

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Juliana Jarussi dos Santos

**Planejamento, Síntese e Atividade Tripanossomicida de
Inibidores covalentes reversíveis da enzima Cruzaína.**

São Carlos,
2017

Juliana Jarussi dos Santos

Planejamento, Síntese e Atividade Tripanossomicida de Inibidores covalentes reversíveis da enzima Cruzaína.

Projeto Temático 2013/ 18009-4

Fapesp – BCO

Processo nº 2016/12047-0

Monografia para conclusão de curso de Bacharelado em Química Tecnológica, no Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Orientador: Dr. Carlos Alberto Montanari.

São Carlos,
2017

Agradecimentos

Agradeço acima de todos aos meus pais pelo grande esforço que fizeram para que eu pudesse fazer o curso que queria em uma universidade de excelência.

Agradeço ao Instituto de Química de São Carlos da USP pela formação e ao Grupo de Química Medicinal – Nequimed, por terem me aceitado como membro do grupo e me auxiliado a construir meu lado profissional.

Agradeço aos professores Dr. Carlos Alberto Monatanari, por ter me acolhido em seu grupo como aluna e orientada, e Dr. Andrei Leitão e Dr. Antônio Burtoloso pelos ensinamentos.

Agradeço ao Dr. Petter Kenny pelas preciosas conversas durante nossas pausas para o café, sempre mostrando-se muito disposto a passar o conhecimento adiante.

Agradecimento em especial para os italianos do grupo, Ms. Lorenzo Cianni e Dr. Daniela De Vita, por terem se tornado grandes amigos e excelentes mentores, sempre me instigando ao saber. Com certeza esse trabalho deve-se ao imenso auxílio que vocês me proporcionaram.

Por fim agradeço a Fapesp pela bolsa de fomento concedida para que este trabalho pudesse ser realizado.

Resumo

A Doença de Chagas é uma das 17 doenças tropicais negligenciadas do mundo de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, transmitido pelo vetor “barbeiro”. Além de ser um problema endêmico em países da América Latina, relatos mostram que está se expandindo para os EUA, Europa e Japão. Visto que na indústria farmacêutica atual existem apenas 2 fármacos disponíveis, o Nifurtimox e Benzonidazol, os quais apresentam baixa eficácia na fase crônica da doença, além de severos efeitos colaterais, a necessidade de estudos de compostos com potenciais quimioterápicos e seguros é essencial. O alvo escolhido de estudo no grupo é a enzima cisteíno protease Cruzaína, a qual possui subsítios dentro os quais S1, S2 e S3 que interagem diretamente com as posições P1, P2 e P3 de dipeptídeos. Revisando a literatura em buscas de moléculas com alto potencial tripanossomicida, foi encontrado grande interesse em compostos nitro-triazol por serem excelentes substratos para o Tipo 1 de nitroredutase (NTR). Portanto, no presente projeto foi proposta a síntese de moléculas híbridas com a estrutura base de dipeptidil-nitrila com adição do fragmento (3-nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético em P3, ocorrendo substituições em P2, dando origem as moléculas: Neq 0691, 0692, 0752, 0753, 0754 e 0755, os quais foram caracterizados quanto a sua estrutura, purificados por CLAE e submetidos a testes cinético-enzimático por Fluorimetria, a fim de analisar seus potenciais de inibição da enzima cruzaína, sendo possível observar que os (*S*) enantiômeros apresentaram maior afinidade com a enzima do que os (*R*) enantiômeros, como estudos anteriores do grupo já haviam mostrado. Além disso, através de estudos de Matched Molecular Pair (MMP) foi possível observar que a substituição do fragmento de benzoíla por (3-nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético P3 acarretou em uma diminuição de pK_i menor que uma unidade. E por estudos de Relação Estrutura-Atividade (SAR), foi possível compreender que ao substituir o grupo Phe pelo grupo *meta*-Cl-Phe na posição P2, o pK_i da molécula diminuiu, divergindo de resultados da literatura, devido à presença do fragmento volumoso (3-nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético na posição P3.

Tais moléculas serão submetidas a posteriores testes biológicos *in vitro* para análise de seu potencial tripanossomicida nas formas infecciosas da tripomastigota do *T. cruzi* das cepas *Tulahuen lacZ*, *Y* e *CL Brener* e para análise citotóxica.

Abstract

Chagas Disease is one of the 17-neglected tropical disease around the world according to the World Health Organization (WHO), caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, in which the brazilian vector is known as “barbeiro”. Besides being an endemic problem in South America’s countries, reports show that it is expanding to the USA, Europe and Japan. Whereas the pharmaceutical industry provides just two drugs, Nifurtimox and Benznidazole, which present low efficiency for the chronic stage of the disease, besides severe off-targets effects, the need for studies of compounds with chemotherapeutic and safe potential is essential. The chosen target is the cysteine protease Cruzain, which has sub-sites such as S1, S2 and S3 that interact directly with the positions P1, P2 and P3 of dipeptides. Therefore, the literature was reviewed in search of molecules that presented high trypanosomicidal potential and nitro-triazoles compounds were interesting targets for being Type 1 nitroreductase substrates (NTR). Wherefore, the syntheses of hybrid molecules with dipeptidyl-nitrile basic structure in addition of the acetic (3-nitro-[1,2,4]triazole-1) moiety in P3 compounds were proposed in this work: Neq 0691, 0692, 0753, 0754 e 0755. The compounds were characterized according to their structure, purified by HPLC and submitted to kinetics-enzymatic test by Fluorimetry, in order to analyze the inhibition potential against cruzain, being possible to observe that the enzyme has shown higher affinity for (*S*) enantiomers than for (*R*) enantiomers, as previous studies at groups have shown. In addition, using Matched Molecular Pair (MMP) is seen that the substitution of benzoyl moiety by acetic (3-nitro-[1,2,4]triazole-1) in P3 decreases the pK_i in less than one unity. Lastly, by SAR studies, we were able to understand that by substituting Phe moiety by *meta*-Cl-Phe in P2 position, the pK_i has decreased, disagreeing with the literature, because of the addition of the voluminous acetic (3-nitro-[1,2,4]triazole-1) moiety in P3.

Such molecules synthesized in this work will undergo *in vitro* test to analyze the trypanosomicidal potential in the infectious trypomastigote forms of *T. cruzi*, such as *Tulahuen lacZ* strain, *Y* strain and *CL Brener* strain, plus cytotoxic potential assays.

Lista de Figuras

Figura 1: Rotas de imigração a partir da América Latina e estimativa dos números de pessoas infectadas com a doença de Chagas.....	12
Figura 2: Estrutura do Nifurtimox (a) e do Benzonidazol (b).	13
Figura 3: Estrutura cristalográfica da cruzaina, co-cristalizada com a benzoilarginina-alaninafluorometilcetona com destaque para a tríade catalítica: Cys25/His159/Asn175. (PDB: 2AIM).....	14
Figura 4: Estrutura cristalográfica do complexo cruzaina e Neq0409 ligado covalentemente à cisteína catalítica, apresentando o MOB e mapa de densidade eletrônica (PDB: 4QH6).....	15
Figura 5: Compostos sintetizados pelo grupo Nequimed: a) estrutura base de dipeptidil-nitrilas, b) Neq0409 e c) Neq0570.	16
Figura 6: Compostos propostos a serem sintetizados no projeto.....	20
Figura 7: Estrutura dos compostos Neq0691 e 0692.	25
Figura 8: Estrutura composto Neq0752.....	27
Figura 9: Estrutura composto Neq0753.....	29
Figura 10: Estrutura composto Neq0754.....	30
Figura 11: Estrutura composto Neq0755.....	31
Figura 12: Estrutura composto Neq0691.....	32
Figura 13: Ajuste não-linear da curva de inibição da cruzaina com o Neq0710, que apresenta comportamento de inibidor de rápida ligação.....	35
Figura 14: Rota sintética para os compostos Neq0691 e 0692. (a) PyBOP, TEA, DCM, à 0°C por 30 min -> hidrocloreto de ciclopropilamino nitrila, RT, Ar atm, 16h. (b) TFA 10% em DCM, RT, 4h. (c) EDC, ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético, DCM, Ar atm, 24h.....	36
Figura 15: Racemização com reagente de acoplamento cloreto de acila.	37
Figura 16: Estruturas dos reagentes de acoplamento BOP, PyBOP e HATU.....	38
Figura 17: Mecanismo proposto de reação utilizando reagente de acoplamento PyBOP.....	39

Figura 18: Mecanismo proposto de remoção do grupo protetor Boc utilizando TFA.....	40
Figura 19: Mecanismo proposto de reação utilizando reagente de acoplamento EDC·HCl....	41
Figura 20: RMN de ¹ H dos compostos Neq 0691+0692 (DMSO-d ₆ , 500 MHz).....	42
Figura 21: RMN de ¹³ C desacoplado dos compostos Neq0691+0692 (DMSO-d ₆ , 125 MHz)..	43
Figura 22: RMN de ¹ H dos compostos Neq0691+0692 com troca deuterada.....	44
Figura 23: Espectro de massas dos compostos Neq0691+0692 obtido por ESI-MS.	45
Figura 24: Cromatogramas obtidos por CLAE dos compostos: a) Neq0691+0692, rt (min) = 26,86 e 37,83; b) FR1, rt (min) = 26,39; c) FR2, rt (min) = 37.51. Condições: Cellulose-2 Phenomenex; MeOH:H ₂ O 50:50; fluxo: 0.5 mL.min ⁻¹ ; Vol. inj.: 10 µL; T = 32°C; Pureza > 95 % (254 nm).	46
Figura 25: Rota sintética para composto Neq0691: (a) HATU, hidrocloreto ciclopropilamino nitrila, DIPEA, DMF, Ar atm, RT, 24h. (b) HCOOH, 0°C, RT, 16h. (c) ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético HATU, DIPEA, DMF, Ar atm, RT, 24h.	47
Figura 26: Espectro de infravermelho do composto Neq0691 obtido por FTIR.....	48
Figura 27: Espectro de massa do composto Neq0691 obtido por ESI-MS.	48
Figura 28: Cromatogramas dos compostos Neq0691 e 0692, enantiomericamente puros, após análise por CLAE com rt (min.) de: a) 19,166 para Neq0691 e b) 27,225 para Neq0692. Condições: Cellulose-2 Phenomenex; MeOH:H ₂ O 50:50; fluxo: 0,8 mL.min ⁻¹ ; Vol. inj.: 10 µL; T = 32°C; Pureza > 99 % (254 nm).....	49
Figura 29: Mecanismo proposto de reação utilizando HATU como reagente de acoplamento.	50
Figura 30: Espectro de RMN de ¹ H do composto Neq0753 (DMSO-d ₆ , 500 MHz).....	52
Figura 31: Espectro de RMN de ¹³ C do composto Neq0753 (DMSO-d ₆ , 125 MHz).....	53
Figura 32: Espectros de massas do composto Neq0753: a) +MS; b) +MS2 c) -MS.	54
Figura 33: Espectro de infravermelho do composto Neq0752 obtido por FTIR.	55
Figura 34: Espectros de massas do composto Neq0752: a) +MS, b) +MS2 e c) -MS.....	56
Figura 35: Cromatogramas obtidos por CLAE dos compostos: a) Neq0753 e b) Neq0752.	57

Figura 36: Espectro de RMN de ^1H do composto Neq0754 (DMSO-d6, 500 MHz).....	59
Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C do composto Neq0754 (DMSO-d6, 125 MHz).....	60
Figura 38: Espectro de massas do composto Neq0754: a) -MS, b) +MS e c) +MS2.....	61
Figura 39: Espectro de infravermelho do composto Neq0755 obtido por FTIR.	62
Figura 40: Espectro de Massas do composto Neq0755 (a) MS+. (b) MS2 e (c) MS-.....	63
Figura 41: Curva de inibição da cruzaina pelos compostos Neq0692 (a) e 0691 (b).	65
Figura 42: Curva de inibição da cruzaina pelos compostos Neq0752 (a) e 0753 (b).	66
Figura 43: Curva de inibição da cruzaina pelos compostos Neq0754 (a) e 0755 (b).	67

Lista de Tabelas

Tabela 1: Atividade antiparasitária in vitro, toxicidade e propriedades dos compostos testados por Popodopoulous, et al..... 17

Tabela 2: Avaliação do potencial dos compostos dipeptil-nitrilas contra Cruzaína..... 68

Lista de Abreviaturas e Siglas

AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
Ar atm	Atmosfera de Argônio
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
CAQI	Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC
CDCl	Clorofórmio
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>HPLC</i>)
DIPEA	Diisopropiletilamina
DCM	Diclorometano
DDT	DL-Ditrioeritol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier
HATU	2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniohexafluorofosfato
HOBT	1-Hidroxi-1H-benzotriazol
I.D.	Diâmetro interno
IC ₅₀	Concentração necessária para inibição de 50% de atividade
K _i	Constante de inibição

K_m	Constante de Michaelis-Menten
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrômetro de massas
MeOH	Metanol
NEQ	Código do banco de dados do grupo Nequimed
Pf	Ponto de fusão
Phe	Fenilalanina
PyBOP	Benzotriazol-(1-iloxi)-tris-pirrolidinofosfonio hexafluorofosfato
RMN	Ressonância magnética nuclear
rt	Tempo de retenção
RT	(do inglês <i>room temperature</i>)
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografia de camada fina (do inglês <i>thin layer chromatography</i>)
Z-FR-AMC	N-benzoxicarbonil –L-fenilalanina-L-arginina-7-amido-metil-cumarina
δ	Deslocamento químico

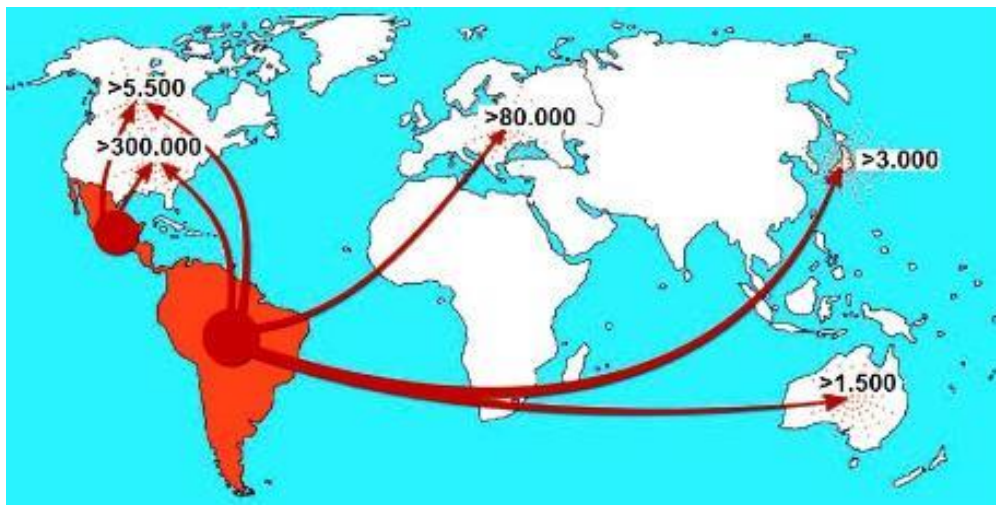
Sumário

1. Introdução e Justificativa	12
2. Objetivos	19
3. Materiais e Métodos.....	22
4. Resultados e discussões	36
5. Conclusão e Planejamento	70
Bibliografia.....	71

1. Introdução e Justificativa

Doença de Chagas é uma das 17 doenças tropicais negligenciadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e transmitida, no Brasil, pelo vetor comumente conhecido como “Barbeiro”, causada por um hemo-flagelado do gênero *Trypanosoma*, o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). A doença afeta o coração e o trato intestinal e é umas das principais causas de cardiomiopatia infecciosa em todo o mundo. Estimam-se que em torno de 8 milhões de pessoas estão infectadas com a doença e foram registradas mais de 15 mil mortes de pacientes infectados por ano. Além de ser um grande problema de saúde em países endêmicos da América Latina também está expandindo para os EUA, Europa, Austrália e Japão (Figura 1).^{1,2}

Figura 1: Rotas de imigração a partir da América Latina e estimativa dos números de pessoas infectadas com a doença de Chagas.

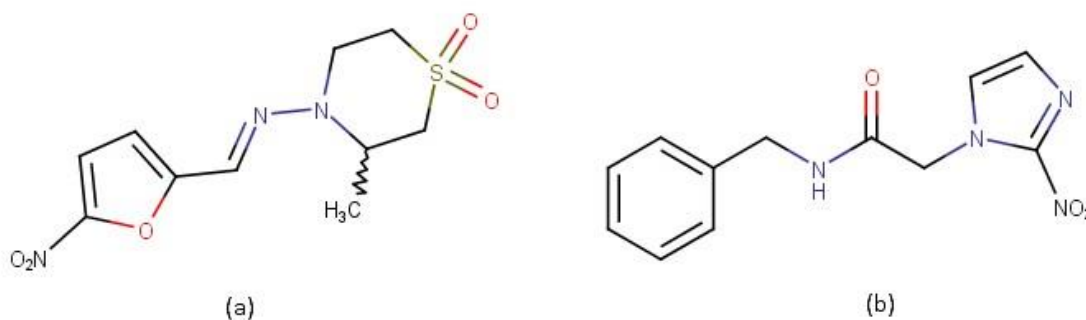


FONTE: COURA, J.R.; VINAS, P.A.; 2010.

Na indústria farmacêutica atual, há apenas dois medicamentos para o tratamento da doença de Chagas, o Nifurtimox e Benzonidazol (Figura 2). Estes apresentam uma eficácia de apenas 50% em todos os casos e são ineficazes na fase crônica da doença, além de apresentarem reações indesejáveis e eventos adversos (ADRs) que impõem grave desconforto aos usuários. Portanto, visto a reduzida eficácia do tratamento farmacológico e a sua elevada toxicidade apresentada por esses dois medicamentos disponíveis, há uma grande necessidade

do estudo e então obtenção de novos fármacos seguros e eficazes para tratar pessoas chagásicas.²

Figura 2: Estrutura do Nifurtimox (a) e do Benzonidazol (b).

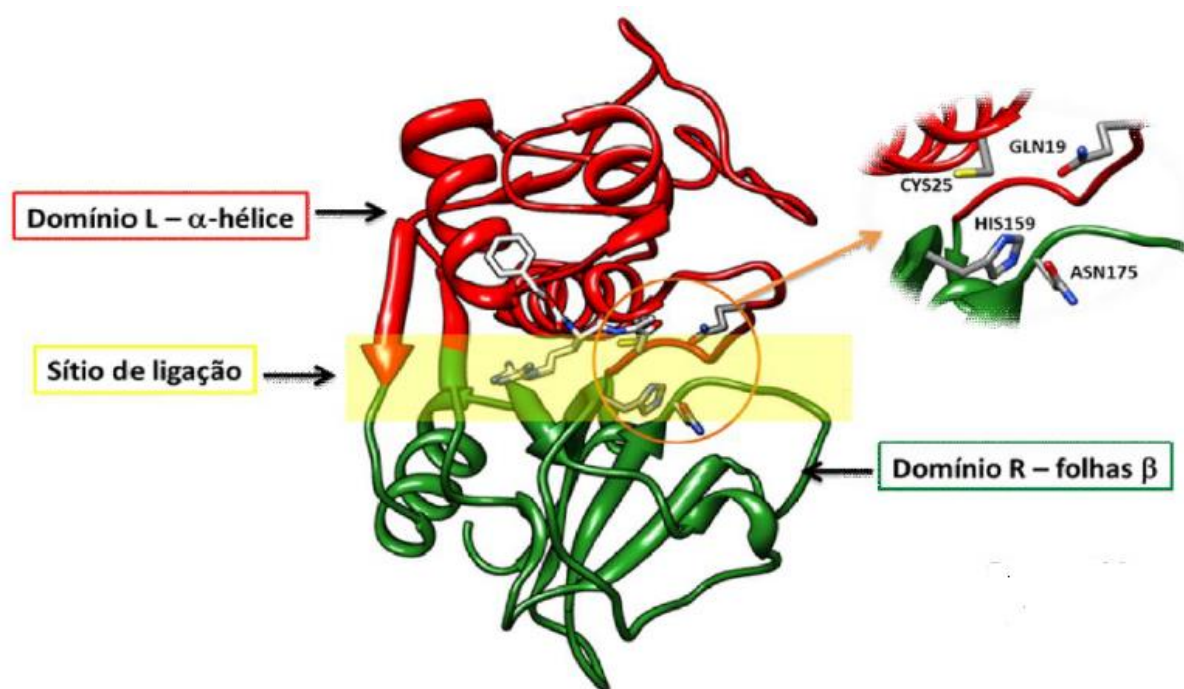


FONTE: Autoria própria.

As proteases são enzimas chaves na patogenicidade de muitas doenças parasitárias, visto que estão envolvidas na sobrevivência e replicação dos parasitos, induzindo dano no tecido do hospedeiro e facilitando a invasão do parasito ou auxiliando na utilização dos metabólitos de proteínas do hospedeiro.^{3,4} No parasito *T. cruzi*, a cruzaina é a cisteino protease mais abundante, sendo então essencial para o desenvolvimento e sobrevivência do parasito dentro e fora da célula hospedeira em todas as formas do seu ciclo de vida, o que a torna um alvo bastante atrativo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para a doença de Chagas.⁵

Assim como as demais cisteíno proteases, a cruzaina possui um sítio ativo que consiste dos resíduos de aminoácidos cisteína, histidina e asparagina, que formam a tríade catalítica⁷ (Figura 3), cavidade do oxiânion responsável pela digestão proteica.⁶

Figura 3: Estrutura cristalográfica da cruzaina, co-cristalizada com a benzoilarginina-alaninafluorometilcetona com destaque para a tríade catalítica: Cys25/His159/Asn175. (PDB: 2AIM)



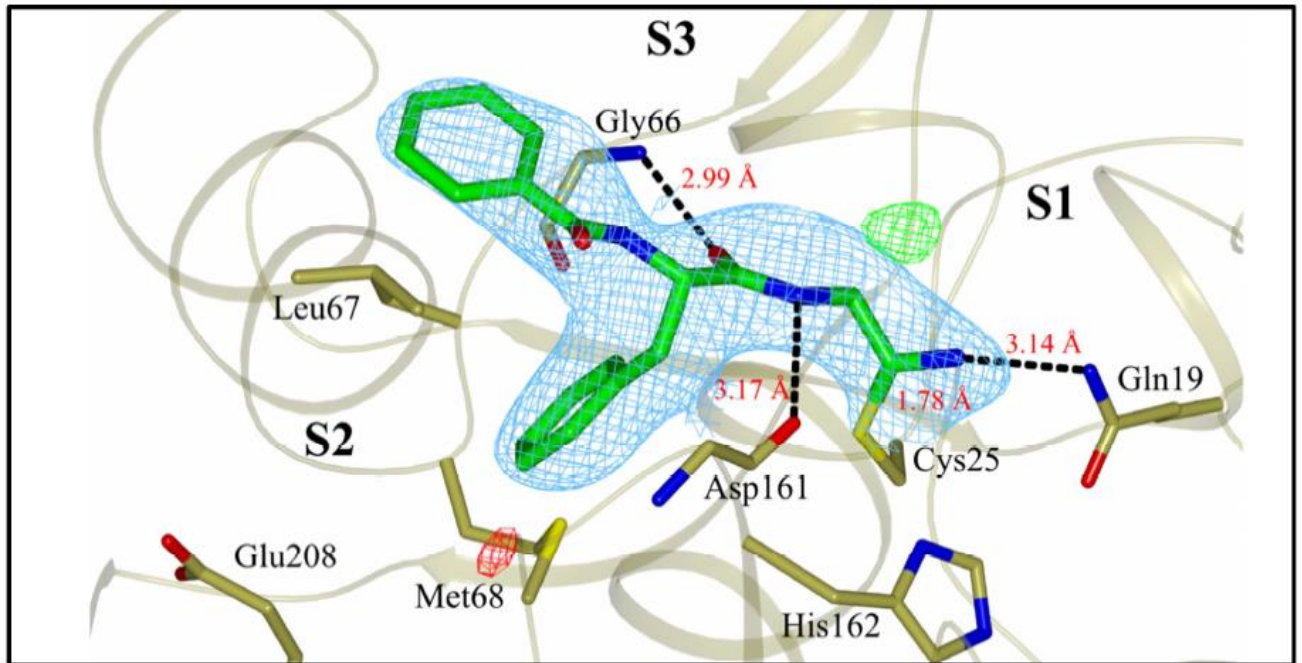
FONTE: RANGEL, K. C.; 2015.

Uma característica importante da cruzaina para a química medicinal é que esta pode ser efetivamente modulada por várias classes de inibidores covalentes e não-covalentes, embora o segundo apresente menor afinidade pela enzima.⁸ Nesses compostos estão presentes grupos contendo um átomo de carbono eletrofílico suscetível ao ataque nucleofílico efetuado pela cisteína ativada presente no sítio ativo da enzima. Esse ataque pode promover tanto uma ligação irreversível (interação covalente) como reversível (interação não-covalente), dependendo da natureza do carbono eletrofílico do inibidor.⁹ Alguns exemplos de inibidores covalentes são aldeído-peptídeos, α -dicetonas, α -cetoésteres, α -cetoamidas, α -cetoácidos e nitrilas.¹⁰ Em adição, compostos como peptidil diazometil-cetonas, fluorometil-cetonas, epóxidos e vinilsulfonas, também conhecidos como inibidores “suicidas”, realizam ligações irreversíveis com a cisteína catalítica da cruzaina.¹¹ Apesar de, até hoje, somente inibidores covalentes terem apresentado eficácia na cura da infecção causada pelo parasito, sugerindo-se essencial a afinidade dos inibidores pela enzima, a utilização de inibidores não covalentes da enzima cruzaina e de outras proteases também são exploradas na literatura.^{12,13}

O objetivo do projeto temático 2013/18009-4 Fapesp em desenvolvimento no Nequimed é identificar e desenvolver inibidores covalentes-reversíveis da enzima cruzaina

(Figura 4) que possam oferecer menores efeitos adversos, quando comparados com aqueles provocados devido às interações *off-target* de inibidores irreversíveis.

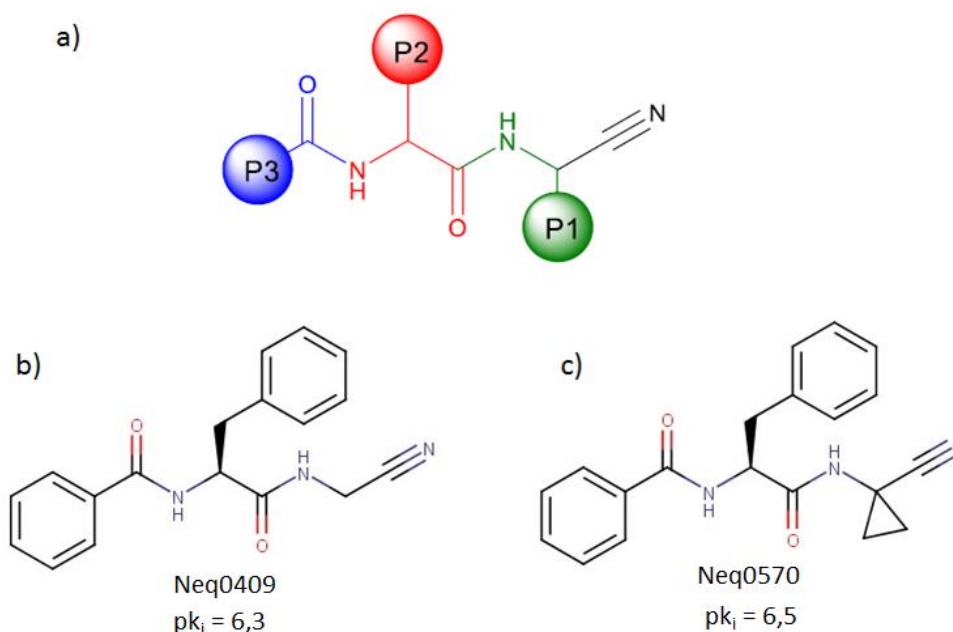
Figura 4: Estrutura cristalográfica do complexo cruzaina e Neq0409 ligado covalentemente à cisteína catalítica, apresentando o MOB e mapa de densidade eletrônica (PDB: 4QH6).



FONTE: FERNANDES, W. B., MONTANARI, C. A., KENNY, P. W., et al. 2015.

Em estudos previamente realizados no grupo, uma série de dipeptidil-nitrilas foi sintetizada e testada tanto contra a cruzaina como contra o *T. cruzi* (Figura 5). Além disso, é extremamente relevante o fato de que os compostos já ensaiados contra a forma infecciosa da tripomastigota do *T. cruzi* da cepa *Tulahuen lacZ* ajustam-se às modificações moleculares impostas através das relações estrutura-atividade estabelecidas na interação com a cruzaina.¹⁴

Figura 5: Compostos sintetizados pelo grupo Nequimed: a) estrutura base de dipeptidil-nitrilas, b) Neq0409 e c) Neq0570.



FONTE: Adaptado de AVELAR, L. A. A., MONTANARI, C. A., KENNY, P. W., et al. 2015.

Em adição, recentes estudos de Papadopoulou, et al. têm demonstrado grande interesse em compostos heterocíclicos nitrogenados, por serem agentes tripanossomicidas mais eficientes quando combinados com anti-chagásicos já conhecidos (segundo ensaios *in vitro*).¹⁵ Em adição, estudos prévios também já haviam demonstrado interesse em derivados triazólicos do tipo BMS-207,147 (Ravuconazol), os quais promoveram cura parasitológica da ordem de 70 a 100% em camundongos infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção. Esta classe de compostos é inibidora específica do estero14- α -demetilase (TcCYP51), que é uma enzima chave na biossíntese de ergosterol, uma etapa metabólica essencial na vida do parasito *T. cruzi*.¹⁶ Recentemente, Papadopoulou et al. realizaram a combinação de características de inibidores do CYP51 com a propriedade nitrorredutase, formando então derivados de 3-nitrotriazol, que se apresentaram como agentes anti- *T. cruzi* extremamente potentes em concentrações subnanomolar (Tabela 1), além de possuírem um alto grau de seletividade com o parasito. Em adição, estes compostos também se mostraram agentes ativos contra o amastigota *Leishmania donovani*, com excelente seletividade para com o parasito.¹⁵

Tabela 1: Atividade antiparasitária in vitro, toxicidade e propriedades dos compostos testados por Popodopoulos, et al.

ID No.	<i>T. b. rhodesiense</i> ^a IC ₅₀ (μM)	SI	<i>T. cruzi</i> ^b IC ₅₀ (μM)	SI	<i>L. donovani</i> Axen. ^c IC ₅₀ (μM)	SI	Cytotox. L6 ^d IC ₅₀ (μM)	Chemical structure	Bnz/compd	clogP	PSA (Å ²)
Melar. Bnz Milt.	0.009 ± 0.0014		2.153 ± 0.176		0.162 ± 0.017						
2	2.7	34	0.065	1416	0.27	339	92		31	2.161	118
3	1.3	22	0.008	3615	0.034	853	29		254	2.874	118
4	2.0	35	0.036	1954	0.18	384	70		56	2.304	118
5	26		18	7.5	29	5	137			3.030	66
6	0.90	140	0.045	2797	0.17	738	126		45	2.716	109
7	58	0.78	0.18	252	1.8	25	45		13	1.951	109
8	139	1.2	2.5	66	>308		169		0.8	2.03	131
9	2.1	17	0.068	528	1.2	31	36		34	2.130	109
10	4.9	14	0.028	2415	3.4	20	68		17	2.81	115
11	12	9.6	8.0	14	133	<1	114		0.28	0.054	112
12	15		4.2	15	0.79	79	62		0.48	2.972	106
13	2.6	50	2.6	49	0.14	937	127		0.78	3.685	106
14	13	9	3.3	37	0.29	418	123		0.61	3.115	106

SI is the ratio: IC₅₀ in L6 cells/IC₅₀ in each parasite. The highest concentration tested in L6 cells was 100 μg/mL and no solubility problems were observed for any compound. Reference drugs: Melarsoprol (Melar.), Benznidazole (Bnz), Miltefosine (Milt.). The IC₅₀ value of each reference drug is the mean from multiple measurements in parallel with the compounds of interest. Bnz/compd is the ratio of IC₅₀ values against *T. cruzi* obtained by Bnz and each compound. PSA: polar surface area. All physical properties were predicted by using the Marvin Calculator (www.chemaxon.com). IC₅₀ values are means of 2–3 measurements. The SD was <5%.

^a *T. b. rhodesiense*, strain STIB 900 trypomastigotes.

^b *T. cruzi*, strain Tulahuen C4 amastigotes.

^c *L. donovani axenic*, strain MHOM-ET-67/L82 amastigotes.

^d Cytotoxicity in the host L6 cells.

FONTE: PAPAPOPOULOUS, M. V.; et al. 2015.

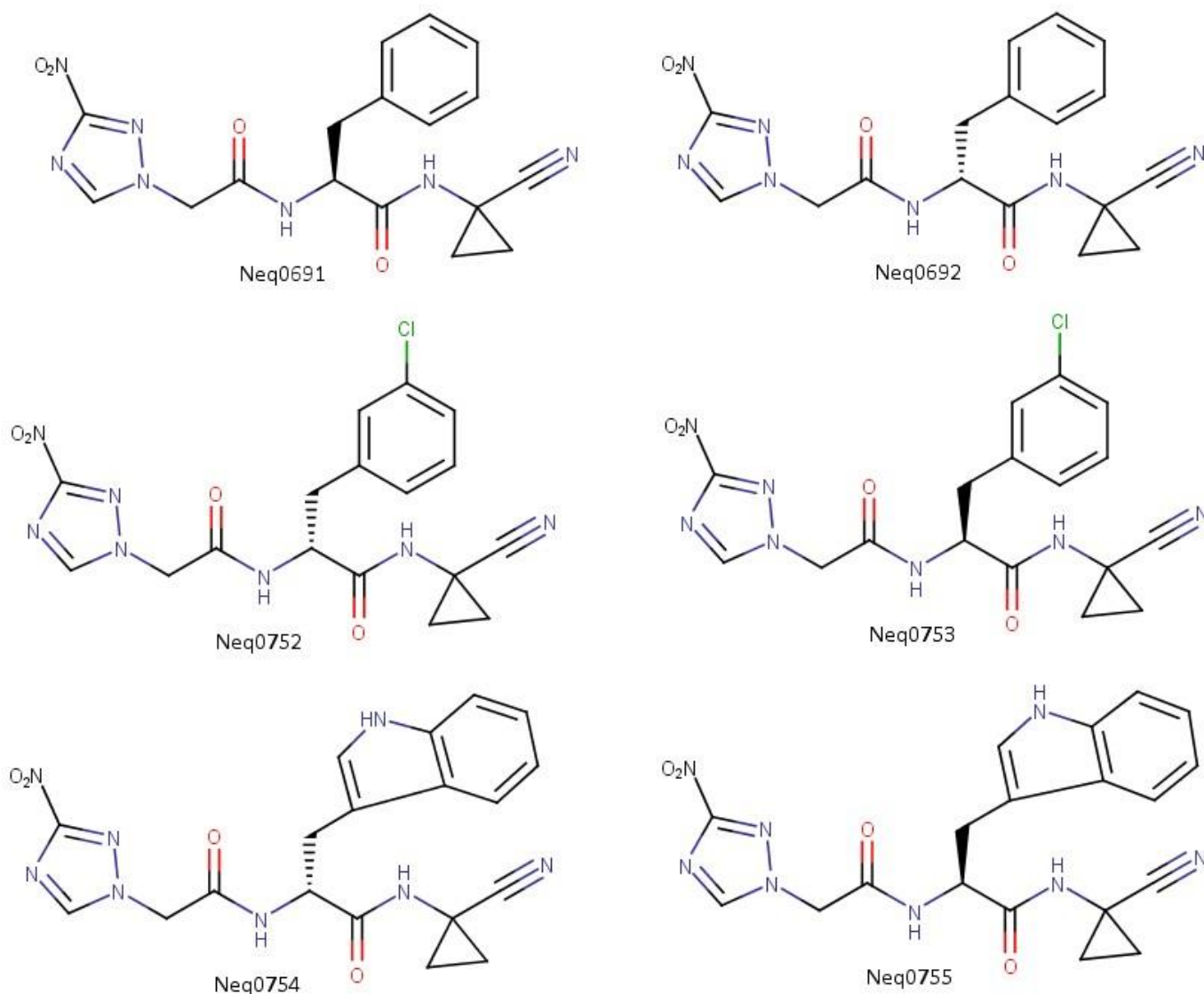
Tais compostos são potentes inibidores da enzima TcCYP51 e por serem excelentes substratos para o Tipo 1 de nitroreductase (NTR), o qual é específico para tripanossomatídeos,

são promissores candidatos a fármacos e constituem uma nova geração de agentes tripanossomicidas efetivos e mais acessíveis.¹⁵

2. Objetivos

No presente trabalho, o objetivo foi a síntese de compostos híbridos (Figura 6), visando o potencial tripanossomicida dos derivados de 3-nitro triazol, além de possuírem um alto grau de seletividade com o parasito¹⁵, assim como o potencial inibitório da enzima cruzaina dos compostos dipeptidil-nitrilas, já em estudo pelo grupo Nequimed. Foi utilizado como estrutura de partida o Neq0570 (Figura 5), que apresenta o grupo ciclopropil em P1, que apresentou conferir maior estabilidade metabólica ao composto, uma vez que diminui a probabilidade de ataques nucleofílicos ao carbono eletrofílico da carbonila, além de apresentar relativa alta energia de dissociação das ligações de carbono e hidrogênio em seu ciclo. ¹⁴

Figura 6: Compostos propostos a serem sintetizados no projeto.



FONTE: Autoria própria.

Portanto, foram propostas as substituições nas posições P2 e P3. Sendo que em P3 foi proposta a inserção do fragmento (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético, visto que o subsítio S3 é um sítio volumoso, suscetível à ação do solvente e de pouco conhecimento. Enquanto em P2 foi proposta a inserção dos fragmentos de fenilalanina, *meta*-Cl-fenilalanina e triptofano, uma vez que a substituição dos dois primeiros fragmentos já foi estudada pelo grupo ¹⁴, ocorrendo um aumento na afinidade da enzima com o composto (aumento do pK_i) ao substituir o fragmento de fenilalanina por *meta*-Cl-fenilalanina, que por estudos de SAR foi possível relacionar esse aumento da afinidade com a interação do fragmento com o resíduo de

aminoácido Met68.²² A proposta da substituição pelo fragmento indol em P2 consiste no crescente interesse de fragmentos heterocíclicos nos estudos inibitórios de cisteíno proteases tanto a cruzaina do *T. cruzi* como a CPB da *Leishmania mexicana*.^{23,24}

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Foram utilizados na síntese solventes orgânicos com grau de pureza P.A. como acetato de etila (AcOEt), *n*-hexano, diclorometano (DCM), clorofórmio, dimetilformamida (DMF), todos da marca Synth. Quando necessário, foram destilados e armazenados em peneira molecular 3 Å (20% m/v). Enquanto que para a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês HPLC), foram empregados solventes de pureza grau HPLC, fornecidos pela empresa Tedia, ou de pureza grau LC-MS, quando utilizada a técnica LC-MS. Os demais reagentes foram fornecidos pelas empresas Combi-Blocks, Enamine e Sigma-Aldrich, todos com pureza superior a 97%.

3.2 Equipamentos para separação e caracterização dos intermediários e produtos finais

Para o monitoramento das reações, foi utilizada Cromatografia em Camada Delgada (uma placa de CCS com matriz sílica gel, com espessura de camada de 200 µm, em suporte de alumínio da marca Sigma-Aldrich), revelador ácido fosfomolibdico (20% m/v), luz UV 254 nm. Para a purificação dos compostos intermediários e finais em coluna cromatográfica utilizou-se sílica gel Flash (tamanho de poro 60 Å, tamanho de partícula 220-440 mesh (35-75 µm) da Sigma-Aldrich). Para a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC), foi utilizado um Cromatógrafo Líquido, série Prominence 20AT da Shimadzu, com detecção por arranjo de diodos (DAD) spd-M20A, coletor de frações FRC-10, coluna Luna C18 da Phenomenex (tamanho de partícula 5 µm, tamanho do poro 1000 Å) e coluna quiral de celulose 2-phase da Phenomenex (tamanho de partícula 5 µm, tamanho do poro 1000 Å) na purificação das misturas racêmicas.

Os pontos de fusão foram determinados utilizando o aparelho digital de ponto de fusão Química Micro MQAPF-302, Microquímica Equipamentos Ltda.

Para a análise estrutural dos produtos foram utilizadas as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C no equipamento Agilent Technologies modelos 500/54

Premium Shield e 400/54 Premium Shield da Central de Análise Química do Instituto de Química de São Carlos (CAQI); Espectrometria de Massas no Espectrômetro de Massas do tipo Ion Trap amaZon SL da Bruker; Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier no equipamento no Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier, modelo IRAffinity 1, da Shimadzu, também disponibilizado pela CAQI. Para a obtenção dos espectros de RMN, foram utilizados solventes deuterados como dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) e clorofórmio deuterado (CDCl₃) da Sigma-Aldrich.

3.3 Procedimentos Sintéticos

Todos os procedimentos sintéticos foram realizados sob supervisão da pós-doutoranda Dra Daniela De Vita.

3.3.1 Síntese da molécula: (S) N-(1-cianociclopropil)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1)aceto amido]-3-fenilpropanamida (Neq0691) e (R) N-(1-cianociclopropil)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1)aceto amido]-3-fenilpropanamida (Neq0692): a primeira síntese dos compostos Neq0691 e 0692 (Figura 7) seguiu a rota sintética da Figura 14.

3.3.1.1 Intermediário 7: tert-butil N-{1-[(1-cianociclopropil)carbamonil]-2-feniletil}carbamato: À uma solução do ácido racêmico 2-[[[(tert-butoxi)carbonil]amino]-3-phenylpropanoico (1 eq., 1,88 mmol) em 10 mL de DCM seco à 0°C foi adicionado TEA (4 eq., 7,54 mmol) e PyBOP (1,2 eq., 2,26 mmol), e deixado sob rotação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos, sob atmosfera de Argônio. Então a mistura foi posta em banho de gelo novamente para a adição de hidrocloreto 1-amino-1-ciclopropanocarbonitrila (1,6 eq., 3,008 mmol) e deixado sob agitação à temperatura ambiente por 16h. A reação foi controlada por TLC, comparando o produto desta etapa com os reagentes. O produto foi extraído da mistura reacional com AcOEt (1x40 mL), solução saturada de NaHCO₃ (2x10 mL) e solução saturada de Brina (3x10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada à vácuo e purificada com coluna cromatográfica de sílica gel Flash (AcOEt : Hex 1:1). O produto final foi um sólido branco, com peso de 430 mg (rendimento: 69.4%), utilizado na reação seguinte.

3.3.1.2 Intermediário 8: 2-amino-N-(1-cianociclopropil)-3-fenilpropanamida:

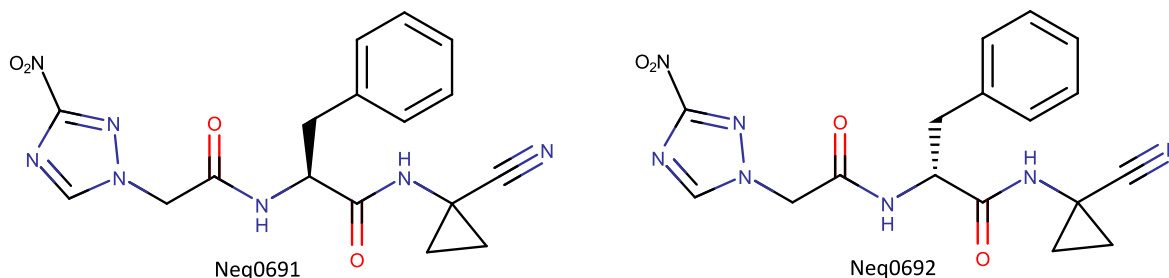
Aos 430 mg do intermediário obtido na síntese anterior foram adicionados 4 mL de DCM seco. A solução foi posta em banho de gelo para a adição de 400 µl de TFA 10%. A mistura foi deixada sob rotação à temperatura ambiente por 4 horas. A reação foi monitorada por TLC e após o término da reação, o excesso de ácido foi evaporado e à mistura foram adicionados DCM e solução de NaOH 1,0 M, em banho de gelo, até pH neutro. Então o produto foi extraído da mistura por extração líquido-líquido com DCM (3x10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada e os 200,7 mg de produto no estado de óleo obtido (rendimento: 67,1%) utilizado na reação seguinte.

3.3.1.3 Produto N-(1-cianociclopropil)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1)aceto amido]-3-fenilpropanamida (Neq0691 + 0692):

para a ativação do ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético (1 eq., 0,875 mmol), este foi diluído em 15 mL de DCM seco e adicionado EDC·HCl (1,086 eq., 0,951 mmol) e deixado sob agitação em banho de gelo e atmosfera de argônio por 1 hora. Então a amina desprotegida obtida na reação anterior (1 eq., 0,875 mmol) foi adicionada à mistura a qual foi deixada reagindo à temperatura ambiente por 24h. A reação foi controlada por TLC e ao fim, o produto foi concentrado no rotoevaporador e com o óleo residual foi realizada a extração líquido-líquido com AcOEt (1x20 mL), solução saturada de Brina (3x10 mL) e NaHCO₃ (3x10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada e purificada com coluna cromatográfica de sílica gel Flash (100% AcOEt), obtendo 11 mg de produto (rendimento: 3,3 %). P.f.: 158,2 - 158,7°C. RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 9,09 (s, 1H), 8,96 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 8,81 (s, 1H), 7,32-7,22 (m, 5H), 5,19 (d, J = 16,5 Hz, 1H), 5,12 (d, J = 16,5 Hz, 1H), 4,46 (m, 1 H), 2,98 (dd, J = 13,5 Hz, J = 6,5 Hz, 1H), 2,87 (dd, J = 13,5 Hz, J = 8,5 Hz, 1H), 1,48 (m, 2H), 0,99 (m, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz): δ 172,2, 164,9, 162,3, 148,5, 137,2, 129,7, 128,6, 127,0, 120,9, 54,4, 52,9, 38,2, 20,0, 16,0. FTIR (KBr, cm⁻¹): 3283, 2243, 1663, 1310, 1040 e 837. ESI-MS (m/z): 406,13 [M+Na]⁺ e 422,17 [M+K]⁺. A separação dos enantiômeros foi feita por CLAE: Cellulose-2 Phenomenex (5µm, 250mm x 4,6mm I.D.), fase móvel:

MeOH/Água: 50:50, T = 32°C, fluxo 0,8 mL/min, rt (min.) = 19,16 para enantiômero (*S*) e rt (min.) = 27,22 min para (*R*), pureza > 96% (206 nm);

Figura 7: Estrutura dos compostos Neq0691 e 0692.



FONTE: Autoria própria.

3.3.2 Síntese da molécula (*R*) 3-(3-clorofenil)-N-(1-cianociclopropil)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1)acetamido]propanamida: Neq0752 (Figura 8): a rota sintética pode ser visto na Figura 24.

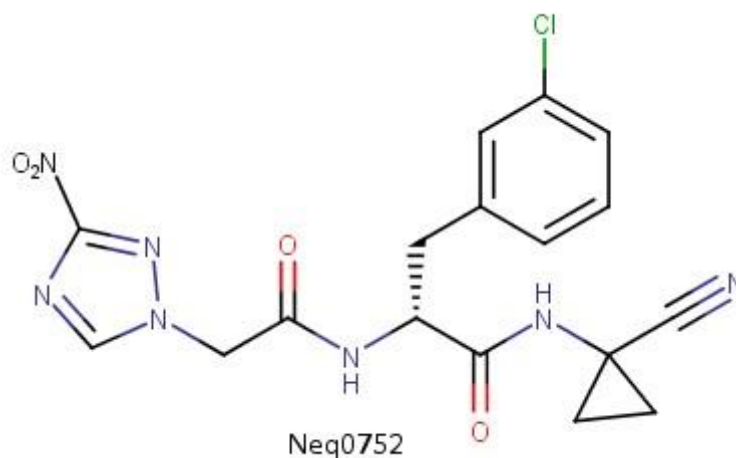
3.3.2.1 Intermediário 9: (*R*) *tert*-butil N-[2-(3-clorofenil)-1-[(1-cianociclopropil)carbamonil]etil]carbamat: o ácido (*D*) Boc-Cl-Phe (1 eq., 1,0 mmol) foi solubilizado em 7 mL de DMF seco e após completa solubilização do ácido, foram adicionados HATU (2 eq., 2,0 mmol), DIPEA (4 eq., 4,0 mmol) e 1-amino-1-ciclopropanocarbonitrila·HCl (1,2 eq., 1,2 mmol) à solução, sob atmosfera de argônio, e deixado sob agitação por 24h. A reação foi controlada por TLC e após seu término, a extração líquido-líquido foi feita com AcOEt (1x20 mL), solução saturada de Brina (1x10 mL), NaHCO₃ (2X10 mL) e Brina novamente (2x10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada à vácuo e purificada com coluna cromatográfica de sílica gel Flash (AcOEt : Hex 1:1). O produto obtido foi um óleo amarelo, de peso 160 mg (rendimento: 44%) e utilizado na reação seguinte.

3.3.2.2 Intermediário 10: (*R*) 2-amino-3-(3-clorofenil)-N-(1-cianociclopropil)propanamida: aos 160 mg do intermediário obtido na síntese anterior foram adicionados 7 mL de ácido fórmico (adição feita em banho de gelo). A mistura ficou sob agitação à temperatura ambiente por 16h. A reação foi controlada por TLC e após seu término, o excesso de ácido foi evaporado e então foi adicionada solução de NaOH 1,0 M até pH neutro da solução, em

banho de gelo. Após neutralização, o produto foi extraído com AcOEt (3x10 mL), a fase orgânica foi seca em MgSO₄ e concentrada. O produto desta reação foi um óleo com peso de 93,9 mg (rendimento: 81%), utilizado na reação seguinte.

3.3.2.3 Produto (R) 3-(3-clorofenil)-N-(1-cianociclopropil)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1)acetamido]propanamida (Neq0752): o ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético (1 eq., 0,356 mmol) foi dissolvido em 10 mL de DMF seco e posto em banho de gelo para a adição de HATU (1,1 eq., 0,392 mmol), DIPEA (3 eq., 1,068 mmol) e o intermediário obtido da síntese anterior (1eq., 0,356 mmol). A mistura reacional foi deixada sob agitação à temperatura ambiente, sob atmosfera de argônio, por 24 horas. A reação foi controlada por TLC e após seu término, realizada a extração líquido-líquido com AcOEt (1x20 mL), Brina (1x30 mL), de NaHCO₃ (2x30 mL) e Brina novamente (3x30 mL). A fase orgânica foi seca em MgSO₄, concentrada e purificada por cromatografia líquida em sílica gel Flash (AcOEt:Hex 80:20), obtendo-se um produto sólido branco de peso 69 mg (rendimento: 46%). Pf: 206,8 – 207,3°C. RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 9,05 (s, 1H), 8,89 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 8,76 (s, 1H), 7,32 -7,25 (m, 3H), 7,15 (dt, *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,5 Hz, 1H), 5,14 (d, *J* = 20,5 Hz, 1H), 5,06 (d, *J* = 20,5 Hz, 1H), 4,42 (m, 1H), 2,94 (dd, *J* = 17,0 Hz, *J* = 7,0 Hz, 1H), 2,82 (dd, *J* = 17,0 Hz, *J* = 11,0 Hz, 1H), 1,45 (m, 2H), 0,99 – 0,95 (m, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz): δ 171,5, 164,6, 161,9, 148,1, 139,4, 132,8, 130,0, 129,0, 128,0, 126,6, 120,5, 53,7, 52,4, 37,2, 19,6, 15,6. FTIR (KBr, cm⁻¹): 3267, 2243, 1663, 1207, 1038 e 837. ESI-MS (*m/z*): 416,14 [M-H]⁻ e 418,12 [M+H]⁺. CLAE: Cellulose-2 Phenomenex (5µm, 250mm x 4,6mm I.D.), fase móvel: MeOH/Água: 65:35, T = 32°C, fluxo 0,5 mL/min, rt (min.): 20,14 e pureza: > 94% (206 nm).

Figura 8: Estrutura composto Neq0752.



FONTE: Autoria própria.

3.3.3 Síntese da molécula (S) 3-(3-clorofenil)-N-(1-cianociclopropil)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1)acetamido]propanamida: Neq0753 (Figura 9): a rota sintética pode ser visto na Figura 24.

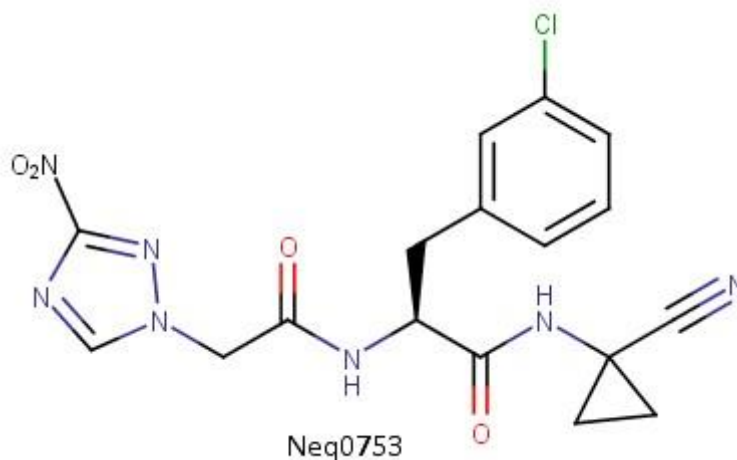
3.3.3.1 Intermediário 11: (S) tert-butil N-[2-(3-clorofenil)-1-[(1-cianociclopropil)carbamonil]etil]carbamato: o ácido (*L*) Boc-Cl-Phe (1 eq., 1,0 mmol) foi solubilizado em 7 mL de DMF seco e após completa solubilização do ácido, foram adicionados HATU (2 eq., 2,0 mmol), DIPEA (4 eq., 4,0 mmol) e 1-amino-1-ciclopropanocarbonitrila·HCl (1,2 eq., 1,2 mmol) à solução, sob atmosfera de argônio, e deixado sob agitação por 24h. A reação foi controlada por TLC e após seu término, foi realizada a extração líquido-líquido com AcOEt (1x20 mL), solução saturada de Brina (1x10 mL), NaHCO₃ (2X10 mL) e Brina novamente (2x10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada à vácuo e purificada com coluna cromatográfica de sílica gel Flash (AcOEt : Hex 50:50). O produto obtido foi um óleo amarelo, de peso 155 mg (rendimento: 42,6%) e utilizado na reação seguinte.

3.3.3.2 Intermediário 12: (S) 2-amino-3-(3-clorofenil)-N-(1-cianociclopropil)propanamida: aos 155 mg do intermediário obtido na síntese anterior foram adicionados 7 mL de ácido fórmico (adição feita em banho de gelo). A mistura ficou sob agitação à temperatura ambiente por 16h. A reação foi controlada por TLC e após seu término, o excesso de ácido foi evaporado e

então foi adicionada solução de NaOH 1,0 M até pH neutro da solução, em banho de gelo. Após neutralização, o produto foi extraído com AcOEt (3x10 mL), a fase orgânica foi seca em MgSO₄ e concentrada. O produto desta reação foi um óleo com peso de 109,9 mg (rendimento: 97,8%), utilizado na reação seguinte.

3.3.3.3 Produto (S) 3-(3-clorofenil)-N-(1-cianociclopropil)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1)acetamido]propanamida (Neq0753): o ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético (1 eq., 0,417mmol) foi dissolvido em 10 mL de DMF seco e posto em banho de gelo para a adição de HATU (1,1 eq., 0,459 mmol), DIPEA (3 eq., 1,251 mmol) e o intermediário obtido da síntese anterior (1eq., 0,417 mmol). A mistura reacional foi deixada sob agitação à temperatura ambiente, sob atmosfera de argônio, por 24h. A reação foi controlada por TLC e ao seu término, foi realizada a extração com AcOEt (1x20 mL), solução saturada de Brina (1x30 mL), de NaHCO₃ (2x30 mL) e Brina novamente (3x30 mL). A fase orgânica foi seca em MgSO₄, concentrada e purificada por coluna cromatográfica de sílica gel Flash (AcOEt:Hex 80:20), obtendo-se um sólido branco de peso 71 mg (rendimento: 40,2%). Pf: 207,7 – 208,4 °C. RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 9,05 (s, 1H), 8,89 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 8,76 (s, 1H), 7,32-7,25 (m, 3H), 7,15 (dt, *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,5 Hz, 1H), 5,14 (d, *J* = 20,5 Hz, 1H), 5,06 (d, *J* = 20,5 Hz, 1H), 4,42 (m, 1H), 2,94 (dd, *J* = 17,0 Hz, *J* = 7,0 Hz, 1H), 2,82 (dd, *J* = 17,0 Hz, *J* = 11,0 Hz, 1H), 1,45 (m, 2H), 0,99 – 0,95 (m, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz): δ 171,5, 164,6, 161,9, 148,1, 139,4, 132,8, 130,0, 129,0, 128,00, 126,6, 120,5, 53,7, 52,4, 37,2, 19,6, 15,6. FTIR (KBr, cm⁻¹): 3267, 2243, 1663, 1207, 1038 e 837. ESI-MS (*m/z*): 416,14 [M-H]⁻ e 418,12 [M+H]⁺. CLAE: Cellulose-2 Phenomenex (5µm, 250mm x 4,6mm I.D.), fase móvel: MeOH/Água: 65:35, T = 32°C, fluxo 0,5 mL/min, rt (min.): 14,81 e pureza >97 % (206 nm).

Figura 9: Estrutura composto Neq0753.

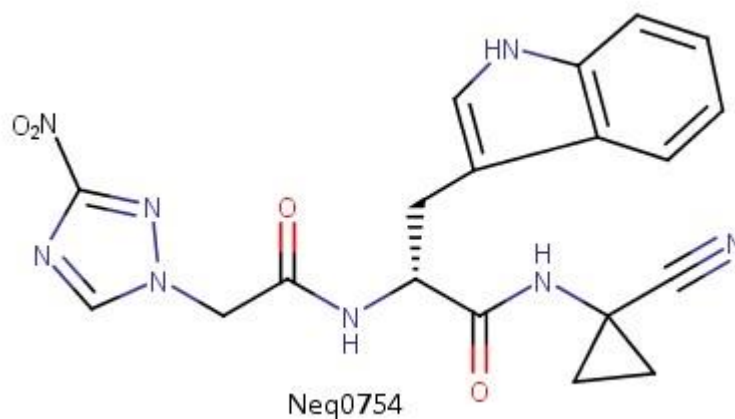


FONTE: Autoria própria.

3.3.4 Síntese da molécula (*R*) N-(1-cianociclopropil)-3-(1H-indol-3-il)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-il)acetamido]propanamida: Neq0754 (Figura 10): a rota sintética pode ser visto na Figura 24. O ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético (1 eq., 0,37 mmol) foi dissolvido em 10 mL de DMF seco, posto em banho de gelo e adicionado HATU (1,1 eq., 0,407 mmol), DIPEA (3 eq., 1,11 mmol) e o intermediário (*D*) 2-amino-N-(1-cianociclopropil)-3-(1H-indol-3-il)propanamida (1 eq., 0,37 mmol), o qual foi previamente sintetizado, purificado e caracterizado no grupo. A mistura reacional ficou sob agitação à temperatura ambiente e atmosfera de argônio por 24h. A reação foi controlada por TLC e após seu término, foi realizada a extração com AcOEt (1x20 mL), solução saturada de Brina (3x30 mL), NaHCO₃ (2x30 mL) e Brina novamente (2x30 mL). A fase orgânica foi seca em MgSO₄, concentrada e purificada com coluna cromatográfica de sílica gel Flash (100% AcOEt). O produto obtido tinha peso de 92,2 mg (rendimento: 59%), sendo um sólido amarelo. Pf: 223,7 – 224,2°C. RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 10,87 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H), 8,98 (s, 1H), 8,83 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 8,76 (s, 1H), 7,55 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 7,33 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 7,11 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 7,06 (dt, *J* = 10,0 Hz, *J* = 1,5 Hz, 1H), 6,98 (dt, *J* = 10,0 Hz, *J* = 1,5 Hz, 1H), 5,18 (d, *J* = 20,5 Hz, 1H), 5,09 (d, *J* = 20,5 Hz, 1H), 4,46 (dd, *J* = 9,5 Hz, *J* = 8,0 Hz, 1H), 3,09 (dd, *J* = 18,0 Hz, *J* = 8,0 Hz, 1H), 2,97 (dd, *J* = 18,0 Hz, *J* = 9,5 Hz, 1H), 1,40 (m, 2H), 0,89 (m, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz): δ 172,6, 164,9, 162,3, 148,5, 136,4, 127,6, 124,2, 121,4, 121,0, 118,8, 111,8, 109,5, 54,0,

52,9, 28,3, 20,1, 16,0. FTIR (KBr, cm^{-1}): 3368, 3294, 2243, 1659, 1250, 1040. ESI-MS (m/z): 423,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 445,15 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e 421,19 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Figura 10: Estrutura composto Neq0754.

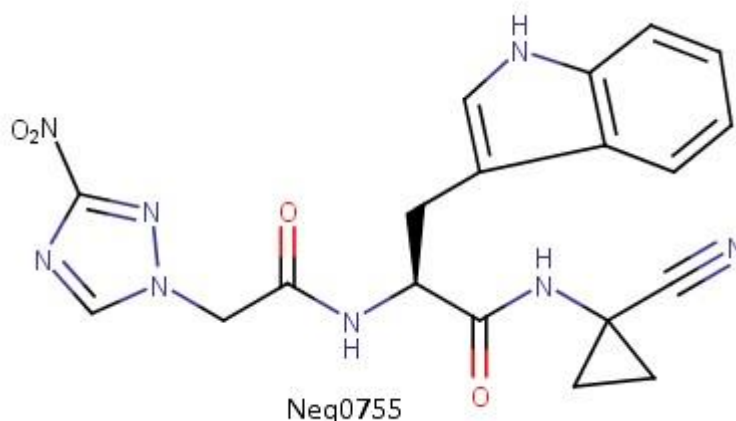


FONTE: Autoria Própria.

3.3.5 Síntese da molécula (S) N-(1-cianociclopropil)-3-(1H-indol-3-il)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-il)acetamido]propanamida: Neq0755 (Figura 11): a rota sintética pode ser visto na Figura 24. O ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético (1 eq., 0,31 mmol) foi dissolvido em 8 mL de DMF seco, posto em banho de gelo e adicionado HATU (1,1 eq., 0,341 mmol), DIPEA (3 eq., 0,93 mmol) e o intermediário (L) 2-amino-N-(1-cianociclopropil)-3-(1H-indol-3-il)propanamida (1 eq., 0,31 mmol), o qual foi previamente sintetizado, purificado e caracterizado no grupo. A mistura reacional ficou sob agitação à temperatura ambiente e atmosfera de argônio por 24h. A reação foi controlada por TLC e após seu término, foi realizada a extração com AcOEt (1x20 mL), solução saturada de Brina (3x30 mL), NaHCO_3 (2x30 mL) e Brina novamente (2x30 mL). A fase orgânica foi seca em MgSO_4 , concentrada e purificada com coluna cromatográfica de sílica gel Flash (100% AcOEt). O produto obtido tinha peso de 45,4 mg (rendimento: 34,7%), sendo um sólido amarelo. Pf: 224,1 – 225,6°C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 10,87 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), 8,98 (s, 1H), 8,83 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 8,76 (s, 1H), 7,55 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 7,33 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 7,11 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H), 7,06 (dt, $J = 10,0$ Hz, $J = 1,5$ Hz, 1H), 6,98 (dt, $J = 10,0$ Hz, $J = 1,5$ Hz, 1H), 5,18 (d, $J = 20,5$ Hz, 1H), 5,09 (d, $J = 20,5$ Hz, 1H), 4,46 (dd, $J = 9,5$ Hz, $J = 8,0$ Hz, 1H), 3,09 (dd, $J = 18,0$ Hz, $J = 8,0$ Hz, 1H), 2,97 (dd, $J = 18,0$ Hz, $J = 9,5$ Hz, 1H), 1,40 (m, 2H), 0,89 (m, 2H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ 172,6,

164,9, 162,3, 148,5, 136,4, 127,6, 124,2, 121,4, 121,1, 118,8, 111,8, 109,5, 54,1, 52,9, 28,3, 20,1, 16,0. FTIR (KBr, cm^{-1}): 3368, 3294, 2243, 1659, 1250, 1040. ESI-MS (m/z): 423,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 445,15 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e 421,19 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Figura 11: Estrutura composto Neq0755.



FONTE: Autoria própria.

3.3.6 Síntese da molécula: (S) N-(1-cianociclopropil)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1)aceto amido]-3-fenilpropanamida: Neq0691 (Figura 12): segunda síntese do composto Neq0691, a qual seguiu a rota sintética da Figura 24.

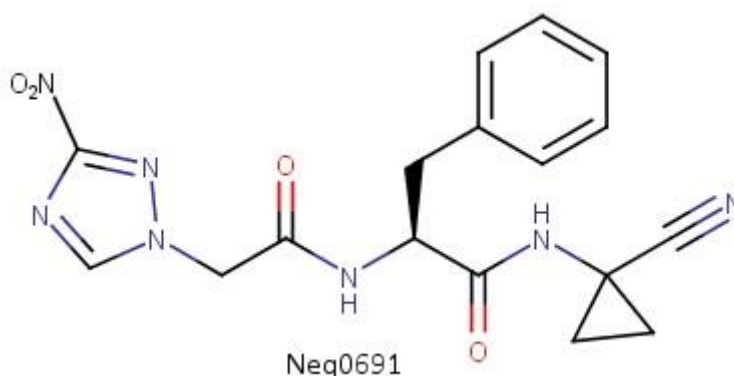
3.3.6.1 Intermediário 13: (S) tert-butil N-{1-[(1-cianociclopropil)carbamonil]-2-feniletil}carbamato: À uma solução de ácido (L) Boc- Phe (1 eq., 0,754 mmol) em 5 mL de DCM seco, em banho de gelo, foram adicionados HATU (1,1 eq., 0,829 mmol), DIPEA (3 eq., 2,26 mmol) e 1-amino-1-ciclopropancarbonitrila·HCl (1,2 eq., 0,905 mmol) e deixado sob agitação à temperatura ambiente por 24h, sob atmosfera de argônio. A reação foi controlada por TLC e após o término, foi realizada a extração líquido-líquido com AcOEt (1x30 mL), solução saturada de NaHCO_3 (3x10 mL) e de Brina (3x10 mL). A fase orgânica foi seca em MgSO_4 , concentrada à vácuo e purificada com coluna cromatográfica de sílica gel Flash (AcOEt : Hex 50:50). O produto final foi um sólido branco, com peso de 236,4 mg (rendimento da reação: 95,2%), utilizado na reação seguinte.

3.3.6.2 Intermediário 14: (S) 2-amino-N-(1-cianociclopropil)-3-fenilpropanamida: Aos 236,4 mg do intermediário obtido na síntese anterior foram adicionados 7 mL de ácido acético em banho de gelo, deixada sob rotação à temperatura

ambiente por 16h. A reação foi monitorada por TLC e após seu término, o excesso de ácido foi evaporado e à mistura foi adicionado gotas de solução de NaOH 1,0 M, em banho de gelo, até pH neutro. Após neutralização, o produto foi extraído da mistura por extração líquido-líquido com clorofórmio (3x10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada e um óleo amarelo de peso 80 mg (rendimento: 48,6%) foi obtido e utilizado na reação seguinte.

3.3.6.3 Produto (S) - N-(1-cianociclopropil)-2-[2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1)acetoamido]-3-fenilpropanamida (Neq0691): para a ativação do ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético (1 eq., 0,349 mmol), este foi diluído em 10 mL de DCM seco, posto em banho de gelo para a adição de HATU (1,1 eq., 0,384 mmol), DIPEA (3 eq., 1,046 mmol) e o intermediário obtido na reação anterior (1 eq., 0,349 mmol). A mistura foi deixada sob agitação e atmosfera de argônio reagindo por 24h. A reação foi controlada por TLC e após seu término, foi realizada a extração líquido-líquido com AcOEt (1x20 mL), solução saturada de Brina (1x10 mL), NaHCO₃ (2x10 mL) e Brina novamente (2x10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada e purificada por coluna cromatográfica de sílica gel Flash (100% AcOEt), obtendo 30 mg de produto (rendimento: 22,4 %).

Figura 12: Estrutura composto Neq0691.



FONTE: Autoria própria.

3.4 Reagentes usados em ensaios bioquímicos

Os reagentes usados na preparação das soluções tampão foram: fosfato de sódio monobásico e dibásico; etilenodiamino tetra-acético (EDTA); dimetilsulfóxido (DMSO); Triton-x100; acetato de sódio; glicerol; cloreto de sódio; substrato Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarina (Z-FR-AMC), todos da Sigma-Aldrich. Já o reagente Ditiotreitól (DDT) é proveniente da empresa USB Corporation. Todos os reagentes apresentam certificação do fabricante de pureza > 99%.

3.5 Estudo de inibição enzimática.

Os ensaios cinético-enzimáticos foram feitos sob supervisão do doutorando Ms. Lorenzo Cianni.

O ensaio biológico da cruzaina recombinante foi dado através de ensaios fluorimétricos, utilizando o fluorímetro Biotek® Synergy HT, com o objetivo de monitorar a taxa de hidrólise do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarina (Z-FR-AMC, Sigma-Aldrich), utilizando uma emissão de fluorescência a 460 nm (excitação a 355 nm) a temperatura de 37°C. As reações foram acompanhadas por 5 minutos para os inibidores considerados irreversíveis e de ligação rápida. Os ensaios cinético-enzimáticos foram realizados em uma solução de 200 µL contendo tampão acetato 100 mM, pH 5,5, NaCl 300 mM, DTT 5 mM (ditiotreitól), DMSO à 5% v / v (dimetilsulfóxido), 0,01% v / v Triton X-100 e 0,15 nM de Cruzaina. Foram utilizadas microplacas de fundo plano preto de 96 poços Corning®. A alíquota de estoque da enzima foi rapidamente descongelada à temperatura ambiente e mantida em gelo até à ativação, em que foi incubada durante 20 min no tampão de ensaio (acetato 100 mM, pH 5,5 e DTT 5 mM) seguido por 2 min adicionais com inibidores antes da reação ser iniciada pela adição do substrato.

Uma inspeção visual e pré-leitura dos poços das placas foram realizadas antes dos ensaios começarem para verificar uma possível precipitação e fluorescência de fundo, respectivamente. Visto que nenhuma leitura significativa de fluorescência foi detectada utilizando o comprimento de onda de emissão de 460 nm (comprimento de onda utilizado no ensaio cinético), os potenciais efeitos do filtro interno não tiveram que ser levados em consideração no experimento.

A análise e manipulação dos dados foram feita por Sigma Plot 10 e Origin.

3.6 Determinação dos parâmetros cinéticos para inibidores de ligação rápida.

As velocidades iniciais da hidrólise do substrato para uma reação de primeira ordem foram calculadas utilizando o software Gen5™ Biotek®, baseado na constante de inibição aparente K_i' , o qual foi determinada por regressão não-linear utilizando a Equação 01 abaixo.

$$V_s = \frac{V_o}{(1+[I])/K_i'} \quad (\text{Eq. 01})$$

Onde, V_s = taxa do estado estacionário, V_o = taxa na ausência do inibidor e $[I]$ = concentração do inibidor.

A constante de inibição é K_i pode ser calculada por uma correção de K_i' pela Equação 02 abaixo.

$$K_i = \frac{K_i'}{(1+[S])/K_m} \quad (\text{Eq. 02})$$

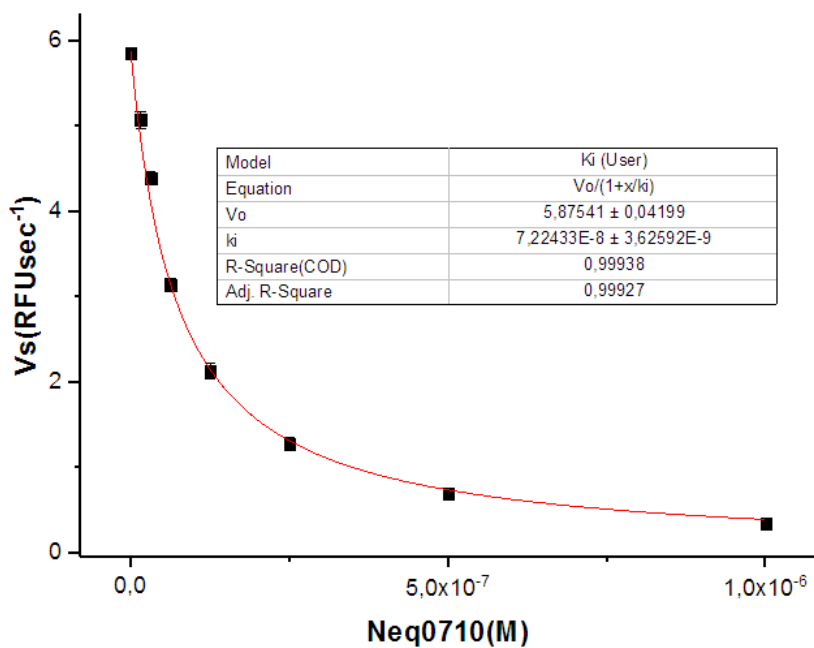
Onde, $[S]$ = concentração do substrato e K_m = constante de Michaelis-Menten.

Uma medida controle foi feita em todos os ensaios enzimáticos utilizando o inibidor reversível de rápida ligação Neq0570. Todos os inibidores foram analisados para sete concentrações diferentes, as quais já haviam sido pré-determinadas baseados em uma análise prévia (percentagem de inibição de 30 a 70%) a uma concentração de substrato de 2,5 μM ($\sim K_m$).¹⁹ Todas os ensaios foram realizados em triplicata.

Um exemplo do resultado do ensaio cinético-enzimático pode ser visto no gráfico de ajuste não-linear na Figura 13 abaixo, através do exemplo do ensaio cinético-enzimático do composto Neq0710, no qual é possível observar o monitoramento da hidrólise catalisada da cruzaina humana com o substrato Z-FR-AMC na presença de concentrações crescentes do composto Neq0710 (sete concentrações, sendo a inicial de 10 μM , com diluição em série de 0,5). A reação (condições de pH 5.5, 300 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% v/v DMSO, 0.01 % v/v Triton X-100 e 0.15 nM Cruzaina) iniciou-se com a adição do substrato (1,7 μM) após a incubação do inibidor com a enzima por 2 minutos. Primeiramente foi medida a excitação a 360 nm e então a emissão de fluorescência a 440 nm. A unidade de Fluorescência (FU) foi corrigida quanto à fluorescência de fundo. E foi construído o gráfico da taxa da hidrólise do substrato Z-FR-AMC

versus a concentração do composto de interação covalente com a enzima Neq 0710 (não autorizada a publicar a estrutura), obtendo-se uma constante de inibição aparente (através de regressão não linear) de $K_i' = 72,2 \pm 3,6$ nM.

Figura 13: Ajuste não-linear da curva de inibição da cruzaina com o Neq0710, que apresenta comportamento de inibidor de rápida ligação.

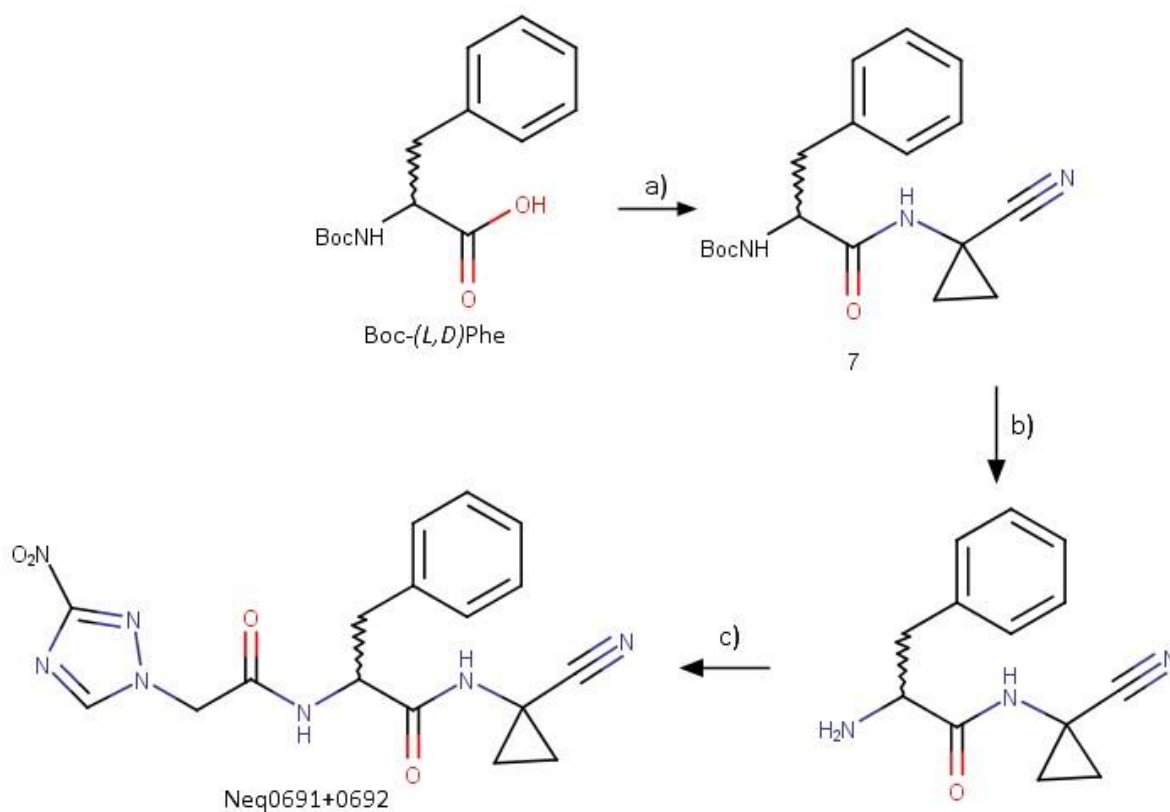


FONTE: Ms. Lorenzo Cianni (doutorando do grupo Nequimed).

4. Resultados e discussões

A primeira síntese dos compostos Neq0691 e 0692 seguiu a rota sintética mostrado na Figura 14 abaixo, utilizando como reagente de partida o aminoácido racêmico fenilalanina com seu grupo amino protegido.

Figura 14: Rota sintética para os compostos Neq0691 e 0692. (a) PyBOP, TEA, DCM, à 0°C por 30 min -> hidrocloreto de ciclopropilamino nitrila, RT, Ar atm, 16h. (b) TFA 10% em DCM, RT, 4h. (c) EDC, ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético, DCM, Ar atm, 24h.



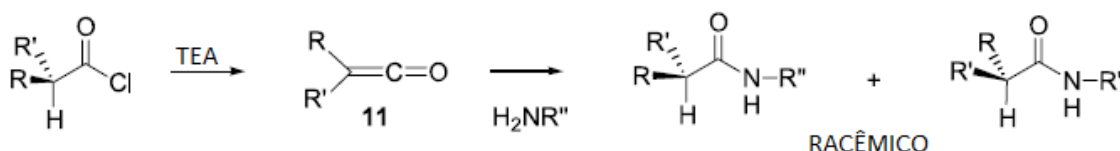
FONTE: Autoria própria.

A primeira etapa da síntese consiste no acoplamento do grupo ciclopropilamino nitrila pela formação de uma ligação amida, utilizando como reagente de acoplamento PyBOP, em um meio basicado por TEA.

Os reagentes de acoplamento foram criados para superar desafios na síntese de amidas, tais como rendimentos baixos, racemização, reduzir quantidade de subprodutos, etc.

Os reagentes mais clássicos são os cloretos de acilas, anidridos mistos, anidridos carbônicos ou ésteres ativos, os quais agem através de mecanismos que podem levar a racemização indesejada. Por exemplo, dentre os efeitos indesejáveis do reagente de cloretos de acila estão a quebra do grupo de proteção no *N-terminal* do peptídeo e racemização. Tal processo de racemização pode ocorrer em cloretos de acila que possuem hidrogênio α em meio básico (TEA), pela formação de um ceteno, que posteriormente reage com um nucleófilo como uma amina, ocorrendo a perda de quiralidade do carbono quiral do aminoácido de partida (Figura 15). Tentando erradicar ou pelo menos amenizar o problema de racemização reagentes de acoplamento como HOBt são usados como aditivos para suprimir a racemização. Esse reagente é um álcool que forma um éster aromático ativo que aumenta a eletrofilicidade da carbonila, sendo assim mais susceptível ao ataque da amina.²¹

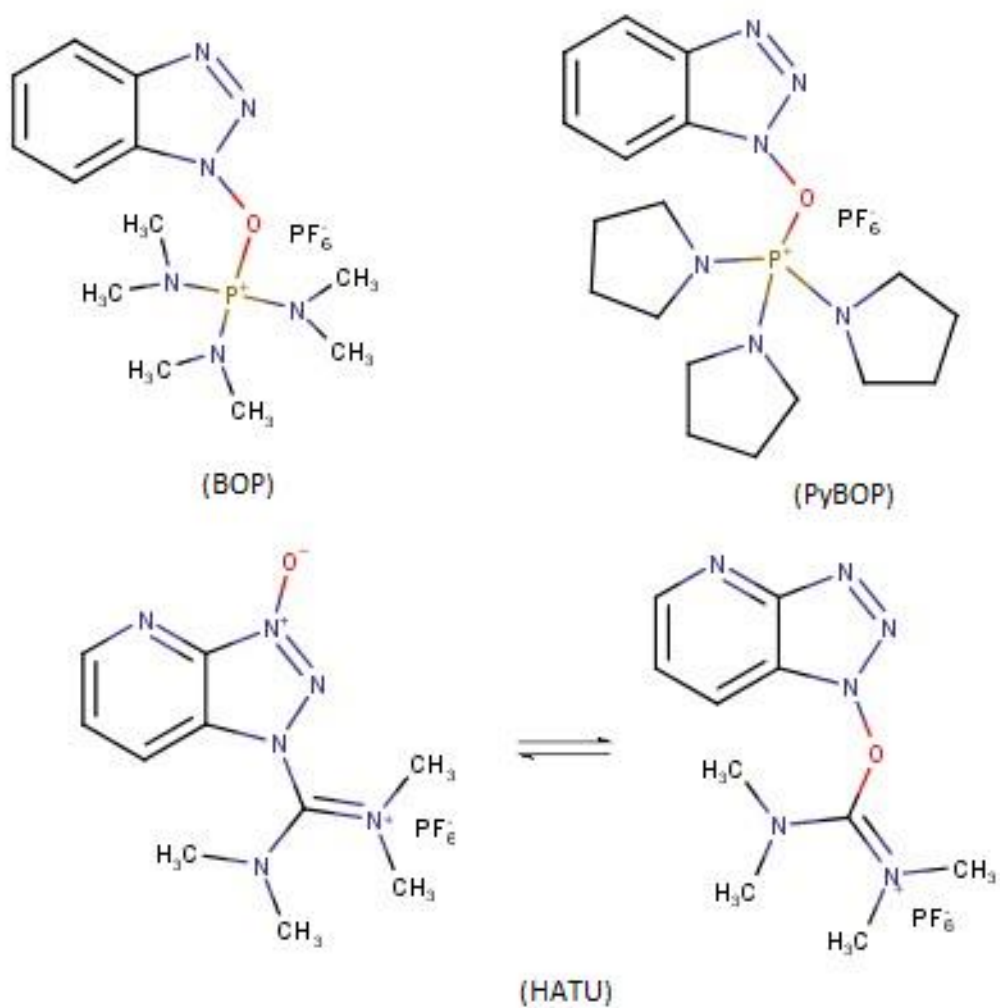
Figura 15: Racemização com reagente de acoplamento cloreto de acila.



FONTE: Montalbetti, C. A. G. N; Falque, V. 2005.

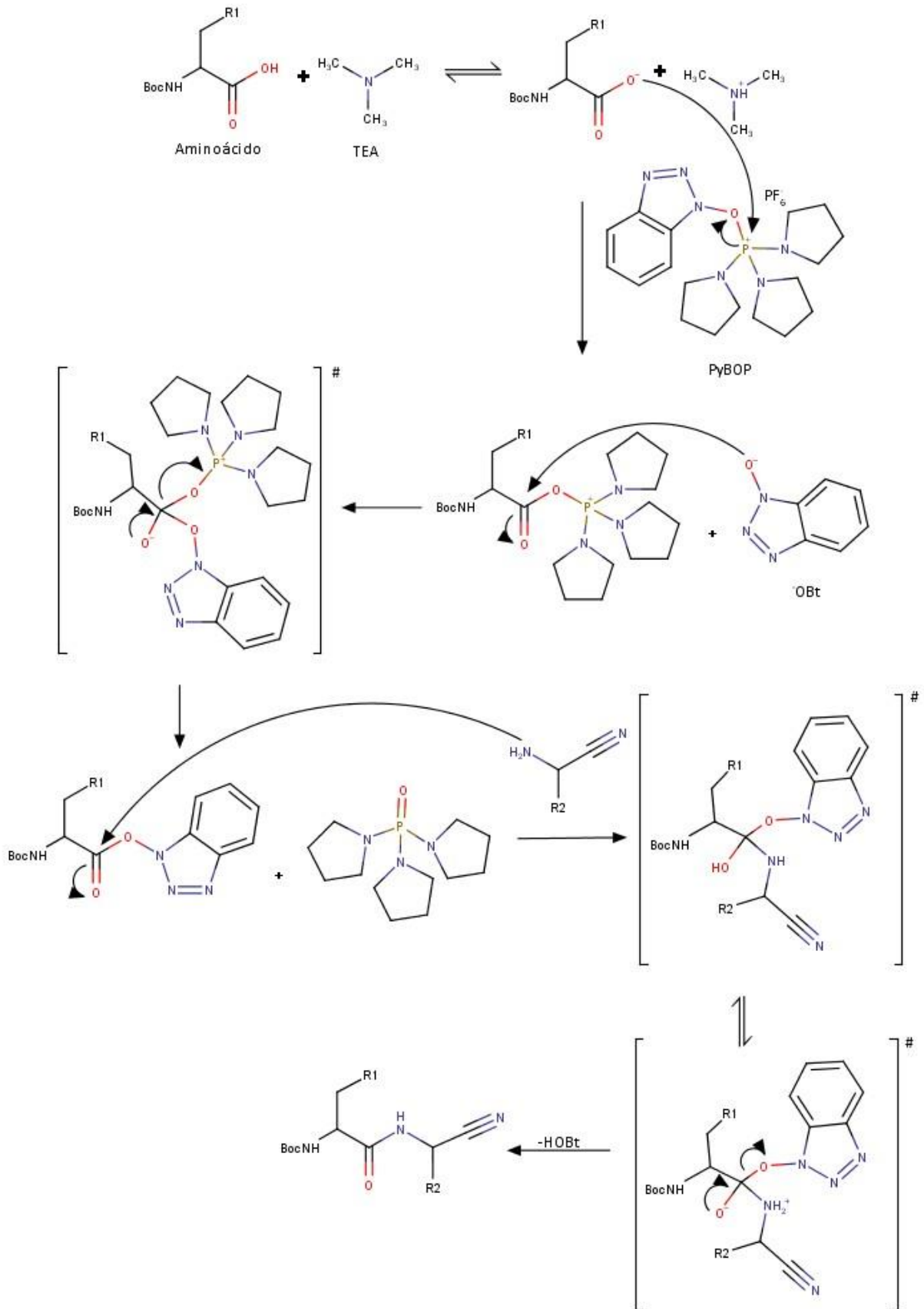
Alguns reagentes de acoplamento já trazem em sua composição o supressor HOBt, tais como os sais de fosfônio (BOP e PyBOP) e urônio (HATU), os quais podem ser vistos na Figura 16 abaixo. O composto PyBOP foi desenvolvido como substituinte do BOP, por produzir menos subproduto tóxico. O mecanismo proposto de acoplamento utilizando PyBOP (mesmo para BOP) ocorre com o ácido desprotonado pela base TEA reage com PyBOP, produzindo uma espécie acil-fosfônio ativa e HOBt, o qual reage rapidamente com o ácido ativado produzindo o éster ativo de Bt, o qual sofre ataque nucleofílico da amina.²¹ O esquema do mecanismo proposto pode ser visto na Figura 17.

Figura 16: Estruturas dos reagentes de acoplamento BOP, PyBOP e HATU.



FONTE: Autoria própria.

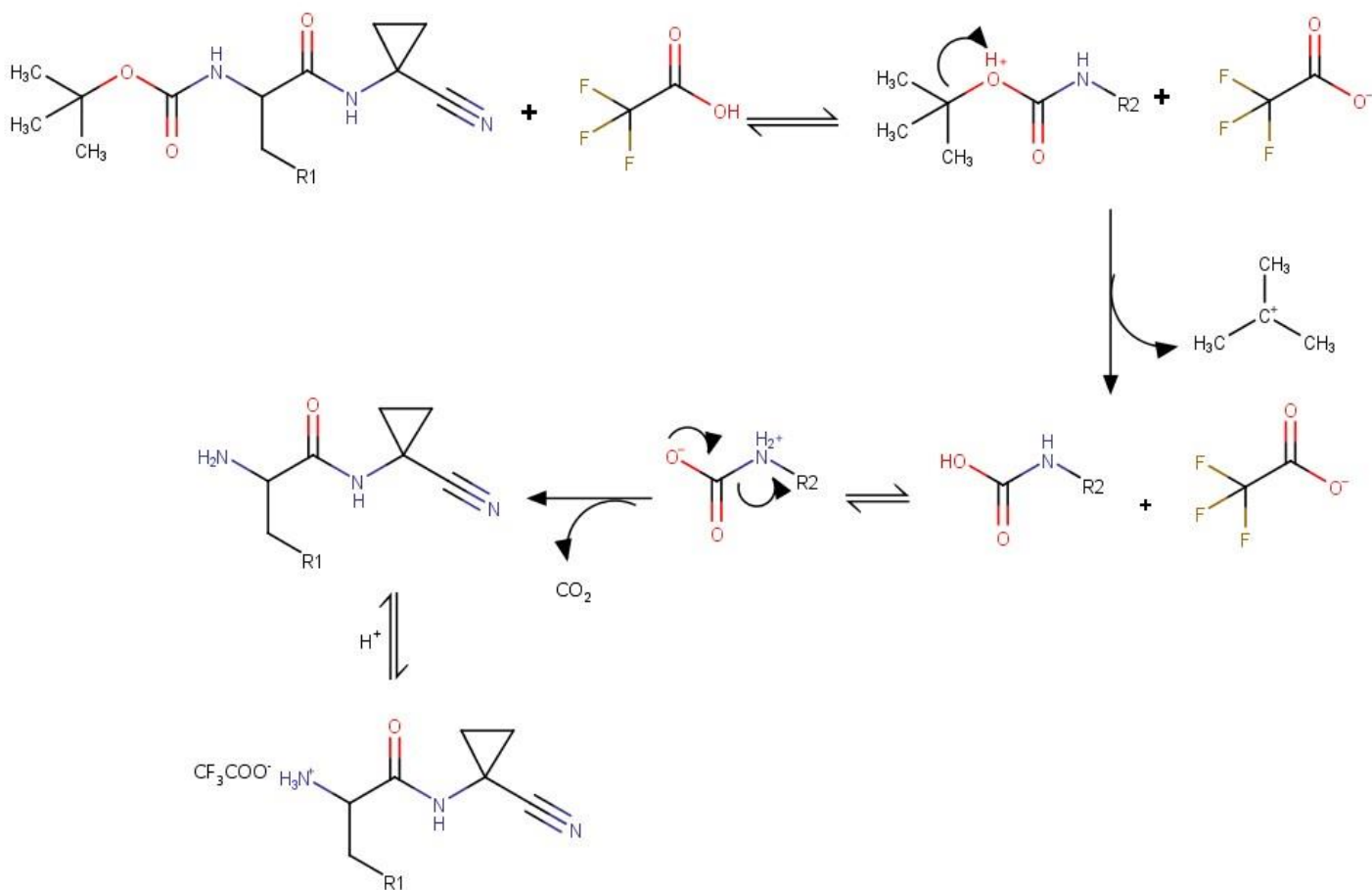
Figura 17: Mecanismo proposto de reação utilizando reagente de acoplamento PyBOP.



FONTE: Autoria própria.

A segunda etapa da síntese consiste da remoção do grupo de proteção Boc, utilizando o ácido TFA 10% e o mecanismo dessa reação pode ser visto na Figura 18 abaixo. É possível observar a formação de um *tert*-butil carbocátion como subproduto durante a reação de desproteção. Tal carbocátion é desprotonado pela base conjugada do TFA presente no meio, formando o radical de *tert*-butil que sobre rearranjo do elétron livre, formando o 2-metilpropene.

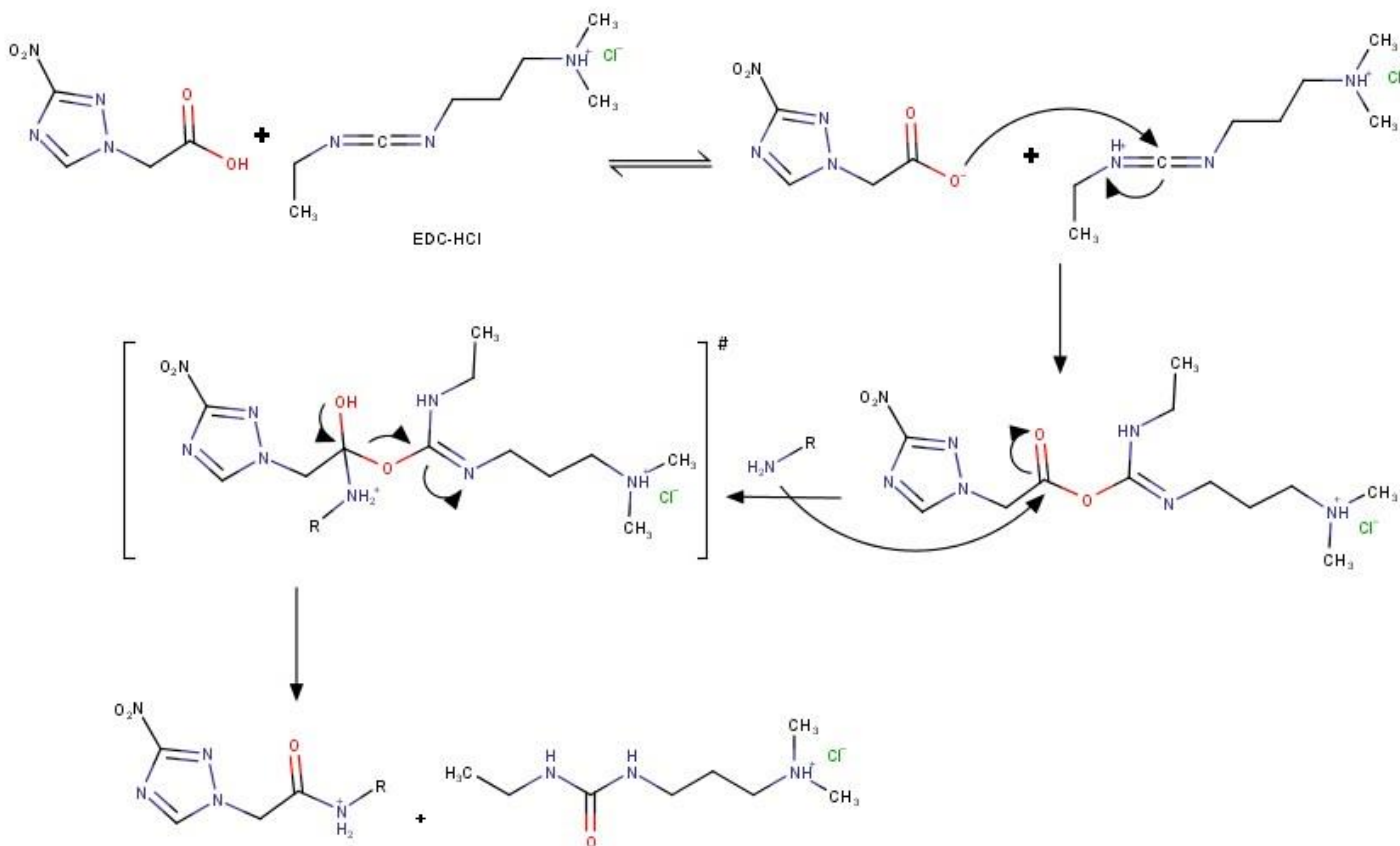
Figura 18: Mecanismo proposto de remoção do grupo protetor Boc utilizando TFA.



FONTE: Autoria própria.

Por fim, a última etapa da síntese consiste no acoplamento do ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético ao intermediário de amina livre. O agente de acoplamento utilizado nessa etapa dessa síntese foi o N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC·HCL) e o mecanismo proposto de reação pode ser visto na Figura 19 abaixo.

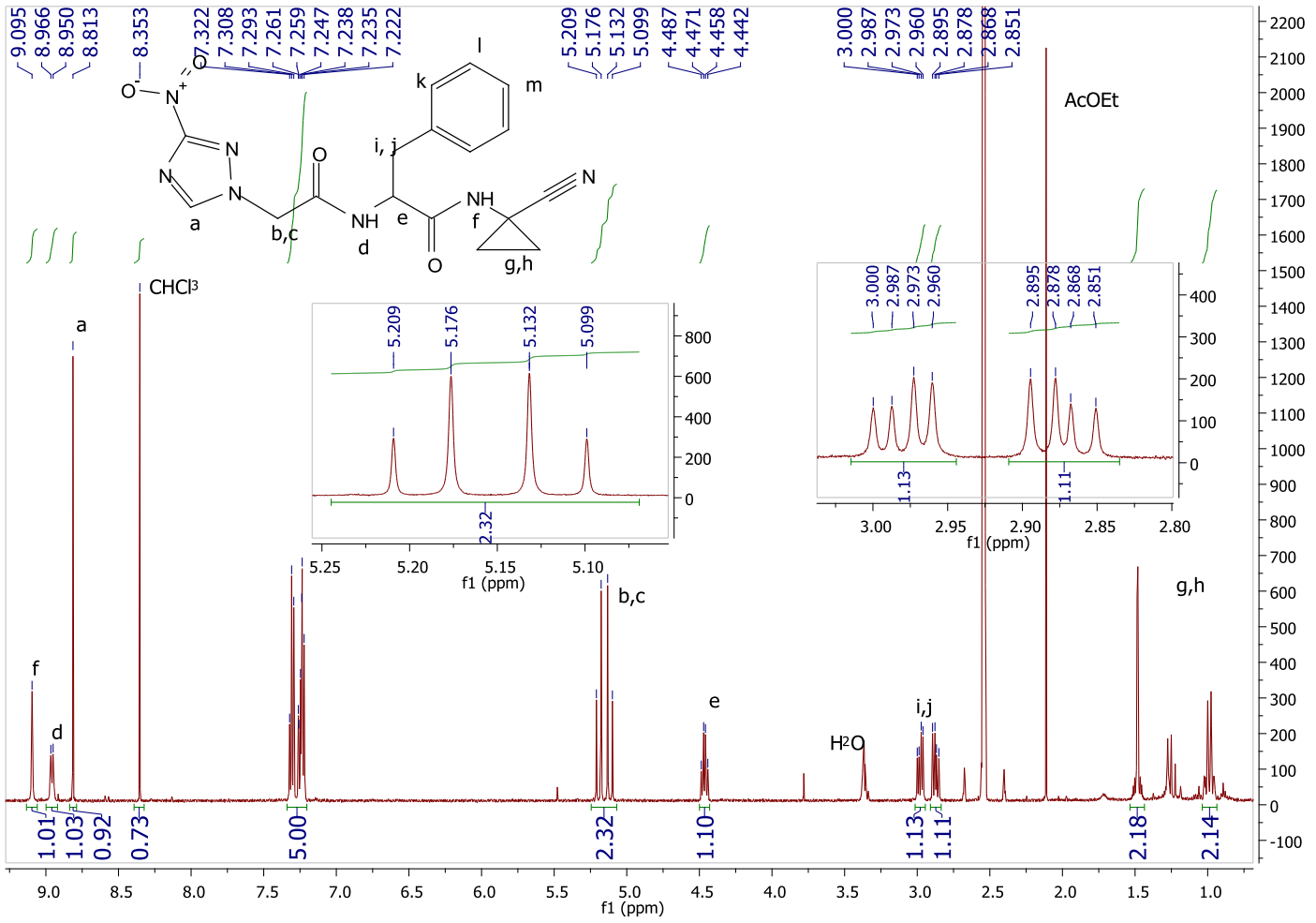
Figura 19: Mecanismo proposto de reação utilizando reagente de acoplamento EDC-HCl.



FONTE: Autoria própria.

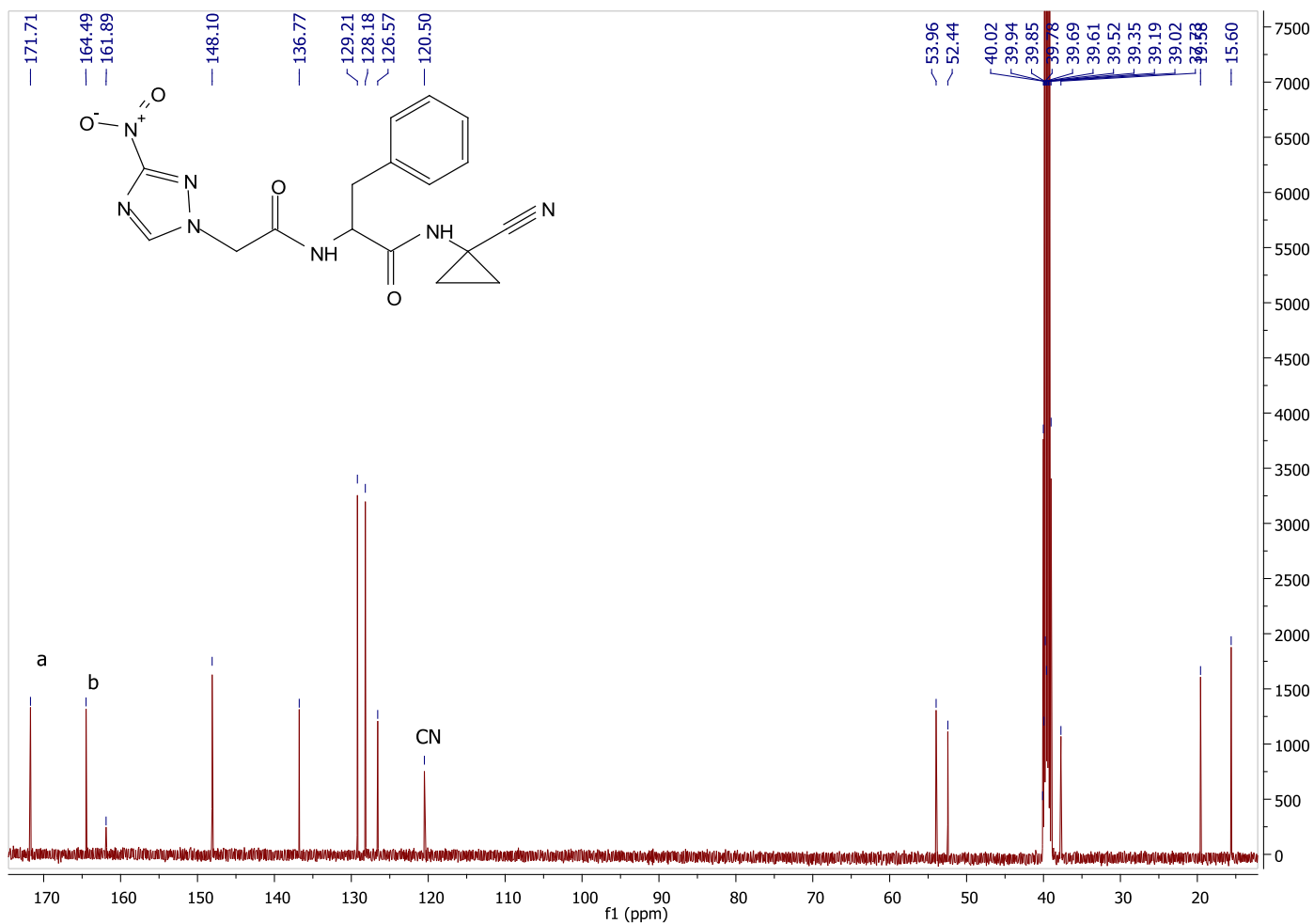
Ao final da síntese, após purificação, foi realizada a caracterização do produto obtido pelas análises de RMN de ¹H e ¹³C e ESI-MS (Figuras 20, 21 e 23) sendo possível confirmar que o composto sintetizado possuía a estrutura desejada. No espectro de RMN de ¹H, foi possível observar o dubleto em 8,96 ppm característico do hidrogênio da amida nomeada “d”, um multiplete na região entre 7,32 a 7,22 ppm característico do fragmento fenilalanina, dois dubletos com *efeito teto* em 5,19 e 5,12 ppm, com $J_{\text{geminal}} = 16,5$ Hz, característico dos hidrogênios geminais nomeados “b,c”, multiplete em 4,46 ppm característico do hidrogênio ligado ao carbono quiral, dois duplo dubletos em 2,98 e 2,87 ppm, com $J_{\text{geminal}} = 13,5$ Hz, característico dos hidrogênios geminais nomeados “i,j”, e dois multipletos em 1,48 e 0,99 ppm referentes aos hidrogênios do fragmento ciclopropil. Enquanto que no espectro de RMN de ¹³C desacoplado, é possível observar o pico em 120 ppm referente ao carbono da nitrila.

Figura 20: RMN de ^1H dos compostos Neq 0691+0692 (DMSO- d_6 , 500 MHz).



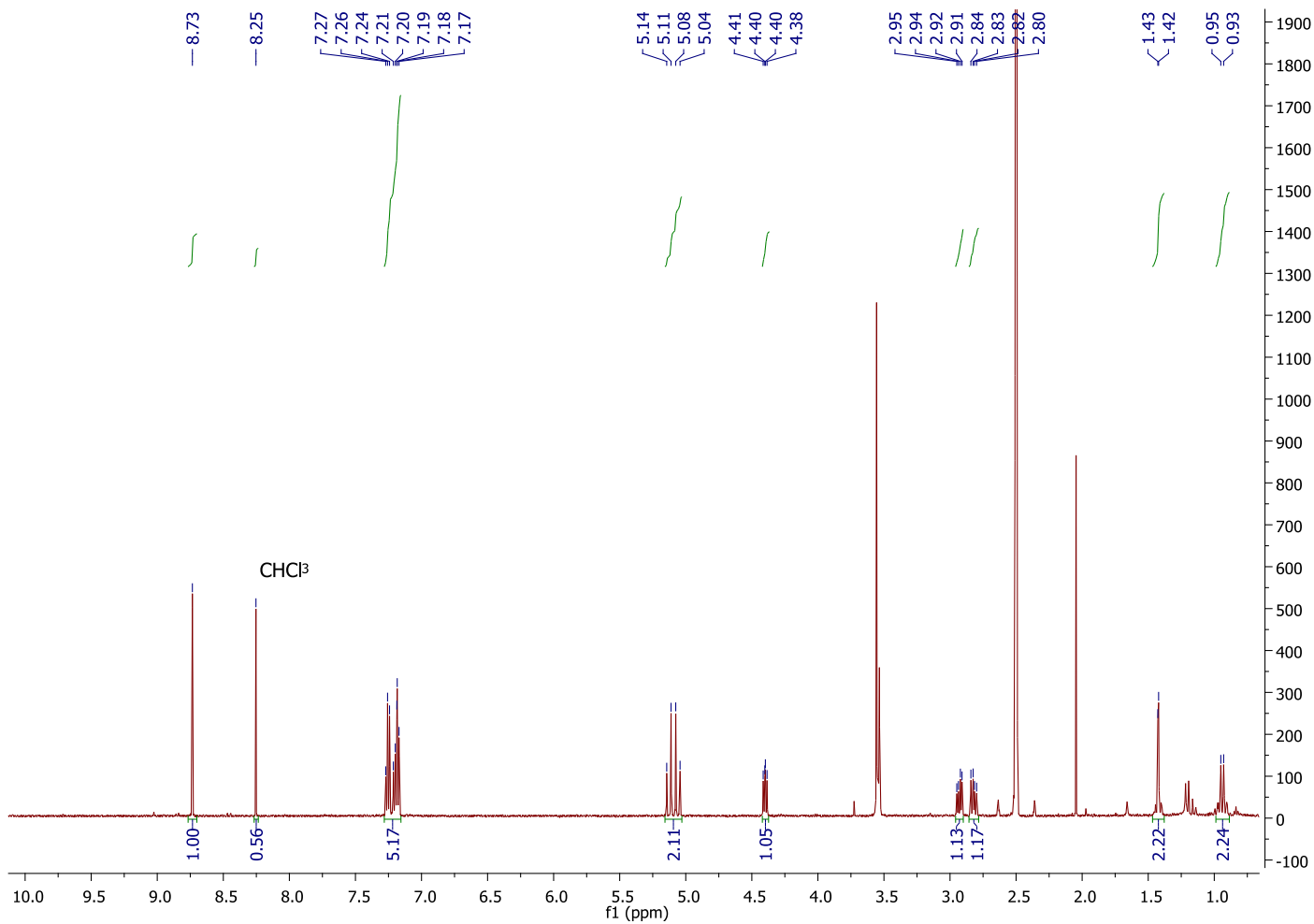
FONTE: Autoria própria.

Figura 21: RMN de ^{13}C desacoplado dos compostos Neq0691+0692 (DMSO- d_6 , 125 MHz).



FONTE: Autoria própria.

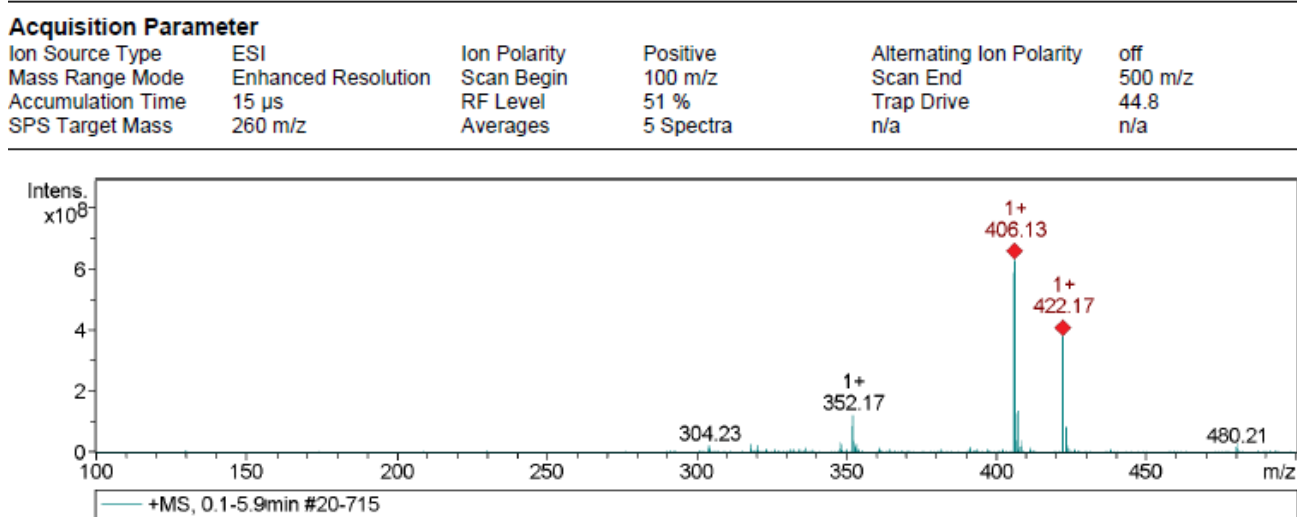
Figura 22: RMN de ^1H dos compostos Neq0691+0692 com troca deuterada.



FONTE: Autoria própria.

Através da análise de RMN de ^1H com troca deuterada (Figura 22), foi possível confirmar que o hidrogênio da amida nomeada como “f” é responsável pelo singlete em 9,095 ppm, enquanto que o hidrogênio do nitro-triazol nomeado como “a” é responsável pelo singlete em 8,813 ppm.

Figura 23: Espectro de massas dos compostos Neq0691+0692 obtido por ESI-MS.

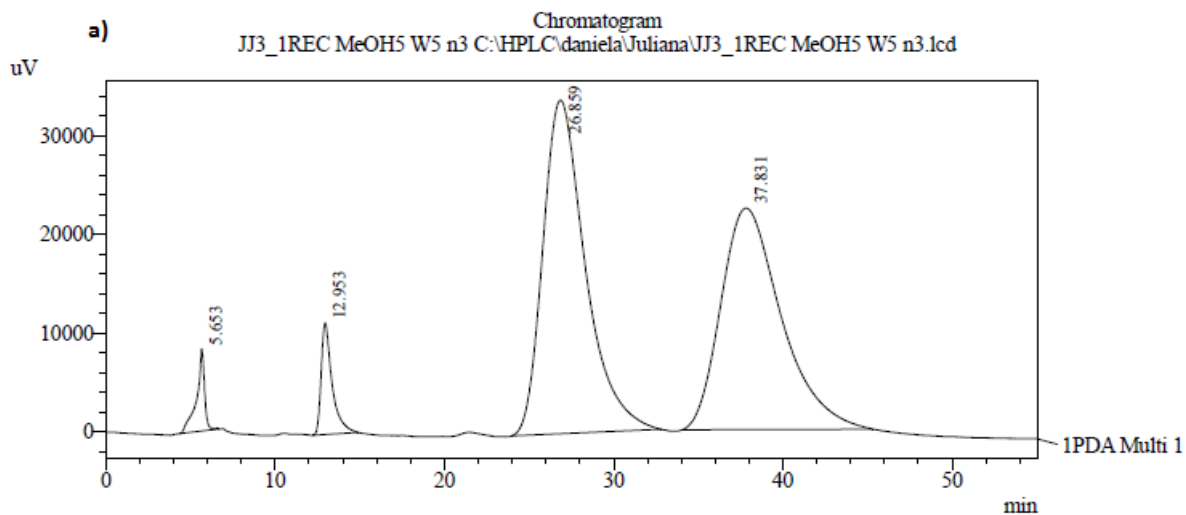


FONTE: Autoria própria.

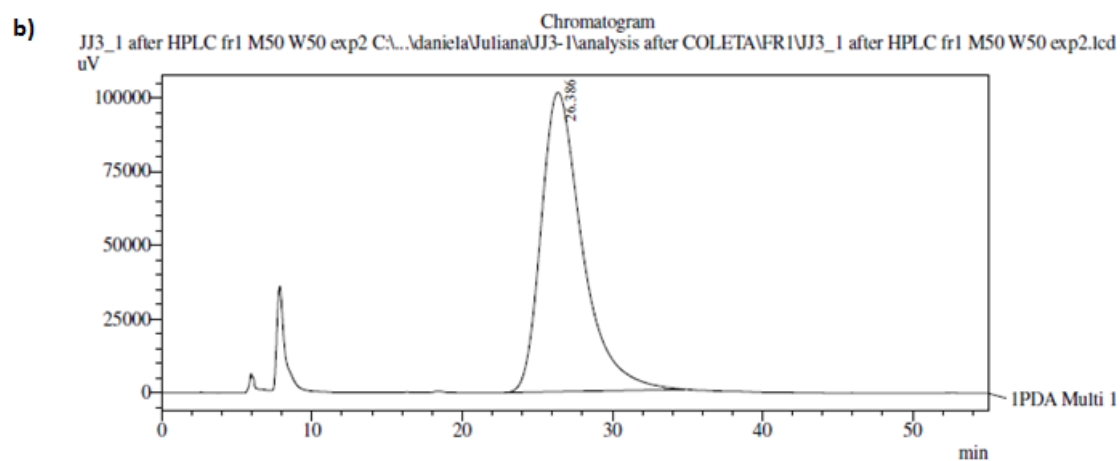
É possível observar no espectro de massas obtido por polarização positiva os picos dos íons moleculares referentes à 408,13 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e 422,17 $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z.

Foi realizada a separação dos enantiômeros por CLAE utilizando coluna quiral e fase móvel MeOH:H₂O 50:50, obtendo-se as frações 1 e 2 (FR1 e FR2) enantiomericamente puras, indicadas nos cromatogramas na Figura 24 abaixo.

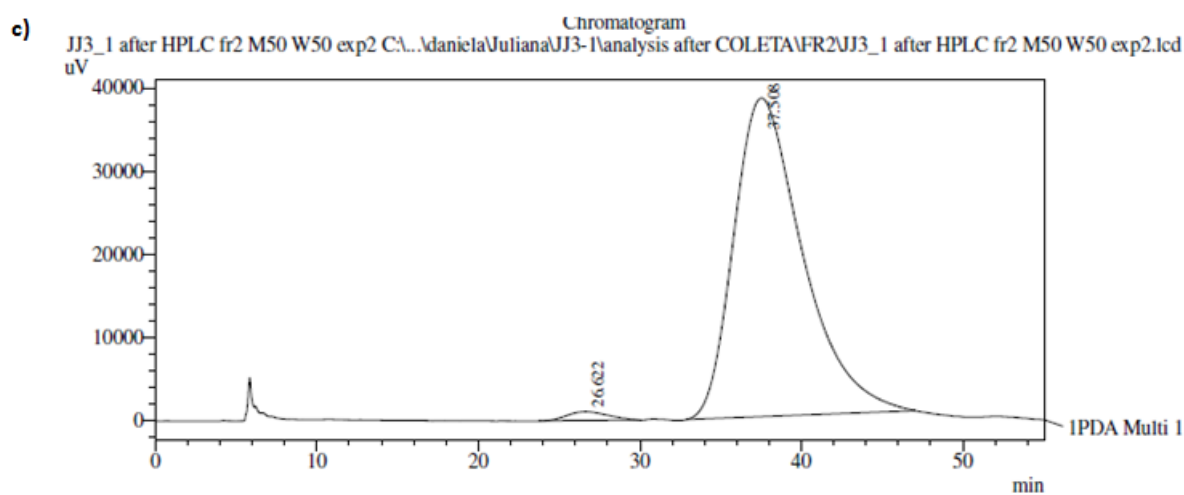
Figura 24: Cromatogramas obtidos por CLAE dos compostos: a) Neq0691+0692, rt (min) = 26,86 e 37,83; b) FR1, rt (min) = 26,39; c) FR2, rt (min) = 37,51. Condições: Cellulose-2 Phenomenex; MeOH:H₂O 50:50; fluxo: 0.5 mL.min⁻¹; Vol. inj.: 10 µL; T = 32°C; Pureza > 95 % (254 nm).



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

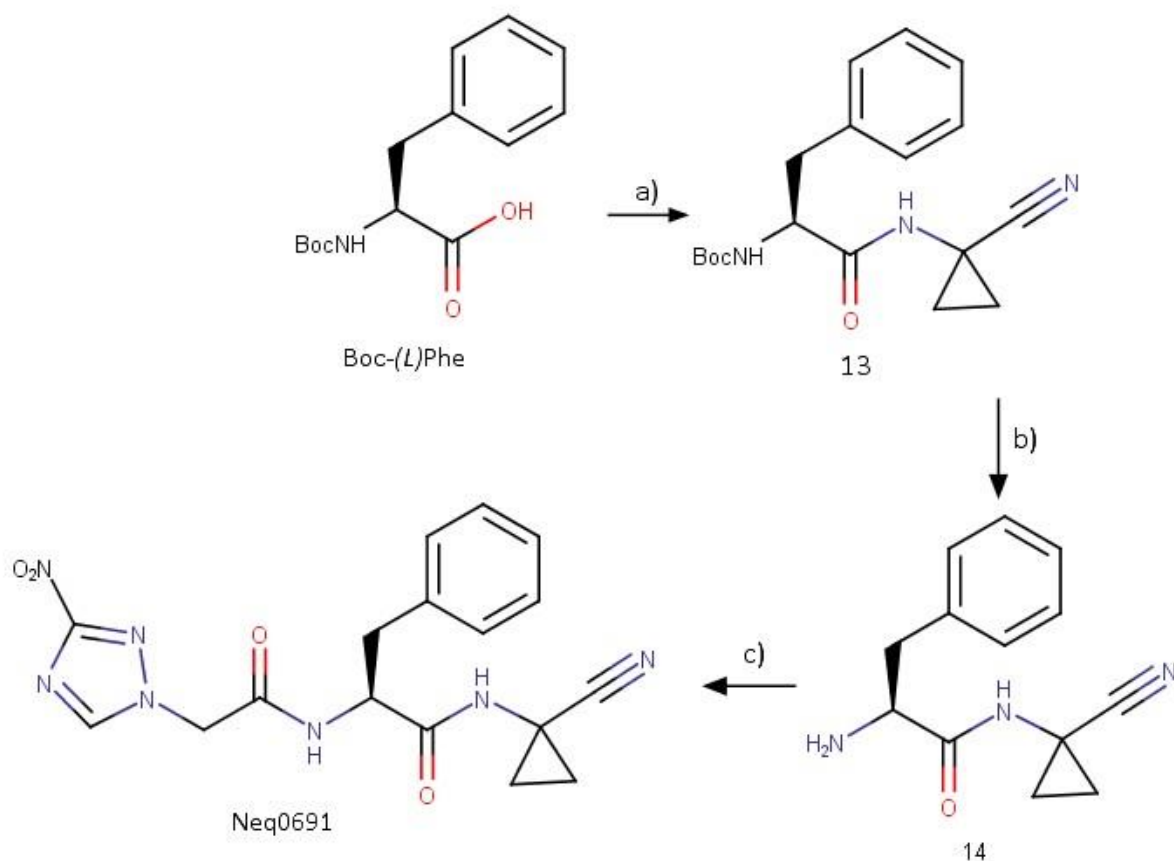


1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

FONTE: Autoria própria.

Para ser possível a identificação das frações 1 e 2, o composto Neq0691 foi sintetizado partindo do ácido enantiomericamente puro (*L*) Boc-Ph, seguindo a rota sintética da Figura 25 abaixo.

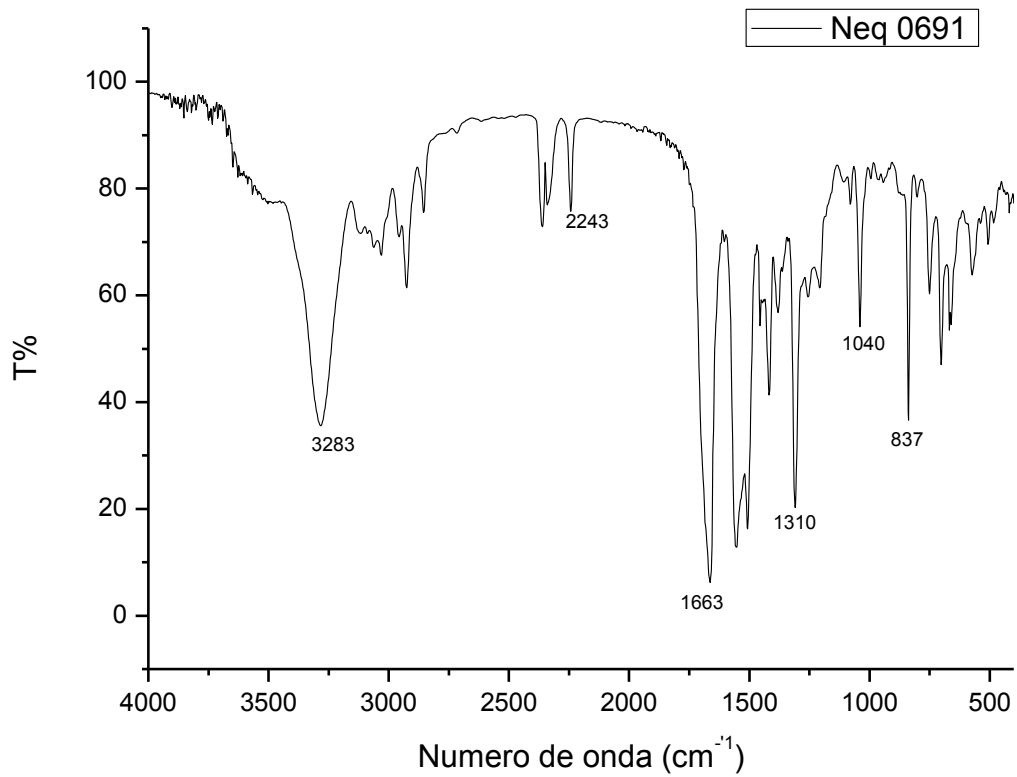
Figura 25: Rota sintética para composto Neq0691: (a) HATU, hidrocloreto ciclopropilamino nitrila, DIPEA, DMF, Ar atm, RT, 24h. (b) HCOOH, 0°C, RT, 16h. (c) ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético HATU, DIPEA, DMF, Ar atm, RT, 24h.



FONTE: Autoria própria.

A rota sintética acima produziu um composto que foi purificado e analisado através de FTIR (Figura 26), onde foram identificadas as principais bandas do espectro: N-H da amida (3283 cm^{-1}), nitrila (2243 cm^{-1}), carbonila (1663 cm^{-1}) e a região de impressão digital da molécula ($1200\text{ a }800\text{ cm}^{-1}$). A caracterização também foi possível através da análise por ESI-MS (Figura 27), onde é possível observar os picos dos íons moleculares $406,13\text{ [M+Na]}^+$ e $422,09\text{ [M+K]}^+$ m/z, comprovando então ser a estrutura do Neq0691. Através de sua análise por CLAE, utilizando coluna quiral, fase móvel MeOH:H₂O 50:50 e fluxo de injeção de $0,8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ foi possível obter os cromatogramas da Figura 28, concluindo que tal rota sintética não produziu nenhuma enantiomerização ao produto.

Figura 26: Espectro de infravermelho do composto Neq0691 obtido por FTIR.

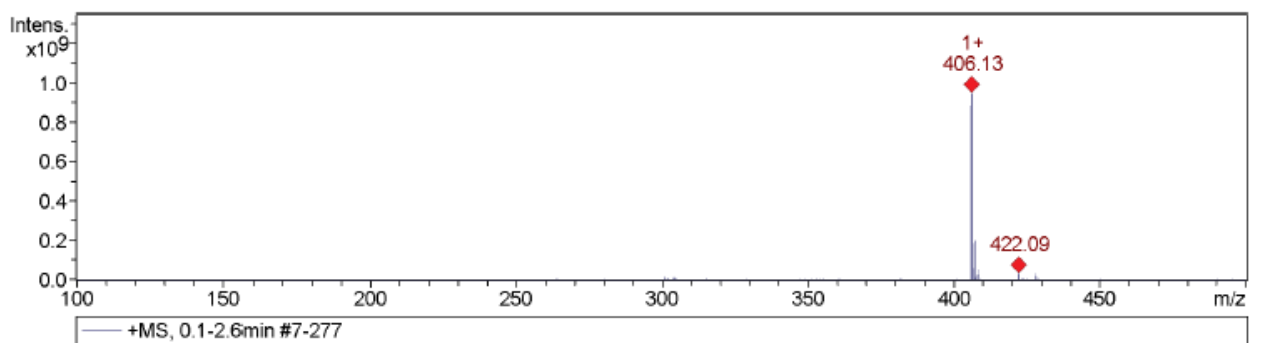


FONTE: Autoria própria.

Figura 27: Espectro de massa do composto Neq0691 obtido por ESI-MS.

Acquisition Parameter

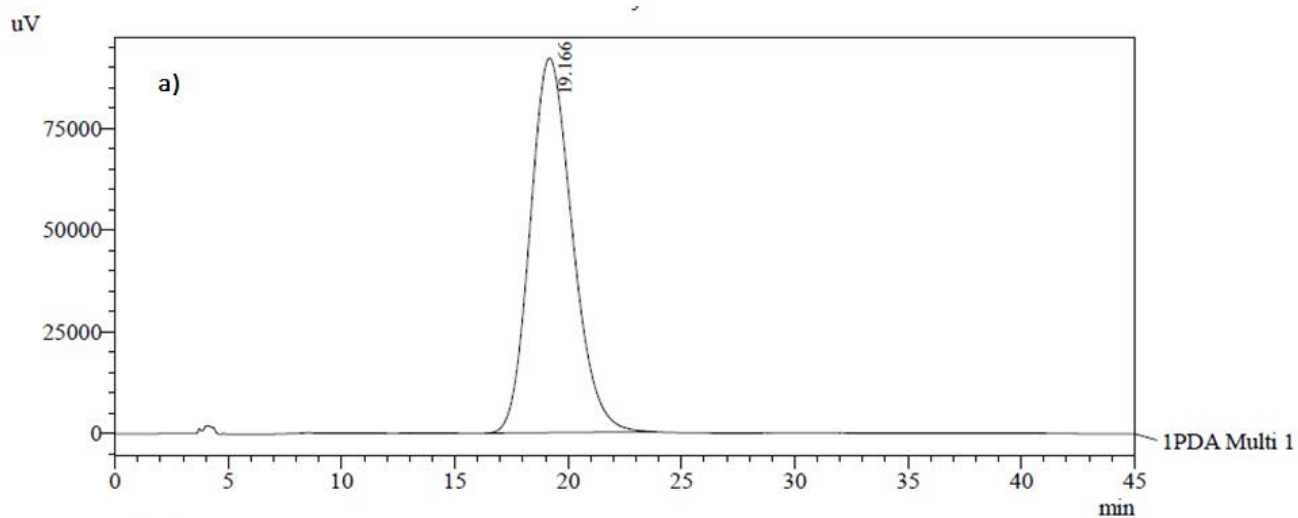
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan Begin	100 m/z	Scan End	500 m/z
Accumulation Time	14 μ s	RF Level	51 %	Trap Drive	44.8
SPS Target Mass	260 m/z	Averages	5 Spectra	n/a	n/a



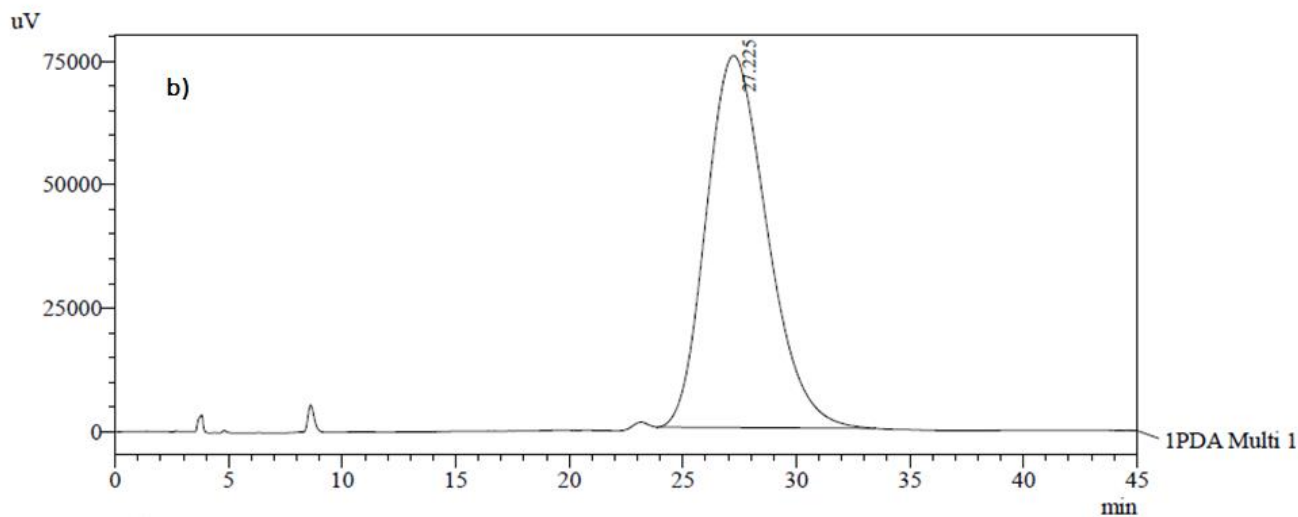
FONTE: Autoria própria.

Além disso, sabendo que o composto sintetizado foi o enantiômero (*S*), através da análise por CLAE do composto Neq0691 (obtido pela 2ª rota sintética) e das frações 1 e 2 obtidas da síntese racêmica, foi possível identificar tais frações 1 e 2 como o produto puro Neq0691 e 0692, respectivamente.

Figura 28: Cromatogramas dos compostos Neq0691 e 0692, enantiomericamente puros, após análise por CLAE com *rt* (min.) de: a) 19,166 para Neq0691 e b) 27,225 para Neq0692. Condições: Cellulose-2 Phenomenex; MeOH:H₂O 50:50; fluxo: 0,8 mL.min⁻¹; Vol. inj.: 10 µL; T = 32°C; Pureza > 99 % (254 nm).



1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

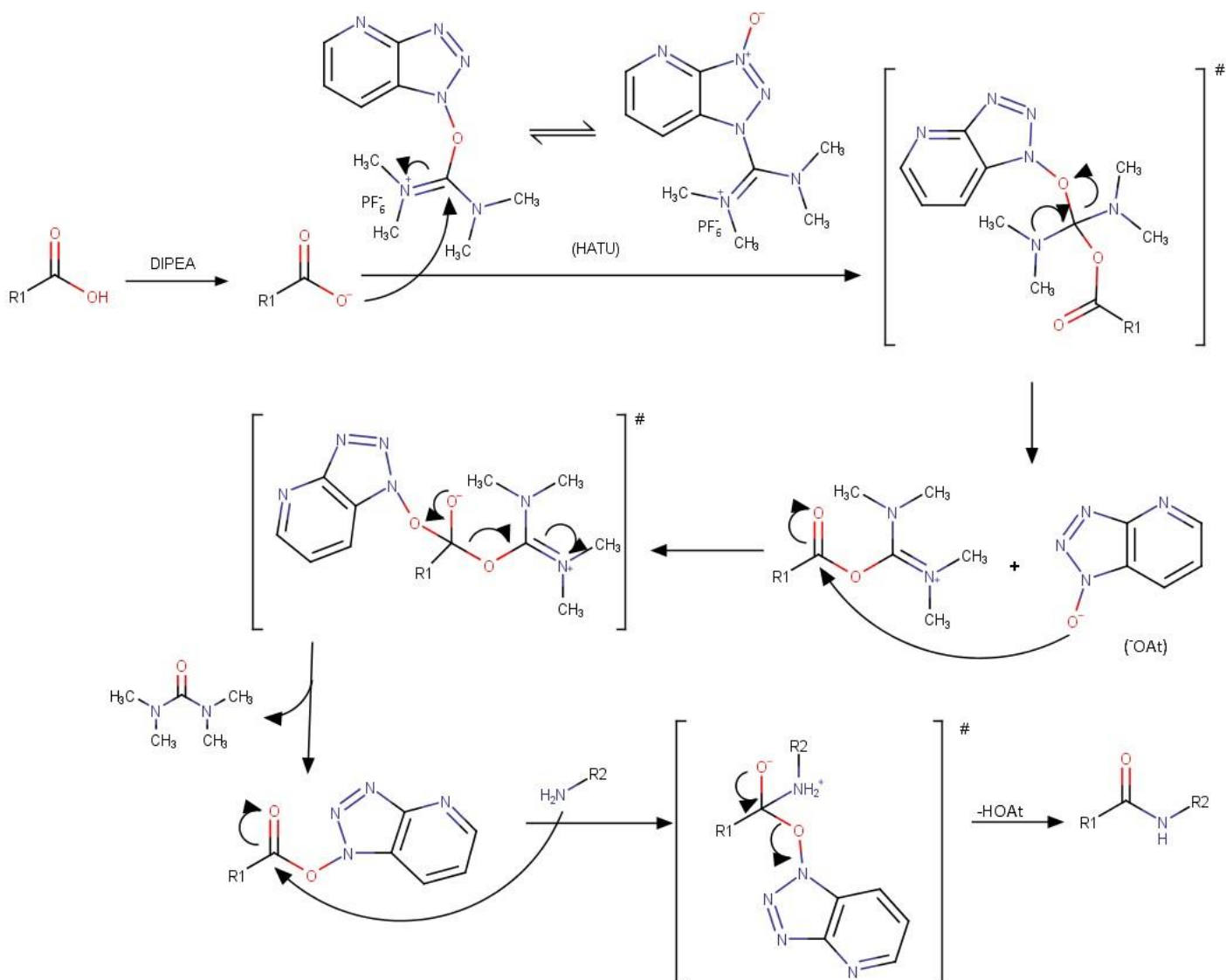


1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

FONTE: Autoria própria.

O mecanismo da reação quando se utiliza HATU como reagente de acoplamento pode ser visto na Figura 29. Neste caso, a força motriz para que a reação ocorra é a formação da ureia como subproduto, além da formação do éster 1-hidroxil-7-azabenzotriazol, o qual é muito reativo quando na presença de aminas.²¹

Figura 29: Mecanismo proposto de reação utilizando HATU como reagente de acoplamento.

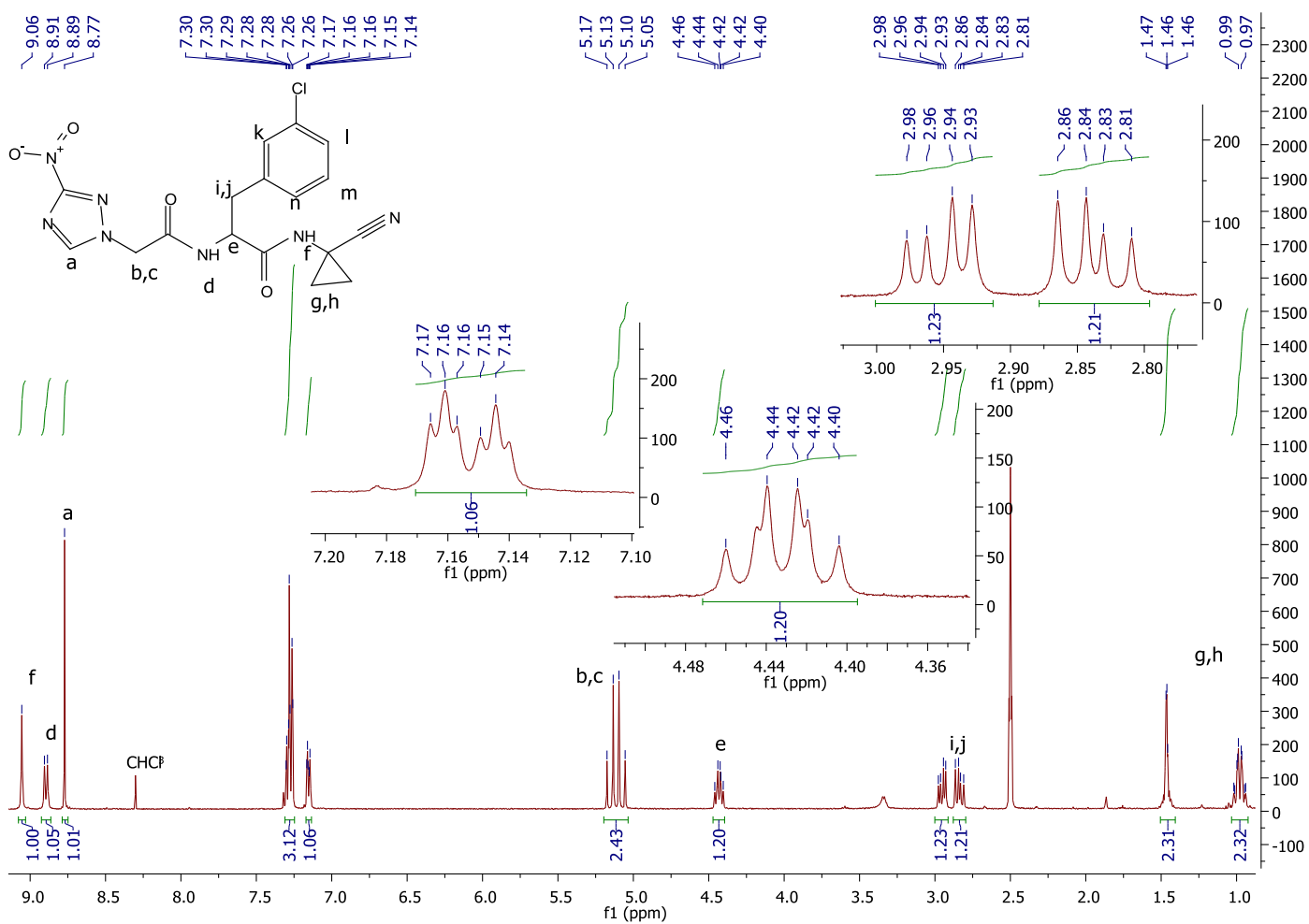


FONTE: Autoria própria.

Tal mecanismo acontece tanto na primeira etapa da síntese (acoplamento da ciclopropilamino nitrila) quanto na última etapa de acoplamento com o ácido (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético. A reação de remoção do grupo Boc com ácido fórmico dá-se de maneira análoga ao mecanismo proposto para a desproteção com ácido TFA, como mostrado anteriormente na Figura 18.

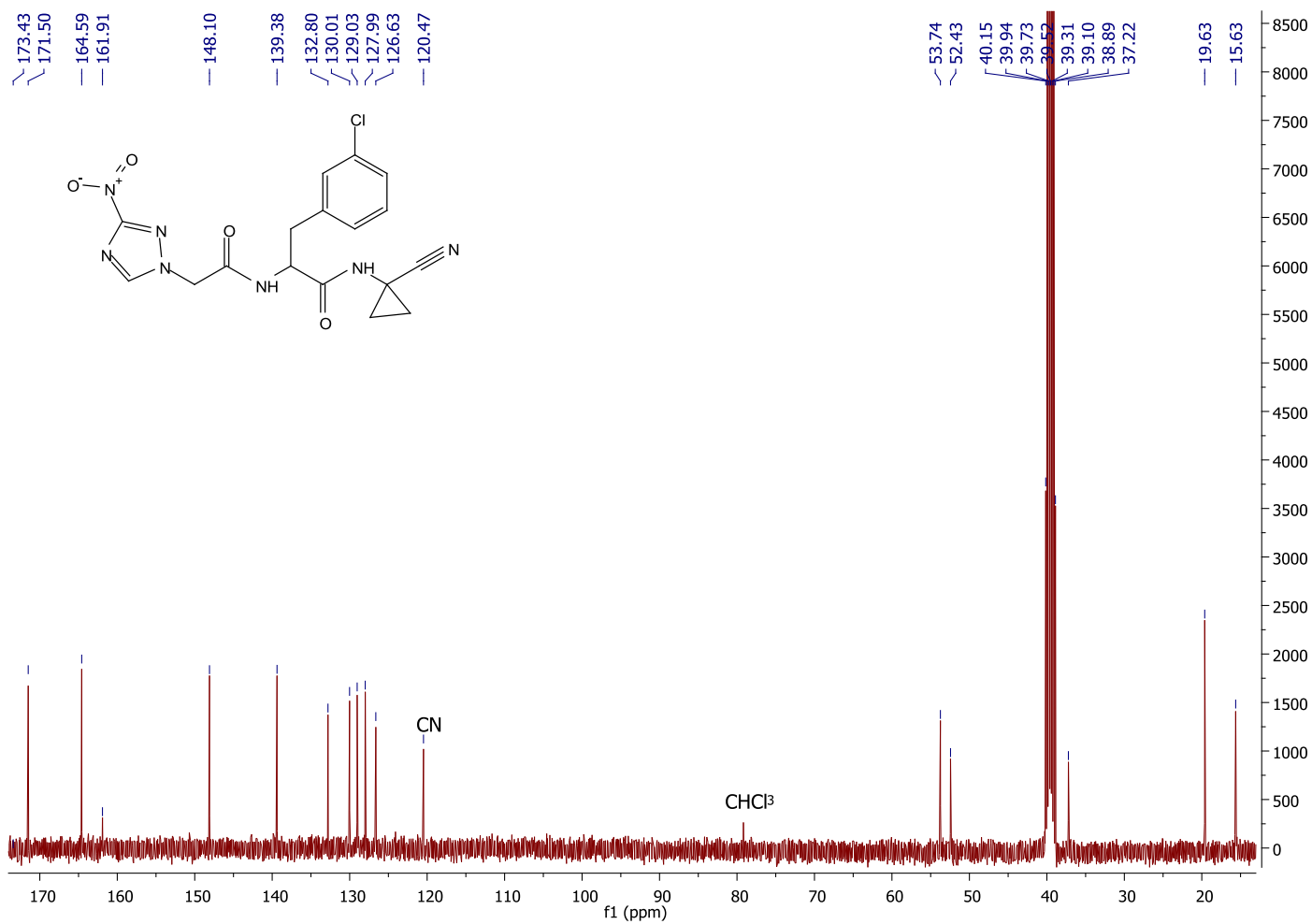
Para a síntese dos compostos Neq0752 e 0753 foi seguida uma rota sintética análoga à síntese do Neq0692 (Figura 25), utilizando como aminoácidos de partida o (*D*) Boc – Cl- Ph e (*L*) Boc – Cl – Ph, respectivamente. O composto Neq0753 foi analisado por RMN ^1H , ^{13}C e ESI-MS (Figuras 30, 31 e 32, respectivamente) para sua caracterização estrutural. No espectro de RMN de ^1H é possível observar os picos característicos dos hidrogênios diastereostópicos “b,c” (com J_{geminal} de 20,5 Hz) e os hidrogênios geminais “i,j” ((com J_{geminal} de 17,0 Hz), hidrogênio das amidas, do nitro-triazol, do fragmento *meta*-Cl-Ph e do hidrogênio ligado ao carbono quiral. No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar o pico característico do carbono da nitrila em 120 ppm. E no espectro de massas, é possível identificar os picos dos íons moleculares para as polarizações positiva e negativa: 418,12 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e 416,14 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z, além de ser possível identificar o padrão isotópico de um cloro em 420,11 m/z, característico do fragmento *meta*-Cl-Ph.

Figura 30: Espectro de RMN de ^1H do composto Neq0753 (DMSO- d_6 , 500 MHz).



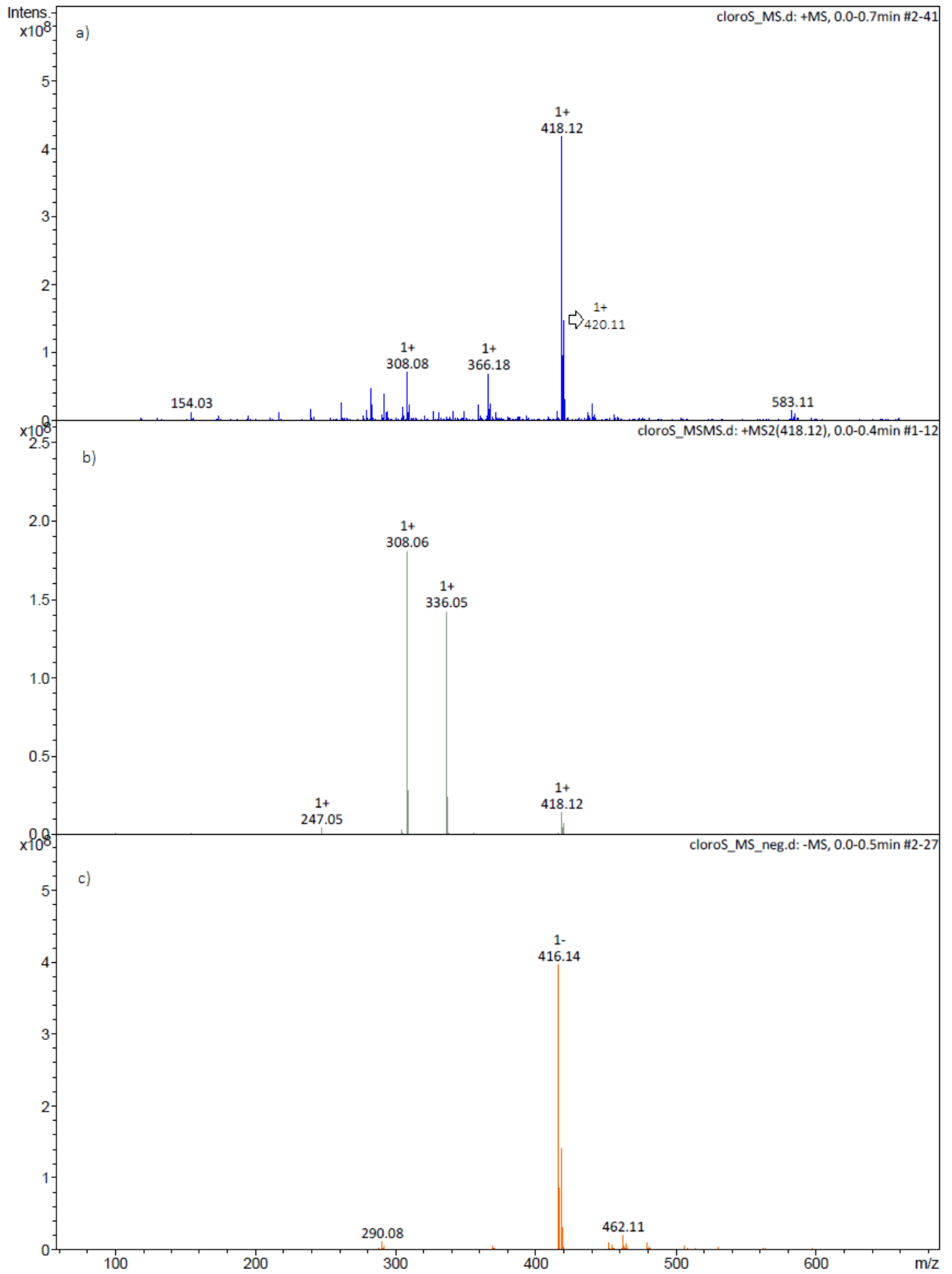
FONTE: Autoria própria.

Figura 31: Espectro de RMN de ^{13}C do composto Neq0753 (DMSO-d₆, 125 MHz).



FONTE: Aatoria própria.

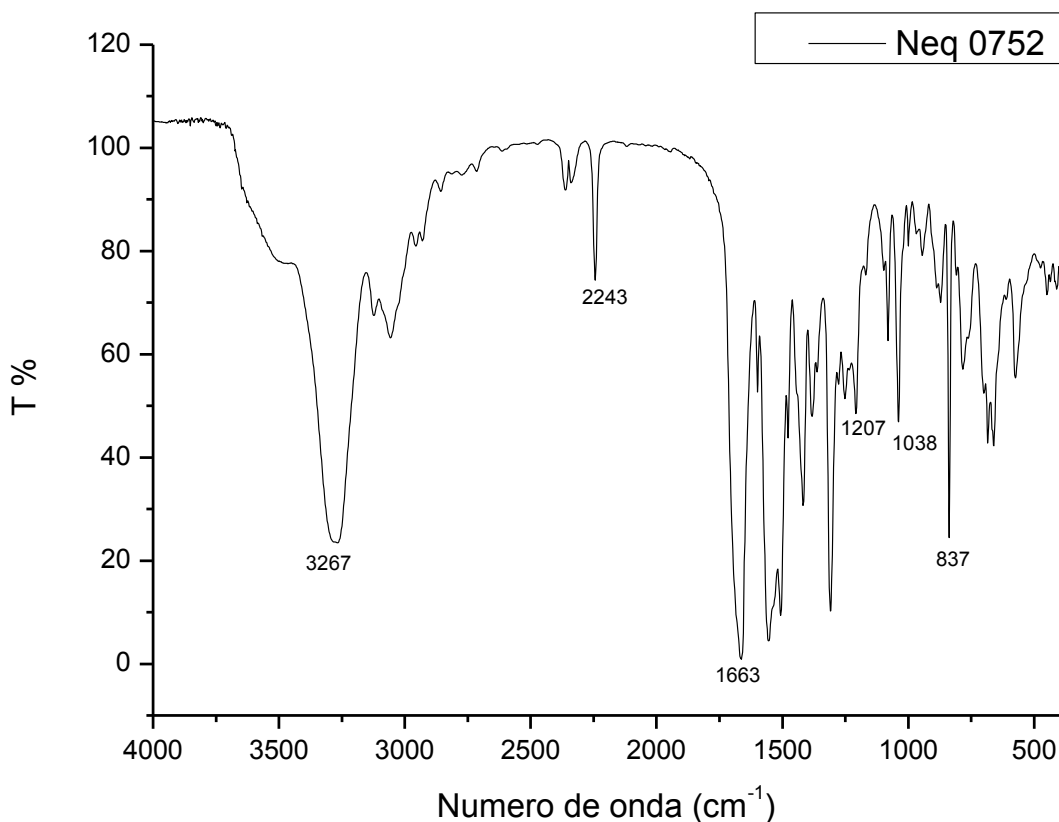
Figura 32: Espectros de massas do composto Neq0753: a) +MS; b) +MS2 c) -MS.



FONTE: Autoria própria.

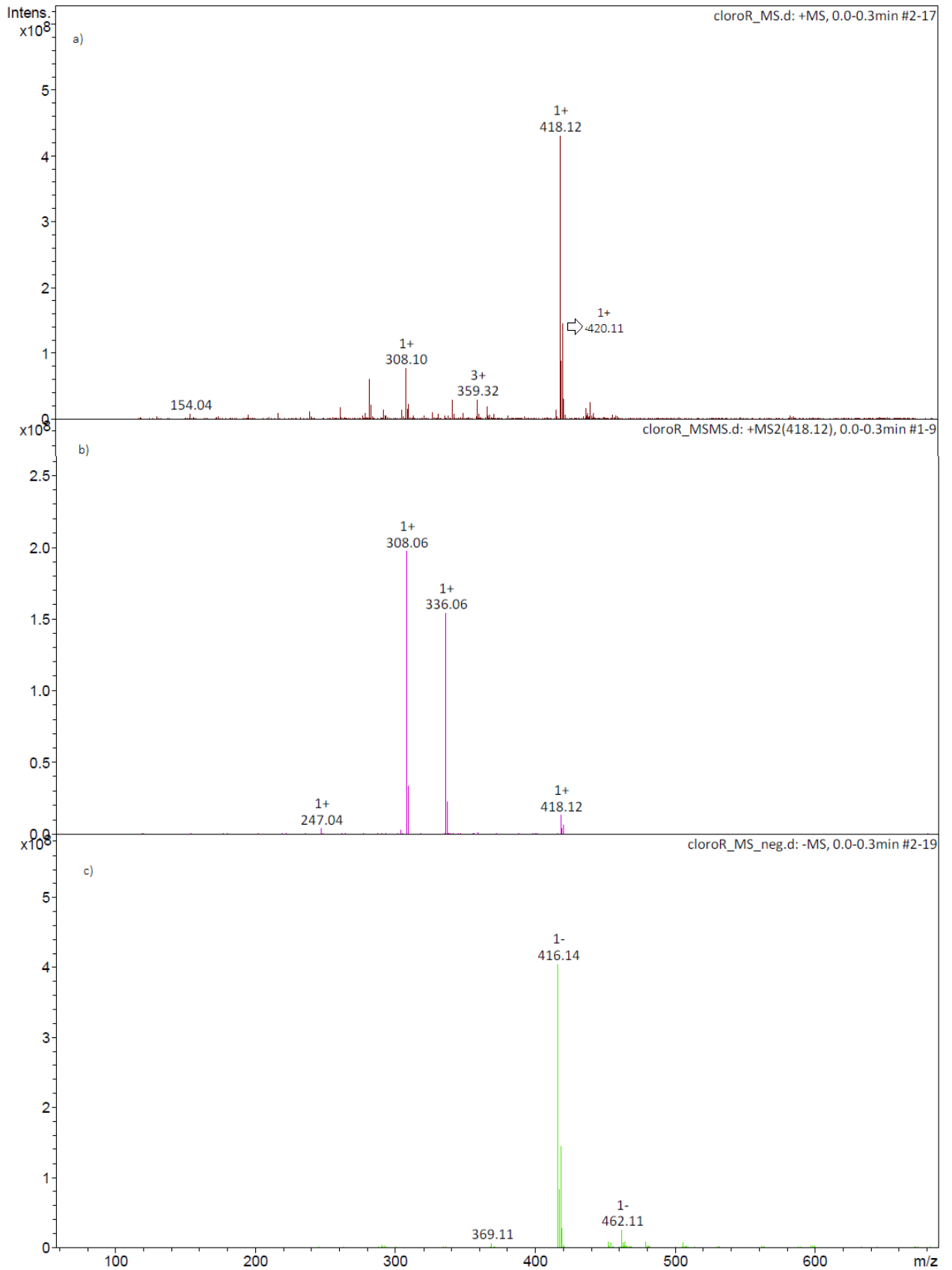
O composto Neq0752 foi analisado apenas em FTIR e ESI-MS (Figura 33 e 34, respectivamente) para sua caracterização, podendo ser identificadas as bandas mais importantes no espectro de infravermelho: N-H da amida (3267 cm^{-1}), nitrila (2243 cm^{-1}), carbonila (1663 cm^{-1}) e a região de impressão digital da molécula ($1200\text{ a }800\text{ cm}^{-1}$). No espectro de massas podem ser identificados os picos dos íons moleculares $418,12\text{ [M+H]}^+$, $416,14\text{ [M-H]}^-$ m/z e o padrão isotópico de um cloro referente ao pico $420,11\text{ m/z}$ utilizando polarização positiva.

Figura 33: Espectro de infravermelho do composto Neq0752 obtido por FTIR.



FONTE: Autoria própria.

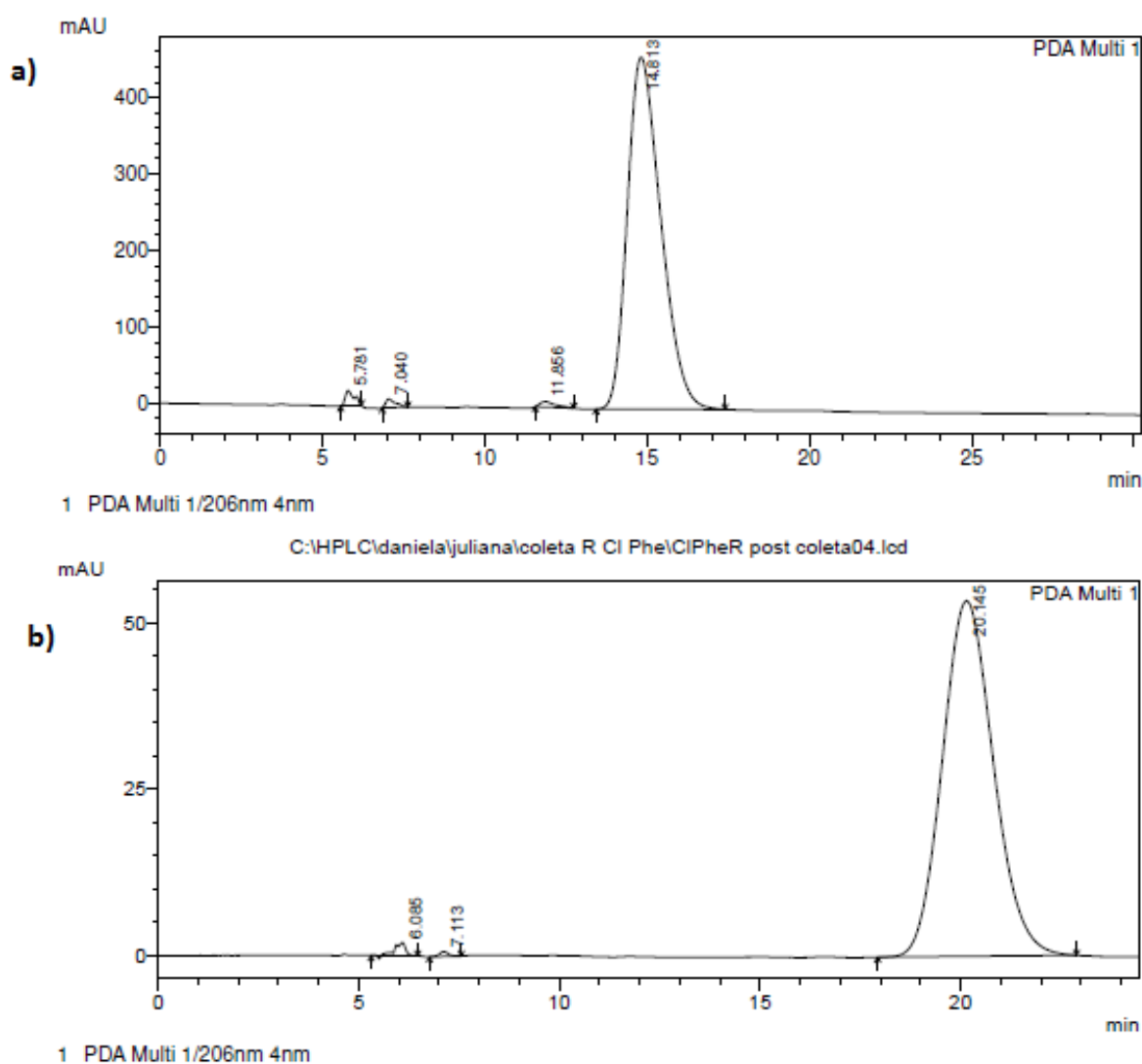
Figura 34: Espectros de massas do composto Neq0752: a) +MS, b) +MS2 e c) -MS.



FONTE: Autoria própria.

Além disso, através da análise em CLAE utilizando coluna quiral e fase móvel MeOH:H₂O 65:35, foi possível obter os cromatogramas da Figura 35 abaixo, provenientes dos compostos Neq0752 e 0753. É possível observar em cada cromatograma que através das sínteses foram obtidos produtos enantiomericamente puros. O composto Neq0752 nas condições apresentadas, apresenta um tempo de retenção de 20,145 minutos, enquanto que o composto Neq0753, nas mesmas condições apresentou um tempo de retenção de 14,813 minutos.

Figura 35: Cromatogramas obtidos por CLAE dos compostos: a) Neq0753 e b) Neq0752.



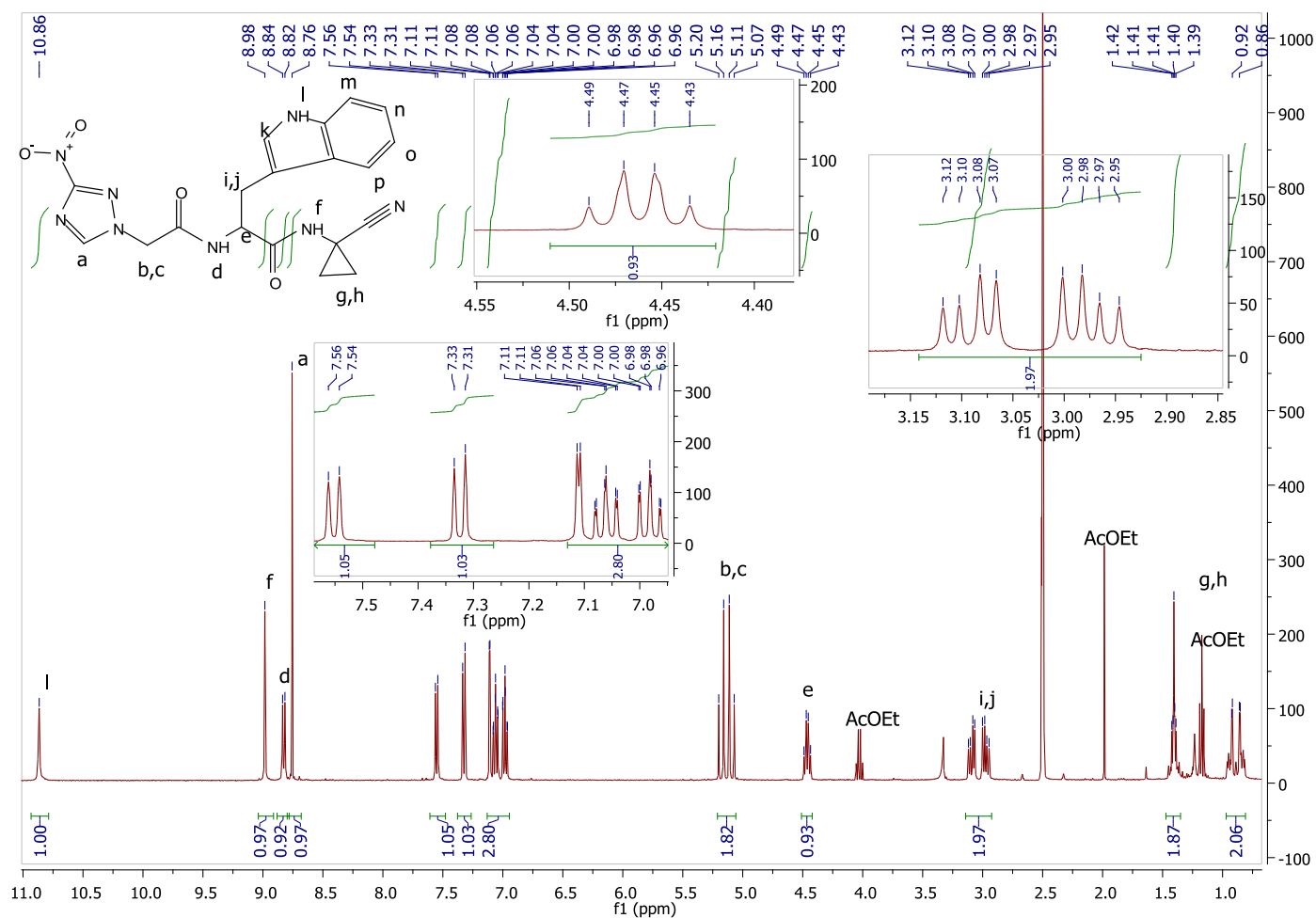
FONTE: Autoria própria.

Para a síntese dos compostos Neq0754 e 0755 foi seguida a rota sintética da Figura 25, utilizando como reagente de partida a amina já desprotegia (*R*) e (*S*) 2-amino-N-(1-

cianociclopropil)-3-(1H-indol-3-il)propanamida, respectivamente, previamente sintetizadas, purificadas, caracterizadas e gentilmente fornecidas pelo doutorando do grupo Ms. Lorenzo Cianni. Ambos os produtos finais apresentaram aspecto amarelo sólido e através de análises de RMN de ^1H , ^{13}C , FTIR e ESI-MS, foi possível confirmar que os produtos apresentavam as estruturas desejadas.

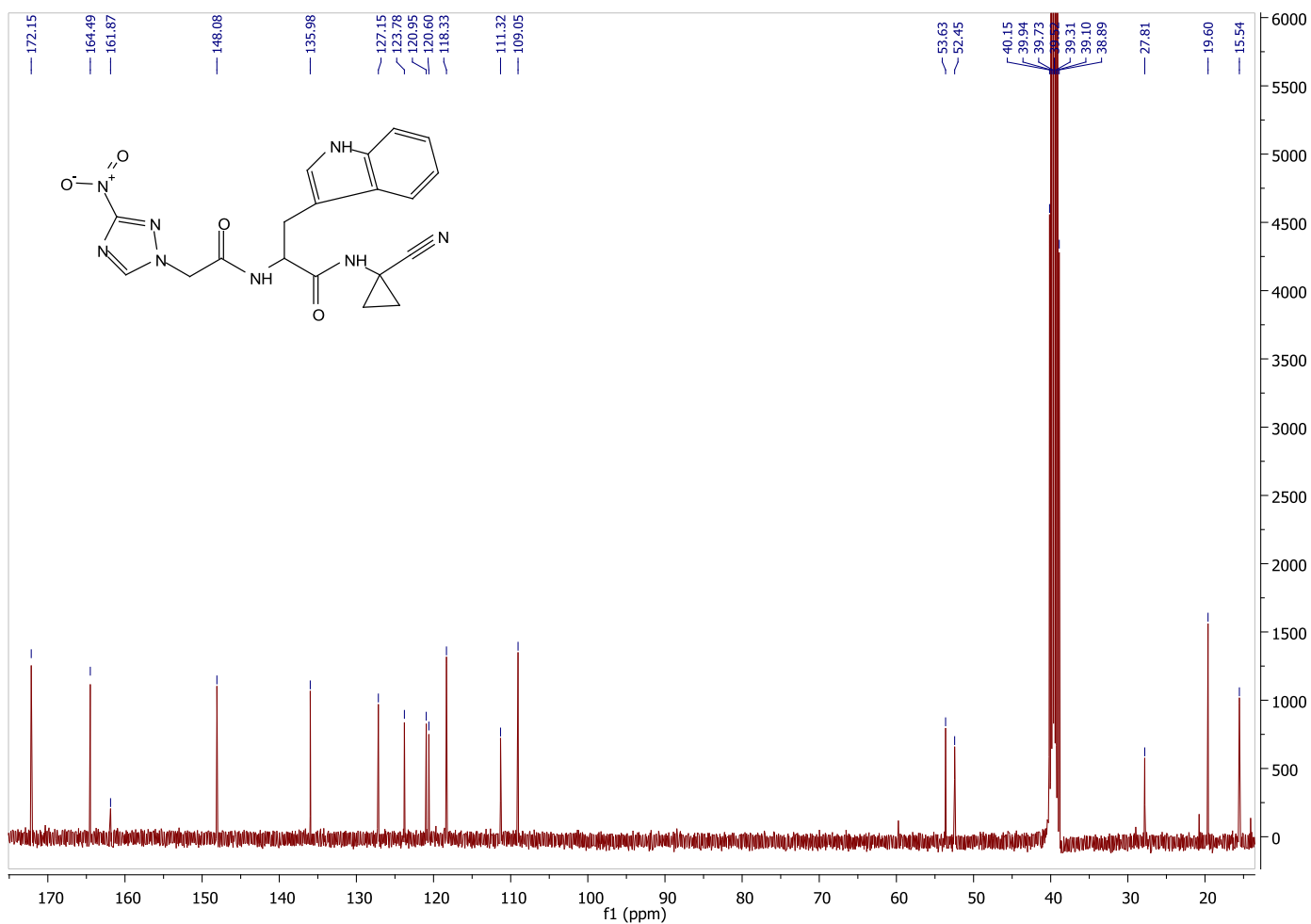
Apenas o composto Neq0754 foi analisado quanto a RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 36 e 37, respectivamente), sendo possível novamente observar os picos característicos da estrutura base da molécula, como já explicado anteriormente, além de apresentar os picos de hidrogênio característicos do fragmento indol na região aromática (entre 7,6 e 6,9 ppm) e na região de baixo campo magnético do espectro referente ao N-H do indol (singleto em 10,86 ppm). No sinal de dois dupletos com *efeito teto* em 5,18 e 5,09 ppm referentes aos hidrogênios diastereotópicos “b,c”, tem-se um $J_{\text{gemial}} = 20,5$ Hz, enquanto que para o sinal de dois duplo dupletos em 3,09 e 2,97 ppm referentes aos hidrogênios geminais “i,j”, tem-se um $J_{\text{geminal}} = 18,0$ Hz. Na Figura 38 tem-se o espectro de massas, onde é possível observar os picos dos íons moleculares 423,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 445,15 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 421,19 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e 341,11 m/z, o qual pode ser referente ao fragmento da molécula que perdeu o fragmento iônico metilciclopropano nitrila.

Figura 36: Espectro de RMN de ^1H do composto Neq0754 (DMSO- d_6 , 500 MHz).



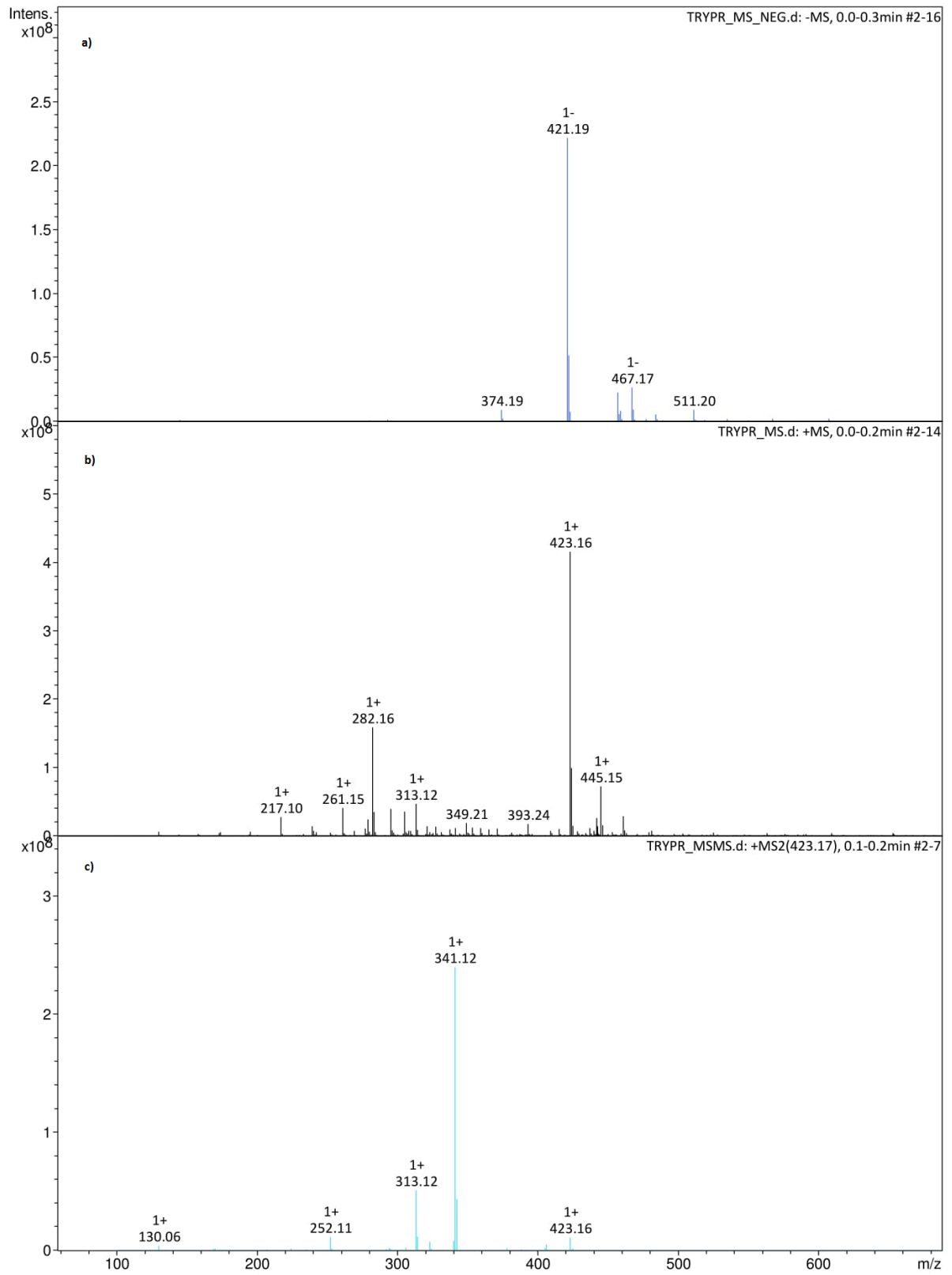
FONTE: Autoria própria.

Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C do composto Neq0754 (DMSO- d_6 , 125 MHz).



FONTE: Autoria própria.

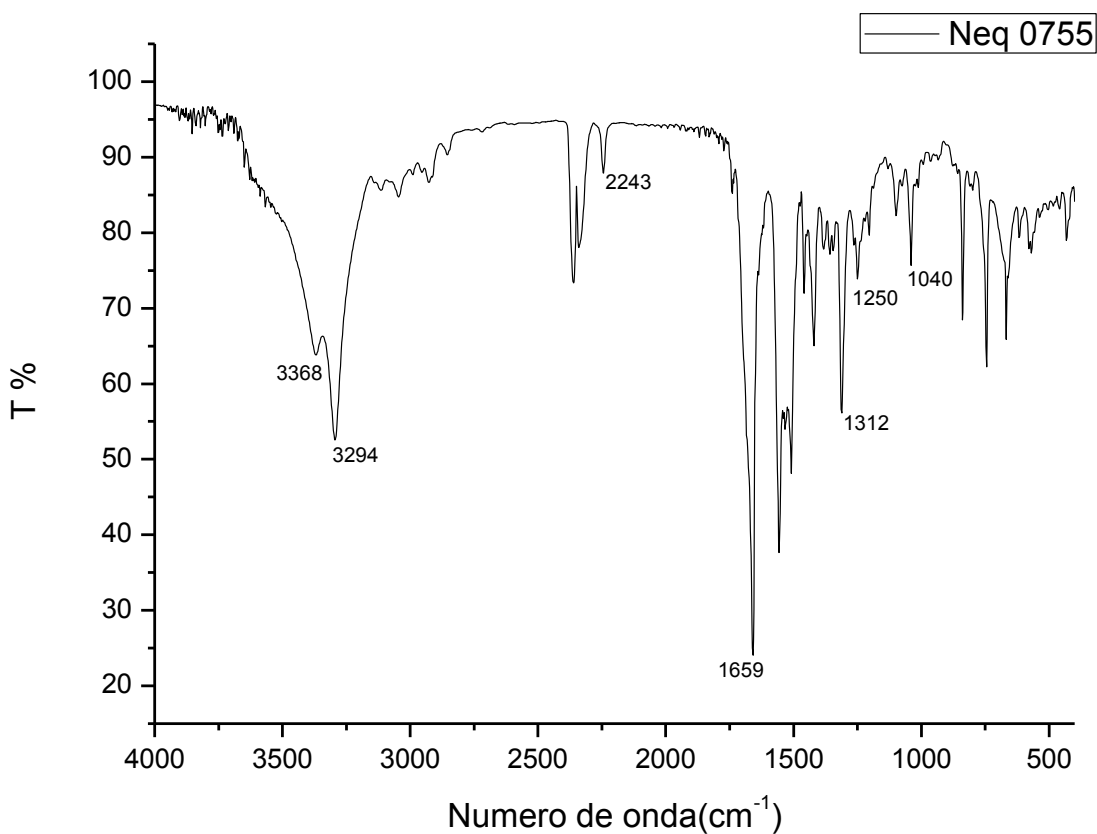
Figura 38: Espectro de massas do composto Neq0754: a) -MS, b) +MS e c) +MS2.



FONTE: Autoria própria.

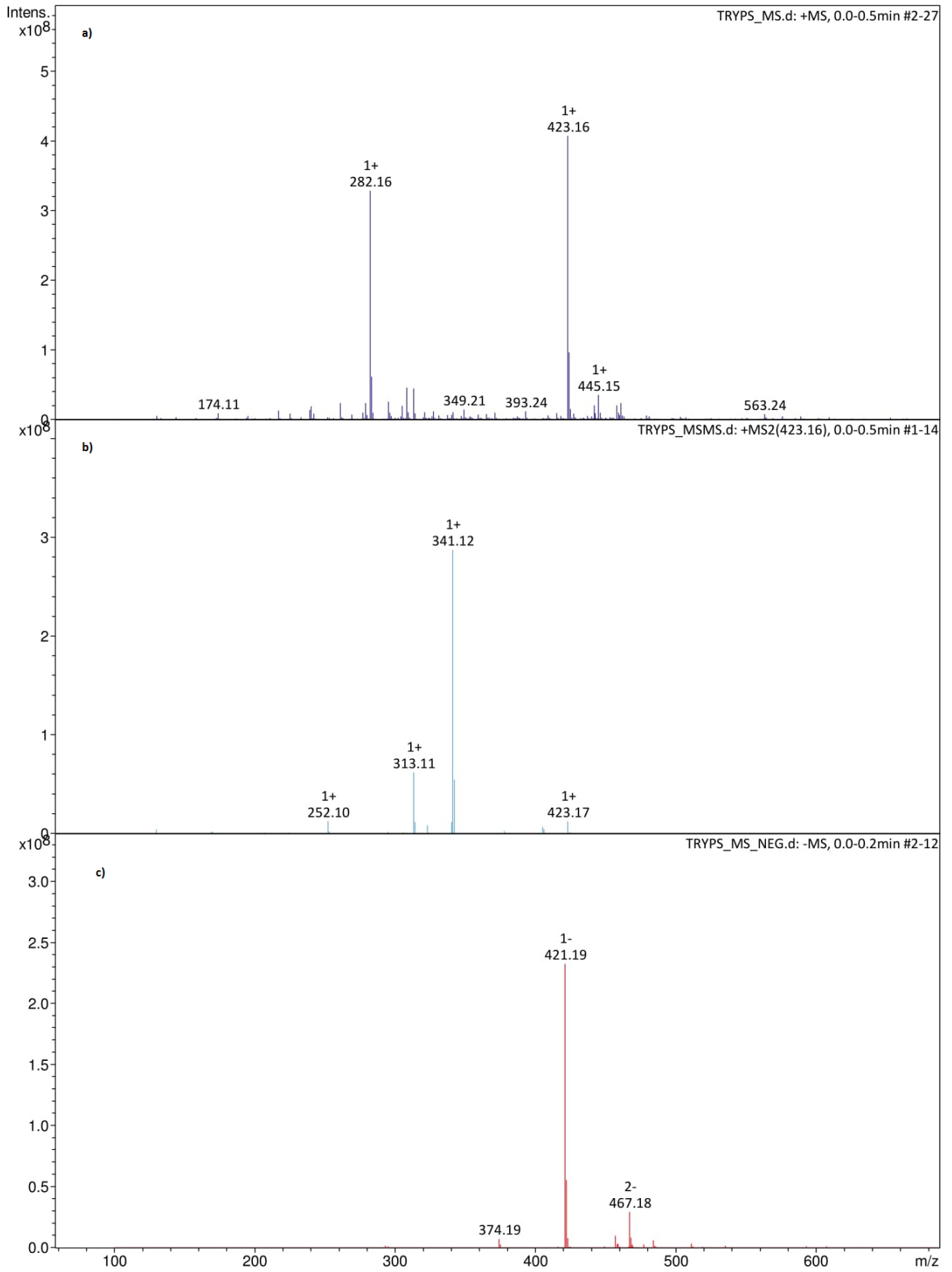
O composto Neq0755 foi analisado apenas por FTIR e ESI-MS (Figuras 39 e 40, respectivamente). No espectro de infravermelho, foram identificadas as bandas mais importantes: N-H do indol (3368 cm^{-1}), N-H da amida (3294 cm^{-1}), nitrila (2243 cm^{-1}), carbonila (1659 cm^{-1}) e a região de impressão digital da molécula ($1200\text{ a }800\text{ cm}^{-1}$). Também foi possível identificar na análise por +MS, -MS e +MS2, os mesmos picos dos íons moleculares encontrados na Figura 36 acima, tal como o pico de $341,11\text{ m/z}$ referente ao fragmento da molécula que perdeu o fragmento metilciclopropano nitrila.

Figura 39: Espectro de infravermelho do composto Neq0755 obtido por FTIR.



FONTE: Autoria própria.

Figura 40: Espectro de Massas do composto Neq0755 (a) MS+. (b) MS2 e (c) MS-.

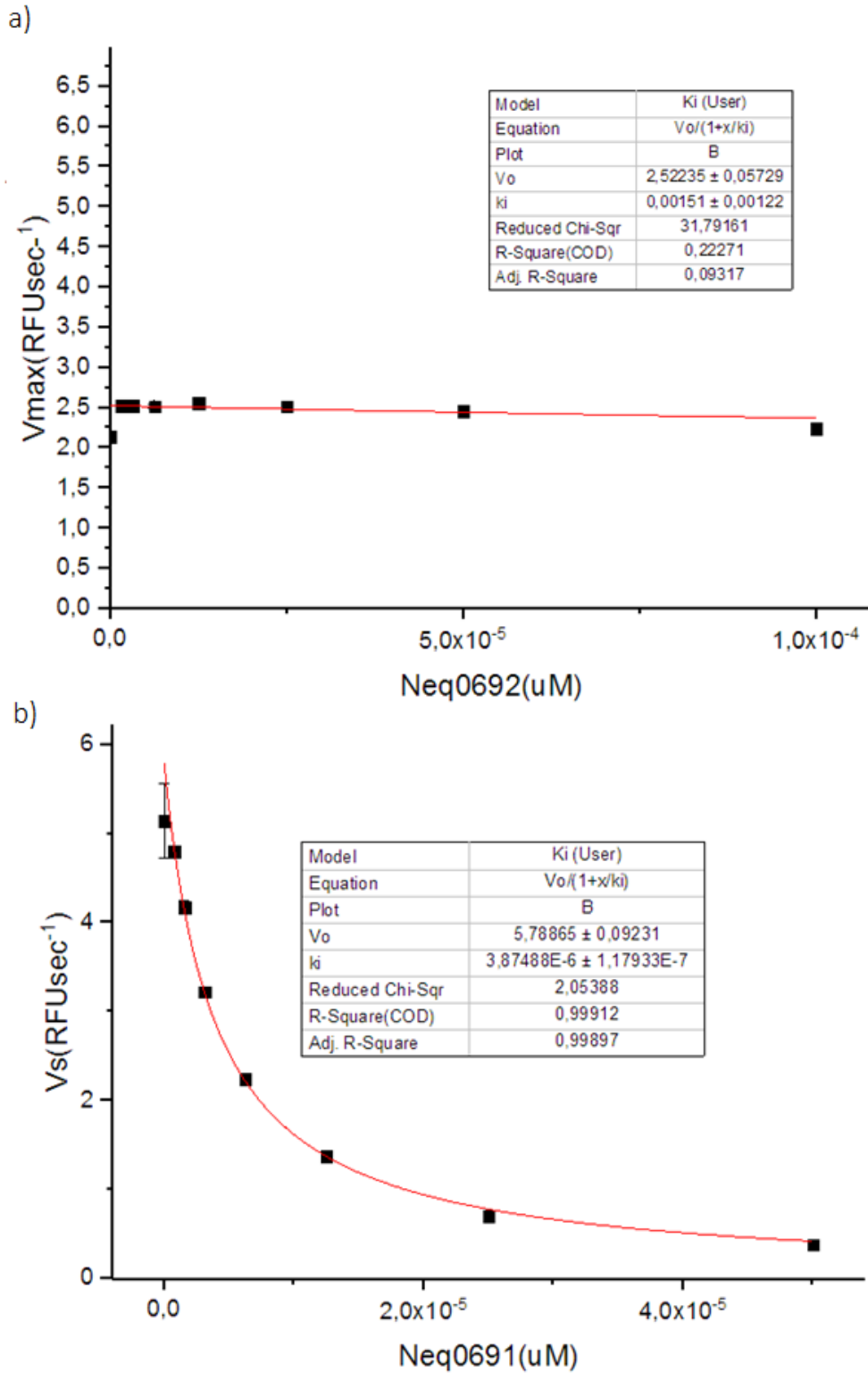


FONTE: Autoria própria.

Contudo, não foi encontrada nenhuma condição satisfatória para a separação enantiomérica dos compostos Neq0754 e 0755 por CLAE.

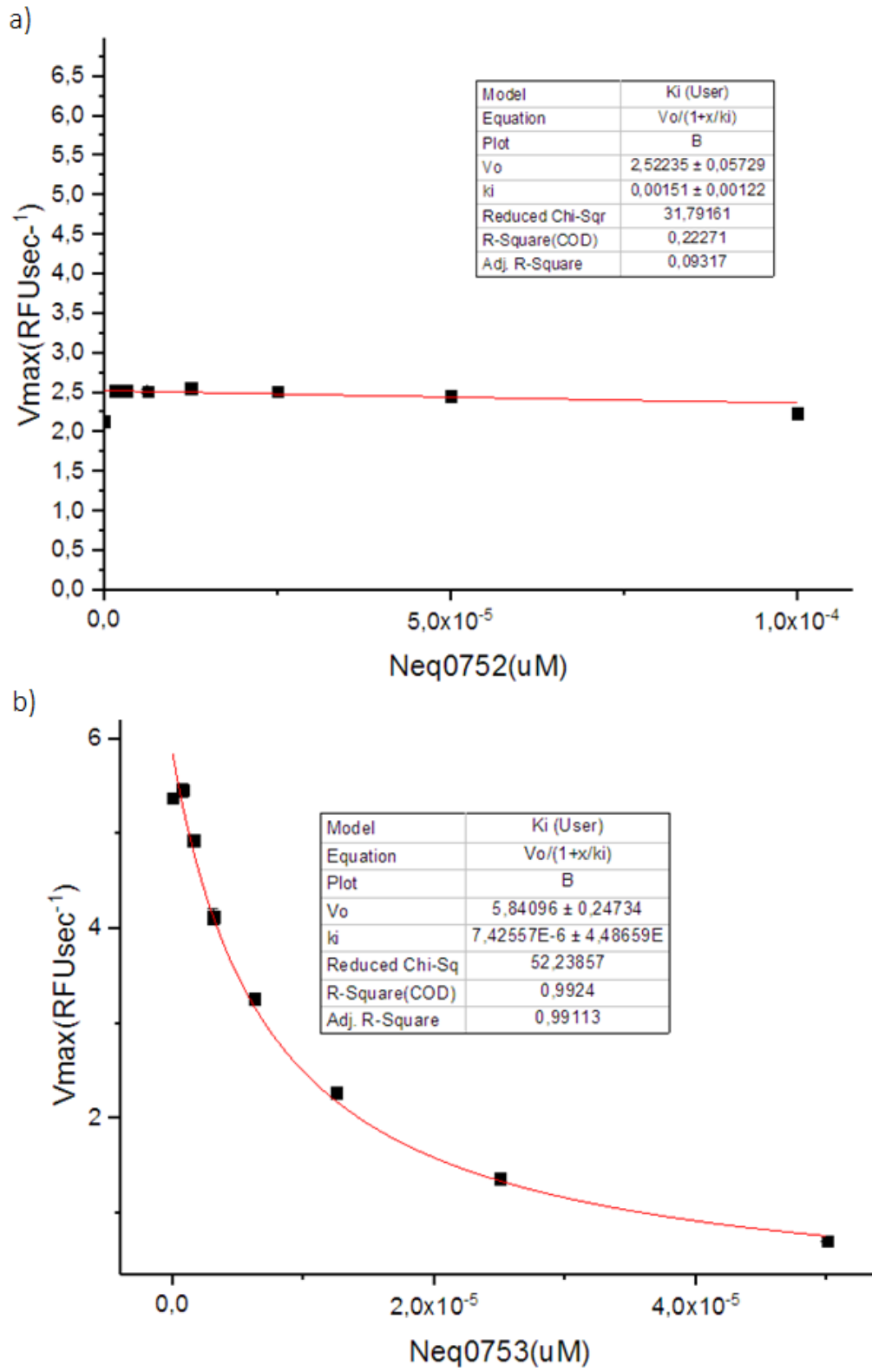
Através dos ensaios cinético-enzimáticos por Fluorimetria, foi possível avaliar o potencial de inibição dos compostos sintetizados observando a taxa de reação de hidrólise do substrato Z-FR-AMC pela enzima cruzaina. Para ser possível a determinação do K_i de cada composto, primeiramente foi necessária a determinação da constante de Michaelis-Menten K_m , para se ter as condições apropriadas para o ensaio: condições de pH 5,5, 300 mM NaCl, 5 mM DTT, 4% v/v DMSO, 0,01 % v/v Triton X-100 e 0,15 nM Cruzaina) + substrato (2,5 μ M) após a incubação do inibidor (7 concentrações, partindo de 100 μ M) com a enzima; excitação a 360 nm e emissão de fluorescência a 440 nm. Obteve-se por regressão não-linear as curvas do comportamento de inibição da enzima na presença do substrato e dos inibidores (Figuras 41, 42 e 43).

Figura 41: Curva de inibição da cruzaina pelos compostos Neq0692 (a) e 0691 (b).



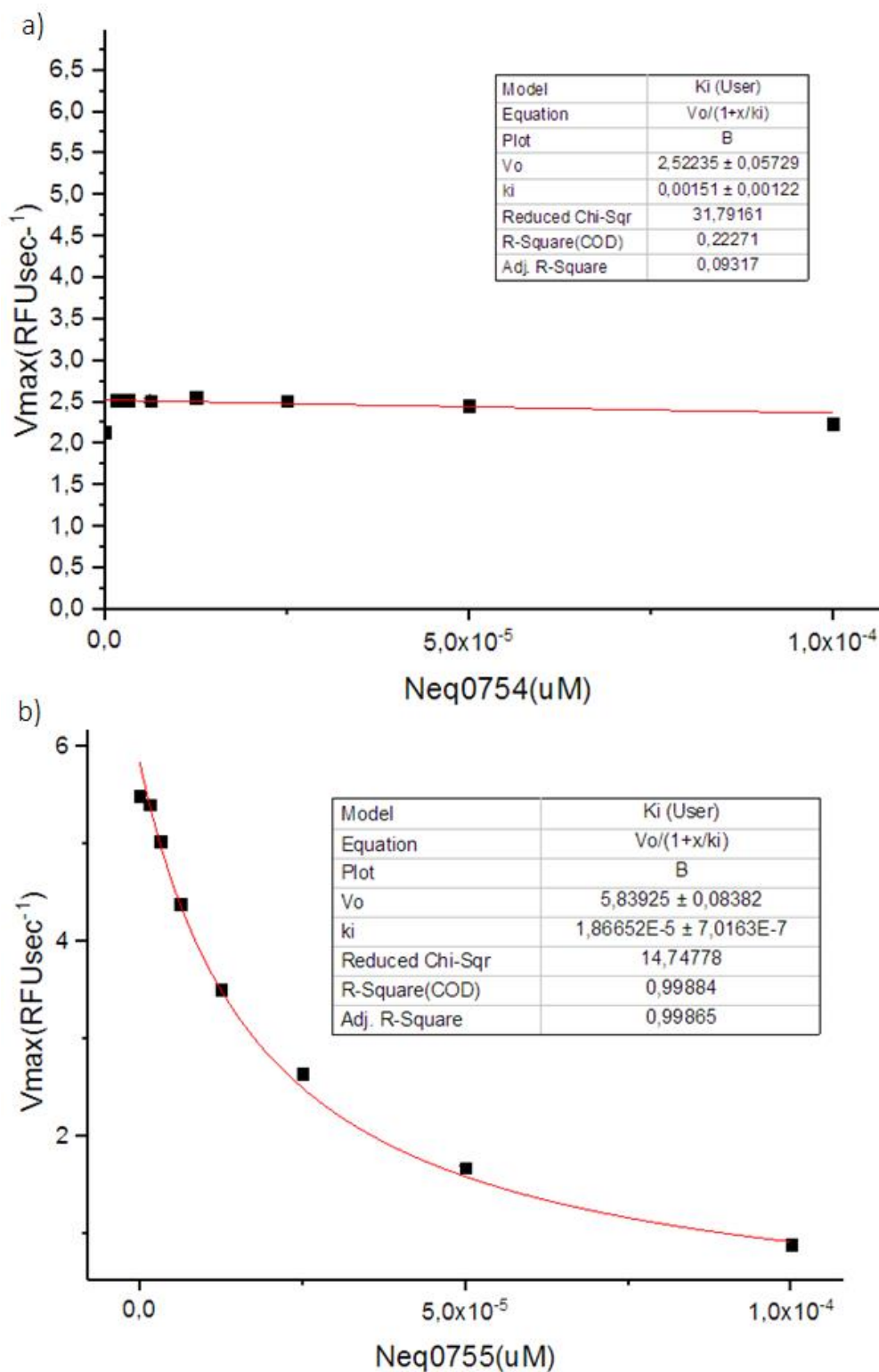
FONTE: Autoria própria.

Figura 42: Curva de inibição da cruzaina pelos compostos Neq0752 (a) e 0753 (b).



FONTE: Autoria própria.

Figura 43: Curva de inibição da cruzaina pelos compostos Neq0754 (a) e 0755 (b).



FONTE: Autoria própria.

Através da análise das curvas de inibição enzimática, foi possível calcular os valores de K_i e conseqüentemente os pK_i de cada composto sintetizado, representados na Tabela 2.

Tabela 2: Avaliação do potencial dos compostos dipeptil-nitrilas contra *Cruzaína*.

	$K_i(\times 10^{-9})$	$sd(K_i)$	pK_i	$sd(pK_i)$
Neq0570 (controle)	330	$2,9 \times 10^{-8}$	6,48	0,03
Neq0691	1935	$1,2 \times 10^{-7}$	5,71	0,03
Neq0692	---	---	<5,0	---
Neq0752	---	---	<5,0	---
Neq0753	3710	$4,4 \times 10^{-7}$	5,43	0,06
Neq0754*	---	---	<5,0	---
Neq0755*	9300	$7,0 \times 10^{-7}$	5,06	0,03

*Valores para consideração de pureza enantiomérica.

FONTE: Autoria própria.

Observa-se pela Tabela 2 que apenas os compostos Neq0691, 0753 e 0755 apresentaram pK_i maiores que 5,0 (valor de controle do grupo), partindo de concentração inicial de 100 μM , ou seja, apenas estes compostos apresentaram um potencial de inibição de interesse para os estudos atuais do grupo.

É possível observar que os (*S*) enantiômeros apresentaram maior afinidade com a enzima do que os (*R*) enantiômeros, como estudos anteriores do grupo já haviam mostrado.²⁰ Além disso, através de estudos de Matched Molecular Pair (MMP), os compostos Neq0570 ($pK_i = 6,48$) e Neq0692 ($pK_i = 5,71$), é possível observar que a substituição do fragmento de benzoíla em P3 pelo (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético diminui o pK_i em 0,77 unidade.

Por análise de Relação Estrutura-Atividade (SAR), é possível compreender a discrepância de resultado para quando ocorre a substituição em P2 do fragmento de fenilalanina por *meta*-Cl-Ph, que segundo estudos anteriores mostram o aumento do pK_i provavelmente devido à interação no subsítio S2 com o resíduo de aminoácido Met68.²⁰ Porém, ao fazer a substituição em P3 do fragmento de benzoíla por (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-

acético, não se observa tal aumento de pK_i esperado, devido à distorção espacial causada pela inserção de um grupo volumoso no subsítio S3.

Apesar de os compostos sintetizados apresentarem menores pK_i que o composto controle (Neq0570), ou seja, uma menor afinidade da enzima para com os compostos, ensaios *in vitro* nas cepas tripomastigotas *Tulahuen lacZ*, *Y* e *CL Brener* para análise do potencial tripanossomicida e potencial citotóxicológico são os passos futuros desse trabalho, devido à natureza híbrida de tais moléculas.

5. Conclusão e Planejamento

Foi possível sintetizar os compostos Neq0691, Neq0692, Neq0752, Neq0753, Neq0754 e Neq0755 propostos no projeto, obtendo-se baixos rendimentos para as sínteses iniciais e rendimentos razoáveis para as duas últimas sínteses: 10,4%, 0,8%, 16,5%, 17%, 59% e 34,7% (respectivamente).

Através dos ensaios cinético-enzimático por Fluorimetria, foi possível obter o pK_i dos compostos, sendo estes menores do que o pK_i do composto controle Neq0570. Além disso, os dados obtidos no trabalho convergem com os dados previamente obtidos no grupo, de que a enzima Cruzaina apresenta maior afinidade com os (*S*) enantiômeros do que os (*R*) enantiômeros.

Por estudos de MMP, foi possível concluir que a substituição em P3 do fragmento de benzoíla por (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético diminui o pK_i em 0,77 unidade. E por SAR, foi possível compreender que a discrepante diminuição do pK_i ao realizar a substituição em P2 do grupo fenilalanina por *meta*-Cl-Ph deve-se à adicional substituição em P3 pelo fragmento volumoso (3-Nitro-[1,2,4]triazol-1)-acético, que pode causar uma distorção espacial que como consequência não ocorre mais a interação no subsítio S2 do fragmento *meta*-Cl-Ph com o resíduo de aminoácido Met68.

Dentro do planejamento para os futuros passos estão: ensaios *in vitro* das moléculas sintetizadas para o conhecimento de seus potenciais tripanossimocidas e potencial citotóxico; continuar a estudar e utilizar o planejamento baseado em hipóteses com ciclos de síntese-ensaios-síntese para identificar novos candidatos a fármacos, utilizando como warhead o grupo nitrila na posição P1.

Bibliografia

- [1] Drug for Neglected Diseases Initiative: *Doença de Chagas*. **2010**. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>>. Acesso em: 18 maio 2016.
- [2] Coura, José Rodrigues; Viñas, Pedro Albajar. *Chagas disease: a new worldwide challenge*. Nature, v. 465, n. 7301, p.6-7, 24 jun. **2010**. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09221>.
- [3] McKerrow, J. H.; *Parasite Proteases*. Exper. Parasitol. **1989**, 68, 111.
- [4] Renslo, Adam R.; McKerrow, James H.; *Drug discovery and development for neglected parasitic diseases*. Nat. Chem. Biol., **2006**, 2, 701.
- [5] Vieira, M.; Rohloff, P.; Luo, S.; Cunha-e-Silva, N. L.; de Souza, W.; Docampo, R.; *Role for a P-type H⁺-ATPase in the acidification of the endocytic pathway of Trypanosoma cruzi* Biochemical Journal, **2005**, 392, 467.
- [6] Erez, E.; Fass, D.; Bibi, E.; *How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane*. Nature, **2009**, 459, 371.
- [7] Rangel, K. C.; *Planejamento e avaliação de fragmentos moleculares como inibidores da enzima cruzaina*. Dissertação de mestrado apresentado ao Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da UFSCar. **2015**.
- [8] Ferreira, R. S.; Simeonov, A.; Jadhav, A.; Eidam, O.; Mott, B. T.; Keiser, M. J.; McKerrow, J. H.; Maloney, D. J.; Irwin, J. J.; Shoichet, B. K.; *Complementarity Between a Docking and a High-Throughput Screen in Discovering New Cruzain Inhibitors*. J. Med. Chem. **2010**, 53, 4891.
- [9] Otto, H.-H.; Schirmeister, T.; *Cysteine proteases and their inhibitors*. Chem. Rev.; **1997**, 97, 133.
- [10] Götz, M. G.; Caffrey, C. R.; Hansell, E.; McKerrow, J. H.; Powers, J. C.; *Peptidyl allyl sulfones: a new class of inhibitors for clan CA cysteine proteases*. Bioorg. Med. Chem., **2004**, 12, 5203.

- [11] Scheidt, K. A.; Roush, W. R.; McKerrow, J. H.; Selzer, P. M.; Hansell, E.; Rosenthal, P. J.; *Structure-based design, synthesis and evaluation of conformationally constrained cysteine protease inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, *6*, 2477.
- [12] Wiggers, H. J.; Rocha, J. R.; Fernandes, W. B.; Sesti-Costa, R.; et al.; *Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay*. *PLoS NTD*, **2013**, *in press*
- [13] Ferreira, R.S.; Bryant, C.; Ang, K. K. H.; McKerrow, J. H.; Shoichet, B. K.; Renslo, A. R.; *Divergent modes of enzyme inhibition in a homologous structure-activity series*. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 5005.
- [14] Avelar, L. A. A.; Camilo C. D.; de Albuquerque S., Fernandes W. B.; Gonçalez C.; Kenny P. W.; et al. *Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors*. *PLoS NTD*, **2015**. doi: 10.1371/journal.pntd.0003916
- [15] Papadopoulous, M. V.; William, D. B.; Howard, S. R.; et al.; *Discovery of potent nitrotriazole-based antitrypanosomal agents: In vitro and in vivo evaluation*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, *23*, 6467.
- [16] Silva, L. E.; *Heterociclos Aromáticos Nitrogenados – Síntese e Potencial Quimioterápico*. Tese de Doutorado - Curso de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, **2014**, 183 p.
- [17] Rodríguez, J. B.; Comin, M. J.; *New Progresses in the Enantioselective Synthesis and Biological Properties of Carbocyclic Nucleosides*. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2003**, *3*, 95-114.
- [18] Kerns, E. H.; Di, L.; *Drug like properties: concepts, structure, design and methods – From ADME to Toxicity Optimization*. Academic Press. **First edition**. 552 p.
- [19] Frizler, M. *Structural Optimization of Azadipeptide Nitriles Strongly Increases Association Rates and Allows the Development of Selective Cathepsin Inhibitors*, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54* (1), pp 396–400.
- [20] Kenny, P. W., et al. *Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors*. *PLoS Negl Trop Dis* *9*(7). **2015**.

- [21] Montalbetti, C. A. G. N; Falque, V.; *Amide bond formation and peptide coupling*. Elsevier. Tetrahedron 61 (2005) 10827–10852. doi: 10.1016/j.tet.2005.08.031
- [22] Avelar, L. A. A.; *Síntese de inibidores das enzimas Cruzaína e Diidroorotato desidrogenase do Trypanossoma cruzi*. Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto de Química de São Carlos, USP. São Carlos. 2014.
- [23] Schröder, J.; Noack, S.; Marhöfer, R. J.; et al. *Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of Leishmania mexicana Cysteine Protease CPB*. PLoS One; V.8(10); 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0077460
- [24] Vieira, D. F.; Choi, J. Y.; Calvet, C. M.; et al. *Binding Mode and Potency of N-Indolyloxopyridinyl-4-aminopropanyl-Based Inhibitors Targeting Trypanosoma cruzi CYP51*. J. Med. Chem., 2014, 57 (23), pp 10162–10175. doi: 10.1021/jm501568b