

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE INIBIDORES DE
CRUZAÍNA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS**

ANDRÉS FELIPE TORRES PEÑA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Química, UNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Mestre em Química.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani

CO-ORIENTADORA: Dra. Marília Valli

**ARARAQUARA - SP
2022**

T693p

Torres-Peña, Andrés Felipe

Planejamento, síntese e avaliação biológica de inibidores de
cruzaína para o tratamento da doença de chagas / Andrés Felipe

Torres-Peña. -- Araraquara, 2022

80 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani

Coorientadora: Marília Valli

1. Doenças negligenciadas. 2. Química medicinal. 3. Química
combinatória. 4. Doença de Chagas. 5. Tripanossoma Cruzi. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Planejamento, síntese e avaliação biológica de inibidores de cruzaina para o tratamento de doença de Chagas

AUTOR: ANDRES FELIPE TORRES PEÑA

ORIENTADORA: VANDERLAN DA SILVA BOLZANI

COORIENTADORA: MARILIA VALLI

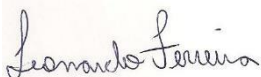
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof.^a Dr.^a VANDERLAN DA SILVA BOLZANI (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. LEONARDO LUIZ GOMES FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Cristalografia / Instituto de Física - USP - São Carlos

Araraquara, 06 de maio de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Andrés Felipe Torres Peña

Nacionalidade: Colombiano

Profissão: Químico

Nome em citações bibliográficas: Peña, A. T.

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7055864877023574>

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

UNESP – Campus Araraquara

Jardim Quitandinha

14800-060- Araraquara, SP- Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2012-2018, Química

Diseño, síntesis y caracterización de β -aminoalcoholes derivados de 2,4-pentanodiona, como precursores en compuestos de coordinación.

Faculdade de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali.

Santiago de Cali, Colômbia.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2017. “1er Simposio colombiano de química verde

Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali.

Santiago de Cali, Colômbia

2017. Curso de Química Verde

Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali.

Santiago de Cali, Colômbia

2017. 1^{ro} Curso de catálisis homogénea y heterogénea.

Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali.

Santiago de Cali, Colombia

2016. “Curso de Electroquímica Aplicada a Materiales y Corrosión.

Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali.

Santiago de Cali, Colombia

2015. “Química de Productos Naturales y su Aplicación en la Farmacología

Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali.

Santiago de Cali, Colombia

2015. “1^{ro} Simposio de Materiales Poliméricos 2015 EXPOSHOW.

Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA)

Santiago de Cali, Colombia

2014. “Avances y tendencias en el uso de la caña de azúcar y sus subproductos como fuente energética”.

Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali.

Santiago de Cali, Colombia

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

Peña, A. T.; A.; Flórez, E.; Diseño, síntesis y caracterización de β -aminoalcoholes derivados de 2,4-pentanediona, como precursores en compuestos de coordinación. Em **“IV Congreso Latinoamericano de estudiantes de química”**, 2017, Pereira, Colombia.

Peña, A. T.; A.; Flórez, E.; Diseño, síntesis y caracterización de β -aminoalcoholes derivados de 2,4-pentanediona, como precursores en compuestos de coordinación. Em **“XVI Encuentro de estudiantes de química pura y aplicada”**, 2017, Pereira, Colombia.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

07/2018 – 01/2019, Chefe de produção de uma pranta de produtos farmacêutica

NATURAL MEDY DISTRIBUCIONES

Santiago de Cali, Colômbia

03/2017 – 07/2017, Auxiliar nos laboratorios de formação academica

Universidad Santiago de Cali

Santiago de Cali, Colômbia

Dedicatória

A minha mãe Jhon Marcisela Peña Quiñonez, a meu pai Eisen Hower Riasco, minha namorada Francis Dayan Rivas, por sempre me apoiarem durante este árduo caminho de Pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani por me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela confiança, conselhos e amizade proporcionados.

Ao meu Coorientador e amigo Dr. Luiz Antonio Dutra pelo apoio incondicional em tudo relacionado ao direcionamento na síntese.

A minha Coorientadora Dra. Marilia Valli por me apoiar desde o início da pós-graduação, me mostrando esta área fenomenal da química medicinal. Me; dirigindo em todos os aspectos em consideração, me oferecendo a sua amizade e apoio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de Financiamento 001.

A meus colegas de laboratório por estarem sempre disponíveis quando precisei deles: Leticia, Helena, Meri, Tony, Suzana, Wellington, Marcus, Rafael e Julia.

À minha namorada Francis Dayan Rivas Garcia, por estar sempre ao meu lado incondicionalmente naqueles momentos difíceis que precisei dela, e em aqueles momentos de alegria que me fez o homem mais feliz do mundo.

Aos meus pais, Eisen Hower Riasco, e Jhon Marcisela Peña Quiñonez pelo apoio incondicional e carinho fornecido todos os dias.

RESUMO

A doença de Chagas é uma enfermidade tropical negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma Cruzi*, que gera sérios problemas de saúde pública para muitos países dos continentes Americano, Africano e subcontinente indiano. O aumento do número de pessoas afetadas pela doença de Chagas, e os efeitos colaterais dos medicamentos atualmente disponíveis, nifurtimox e benznidazol, mostram a necessidade do desenvolvimento de fármacos novos seguros e eficazes. Neste trabalho foi descrito a síntese e caracterização estrutural do composto hit 9, um inibidor de cruzaina irreversível já descrito na literatura. O hit 9 (19a) foi obtido na forma de mistura racêmica, apresentando inibição em cruzaina de 71% comparado ao controle positivo (63%). O estudo de docking molecular permitiu sugerir o modo interação dos compostos sintetizados. Além disso, foi possível prever a estereoquímica R como mais promissora para interação no sítio de cruzaina, a qual apresentou menor valor de $\Delta G = -30,37$ e maior valor de pontuação 27.11. O estudo computacional ainda sugere novos derivados do hit 9 promissores a inibição de cruzaina encontrados por química combinatória, considerando sua configuração R. Os resultados de síntese, docking molecular e atividade biológica descritos nesse trabalho abrem caminhos para a descoberta de novos compostos inibidores de cruzaina úteis ao tratamento da doença de chagas.

Palavras chaves: doenças negligenciadas, química medicinal, química combinatória, doença de Chagas, *Trypanosoma Cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected tropical disease caused by the protozoan *Trypanosoma Cruzi*, causing serious public health problems for many countries in the American, African, and Indian subcontinent. The increase in the number of people affected by Chagas disease, and the side effects of the currently available drugs, nifurtimox and benznidazole, reveal the need for the development of new safe and effective drugs. In this work, the synthesis and structural characterization of the compound hit 9, an irreversible cruzain inhibitor already described in the literature, was described. Hit 9 (19a) was obtained as a racemic mixture, showing 71% cruzain inhibition compared to the positive control (63%). The molecular docking study allowed us to suggest the interaction mode of the synthesized compounds. In addition, it was possible to predict the R stereochemistry as the most promising for interaction at the cruzain site, which presented the lowest value of $\Delta G = -30.37$ and the highest score value 27.11. The computational study also suggests new derivatives of hit 9 promising the inhibition of cruzain found by combinatorial chemistry, considering its R configuration. The results of synthesis, molecular docking and biological activity described in this work open paths for the discovery of new compounds that are useful cruzain inhibitors to the treatment of Chagas disease.

Keywords: neglected diseases, medicinal chemistry, combinatorial chemistry, Chagas disease, *Trypanosoma Cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da Tripanossomíase Americana (doença de Chagas) no mundo. -----	16
Figura 2. Ciclo de vida do tripanosoma cruzi no hospedeiro humano -----	17
Figura 3. Benznidazol (1) e Nifurtimox (2), fármacos para o tratamento da doença de Chagas-----	18
Figura 4. Subsítios S1, S2 e S3 e seus resíduos de aminoácidos no sítio catalítico da enzima cruzaina-----	19
Figura 5. Estrutura química de compostos com atividade já reportada para a inibição da cruzaina -----	20
Figura 6. Estrutura química do composto 9 identificado como inibidor irreversível de cruzaina -----	22
Figura 7. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o intermediário 10a -----	36
Figura 8. Conformações e interações intermoleculares para os intermediários e produto final planejado no sítio da enzima cruzaina.-----	46
Figura 9. Estrutura química do composto 9 inibidor irreversível de cruzaina usado como modelo para estudo de química combinatória. -----	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado de atividade biológica de inibição com os intermediários 13a-b-c, 14a-b-c e produto final 19a.....	42
Tabela 2. Resultado do docking realizado com os compostos 13b-c, 14b-c e 19b-c	44
Tabela 3. Estrutura dos compostos planejados considerando a viabilidade sintética e o docking realizado com os compostos da química combinatória computacional.....	48

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Esquema geral de síntese para o composto final 19a.....	25
Esquema 2. Condições reacionais para a síntese dos intermediários 14a-b-c.	26
Esquema 3. Esquema geral para a síntese do intermediário 18.....	30
Esquema 4. Esquema geral para a síntese dos intermediário 19a-b-c.	31
Esquema 5. Rota sintética utilizada para obtenção do hit 19.....	35
Esquema 6. Mecanismo de reação do cloreto de acila, na obtenção dos metil- triptofano 11a-b-c	37
Esquema 7. Mecanismo de acilação do éster triptofano por cloreto de 4-flurbenzil.....	38
Esquema 8. Mecanismo de hidrólise de éster para formação dos intermediários 14a- b-c	39
Esquema 9. Mecanismo de acilação do 3- Amino- 5- metilisoxazol por cloreto de acetoxiacetila.....	39
Esquema 10. Mecanismo de hidrólise do acetato para formação do intermediário 18. .	40
Esquema 11. Mecanismo de reação de Mitsunobu na obtenção de composto 19a.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia de Camada Delgada
DC	Doença de Chagas
DCM	Diclorometano
DEAD	Azodiacarboxilato de dietila
DIAD	Azodiacarboxilato de diisopropila
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
EM	Espectrometria de massas
IV	Infravermelho
IC ₅₀	Concentração para inibir 50% da atividade enzimática
MPLC	Cromatografia Líquida de meia Pressão
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S1, S2 e S4	Sub-sítios integrantes do sítio catalítico da enzima cruzaina
ΔG	Energia livre de Gibbs

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	Doença de Chagas e tratamentos disponíveis.....	15
1.2.	A enzima cruzaina como alvo molecular validado	18
1.3.	Estratégias de Planejamento de Fármacos	21
2.	OBJETIVOS.....	23
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1.	Materiais	24
3.2.	Metodologia sintética	25
3.2.1.	Síntese dos intermediários 14a-b-c.	26
3.2.2.	Síntese do intermediário 18.	29
3.2.3.	Síntese do composto final 19a.....	30
3.2.4.	Ensaio bioquímico de inibição da enzima cruzaina	31
3.3.	Docking molecular	32
3.4.	Construção da biblioteca virtual por química combinatória e docagem molecular	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1.	Síntese do composto hit e confirmação da atividade de inibição da cruzaina.	34
4.2.	Estudos computacionais para avaliação <i>in silico</i> da contribuição da estereoquímica para a interação do hit e enzima.....	44
4.3.	Química Combinatória Computacional para o planejamento de análogos.	47
5.	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICE	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas e tratamentos disponíveis

A tripanossomíase americana, também conhecida como Doença de Chagas (DC) (GOMES et al., 2019), é uma das 21 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) de acordo com a organização mundial de saúde (OMS) (ORTEGA et al., 2019; PERIN et al., 2020; SERAFIM et al., 2017). As DTNs são doenças infecciosas que prevalecem em países com clima tropical e subtropical (ARRÚA et al., 2019; FERREIRA et al., 2014), essas doenças causam uma grande quantidade de incapacidades e mortes no mundo (FRANCO-PAREDES et al., 2020), e são causas graves de saúde pública com impacto social e implicações econômicas (SANTOS et al., 2020). Anualmente o custo à saúde é de cerca de \$ 627 milhões e calculam-se mais de 800.000 anos perdidos por incapacidade laboral em pessoas que adquirem a doença (ARRÚA et al., 2019). Estima-se que 10 milhões de pessoas são afetadas principalmente na América Latina (ARRÚA et al., 2019; FRANCO-PAREDES et al., 2020), 75 milhões de pessoas estão em risco de infecção (ACOSTA-HERRERA et al., 2019), mais de 10.000 morrem ao ano (IKEDIONWU et al., 2020). No entanto, durante a última década foram identificados novos casos de DC em áreas não endêmicas como Estados Unidos, Canadá, alguns países europeus, Africanos e no Pacífico Ocidental, o que a tornou um problema de saúde pública global devido ao fluxo migratório de pessoas e a globalização (FRANCO-PAREDES et al., 2020; MARTINS-MELO et al., 2019; SANTOS et al., 2020). A **Figura 1** mostra a distribuição da tripanossomíase americana no mundo.



Figura 1. Distribuição da *Tripanossomíase Americana* (doença de Chagas) no mundo. Fonte: adaptado de (SANTOS et al., 2020).

A DC foi descoberta pelo pesquisador o Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, o único cientista na história da medicina responsável pela identificação completa de todos os aspetos da doença, desde o agente etiológico ao vetor incluindo a infecção, hospedeiro e as manifestações clínicas (SANTOS et al., 2020). Esta doença é uma infecção crônica que afeta todo o corpo, pelo que pode ser denominada uma doença sistêmica (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015) causada pelo parasita protozoário *T. Cruzi*, um parasita flagelado que produz uma série de enzimas alvo potenciais implicadas na patogênese e na invasão de células hospedeiras (BARBOSA DA SILVA et al., 2019a). Os principais vetores são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (GUARNER, 2019), insetos triatomíneos chamados coloquialmente como barbeiros (ACOSTA-HERRERA et al., 2019; LYNN et al., 2020; MARTINS-MELO et al., 2019). O ciclo de vida do parasita começa com a picada do inseto no hospedeiro e suas fezes entram em contato com o sangue (**Figura 2A**). No hospedeiro, a infecção ocorre quando o parasita está no estágio de tripomastigota infectando as células próximas ao local da inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares (GUARNER, 2019) (**Figura 2B**). Os amastigotas se multiplicam por fissão binária (**Figura 2C**), e em seguida diferenciam-se em tripomastigotas infecciosos, sendo então liberados na corrente sanguínea (**Figura 2D**). Vale ressaltar que o ciclo de vida mostrado na figura 2,

representam apenas as etapas que envolvem o hospedeiro. As manifestações clínicas encontradas para a DC podem ser decorrentes desse ciclo infeccioso (PROCEDURE, 2019). Cabe mencionar que a transmissão pode ocorrer de diferentes maneiras entre elas estão o consumo acidental desses insetos ou suas fezes, transmissão vertical no útero, transfusão de sangue e transplante de órgãos (SANTOS et al., 2020; ZECCA et al., 2020).

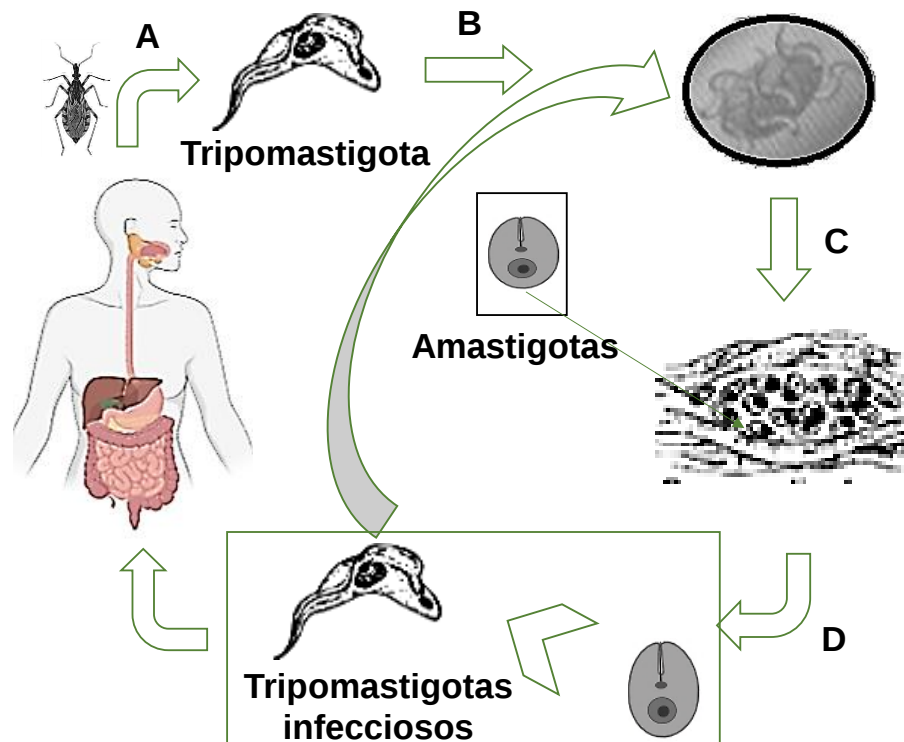


Figura 2. Ciclo de vida do *T. Crizi* no hospedeiro humano. A) picada do inseto no hospedeiro, quanto suas fezes entram em contato com o sangue; B) infecção de células próximas ao local da inoculação, onde os parasitas se diferenciam em amastigotas; C) amastigotas se multiplicam; D) diferenciação em tripomastigotas infecciosos e liberação na corrente sanguínea. **Fonte:** adaptado de (PROCEDURE, 2019)

Embora essa doença tenha sido descoberta há mais de um século (FERREIRA et al., 2014; GUARNER, 2019) só existem dois medicamentos para seu tratamento, o Benznidazol (**1, Figura. 3**), e em alguns países o Nifurtimox (**2, Figura. 3**) (CUCUNUBÁ et al., 2017), ambos descobertos há mais de 50 anos e incluídos na lista dos medicamentos essenciais da OMS (ARRÚA et al., 2019). É importante ressaltar que esses medicamentos só mostraram ser eficazes na fase aguda da doença, tendo baixa

eficácia na fase crônica (CARDOSO et al., 2019; WANG et al., 2020), e causam efeitos colaterais graves (DE MENEZES et al., 2019).

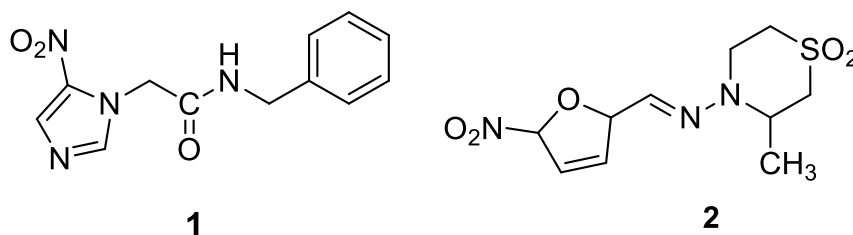


Figura 3. Benznidazol (1) e Nifurtimox (2), fármacos para o tratamento da doença de Chagas.
Fonte: autor

1.2. A enzima cruzaina como alvo molecular validado

Entre as enzimas produzidas pelo *T. Cruzi*, a cruzaina é a principal cisteína protease de *T. Cruzi*, expressa-se ao longo do ciclo de vida do parasita. A cruzaina está presente em processos biológicos como a interação com as células hospedeiras, reprodução, nutrição, diferenciação, sobrevivência do parasita dentro das células hospedeiras e a evasão do sistema imunológico (CIANNI et al., 2019). A cruzaina é a forma recombinante da enzima cruzipaina (EC 3.4.22.51) (CIANNI et al., 2019), composta por uma cadeia polipeptídica de 215 resíduos de aminoácidos (FERREIRA et al., 2019). As cisteína proteases da família da papaína, são em sua maioria endopeptidases proteolíticas que hidrolisam ou clivam a ligação amida, através de uma tríade catalítica localizada no sítio catalítico (RIBEIRO, 2018). O sítio catalítico da cruzaina define-se como os resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade catalítica, formado pelos resíduos cisteína (Cys25), histidina (His162) e asparagina (Asn182) (**Figura. 4**) (BARBOSA DA SILVA et al., 2019b; SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015), e um resíduo de glicina (Gln19) que pode ou não estar envolvido na atividade catalítica considerado um resíduo acessório. Estruturalmente, essa família de proteínas possui dois domínios, um domínio formado predominantemente por hélices-alfa (domínio L) e outro composto por folhas β (domínio R). O sítio catalítico está localizado especificamente na fenda formada entre esses dois domínios (**Figura. 4**) (RIBEIRO, 2018). A cruzaina é validada como alvo molecular para a descoberta de novos medicamentos para a DC, por meio de estudos genéticos de *T.*

cruzi e a capacidade de inibidores de cruzaina de diminuir a carga parasitária *in vivo* (FERREIRA et al., 2019). Inibidores seletivos dessa protease podem bloquear a proliferação tanto de epimastigotas extracelulares quanto de amastigotas intracelulares, e interrompem a transformação de epimastigotas em tripomastigota metacíclicos *in vitro*, em um processo chamado metaciclogênese (ROMEIRO et al., 2009). Os testes de validação pré-clínica certificam a cruzaina como um alvo viável de fármacos. Há uma diversidade estrutural de inibidores de cisteína proteases e mecanismos catalíticos que mostraram serem capazes de tratar esta doença em modelos celulares e animais como o caso da substância K11777 (FERREIRA et al., 2019).

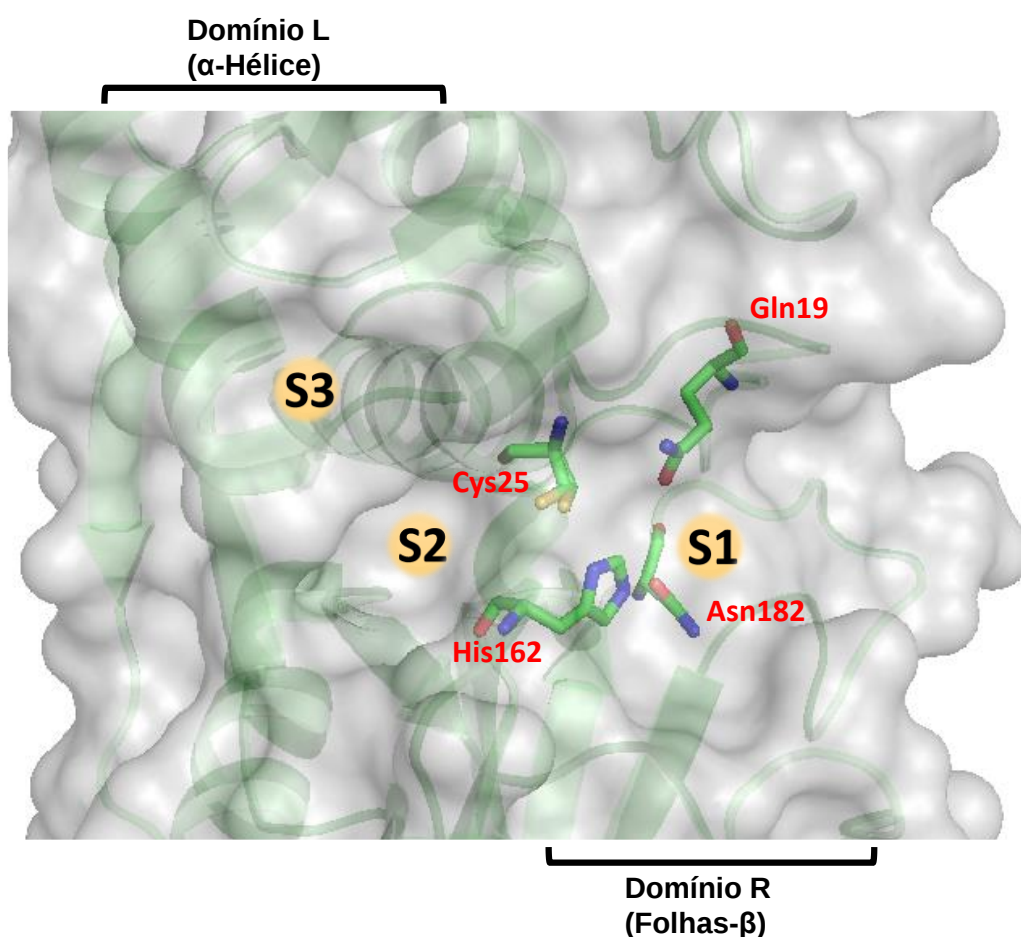


Figura 4. Subsítios S1, S2 e S3 e seus resíduos de aminoácidos no sítio catalítico da enzima cruzaina. **Fonte:** autor

Atualmente, a maioria dos inibidores de cruzaina encontrados na literatura pertencem à classe dos inibidores irreversíveis entre os quais podemos destacar as chalconas (SINGH; ANAND; KUMAR, 2014), triazóis (BRAK et al., 2010), tiossemicarbazonas (SILES et al., 2006), indol pirimidinas (WANG; DONG; SHENG, 2019), benzimidazóis (SANTOS et al., 2019) e vinil sulfonas (CIANNI et al., 2019) (**Figura 5**). O modo de inibição irreversível não tem permitido que alguns dos inibidores mencionados avancem até fases pré-clínicas avançadas para aprovação como fármacos. Um desses inibidores é o K11777 o qual apresenta em sua estrutura uma vinil sulfona (**8, Figura 5**). Este composto apresentou resultados promissores em teste de eficácia pré-clínica, para a DC em modelos de camundongos e cães. No entanto, teve problemas relacionados à sua alta toxicidade mesmo em doses baixas, o que foi impeditivo para prosseguir para o desenvolvimento clínico, aspecto que foi atribuído a seu modo irreversível de inativação enzimática (FERREIRA et al., 2019).

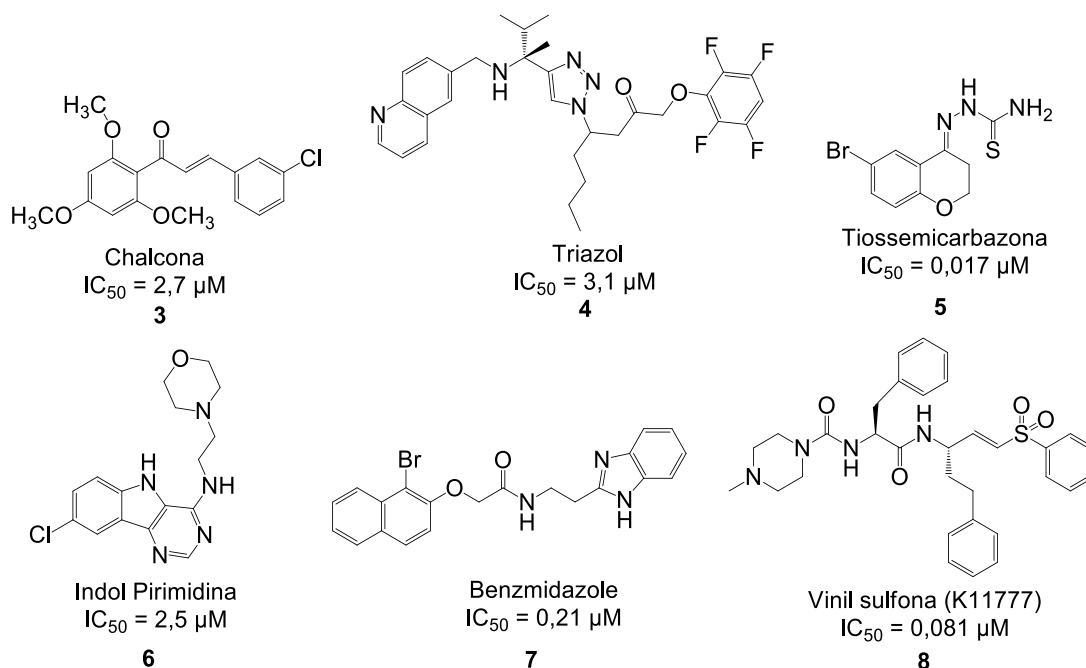


Figura 5. Estrutura química de compostos com atividade já reportada para a inibição da cruzaina.
Fonte: autor.

1.3. Estratégias de Planejamento de Fármacos

A descoberta de medicamentos no início da década de 1950 até a década de 1980 foi baseada principalmente em dados obtidos em ensaios *in vivo*. No período atual, o desenvolvimento de novas tecnologias como triagem *in vitro*, criação de grandes bibliotecas de compostos e estudos de química combinatória mudaram a perspectiva anterior uma vez que estes permitem o desenvolvimento de medicamentos com base na estrutura dos alvos, mudando assim o papel do químico na era moderna, permitindo passar da atividade *in vitro* a atividade *in vivo*, reduzindo parâmetros como complexidade, tempo, economia e riscos (LOMBARDINO, JOSEPH G, 2004). Os métodos computacionais de triagem virtual usados na descoberta de fármacos incluindo triagens de milhões de compostos, relações quantitativas estrutura-atividade e docking molecular, são métodos que simulam ou predizem como uma substância interagem com um determinado alvo biológico (RUIWU; XIAOCEN; LAM, 2017).

O docking molecular é um método que calcula as afinidades de interação entre uma substância e uma proteína (eg, energia livre de Gibbs (ΔG)) considerando interações não covalentes comuns como ligações eletrostáticas, Van der Waals, e de hidrogênio e prevendo conformações dos ligantes no sítio catalítico da macromolécula (KHATER; NASSAR, 2021). A estratégia de docking molecular tem sido uma abordagem que tornou a descoberta de um novo fármaco um processo mais rápido e focado, já que este é um processo conhecido por ser excessivamente caro, longo e difícil que normalmente pode levar entre 10-15 anos desde sua etapa inicial até aprovação pelo órgãos reguladores (SERRANO et al., 2020). Alguns exemplos que podem ser citados são a obtenção do receptor Muscarínico M3 de Marriot et al. patenteado pela Pfizer com atividade de 0,2 μM e o inibidor da quinase 1 de Lyne et al, priorizado de um grupo de 250 hits com atividade de 450 nM. Trabalhos recentes são direcionados para a síntese de compostos já priorizados por estudos de docking molecular.

Ferreira e colaboradores (2010) identificaram o composto (**9**, **Figura 6**) como um inibidor irreversível de cruzaína utilizando métodos de docking combinada com high-throughput screening (HTS). O estudo foi realizado com uma biblioteca de 197.861 compostos que foi avaliada computacionalmente frente à estrutura cristalográfica da

cruzaína e no ensaio experimental quantitativo bioquímico com a enzima. O estudo incluiu avaliações para eliminar falsos positivos experimentais como, inibição por agregação coloidal, interferência por fluorescência, inibição covalente promíscua, e aqueles compostos que apenas eram ativos somente na concentração mais elevada do ensaio bioquímico. Além disso, as moléculas foram agrupadas por suas características estruturais e avaliadas por similaridade com inibidores de cruzaína conhecidos, o que mostrou que este hit caracterizava um modelo químico inovador para esta atividade. O hit (**9**, **Figura 6**) tem em sua estrutura química um anel oxazol, um anel indol grupos amida e éster, e um fenil com flúor para-substituído, além de apresenta valor de $IC_{50} = 3 \mu M$ no ensaio bioquímico com a cruzaína reportado no artigo original

Inicialmente o hit **9** foi avaliado na forma de mistura racêmica e não há informações sobre potência inibitória de suas configurações R e S sobre cruzaína. Assim, o objetivo deste trabalho foi sintetizar o hit **9** e suas configurações R e S para avaliação da potência inibitória sobre cruzaína. Com o objetivo de conhecer possíveis interações entre os compostos sintetizados e a estrutura da cruzaína, foi utilizado docking molecular para sugerir o modo de ligação destes compostos para validar a estereoquímica com maior potência e melhor interação com a enzima.

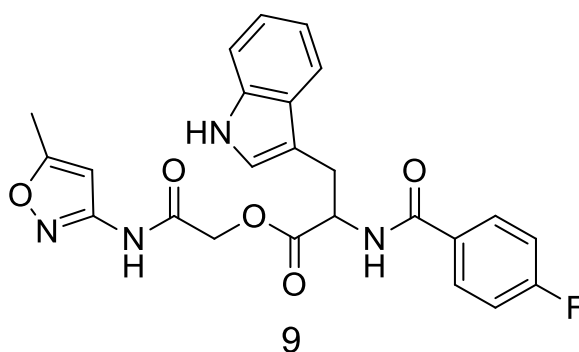


Figura 6. Estrutura química do composto **9** identificado como inibidor irreversível de. **Fonte:** autor

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho visa planejar, sintetizar e caracterizar compostos potenciais para o tratamento da doença de Chagas.

Objetivos específicos

- a) Síntese do composto hit identificado 9 e suas configurações estereoquímica R e S para confirmação da atividade de inibição da cruzaina
- b) Estudos computacionais para avaliação in silico do modo de ligação e contribuição da estereoquímica para a interação dos inibidores com a enzima
- c) Química Combinatória Computacional para o planejamento de análogos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e métodos gerais

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich e usados sem purificação prévia. Acetato de etila (AcOEt), hexano (Hex), cloreto de tionila (SOCl_2), DL-triptofano, carbonato de potássio (K_2CO_3), hidróxido de sódio (NaOH), diclorometano (DCM), sílica gel (sílica “flash”), sulfato de amônio anidro, tetrahidrofurano (THF), 3- amino- 5- metilisoxazol, cloreto de 4-fluorobenzoil, cloreto de acetoxiacetila (Sigma Aldrich), trietilamina (Et_3N , Sigma Aldrich), carbonato de sódio (Na_2CO_3 , Sigma Aldrich), cloreto de sódio (NaCl, Sigma Aldrich), L-triptofano, D-triptofano, azodiacarboxilato de diisopropila (DIAD) e trifetilfosfina (PPh_3).

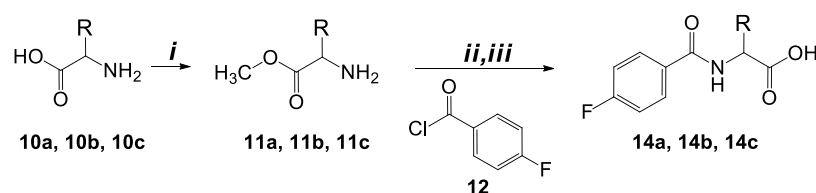
O tetrahidrofurano foi destilado com sódio metálico. A cromatografia de camada delgada analítica (CCD), foi realizada usando placas de gel de sílica e C18 em folhas de alumínio de 250 μm , a visualização foi realizada usando câmera de luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm, e a fase móvel foi estabelecida para cada composto analisado. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear unidimensional de hidrogênio (RMN de ^1H), carbono treze (RMN de ^{13}C), e bidimensional Heteronuclear Multiple Bond Correlation) (HMBC), foram realizados em Dimetilsulfóxido $\text{DMSO}-d_6$, clorofórmio deuterado CDCl_3 , metanol deuterado (CD_3OD) e óxido de deutério (D_2O). Os espectros foram obtidos em espectrômetro Bruker Fourier 600 (7,1 T) e 300, operando a 600 MHz para os núcleos de ^1H e 150 MHz para ^{13}C e espectrômetro Bruker Fourier 300 operando a 300 MHz para os núcleos de ^1H e 75 MHz para ^{13}C . Os dados foram relatados como segue: s = singuleto, d = duplete, t = tripleto, dd = dupla duplete e m = multiplete. Os espectros de massa foram adquiridos usando o sistema LC-DAD-ESI da Shimadzu HPLC (CBM20A), bomba quaternária LC-20AD, detector SPD-M20A, amostrador automático SIL-20A e compartimento de coluna CTO-20A, acoplado à fonte ESI Bruker Ion Trap (amaZon SL). Os espectros de UV foram adquiridos na faixa de 200-800 nm. As análises de massas foram realizadas no modo positivo e m/z varrido de 50-1000 usando os seguintes parâmetros: tensão da fonte de 4,5 kV, gás de invólucro de 9,00 L / min, nebulizador de 40 psi e temperatura seca (300 ° C). As análises

cromatográficas foram realizadas em coluna Luna® C-18 (5,0 μm , 4,6 x 150 mm, Phenomenex), a 25 °C. O gradiente de eluição foi água/metanol e ácido fórmico a 0,1% (A) e acetonitrila /ácido fórmico a 0,1% nas seguintes condições: 0 min, 30% B; 10 min, 100% B; 15 min, 100% B, 17 min, 30% B; 20 min, 30% B. Taxa de fluxo de 1,0 mL / min e volume de injeção de 2 μL . Os espectros de infravermelho (IV) foram adquiridos em Espectrofotômetro Nicolet IS5 Thermo Scientific, os quais foram gerados em % Transmitância versus frequências de absorção na região de 400-4000 cm^{-1} . Pastilhas de KBr foram utilizadas no preparo das amostras para a obtenção dos espectros.

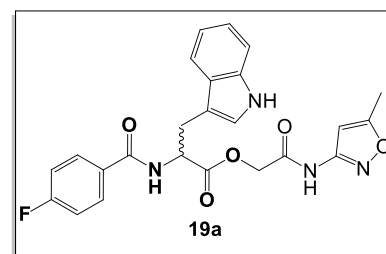
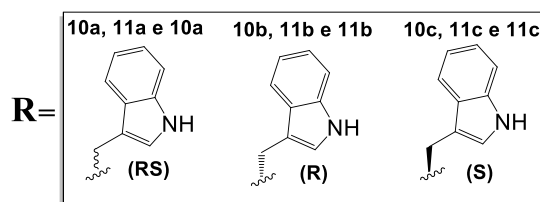
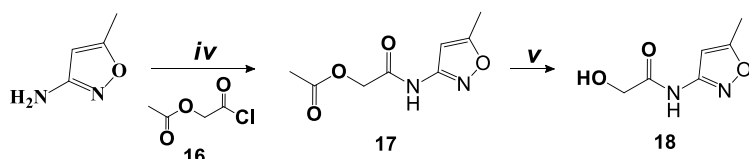
3.2. Metodologia sintética

O hit **9** (**19a**) e suas estereoisômeras R (**19b**) e S (**19c**) tiveram suas rotas sintéticas planejadas de acordo com o **Esquema 1** compostos foram obtidos de acordo com o geral **Esquema 1**. O processo sintético convergente foi dividido em três rotas gerais **1)** síntese dos intermediários **14a-b-c**; **2)** síntese do composto **18**; **3)** sínteses do composto finais **19a-b-c**. A seguir apresenta-se com detalhe cada uma destas etapas:

Síntese dos intermediários 13a, 13b e 13c



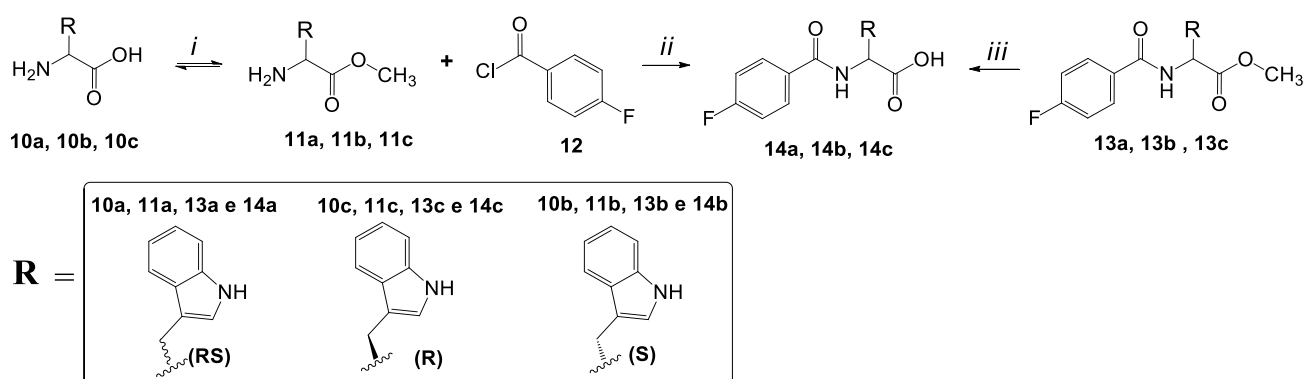
Síntese do intermediário 17



Esquema 1. Esquema geral de síntese para o composto final **19a**. **Fonte:** autor

3.2.1. Síntese dos intermediários 14a-b-c.

A obtenção dos intermediários **14a-b-c** ocorreram através de uma esterificação no grupo ácido do triptofano com SOCl_2 (LIU et al., 2015), seguida da reação de Schotten-Baumann entre **11a-b-c** e 4-fluorobenzoil para obter os compostos **13a-b-c** (LOW et al., 1992; MAGOSSO; VAN DEN BERG; VAN DER SCHAAF, 2021). Em seguida, realizou-se a hidrólise básica do grupo éster dos intermediários **13a-b-c** para síntese dos intermediários 14a-b-c (**Esquema 2**).



Esquema 2. Condições reacionais para a síntese dos intermediários 14a-b-c. (i) SOCl_2 , CH_3OH , 12 h, t.a; (ii) TEA, DCM, 1 h, t.a; (iii) NaOH 50% (w/w), THF, 2 h, t.a. **Fonte:** autor

Procedimento experimental para síntese dos intermediários 14a-b-c

Na primeira etapa reacional, os DL, L e D-triptofano (1,0 g, 4,90 mmol, 1,0 eq) foram submetidos à reação com SOCl_2 (1,5 mL, 20,24 mmol, 4,13 eq.) para formação dos cloretos de acila, seguido de esterificação com MetOH para formação de **11a-b-c** com rendimentos de 94, 97 e 91% respectivamente. Na segunda etapa, ocorre a formação de amida reagindo **11a-b-c** (4,60 mmol) com o cloreto de ácido **12** (3,37 mmol) com Et_3N (5,07 mmol) em DCM por 1h a temperatura ambiente, para obtenção de **13a-b-c** com rendimentos de 88, 83 e 85% respectivamente. Em seguida, foi realizada a hidrólise em meio básico para remoção da metila usada como grupo protetor. A reação foi realizada

com NaOH (9,27 mmol) em THF por 2h a temperatura ambiente, levando à obtenção de **14a**, **13b** e **13c** com rendimento 80, 83 e 91% respectivamente.

11a. Solido branco, rendimento de 94,29%. RMN de ^1H (600 MHz, Metanol- d_4) δ_{H} 7.54 (dt, $J = 8.0, 1.0$ Hz, H-4), 7.40 (dt, $J = 8.2$ Hz, H-1), 7.21 (s, H-8), 7.10 (m, $J = 8.0$ Hz, H-6 e H-5), 4.33 (dd, $J = 7.4$ Hz, H-11), 3.80 (s, H-14), 3.42 (m, $J = 7.6$ Hz, H-10). RMN de ^{13}C (75 MHz, Metanol- d_4) δ_{C} 171.73 (C-13), δ_{C} 137. (C-2), δ_{C} 126.58 (C-8), δ_{C} 122.43 (C-6), δ_{C} 118.34 (C-4), δ_{C} 113.80 (C-1), δ_{C} 106.25 (C-9), δ_{C} 53.34 (C-14), δ_{C} 28.42 (C-10). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 3457 (N-H amida), 3058 (C-H aromático), 1645 e 1570 (N-H amida), 1734 (R-COO-R éster), 1000 e 1340 (R-COO-R éster) (**Apêndice A**). A **Figura 7** mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC do intermediário 10a.

11b. Solido branco, rendimento de 83,08%. RMN de ^1H (300 MHz, Metanol- d_4) δ_{H} 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, H-4), 7.40 (d, $J = 8.1$ Hz, H-1), 7.19 (s, H-8), 7.14 (t, $J = 7.6$ Hz, H-6), 7.08 (t, $J = 7.4$ Hz, H-5), 4.28 (m, $J = 7.3$ Hz, H-11), 3.81 (s, $J = 1.9$ Hz, H-14), 3.47 (dd, $J = 15.1, 5.4$ Hz, H-10), 3.38 (d, $J = 7.4$ Hz, H-10). RMN de ^{13}C (75 MHz, Metanol- d_4) δ_{C} 171.73 (C-13), δ_{C} 139.16 (C-2), δ_{C} 129.04 (C-3), δ_{C} 126.53 (C-8), δ_{C} 123.83 (C-6), δ_{C} 121.21 (C-5), δ_{C} 119.70 (C-4), δ_{C} 113.57 (C-1), δ_{C} 108.32 (C-9), δ_{C} 55.51 (C-11), δ_{C} 54.56 (C-14), δ_{C} 28.42 (C-10). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 3461 (N-H amida), 3042 (C-H aromático), 1645 e 1572 (N-H amida), 1730 (R-COO-R éster), 1314 (R-COO-R éster). M/z 219,10 $[\text{M}+\text{H}]^+$. (**Apêndice B**).

11c. Solido branco, rendimento de 90,82%. RMN de ^1H (300 MHz, Metanol- d_4) δ_{H} 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, H-4), 7.40 (d, $J = 8.1$ Hz, H-1), 7.20 (s, H-8), 7.15 (t, $J = 7.0$ Hz, H-6), 7.07 (t, $J = 7.0$ Hz, H-5), 4.33 (dd, $J = 7.4$ Hz, H-11), 3.80 (s, H-14), 3.38 (m, $J = 7.4$ Hz, H-10). RMN de ^{13}C (75 MHz, Metanol- d_4) δ_{C} 171.69 (C-13), 139.19 (C-2), 129.03 (C-3), 126.45 (C-8), 123.83 (C-6), 121.19 (C-5), 119.66 (C-4), 113.55 (C-1), 108.32 (C-9), 55.48 (C-11), 54.51 (C-14), 28.44 (C-10). M/z 219,10 $[\text{M}+\text{H}]^+$. (**Apêndice C**).

13a. Solido rosa claro, rendimento de 87,50%. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 8.15 (s, H-15), 7.68 (dd, $J = 5.4$ Hz, H-8 e H-12), 7.53 (d, $J = 8.0$ Hz, H-17), 7.37 (dt, $J = 8.1$ Hz, H-20), 7.20 (t, $J = 6.3$ Hz, H-16), 7.07 (d, $J = 8.5$ Hz, H-9 e H-11), 7.01 (d, $J = 2.5$ Hz, H-18 e H-19), 6.61 (d, $J = 7.7$ Hz, H-3), 5.14 (dt, $J = 7.7, 5.14$ Hz, H-2), 3.74 (s, H-

21), 3.45 (dd, $J = 5.1$, Hz, H-4). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 172.54 (C-1), 166.07 (C-6), 136.29 (C-10), 129.71 (C-14), 129.59 (C-7), 127.84 (C-8 e C12), 122.97 (C-13), 122.55 (C-16), 119.96 (C-19), 118.79 (C-18), 115.90 (C-17), 115.61 (C-9 e C11), 111.52 (C-20), 110.16 (C-5), 53.75 (C-2), 52.69 (C-21), 27.76 (C-4). M/z 341,12 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Apêndice D**).

13b. Solido rosa claro, rendimento de 83,08%. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 8.14 (s, 15), 7.68 (dd, $J = 13.3$ Hz C-8 e C12), 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, H-17), 7.37 (dt, $J = 8.1$ Hz, H-20), 7.20 (t, $J = 8.2$ Hz, H-16), 7.07 (d, $J = 8.5$ Hz, H-9 e H-11), 7.01 (d, $J = 2.4$ Hz, H-18 e H-19), 6.60 (d, $J = 7.7$ Hz, H-3), 5.14 (dt, $J = 7.7$ Hz, H-2), 3.74 (s, H-21), 3.46 (dd, $J = 2.6$ Hz H-4). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 172.50 (C-1), 166.02 (C-6), 136.25 (C-10), 129.65 (C-14), 129.53 (C-7), 127.79 (C-8 e C12), 122.93 (C-13), 122.49 (C-16), 119.91 (C-19), 118.74 (C-18), 115.85 (C-17), 115.56 (C-9 e C11), 111.48 (C-20), 110.10 (C-5), 53.69 (C-2), 52.64 (C-21), 27.71 (C-4). M/z 341,12 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Apêndice E**).

13c. Solido branco, rendimento de 85,30%. RMN de ^1H (600 MHz, Clorofórmio deuterado) δ_{H} 8.21 (s, H-15), 7.68 (dd, $J = 5.2$ Hz, C-8 e C12), 7.53 (d, $J = 8.0$ Hz, H-17), 7.36 (dt, $J = 8.2$ Hz, H-20), 7.19 (t, $J = 8.2$ Hz, H-16), 7.06 (d, $J = 7.5$ Hz, H-9 e H-11), 7.00 (d, $J = 2.4$ Hz, H-18 e H-19), 6.62 (d, $J = 7.7$ Hz, H-3), 5.13 (dt, $J = 7.7$ Hz, H-2), 3.73 (s, H-21), 3.45 (dd, $J = 5.5$ Hz, H-4). RMN de ^{13}C (151 MHz, clorofórmio deuterado) δ_{C} 172.51 (C-1), 166.03 (C-6), 136.28 (C-10), 129.64 (C-14), 129.58 (C-7), 127.83 (C-8 e C12), 122.93 (C-13), 122.52 (C-16), 119.93 (C-19), 118.77 (C-18), 115.79 (C-17), 115.65 (C-9 e C11), 111.49 (C-20), 110.16 (C-5), 53.71 (C-2), 52.63 (C-21), 27.74 (C-4). M/z 341,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Apêndice F**).

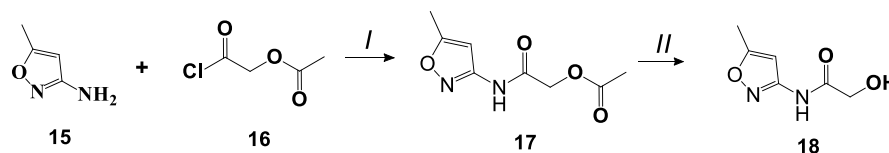
14a. Solido rosa claro, rendimento de 80,25%. RMN de ^1H (600 MHz, Dimetilsulfóxido deuterado) δ_{H} 10.84 (s, H-21), 8.73 (d, $J = 7.9$ Hz, H-15), 7.93 (m, $J = 7.9$ Hz, H-8 e H-12), 7.63 (d, $J = 7.8$ Hz, H-17), 7.36 (d, $J = 8.1$ Hz, H-20), 7.32 (m, $J = 8.7$ Hz, H-9 e H-11), 7.24 (d, $J = 2.4$ Hz, H-16), 7.10 (t, $J = 8.1$ Hz, H-19), 7.02 (t, $J = 8.0$ Hz, H-18), 4.69 (m, $J = 10.1$ Hz, H-2), 3.35 (dd, $J = 14.5$ Hz, H-4), 3.24 (dd, $J = 14.7$ Hz, H-4). RMN de ^{13}C (151 MHz, Dimetilsulfóxido deuterado) δ_{C} 174.49 (C-1), 166.29 (C-6), 137.07 (C-10), 131.04 (C-14), 130.98 (C-7), 128.08 (C-8 e C12), 124.50 (C-13), 121.92 (C-16), 119.36 (C-19), 119.08 (C-18), 116.21 (C-17), 116.06 (C-9 e C11), 112.40 (C-20), 111.37 (C-5), 54.71 (C-2), 27.61 (C-4). M/z 327,08 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Apêndice G**).

14b. Solido rosa claro, rendimento de 83,33%. RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} 10.82 (d, $J = 2.5$ Hz, H-21), 8.71 (d, $J = 7.9$ Hz, H-15), 7.91 (m, $J = 5.8$ Hz C-8 e C12), 7.60 (d, $J = 7.9$ Hz, H-17), 7.33 (d, $J = 8.1$ Hz, H-20), 7.29 (m, $J = 8.7$ Hz, H-9 e H-11), 7.21 (d, $J = 2.4$ Hz, H-16), 7.07 (t, $J = 8.1$ Hz, H-19), 6.99 (m, $J = 7.5$ Hz, H-18), 4.66 (m, $J = 10.1$ Hz, H-2), 3.32 (dd, $J = 14.7$ Hz, H-4), 3.21 (dd, 10.2 Hz, H-4). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} 174.54 (C-1), 166.31 (C-6), 164.11 (C-10), 137.09 (C-14), 131.38 (C-7), 131.07 C-8, 131.07 C-12, 128.10, (C-13), 124.54 (C-16), 121.95 (C-20), 119.39 (C-19), 119.10 (C-18), 116.24 (C-9), 116.09 (C11), 112.43 (C-7), 111.40 (C-5), 54.74 (C-2), 27.63 (C-4). M/z 327,09 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Apêndice H**).

14c. Solido rosa claro, rendimento de 85,30%. RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} 10.84 (s, $J = 2.5$ Hz, H-21), 8.73 (d, $J = 7.9$ Hz, H-15), 7.93 (m, $J = 5.5$ Hz, C-8 e C12), 7.63 (d, $J = 7.9$ Hz, H-17), 7.36 (d, $J = 8.0$ Hz, H-20), 7.32 (t, $J = 8.8$ Hz, H-9 e H-11), 7.23 (d, $J = 2.3$ Hz, H-16), 7.09 (t, $J = 7.5$ Hz, H-19), 7.02 (t, $J = 7.4$ Hz, H-18), 5.79 (s, H-3), 4.68 (m, $J = 10.0$ Hz, H-2), 3.34 (dd, $J = 10.1$ Hz, H-4), 3.23 (dd, $J = 10.1$, H-4). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} 174.49 (C-1), 166.26 (C-6), 164.07 (C-10), 137.05 (C-14), 131.34 (C-7), 131.03 C-8, 130.97 C-12, 128.50, (C-13), 124.50 (C-16), 121.91 (C-20), 119.35 C-19, 119.07 (C-18), 116.20 (C-9), 116.06 (C11), 112.43 (C-7), 112.39 (C-5), 54.70 (C-2), 27.59 (C-4). 327,06 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Apêndice I**).

3.2.2. Síntese do intermediário 18.

O processo sintético para obtenção do intermediário **18** ocorreu em duas etapas (**Esquema 3**): *i*) reação de Schotten-Baumann entre 5-metilisoxazol-3-amina e 2-cloro-2-oxoetil acetato para obter a correspondente amida **17** (LOW et al., 1992; MAGOSSO; VAN DEN BERG; VAN DER SCHAAF, 2021). Posteriormente, **18** foi obtido com rendimento de 99% através de uma hidrólise básica (*ii*) do grupo acetato do intermediário **17**



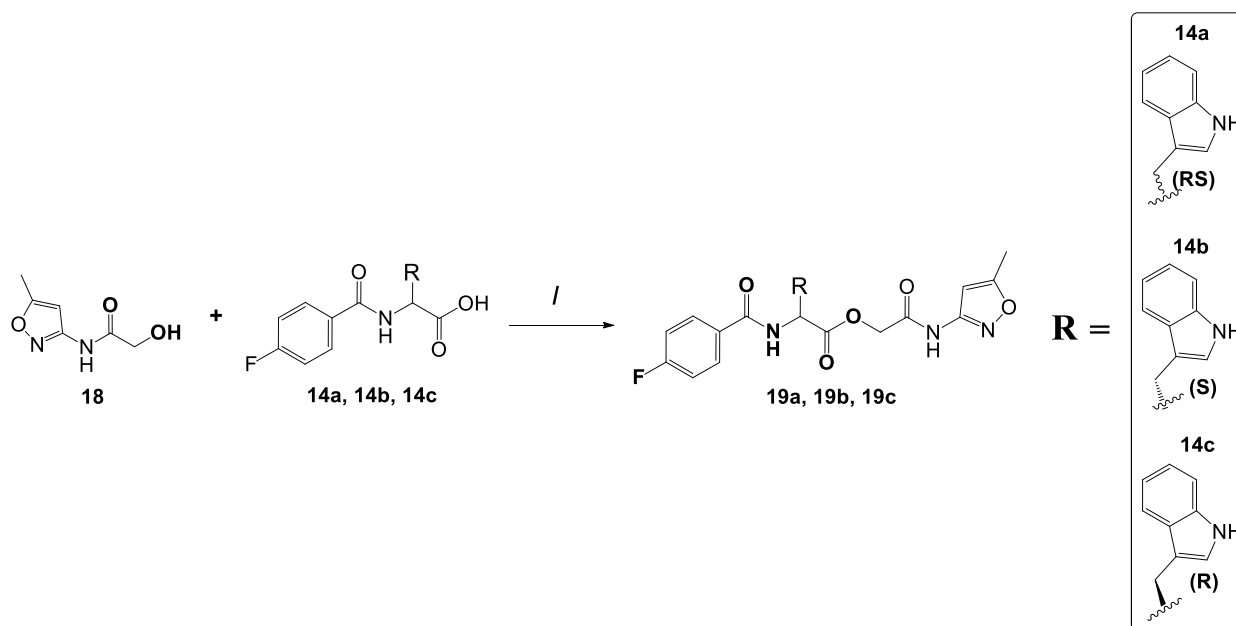
Esquema 3. Esquema geral para a síntese do intermediário 18. (i) TEA, DCM, 1 h, t.a; (ii) NaOH 50% (w/w), THF, 2 h, t.a. **Fonte:** autor

Procedimento experimental para síntese do intermediário 18.

O material de partida **15**, 5-metilisoxazol-3-amina (1,0 g, 10,2 mmol, 1,0 eq.) foi adicionado ao reagente **16**, 2-cloro-2-oxoetil acetato (1204 μ L, 11,20 mmol, 1,1 eq.) com Et₃N (1560 μ L, 11,20 mmol) em DCM por 1h a temperatura ambiente, para obtenção de **16** com rendimentos de 89,61%. Em seguida, foi realizada a hidrólise em meio básico de **17** (765,20 mg, 3,86 mmol) com NaOH (965,20 mg, 24,13 mmol) EM THF por 2h a temperatura ambiente, levando à obtenção de **17** com rendimento de 98,96%. **17**. Sólido amarelo, rendimento de 90%. RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ_H 8.98 (s, H-5), 6.73 (s, H-2), 4.72 (s, H-7), 2.41 (s, H-4), 2.21 (s, H-9). RMN de ¹³C (151 MHz, CDCl₃) δ_C 170.55 (C-8), 169.46 (C-3), 165.36 (C-6), 157.29 (C-1), 96.59 (C-2), 63.00 (C-7), 20.78 (C-9), 12.80 (C-4). IV (Vmax; cm⁻¹; pastilha de KBr), 3190-3485 (N-H amida), 2950-2992 (C-H alifático), 1715 (C=O amida), 1573 (C-NH), 1755 (C=O éster). 199,05 [M+H]⁺ (**Apêndice J**). **18**. Sólido branco, rendimento de 99%. RMN de ¹H (300 MHz, D₂O) δ_H 6.43 (s, H-2), 4.24 (s, H-7), 2.38 (s, H-4). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ_C 173.34 (C-3), 171.61 (C-6), 157.28 (C-1), 96.20 (C-2), 61.09 (C-7), 11.62 (C-4). IV (Vmax; cm⁻¹; pastilha de KBr), 3300 (O-H álcool), 3261 (N-H amida), 2922 (C-H alifático), 1673 (C=O amida), 1496-1530 (N-H amida), 1353 (C-N aromático), 1218 (C-N alifático), 1082 (C-O álcool). 157,05 [M+H]⁺ (**Apêndice K**).

3.2.3. Síntese do composto final 19a.

O composto final **19a** foi sintetizado através da Reação de Mitsunobu, levando à formação de uma ligação éster a partir do álcool primário **18** e o ácido **14a**, catalisada por DIAD e PPh₃ (**Esquema 4**) (SATPATHI et al., 2020).



Esquema 4. Esquema geral para a síntese dos intermediário **19a-b-c**. (VI) PPh₃, THF, DIAD, 24 h, t.a. **Fonte:** autor

Procedimento experimental para síntese do intermediário final **19a**.

A reação de Mitsunobu entre **14a** (50,20 mg, 0,154 mmol) e **18** (19,98 mg, 0,128 mmol) com DIAD (45,0 µL, 0,23 mmol), PPh₃ (60,43 mg, 0,23 mmol, 1,8 eq.) e THF a temperatura ambiente por 12h, forneceu o composto **19a** com 17% de rendimento como um óleo amarelo. RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ_H 11.16 (s, 1H, H-18), 10.88 (d, *J* = 2.4 Hz, H-7), 8.97 (d, *J* = 7.7 Hz, H-12), 7.94 (m, *J* = 5.8 Hz, 22 e H-26), 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, H-4), 7.37 (d, *J* = 8.1, 0.9 Hz, H-1), 7.33 (m, *J* = 8.8 Hz, H-23 e H-25), 7.28 (d, *J* = 2.4 Hz, H-8), 7.06 (m, *J* = 7.3 Hz, H-5 e H-6), 6.67 (s, H-20), 5.76 (s, H-16), 4.84 (m, *J* = 7.8 Hz, H-14), 4.81 (s, *J* = 6.2 Hz, H-27), 3.33 (dd, *J* = 10.0 Hz, H-10), 2.42 (d, H-27). RMN de ¹³C (151 MHz, DMSO-d₆) δ_C 172.62 (C-13), 170.80 (C-21), 166.51 (C-17), 164.18 (C-14), 158.52 (C-10), 157.14 (C-19), 137.08 (C-2), 131.13 (C-22), 131.06 (C-23), 127.96 (C-25), 124.70 (C-8), 121.98 (C-6), 119.43 (C-5), 118.92 (C-4), 116.28 (22), 116.14 (C-26), 112.47 (C-1), 110.95 (C-9), 97.22 (C-20), 63.55 (C-16), 54.61 (C-11), 27.45 (C-10), 22.89 (C-27). 465,133 [M+H]⁺ (**Apêndice L**).

3.2.4. Ensaio bioquímico para inibição da enzima cruzaina

A atividade catalítica da cruzaína foi medida pelo monitoramento da clivagem do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC como descrito anteriormente (DE OLIVEIRA et al., 2021). Os ensaios foram realizados em acetato de sódio 0,1 M, DTT 5 mM e Triton X-100 0,01%, pH 5,5. A concentração de cruzaína foi de 0,5 μ M e a concentração de substrato foi de 5,0 μ M (K_m = 1,6 μ M). Os ensaios foram acompanhados por 300s a 29°C em placas pretas de fundo plano de 96 poços e a atividade foi calculada com base nas taxas iniciais de atividade da enzima, em comparação com um controle de DMSO. Um inibidor reversível e competitivo conhecido da cruzaína, composto 31, IC_{50} = 0,36 μ M (DE SOUZA et al., 2020), foi usada como controle positivo em todos os ensaios enzimáticos. Comprimentos de onda de 355 e 460 nm foram usados para excitação e emissão, respectivamente. Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA) foi usado para determinar os valores de IC_{50} . Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3. Docking molecular

A estrutura (arquivos Mol2) dos compostos foi gerada usando o software de modelagem molecular SvhyL-X 2.1.1 (Certara, St. Louis, MO, EUA) rodando em CentOS Linux. A energia conformacional 3D foi minimizada usando o campo de força Tripos e o método de powell (SANTOS et al., 2014). Cargas parciais atômicas foram calculadas usando o método Gasteiger-Hückel em um ambiente aquoso implícito (constante dielétrica de 80,0). As moléculas foram docadas com o programa GOLD 5.3 (Cambridge Crystallographic Data Centre, UK) no sítio de ligação da cruzaína (PDB 3KKU, 1,28 Å) (FERREIRA et al., 2014). A preparação da cruzaína consistiu na remoção de todas as águas cristalográficas e do ligante cristalográfico e adição de hidrogênios. O sítio de ligação foi definido como uma esfera com radio de 10 Å centrado no ligante cristalográfico (B95). Os compostos foram docados aplicando os parâmetros default do GOLD e GoldScore. A verificação das conformações foi realizada com Pymol 1.7.x (Schrödinger. Nova York.NY).

3.4. Construção da biblioteca virtual por química combinatória e docagem molecular

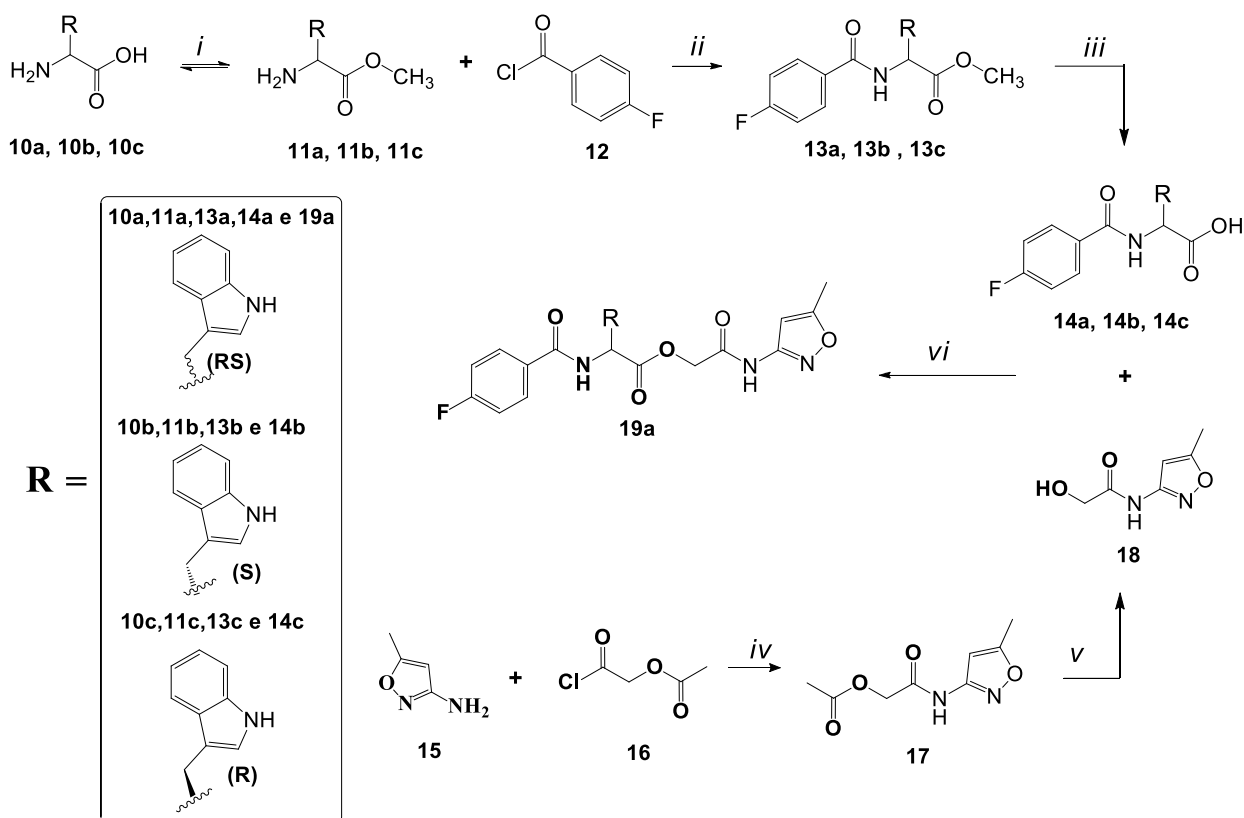
Para a construção da biblioteca de compostos análogos ao hit 10, foi utilizado o módulo CombiGlide da plataforma Schrödinger. Os análogos tiveram a combinação de 2 grupos de reagentes na estrutura. Os reagentes necessários para gerar a biblioteca de compostos virtual, foram obtidos no catálogo da Sigma Aldrich, no site zinc15.com, um total de 84.807 reagentes. Em seguida, o programa MAESTRO (Schrödinger, Nova York, NY) foi usado para realizar a química combinatória, e um filtro foi realizado para os reagentes: massa molar menor que 300, número de aromáticos igual a 1, este procedimento levou à obtenção de 16.360 reagentes aos quais a energia foi minimizada utilizando o campo OPLS3, retendo a quiralidade e sem ionizá-los obtendo suas estruturas 3D. Os reagentes obtidos foram utilizados para substituir as porções (A) oxazol e (C) fenil, mantendo as porções estruturais (B) Indol e (D) linker fixas. Para a porção A, 1.864 reagentes ajustaram-se no perfil de (Amine-primary-aryl), e para a porção B, 2.420 reagentes no perfil de (Carboxylic-acid-C-O). O local de ligação exato foi especificado no esqueleto da molécula e nos grupos funcionais livres dos reagentes (OH) e (NH₂) de fenil e oxazole respectivamente. A química combinatória foi realizada, finalmente obtendo-se uma biblioteca de compostos de 4.559.280 que foi utilizada em seguida para a realização de um docking molecular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese do composto hit e confirmação da atividade de inibição da cruzaina

Tendo como modelo a estrutura química do hit, foi realizado o planejamento da rota sintética para este composto (**Esquema 5**). A rota sintética foi planejada e fragmentada em reagentes comerciais (**Figura 6**), que a partir de condições reacionais encontradas na literatura envolvendo essencialmente reações de esterificação e acilação de aminas para formação de amidas, foi sintetizado seguindo o **Esquema 5**.

Para a rota sintética, foram utilizados o material de partida 10 (triptofano), que possui um centro estereogênico, que foi mantido até a obtenção do produto final da rota sintética, (a) em mistura racêmica, (b) L-triptofano e (c) D-triptofano, fornecendo os intermediários identificados com sufixo –a (mistura racêmica), -b (S) e –c (R). A avaliação da estereoquímica que fornece maior potência de inibição da enzima é um dos objetivos do presente estudo, que foi realizada in silico.



Esquema 5. Rota sintética utilizada para obtenção do hit **19**. (i) Esterificação de triptofano (**10**, comercial) com MeOH, e SOCl₂ produzindo o éster metílico **11** (LIU et al., 2015), para a proteção da função ácido, deixando livre a função amina para a próxima reação; (ii) **11** reage com o cloreto de ácido **12** em presença de TEA e DCM como solvente a temperatura ambiente por 1h (reação de Schotten Baumann) (LOW et al., 1992; MAGOSSO; VAN DEN BERG; VAN DER SCHAAF, 2021), para produzir **13**, (iii) o qual mediante hidrólise básica (NaOH 50%) proporciona o intermediário **14**. (iv) A obtenção de **18** se dá pela reação entre **15** e **16** (comerciais), DCM como solvente, e TEA como catalizador a temperatura ambiente durante 1h (reação de Schotten Baumann); (v) em seguida, por meio da hidrólise básica (NaOH 50%) de **17** o composto **18** é obtido. (vi) Finalmente, a reação de Mitsunobu entre **14** e **18** com DEAD, PPh₃, THF como solvente a temperatura ambiente por 12h (SATPATHI et al., 2020), fornece o composto **19a**.

Na primeira etapa reacional, os reagentes DL (10a), L (10b) e D triptofano (10c) foram clorados utilizando cloreto de tionila para formação dos cloretos de acila **11a-b-c** com rendimentos de 94, 97 e 91% respectivamente. O mecanismo começa com a substituição do –OH do ácido por um bom grupo de saída, o clorosulfito (**c**, **Esquema 6**). Em seguida, o cloro nucleofílico formado ataca a carboxila substituindo o clorosulfito, que deixa a estrutura levando o par de elétrons da ligação C-O (**f**, **Esquema 6**) (WADE, 2011).

Na segunda etapa, para a conversão dos cloretos de acila em os ésteres **11a-b-c**, segue um mecanismo de adição-eliminação, iniciando com adição do nucleófilo no grupo carboxila do derivado de ácido deslocando o par de elétrons para o oxigênio (**h**, **Esquema 6**). Posteriormente, segue a eliminação do grupo de saída (cloro) e formação da dupla ligação (**i**, **Esquema 6**). Por último, o cloreto básico desprotona o intermediário (**j**, **Esquema 6**) para formar os intermediário **11a-b-c** (WADE, 2011) (**Esquema 6**).

Devido à semelhança espectral entre os intermediários **11a-b-c** apenas uma estrutura química teve a discussão detalhada sobre a identificação estrutural (**Figura 7**). Para os outros intermediários, os dados foram citados e mais detalhe podem ser observados na seção apêndice para cada estrutura química.

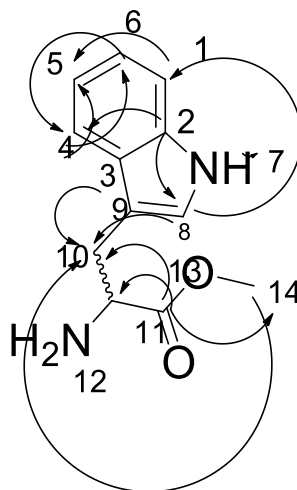
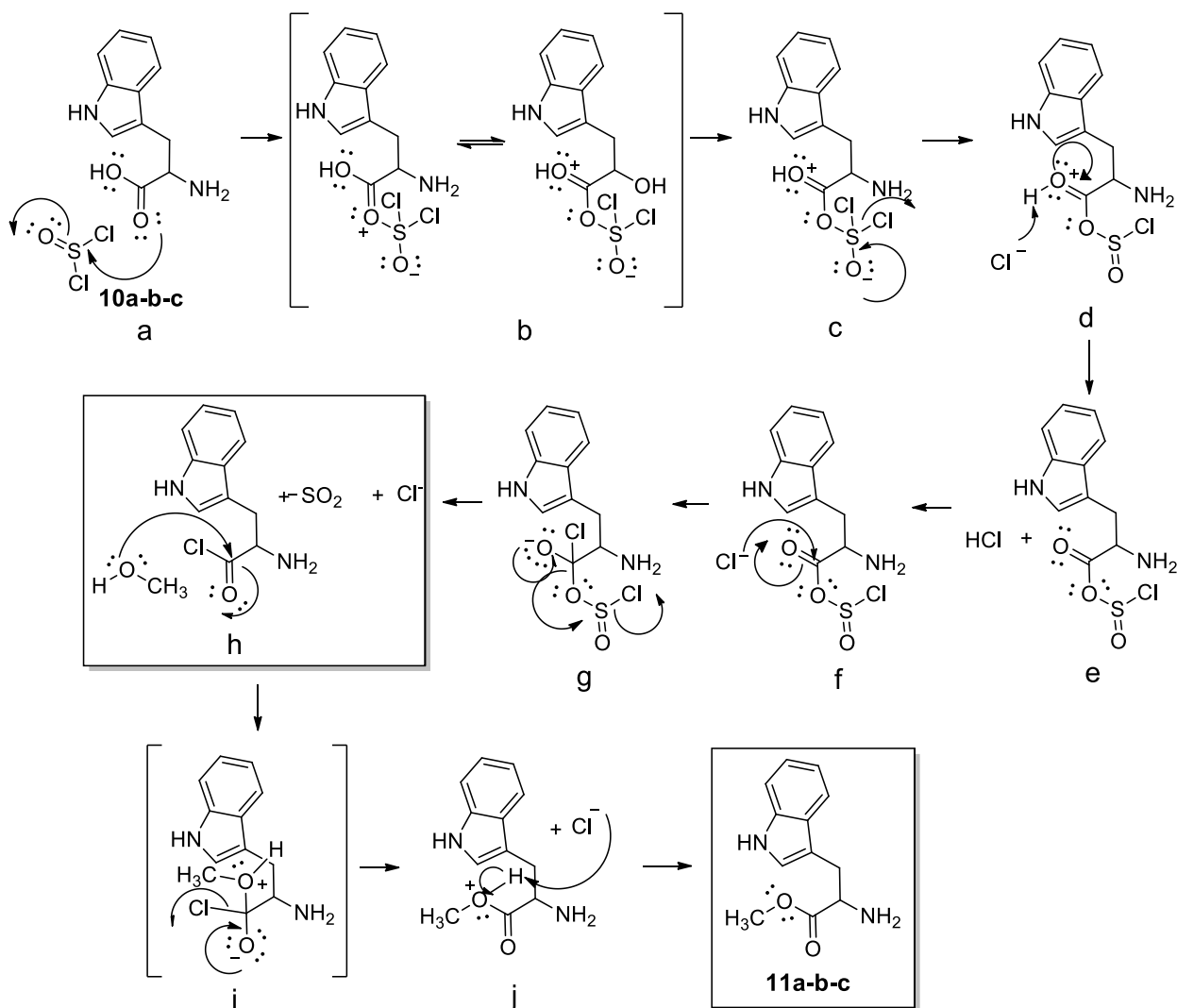


Figura 7. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o intermediário **10a**

O espectro de absorção do infravermelho do intermediário **10a** mostrou três estiramentos um em 1734 cm^{-1} e dois em 1000 e 1340 cm^{-1} , as quais puderam ser identificadas como pertencente a ligação R-COO-R do éster. Esse dado foi confirmado devido a presença de um simpleto no espectro de RMN ^1H com δ_{H} 3.80 ppm e o sinal no espectro de RMN de ^{13}C em δ_{C} 118.34 ppm referente à presença da metila. Além disso, no espectro de HMBC pode-se observar uma correlação entre o hidrogênio (H-14) em 3,80 ppm e o carbono (C-13) em 173,73 ppm da carboxila, estas correlações a longa

distância pode-se detectar uma vez que é uma tecnica permite o acoplamento a duas ou três ligações de distâncias (**Apêndice A**).

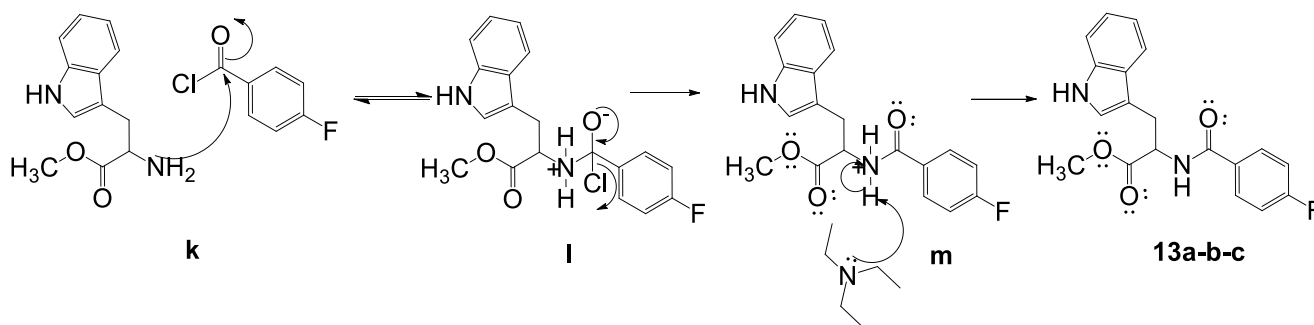


Esquema 6. Mecanismo de reação do cloreto de acila, na obtenção dos metil-triptofano 11a-b-c. (c) substituição do $-\text{OH}$ do ácido pelo clorosulfito, (f) ataque do cloro nucleofílico à carboxila substituindo o clorosulfito, (h) adição do metanol nucleofílico no grupo carboxila do cloreto de ácido, (i) eliminação do grupo de saída (cloro) para formação da dupla ligação e (i) desprotonação pelo cloreto básico para formação de 10a-b-c. **Fonte:** autor.

A obtenção de **13a-b-c** ocorreu através da Reação de Substituição nucleofílica no grupo acila com rendimentos de 88, 83 e 86%. O mecanismo de reação começa com o ataque nucleofílico das aminas primárias **11a-b-c** na carboxila do cloreto de ácido (**k**, **Esquema 7**). O cloreto de ácido é mais reativo que uma cetona ou aldeído porque o átomo eletronegativo cloro atrai a densidade eletrônica do carbono do grupo carboxila

tornando-o mais eletrofílico. O átomo de cloro no intermediário tetraédrico é um bom grupo de saída. O intermediário tetraédrico formado remove o cloro (**I**, **Esquema 7**). Por fim, a trietilamina utilizada neutraliza o HCl formado, permitindo que a reação ocorra obtendo a amida desejada 12a-b-c (WADE, 2011) (**m**, **Esquema 7**).

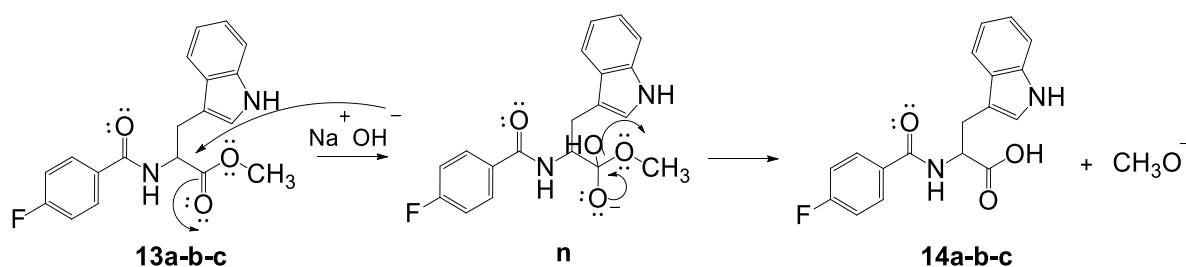
Da mesma forma como foi descrito na identificação estrutural de **11a-b-c**, entre os intermediários **13a-b-c** apenas uma estrutura química recebeu discussão em detalhe sobre a identificação estrutural. Para os outros intermediários, os dados foram citados e mais detalhes podem ser observados na seção apêndice para cada estrutura química. O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da molécula **13a** mostrou a presença de um dobleto em δ H 6,61 ppm, o qual é referente à presença da formação da amida. Esse dado pode ser confirmado com o espectro de massas que apresentou o pico do íon molecular +1 de 341,12 [M+H]⁺ (**Apêndice D**).



Esquema 7. Mecanismo de acilação do éster triptofano por cloreto de 4-flurbenzil; (**k**) ataque nucleofílico das aminas primárias na carboxila do cloreto de ácido, (**I**) remoção de cloro do intermediário tetraédrico e (**m**) neutralização do HCl formado. **Fonte:** autor

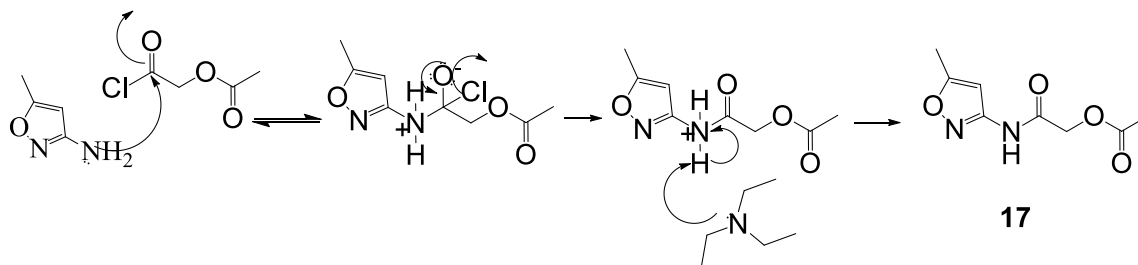
A hidrólise em meio básico do grupo éster de **13a-b-c**, resultou na formação do grupo ácido presente nos intermediários **14a-b-c**, com rendimentos de 80, 83 e 91% respectivamente. O mecanismo é uma reação de substituição nucleofílica à carboxila alfa ao anel indol, onde a hidroxila (OH) ataca a carboxila do grupo éster levando a delocalização dos elétrons para o oxigênio. Nessa etapa, um estado de transição é formado no qual uma estrutura tetraédrica (**n**, **Esquema 8**) é formada, para posteriormente, reestabelecer a ligação C=O fazendo com que o grupo OCH₃ seja eliminado carregando o par de elétrons formando o grupo ácido desejado (WADE, 2011) (**Esquema 8**).

Da mesma forma que nas seções anteriores devido a sua semelhança espectral, apenas o intermediário **14a** recebeu discussão detalhada da identificação estrutural, o qual mostra os principais sinais que confirmam sua obtenção. O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da molécula **14a** mostrou a presença de um simpleto em δ H 10.84 ppm, o indica a evidência do hidrogênio da hidroxila do ácido carboxílico. Esse dado pode ser confirmado com o espectro de massas que apresentou o pico do íon molecular +1 de 327,08 [M+H]⁺, o que indica a perda em massa da metila do éster corroborando assim a etapa sintética da hidrólise (**Apêndice G**).



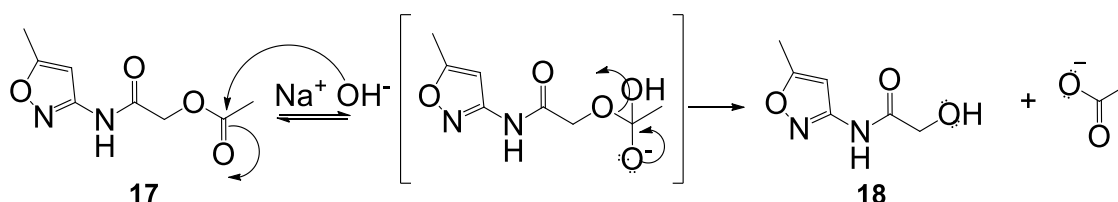
Esquema 8. Mecanismo de hidrólise de éster para formação dos intermediários **14a-b-c**. substituição nucleofílica à carboxila alfa ao anel indol, (**n**) restauração a ligação C=O do carbóximo do anel indol. **Fonte:** autor.

Os intermediários **17** e **18** (**Esquemas 9 e 10**) foram obtidos com rendimentos de 90 e 98% respectivamente, utilizando metodologia similar à utilizada para os intermediários **13a-b-c** e **14a-b-c** (**Esquema 9 e 10**).



Esquema 9. Mecanismo de acilação do 3- Amino- 5- metilisoxazol por cloreto de acetoxiacetila. **Fonte:** autor.

A banda larga de absorção na região do IV na faixa de 2950-2992 cm^{-1} (estiramento N-H) juntamente com o simpleto em δH 8.98 ppm, faz referenciar a presença do grupo amida na estrutura química do intermediário **17**. A estrutura química ainda pode ser confirmada devido ao valor do íon molecular em 199,05 $[\text{M}+\text{H}]^+$ + (**Apêndice J**).



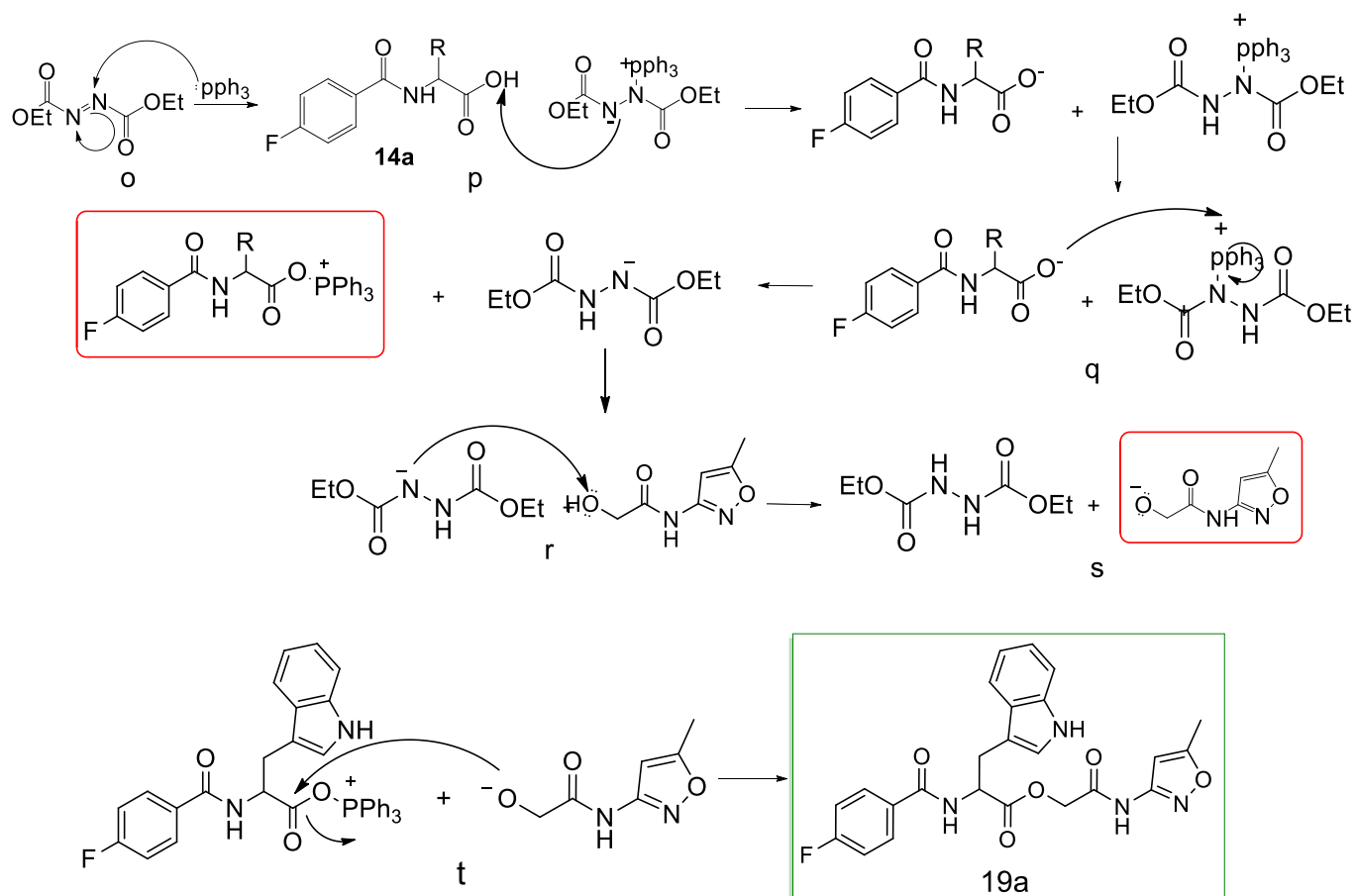
Esquema 10. Mecanismo de hidrólise do acetato para formação do intermediário **18**.

O espectro de absorção na região do infravermelho do intermediário **18** mostrou um estiramento em 3300 cm^{-1} característico de álcoois O-H e um estiramento em 1082 cm^{-1} identificada como pertencente à ligação C-O do álcool. Essa etapa sintética de hidrólise do acetato pode ser confirmado com o espectro de massas que apresentou o pico do íon molecular +1 de 157,05 $[\text{M}+\text{H}]^+$ + (**Apêndice K**).

O composto final **19a** foi sintetizado empregando a reação de Mitsunobu, que envolve a reação de um álcool com um ácido carboxílico catalisado por DEAD (LUTJEN et al., 2018) e PPh_3 . A reação de Mitsunobu fornece estereoespecificidade, uma vez que mantém a estereoquímica inicial do reagente (SATPATHI et al., 2020).

Nesta reação, a PPh_3 realiza um ataque nucleofílico se adicionando em uns dos nitrogênios do DEAD (**o**, **Esquema 11**), para fornecer o ânion estabilizado por um dos grupos éster formando a bateína. Esse ânion, é suficientemente básico para desprotonar o ácido **14a** (**p**, **Esquema 11**) obtendo um par iônico. O íon derivado do ácido ataca o átomo de fósforo (**q**, **Esquema 11**) formando um ânion nitrogenado e estabilizando-se com o grupo éster. Em seguida, o ânion básico desprotona o álcool (**r**, **Esquema 11**) obtendo-se os subprodutos (**s**, **Esquema 11**) (CAMP; JENKINS, 1989). Finalmente, o ânion eletrofílico formado ataca o derivado de fósforo do ácido em uma reação $\text{S}_{\text{N}}2$ onde o grupo de saída oxido de fósforo é deslocado (**t**, **Esquema 11**) obtendo o composto final **19a** (WADE, 2011). Por fim, composto **19a** teve sua estrutura confirmada através do espectro de massa que apresentou o pico do íon molecular +1 de 465,133 $[\text{M}+\text{H}]^+$, uma

vez que os sinais de hidrogênio e carbono não podem ser evidenciadas para este composto nos espectros obtidos (**Apêndice L**).



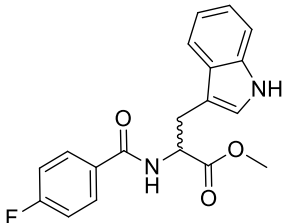
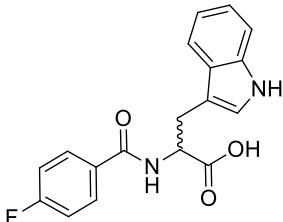
Esquema 11. Mecanismo de reação de Mitsunobu na obtenção de composto **18a**. (**u**); ataque nucleofílico da PPh₃ no nitrogênio do DEAD, (**v**); desprotonação del -ácido pela bateína, (**w**). par iônico obtido, (**x**); desprotonação do álcool por parte do ânion básico, (**z**); reação SN2 entre o ânion eletrofílico e o derivado de fósforo de ácido. **Fonte:** autor.

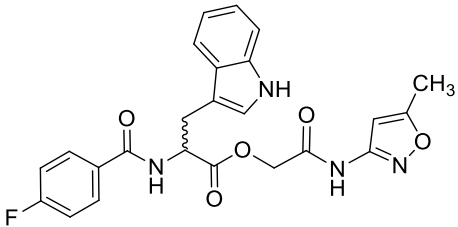
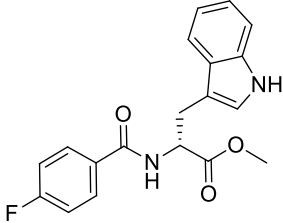
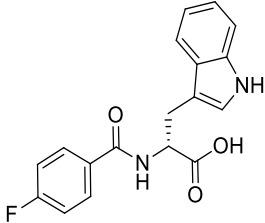
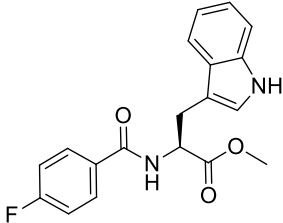
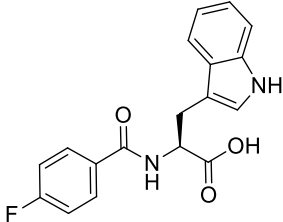
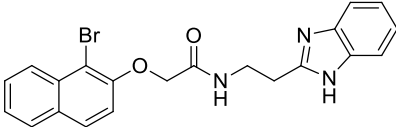
A avaliação bioquímica com a enzima cruzaína foi realizada com os intermediários (**13a-b-c**, **14a-b-c**) e o composto final **19a** (**Tabela 1**). A síntese realizada permitiu explorar as interações com o anel oxazol e a importância da estereoquímica no anel indol do triptofano (**Figura 6**).

Modificações foram toleradas no oxigênio alfa da carbonila do triptofano, que se esperava ocupar o subsítio S3 da enzima cruzaína. A substituição do átomo de hidrogênio pelo grupo metil e pelo oxazol resultou em um aumento na potência de inibição da enzima em relação aos intermediários **13a**, **b** e **c**, sugerindo que o anel oxazol, devido

seu maior tamanho molecular, que ocupa o subsítio S3, aumentando a probabilidade de gerar uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio presente na estrutura química do anel oxazol e os resíduos vizinhos. Ao mesmo tempo, é provável que o metil do oxazol interaja hidrofobicamente no subsítio S3, pois este é um subsítio com características hidrofóbicas. Adicionalmente, temos a intenção de avaliar a estereoquímica na porção (B) do composto hit (**Figura 6**). Embora não tenha sido realizado o ensaio bioquímico do composto **19b** e **19c** com a cruzaina, pode-se observar nos resultados de ensaio biológicos (**Tabela 1**) que os intermediários **13c** e **14c** apresentam uma potência considerável devido à estereoquímica (R) que eles apresentam. O estudo de modelagem molecular realizado apresentado na próxima seção traz também indicações sobre a contribuição da estereoquímica para a atividade.

Tabela 1. Resultado de atividade biológica de inibição da cruzaina e rendimento obtidos na síntese dos intermediários **13a-b-c**, **14a-b-c** e produto final **19a**.

Inibição cruzaina			
Identificação	% Inibição (100 μ M)	Estrutura	Rendimento sintético
13a	16,6%	 Configuração RS	88%
14a	13,0%	 Configuração RS	80%

19a	71,4%		18%
		Configuração RS	
13b	12,6%		83%
		Configuração S	
14b	7,6%		83%
		Configuração S	
13c	17,9%		85%
		Configuração R	
14c	31,7%		91%
		Configuração R	
Controle positivo [8r, Ferreira et al. 2014]	63%		

4.2. Estudos computacionais para avaliação *in silico* da contribuição da estereoquímica para a interação do hit e enzima.

Uma das investigações iniciais sobre a atividade biológica do hit foi com relação a sua estereoquímica, já que no artigo original ela não é explorada. Paralelamente à síntese e avaliação biológica dos enantiômeros, foi realizada uma avaliação *in silico* por meio de docking molecular, que consistiu em evidenciar qual estereoquímica do composto (R ou S), poderia fornecer a melhor interação no sítio ativo, e possivelmente maior potência na atividade biológica. O docking foi realizado com as estereoquímicas R e S de cada um dos intermediários sintetizados (**13b-c** e **14b-c**) e compostos finais (**19b-c**) (não sintetizados). Os resultados estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Resultado do docking realizado com os compostos **13b-c**, **14b-c** e **19b-c**

Identificação	Pontuação	ΔG
19b Configuração S	24.00	-28.35
13b Configuração S	23.32	-24.30
14b Configuração S	22.60	-23.47
19c Configuração R	27.11	-30.37
13c Configuração R	25.76	-31.53
14 Configuração R	24.85	-30.03

Os resultados obtidos nos mostram uma maior afinidade dos compostos com estereoquímica R pelo sítio da cruzaina, evidenciando que esta seja a estereoquímica que proporcione maior potência para a inibição da enzima. Os intermediários **13c** e **14c** (**a** e **b**, **Figura 8**) apresentaram interações em comum, 1) uma ligação de hidrogênio entre

a carbonila de Asp161 e o N-H da amida na posição beta ao anel fenílico; 2) ligação de hidrogênio entre anel indol e a carbonila da cadeia lateral da Gln19; 3) ligação de hidrogênio entre o N-H da Gly66 e a carbonila na posição alfa ao anel aromático.

A estrutura com maior pontuação e baixo ΔG é a substância **19c** que apresentou quatro ligações de hidrogênio, ilustradas em (c, **Figura 8**). No subsítio S3, observamos uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do anel oxazol com o hidrogênio da hidroxila da cadeia lateral da Ser61 e uma ligação de hidrogênio entre a carbonila de Ser64 com o hidrogênio da amida alfa ao anel oxazólico (c, **Figura 8**). Além disso, observamos uma ligação de hidrogênio entre a carbonila da Asp161 e o N-H da posição beta ao anel fenil, e uma quarta ligação de hidrogênio do N-H do anel indol com a carbonila da cadeia lateral da Gln19, nos subsítios S1 e S2 respectivamente. Podemos observar também que o anel indol dos compostos **13c**, **14c** e **18c** com estereoquímica R realizam uma interação π - π , com o anel aromático da His162, contribuindo para menor energia de ligação (d, **Figura 8**). O baixo valor de pontuação e alto ΔG em 19b, deve-se ao fato deste composto possuir uma estereoquímica S que induz os grupos fenil inverterem suas posições nos subsítios de cruzaína, e as interações são modificadas. Por outro lado, esta configuração faz que a cadeia lateral do oxazol fique localizada fora do subsítio S3 (e, **Figura 8**).

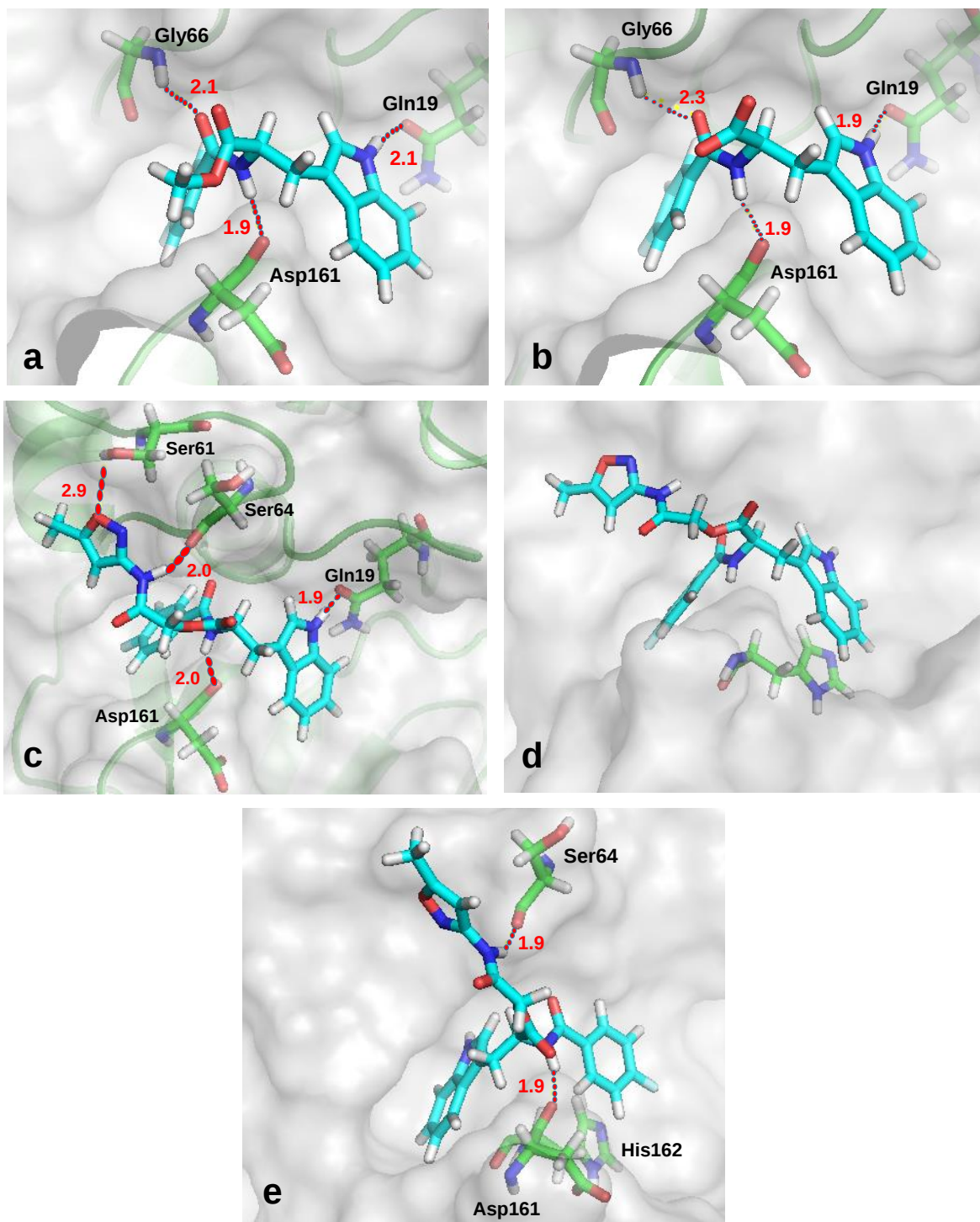


Figura 8. Conformações e interações intermoleculares para os intermediários e produto final planejado no sítio da enzima cruzaina (superfície representada em cinza, PDB ID: 3KKU). As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio, **a** e **b**) estrutura dos intermediários **13c** e **14c** (ciano) e destaque para as interações entre a carbonila de Asp161 e o N-H da amida na posição beta ao anel fenílico, do N-H do anel indólico e a carbonila da cadeia lateral da Gln19, e entre o N-H da Gly66 e a carbonila na posição alfa ao anel fenílico. **c**) estrutura do composto **18c** (ciano) e interações entre o oxigênio do anel oxazol com o hidrogênio da hidroxila da cadeia

lateral da Ser61, entre a carbonila da Ser64 com o hidrogênio da amida alfa ao anel oxazólico, entre a carbonila de Asp161 e o N-H da amida na posição beta ao anel fenil, e uma quarta ligação de hidrogênio do N-H do anel indólico com a carbonila da cadeia lateral da Glu119, **d)** representação da interação π - π do anel indol do composto **19c**, com o anel aromático da His162, **e)** Estrutura do composto **19b** e representação de interação enzima-substrato com a estereoquímica S.

Com esses resultados, foi verificado que tanto o ensaio biológico quanto o estudo de docking molecular tiveram ponto de convergência uma vez que a estereoquímica R foi a mais adequada para o tipo de compostos testado, devido aos valores de ΔG obtidos.

4.3. Química Combinatória Computacional para o planejamento de análogos.

Além da síntese do hit inicial foi realizado o planejamento de análogos por uma avaliação sistemática e robusta, por meio de química combinatória computacional. O estudo gerou uma série de análogos com reagentes químicos disponíveis comercialmente, onde no caso usamos o catálogo de reagentes da Sigma Aldrich. Foi realizada uma busca por materiais de partida similares aos utilizados para a síntese do hit original, mas com diferentes substituintes (**Figura 9**), e com os requisitos químicos para que pudessem ser utilizados na rota sintética planejada. Essa busca resultou em milhares de reagentes comerciais que foram combinados para resultar em mais de 4 milhões de compostos planejados. As porções estruturais B e D da **Figura 9** foram fixadas e a combinação de 1.864 reagentes da porção oxazol (c), e 2.420 da porção fenil (a) resultaram em 4.559.260 de compostos planejados computacionalmente, que foram avaliados por docagem molecular com a enzima cruzaina.

Levando em consideração os resultados para os compostos mais bem pontuados no docking molecular e a viabilidade sintética dos compostos planejados computacionalmente, foram selecionados os compostos **20** e **21**, apresentados na **Tabela 3** como os mais promissores para realizar a síntese e avaliação biológica. Estes compostos serão sintetizados posteriormente utilizando rota similar à utilizada para a síntese do composto **19c**, visando obtenção de compostos com maior potência de inibição da enzima cruzaina.

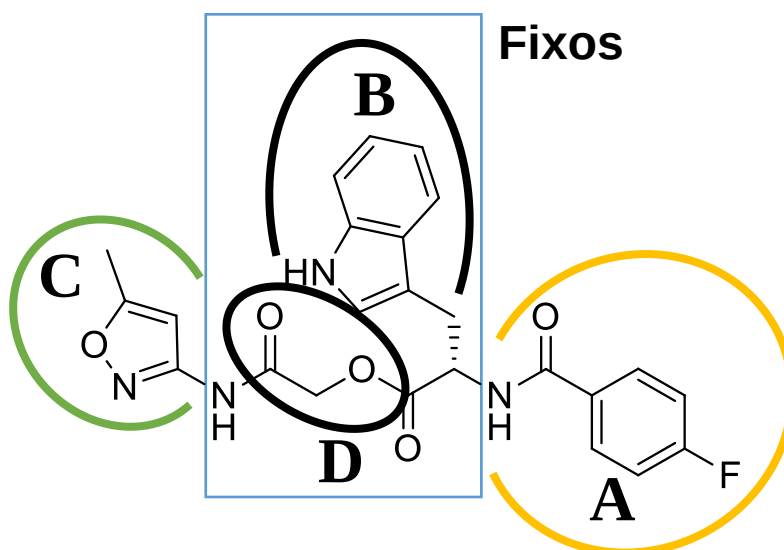


Figura 9. Estrutura química do composto **9** inibidor irreversível de cruzafina usado como modelo para estudo de química combinatória.

Tabela 3. Estrutura dos compostos planejados considerando a viabilidade sintética e o docking realizado com os compostos da química combinatória computacional.

Identificação	Estrutura	Pontuação	ΔG
20 Configuração R		33.59	-38.57
21 Configuração R		31.77	-37.38

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível realizar um planejamento sintético para obtenção do hit 9, um inibidor irreversível de cruzaina descrito na literatura, bem como sua avaliação de inibitória enzimática. Os métodos de purificação e caracterização estrutural por RMN de ^1H , ^{13}C , espectroscopia de absorção na região do infravermelho e espectrometria de massas forneceram dados que permitiram confirmar as estruturas dos intermediários 13a-b-c, 14a-b-c e composto final 19a (hit 9) com rendimentos sintéticos satisfatórios.

O estudo de docking molecular foi uma estratégia eficiente para avaliar a interação dos compostos ativos e a estrutura de cruzaina, sugerir a estereoquímica mais adequada (estereoquímica R) do hit 9 para inibição de cruzaina e identificar compostos mais promissores por química combinatória a partir de uma biblioteca de 4 milhões de compostos. Os resultados de síntese, estudo computacional e atividade biológica descritos nesse trabalho abrem caminhos para a descoberta de novos compostos hits inibidores de cruzaina para o tratamento da doença de chagas.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-HERRERA, M. et al. Genomic medicine in Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 197, n. March, 2019.
- ARRÚA, E. C. et al. Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chagas disease: A review. **Acta Tropica**, v. 198, n. July, p. 105080, 2019.
- BARBOSA DA SILVA, E. et al. Cruzain structures: Apocruzain and cruzain bound to S-methyl thiomethanesulfonate and implications for drug design. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 75, n. 6, p. 419–427, 2019a.
- BARBOSA DA SILVA, E. et al. Cruzain structures: Apocruzain and cruzain bound to S-methyl thiomethanesulfonate and implications for drug design. **research communications**, v. 75, n. 6, p. 419–427, 2019b.
- BRAK, K. et al. Nonpeptidic Tetrafluorophenoxymethyl Ketone Cruzain Inhibitors as Promising New Leads for Chagas. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 1763–1773, 2010.
- CAMP, D.; JENKINS, I. D. the Mitsunobu Esterification Reaction. 1. The Involvement of Phosphoranes and Oxyphosphonium Salts. **American Chemical Society/American Chemical Society**, v. 54, n. 9, p. 3045–3049, 1989.
- CARDOSO, M. V. DE O. et al. 2-(phenylthio)ethylidene derivatives as anti-Trypanosoma cruzi compounds: Structural design, synthesis and antiparasitic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 180, p. 191–203, 2019.
- CIANNI, L. et al. Can Cysteine Protease Cross-Class Inhibitors Achieve Selectivity? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 23, p. 10497–10525, 2019.
- CUCUNUBÁ, Z. M. et al. How universal is coverage and access to diagnosis and treatment for Chagas disease in Colombia? A health systems analysis. **Social Science and Medicine**, v. 175, p. 187–198, 2017.
- DE MENEZES, R. R. P. P. B. et al. Antiparasitic effect of (–)- α -bisabolol against Trypanosoma cruzi Y strain forms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.

95, n. 3, p. 114860, 2019.

DE OLIVEIRA, A. S. et al. Diaminomaleonitrile derivatives as new potential antichagasic compounds: A study of structure-activity relationships. **Future Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 24, p. 2167–2183, 2021.

DE SOUZA, M. L. et al. Discovery of Potent, Reversible, and Competitive Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity: A Structure-Based Drug Design Approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, p. 1028–1041, 2020.

FERREIRA, R. et al. Structure-Based and Molecular Modeling Studies for the Discovery of Cyclic Structure-Based and Molecular Modeling Studies for the Discovery of Cyclic Imides as Reversible Cruzain Inhibitors With Potent Anti- *Trypanosoma cruzi* Activity. **frontiers in cchemistry**, v. 7, p. 1–21, 2019.

FERREIRA, R. S. et al. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of potent noncovalent and nonpeptidic cruzain inhibitors as anti- *Trypanosoma cruzi* agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2380–2392, 2014.

FRANCO-PAREDES, C. et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine importance. **Travel Medicine and Infectious Disease**, n. January, p. 101565, 2020.

GOMES, J. C. et al. Synthesis and structure-activity relationship of nitrile-based cruzain inhibitors incorporating a trifluoroethylamine-based P2 amide replacement. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 22, p. 115083, 2019.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 164–169, 2019.

IKEDIONWU, C. et al. Trends and associated characteristics for Chagas disease among women of reproductive age in the United States, 2002 to 2017. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 11, p. e00167, 2020.

KHATER, I.; NASSAR, A. In silico molecular docking analysis for repurposing approved antiviral drugs against SARS-CoV-2 main protease. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 27, p. 101032, 2021.

LIU, J. et al. Design, synthesis and biological evaluation of tasiamide B derivatives as BACE1 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 1963–1974, 2015.

LOMBARDINO, JOSEPH G, J. A. L. THE ROLE OF THE MEDICINAL CHEMIST IN DRUG DISCOVERY — THEN AND NOW. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. October, p. 853–861, 2004.

LOW, C. M. R. et al. Novel oxathiazinones as gastrin ligands : Unexpected products from the schotten-baumann reaction of arylsulphonyl chlorides with derivatives of aspartic acid. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 325–330, 1992.

LUTJEN, A. B. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Synthesis of (E) -cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification. **journal**, v. 26, n. 19, p. 5291–5298, 2018.

LYNN, M. K. et al. Contemporary Autochthonous Human Chagas Disease in the USA. **Acta Tropica**, v. 205, n. September 2019, p. 105361, 2020.

MAGOSSO, M.; VAN DEN BERG, M.; VAN DER SCHAAF, J. Kinetic study and modeling of the Schotten-Baumann synthesis of peroxyesters using phase-Transfer catalysts in a capillary microreactor. **Reaction Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 9, p. 1574–1590, 2021.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 496–524, 2015.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Burden of Chagas disease in Brazil, 1990–2016: findings from the Global Burden of Disease Study 2016. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 3–4, p. 301–310, 2019.

ORTEGA, H. E. et al. Antifungal compounds from *Streptomyces* associated with attine ants also inhibit *Leishmania donovani*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007643, 2019.

PERIN, L. et al. Low-dose of benznidazole promotes therapeutic cure in experimental chronic Chagas' disease with absence of parasitism in blood, heart and colon. **Experimental Parasitology**, v. 210, n. November 2019, p. 107834, 2020.

PROCEDURE, A. S. **DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern Stool Specimens - Staining Procedures**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>.

RIBEIRO, J. F. R. **Inibidores de Cisteíno Proteases como Candidatos Terapêuticos para o Tratamento de Doenças Parasitárias**. [s.l: s.n.].

ROMEIRO, N. C. et al. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 641–652, 2009.

RUIWU, L.; XIAOCEN, L.; LAM, K. S. Combinatorial Chemistry in Drug Discovery. **Chemical Biology**, v. 63, n. 38, p. 117–126, 2017.

SANTOS, C. B. R. DOS et al. Molecular Modeling: Origin, Fundamental Concepts and Applications Using Structure-Activity Relationship and Quantitative Structure-Activity Relationship. **Reviews in Theoretical Science**, v. 2, n. 2, p. 91–115, 2014.

SANTOS, L. H. et al. Understanding Structure-Activity Relationships for Trypanosomal Cysteine Protease Inhibitors by Simulations and Free Energy Calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 1, p. 137–148, 2019.

SANTOS, S. S. et al. Searching drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a brief review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 105906, 2020.

SATPATHI, H. et al. New trivalent phosphorus containing poly(arylene ether)s as alternative reactants for the Mitsunobu reaction. **European Polymer Journal**, v. 140, n. September, p. 110045, 2020.

SERAFIM, R. A. M. et al. Molecular modeling and structure–activity relationships studies of bioisoster hybrids of N-acylhydrazone and furoxan groups on cruzain. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 4, p. 760–769, 2017.

SERRANO, A. et al. QN-Docking: An innovative molecular docking methodology based on Q-Networks. **Applied Soft Computing Journal**, v. 96, p. 106678, 2020.

SIKLOS, M.; BENAÏSSA, M.; THATCHER, G. R. J. Cysteine proteases as therapeutic

targets : does selectivity matter ? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors.

Acta Pharmaceutica Sinica B, v. 5, n. 6, p. 506–519, 2015.

SILES, R. et al. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 16, p. 4405–4409, 2006.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 758–777, 2014.

WADE, L. G. J. **Química Orgánica. Vol 2**. 7. ed. Mexico: Pearson, 2011.

WANG, S.; DONG, G.; SHENG, C. Structural simplification: an efficient strategy in lead optimization. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 9, n. 5, p. 880–901, 2019.

WANG, X. et al. A new chemotype with promise against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 1, p. 126778, 2020.

ZECCA, I. B. et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection and associated histologic findings in domestic cats (*Felis catus*). **Veterinary Parasitology**, v. 278, n. October 2019, p. 109014, 2020.

APÊNDICE

Apêndice A – Espectros para caracterização estrutural do Intermediário **11a**

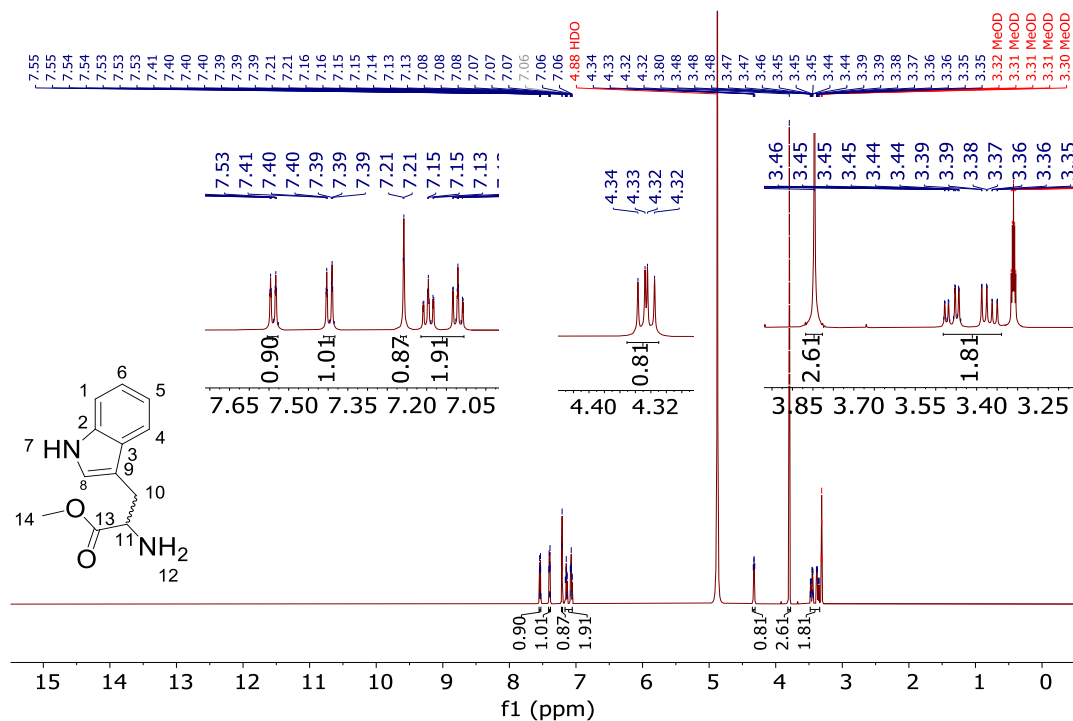


Figura A1. RMN ^1H (300 MHz, metanol deuterado) do intermediário **11a**

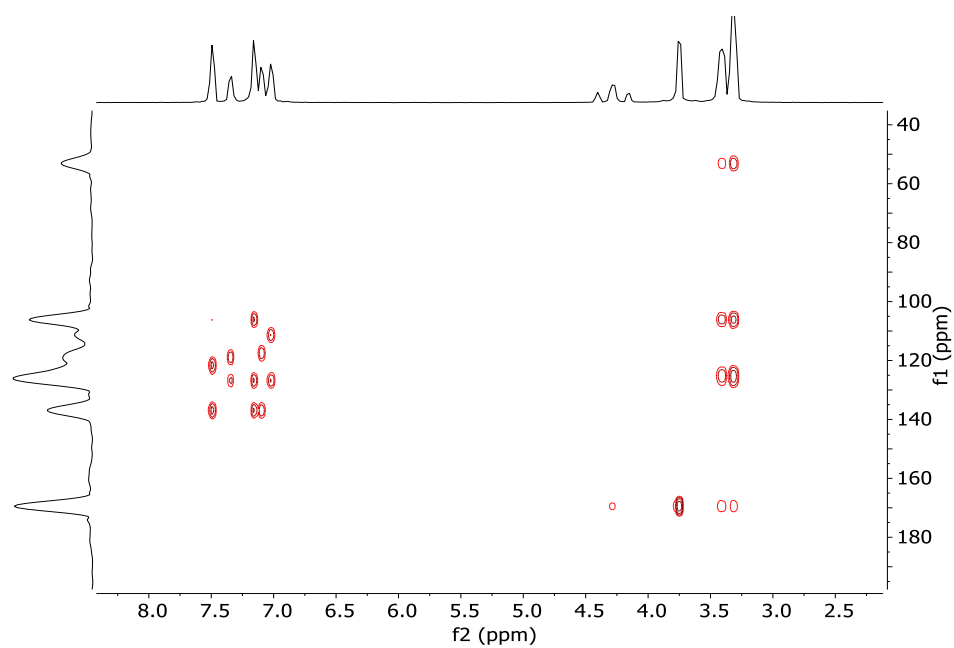


Figura A2. Ampliação das correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **11a**

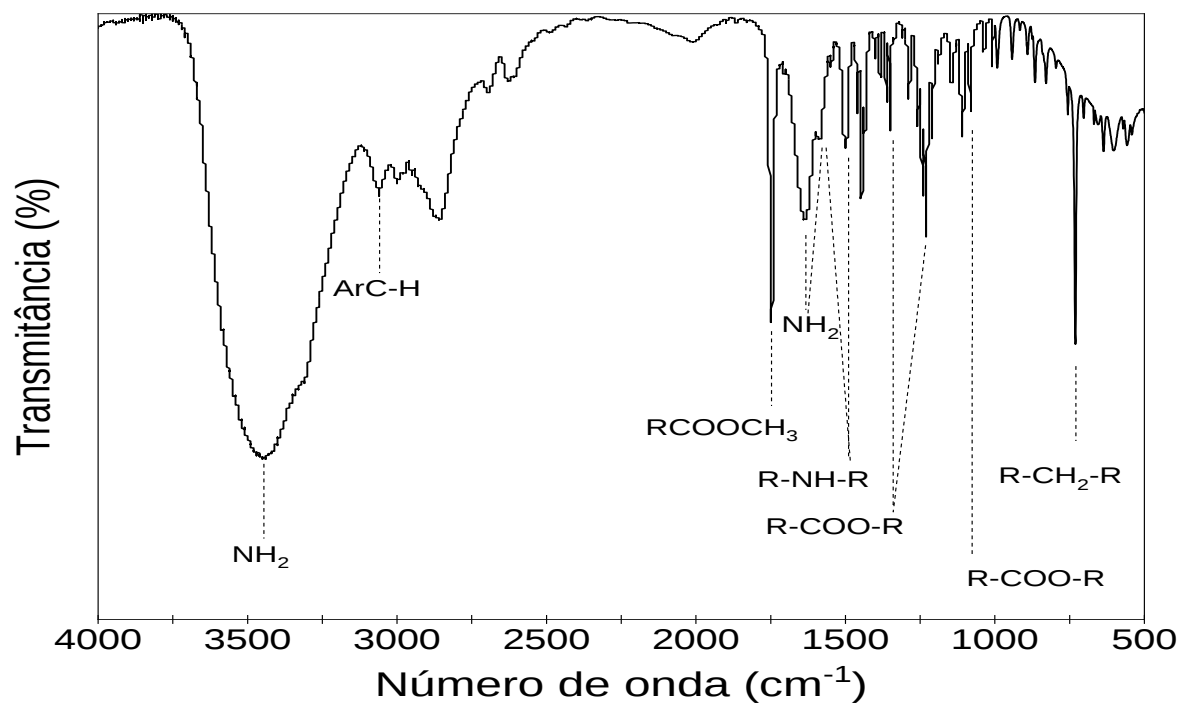


Figura A3. Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do intermediário **11a**

Apêndice B - Espectros para caracterização estrutural do Intermediário 11b

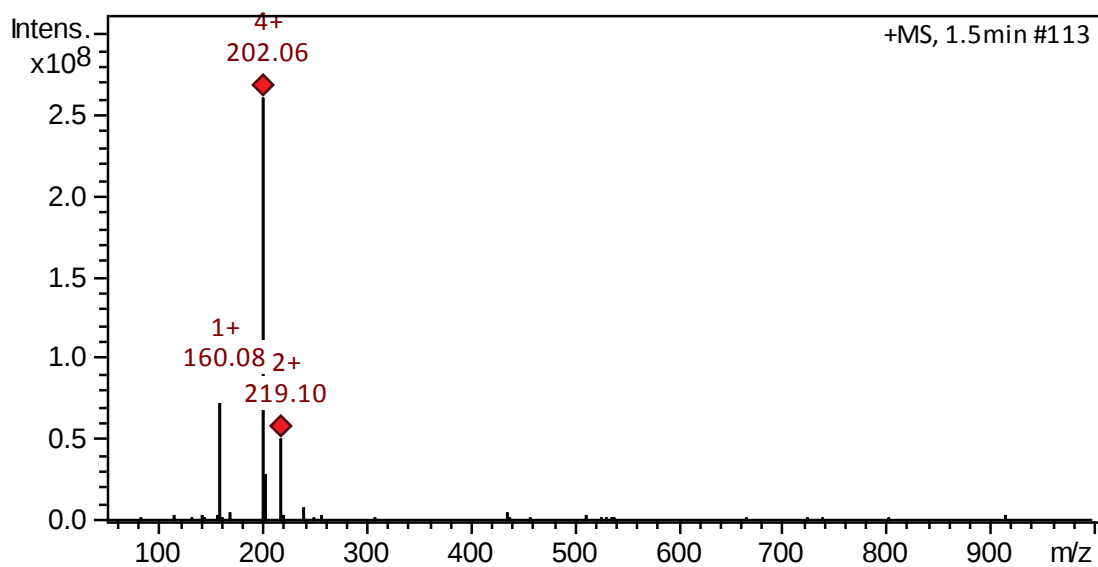


Figura B3. Espectro de massas de intermediário **11b**

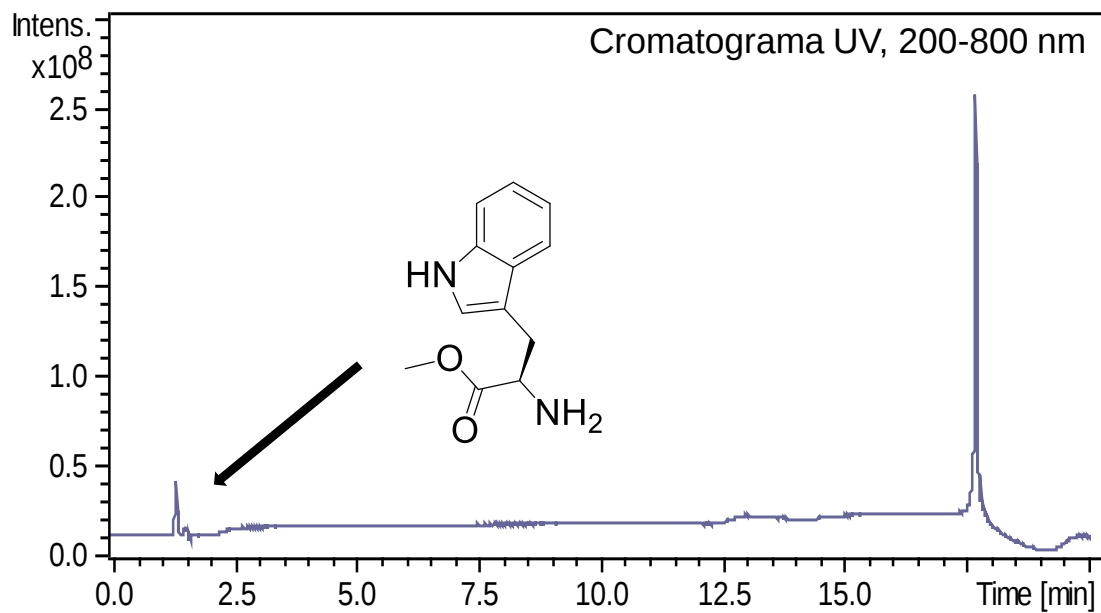


Figura B4. Espectro de UV de intermediário **11b**

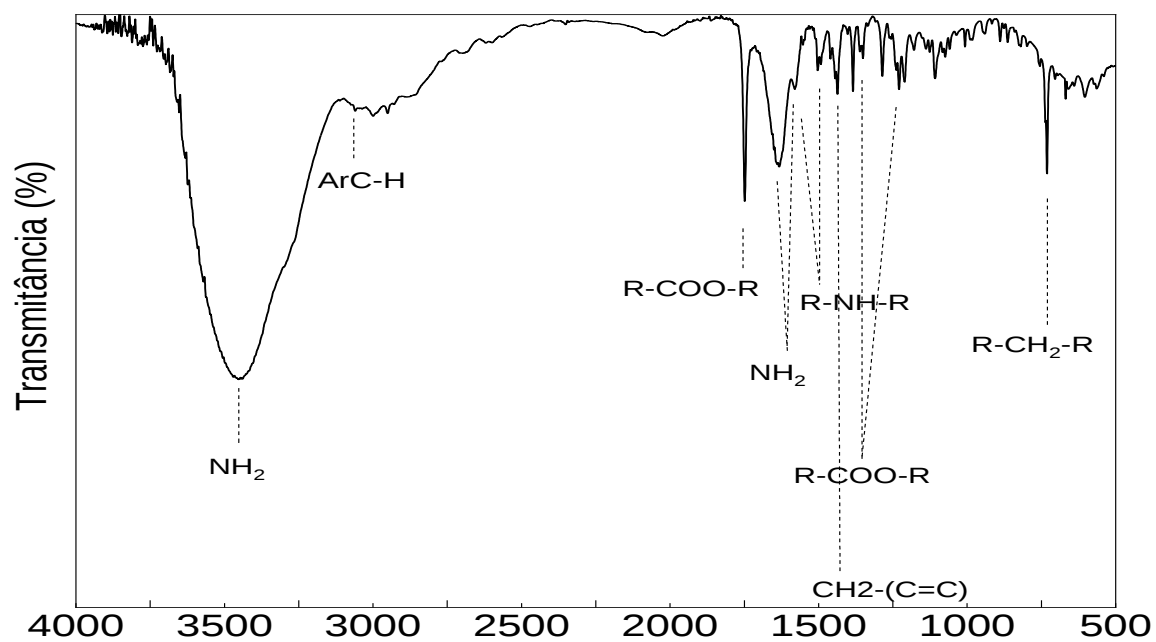


Figura B5. Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do intermediário **11b**

Apêndice C - Espectros para caracterização estrutural do Intermediário **11c**

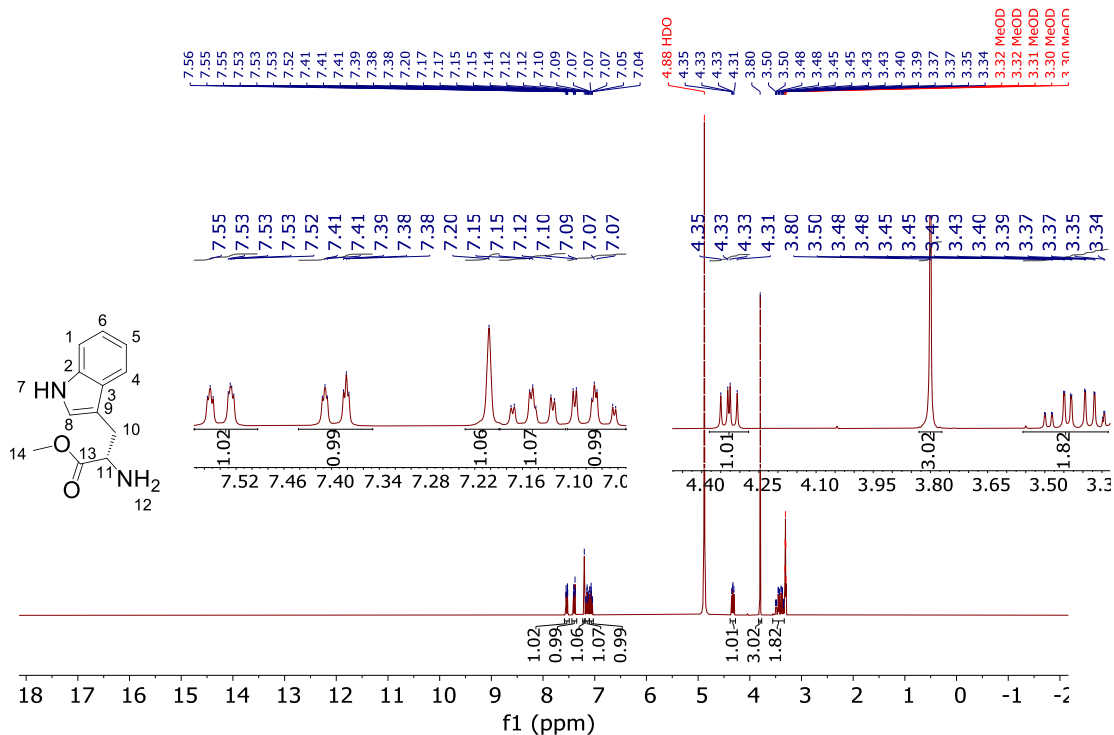


Figura C1. RMN ¹H (300 MHz, metanol deuterado) do intermediário **11c**

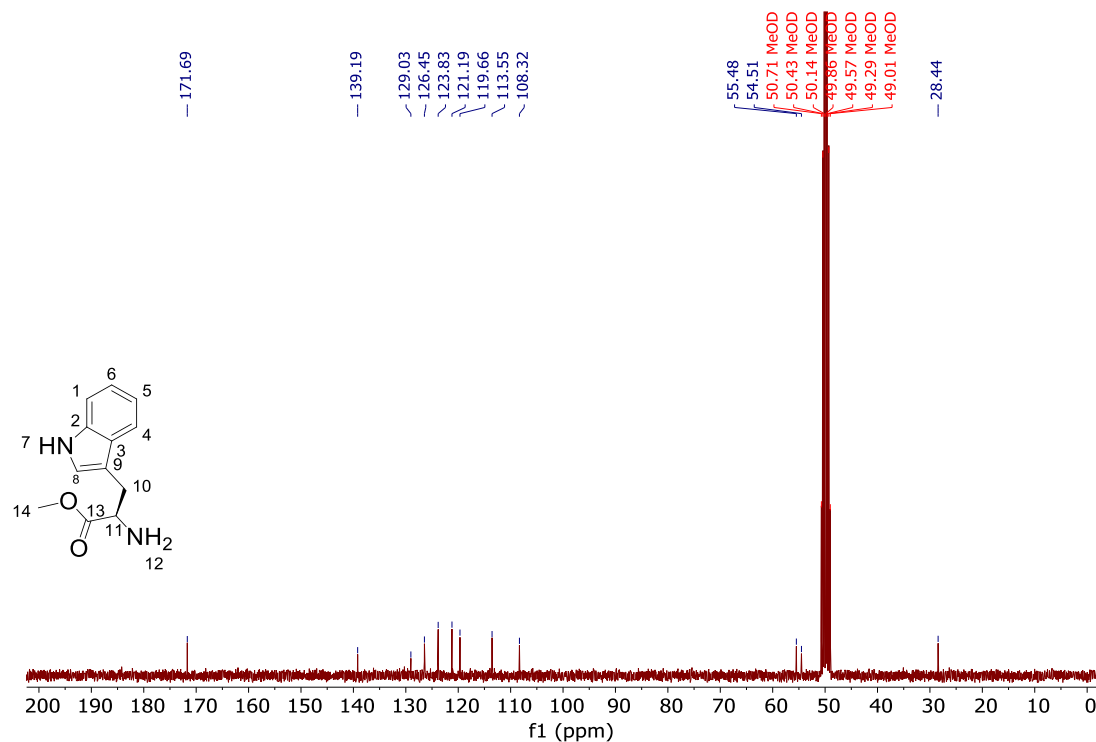


Figura C2. RMN ¹³C (75 MHz, metanol deuterado) do intermediário **11c**

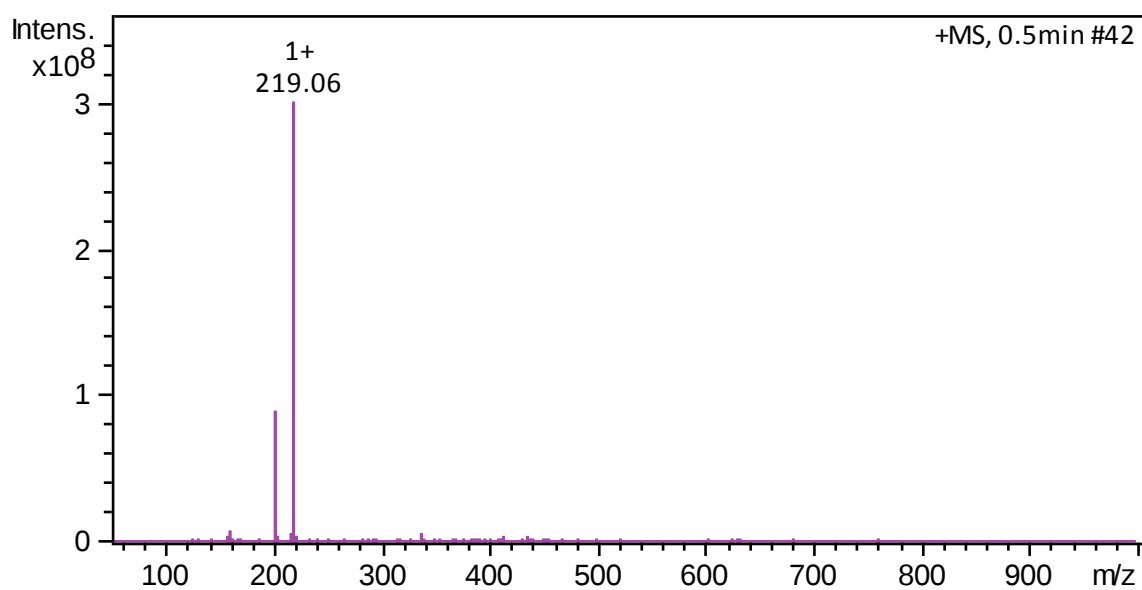
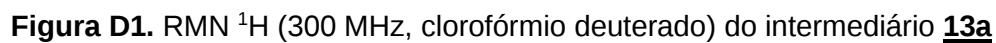


Figura C3. Espectro de massas de intermediário **11c**



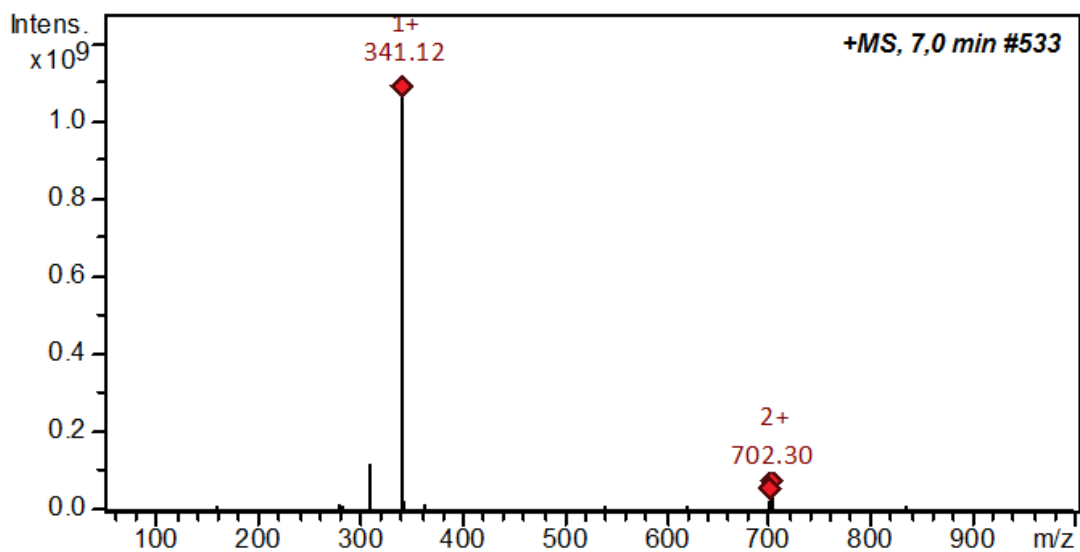


Figura D3. Espectro de massas de intermediários **13a**

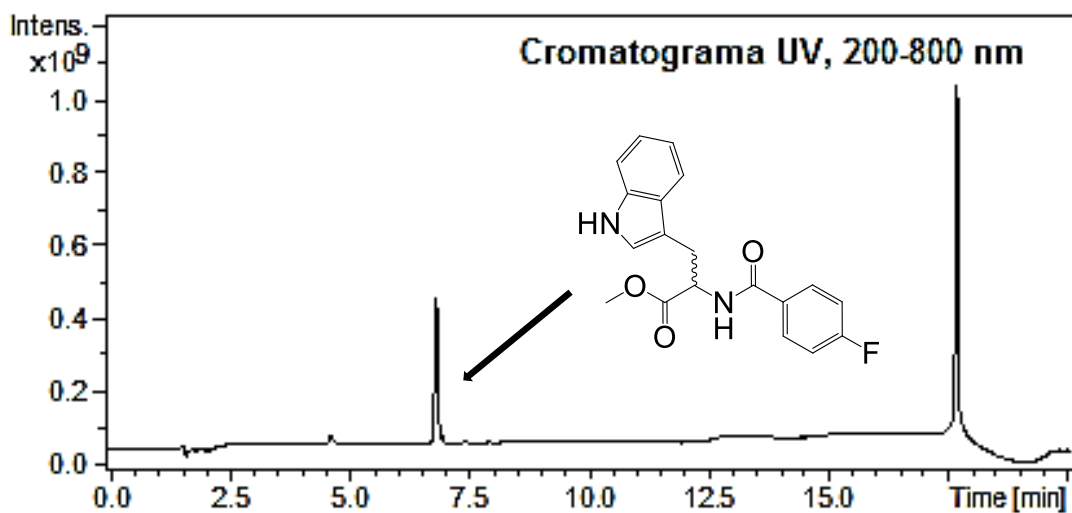


Figura D4. Espectro de UV de intermediário **13a**

Apêndice E - Espectros para caracterização estrutural do Intermediário **13b**

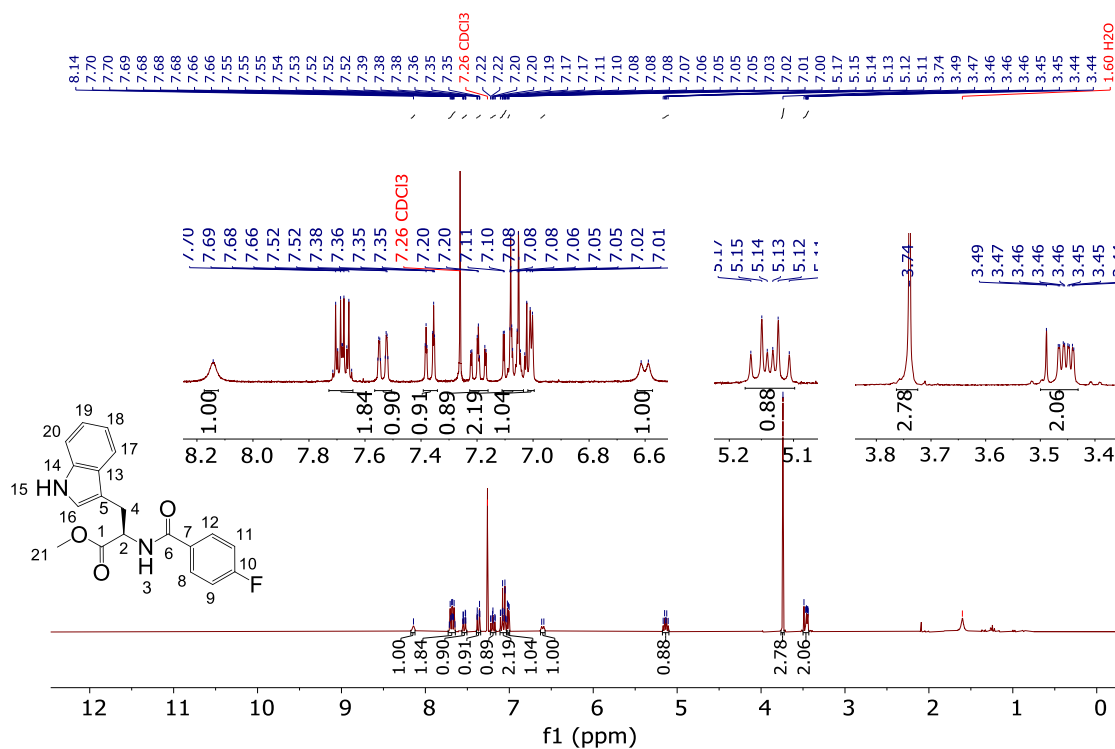


Figura E1. RMN ¹H (600 MHz, clorofórmio deuterado) do intermediário **13b**

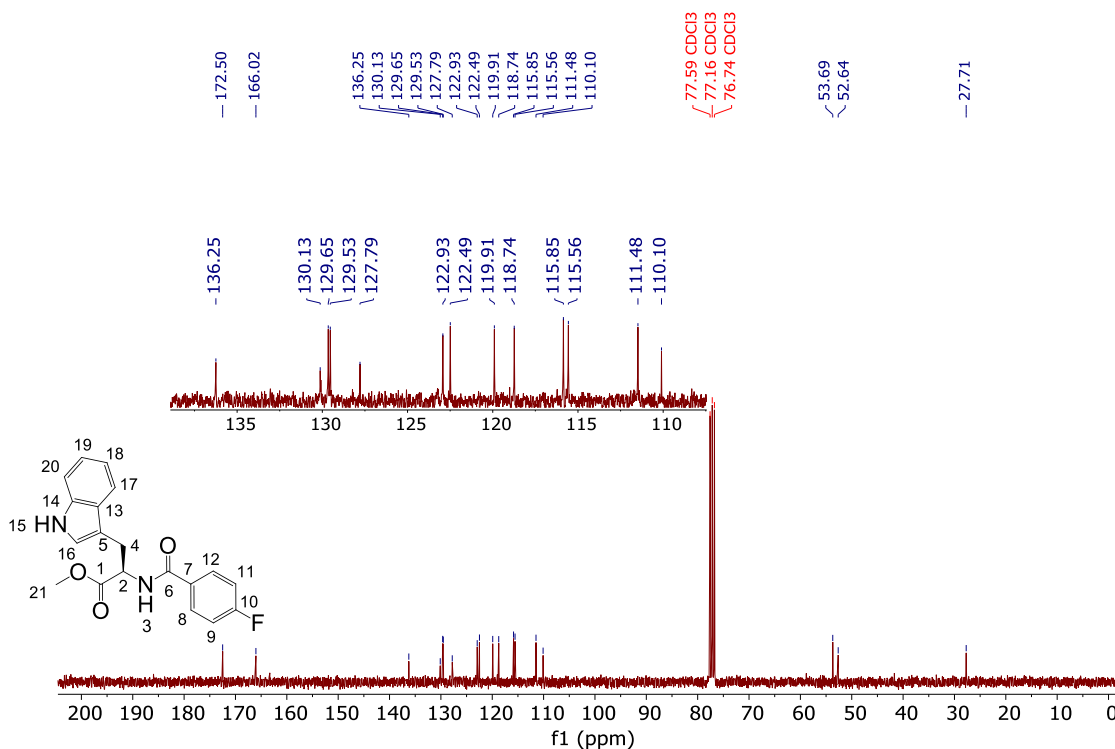


Figura E2. RMN ¹³C (75 MHz, clorofórmio deuterado) do intermediário **13b**

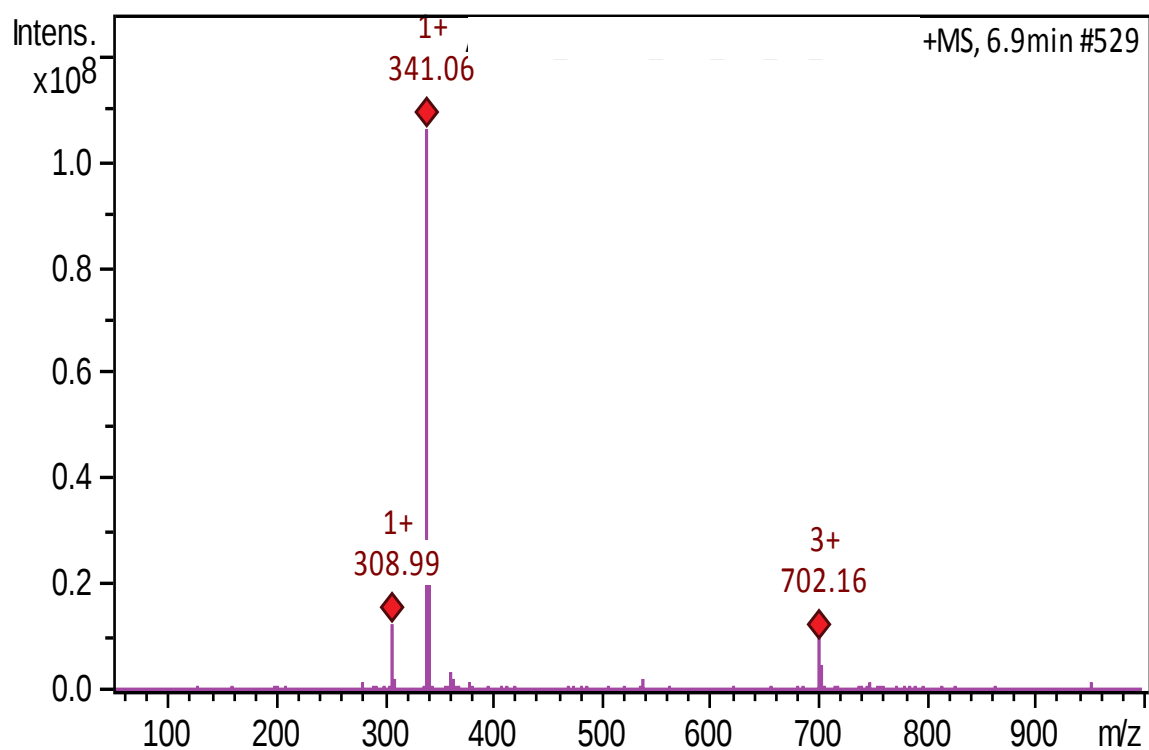


Figura E3. Espectro de massas de intermediário **13b**

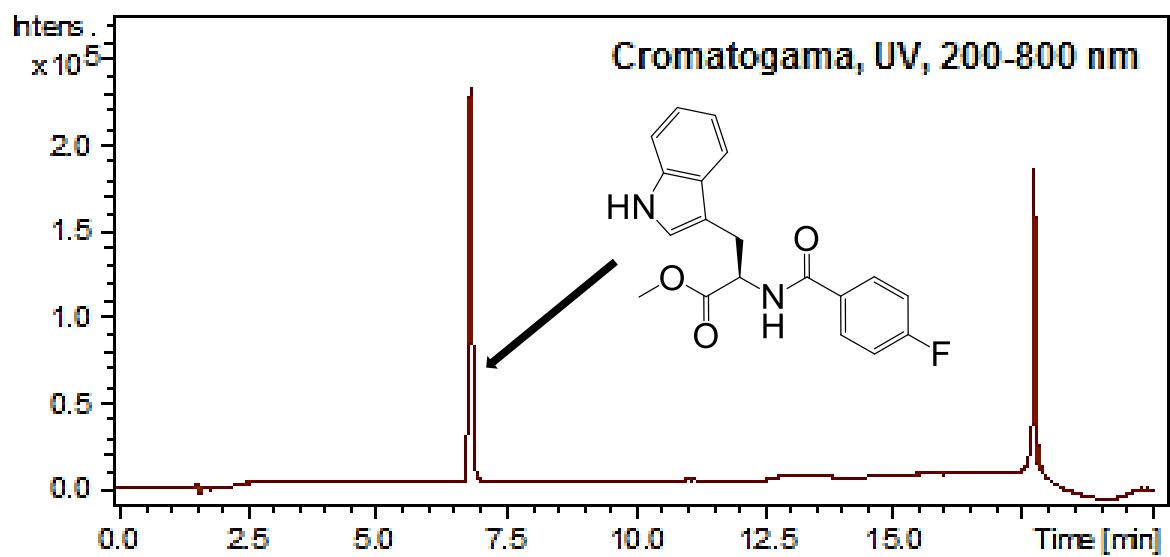


Figura E4. Espectro de UV de intermediário **13b**

Apêndice F - Espectros para caracterização estrutural do Intermediário **13c**

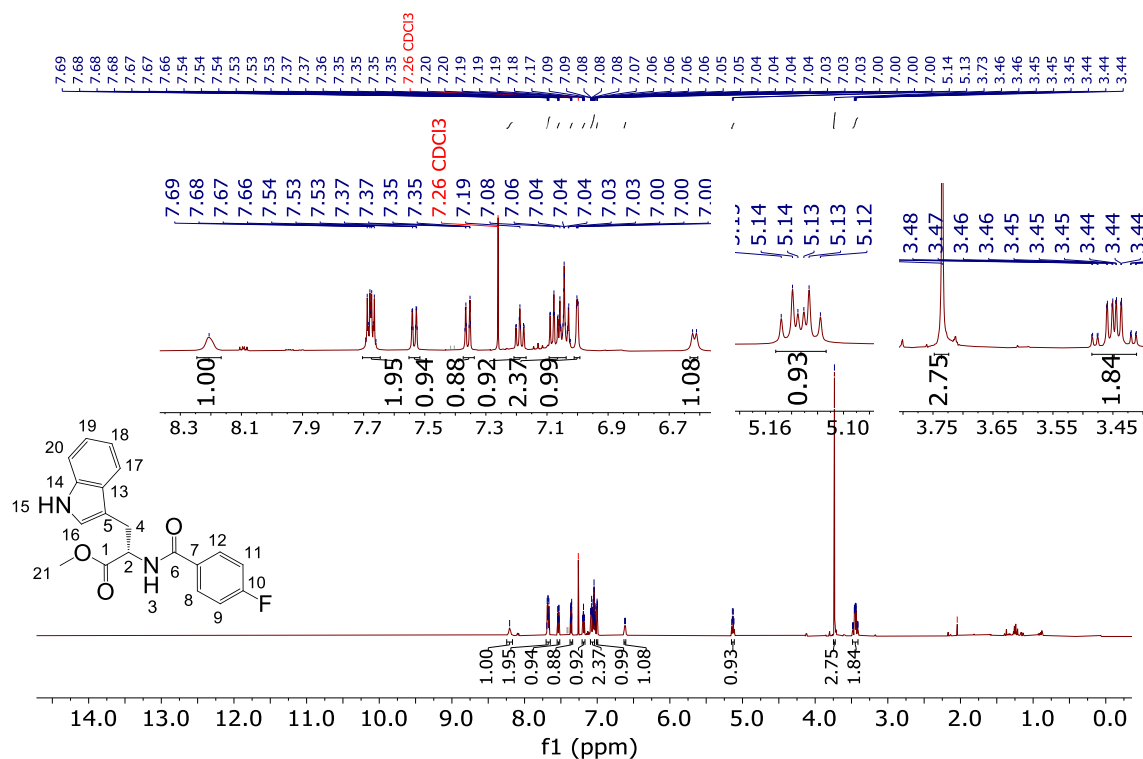


Figura F1. RMN ¹H (300 MHz, clorofórmio deuterado) do intermediário **13c**

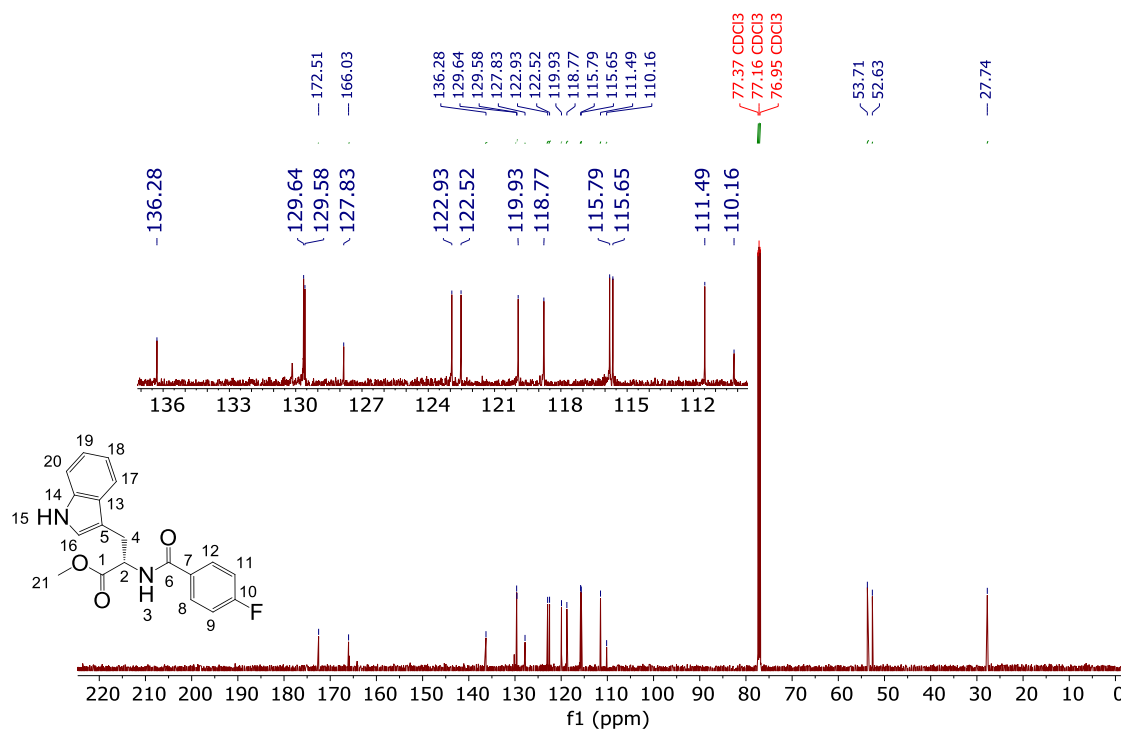


Figura F2. RMN ¹³C (75 MHz, clorofórmio deuterado) do intermediário **13c**

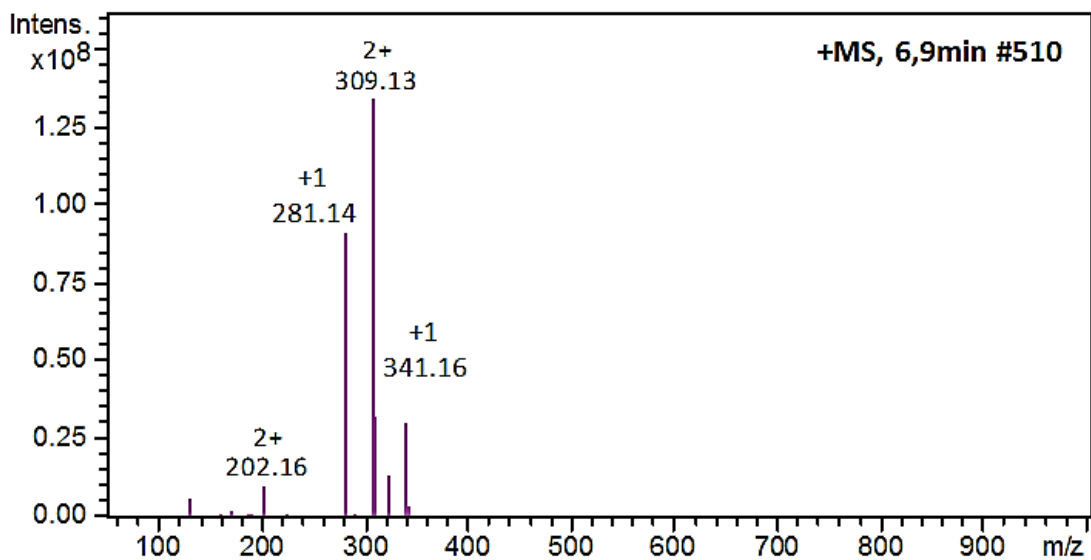


Figura F3. Espectro de massas de intermediário **13c**

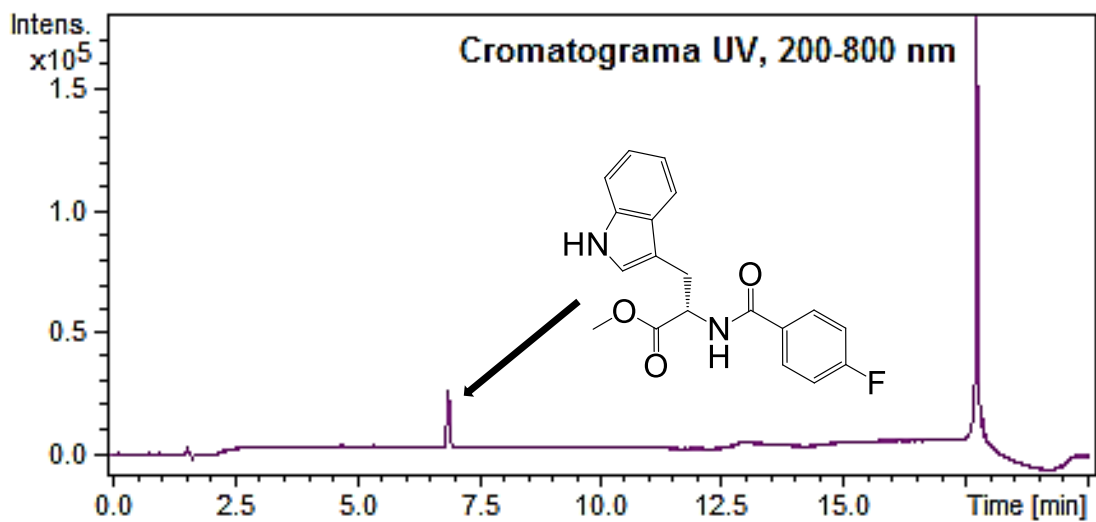


Figura F4. Espectro de UV de intermediário **13c**

Apêndice G - Espectros para caracterização estrutural do Intermediário **14a**

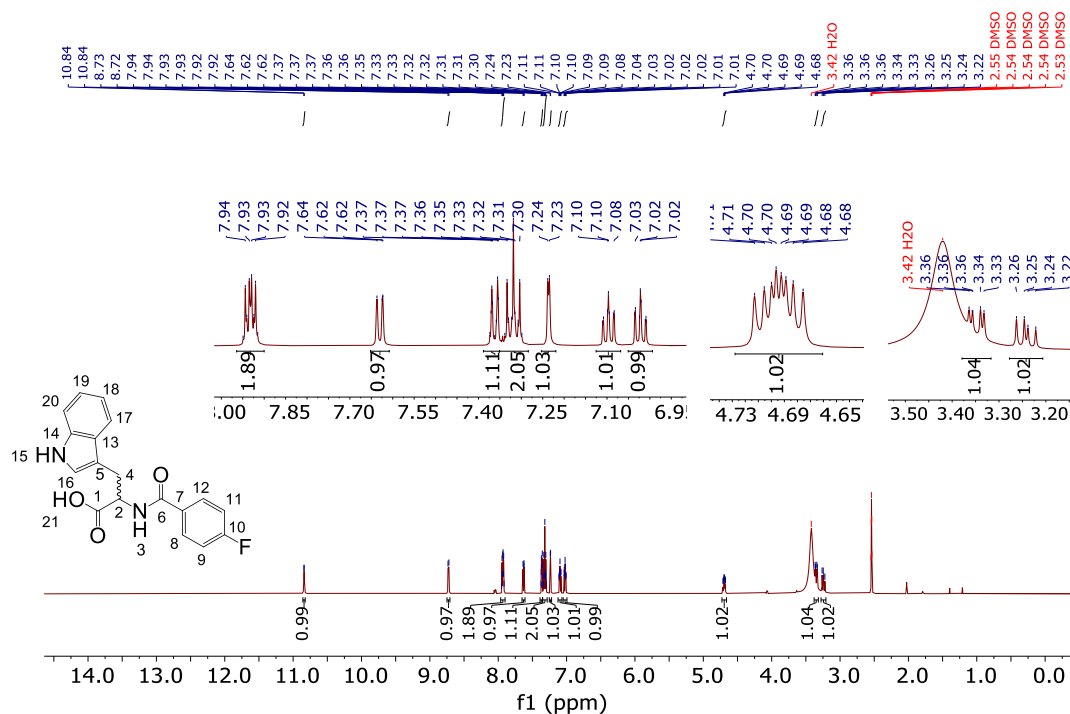


Figura G1. RMN ¹H (600 MHz, Dimetilsulfóxido deuterado) do intermediário **14a**

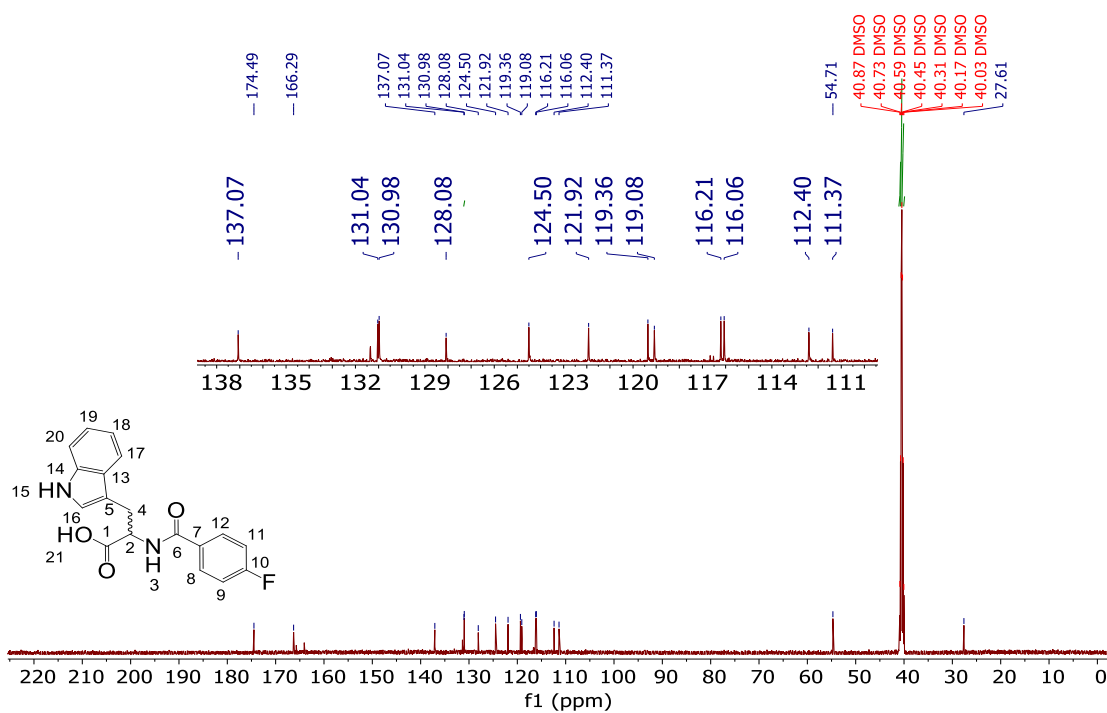


Figura G2. RMN ¹³C (151 MHz, clorofórmio deuterado) do intermediário **14a**

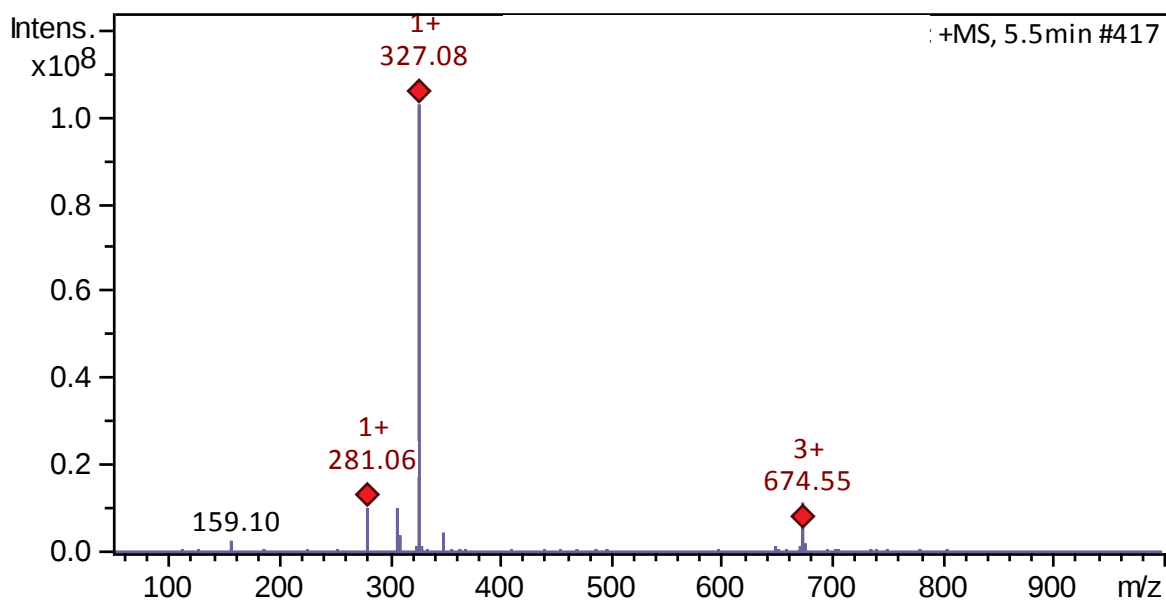


Figura G3. Espectro de massas de intermediário **14a**

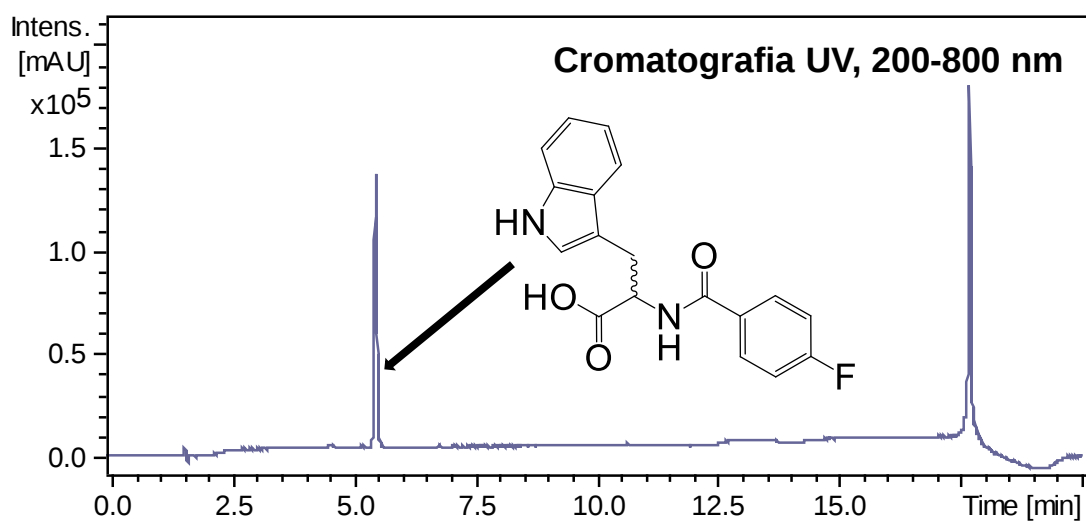


Figura. Espectro de UV de intermediário **13a**

Apêndice H - Espectros para caracterização estrutural do Intermediário **14b**

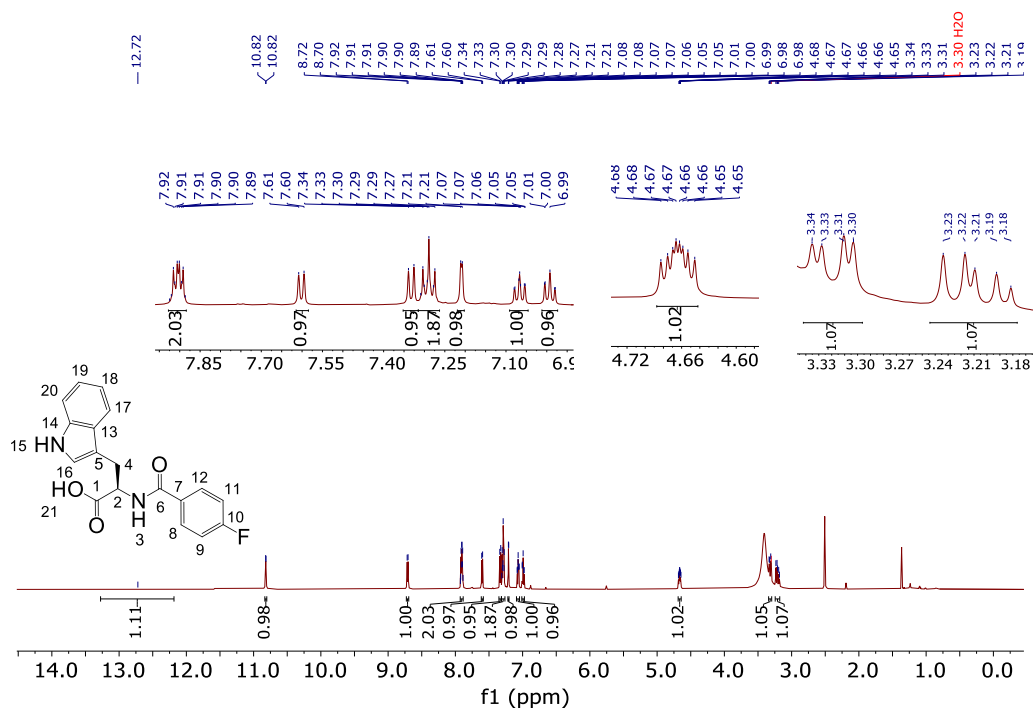


Figura H1. RMN ¹H (600 MHz, Dimetilsulfóxido deuterado) do intermediário **14a**

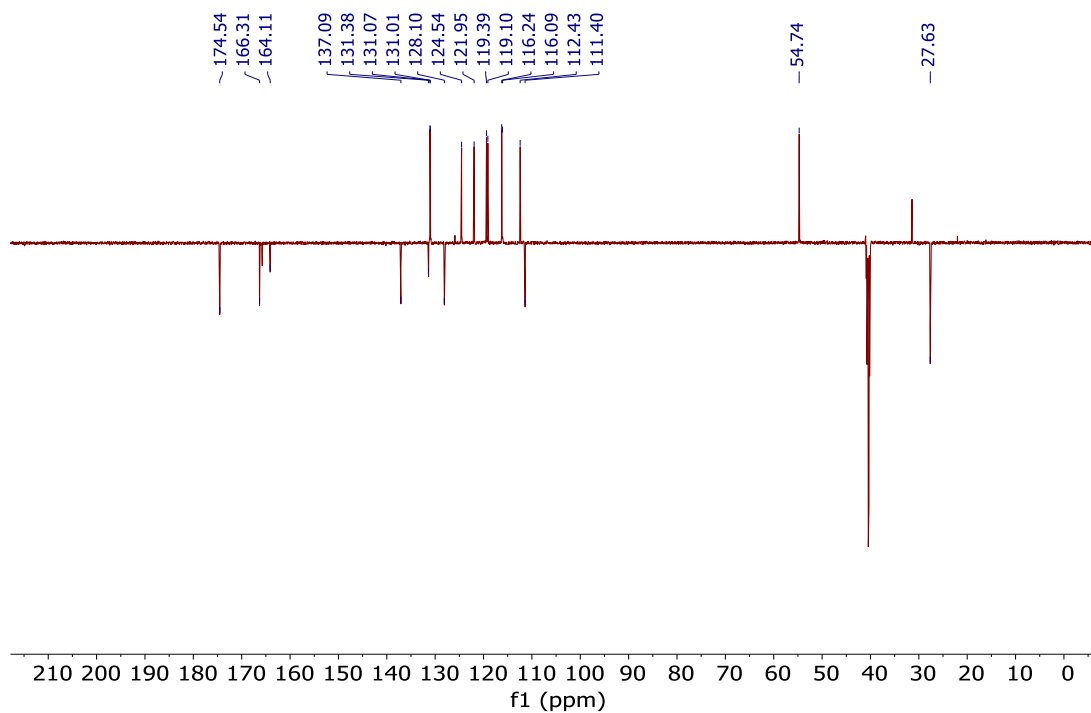


Figura H2. RMN ¹³C (151 MHz, clorofórmio deuterado) do intermediário **14b**

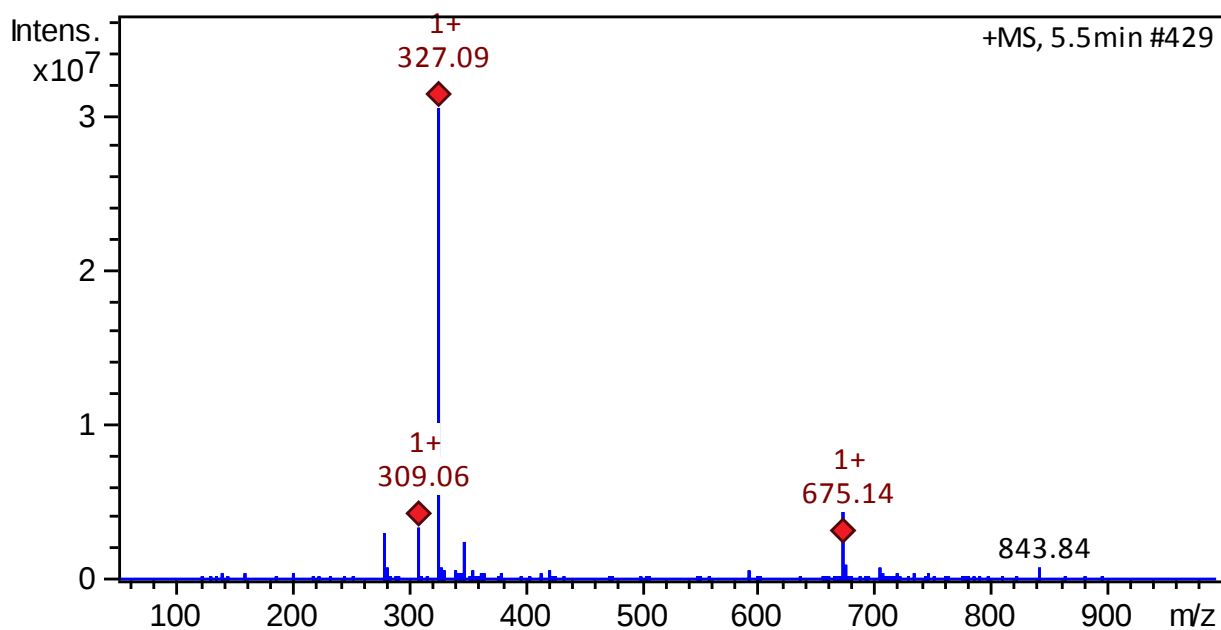


Figura H3. Espectro de massas de intermediário **14b**

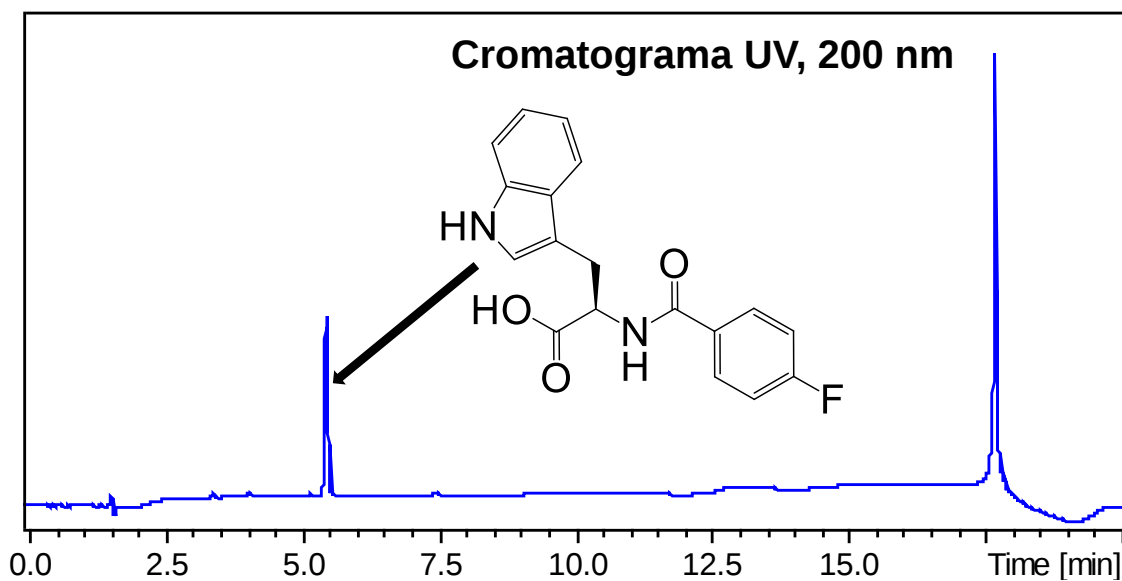


Figura H4. Espectro de UV de intermediário **14b**

Apêndice I - Espectros para caracterização estrutural do Intermediário **14c**

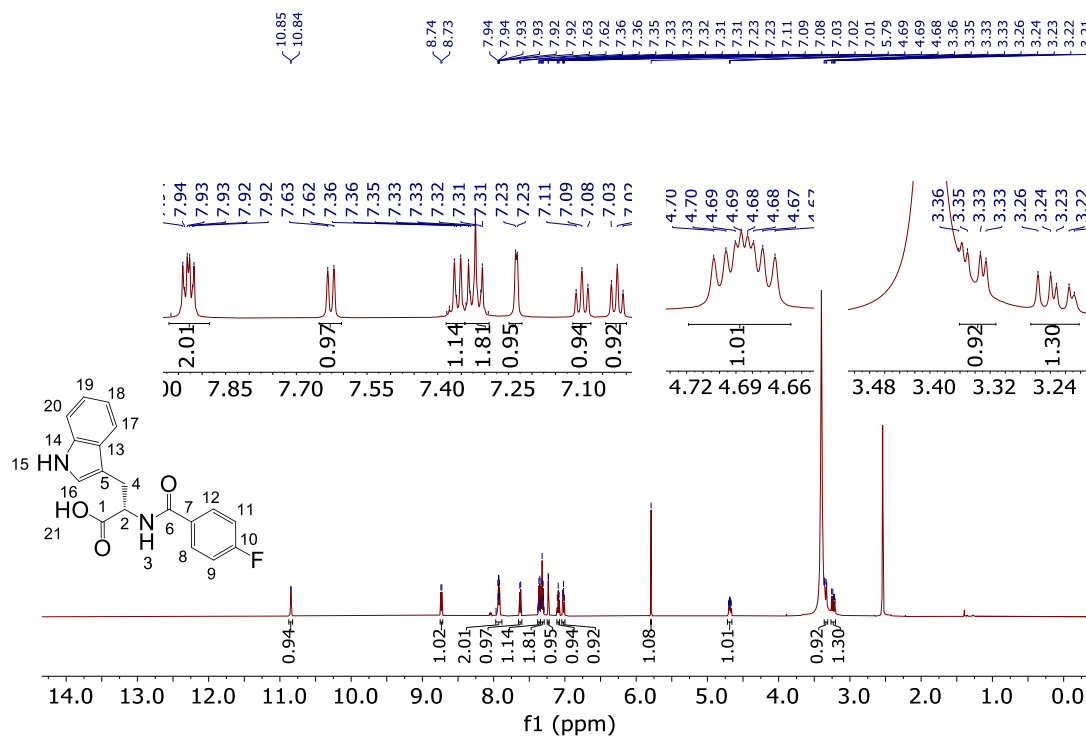


Figura I1. RMN ^1H (600 MHz, Dimetilsulfóxido deuterado) do intermediário **14c**

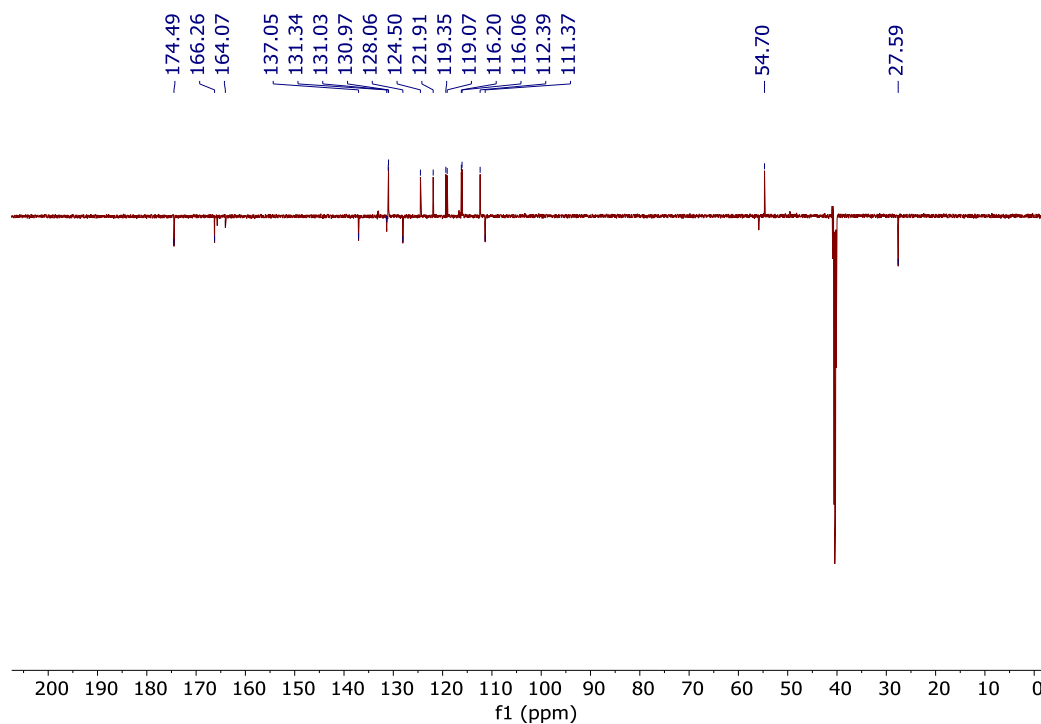


Figura I2. RMN ^{13}C (151 MHz, clorofórmio deuterado) do intermediário **14c**

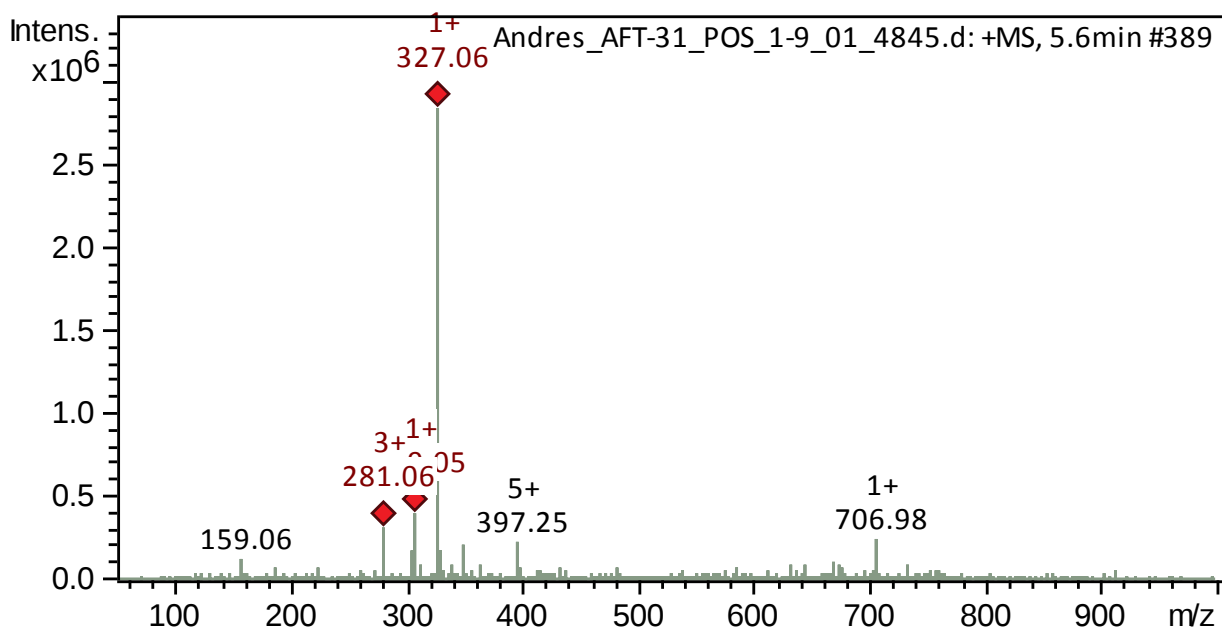


Figura I3. Espectro de massas de intermediário **14c**

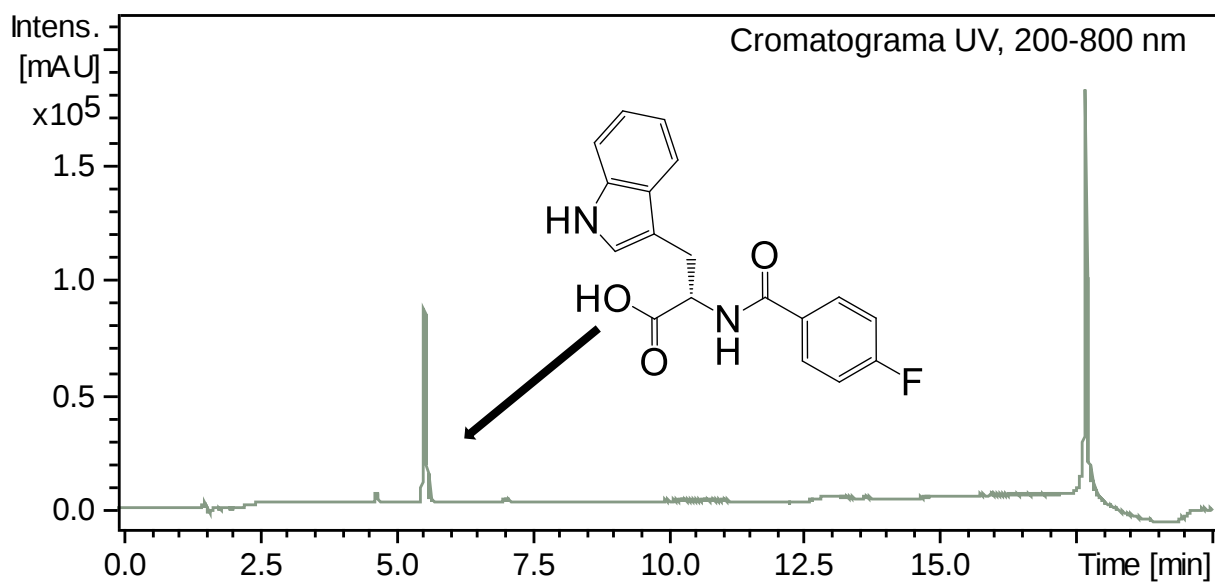


Figura I3. Espectro de UV de intermediário **14c**

Apêndice J - Espectros para caracterização estrutural do Intermediário 17

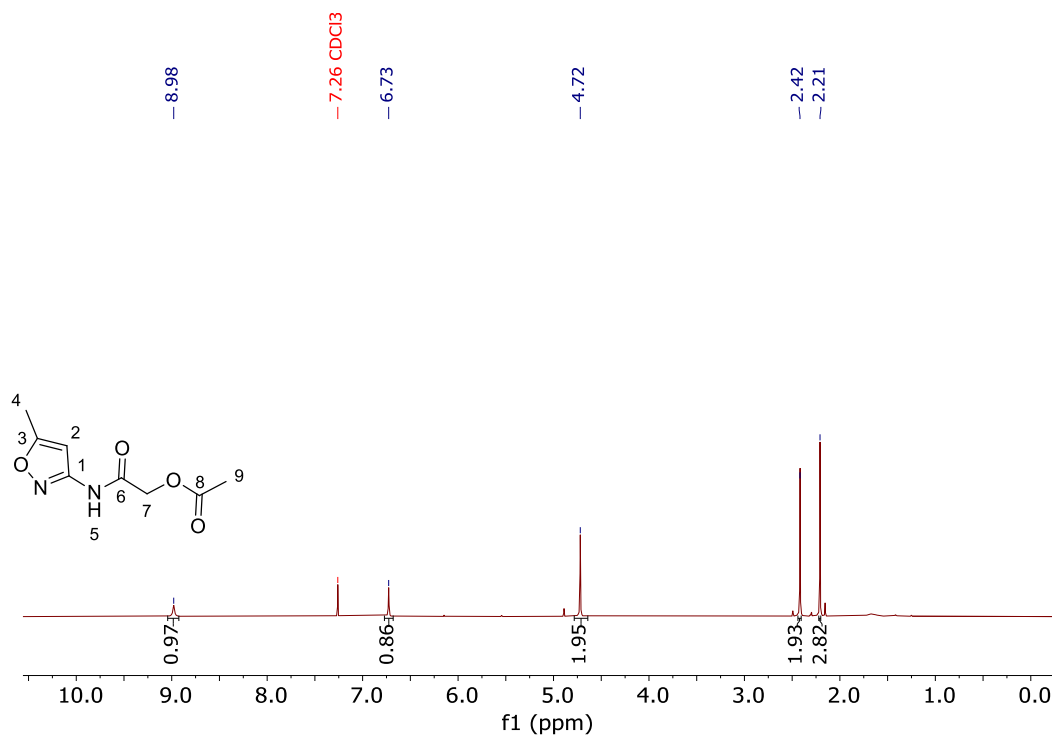


Figura J1. RMN ¹H (600 MHz, clorofórmio deuterado) do intermediário 17

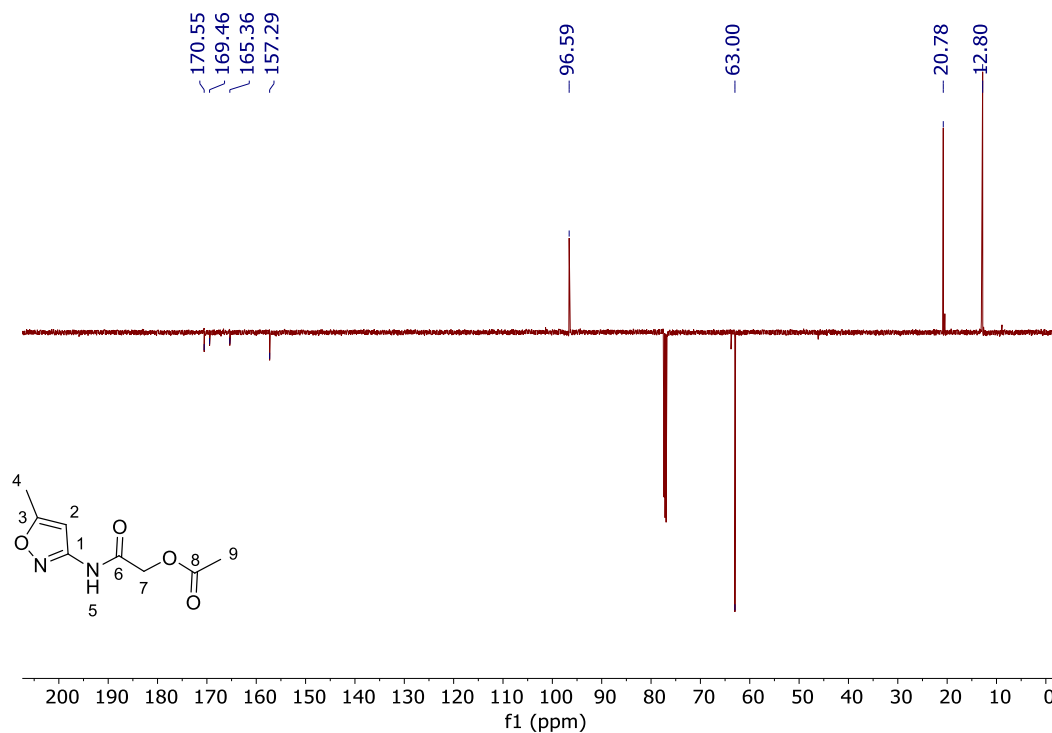


Figura J2. RMN ¹³C (151 MHz, clorofórmio deuterado) do intermediário 17c

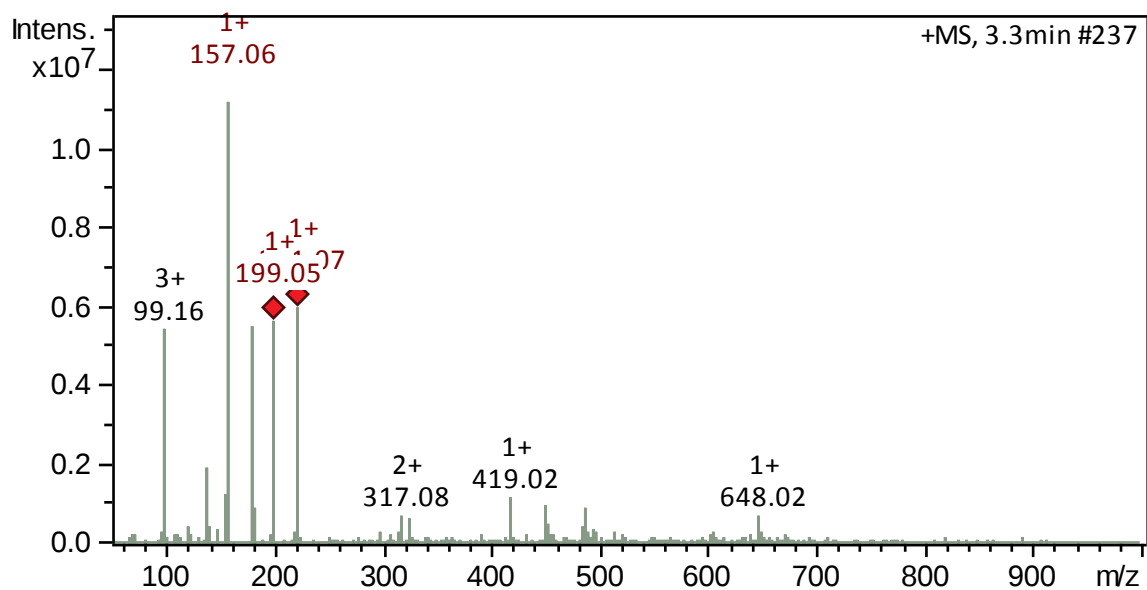


Figura J3. Espectro de massas de intermediário **17**

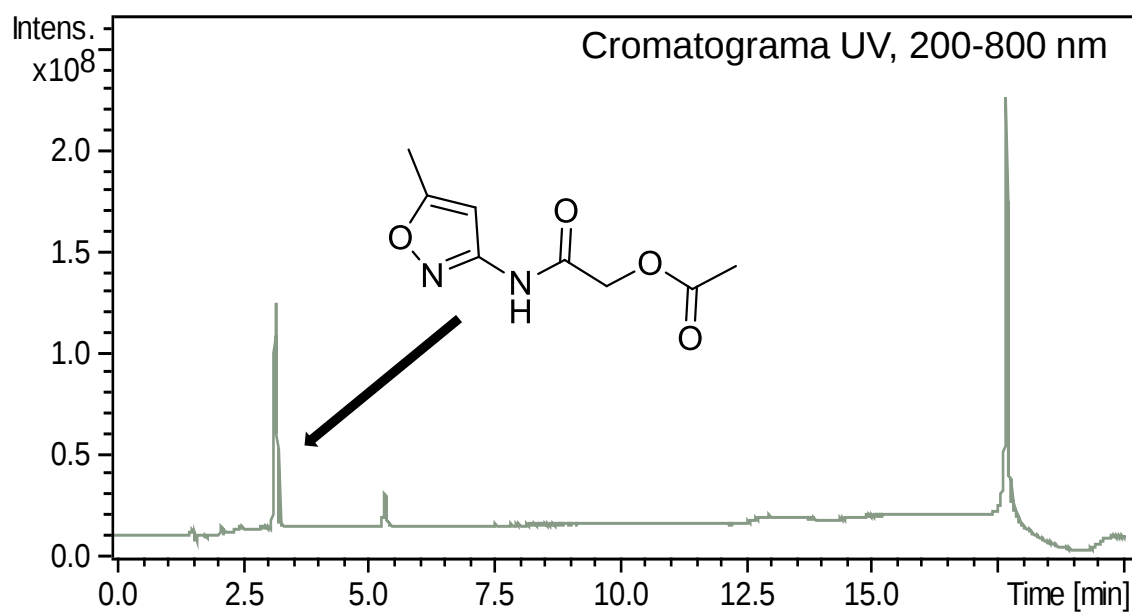


Figura J4. Espectro de UV de intermediário **17**

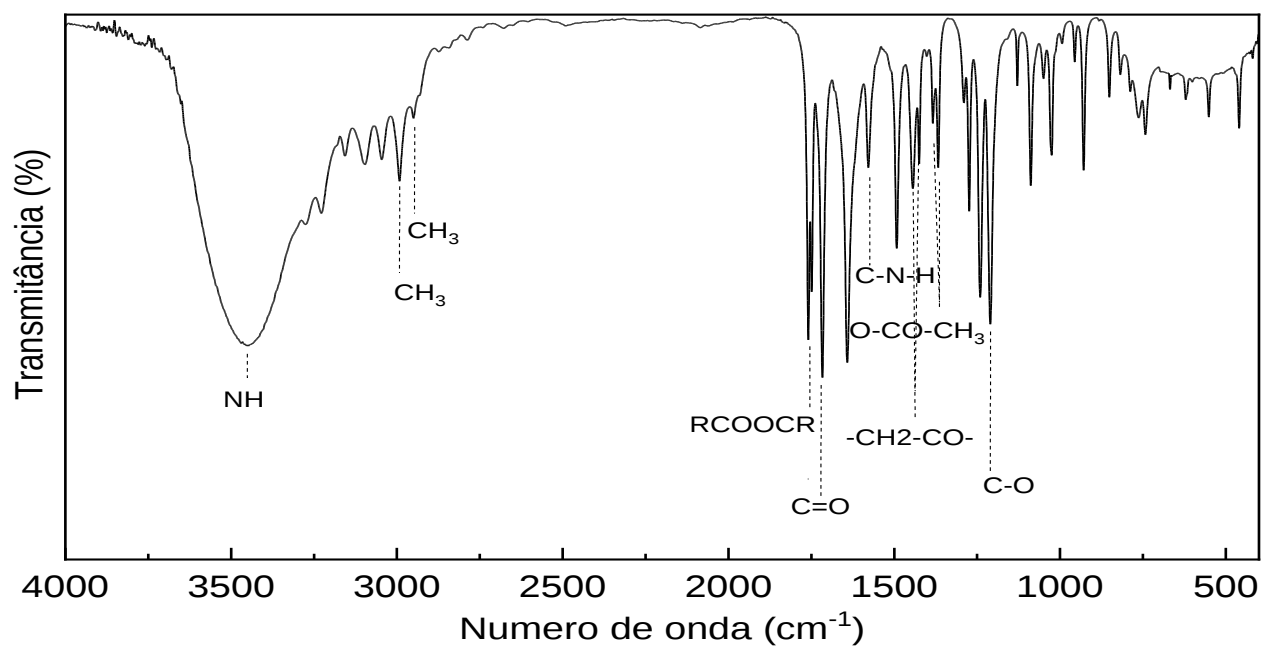


Figura J5. Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do intermediário **17**

Apêndice K - Espectros para caracterização estrutural do Intermediário 18

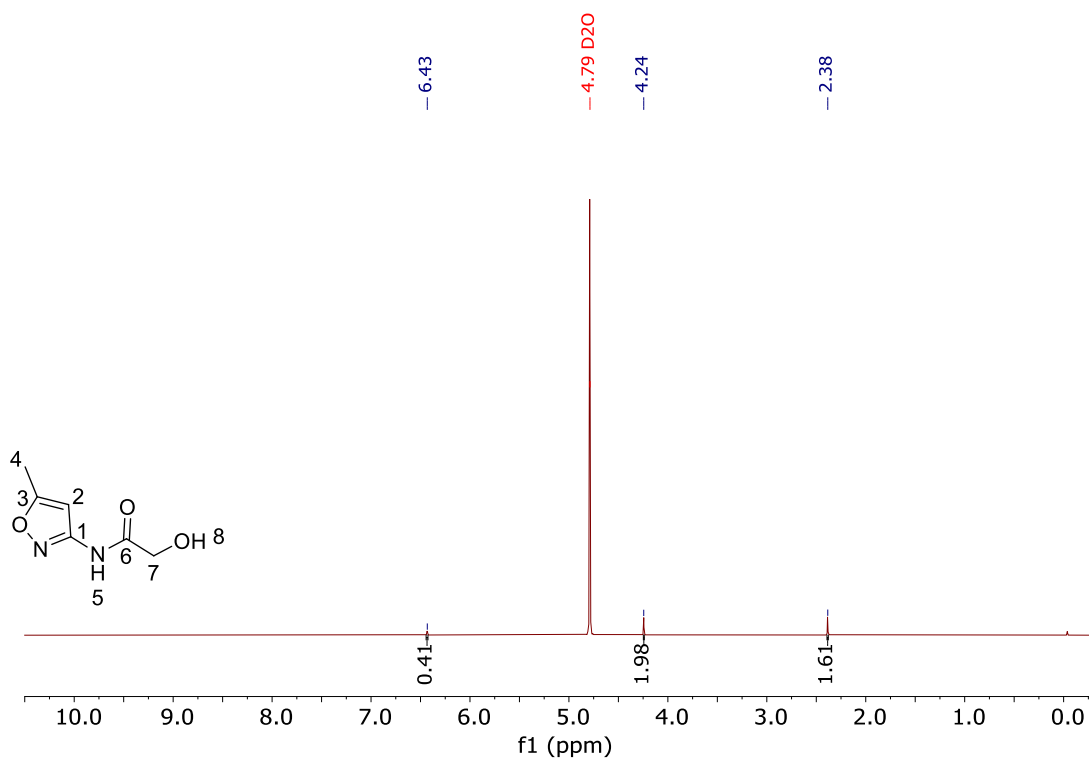


Figura K1. RMN ¹H (300 MHz, água deuterado) do intermediário 18

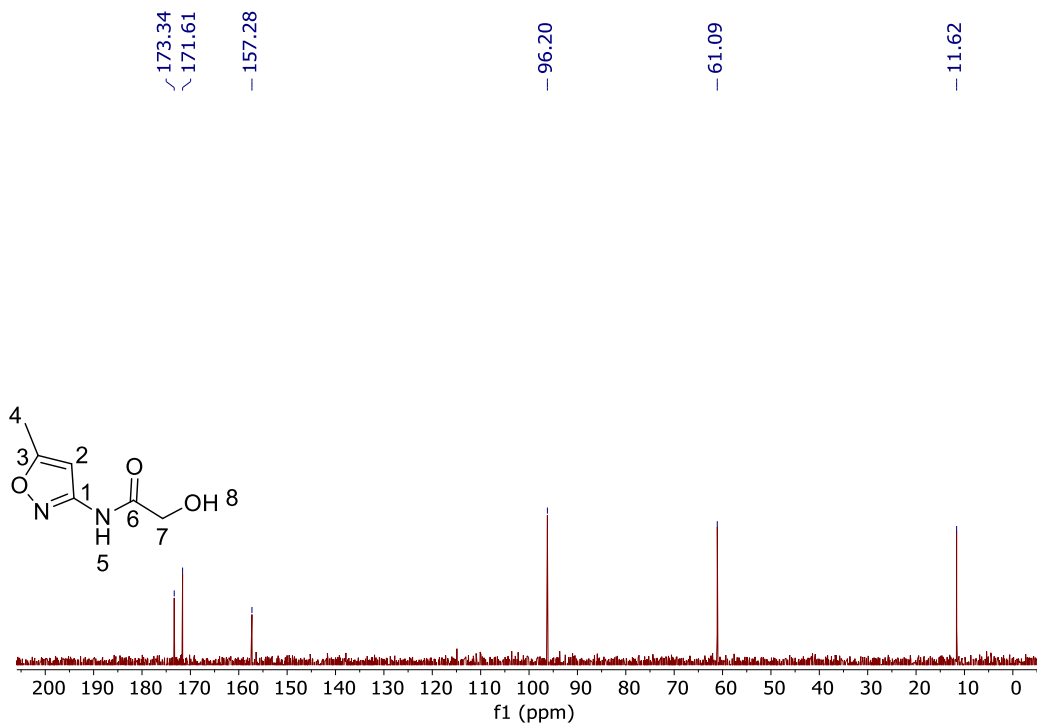


Figura K2. RMN ¹³C (151 MHz, clorofórmio deuterado) do intermediário 18

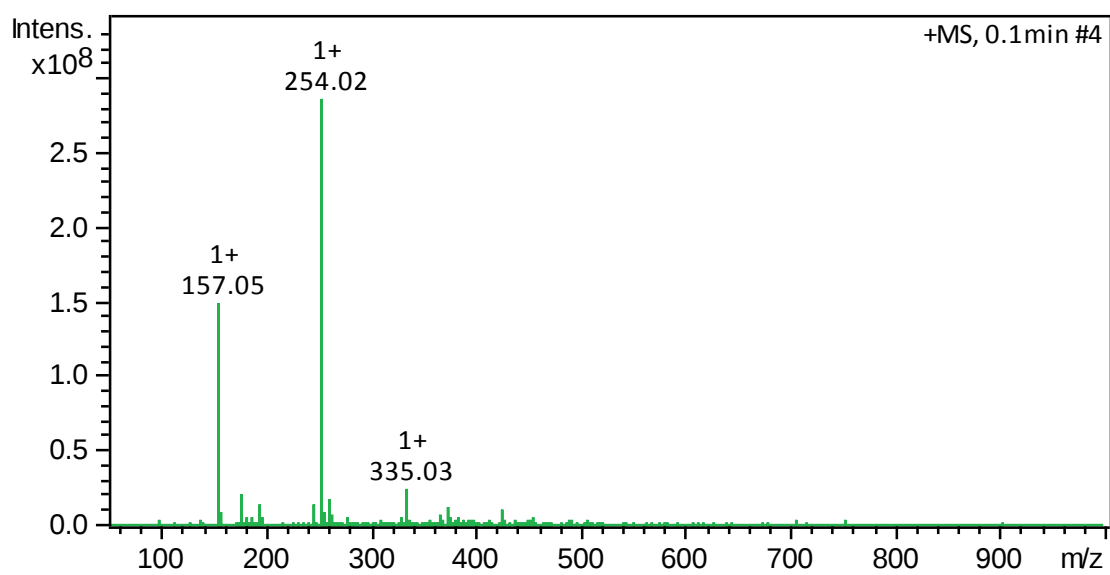


Figura K3. Espectro de massas de intermediário **18**

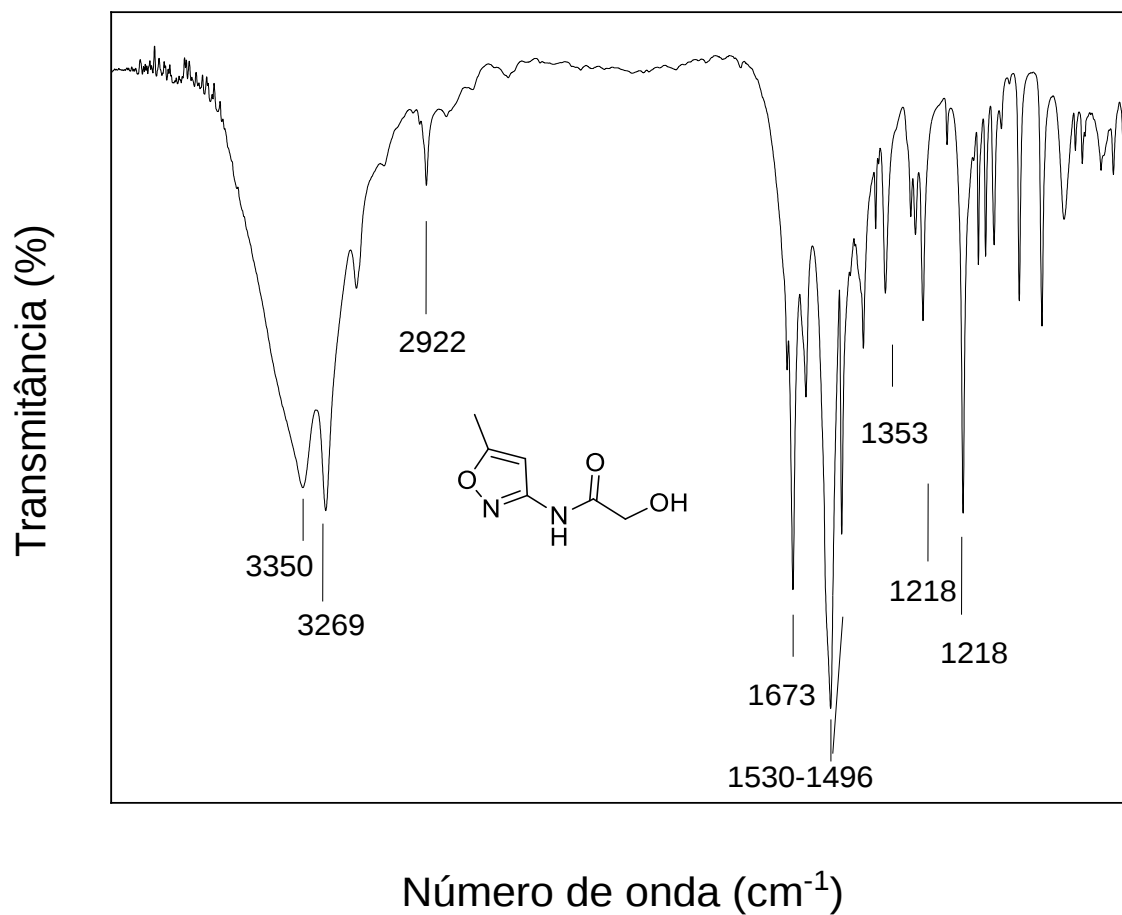


Figura K4. Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do intermediário **18**

Apêndice L - Espectros para caracterização estrutural do Intermediário **19a**

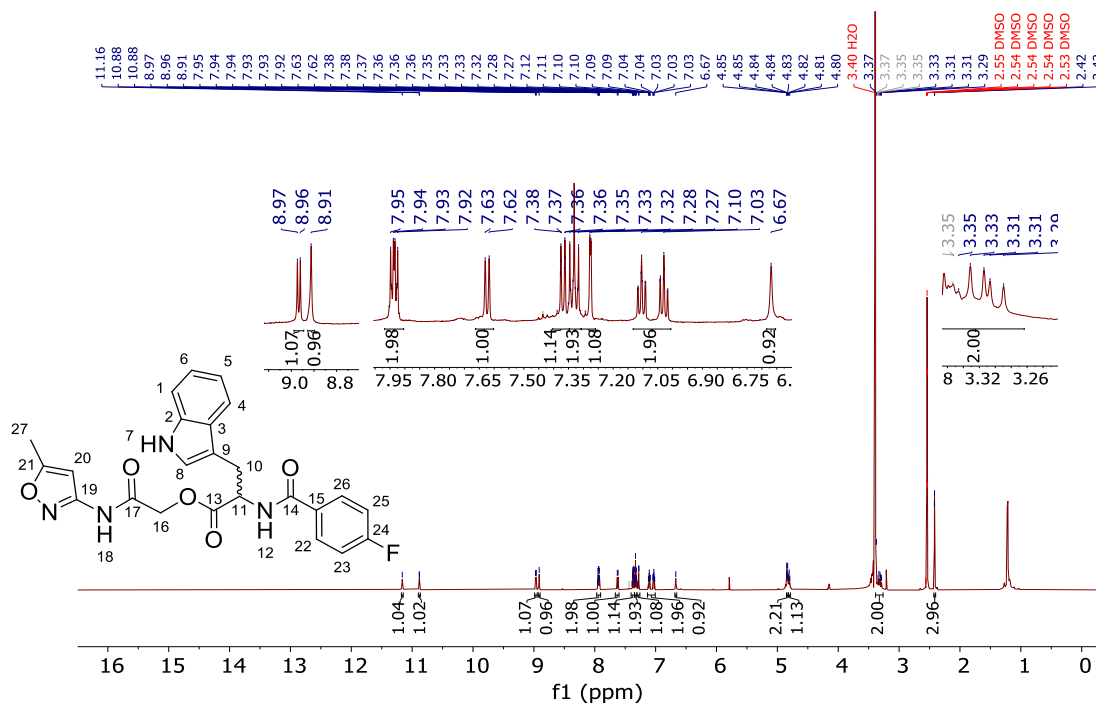


Figura L1. RMN ¹H (600 MHz, Dimetilsulfóxido deuterado) do intermediário **19a**

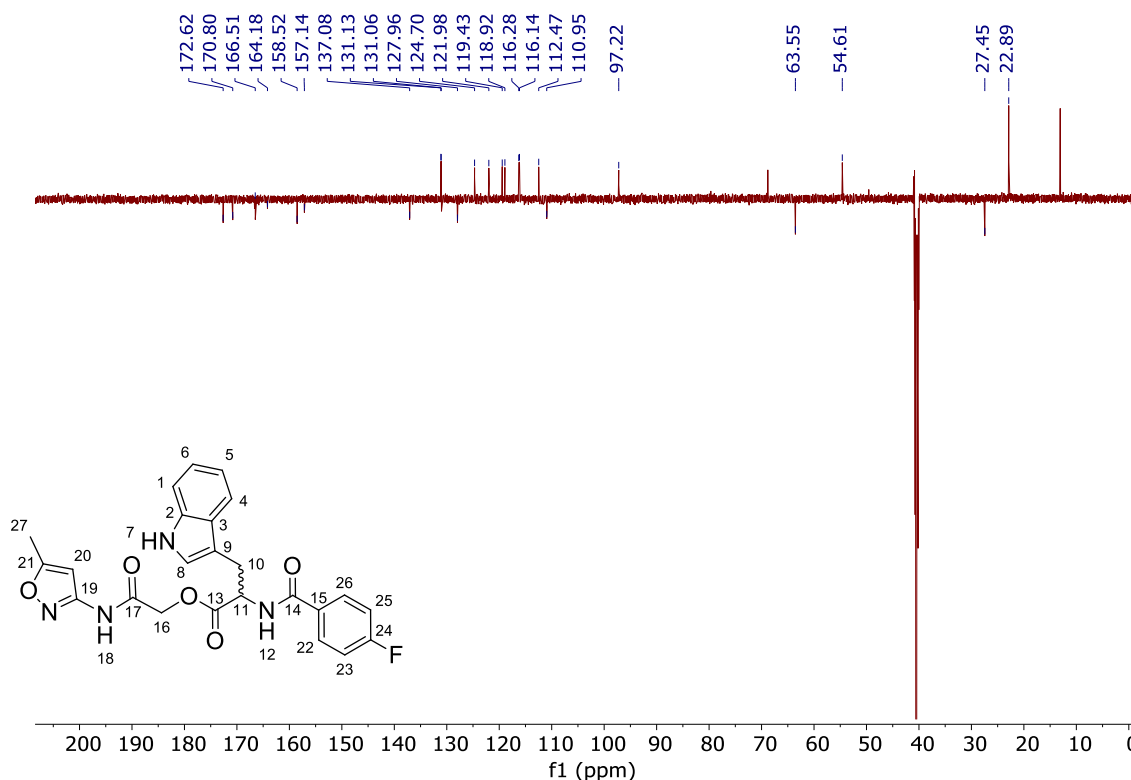


Figura L2. RMN ¹³C (151 MHz, Dimetilsulfóxido deuterado) do intermediário **19a**

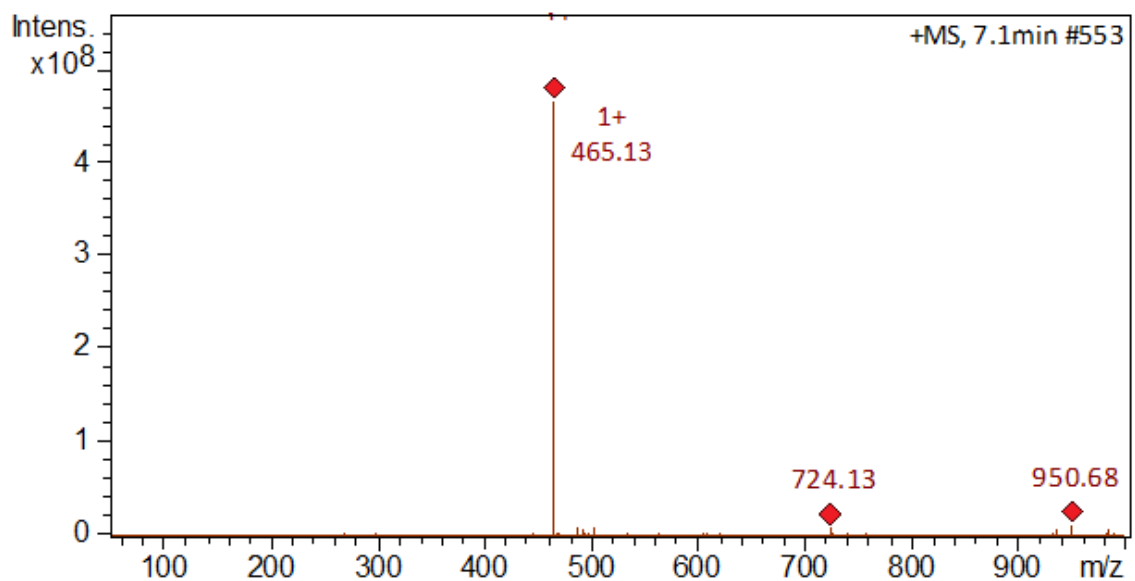


Figura L3. Espectro de massas de intermediário **19a**.

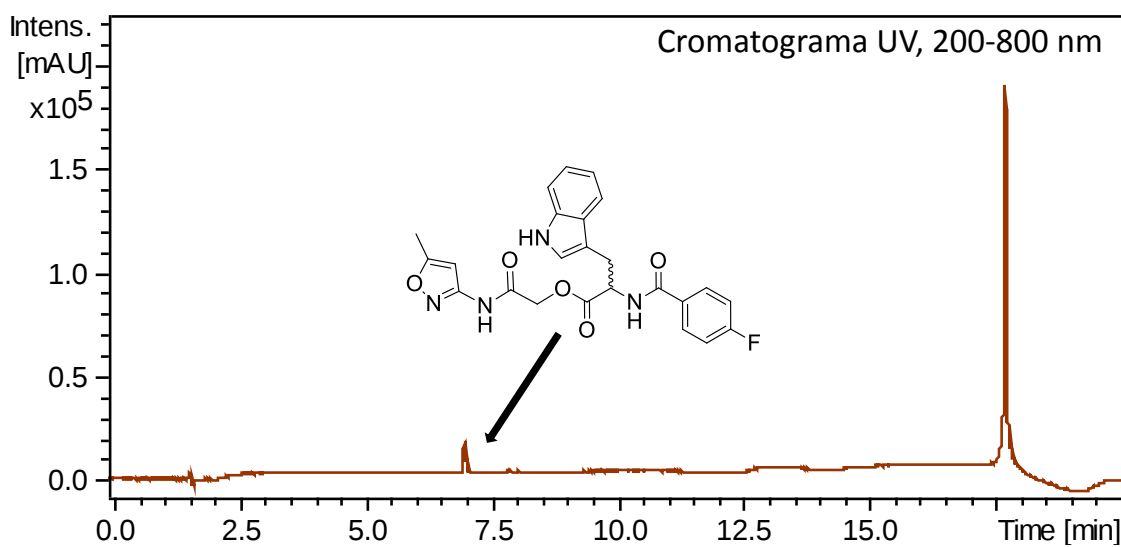


Figura L4. Espectro de UV de intermediário **19a**.