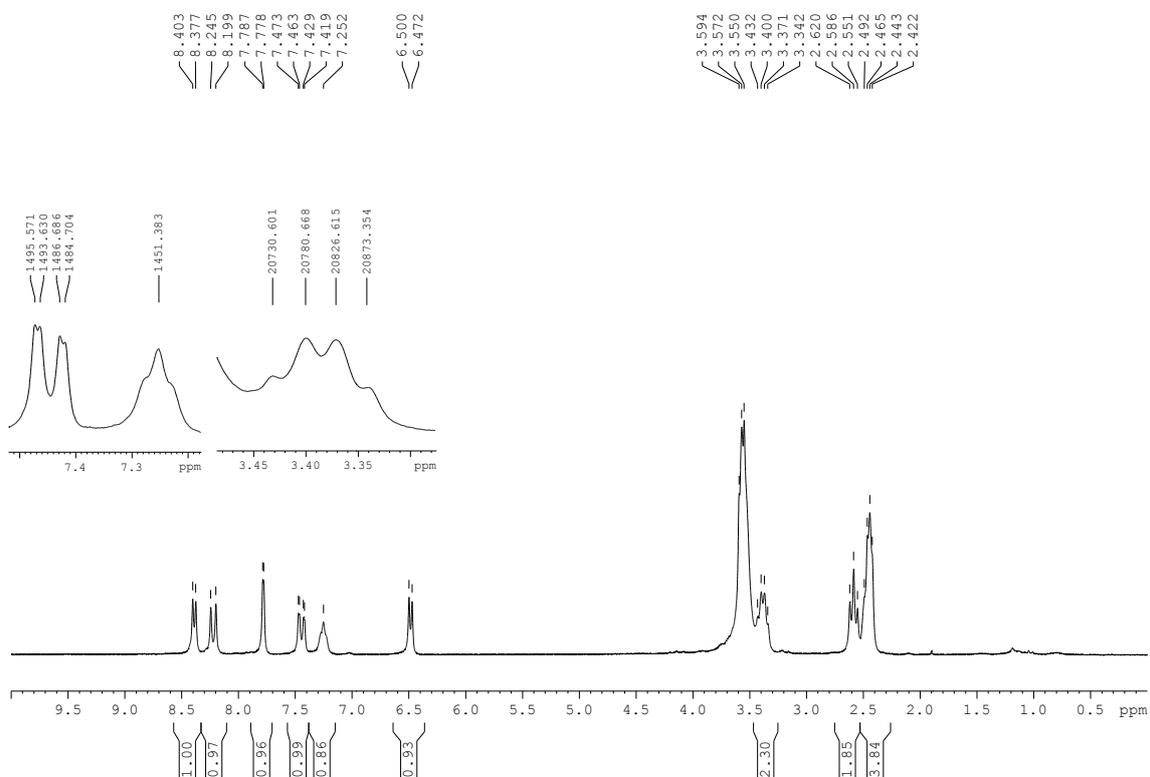


Figura A.27 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **20a** (50MHz, DMSO- d_6)

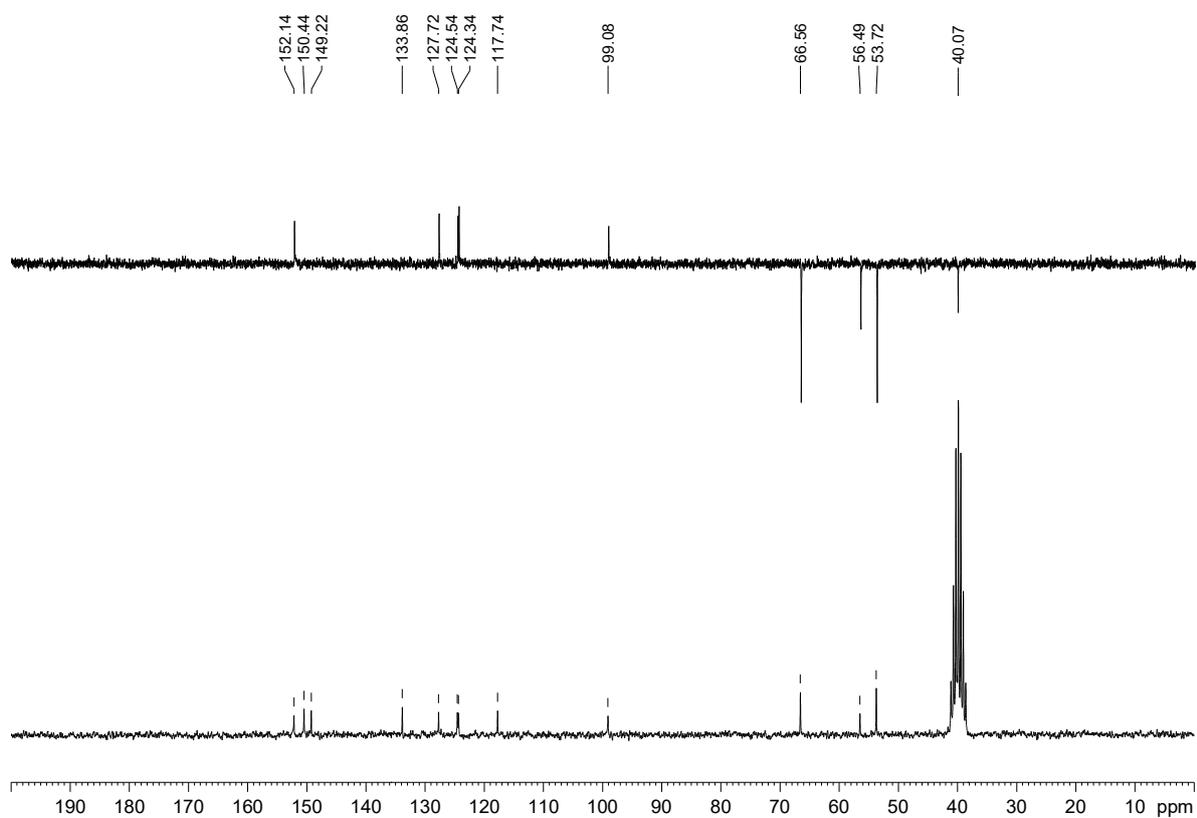


Figura A.28 - Espectro no infravermelho de **20b**

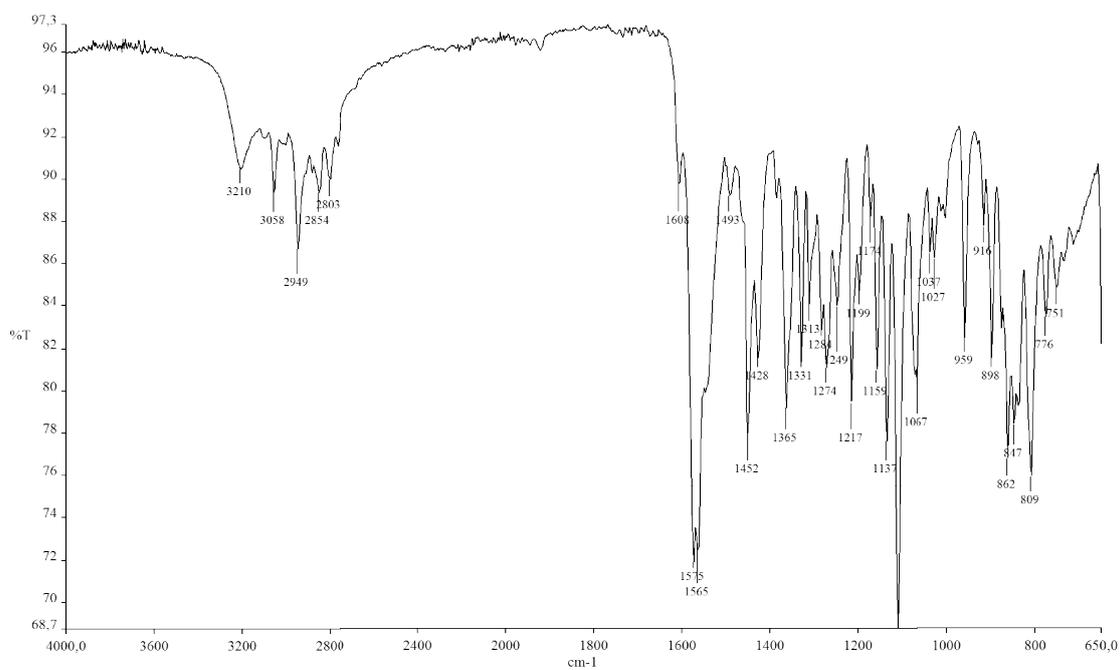


Figura A.29 - Espectro de RMN de ^1H de **20b** (400MHz, DMSO- d_6)

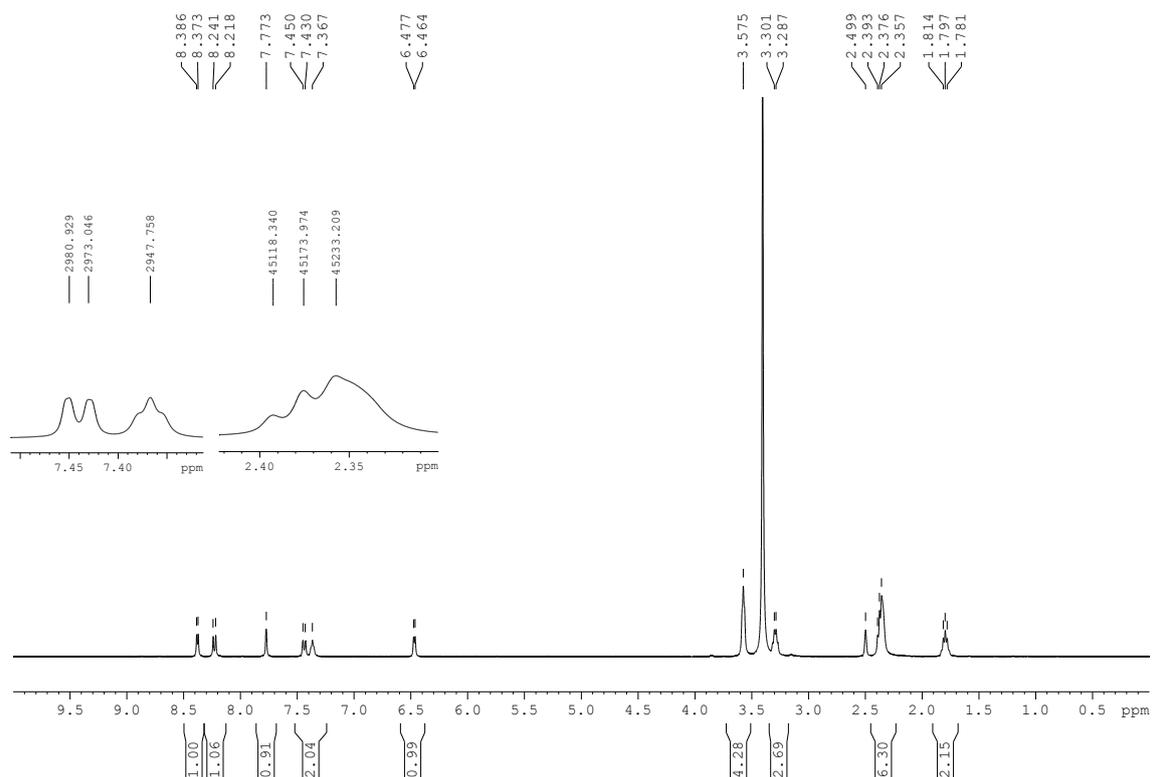


Figura A.30 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **20b** (50MHz, DMSO- d_6)

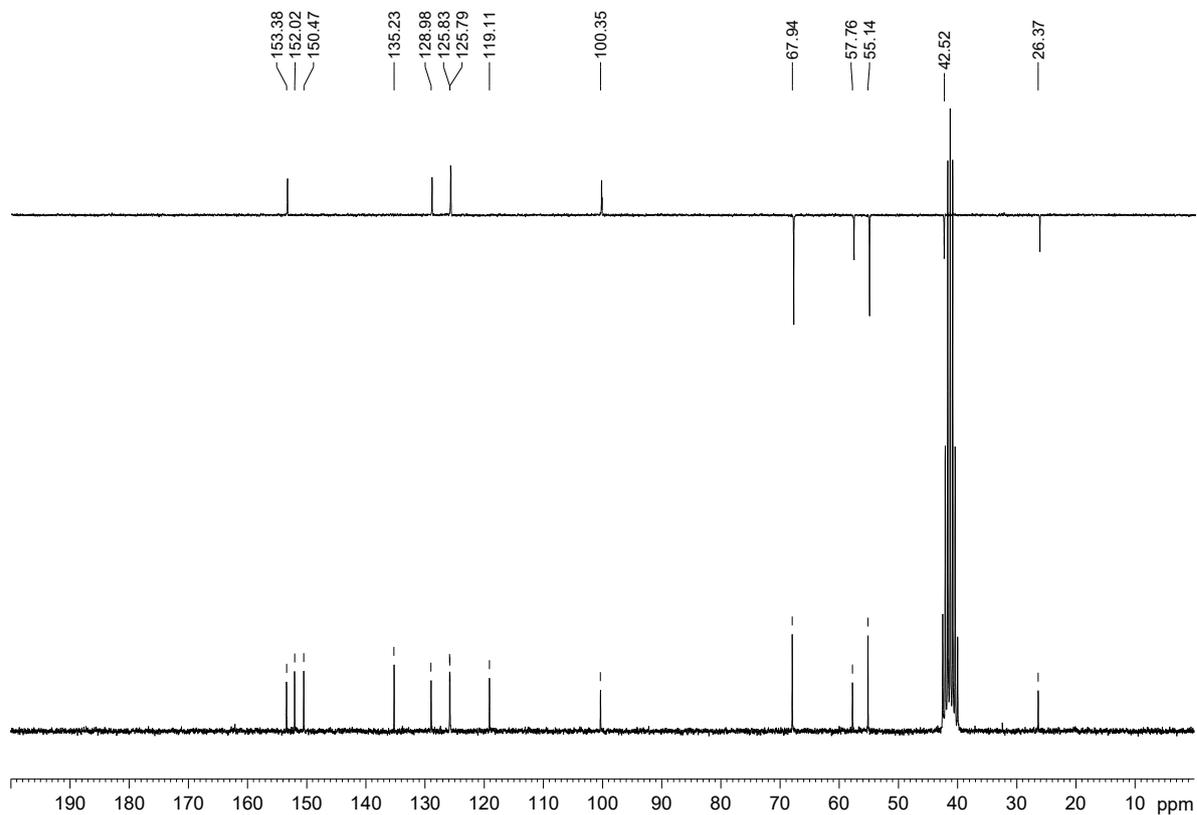


Figura A.31 - Espectro no infravermelho de 21a

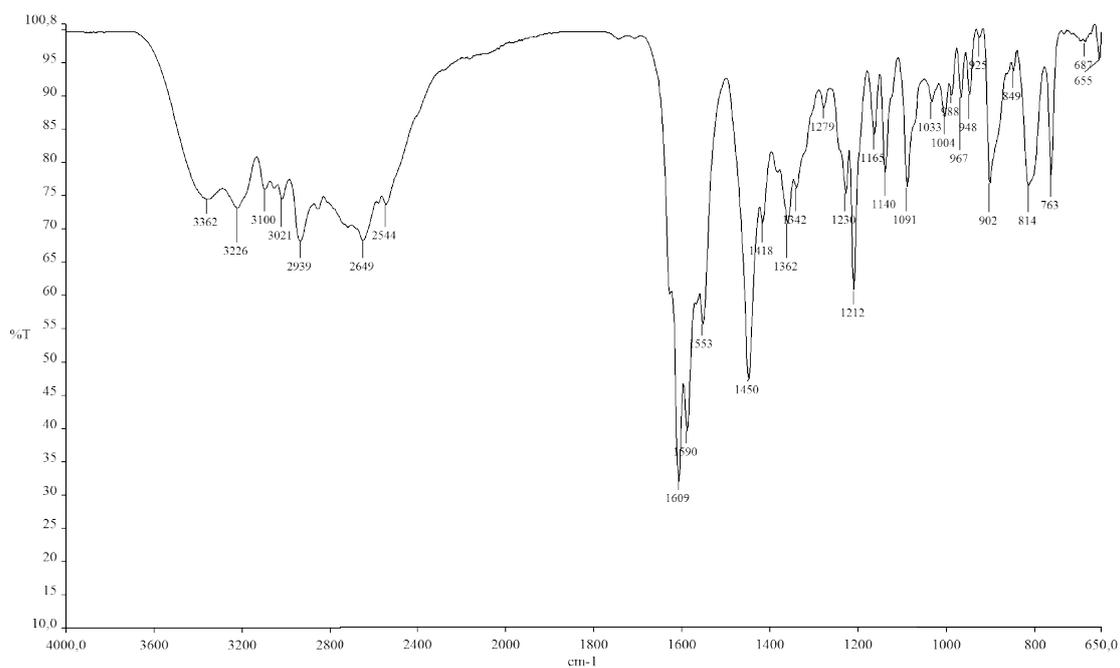
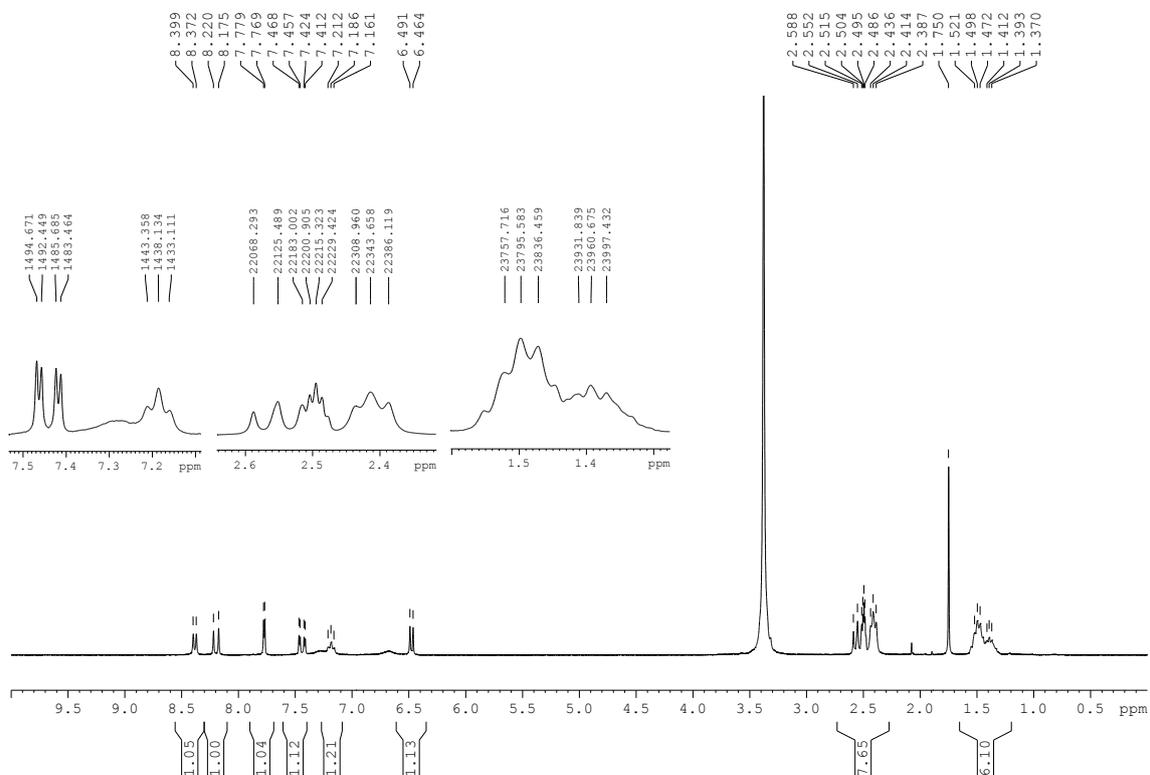
Figura A.32 - Espectro de RMN de ¹H de 21a (200MHz, DMSO-d₆)

Figura A.33 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **21a** (50MHz, DMSO- d_6)

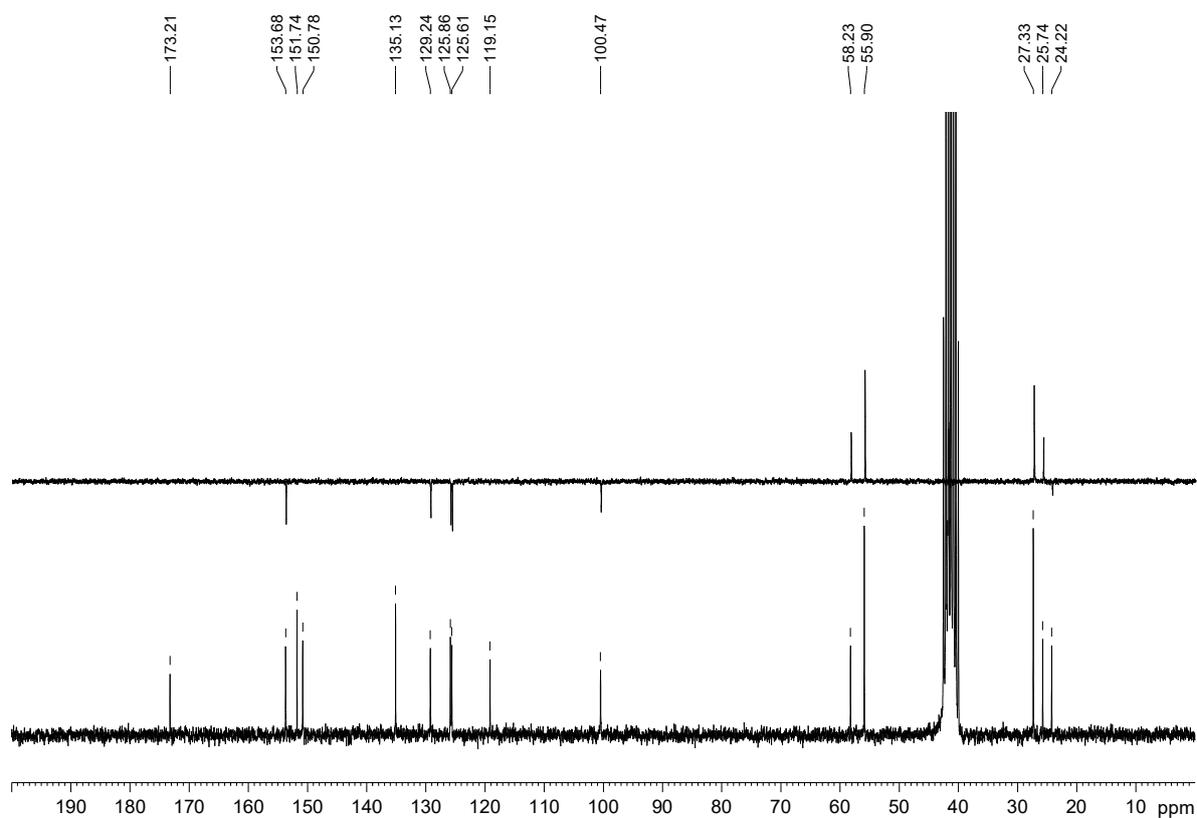


Figura A.34 - Espectro no infravermelho de **21b**

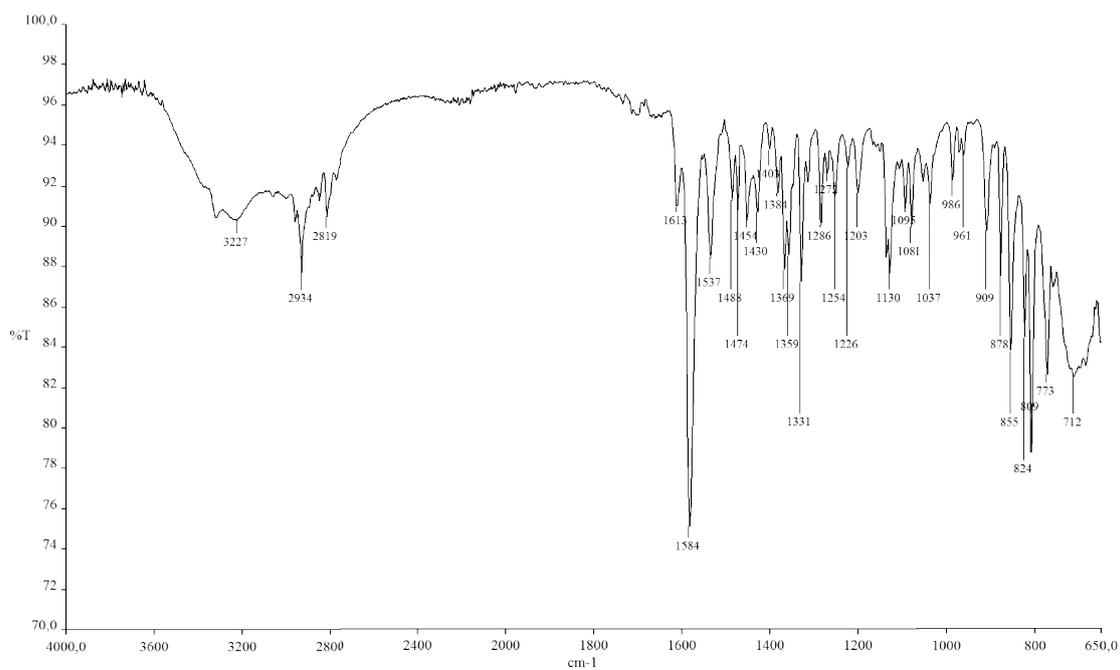


Figura A.35 - Espectro de RMN de ^1H de **21b** (200MHz, DMSO- d_6)

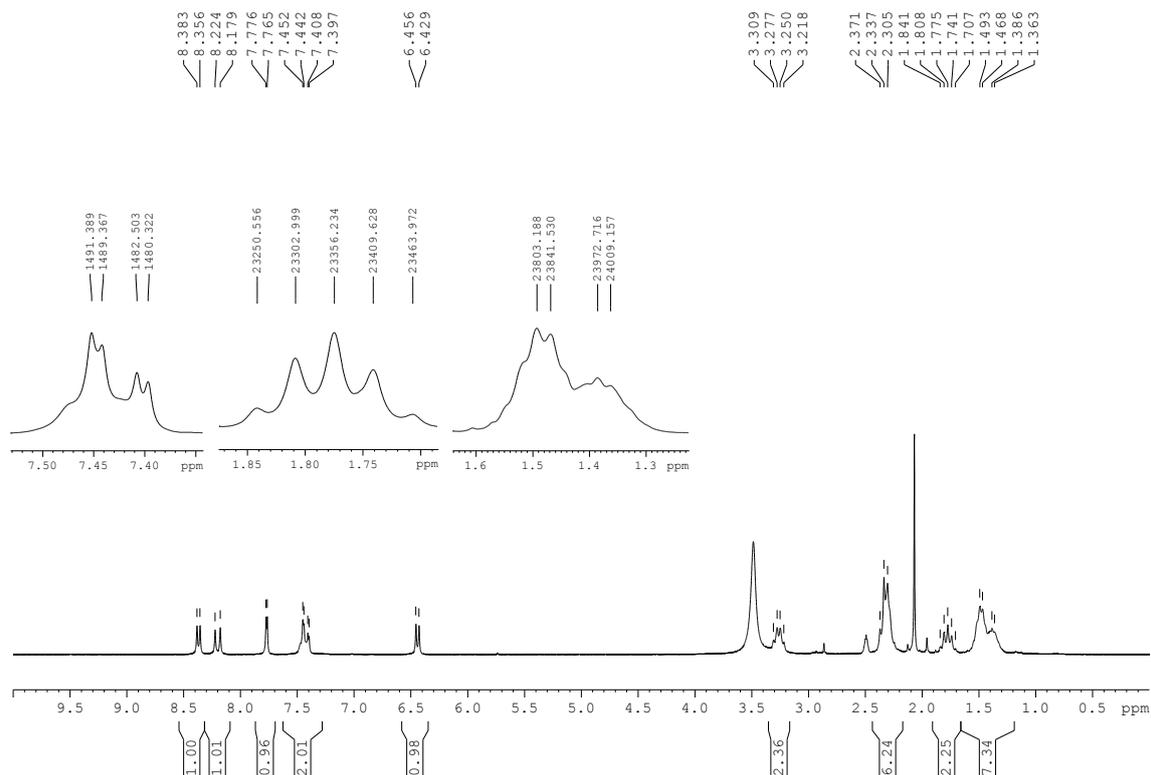


Figura A.36 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **21b** (50MHz, DMSO- d_6)

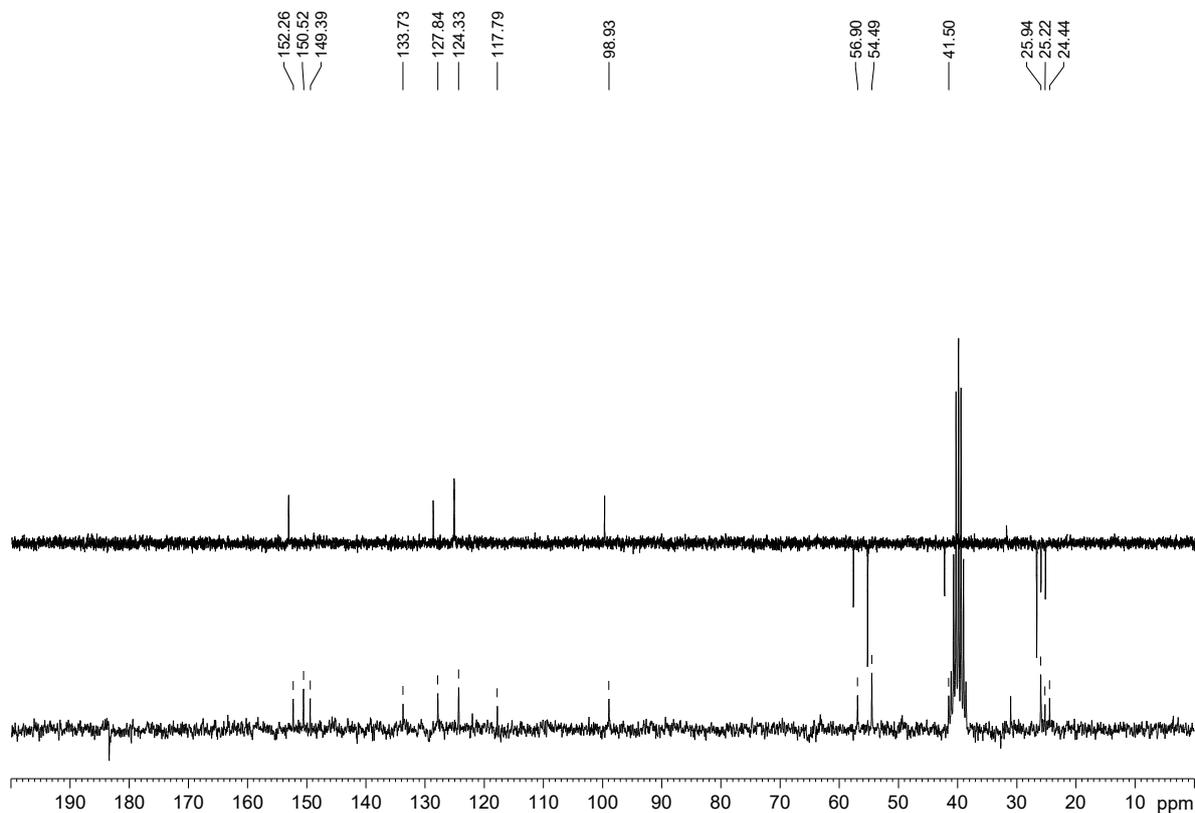


Figura A.37 - Espectro no infravermelho de 22

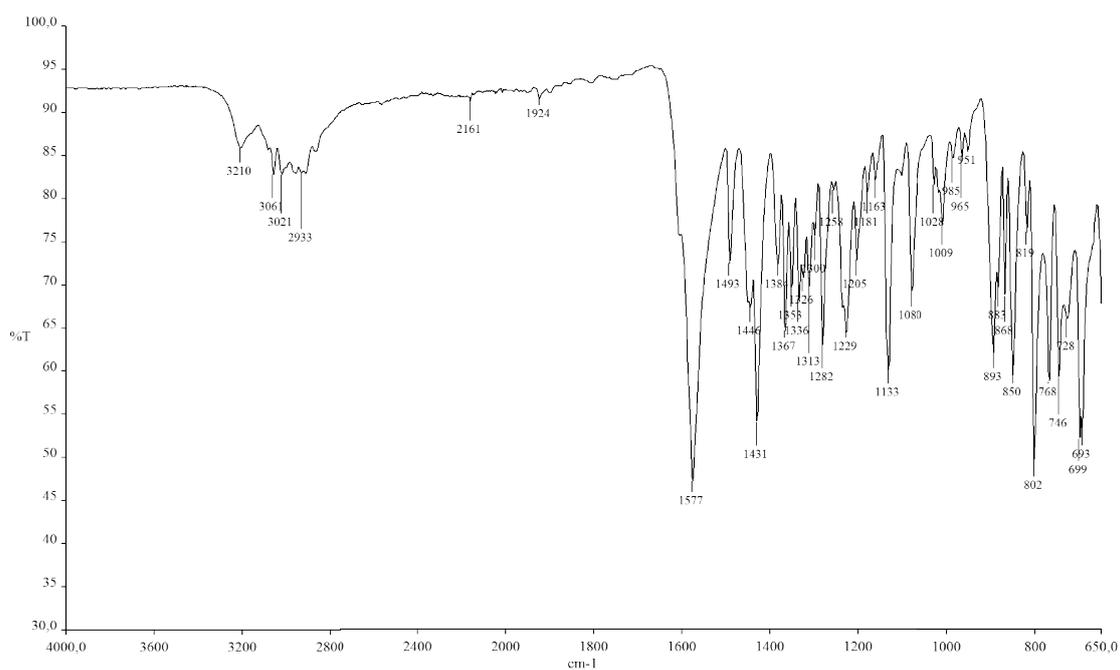


Figura A.38 - Espectro de RMN de ¹H de 22 (200MHz, CDCl₃)

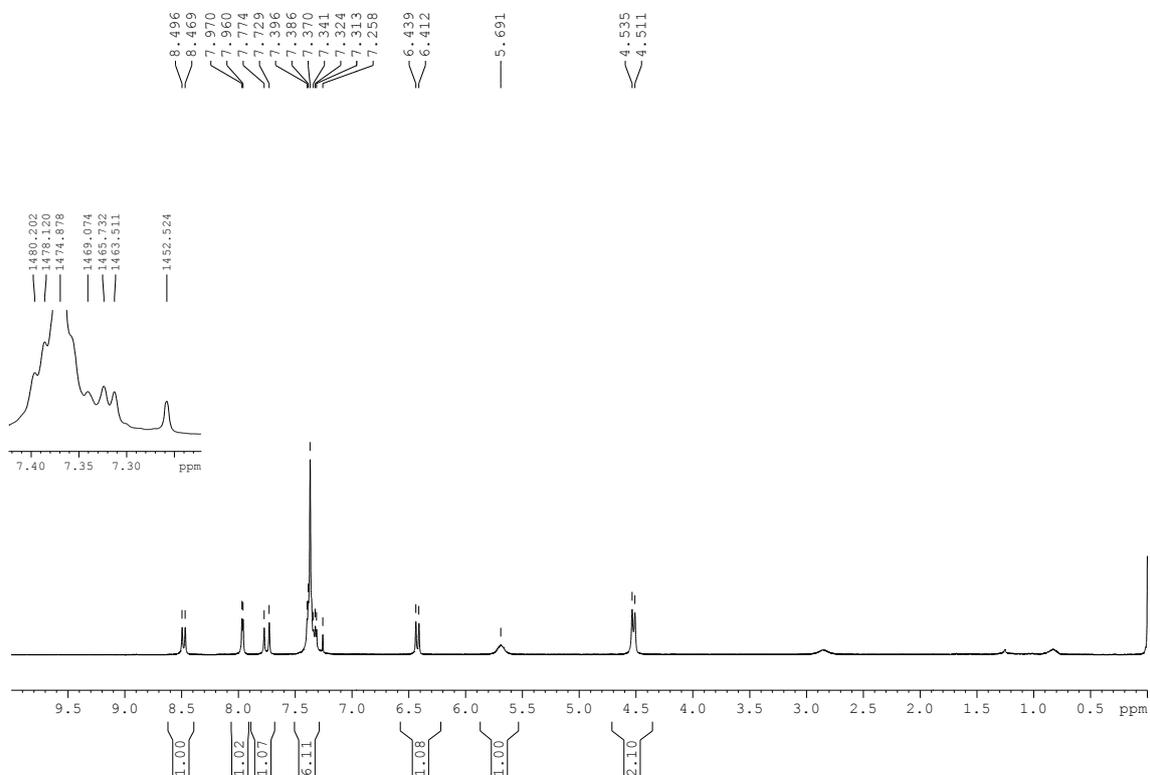


Figura A.39 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **22** (50MHz, CDCl_3)

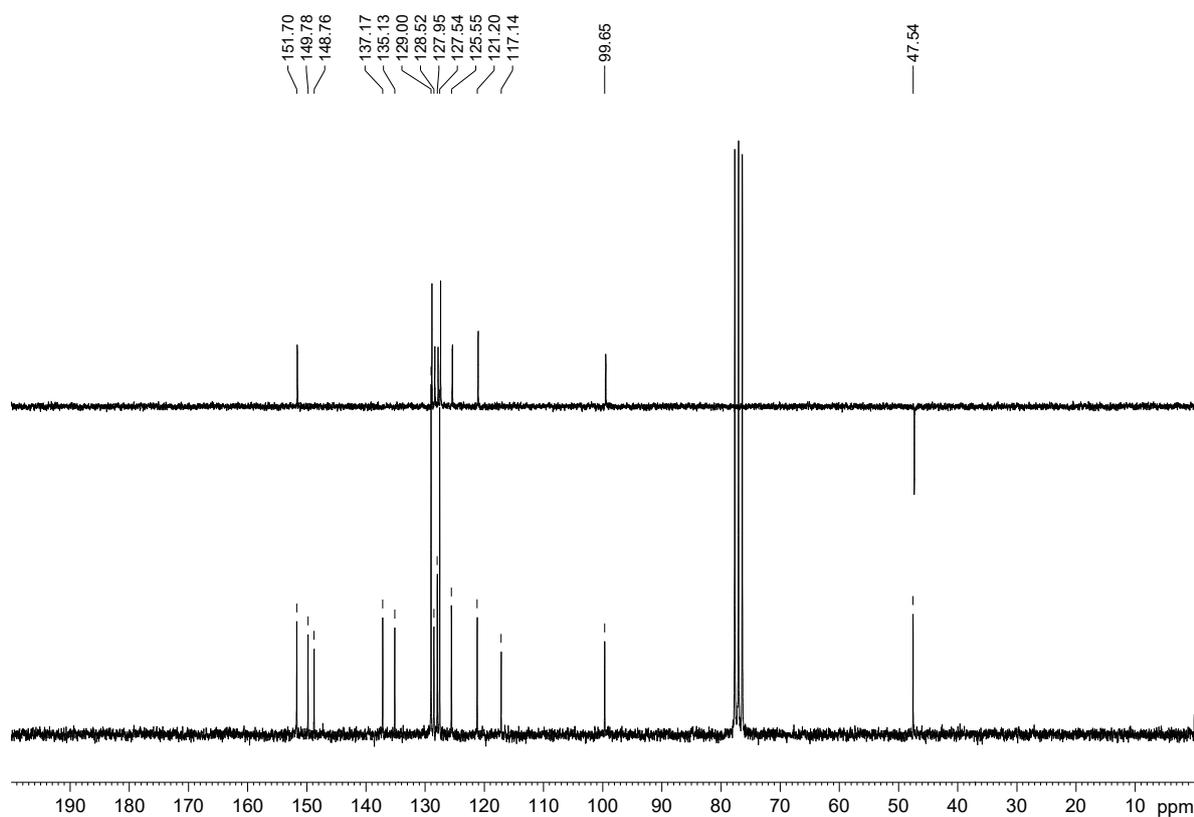


Figura A.40 - Espectro no infravermelho de **23**

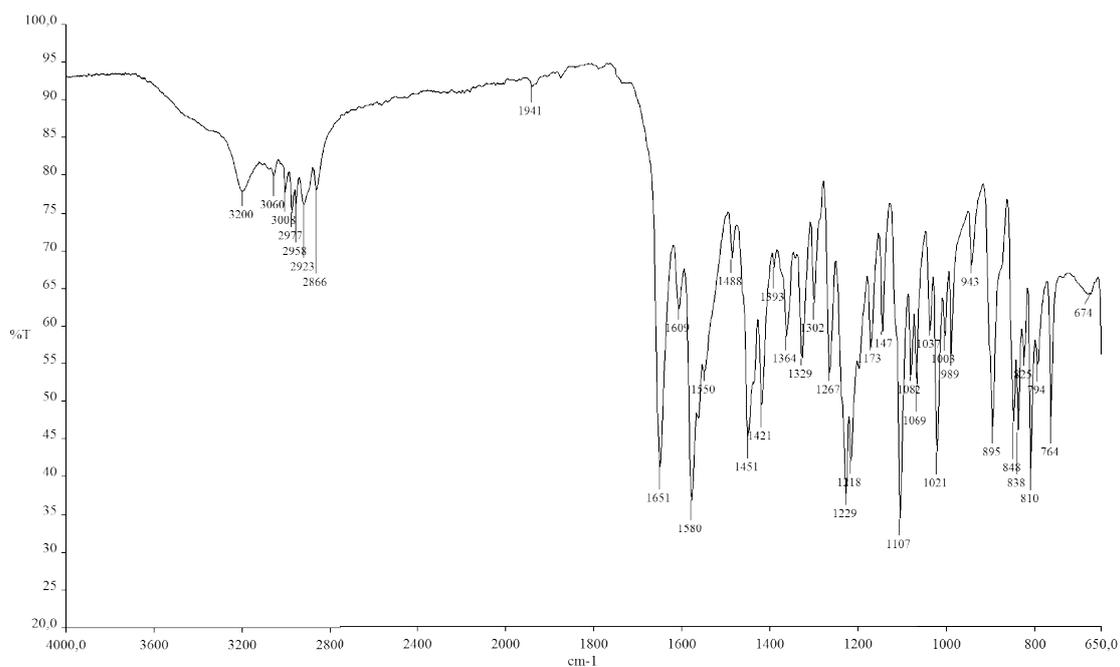


Figura A.41 - Espectro de RMN de ^1H de **23** (200MHz, DMSO- d_6)

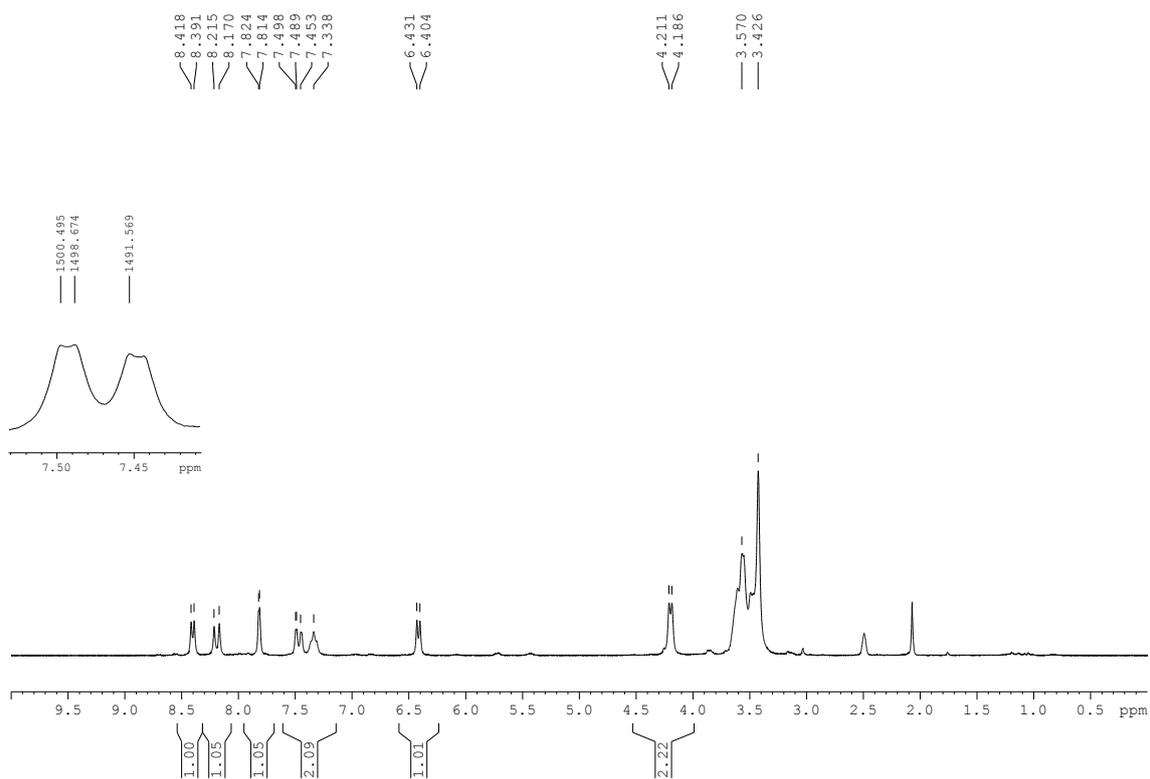


Figura A.42 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **23** (50MHz, DMSO- d_6)

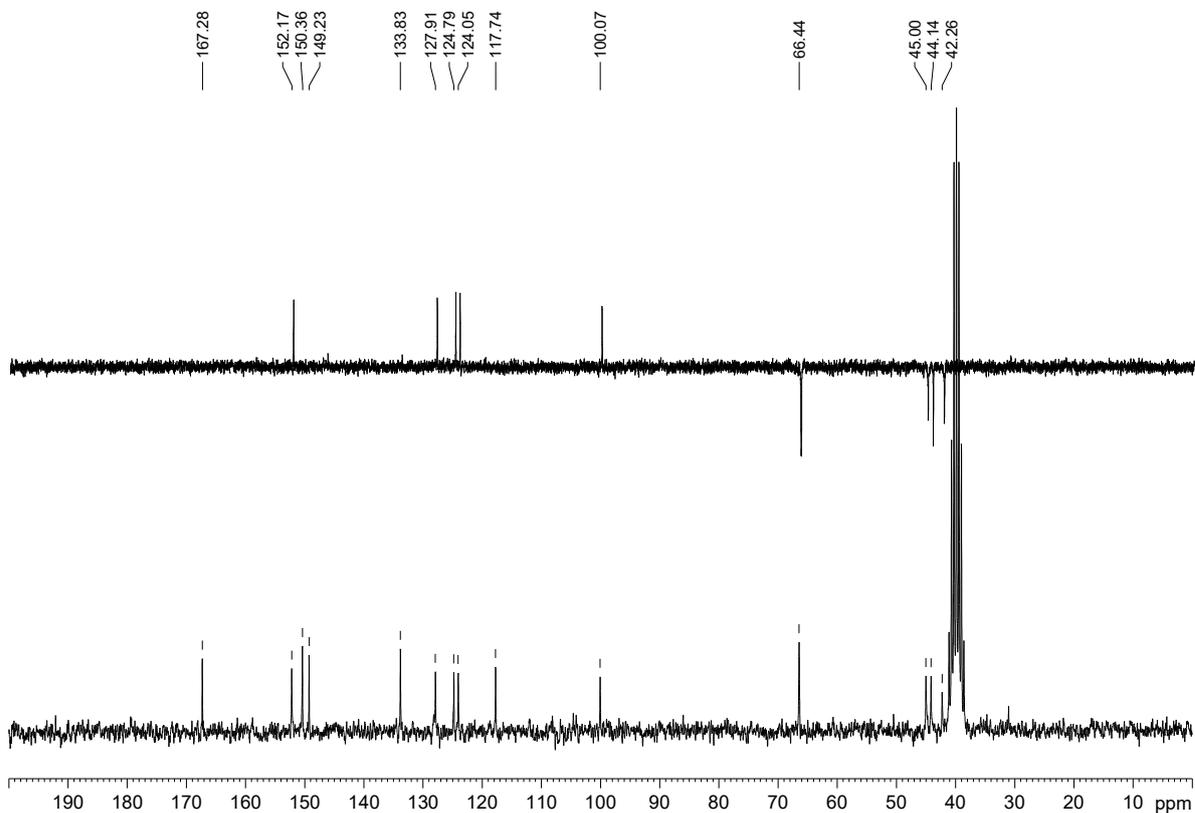


Figura A.43 - Espectro no infravermelho de 24

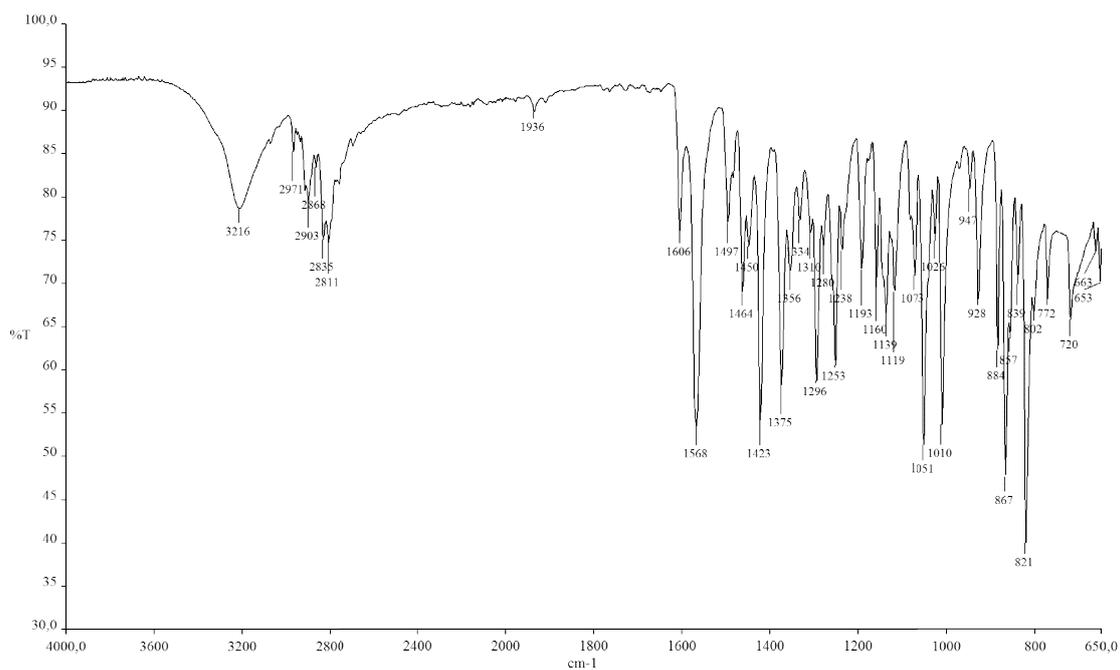
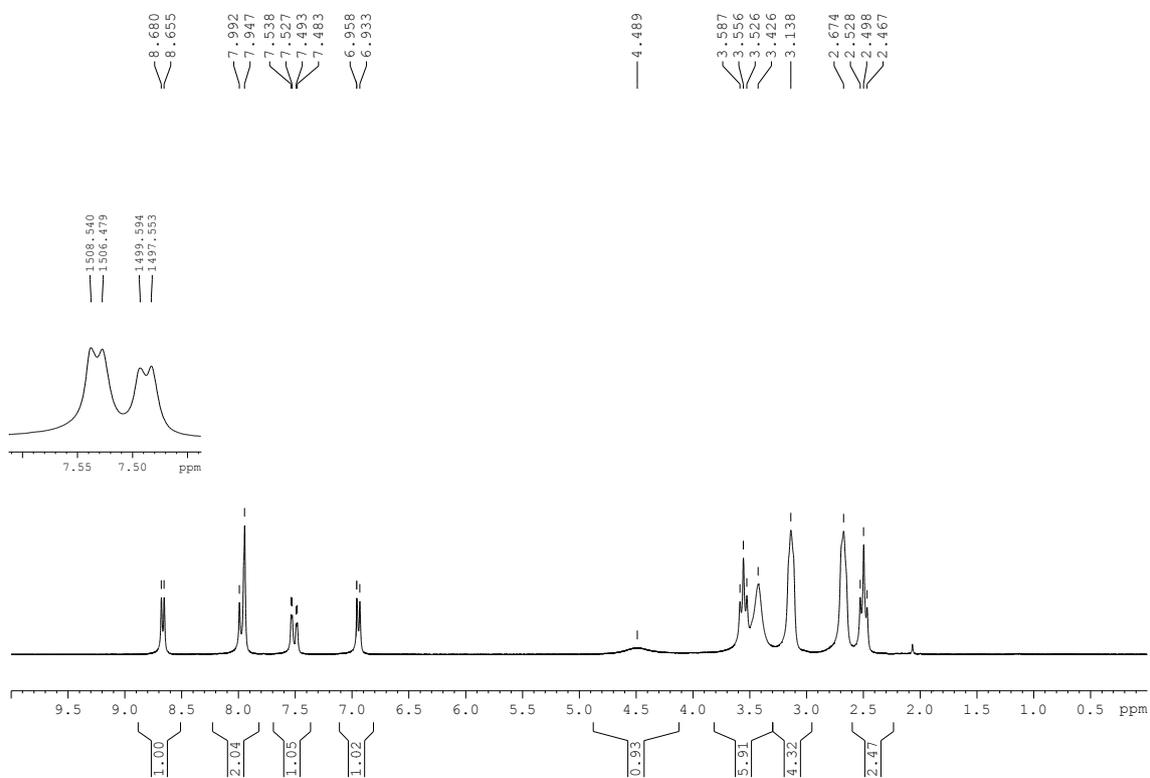
Figura A.44 - Espectro de RMN de ¹H de 24 (200MHz, DMSO-d₆)

Figura A.45 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **24** (50MHz, DMSO- d_6)

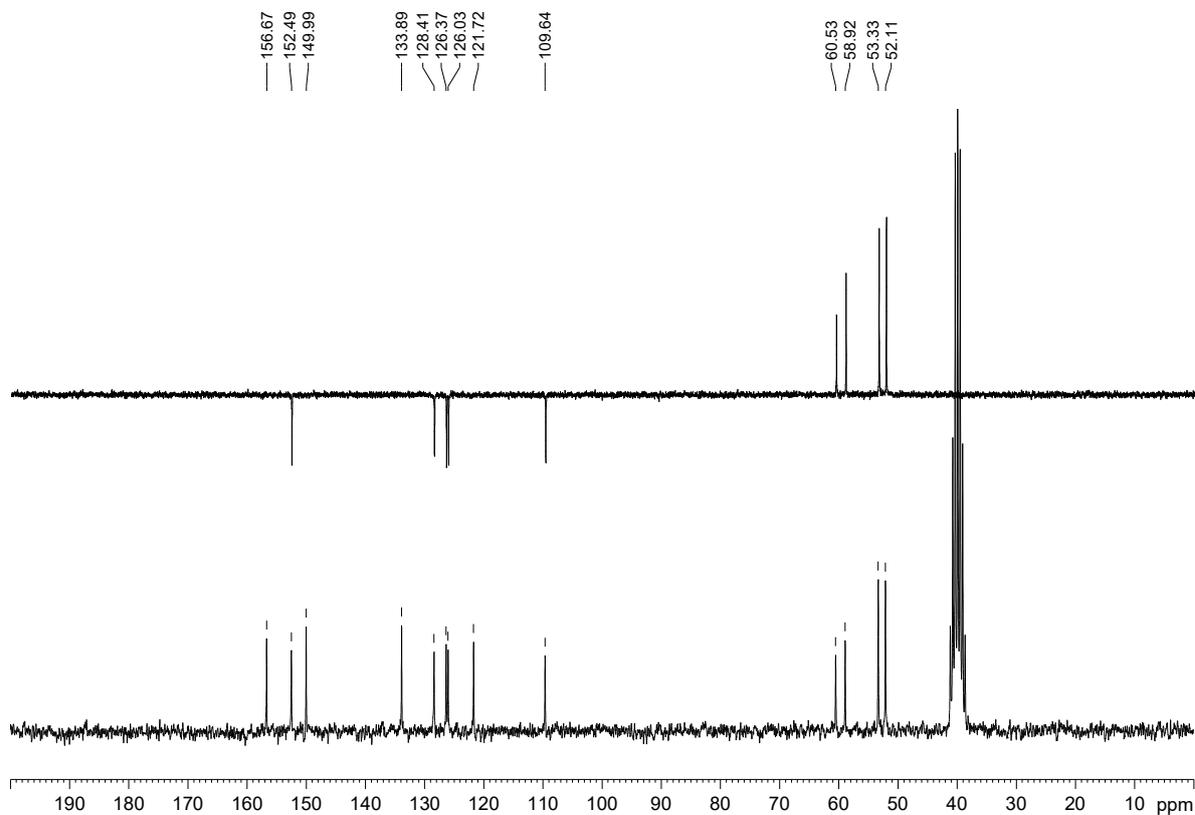


Figura A.46 - Espectro no infravermelho de **25**

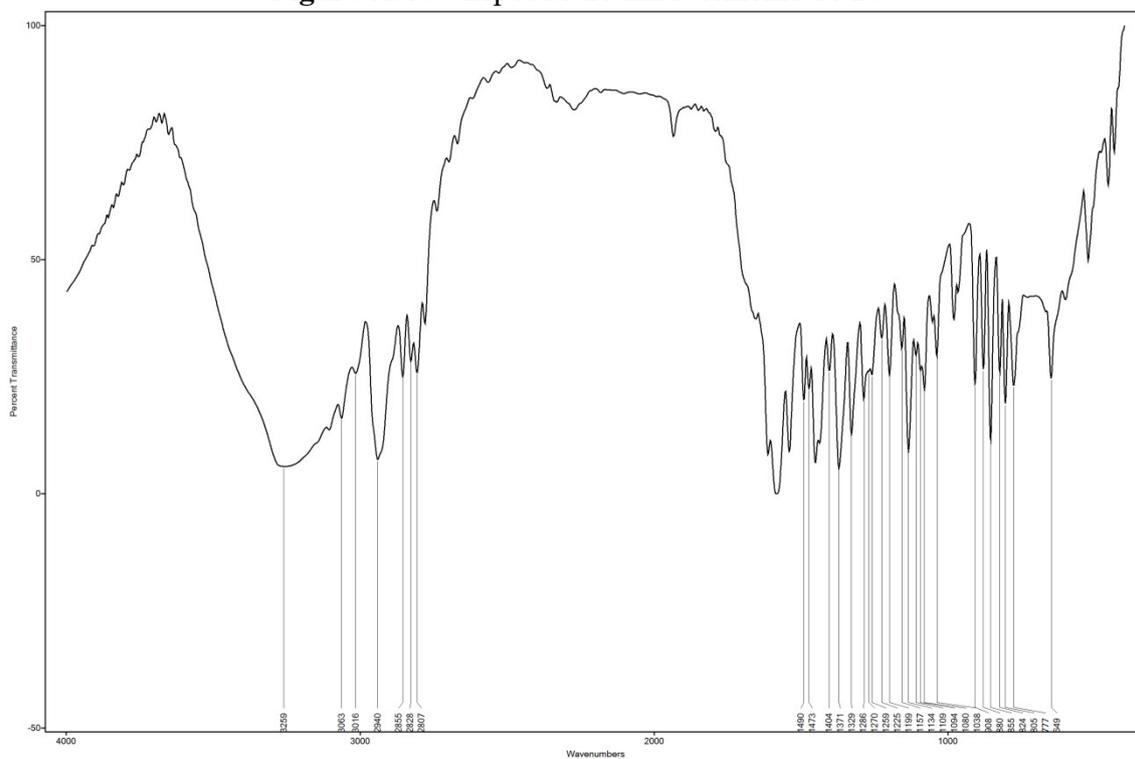


Figura A.47 - Espectro de RMN de ^1H de **25 (200MHz, CDCl_3)**

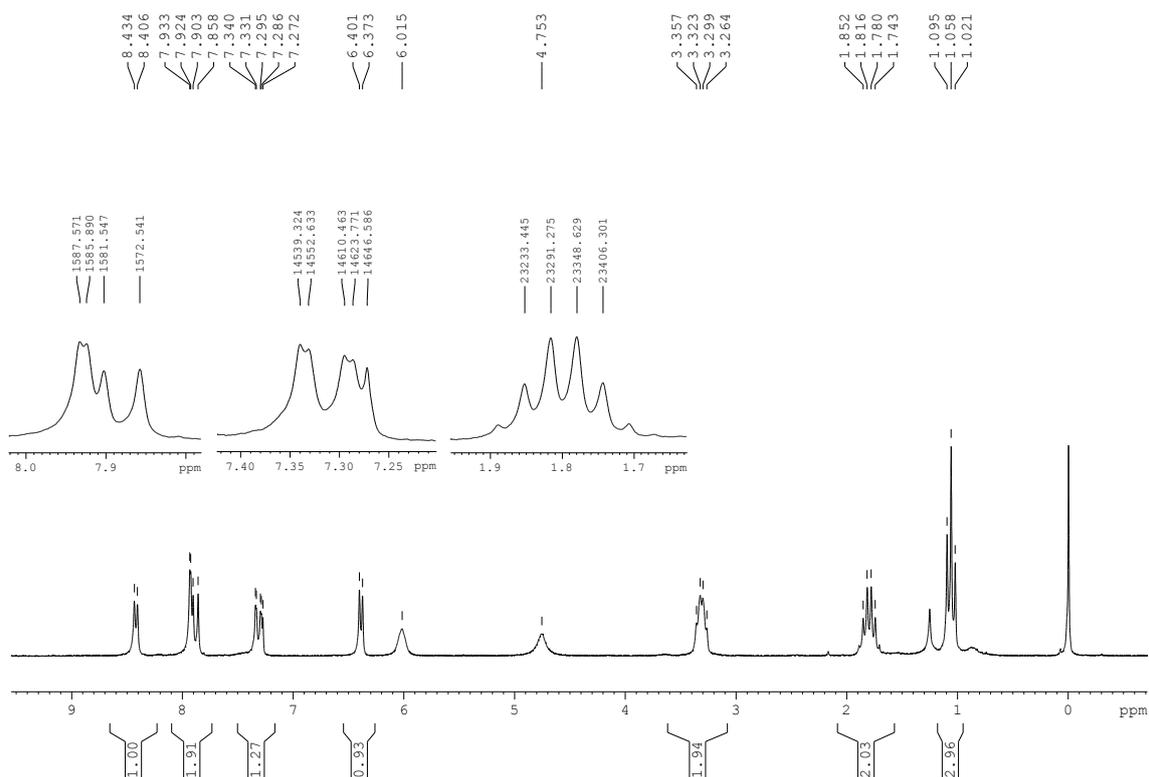
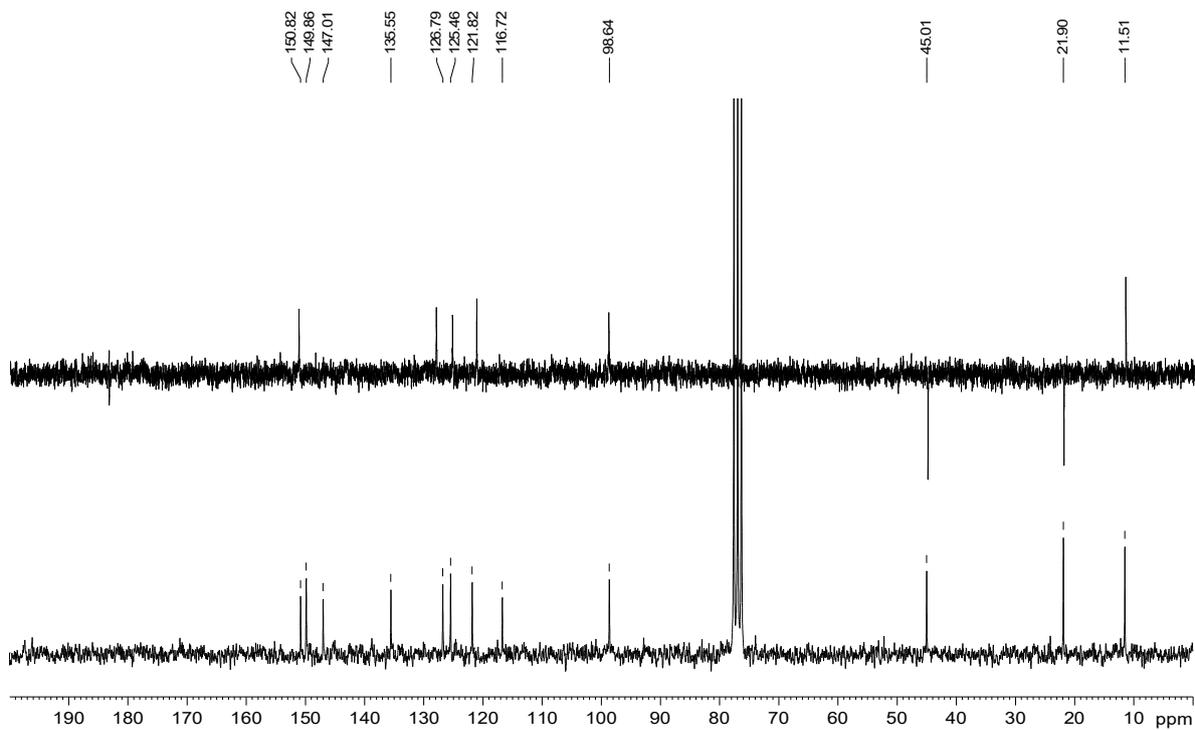


Figura A.48 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT-135 de **25 (50MHz, CDCl_3)**



ANEXO B - Dados da parametrização da substância 20b

Figura B.1 – Numeração dos átomos da estrutura química da substância **20b** utilizada no cálculo de cargas. A numeração apresentada não segue a recomendação da IUPAC.

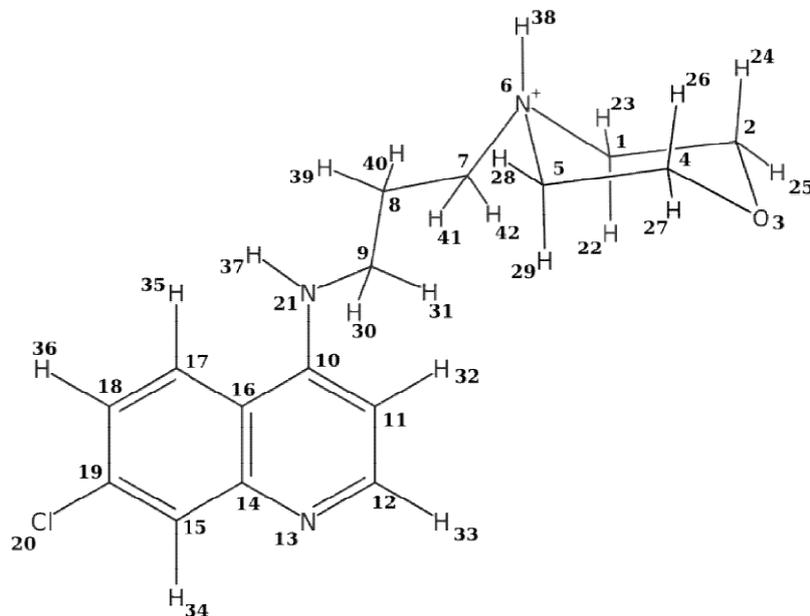


Tabela B.1 – cargas atômicas de cada átomo da estrutura **20b**

<i>Átomo</i>	<i>Carga</i>	<i>Átomo</i>	<i>Carga</i>	<i>Átomo</i>	<i>Carga</i>
1	0,03	15	-0,53	29	0,04
2	0,02	16	-0,08	30	-0,15
3	-0,03	17	-0,06	31	-0,15
4	0,02	18	-0,30	32	0,15
5	0,03	19	0,47	33	0,46
6	0,28	20	-0,82	34	0,55
7	0,00	21	-0,04	35	0,06
8	0,00	22	0,04	36	0,43
9	0,15	23	0,05	37	0,28
10	-0,04	24	0,06	38	0,15
11	-0,05	25	0,04	39	0,01
12	-0,32	26	0,06	40	0,01
13	-0,41	27	0,04	41	0,05
14	0,38	28	0,05	42	0,05

Figura B.2 – Identificação dos ângulos de diedro da substância 20b utilizados para a parametrização

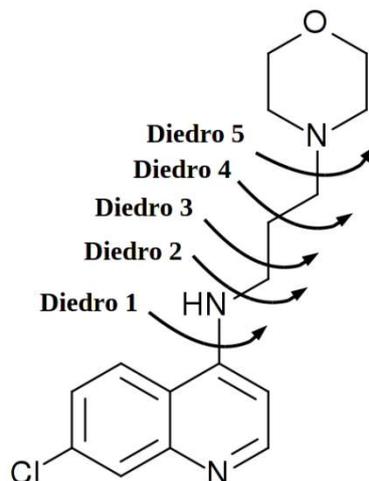


Figura B.3 – Gráfico da energia relativa por ângulo diedral utilizados na regressão dos parâmetros torcionais do ângulo de diedro 1

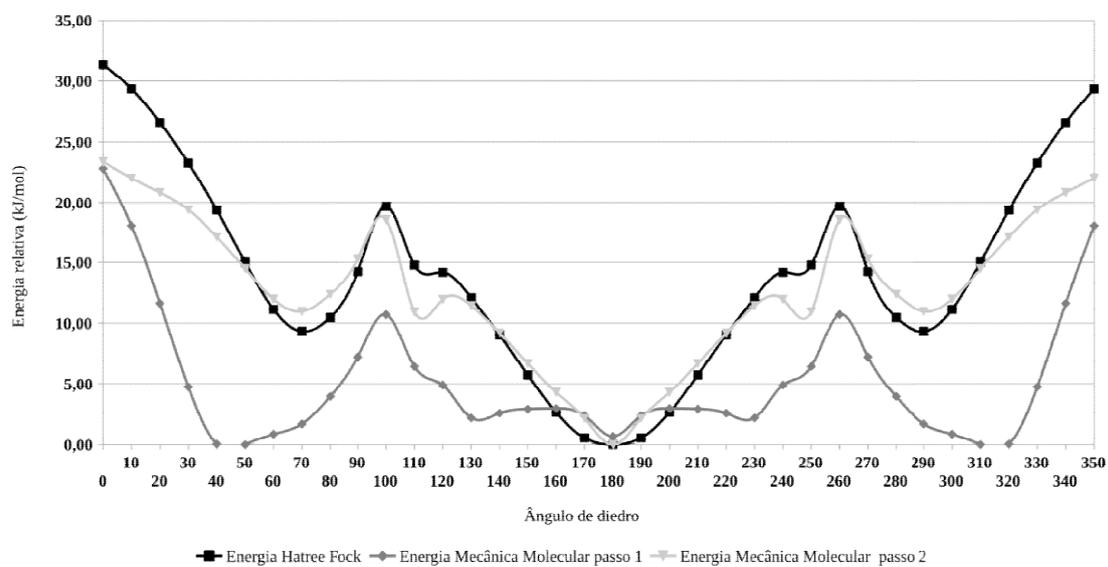


Figura B.4 – Gráfico da energia relativa por ângulo diedral utilizados na regressão dos parâmetros torcionais do ângulo de diedro 2

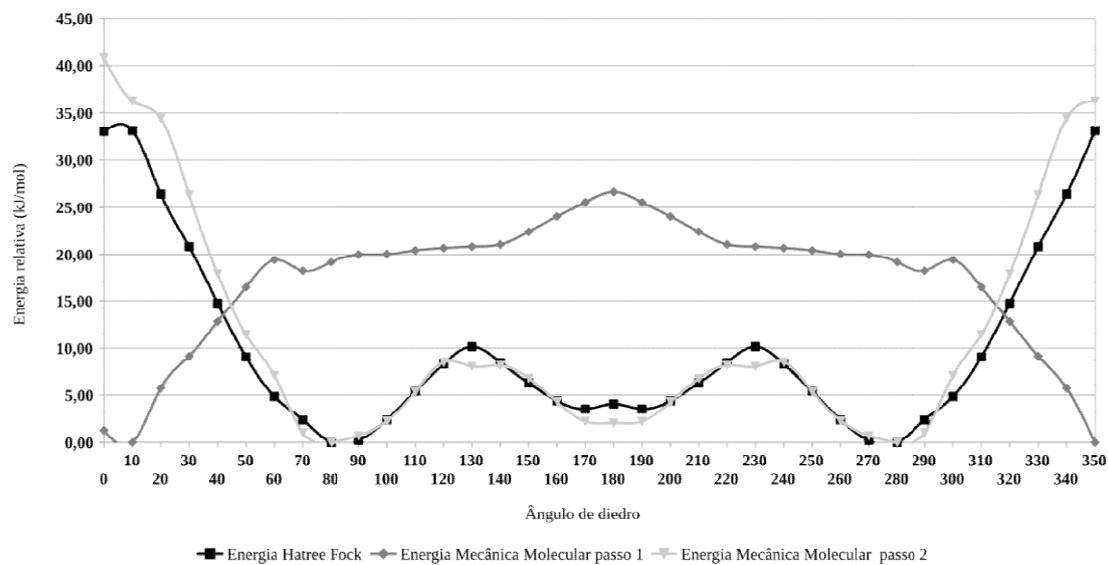


Figura B.5 – Gráfico da energia relativa por ângulo diedral utilizados na regressão dos parâmetros torcionais do ângulo de diedro 3

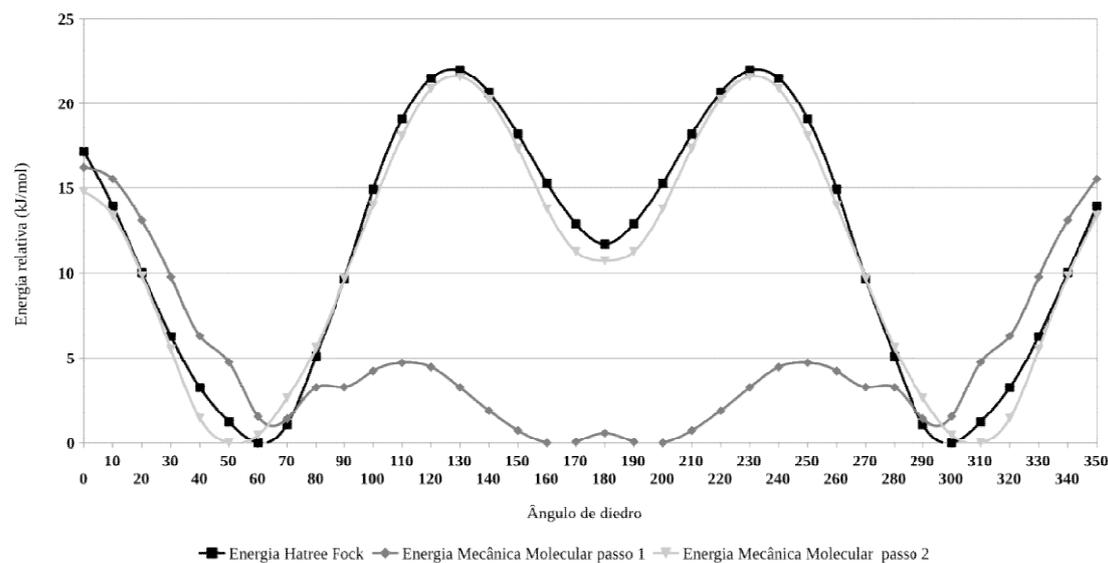


Figura B.6 – Gráfico da energia relativa por ângulo diedral utilizados na regressão dos parâmetros torcionais do ângulo de diedro 4



Figura B.7 – Gráfico da energia relativa por ângulo diedral utilizados na regressão dos parâmetros torcionais do ângulo de diedro 5

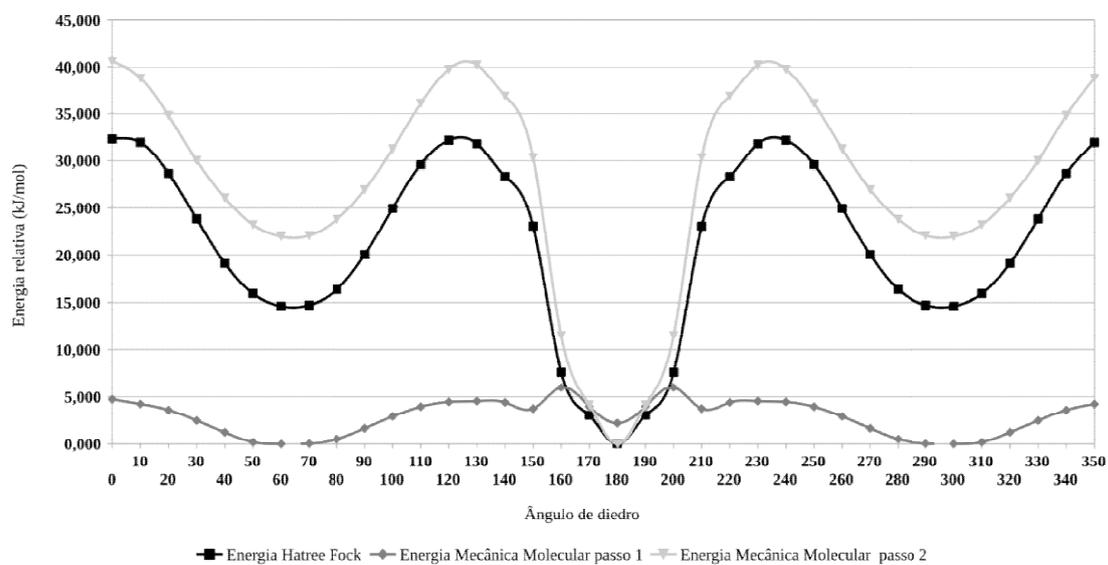


Tabela B.2 – Coeficientes da equação de Ryckaert-Bellemans obtidos após regressão para cada ângulo de diedro

	<i>Coeficiente (kJ/mol)</i>					
	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
<i>Diedro 1</i>	4,13	9,00	3,67	-33,48	-4,73	19,78
<i>Diedro 2</i>	-17,84	1,19	13,59	13,48	6,79	-40,58
<i>Diedro 3</i>	5,89	24,29	9,71	-13,23	-8,77	-4,86
<i>Diedro 4</i>	7,66	11,47	9,18	-44,40	-4,77	19,63
<i>Diedro 5</i>	5,37	9,67	8,96	-12,17	-10,46	-4,47