

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
GRUPO DE QUÍMICA MEDICINAL & BIOLÓGICA (NEQUIMED/IQSC/USP)

Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de Agentes não-Peptídicos como Inibidores da Cisteína Protease Cruzaína

Discente: Rafael da Fonseca Lameiro, nº USP: 8523641

Bolsista FAPESP, Processo 2018/03279-0

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

São Carlos

2020

Rafael da Fonseca Lameiro

Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de Agentes não-Peptídicos como Inibidores da Cisteíno Protease Cruzaína

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências: Química Orgânica e Biológica

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

São Carlos

2020

Agradecimentos

Às agências de fomento CNPq (Processo 130465/2018-6) e FAPESP (Processo 2018/03279-0) pelo auxílio financeiro oferecido.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo que contribuíram para minha formação e para a realização desse projeto.

Aos colegas e colaboradores do Grupo de Química Medicinal & Biológica (NEQUIMED/IQSC/USP), em especial ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari pela orientação.

Resumo

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas. Apesar de ser conhecida há mais de cem anos, os tratamentos para essa parasitose são hoje limitados a apenas dois medicamentos que, além de gerar efeitos colaterais, não são capazes de eliminar os parasitos do corpo do hospedeiro na fase crônica da doença. No contexto de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, a cisteíno protease cruzaiína destaca-se como alvo molecular para inibição devido ao seu papel essencial no ciclo de vida do tripanossoma. Nesse trabalho, foram produzidos compostos derivados de um inibidor de cruzaiína e agente tripanossomicida desenvolvido anteriormente no NEQUIMED/IQSC/USP, denominado Neq0594. Esses derivados têm sua estrutura baseada em peptídeos, que são o substrato natural da cruzaiína, mas, por apresentarem o grupo 2,2,2-trifluoroetilamina no lugar de uma ligação peptídica, e átomos de flúor substituindo átomos de hidrogênio, apresentam maior biodisponibilidade e estabilidade metabólica em comparação a seus análogos peptídicos e ao Neq0594. Quinze derivados do Neq0594 foram sintetizados, purificados e caracterizados (RMN-¹H, RMN-¹³C, FTIR, HRMS, polarimetria e ponto de fusão) para os estudos de relação estrutura-atividade. Os compostos foram testados contra as enzimas cruzaiína, LmCPB e catepsina L e apresentaram afiidade maior ou igual à do composto protótipo na cruzaiína. Também foi observada a preferência dessa enzima por compostos contendo o grupo isobutila em P2 e de configuração (S,S), bem como o bioisosterismo da substituição H/F. Os resultados também sugerem a existência de relações estrutura-atividade (SAR) cruzadas entre as cisteíno proteases de agentes infecciosos (cruzaína e LmCPB). Além disso, simulações computacionais empregando o método de dinâmica molecular foram realizadas com o objetivo de explorar as interações de três compostos com a cruzaiína. As simulações demonstraram as principais ligações de hidrogênio com os resíduos Gly66 e Asp161, interações hidrofóbicas em P2 e P3 e a ausência de interações polares com os átomos de flúor na posição P3.

Abstract

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, was first described in 1909 by the Brazilian physician Carlos Chagas. Despite being known for over a hundred years, treatments for this disease are currently limited to only two drugs that, besides generating side effects, are not capable of eliminating the parasites from the host body in the chronic phase of the disease. In the context of developing new drugs for Chagas disease, the cysteine protease cruzain stands out as a molecular target for inhibition, due to its essential role in the life cycle of the trypanosome. In this work, compounds derived from Neq0594, a trypanocidal agent and cruzain inhibitor previously developed in NEQUIMED/IQSC/USP, were produced. These derivatives have their structures based on dipeptides, which are the natural substrate of cruzain, but, because they have a 2,2,2-trifluoroethylamine group replacing a peptide bond, and fluorine atoms substituting hydrogen atoms, they must be more bioavailable and metabolically stable than their peptide analogues. Fifteen derivatives of Neq0594 were synthesized, purified and characterized ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FTIR, HRMS, polarimetry and melting point) for the structure-activity relationship study. The compounds were tested for cruzain, LmCPB and cathepsin L and displayed activities equal to or better than the lead compound for cruzain. It was also observed the preference of this enzyme for compounds with the isobutyl group at P2 and (S,S) configuration, as well as the bioisosterism of the H/F replacement. The results also suggest the presence of crossed structure-activity relationships between the protozoan cysteine proteases (cruzain and LmCPB). Moreover, computer simulations using the molecular dynamics method were performed to explore the interactions of three compounds with cruzain. The simulations demonstrated the major hydrogen bonds with the residues Gly66 and Asp161, hydrophobic interactions at P2 and P3 and the absence of polar interactions with the P3 fluorine atoms.

Lista de Esquemas

Esquema 1 - Formação do par iônico e mecanismo geral de hidrólise por cisteíno proteases.....	17
Esquema 2 - Formação do par iônico e mecanismo geral de hidrólise para a cruzaina.	18
Esquema 3 - Mecanismo da formação do tioimidato.....	25
Esquema 4 - Rotas de síntese propostas para a realização do projeto.	36
Esquema 5 - Mecanismo da formação de iminas em meio ácido.	44
Esquema 6 - Mecanismo proposto para a formação do grupo imina em meio básico.	44
Esquema 7 - Explicação proposta para a estereosseletividade dos agentes redutores utilizados.	46
Esquema 8 - Mecanismo da reação de acoplamento com HATU.	48
Esquema 9 - Mecanismo da racemização de derivados de aminoácidos.	49

Lista de Figuras

Figura 1 - Estruturas dos compostos benzonidazol e nifurtimox, com destaque para os grupos nitro responsáveis pela atividade.	14
Figura 2 - Estrutura tridimensional (superfície) da cruzaina, com destaque para a tríade catalítica no sítio ativo.	16
Figura 3 - Representação de um inibidor peptídico no sítio ativo da cruzaina, com destaque para os subsítios S1', S1, S2 e S3, resíduos de aminoácidos relevantes e as regiões do inibidor que interagem com cada subsítio: P1', P1, P2 e P3.	20
Figura 4. Estruturas de alguns inibidores de cruzaina.	23
Figura 5 - Odanacatib, um inibidor de catepsina K com estrutura derivada de uma peptidilnitrila.	26
Figura 6 – A ligação peptídica e alguns de seus bioisósteros.	29
Figura 7 - Estruturas do odanacatib e do composto protótipo Neq0594, com destaque para as modificações realizadas na estrutura do odanacatib para a concepção do Neq0594.	33
Figura 8 - Estruturas dos compostos Neq0977, Neq1000 e Neq1074.	41
Figura 9 - Substituintes P1, P2 e P3 das moléculas produzidas no projeto. P1 é mantido com o grupo ciclopropila.	43
Figura 10 - Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto Neq0999, com atribuições.	50
Figura 11 - Espectro de RMN- ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) do composto Neq0999, com atribuições.	52
Figura 12 - Aproximações dos sinais f (a), j (b) e p (c) da Figura 10.	52
Figura 13 - Espectro de FTIR do composto Neq0999.	54
Figura 14 - Gráficos de radar obtidos no <i>website SwissADME</i> para os compostos Neq0594 e Neq1000.	55
Figura 15 - Pares moleculares variando em P2 e variação da atividade na cruzaina.	59
Figura 16 - Pares moleculares variando na posição dos átomos de flúor e variação da atividade na cruzaina.	60

Figura 17 - Pares moleculares variando na estereoquímica do grupo TFEA e variação da atividade na cruzaina.	61
Figura 18 - Gráfico de correlação entre os valores de pK_i para as enzimas cruzaina e LmCPB.....	62
Figura 19 - Gráficos de RMSD para o Neq0997, Neq1000 e Neq1074, respectivamente.	64
Figura 20 - Neq1000 ligado à cruzaina, com destaque para as ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor e o átomo de oxigênio do resíduo Asp161 (Asp161O) e os átomos de hidrogênio e oxigênio do resíduo Gly66 (Gly66H e Gly66O).	65
Figura 21 - Rotação em torno da ligação C–N da TFEA, levando o grupo P3 de uma conformação próxima ao resíduo Leu160 (a), na parte inferior do subsítio S2, destacado em amarelo, para uma conformação próxima a Leu67 (b), na parte superior de S2.....	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Valores de inibição enzimática medidos para os compostos do projeto. .58

Tabela 2 - Distâncias médias e desvios padrão (Å) para as ligações de hidrogênio entre os inibidores e os resíduos Gly66 e Asp161 da cruzaina.....65

Lista de abreviaturas e siglas

- ACN – acetonitrila
- BENEFIT – *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*
- Boc – grupo protetor *tert*-butoxicarbonila
- Bz – Benzonidazol
- CAQI – Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos/Universidade de São Paulo
- CCD – cromatografia em camada delgada
- CH₃, CH₂, CH – respectivamente, grupos orgânicos metila, metileno e metino
- DAD – *diode array detector*
- DIPEA - diisopropiletilamina
- DME – dimetoxietano
- DMF – dimetilformamida
- DMSO – dimetilsulfóxido
- HATU - hexafluorofosfato de 2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
- I.D. – diâmetro interno da coluna cromatográfica (mm)
- LmCPB – enzima CPB do protozoário *Leishmania mexicana*
- logP_{o/w} – logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (calculado)
- logS – logaritmo da solubilidade (calculado)
- Nf – Nifurtimox
- NTDs – doenças tropicais negligenciadas (do inglês, *Neglected Tropical Diseases*)
- PDB – *Protein Data Bank*
- pK_i – logaritmo negativo da constante de inibição K_i
- SAR – relação estrutura-atividade
- RMSD – *root-mean-square deviation*
- TFEA – grupo 2,2,2-trifluoroetilamina
- TPSA – área polar superficial topológica (Å²)
- t_R – tempo de retenção (min)

Sumário

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
Lista de Esquemas	6
Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas	9
Lista de abreviaturas e siglas	10
Sumário	11
1 Introdução	13
1.1 A Doença de Chagas e seus tratamentos	13
1.2 Cruzaína, a principal cisteína protease do <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.3 O uso de inibidores de cruzaína para o tratamento da doença de Chagas	21
1.4 Estratégias para o planejamento de inibidores de cruzaína	23
1.4.1 Inibidores peptídicos	23
1.4.2 O grupo funcional nitrila em inibidores covalentes reversíveis	24
1.4.3 Características de substituintes em inibidores de cruzaína	26
1.5 Peptideomiméticos e bioisómeros	28
1.6 Composto protótipo e relação estrutura-atividade	32
1.7 Objetivos gerais	33
1.8 Objetivos específicos	34
2 Parte experimental	35
2.1 Síntese	35
2.1.1 Reagentes e solventes	35
2.1.2 Monitoramento de reações e purificação	35
2.1.3 Rotas de síntese	36
2.2 Caracterização	37
2.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	37
2.2.2 Pureza por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	38
2.2.3 Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)	38
2.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	39
2.2.5 Ponto de fusão	39
2.2.6 Polarimetria	39

2.3 Cálculo de descritores físico-químicos	40
2.4 Ensaio bioquímico e biológico.....	40
2.5 Dinâmica molecular	40
3 Resultados e Discussão	43
3.1 Planejamento, rotas de síntese e mecanismos	43
3.2 Caracterização	50
3.2.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio	50
3.2.2 Ressonância magnética nuclear de carbono-13	52
3.2.3 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	54
3.3 Cálculo de descritores físico-químicos	55
3.4 Ensaio bioquímico	57
3.5 Dinâmica molecular	63
4 Conclusões.....	68
5 Referências	69
6 Anexo	79
6.1 Procedimentos experimentais e dados das caracterizações.....	79
6.1.1 Considerações gerais.....	79
6.1.2 Procedimento geral para a preparação dos (<i>R,S</i>)-trifluorometilaminoácidos ...	79
6.1.3 Procedimento geral para a preparação dos (<i>S,S</i>)-trifluorometilaminoácidos....	80
6.1.4 Procedimento geral para a preparação das trifluorometilamino dipeptidil-nitrilas	82
6.1.5 Dados das caracterizações	83
6.1.6 Espectros de ¹ H e ¹³ C-RMN dos compostos inéditos.....	93

1 Introdução

1.1 A Doença de Chagas e seus tratamentos

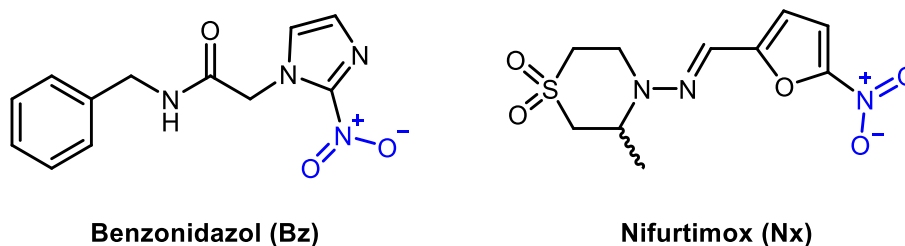
Descrita em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas e causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, a doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma das 17 doenças tropicais negligenciadas (NTDs), um grupo de infecções parasitárias que aflige majoritariamente populações de baixa renda de países em desenvolvimento (1–4). A contaminação de humanos pelo tripanossoma pode ocorrer por meio da ingestão de alimentos contaminados e pelo contato com as fezes de insetos da família *Reduviidae*, como o *Triatoma infestans* (2,3). O transplante de órgãos e a transfusão de sangue contaminados também são formas de transmissão relevantes atualmente (3). O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, envolvendo vetor, hospedeiro e três estágios de desenvolvimento. A forma tripomastigota é alongada e possui um flagelo para locomoção; não é replicativa, mas é altamente infectante. As outras duas formas do parasito, amastigota e epimastigota, têm função de multiplicação. (2,3,5–8).

Após a contaminação, a progressão da doença ocorre em duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda ocorre a multiplicação dos parasitos, aumentando sua concentração no sangue. Pode durar de semanas a alguns meses e está associada a sintomas como febre, reações alérgicas e conjuntivite (sinal de Romana). Pacientes que sobrevivem à fase aguda entram na fase crônica, que se apresenta de duas formas: indeterminada e sintomática. A fase indeterminada é caracterizada pela resposta imunológica do organismo, ocorrendo a diminuição dos níveis de parasitos no sangue. Essa fase é assintomática e pode durar vários anos. Cerca de 30% dos pacientes atingem a fase crônica sintomática, associada ao surgimento de problemas cardíacos e hipertrofia de órgãos. O tratamento na fase crônica é difícil, já que o parasito, na forma intracelular, está restrito a alguns tecidos, em baixas concentrações (3,4,9–12).

Uma vez feito o diagnóstico da doença de Chagas, o paciente pode recorrer a apenas dois medicamentos para seu tratamento. Esses fármacos, desenvolvidos nas

décadas de 1960 e 1970, são o benzonidazol (Bz, *Rochagan*®, *Radanil*®, *Roche*) e o nifurtimox (Nx, *Lampit*®, *Bayer*), cujas estruturas são mostradas na Figura 1. Ambos são compostos nitro-heterocíclicos que geram espécies reativas após a redução do grupo nitro por enzimas do parasito. Essas espécies formam adutos com tióis (por exemplo, tripanotona e glutatona) e danificam macromoléculas, como proteínas e DNA, por modificação covalente, provocando a morte do tripanossoma (3,10,13–15). O tratamento com esses medicamentos durante a fase aguda leva a cura parasitológica, definida como a ausência de parasitos no sangue por meio de testes convencionais, em 80% dos casos. Todavia, a iniciativa BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) demonstrou que a administração de Bz durante a fase crônica apenas diminui os níveis de parasitos, não promovendo uma melhora na condição cardíaca dos pacientes, nem levando a cura parasitológica (13). Além disso, sabe-se que esses fármacos podem provocar diversos efeitos negativos, como neuropatias e problemas gastrointestinais, podem ser carcinogênicos e requerem a ingestão de doses elevadas por um longo período, o que, associado aos efeitos colaterais, leva muitos pacientes a abandonar o tratamento (3,10,11,16–18).

Figura 1 - Estruturas dos compostos benzonidazol e nifurtimox, com destaque para os grupos nitro responsáveis pela atividade.



Fonte: Adaptado de (3).

Dadas as desvantagens dos medicamentos disponíveis, buscam-se outras abordagens para impedir o desenvolvimento do *T. cruzi* uma vez dentro do hospedeiro. A inibição de enzimas específicas ou de vias metabólicas exclusivas do parasito é uma estratégia interessante, denominada “descoberta de fármacos baseada no alvo” (*target-based drug discovery*) (19). Nesse contexto, as cisteíno proteases destacam-se como alvos moleculares validados para inibição, por apresentarem funções

essenciais para a sobrevivência e a reprodução dos parasitos, e muito se conhece sobre sua estrutura, mecanismo de ação e especificidade (20–22).

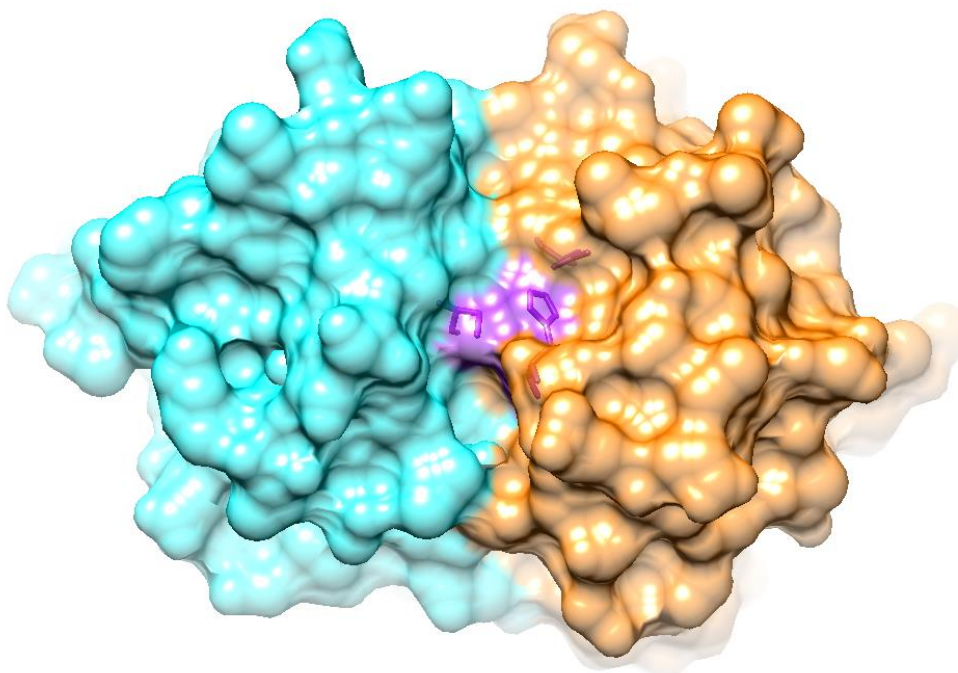
1.2 Cruzaína, a principal cisteíno protease do *Trypanosoma cruzi*

A cruzaína (GP57/51, EC 3.4.22.51, também chamada de cruzipaína na sua forma nativa) é a cisteíno protease majoritária no *T. cruzi*, expressa em todos os estágios do seu ciclo de vida, como diversas isoformas similares (2,16,23). Pode ser encontrada em vesículas intracelulares no estágio dormente do parasito, em ambiente químico ácido (pH \approx 5,5), mas, na forma amastigota, está também presente na superfície do parasito, em contato com o citoplasma do hospedeiro e, conseqüentemente, em ambiente neutro (pH \approx 7,4) (19,21,24). Essa característica difere a cruzaína de catepsinas humanas análogas, que se localizam nos lisossomos e somente são ativas em meio ácido (19). A cruzaína é essencial para o desenvolvimento do parasito dentro do hospedeiro, por estar associada a funções como penetração dos tripomastigotas nas células humanas, remodelamento molecular dos epimastigotas para tripomastigotas, nutrição e evasão do sistema imune. Além disso, também está relacionada à ativação da resposta inflamatória (9,16,19,21,22,25).

A cruzaína pertence ao clã CA, uma família de cisteíno proteases análogas à papaína, do qual também fazem parte enzimas de humanos como as catepsinas B, F, K, S e V, além da catepsina L, homóloga à cruzaína (2,13). As cisteíno proteases são enzimas com função proteolítica, ou seja, que realizam a hidrólise de peptídeos, promovida por três resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo (Figura 2): cisteína, histidina e asparagina. Estes resíduos, que compõem a tríade catalítica, recebem a numeração Cys25, His162 e Asn182 na cruzaína, e Cys25, His159 e Asn175 na cruzipaína. A cisteína é responsável pelo início da reação de hidrólise, por meio de um ataque nucleofílico do grupo tiolato à carbonila do peptídeo. A histidina tem múltiplas funções, como promover a ionização do grupo tiol da cisteína, aumentando sua nucleofilia, e transferir um íon H⁺ ao nitrogênio do peptídeo que será hidrolisado. Por sua vez, a asparagina mantém o anel imidazol da histidina em uma

orientação favorável durante a reação (26,27). A Figura 2 apresenta a estrutura da cruzaína, com 215 aminoácidos, destacando a tríade catalítica.

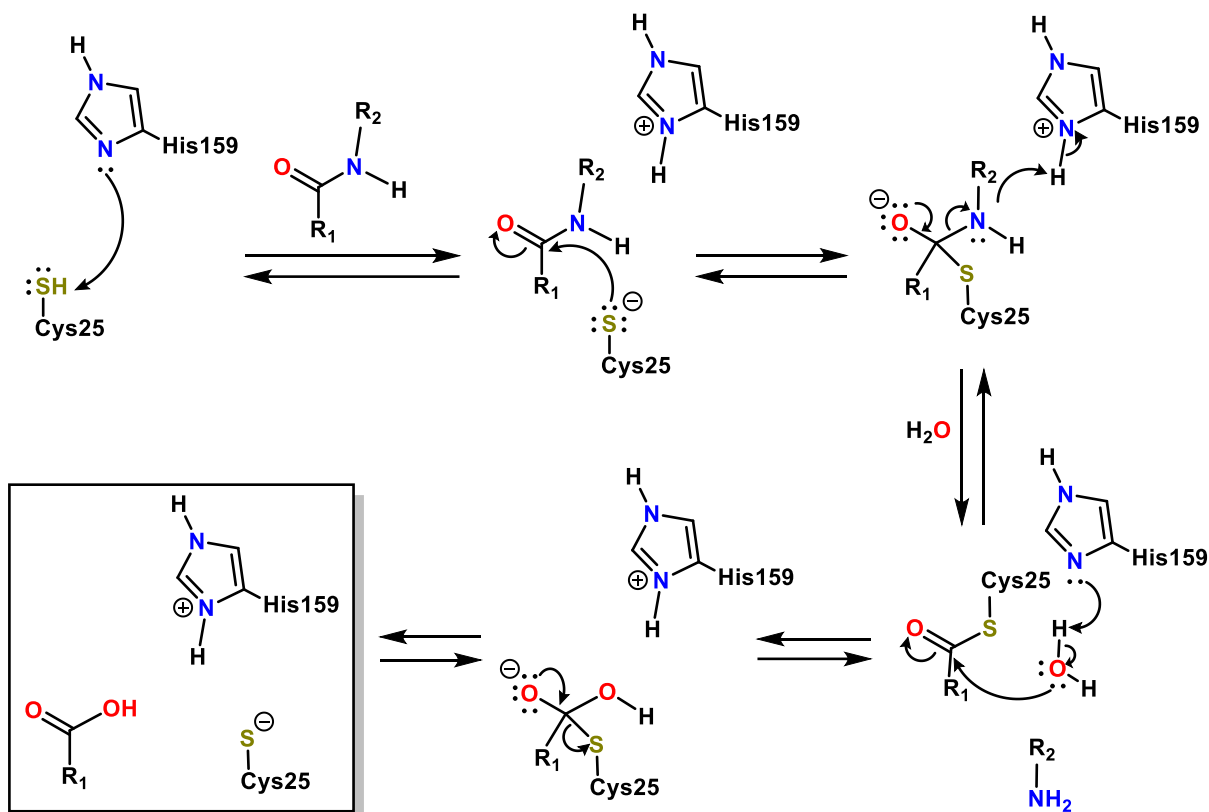
Figura 2 - Estrutura tridimensional (superfície) da cruzaína, com destaque para a tríade catalítica no sítio ativo.



Fonte: Autoria própria.

O mecanismo catalítico mais comum para as cisteíno proteases, mostrado no Esquema 1, é consistente com a presença de um par iônico, formado após a transferência de um íon H^+ do resíduo de cisteína para o de histidina, levando a enzima a possuir um sítio ativo ionizado em sua forma livre ($CysS^-/HisH^+$). A existência do par iônico em cisteíno proteases, como a papaína e catepsinas, foi confirmada experimentalmente e por modelos computacionais (28,29), sendo uma das características que diferem cisteíno proteases de serino proteases, que dependem da interação com o substrato para a ativação do grupo que dará início à hidrólise (30). O par iônico no sítio ativo explica a maior reatividade das cisteíno proteases frente a espécies eletrofílicas, quando comparadas a outras espécies nucleofílicas contendo enxofre, especialmente em meios mais ácidos, uma vez que o ânion tiolato é cerca de 10^{10} vezes mais nucleofílico que o grupo tiol neutro (24,25,31).

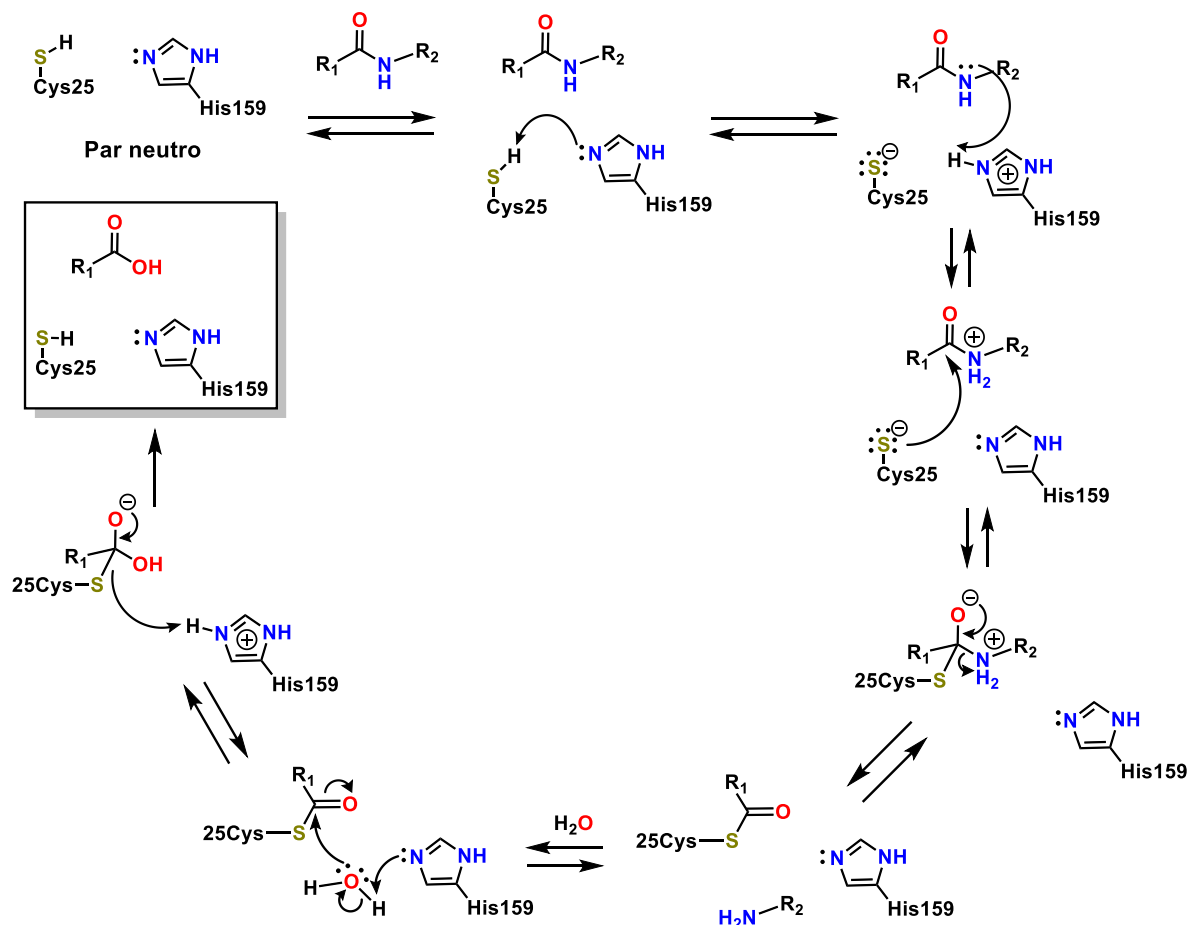
Esquema 1 - Formação do par iônico e mecanismo geral de hidrólise por cisteíno proteases.



Fonte: Adaptado de (32).

Assim, dada a analogia da cruzaina com outras cisteíno proteases, é possível encontrar trabalhos que indicam a existência do par iônico na sua forma livre (24,29,33). Entretanto, um trabalho recente (31) envolvendo o efeito isotópico cinético questiona essa suposição, apresentando resultados consistentes com a existência de um par neutro (Cys25/His159) na enzima livre, uma vez que a distância entre esses grupos seria muito grande para a ocorrência espontânea da ionização e que o pK_a da cisteína seria de 9,8. A aproximação entre os grupos ocorreria somente após uma mudança conformacional promovida pela aproximação do substrato ao sítio ativo, permitindo a ionização e a ativação do grupo tiol. Esse tipo de mecanismo não é desconhecido para cisteíno proteases, sendo a enzima protease específica da ubiquitina 1 (do inglês *ubiquitin-specific protease 1*, USP1) um exemplo (31). Dessa forma, o mecanismo da reação de hidrólise proposto para a cruzaina pode ser dividido em etapas, conforme mostrado no Esquema 2.

Esquema 2 - Formação do par iônico e mecanismo geral de hidrólise para a cruzaina.



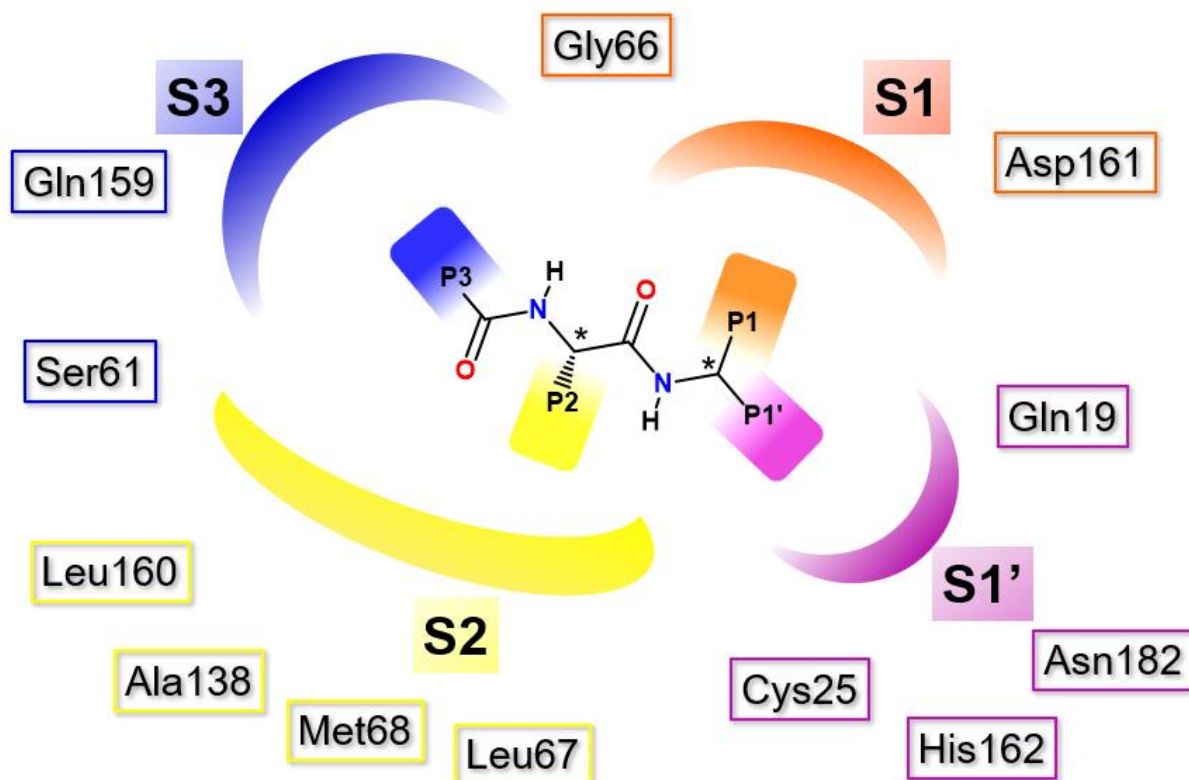
Fonte: Autoria própria.

Primeiramente, ocorre a interação entre o peptídeo e o sítio ativo, permitindo a aproximação dos resíduos Cys25 e His159 e a formação do par iônico. Em seguida, inicia-se a etapa de acilação, à qual foi atribuído um mecanismo não-concertado em um trabalho recente de mecânica quântica e mecânica molecular (24). Foi sugerida a transferência de H⁺ da His159 para o átomo de nitrogênio da ligação peptídica, enquanto a estabilização do grupo Cys25S⁻ é realizada por grupos próximos, como Trp26, Gly160 e His159. Isso permite o ataque nucleofílico do átomo de enxofre, formando um intermediário tetraédrico estabilizado pela cavidade do oxiânion. A ligação dupla da carbonila pode ser, então, refeita, sendo uma amina neutra o grupo de saída, resultando no segundo intermediário da reação de hidrólise (R-CO-S-Cys). Em seguida, inicia-se a etapa de desacilação. O anel imidazol da histidina, agora na forma neutra, atua como base, polarizando uma molécula de água, cujo oxigênio ataca o carbono carbonílico do intermediário, de forma concertada. Nesse ponto, há

discordância em artigos recentes com relação à existência de intermediário tetraédrico, que é mostrado no Esquema 2 (24,31). Finalmente, o enxofre da cisteína recupera o íon H^+ , reestabelecendo a forma neutra do sítio ativo.

Nas diversas estruturas tridimensionais da cruzaina obtidas por difração de raios X é possível observar a existência de dois domínios: um deles é composto majoritariamente por α -hélices, e o outro, por folhas- β (22). O sítio ativo é localizado entre esses dois domínios e, adjacentes a ele, existem subsítios de ligação, capazes de acomodar as cadeias laterais dos aminoácidos do peptídeo a ser hidrolisado, sendo, portanto, responsáveis pela especificidade da enzima. Esses são designados segundo a nomenclatura proposta por Schechter e Berger: os subsítios recebem a designação S, se interagem com os aminoácidos da região *N*-terminal do substrato, ou S', se interagem com os da região *C*-terminal (22). Dos subsítios da cruzaina, quatro são mais explorados no desenvolvimento de inibidores: S1, S2, S3 e S1' (27). Nos inibidores, de forma análoga, utiliza-se a mesma numeração para os grupos que interagem com os subsítios, mas com designação P (P1, P2, P3 e P1'). A Figura 3 apresenta, de forma simplificada, um inibidor genérico interagindo com os principais subsítios da cruzaina, e os resíduos de aminoácidos que participam dessas interações (numeração da cruzaina).

Figura 3 - Representação de um inibidor peptídico no sítio ativo da cruzaina, com destaque para os subsítios S1', S1, S2 e S3, resíduos de aminoácidos relevantes e as regiões do inibidor que interagem com cada subsítio: P1', P1, P2 e P3.



Fonte: Adaptado de (32).

O subsítio S1 é superficial e fica próximo à tríade catalítica da cruzaina. É capaz de acomodar substituintes P1 hidrofóbicos volumosos, e foi demonstrado que a estereoquímica em P1, quando existente, é um fator importante para a atividade (21,34). É classificado como subsítio de potencialização, uma vez que diferentes substituintes na posição P1 de um inibidor podem aumentar sua atividade, aproximando a porção eletrofílica da molécula e o enxofre da cisteína. Apesar disso, modificações em P1, em geral, não levam a uma maior seletividade frente a catepsinas (9,26,32). Alguns resíduos de aminoácidos que podem interagir com o substituinte P1 são: Gln19, Gly23, Ser24, Asp161 e His162.

A região S2 é conhecida como subsítio de especificidade, por ser determinante para o planejamento da seletividade do inibidor, tendo sido amplamente explorada em estudos de SAR. É o subsítio menos exposto ao solvente (mais interno), podendo

acomodar grupos volumosos, e é capaz de interagir tanto com grupos básicos, como a cadeia lateral da arginina e pirimidinas, quanto hidrofóbicos, como as cadeias laterais dos aminoácidos fenilalanina, valina e leucina (9,22,32,35,36). A preferência por substituintes apolares se deve a interações com as cadeias laterais dos aminoácidos Leu67, Met68, Ala138 e Leu160. Por outro lado, a capacidade de interagir com grupos polares pode ser explicada pela presença do resíduo Glu208, ausente em outras cisteíno proteases da família da papaína, que apresentam o resíduo Ser208, o que as leva a apresentar uma afinidade muito maior por inibidores derivados da fenilalanina em relação aos derivados da arginina (37). Em geral, se observa que substituintes apolares na região P2 de inibidores de cruzaína fazem com que a cadeia lateral do ácido glutâmico aponte na direção oposta à molécula, em direção ao solvente, enquanto substituintes básicos e polares levam a uma interação direta entre a cadeia lateral e o inibidor (23,38).

O subsítio S3 apresenta uma porção exposta ao solvente, contendo resíduos polares, como serina e aspartato, que podem interagir com o inibidor realizando ligações de hidrogênio (32). É menos explorado em estudos de SAR, mas suas características permitem a utilização de grupos P3 volumosos, aumentando assim a seletividade frente a outras enzimas, como a catespina S, que apresenta um subsítio S3 menor e delimitado. Uma vez que diversos grupos são tolerados em P3 sem perda de potência, pode-se explorar essa região como moduladora de propriedades físico-químicas e biológicas, como lipofilia e estabilidade metabólica (21,34).

Por fim, o subsítio S1', assim como S2, pode acomodar substituintes volumosos, como anéis aromáticos substituídos, mas também possibilita a formação de ligações de hidrogênio (21). Alguns exemplos de cisteíno proteases para as quais foram desenvolvidos melhores inibidores com alterações em P1' são, além da cruzaína, a catespina B e a calpaína (39).

1.3 O uso de inibidores de cruzaína para o tratamento da doença de Chagas

Diversos estudos prévios demonstraram a eficácia da estratégia de utilizar inibidores de cisteíno proteases para o tratamento de doenças como câncer, diabetes,

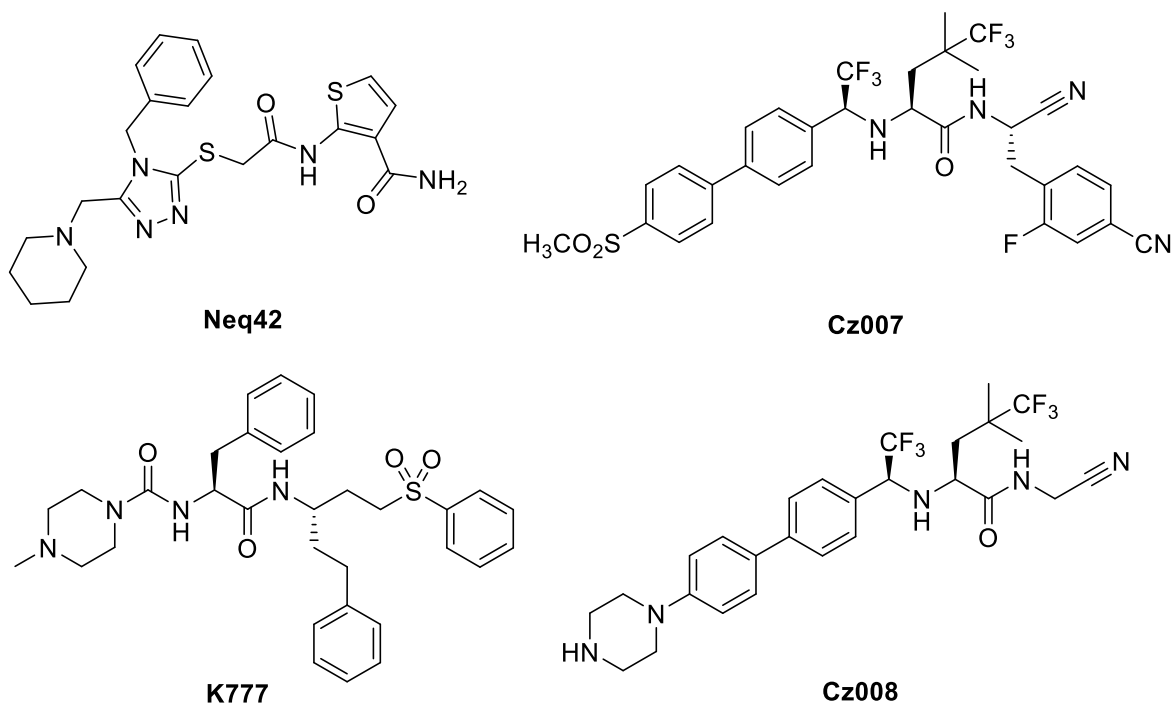
AIDS, artrite e doenças parasitárias (19,40–44). Estima-se que cerca de 5 a 10% dos alvos biológicos para fármacos em desenvolvimento sejam proteases, e que as vendas de medicamentos baseados em inibidores de proteases estejam na casa dos bilhões de dólares (45).

Nos tripanossomas, diferente do que ocorre em humanos, observa-se uma falta de redundância das cisteíno proteases, o que significa que a inativação de uma protease não é compensada por outros mecanismos, levando a uma falha metabólica e consequente morte do parasito. Por isso, a inibição dessa classe de enzimas é uma estratégia interessante no combate à doença de Chagas (34,46). A validade dessa abordagem foi comprovada em um estudo de prova de conceito (do inglês *proof-of-concept*) em que animais infectados por parasitos foram tratados com inibidores irreversíveis seletivos para cruzaina. O trabalho demonstrou o acúmulo de cruzaina não-processada no complexo de Golgi do tripanossoma, impedindo sua proliferação e diferenciação, e resultando em cura parasitológica e aumento da sobrevivência dos animais (12,13,16,46–48).

Curiosamente, em alguns trabalhos foi observada uma ausência de correlação entre atividade inibitória na enzima e eficácia tripanossomicida (44,49,50). Algumas explicações são possíveis para esse fenômeno, dentre elas: dificuldade do fármaco em atravessar as membranas celulares, degradação (instabilidade metabólica) e acúmulo em organelas, como lisossomos, no caso de moléculas com características básicas (16,44). Em outros casos, de forma oposta, podem ser observadas altas atividades anti-tripanosossoma mesmo que os ensaios enzimáticos tenham apresentado baixos valores de afinidade. Isso pode ser atribuído a uma falta de seletividade do inibidor, que deve interferir em outras vias do metabolismo do parasito, ou mesmo a um efeito de citotoxicidade geral, pela geração de intermediários reativos (44).

A Figura 4 apresenta alguns inibidores de cruzaina conhecidos, codificados de acordo com o trabalho em que foram publicados.

Figura 4. Estruturas de alguns inibidores de cruzaina.



Fonte: Adaptado de (2, 35).

1.4 Estratégias para o planejamento de inibidores de cruzaina

1.4.1 Inibidores peptídicos

Tendo em vista que um inibidor enzimático deverá interagir com um sítio ativo altamente seletivo, é natural que se utilize o substrato natural da enzima para iniciar a busca por um composto bioativo. Historicamente, o desenvolvimento de inibidores de cruzaina evoluiu a partir de dipeptídeos ou tripeptídeos reconhecidos pela enzima, modificados pela adição de um grupo eletrofílico que, após o ataque nucleofílico do átomo de enxofre da cisteína, forma uma ligação covalente estável, bloqueando o sítio ativo e impedindo o funcionamento da enzima (9,29,38). Essa estratégia tem mostrado resultados positivos, existindo inibidores peptídicos com alta atividade frente à cruzaina (28,40,49).

Inibidores de enzimas podem ser classificados levando em conta a presença ou ausência de ligação covalente entre o inibidor e a enzima, ou à reversibilidade da interação com o sítio, havendo, nesse caso, duas possibilidades: os inibidores reversíveis e os irreversíveis. Os inibidores desenvolvidos para a cruzaína são, em sua maioria, do tipo covalente irreversível. Entretanto, cada vez mais no planejamento de fármacos para o tratamento de doenças crônicas, tem sido evitado o uso de fragmentos que produzam inibidores irreversíveis. Isso porque esse tipo de estrutura é mais susceptível à promiscuidade e toxicidade, devido à formação de adutos com moléculas contendo átomos nucleofílicos, como a glutatona e diversas proteínas. Esses adutos podem apresentar propriedades alergênicas e provocar uma resposta imunológica no paciente (21,26,30,40,43). Assim, considerando que inibidores irreversíveis de cruzaína já se mostraram eficazes em eliminar a doença, abre-se o caminho para o desenvolvimento de uma segunda geração de inibidores que, sendo reversíveis, podem proporcionar maior eficácia e biodisponibilidade oral, além de menor toxicidade (34,50).

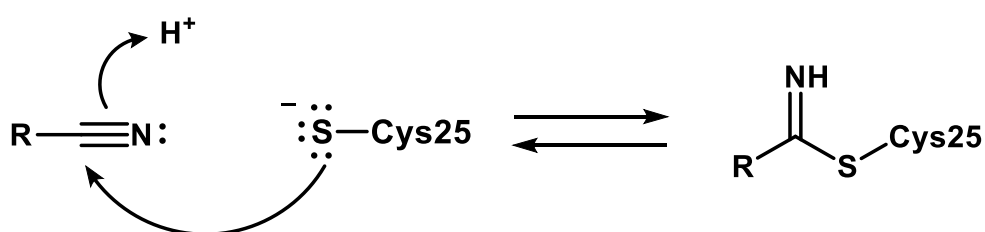
Apesar dos pontos negativos apresentados pelos inibidores irreversíveis, deve-se destacar que inibidores covalentes possuem propriedades atraentes, como ação rápida e prolongada, maior potência, possibilidade de explorar interações em regiões planas e convexas da enzima e atividade persistente, mesmo após a ocorrência de mutações no alvo molecular (26,45,49). Dessa forma, conclui-se que, do ponto de vista farmacológico, a produção de inibidores covalentes reversíveis apresenta-se como uma abordagem interessante. A ideia parece contraditória à primeira vista, uma vez que, em geral, a formação de ligação covalente implica em estabilidade e, conseqüentemente, irreversibilidade da interação inibidor-enzima. Entretanto, com a escolha adequada de um grupo funcional para formar essa ligação, é possível o desenvolvimento de inibidores covalentes reversíveis para a cruzaína.

1.4.2 O grupo funcional nitrila em inibidores covalentes reversíveis

Inibidores covalentes, que levam à formação de uma ligação com o resíduo de cisteína do sítio ativo das cisteíno proteases, devem apresentar um grupo funcional

eletrofílico, ao qual se dá a denominação de *warhead* (40). Os *warheads* são importantes não somente para bloquear o átomo nucleofílico do sítio ativo, mas também porque funcionam como uma âncora que mantém o restante da molécula posicionado de forma mais eficiente para a interação com os subsítios. Diversos grupos podem ser usados para esse fim, como aldeídos, fluorometilcetonas e vinil-sulfonas (16,28,40). Todavia, o grupo nitrila ($-C\equiv N$) é um dos *warheads* mais empregados para inibidores de cisteína proteases, devido a sua alta estabilidade metabólica, seletividade frente a serino proteases e por ser reativo o suficiente para formar um intermediário covalente com o grupo tiol da cisteína, denominado tioimidato, sem apresentar instabilidade metabólica (21,34,41,42,49,51–53). Além disso, apesar de haver ligação covalente no sítio ativo, a reação é geralmente reversível, e os inibidores são do tipo competitivo (28,41,49). O mecanismo de formação do tioimidato na cruzaina é semelhante ao da reação de hidrólise peptídica: após a acomodação do inibidor no sítio ativo, ocorre a formação do par iônico, seguida do ataque do átomo de enxofre do resíduo Cys25 ao carbono da nitrila (29). Estudos computacionais demonstraram que o ataque nucleofílico ao carbono da nitrila ocorre concomitantemente à transferência de próton da histidina para o átomo de nitrogênio da nitrila (28). O Esquema 3 apresenta a reação de formação de um grupo tioimidato.

Esquema 3 - Mecanismo da formação do tioimidato.

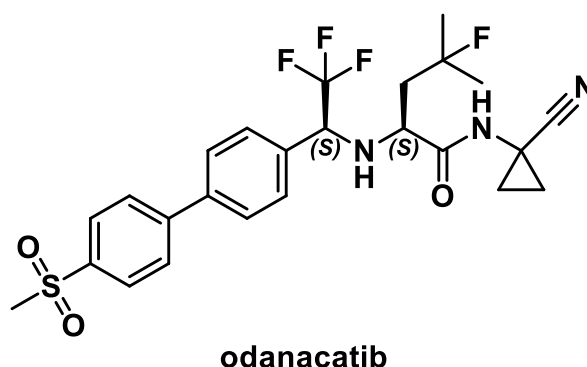


Fonte: Adaptado de (25).

Compostos que possuem uma estrutura peptídica e um *warhead* nitrila são denominados peptidilnitrilas. Esse tipo de estrutura foi explorado como inibidor de diversos tipos de cisteína proteases, como cruzaina (*T. cruzi*), rodesaina (*T. brucei*), LmCPB (*Leishmania mexicana*) e catepsinas humanas, como B, S e K (28,41,48,49,52–56). Para essa última, associada à progressão da osteoporose, foi

desenvolvido um inibidor derivado de uma dipeptidilnitrila (peptídeomimético) que atingiu a fase clínica III, denominado odanacatib, cuja estrutura é apresentada no Figura 5.

Figura 5 - Odanacatib, um inibidor de catepsina K com estrutura derivada de uma peptidilnitrila.



Fonte: Adaptado de (56).

O grupo nitrila não está presente somente em inibidores de cisteína proteases, podendo ser encontrado, por exemplo, em fármacos para o tratamento de diabetes, hipertensão e AIDS (57).

1.4.3 Características de substituintes em inibidores de cruzaina

Os subsítios de ligação na cruzaina permitem a utilização de estratégias de planejamento racional de fármacos com base nas interações dos inibidores com cada região da enzima, conforme mostrado na Figura 3. A seguir, serão discutidas especificidades das regiões mais relevantes de inibidores de cruzaina.

O substituinte P1 em dipeptidilnitrilas situa-se entre o *warhead* nitrila e o nitrogênio de uma ligação peptídica. Sabe-se que átomos de carbono adjacentes a grupos insaturados são pontos susceptíveis a oxidação metabólica, e que existe uma relação entre a energia de dissociação da ligação C–H e a facilidade de oxidação (58). Esses fatores explicam a instabilidade observada quando se utiliza o grupo metileno

nessa posição. Dessa forma, evidencia-se que os grupos P1, idealmente, não devem possuir átomos de hidrogênio no carbono adjacente à nitrila.

Verificou-se que tanto a cruzaina quanto sua isoforma cruzipaina-2 hidrolisam preferencialmente peptídeos contendo os resíduos básicos arginina ou lisina na posição P1 (23), sendo que grupos análogos à fenilalanina também se apresentaram superiores a inibidores sem grupos nessa posição (34). Assim, é comum empregar substituintes volumosos, como grupos aromáticos, nessa posição, e já foi proposto que grupos pequenos, como a ciclopropila, na posição P1 seriam inadequados para interagir com o subsítio S1 da cruzaina (50). Entretanto, resultados anteriores do NEQUIMED questionam essa sugestão. Em um dos trabalhos do grupo foi observado que a substituição de um grupo metileno por ciclopropila em P1 levou a um aumento na potência de inibição de cruzaina de 0,3 a 0,4 unidades logarítmicas (40) e que o grupo ciclopropila na posição P1 aumentou a estabilidade metabólica e melhorou o perfil farmacocinético das moléculas, além de manter a hidrofobicidade em P1, algo característico de inibidores de cruzaina (59,60). Outro resultado interessante de calorimetria de titulação isotérmica demonstrou que esse grupo contribuiu para uma diminuição na contribuição entrópica desfavorável presente nos inibidores explorados (28).

O subsítio S2 é o principal determinante da seletividade entre as cisteíno proteases. Apesar de poder acomodar substituintes apolares e polares (básicos), já foi demonstrado que espécies fluorogênicas contendo em suas cadeias laterais grupos hidrofóbicos positivamente carregados são menos susceptíveis à hidrólise pela cruzaina, não havendo, portanto, um eficiente reconhecimento do substrato pela enzima (61). Além disso, foi observada uma preferência pelo aminoácido fenilalanina em P2 para a cruzaina, enquanto sua isoforma cruzipaina-2 apresentou uma preferência por leucina, uma característica presente em enzimas como as catepsinas S e K, mas ausente nas catepsinas B, F e L (23). Em outro estudo de SAR, foi produzido um potente inibidor de cruzaina contendo o grupo valina em P2 (62). Também já foi demonstrada a afinidade dessa região por grupos não-naturais, como ciclobutila (21), cicloexila (38), cicloexilalanina (63) e β -sulfonila (64).

Esses dados sugerem a manutenção de aminoácidos apolares e volumosos em P2, no lugar da utilização de aminoácidos básicos, que nem sempre se apresentam adequados para a inibição da cruzaina. É válido ressaltar que muitas informações a

respeito de inibidores peptídicos e peptideomiméticos derivam do desenvolvimento do odanacatib. Os estudos metabólicos de um de seus precursores mostraram a necessidade de se bloquear certos pontos de metabolismo que, uma vez oxidados, levavam a uma ciclização intramolecular, com perda do grupo nitrila. Esses pontos são o grupo metileno adjacente à nitrila e a cadeia lateral correspondente ao grupo P2 (21,65).

Por sua vez, a região S3 da cruzaina é menos explorada no desenvolvimento de inibidores, mas também permite a realização de interações favoráveis, como uma ligação de hidrogênio com a Ser61 (52). Devido a suas características, como ser mais plana que outras regiões, diversos tipos de grupos podem ser utilizados em P3 sem prejuízo de atividade. Por isso, substituintes nessa região são classicamente explorados para melhorar propriedades farmacológicas, como estabilidade e solubilidade (52).

Finalmente, com relação a P1', já foram demonstrados inibidores potentes que sequer possuíam grupos nessa posição (21). Entretanto, comparando diferentes isoformas da cruzaina, observou-se uma maior especificidade da cruzipaina-2 quando comparada com cruzipaina-1 ou r-cruzaina para substituintes em P1', havendo preferência por grupos como Leu e Phe, enquanto as outras isoformas aceitam igualmente Leu, Phe, Ala e Arg (23).

1.5 Peptideomiméticos e bioisósteros

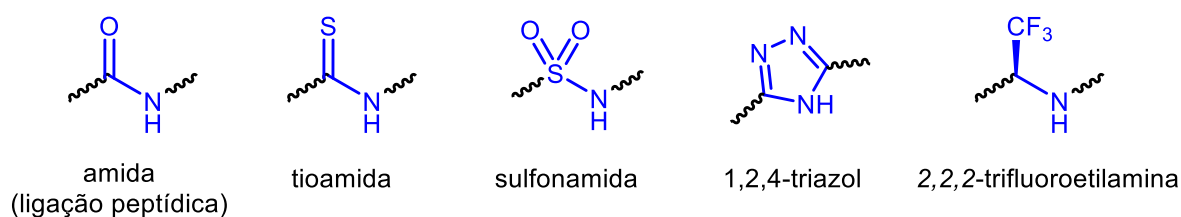
Apesar das claras vantagens em termos de reconhecimento molecular, os inibidores peptídicos apresentam também pontos negativos, associados a sua baixa biodisponibilidade e à labilidade da ligação peptídica, facilmente hidrolisável (2,30,35,38,66). Dessa forma, uma vez encontrada uma estrutura peptídica com atividade satisfatória, faz-se necessária uma otimização dessa estrutura, utilizando um conceito recorrente em química medicinal: os bioisósteros.

Bioisósteros são grupos que, por apresentarem semelhança física e química (como polaridade, volume, forma e distribuição eletrônica) com grupos funcionais

presentes em moléculas bioativas, produzem aproximadamente a mesma resposta biológica, apesar de apresentarem outras propriedades relevantes alteradas (60,67). O emprego de bioisósteros leva a modificações na estrutura de um composto protótipo, podendo gerar derivados mais seguros e eficazes, aumentar a estabilidade metabólica e a solubilidade em água, e diminuir a toxicidade (60,67–69). Além disso, sabe-se que, em geral, diminuindo o caráter peptídico de um inibidor, aumenta-se sua biodisponibilidade (67). No caso da doença de Chagas essas mudanças são importantes, uma vez que se recomenda que novos tratamentos sejam administrados por via oral.

Para substituir uma ligação peptídica por um bioisótero, produzindo assim um composto peptideomimético, é necessário compreender as interações que ocorrem entre o inibidor e a enzima. Estruturas cristalográficas ou simulações computacionais podem ser utilizadas para identificar essas interações. Em dipeptidilnitrilas, foi demonstrada a formação de uma ligação de hidrogênio entre o grupo NH da ligação peptídica e o oxigênio de um resíduo de glicina (Gly66), importante para a atividade dos inibidores. Dessa forma, é desejável que o bioisótero apresente um grupo capaz de doar ligação de hidrogênio, como OH ou NH. A Figura 6 apresenta alguns exemplos de possíveis bioisósteros da ligação peptídica, com destaque para o grupo doador de ligação de hidrogênio.

Figura 6 – A ligação peptídica e alguns de seus bioisósteros.



Fonte: Adaptado de (60).

Desses grupos, a 2,2,2-trifluoroetilamina (TFEA) se destaca, tendo sido descrita pela primeira vez no ano 2000 como bioisótero da ligação peptídica (70–73). O grupo TFEA pode ser comparado ao intermediário tetraédrico formado durante a hidrólise de um peptídeo, com a presença de um carbono sp^3 ligado a um grupo eletronegativo

(CF₃ no lugar de O⁻) e preservando o átomo de nitrogênio que, assim como na ligação peptídica, não apresenta um significativo caráter básico, por estar próximo a um grupo que retira elétrons. Essa última propriedade é especialmente relevante, uma vez que a formação de uma espécie protonada não seria adequada para um inibidor enzimático, levando em conta que o ganho energético devido à interação inibidor-enzima, em geral, não compensa o custo envolvido na dessolvatação de uma espécie carregada (60,62,74,75). Além disso, ocorre a manutenção do grupo NH entre P2 e P3, que forma a ligação de hidrogênio com o grupo carbonila do resíduo Gly66 da cruzaina (76). O grupo TFEA também apresenta como vantagem o fato não ser hidrolisável, o que contribui para aumentar a estabilidade metabólica do composto.

Black et al. (75) demonstraram que a substituição da ligação peptídica pelo grupo TFEA entre os fragmentos P2 e P3 de inibidores de catepsina K manteve interações relevantes com a enzima, e obtiveram compostos mais estáveis, biodisponíveis e de 10 a 20 vezes mais potentes que os peptídicos correspondentes. O desenvolvimento desse trabalho culminou com a síntese do odanacatib, um potente inibidor de catepsina K (56). Outro trabalho demonstrou que a utilização desse grupo em inibidores de catepsina S produziu inibidores potentes (valores de IC₅₀ da ordem de nanomolar) que, curiosamente, são insensíveis à configuração absoluta do carbono assimétrico (77). Diversos trabalhos também demonstraram o uso do grupo TFEA em inibidores de cisteíno proteases (34,44,62).

Estudos de docagem molecular demonstraram que o grupo CF₃ localizado entre os substituintes P2 e P3 em inibidores de cruzaina está sempre exposto ao solvente, sugerindo mais uma função interessante desse grupo, que é forçar a aproximação do substituinte em P3 à superfície S3, favorecendo interações ligante-receptor (32). Entretanto, vale ressaltar que o grupo TFEA possui um átomo de carbono assimétrico, o que pode ser considerado um ponto negativo, devido à necessidade de síntese e purificação de apenas um estereoisômero para ensaios biológicos. Além disso, nem todas as ligações peptídicas podem ser substituídas por um grupo TFEA. Black et al. (75) constataram que, em inibidores de catepsina K, o grupo amida entre P2 e P3 podia ser substituído pelo grupo TFEA sem perda de atividade, mas o mesmo não era verdadeiro para a ligação peptídica entre P1 e P2, já que tanto o par de elétrons do grupo carbonila quanto o hidrogênio do grupo NH estavam envolvidos em ligações de

hidrogênio. Todavia, os autores não observaram hidrólise dessa ligação peptídica em compostos contendo o grupo TFEA entre P2 e P3.

Outra estratégia comum de substituição bioisostérica está relacionada à característica comum ao átomo de hidrogênio (H) e os halogênios (X), que é a monovalência. Essa propriedade possibilita a realização de substituições pontuais na estrutura de um composto, utilizando um precursor contendo um halogênio no lugar do hidrogênio. A natureza dessa substituição é muito interessante do ponto de vista de SAR, já que essa troca de átomos pode levar a grandes mudanças nas características da molécula, uma vez que os halogênios apresentam propriedades físico-químicas distintas do hidrogênio, podendo impactar no encaixe da molécula no sítio ativo, na presença ou ausência de interações polares e na estabilidade metabólica (67–69,78,79).

Dentre os halogênios, o flúor (raio de van der Waals = 1,4 Å) é o que mais se aproxima do hidrogênio (raio de van der Waals = 1,2 Å) em tamanho, o que explica o fato de que a substituição de átomos de H por F é uma estratégia comum para modular diversas propriedades de candidatos a fármacos. Em geral, a razão por trás dessa substituição em um contexto de SAR é bloquear pontos de metabolismo, por meio da substituição de ligações C–H susceptíveis a oxidação, tendo em vista que a ligação C–F é praticamente inerte sob as mais diversas condições biológicas. Além disso, a introdução de átomos de F em anéis aromáticos faz com que esses, naturalmente susceptíveis a oxidação a compostos fenólicos, sejam desativados frente a reações de metabolismo oxidativo (58,60,68,69,78–80). Entretanto, os efeitos da substituição H/F não se limitam às propriedades farmacocinéticas, uma vez que o flúor também pode alterar marcadamente propriedades físico-químicas e biológicas quando introduzido em uma molécula (60,68,69,78,79).

O flúor, por ser muito eletronegativo, polariza a densidade eletrônica de átomos ricos em elétrons, podendo diminuir a basicidade ou aumentar a acidez de grupos próximos. Além disso, a lipofilia da molécula também é alterada com a introdução desse elemento, de maneira menos previsível, mas geralmente se observa um aumento no valor de $\log P_{o/w}$, o que pode aumentar a atividade inibitória do composto, de modo não específico (69). Átomos de flúor também podem provocar alterações conformacionais na molécula, levando-a a adotar uma posição que favorece interações entre o inibidor e o alvo (58,60,67,69,78,79). Já do ponto de vista biológico,

sabe-se que a substituição H/F pode levar, por exemplo, a alterações no desempenho *in vivo* e na permeabilidade nas membranas celulares (60,74).

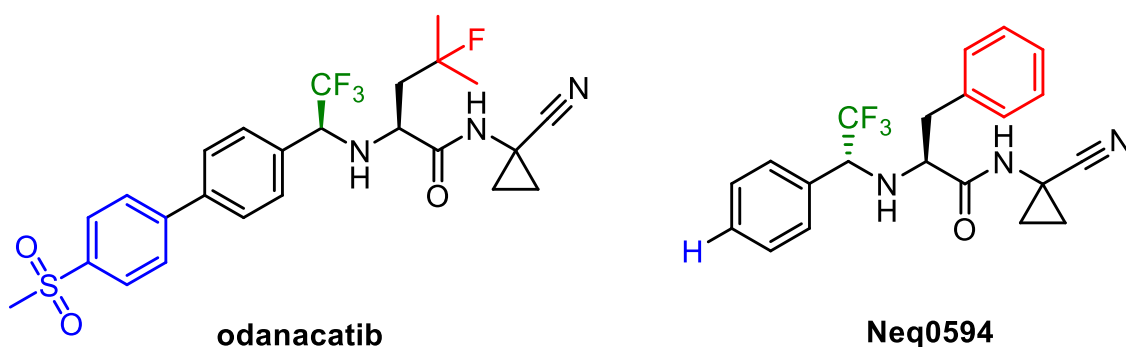
1.6 Composto protótipo e relação estrutura-atividade

Dada a natureza deste trabalho, é importante que seja feita uma breve explicação dos conceitos composto protótipo (em inglês: *lead compound*) e relação estrutura-atividade (em inglês: *structure-activity relationship, SAR*). Em química medicinal, são raros os exemplos em que um medicamento é “descoberto”. Usualmente, ensaios celulares com produtos naturais ou a síntese de compostos derivados de modelos computacionais fornecem algumas moléculas que apresentam atividade biológica alta o suficiente para serem consideradas interessantes do ponto de vista medicinal, mas que não dispõem de outras propriedades adequadas para um fármaco. Esses são os compostos protótipo, a partir dos quais os químicos medicinais derivam as próximas gerações de moléculas, realizando alterações na estrutura original, visando à obtenção de um novo candidato a fármaco com atividade igual ou maior que a do protótipo, além de outras características apropriadas para um medicamento de uso humano. Dentre os parâmetros para os quais se busca otimização, destacam-se: potência, seletividade, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Essas modificações em uma estrutura molecular, que levam a diferentes atividades biológicas, estabelecem o conceito de relação estrutura-atividade (32,58).

Em geral, espera-se que pequenas modificações químicas em um composto levem a variações na atividade biológica igualmente pequenas. Entretanto, exceções para essa regra existem e são denominadas de falésias de atividade (em inglês: *activity cliffs*), uma vez que correspondem a uma descontinuidade na SAR, ou seja, uma pequena mudança na estrutura leva a uma grande alteração na atividade de uma substância, seja no sentido de aumentá-la ou de diminuí-la. Em ambos os casos, a presença de uma falésia de atividade é um ponto importante a ser investigado, pois fornece informações a respeito da interação entre um inibidor e o sítio ativo da enzima (81).

Utilizando a estratégia de desenvolver um composto a partir de uma estrutura bem-sucedida, o grupo NEQUIMED/IQSC/USP produziu o composto Neq0594, com base no odanacatib, um inibidor seletivo de catepsina K. A estrutura, obtida por meio da estratégia de simplificação molecular, é apresentada na Figura 7.

Figura 7 - Estruturas do odanacatib e do composto protótipo Neq0594, com destaque para as modificações realizadas na estrutura do odanacatib para a concepção do Neq0594.



Fonte: Adaptado de (44).

Apesar de não ser um bom inibidor de cruzaina ($pK_i = 5,6 \pm 0,07$), o Neq0594 apresentou uma elevada potência tripanossomicida para a cepa *CL Brener* do *T. cruzi* ($pEC_{50} = 6,9 \pm 0,08$), sendo cerca de 20 vezes mais potente que o benzonidazol (44). Entretanto, sua estrutura apresenta dois anéis aromáticos monossustituídos, que são vulneráveis a metabolismo oxidativo. Dessa forma, as propriedades do Neq0594 tornam-no um excelente exemplo de composto protótipo, a partir do qual podem ser desenvolvidos derivados com propriedades mais atraentes do ponto de vista medicinal, como estabilidade, biodisponibilidade e menor toxicidade.

1.7 Objetivos gerais

Planejar e executar a síntese de derivados do composto protótipo Neq0594, um peptidomimético inibidor da enzima cruzaina e agente anti-*T. cruzi*. Determinar a atividade e potência inibitória para a cruzaina e enzimas análogas, bem como as principais interações com a cruzaina, empregando métodos de dinâmica molecular.

1.8 Objetivos específicos

- Planejamento de novas entidades químicas candidatas a inibidores da enzima cruzaina, com base no composto protótipo Neq0594. Os compostos propostos apresentam estrutura de dipeptidilnitrilas, com um grupo TFEA substituindo a ligação peptídica entre P2 e P3.

- Planejamento e execução das rotas de síntese para as moléculas propostas;

- Caracterização das moléculas sintetizadas com as seguintes técnicas: ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 e de carbono-13, espectroscopia no infravermelho, espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência, polarimetria e temperatura de fusão;

- Determinação da atividade e seletividade dos compostos por meio de ensaios fluorimétricos de inibição frente à cruzaina e a outras enzimas da família da papaína, como LmCPB e catepsina L, e em ensaios biológicos contra o *T. cruzi*;

- Identificação das principais interações entre os compostos e a cruzaina, realizando simulações com o método de dinâmica molecular.

2 Parte experimental

2.1 Síntese

2.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes foram utilizados sem tratamento prévio, exceto quando explicitamente mencionado. Todas as reações realizadas em solvente não-aquoso foram feitas sob atmosfera de argônio e em vidraria seca em estufa a 120 °C. Os solventes dimetoxietano (DME) e tetraidrofurano (THF) foram destilados com sódio metálico e benzofenona, e armazenados sobre peneira molecular. A acetonitrila foi destilada com hidreto de cálcio e armazenada sobre peneira molecular. O metanol e a dimetilformamida (DMF) foram utilizados sem tratamento. A diisopropiletilamina (DIPEA) foi destilada e armazenada em um frasco de vidro dentro de um recipiente contendo cloreto de cálcio.

2.1.2 Monitoramento de reações e purificação

Para acompanhar o progresso das reações foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de alumínio *Sigma-Aldrich* cobertas com uma matriz de sílica-gel e indicador fluorescente (254 nm), utilizando os seguintes agentes reveladores: iodo com sílica, solução de ácido fosfomolibdico em etanol, solução de vanilina e ácido sulfúrico em etanol ou solução de ninidrina em etanol.

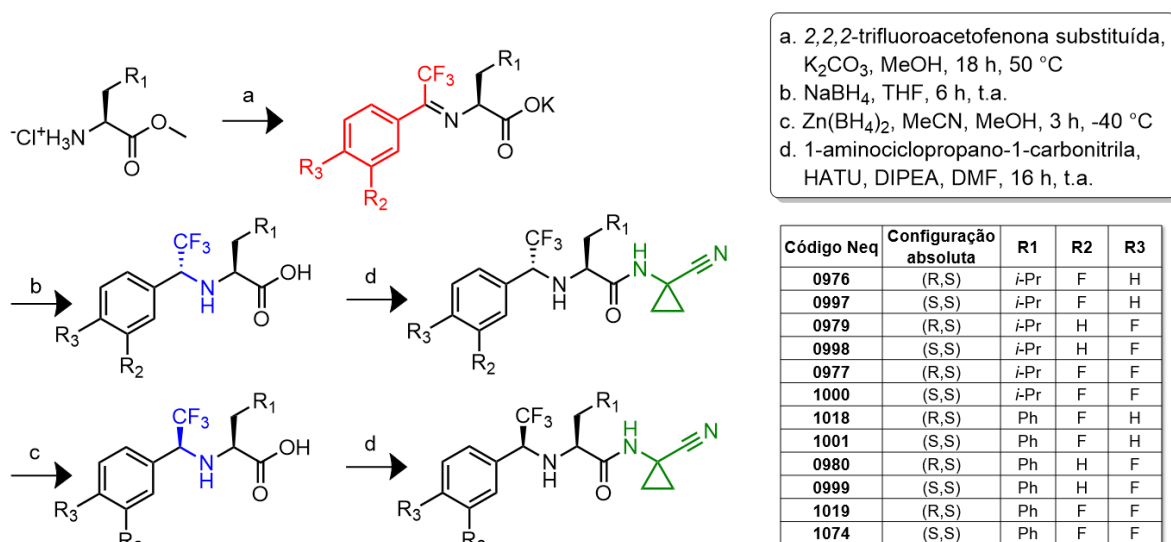
A purificação dos compostos foi feita utilizando coluna cromatográfica de sílica-gel, com uma mistura de acetato de etila e hexano como eluente. Quando necessário, empregou-se a técnica de recristalização a partir de uma solução do produto em diclorometano, à qual se adicionou hexano até a formação de turbidez.

Nos casos em que os compostos não apresentaram pureza maior que 95%, foi realizada a purificação cromatográfica em coluna analítica, pelo doutorando Pedro Batista, em um instrumento *Shimadzu Prominence HPLC System* (Quioto, Japão). Primeiramente, foi utilizada uma coluna quiral analítica *cellulose-2 Phenomenex* (tamanho de partícula 5 μm , 250 mm x 4,6 mm I.D., volume de injeção de 20 μL), para encontrar o método analítico que separava adequadamente o produto majoritário de seus contaminantes. Em seguida, cerca de 50 mg do produto impuro foram solubilizados em metanol (*Panreac*, grau HPLC) e a solução foi injetada em porções de 50 μL em uma coluna quiral semipreparativa *cellulose-2 Phenomenex* (tamanho de partícula 5 μm , 250 mm x 10 mm I.D.). Em ambos os casos, utilizou-se eluição por gradiente de uma mistura de metanol e água (variando de 50 a 100% por 30 min). A quantificação dos sinais foi feita com um detector DAD, de 200 a 800 nm.

2.1.3 Rotas de síntese

Com base na síntese do Neq0594, do seu isômero (S,S), o Neq0631, e na bibliografia consultada (44,74,82), as seguintes rotas foram propostas para as moléculas do projeto (Esquema 4).

Esquema 4 - Rotas de síntese propostas para a realização do projeto.



Fonte: Autoria própria.

Detalhes a respeito das etapas da síntese serão discutidos na parte de Resultados e Discussão. A descrição dos procedimentos utilizados e as moléculas preparadas, com seus respectivos dados das caracterizações, são apresentadas no Anexo.

2.2 Caracterização

2.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As caracterizações por espectroscopia de RMN-¹H e RMN-¹³C foram realizadas pelos técnicos Dra. Sylvana Agostinho e André Tognon da Central de Análises Químicas do IQSC/USP utilizando espectrômetros *Agilent Technologies*, modelos 400/54 e 500/54, operando nas frequências 400 MHz para ¹H e 101 MHz para ¹³C ou 500 MHz para ¹H e 126 MHz para ¹³C, respectivamente. Na interpretação dos espectros, os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) utilizando como padrão interno o TMS (0 ppm para ¹H e ¹³C) ou, na ausência deste, o deslocamento químico do sinal do solvente: clorofórmio deuterado (CDCl₃: 7,26 ppm para ¹H e 77,16 ppm para ¹³C) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆: 2,50 ppm [quinteto, $J_{HD} = 1,9$ Hz] para ¹H e 39,52 ppm para ¹³C) (83). Nos espectros de RMN-¹H em que o sinal do solvente estava sobreposto por um sinal da molécula, utilizou-se o deslocamento de 5,30 ppm para o diclorometano residual (83). As constantes de acoplamento (J) são expressas em Hz. As multiplicidades dos sinais de ¹H e ¹³C são indicadas seguindo a convenção: s (singleto); d (dubleto); dd (duplo dubleto); ddd (duplo duplo dubleto); t (tripleto); dt (duplo tripleto); q (quarteto); p (quinteto); m (multipeto). A utilização da letra b indica sinal alargado.

2.2.2 Pureza por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A verificação da pureza por HPLC foi realizada pelo doutorando Pedro Batista em um instrumento *Shimadzu Prominence HPLC System* (Quioto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas *Amazon Ion Trap* (*Bruker*, Bremen, Alemanha) no modo ionização por *electrospray* (ESI) em modo positivo. O sistema cromatográfico é equipado com bombas *LC-20AT* e *LC-20AD*, um amostrador automático *SIL-20A HT*, um detector *DAD SPDM20A* e um coletor de frações *FRC-10A*. Os dados foram adquiridos e processados no software *LCsolution*, versão 1.26 SP5.

O protocolo de verificação da pureza das amostras consistiu no preparo de uma solução de concentração igual a $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ do composto em metanol, da qual foram injetados $20 \text{ }\mu\text{L}$ em uma coluna analítica *Chiralpak IC*, $250 \times 4,6 \text{ mm}$, tamanho de partícula $5 \text{ }\mu\text{m}$. Para a corrida cromatográfica foi utilizado um gradiente de ACN/H₂O da seguinte forma: de 0 a 30 min, a porcentagem de água na fase móvel variou de 5 a 100%; de 30 a 40 min, manteve-se a 100% de água e; de 40 a 50 min, 5% de água. O fluxo utilizado foi de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e a temperatura, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os espectros de massa foram obtidos nas seguintes condições: voltagem do capilar de 4500 V, temperatura do capilar de $300 \text{ }^\circ\text{C}$, pressão do nebulizador de 35 psi e fluxo de gás seco de $9,0 \text{ mL min}^{-1}$.

2.2.3 Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos pela técnica Dra. Silmara Buchviser do IQSC/USP em um espectrômetro de massas de alta resolução *Thermo Scientific LTQ Velos Orbitrap*, operando no modo ionização por *electrospray* (ESI). Para a realização das análises, foram pesados $0,3 \text{ mg}$ de cada composto em uma balança de precisão (*Sartorius*, *CPA26P*). Em seguida, foram preparadas soluções das amostras em metanol (*LiChrosolv*, grau MS), na concentração de 5 ppm, para injeção no modo inserção direta, utilizando um fluxo de $5 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. A voltagem do *spray* utilizada foi de $3,00 \text{ kV}$ e a temperatura, de $90 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de transmitância no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro *FT-IR Bruker*, modelo *ALPHA II*, com janela de seleneto de zinco (ZnSe). As amostras (cerca de 1 mg) foram solubilizadas em clorofórmio (*Synth*, P.A.) e depositadas sobre a janela de ZnSe. Os espectros foram adquiridos após a evaporação do solvente, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , e processados no *software* do equipamento.

2.2.5 Ponto de fusão

Os intervalos de temperatura que vão do início ao término da fusão de cada composto foram determinados em um instrumento *Microquímica Equipamentos*, modelo *MQAPF-302*, com termômetro não aferido e não foram corrigidos.

2.2.6 Polarimetria

Os valores de rotação específica dos produtos foram medidos em um polarímetro *Jasco*, modelo *P2000*, no comprimento de onda de 589 nm, a linha D de uma lâmpada de sódio, na temperatura de 23 °C. Cerca de 10 mg de cada composto foram pesados em uma balança de precisão (*Sartorius*, modelo *CPA26P*) e totalmente dissolvidos em metanol (*Panreac*, grau HPLC). O valor fornecido pelo instrumento (α = rotação observada, em graus) foi utilizado para o cálculo do valor reportado utilizando a fórmula $[\alpha]_D^{23} = \alpha / \ell c$ (graus $\text{mL g}^{-1} \text{dm}^{-1}$, aqui reportadas em graus, conforme a convenção), na qual: ℓ = caminho óptico de 0,1 decímetro e c = concentração em g mL^{-1} . As medidas de $[\alpha]_D^{23}$ podem ser encontradas no Anexo, com indicação do solvente utilizado e a concentração, em g mL^{-1} .

2.3 Cálculo de descritores físico-químicos

Diversos parâmetros físico-químicos relevantes na química medicinal foram calculados para moléculas do projeto e outras relacionadas utilizando o *website SwissADME*, desenvolvido pelo Grupo de Modelagem Molecular do SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*) (84).

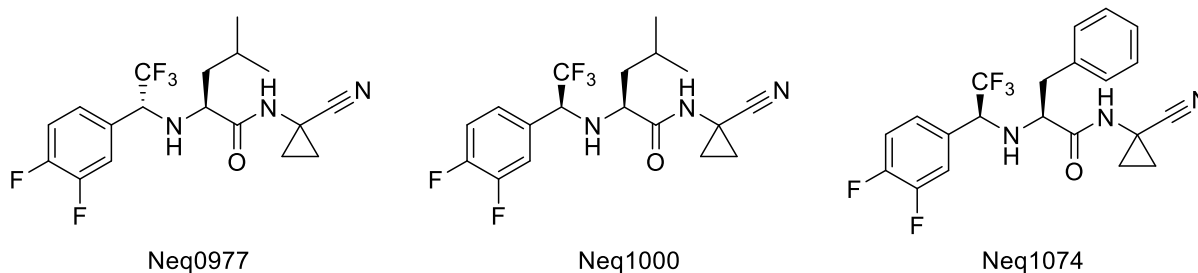
2.4 Ensaio bioquímico e biológico

Os ensaios bioquímicos para determinar a constante de inibição (K_i) dos compostos foram realizados pelo mestrando Rodrigo Cendron para as três enzimas: cruzaina, LmCPB e catepsina L, conforme descrito na literatura (44,49).

2.5 Dinâmica molecular

Simulações computacionais utilizando o modelo de dinâmica molecular foram realizadas para os compostos Neq0977, Neq1000 e Neq1074 em ligação covalente com a enzima cruzaina, cujas estruturas são mostradas na Figura 8. Esses compostos foram selecionados pois permitem a comparação por pares moleculares, levando em conta duas modificações: a estereoquímica do grupo TFEA (par Neq0977 e Neq1000) e o grupo P2 (par Neq1000 e Neq1074).

Figura 8 - Estruturas dos compostos Neq0977, Neq1000 e Neq1074.



Fonte: Autoria própria.

Para preparar a enzima cruzaina para as simulações, foi selecionada uma estrutura de alta resolução (*PDB: 3I06*) (85) no banco de dados *Protein Data Bank* (*PDB*). Utilizando o programa *VMD* (86), essa estrutura foi sobreposta a uma outra estrutura da cruzaina, de menor resolução, mas que possuía em seu sítio ativo uma dipeptidilnitrila (*PDB: 4KLB*) (2). Isso foi feito para garantir que a conformação inicial da enzima fosse adequada para acomodar os compostos do projeto, análogos a dipeptidilnitrilas. Por fim, foram adicionados os átomos de hidrogênio à enzima utilizando o programa *PROPKA 3.1* (87,88), considerando pH de 7,0 para os resíduos ionizáveis. A partir da estrutura do inibidor presente no sítio ativo da enzima *4KLB*, foram preparadas as estruturas dos compostos para as simulações, utilizando o programa *Avogadro* (89), gerando assim um arquivo *.pdb* do inibidor ligado covalentemente à cisteína Cys25.

O preparo do sistema foi feito utilizando programas dentro do pacote *Amber18* (90). O cálculo das cargas parciais dos átomos do ligante foi feito com o método *AM1-BCC* no programa *antechamber* (91) e, em seguida, foi preparado o sistema completo com a enzima e o ligante no programa *tleap*. O sistema foi solvatado por moléculas de água *TIP3P* (92) (caixa de água na forma de um octaedro truncado), e íons Na^+ foram adicionados para que o sistema ficasse com carga neutra. O ligante foi parametrizado utilizando o campo de força *GAFF* (93), e a proteína, com o campo de força *ff14SB* (94). O algoritmo *SHAKE* (95) foi utilizado para manter as distâncias de equilíbrio das ligações envolvendo átomos de hidrogênio.

As simulações foram realizadas em três etapas, utilizando programas dentro do pacote *Amber18* (90). Na primeira etapa, foram feitos 10000 ciclos de minimização

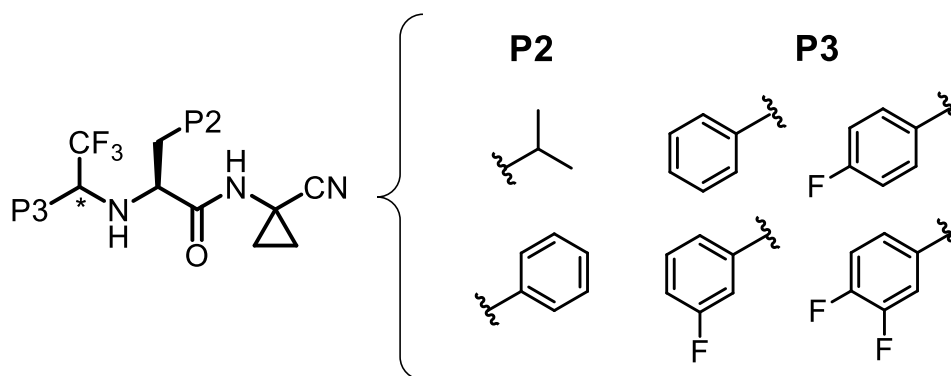
utilizando os algoritmos de *steepest descent* e *conjugate gradient* dentro do programa *sander*. Em seguida, foi feita a etapa de aquecimento do sistema até a temperatura de 300 K e a etapa de produção, ambas em *pmemd.cuda*. Na etapa de produção, foram feitas as simulações de 100 ns (10 janelas de 10 ns, com 1000 *frames* cada) para os compostos em complexo covalente com a cruzaina, conforme descrito por Lameira et al. (96). As trajetórias geradas foram analisadas no programa *VMD* (86) e no programa *cpptraj* (97). A linguagem *R* (98) foi utilizada para calcular os valores de distâncias médias das ligações de hidrogênio e gerar os gráficos apresentados.

3 Resultados e Discussão

3.1 Planejamento, rotas de síntese e mecanismos

Os substituintes que compõem os derivados do Neq0594 produzidos são apresentados na Figura 9, com P1 fixado como ciclopropila.

Figura 9 - Substituintes P1, P2 e P3 das moléculas produzidas no projeto. P1 é mantido com o grupo ciclopropila.

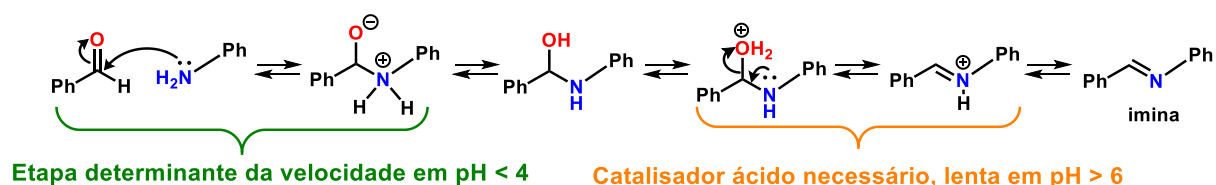


Fonte: Autoria própria.

A rota escolhida para a síntese dos peptideomiméticos possui três etapas, das quais as duas primeiras correspondem à formação do grupo TFEA entre P2 e P3, enquanto a terceira leva ao acoplamento do grupo P1 e do *warhead* (44,56). Todas as estruturas produzidas, bem como os procedimentos de síntese, podem ser encontradas no Anexo.

A primeira reação consiste na formação de uma imina, reagindo o grupo amino de um (S)-aminoácido protegido (aminoéster metílico) com uma 2,2,2-trifluoroacetofenona contendo os substituintes desejados. A formação de iminas é classicamente realizada em meio levemente ácido, que favorece a desidratação do intermediário hemiaminal, de acordo com o mecanismo mostrado no Esquema 5.

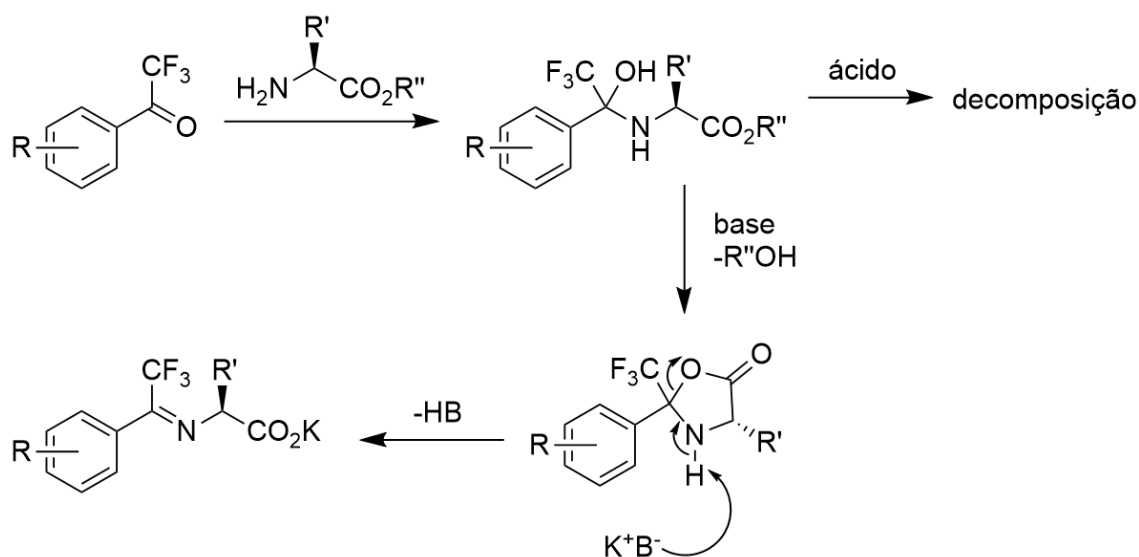
Esquema 5 - Mecanismo da formação de iminas em meio ácido.



Fonte: Adaptado de (99).

Entretanto, Hughes et al. (74) observaram a formação de produtos de degradação quando realizaram essa reação com compostos semelhantes ao desse projeto em condições ácidas. Isso levou os pesquisadores a desenvolver uma rota alternativa, em meio alcalino e a temperaturas relativamente baixas (50 °C), para a qual foi estabelecido o seguinte mecanismo, passando por um intermediário oxazolidinona (Esquema 6).

Esquema 6 - Mecanismo proposto para a formação do grupo imina em meio básico.



Fonte: Adaptado de (74).

As reações propostas pelos autores (74) indicaram excelentes valores de rendimento e excesso enantiomérico. Portanto, as reações do projeto também foram feitas empregando carbonato de potássio em metanol, mantendo um ambiente alcalino.

De forma geral, as reações de formação de iminas realizadas foram bem-sucedidas. Geralmente, a coloração do meio reacional mudou de transparente para amarelada e, por vezes, foi observada evaporação do solvente, caso o sistema não fosse adequadamente resfriado com fluxo de água em um condensador, havendo alguns casos em que a reação teve de ser descartada por estar seca após as 18 h.

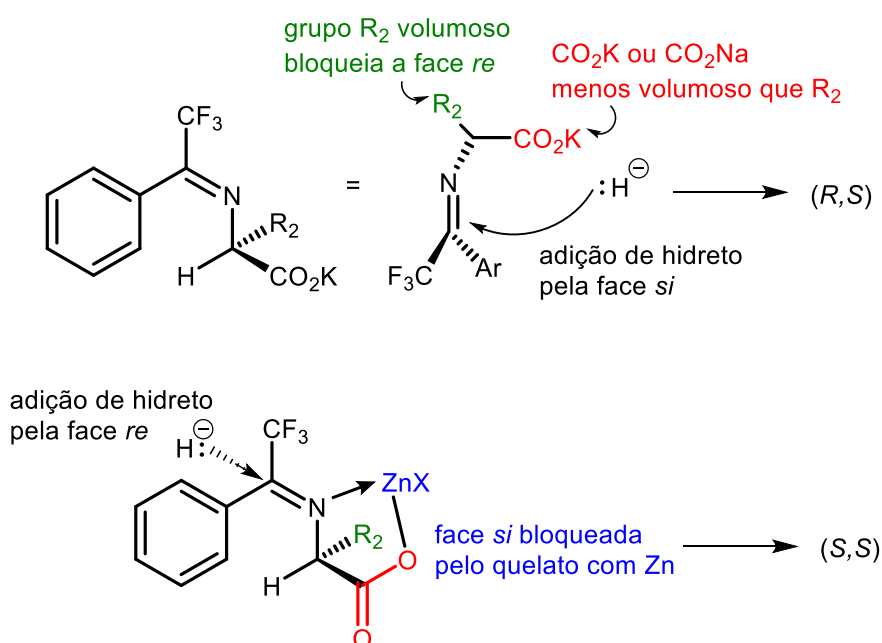
Uma vez formada a imina, prosseguiu-se imediatamente para a etapa de redução, evitando assim a hidrólise desse intermediário e a diminuição do rendimento. Entretanto, a substituição de uma ligação peptídica por um grupo TFEA introduz uma característica ausente nas dipeptidilnitrilas, que é a presença de mais um carbono assimétrico, além daquele no aminoácido em P2. A presença de dois centros estereogênicos possibilita a existência de quatro diastereoisômeros para as moléculas sintetizadas. Dois deles envolvem a utilização do (*R*)-aminoácido e não foram abordados nesse trabalho, por apresentarem atividade inferior à dos isômeros (*S*). Os outros dois diastereoisômeros diferem na configuração do carbono ligado ao grupo CF₃, que pode apresentar relevância para a atividade inibitória, conforme será discutido. Dessa forma, a utilização de metodologias de redução diastereosseletivas para as iminas possibilitou a síntese de ambos os diastereoisômeros (*R,S*) e (*S,S*) como potenciais inibidores de cruzaina.

Hughes et al. (74) exploraram diversos agentes redutores para essa etapa, buscando os melhores rendimentos absolutos e estereosseletividade. Para a síntese dos compostos de estereoquímica (*R,S*), os autores destacaram a utilização de boroidreto de sódio em uma mistura de THF e água, devido aos bons valores de rendimento (86%) e de proporção de diastereoisômeros [25:1 (*R,S*):(*S,S*)]. Também foi observado que a utilização de boroidreto de zinco preparado a partir de boroidreto de sódio e cloreto de zinco em DME forneceu preferencialmente o diastereoisômero (*S,S*), com proporções variando entre 8:1 e 21:1 (*S,S*):(*R,S*). Com esses dados e considerando a experiência anterior do grupo (44,82), optou-se pela utilização de boroidreto de sódio para a produção dos compostos (*R,S*) e de boroidreto de zinco para a produção dos compostos (*S,S*).

A diastereosseletividade dos agentes redutores foi explicada por cálculos *ab initio* realizados pelos mesmos autores (74). Foi proposto que a conformação de menor energia da espécie cujo contra-íon é Na⁺ ou K⁺ apresenta o hidrogênio do grupo metino do aminoácido coplanar à ligação dupla da imina. Com isso, a face *re* da imina

é bloqueada pela cadeia lateral do aminoácido, que é mais volumosa que o carboxilato presente na face *si*. Assim, quando a redução é realizada com boroidreto de sódio, o ataque do hidreto ocorre pela face *si*, menos impedida. Por outro lado, na presença de um contra-íon ZnX^+ (onde X é um halogênio), ocorre a formação de um quelato com um átomo de oxigênio do carboxilato e o átomo de nitrogênio da imina, dificultando o acesso do boroidreto à face *si* e favorecendo o ataque pela outra face. O Esquema 7 sumariza a explicação proposta pelos autores.

Esquema 7 - Explicação proposta para a estereosseletividade dos agentes redutores utilizados.



Fonte: Adaptado de (74).

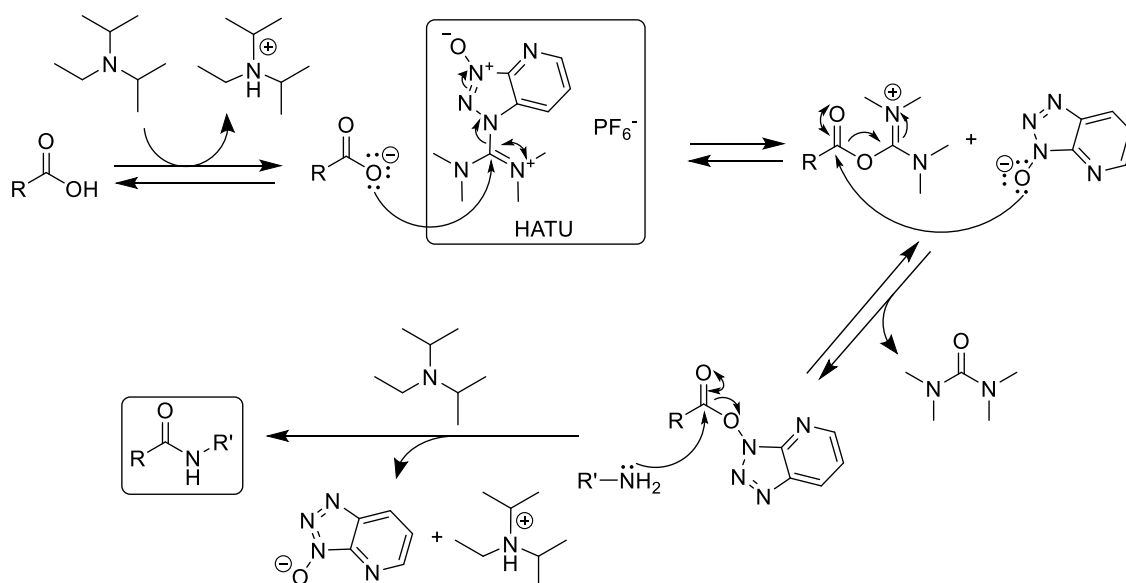
Essa etapa da síntese mostrou-se a mais desafiadora nesse projeto. Diversas tentativas de realizar a redução com boroidreto de sódio não forneceram quantidades significativas de produto que, mesmo quando formado, não era facilmente identificado nas placas de CCD com luz ultravioleta ou pelos agentes reveladores utilizados. Entretanto, com o auxílio da Dra. Bruna Simões e do Dr. Anwar Shamim, constatou-se que a reação com oito equivalentes de boroidreto de sódio foi capaz de fornecer bons rendimentos, em contraste com as tentativas com três e seis equivalentes. Também foi observado que a utilização de solução de vanilina sulfúrica em etanol recém-preparada foi capaz de revelar as manchas correspondentes aos

trifluorometilaminoácidos, com coloração azul ou amarela. Por sua vez, a redução com boroidreto de zinco, apesar de mais trabalhosa, por necessitar de preparo do reagente e controle da temperatura da reação por três horas, em geral, forneceu bons rendimentos e seletividade para o isômero (S,S).

Os trifluorometilaminoácidos produzidos nessa etapa foram purificados em coluna cromatográfica de sílica-gel, e não foram medidos os valores de excesso diastereoisomérico, uma vez que o objetivo do trabalho não era a otimização da síntese. Todavia, a verificação da pureza dos produtos finais (após purificação por coluna de sílica-gel) permite que se estime uma diastereosseletividade razoável para ambas as reações, com proporções em torno de 7:1 a 10:1 do diastereoisômero majoritário. Verificou-se que a seletividade de redução com boroidreto de sódio foi, em geral, maior que a com boroidreto de zinco, e que esta dependia em grande parte da temperatura utilizada: quando a reação foi feita a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, o produto final apresentou entre 80 e 90% do diastereoisômero (S,S), ao passo que a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, a proporção entre os isômeros foi de aproximadamente 1:1. Projetos que envolvam a exploração de ambos os diastereoisômeros podem se valer da reação feita a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtendo ambos os isômeros em uma única reação e tendo em vista que a purificação cromatográfica do produto se faz necessária na maioria dos casos.

A etapa final desse esquema de síntese é a formação da ligação peptídica que liga os fragmentos correspondentes a P1 e P2. A ativação de ácidos carboxílicos para a formação de amidas pode ser feita de diversas formas. Nesse trabalho, optou-se pela utilização do sal de urônio HATU, devido aos bons resultados obtidos pelo grupo utilizando esse reagente. O mecanismo da reação de acoplamento é mostrado no Esquema 8.

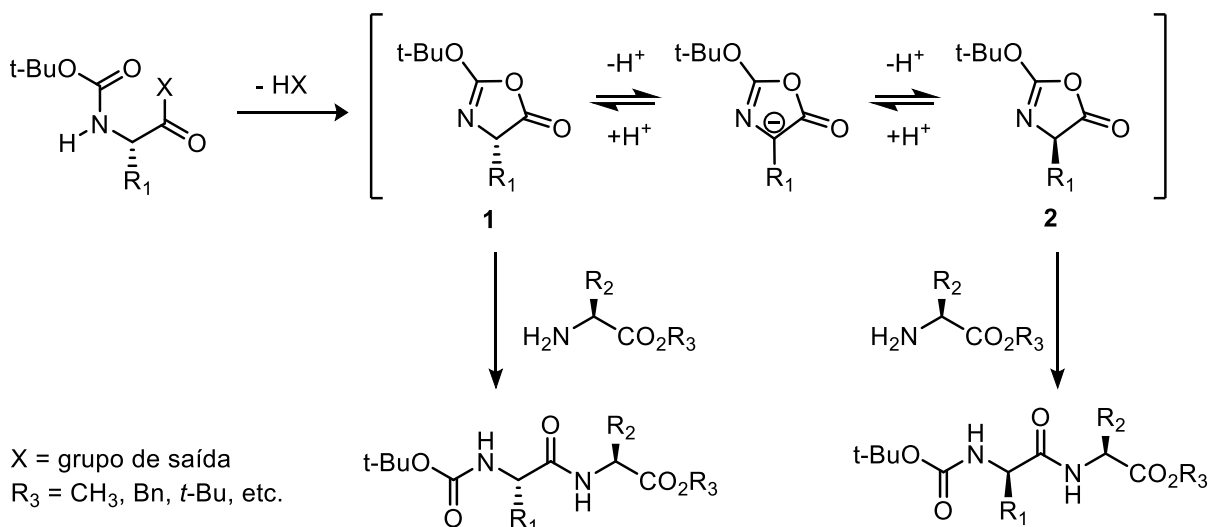
Esquema 8 - Mecanismo da reação de acoplamento com HATU.



Fonte: Adaptado de (100).

A utilização desse reagente de acoplamento proporcionou bons rendimentos e fácil purificação dos produtos. Além disso, sabe-se que o HATU previne a reação que leva à epimerização do centro assimétrico do aminoácido com o ácido carboxílico ativado, através da formação de um intermediário cíclico, denominado oxazolona, conforme mostrado no Esquema 9, com derivados *N*-protegidos com o grupo Boc (44,101,102). É válido ressaltar que esse mecanismo de epimerização não seria esperado para as moléculas do projeto, visto que o nitrogênio do aminoácido não está ligado a uma carbonila.

Esquema 9 - Mecanismo da racemização de derivados de aminoácidos.



Fonte: Adaptado de (101).

Apesar da razoável seletividade proporcionada pelos métodos de redução empregados, também são produzidas pequenas, mas significativas, quantidades do diastereoisômero não desejado, que dificilmente pode ser separado do produto empregando cromatografia em coluna de sílica-gel. Para a maioria dos compostos, tentou-se a realização de duas etapas de purificação do produto final por coluna de sílica-gel, muitas vezes sem sucesso. Em alguns casos, quando a quantidade de produto era suficiente (>100 mg), foi possível empregar a recristalização a partir de uma solução em diclorometano, à qual se adicionou hexano para diminuir sua solubilidade, permitindo assim que cristais fossem formados. Entretanto, mesmo utilizando essa técnica, nem sempre foi possível obter o produto com pureza maior que 95%, necessária para os ensaios enzimáticos.

Tendo em vista a ineficiência dos métodos clássicos de purificação para boa parte dos compostos produzidos, muitas vezes foi necessário recorrer ao método analítico, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em escala semipreparativa. As purificações dos compostos foram feitas em fase reversa, com coluna quiral, visto que tanto em fase normal com coluna quiral quanto em fase reversa com coluna C18, não foi possível a separação dos diastereoisômeros. De forma geral, compostos purificados pelo método analítico apresentaram pureza entre 95 e 99%, adequada para os ensaios biológicos.

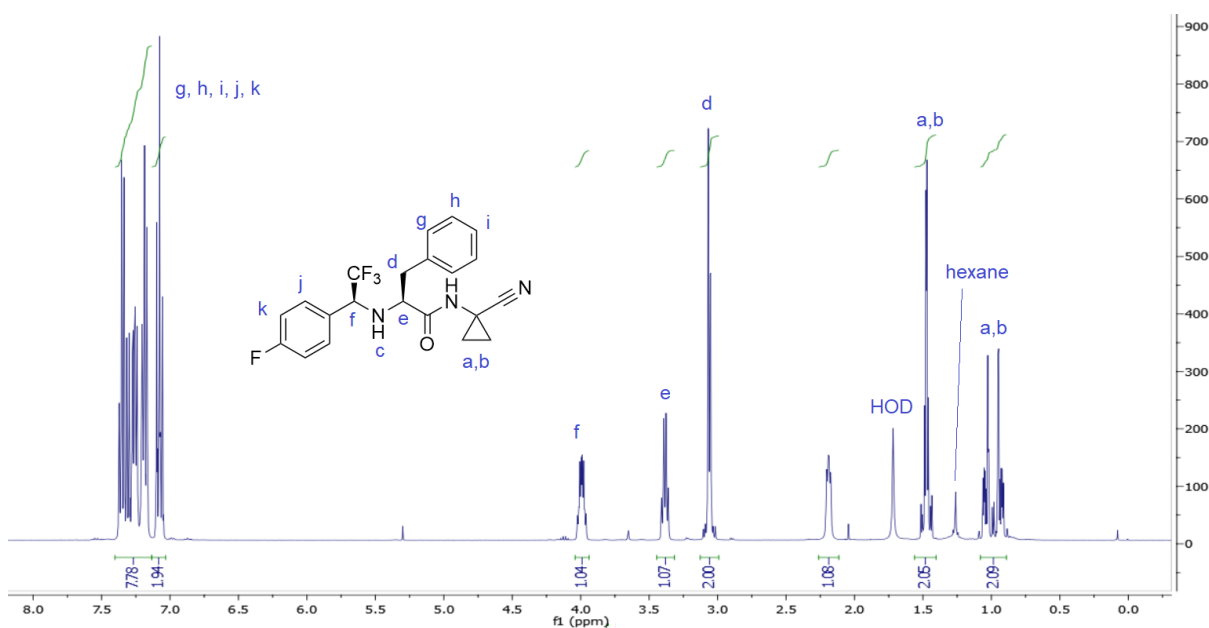
3.2 Caracterização

Tendo em vista a semelhança estrutural entre os compostos produzidos, nessa seção será discutida a caracterização para apenas um composto, o Neq0999. Os dados das caracterizações de todos os compostos produzidos nesse projeto podem ser encontrados no Anexo.

3.2.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

O espectro de RMN-¹H do composto Neq0999 é apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto Neq0999, com atribuições.



Fonte: Autoria própria.

Em geral, sinais de RMN-¹H de moléculas orgânicas apresentam deslocamento químico entre 0 e 10 ppm, com o tetrametilsilano como referência ($\delta_{\text{TMS}} = 0,0$ ppm). Nesse intervalo, é interessante separar o espectro em regiões associadas a certos

grupos funcionais, para facilitar a discussão dos sinais apresentados por uma molécula.

Assim, a primeira faixa a ser discutida vai de 0 a 2 ppm e está associada a sinais de H ligados a carbono sp^3 . No espectro apresentado, é possível observar a presença dos sinais do grupo ciclopropila (**a,b**), na forma de dois multipletos, cada um com integral igual a 2,0, separados por aproximadamente 0,5 Hz.

A segunda faixa relevante vai de 2 a 5 ppm. Nessa região estão presentes os sinais de H ligados a carbono sp^3 próximos a substituintes que retiram elétrons, assim como sinais de H ligados a heteroátomos. No espectro, observa-se o sinal do grupo NH do aminoácido (**c**) em 2,19 ppm, como um duplo dubleto. O CH_2 da cadeia lateral da fenilalanina (**d**) aparece nessa região em 3,06 ppm, como um multipletos, por se tratar de grupo com hidrogênios diastereotópicos. O CH do aminoácido (**e**), adjacente a um átomo de nitrogênio e uma carbonila, aparece nessa região em 3,38 ppm, como duplo duplo dubleto (no espectro apresentado, as constantes de acoplamento são próximas e o sinal se assemelha a um quarteto). Por fim, o sinal mais desblindado da região, em 3,99 ppm, corresponde ao H ligado ao carbono adjacente ao grupo CF_3 (**f**). Nesse caso, o sinal é um multipletos, mas em algumas moléculas aparece como um quinteto, devido aos três acoplamentos $^3J_{CF}$ e ao acoplamento com NH, que pode alargar o sinal.

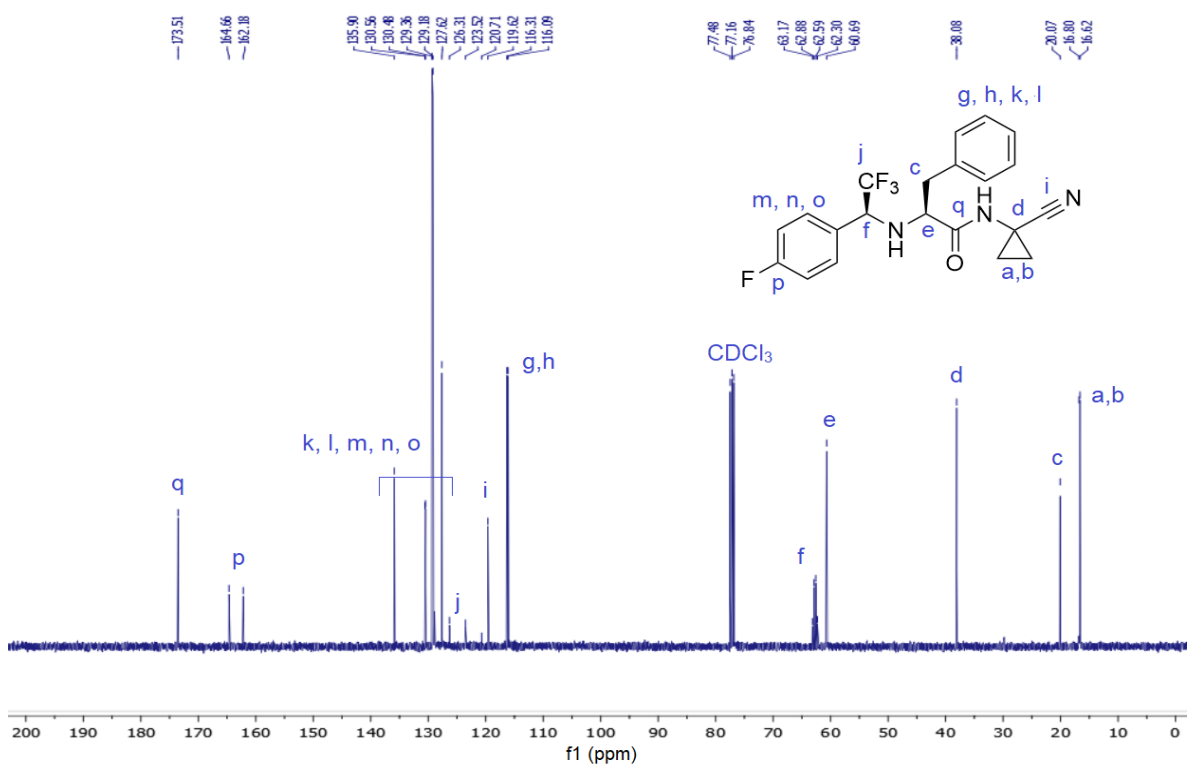
A última região relevante para a discussão vai de 6 a 9 ppm e está associada a sinais de H aromáticos, tanto do grupo P3 quanto da cadeia lateral da fenilalanina. Os sinais (**g-k**) são, em sua maioria, multipletos, devido aos diversos acoplamentos H-H e H-F. Nessa região também se encontra o singletos correspondente H da ligação peptídica (**l**).

Nas moléculas derivadas do aminoácido leucina, os sinais correspondentes a sua cadeia lateral aparecem na região de 0 a 2 ppm: os grupos metila, na forma de dois dubletos, ou um dubleto largo, quando há sobreposição (a relação entre os CH_3 é diastereotópica), o sinal do grupo CH_2 , geralmente sobreposto a um dos sinais da ciclopropila, e o sinal do CH, que é complexo, muitas vezes sobreposto ao pico residual da água. Os outros sinais são semelhantes aos do espectro apresentado.

3.2.2 Ressonância magnética nuclear de carbono-13

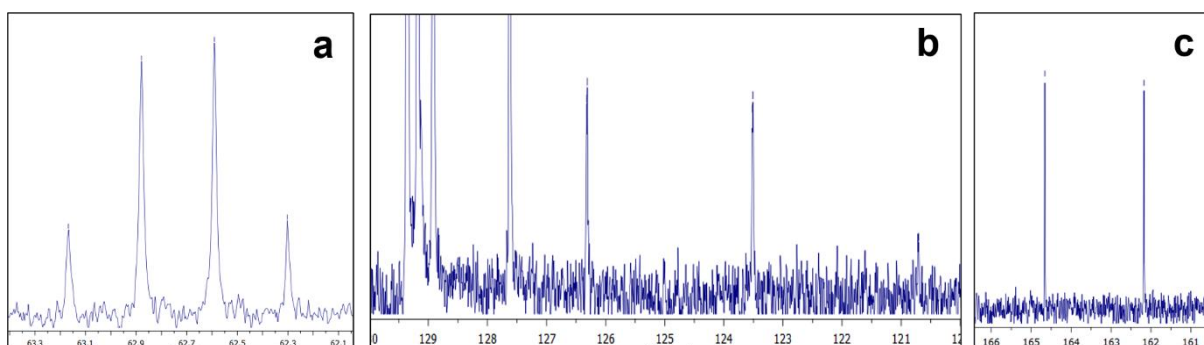
O espectro de RMN-¹³C do composto Neq0999 é apresentado na Figura 11, e aproximações, na Figura 12.

Figura 11 - Espectro de RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) do composto Neq0999, com atribuições.



Fonte: Autoria própria.

Figura 12 - Aproximações dos sinais f (a), j (b) e p (c) da Figura 10.



Fonte: Autoria própria.

O espectro de RMN-¹³C, cujos sinais estão na faixa de 0 a 200 ppm, foi arbitrariamente separado em duas regiões.

A primeira região foi definida de 0 ppm até o valor do deslocamento químico do clorofórmio deuterado (77,16 ppm). Essa região está associada a carbonos alifáticos das moléculas (sp³). Os sinais dos carbonos da ciclopropila (**a,b**) são os mais blindados, em 16,62 e 16,80 ppm, seguidos pelo sinal do grupo CH₂ da cadeia lateral da fenilalanina (**c**), em 20,07 ppm. O sinal do carbono quaternário do grupo ciclopropila (**d**), adjacente a um átomo de nitrogênio e um grupo nitrila, aparece em 38,08 ppm. Em seguida, em 60,69 ppm, encontra-se o carbono assimétrico do aminoácido P2 (**e**), adjacente a um átomo de nitrogênio e uma carbonila. O sinal do carbono adjacente ao grupo CF₃ (**f**) é o mais desblindado da região, aparecendo como um quarteto centrado em 62,74 ppm (³J_{CF} = 29 Hz, Figura 12a). Em algumas moléculas, o sinal aparece como um quarteto de dubletos, devido à proximidade do átomo de flúor do anel aromático na posição *meta* em P3.

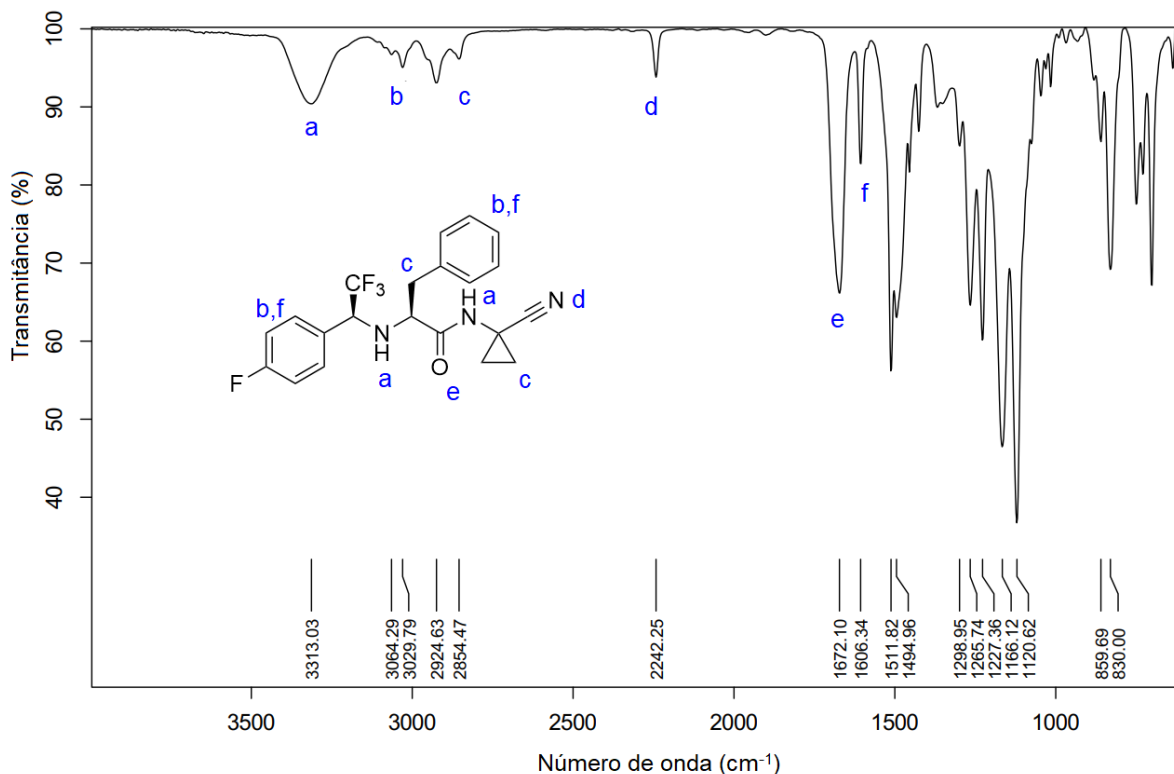
A segunda região foi definida de 100 a 200 ppm. O carbono do grupo nitrila (**i**) apresenta um sinal com deslocamento químico de 119,62 ppm. Os sinais dos carbonos aromáticos também aparecem nessa região, sendo **g,h** correspondentes a carbonos do anel da fenilalanina, menos desblindados, enquanto os outros sinais (**k-o**) aparecem na região de 120 a 135 ppm. Nessa região se encontra também o sinal correspondente ao grupo CF₃ (**j**), que se desdobra em um quarteto (¹J_{CF} = 282 Hz, Figura 12b), centrado em 124,9 ppm, cujos sinais das extremidades são dificilmente distinguidos do ruído. O carbono ligado diretamente ao flúor em P3 é o dubleto (**p**) centrado em 163,42 ppm (¹J_{CF} = 250 Hz, Figura 12c), já que presença do átomo de flúor leva a desdobramentos dos sinais, tanto dos carbonos adjacentes (¹J_{CF}), quanto de carbonos mais distantes (²J_{CF}, ³J_{CF}). Por fim, o sinal mais desblindado em 173,51 ppm corresponde ao carbono da ligação peptídica.

Nas espécies derivadas da leucina, podem ser observados os sinais dos grupos metila, CH₂ e CH da cadeia lateral na região mais blindada do espectro.

3.2.3 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

O espectro de FTIR do composto Neq0999 é apresentado a seguir na Figura 13.

Figura 13 - Espectro de FTIR do composto Neq0999.



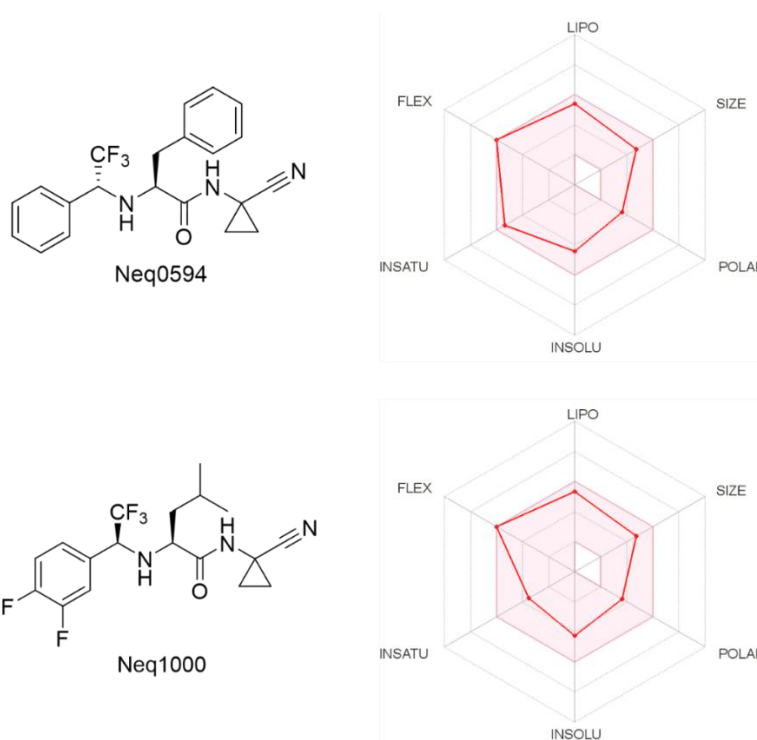
Fonte: Autoria própria.

No espectro, é possível observar os seguintes estiramentos: N–H em 3313 cm⁻¹ (**a**), C(sp²)–H em 3064 e 3030 cm⁻¹ (**b**), C(sp³)–H em 2925 e 2854 cm⁻¹ (**c**), C≡N em 2242 cm⁻¹ (**d**), C=O da ligação peptídica em 1672 cm⁻¹ (**e**) e C=C dos anéis aromáticos por volta de 1606 cm⁻¹ (**f**). Além disso, observa-se a presença de sinais por volta de 1500 cm⁻¹, provavelmente devido ao modo de vibração *bend* da ligação N–H do grupo TFEA, e entre 1300 e 1100 cm⁻¹, que podem corresponder a sinais das ligações C–N e C–F.

3.3 Cálculo de descritores físico-químicos

O *website SwissADME* (84) reúne ferramentas para o cálculo de diversas propriedades físico-químicas de moléculas de interesse medicinal, necessitando apenas de suas estruturas químicas em duas dimensões. Após o cálculo, é disponibilizado um gráfico de radar que situa as propriedades das moléculas analisadas dentro de uma região formada pelos valores mínimos e máximos de alguns parâmetros relevantes para compostos com características de fármacos, que são: tamanho (massa molecular relativa, SIZE), grau de insaturação (fração de carbonos saturados, INSATU), flexibilidade (número de ligações com livre rotação, FLEX), polaridade (área superficial polar topológica, POLAR), lipofilia ($\log P_{o/w}$, LIPO) e solubilidade em água ($\log S$, SOLU). Em poucos minutos, foi possível obter os resultados, que permitiram fazer algumas observações interessantes a respeito das moléculas do projeto. Gráficos obtidos para dois compostos: Neq0594 e Neq1000 são apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Gráficos de radar obtidos no *website SwissADME* para os compostos Neq0594 e Neq1000.



Fonte: Autoria própria

É possível observar que as propriedades do Neq0594 atendem às exigências de um bom composto protótipo, estando todos os valores dentro dos limites estabelecidos, com destaque para o baixo peso molecular, que possibilita a adição de grupos para aprimorar suas propriedades físico-químicas e atividade.

Os efeitos mais relevantes decorrentes da introdução de átomos de halogênio podem ser verificados na comparação com o Neq1000. A lipofilia calculada aumentou em cerca de 20 a 30 vezes, indicando que os átomos de flúor, apesar de serem muito eletronegativos, não polarizam significativamente os anéis aromáticos em P3, produzindo, assim, um efeito de aumento da lipofilia, devido a sua densidade eletrônica, maior que a de um átomo de hidrogênio. Realizando cálculos para moléculas com diferentes substituintes em P3, observou-se uma diminuição da lipofilia com a introdução dos grupos OH e NH₂ no anel aromático, ao passo que os halogênios provocaram um aumento nesse valor, reforçando a superioridade do efeito da nuvem eletrônica em detrimento da capacidade de realizar ligação de hidrogênio. De forma semelhante, os cálculos indicam hidrossolubilidade moderada para os compostos. Em todos os casos, os valores calculados mantêm-se dentro dos limites estabelecidos para potenciais fármacos.

Na comparação com os compostos peptídicos correspondentes, os miméticos produzidos possuem maior massa molecular relativa e número de átomos pesados, devido à substituição da carbonila por um grupo C–CF₃ e à introdução de halogênios. Entretanto, sua massa molecular não supera 500 Da, limite superior para pequenas moléculas de interesse farmacológico indicado pelo *website*. Além disso, a razão entre o número de carbonos saturados e insaturados aumentou, aproximando-se do valor médio do intervalo, que vai de 0 a 1. A flexibilidade das moléculas é alta, igual ao limite superior estabelecido, de nove ligações com livre rotação. Isso pode ser prejudicial para a utilização das moléculas como fármacos, mas sugere a utilização de uma estratégia para aumentar a rigidez molecular em uma próxima etapa de otimização. Por sua vez, a polaridade diminuiu em 17 Å², o que pode ser explicado pela substituição da carbonila pelo grupo C–CF₃, já que foi verificado que a introdução de átomos de halogênios no anel aromático não altera o valor de TPSA.

Em resumo, os resultados parecem apontar no sentido de uma otimização das estruturas por meio da diminuição de sua flexibilidade e, possivelmente, aumento da polaridade e hidrossolubilidade. O primeiro objetivo pode ser atingido com a utilização

de estruturas cíclicas e ligações duplas e triplas no esqueleto da molécula. Entretanto, para um planejamento racional, é interessante ter um conhecimento do modo de ligação das moléculas com a cruzaina, seja pela obtenção de estruturas cristalográficas ou por dinâmica molecular. Com esses dados, é possível orientar as propostas de síntese no sentido de buscar estruturas mais rígidas que tenham uma distribuição espacial semelhante à da conformação de menor energia das moléculas no sítio ativo. O segundo objetivo sugere a introdução de grupos polares na estrutura das moléculas. Uma vez que a substituição H/F provocou um aumento na lipofilia, a adição de grupos mais polares provavelmente não prejudicará a capacidade da molécula de penetrar as membranas celulares. Entretanto, deve ser evitado o uso de grupos básicos, devido à possibilidade de acúmulo do inibidor em organelas ácidas, como lisossomos. A região mais promissora para a realização dessas modificações é o substituinte P3, por razões já discutidas.

3.4 Ensaio bioquímico

Os valores de inibição medidos para os compostos derivados do Neq0594, com átomos de flúor em P3, são apresentados na Tabela 1, juntamente com os dados do composto protótipo, para fins de comparação. São reportados, nessa ordem: o código Neq do composto, o aminoácido que dá origem ao substituinte P2, a configuração absoluta, a posição dos átomos de flúor em P3 e os valores de inibição para as enzimas cruzaina, LmCPB e catepsina L (com incerteza na primeira casa após a vírgula).

Tabela 1 - Valores de inibição enzimática medidos para os compostos do projeto.

Código Neq	P2	Configuração absoluta	Posição F	pK_i		
				Cruzaína	LmCPB	CatL
0594	Phe	(R,S)	-	5,6	5,7	6,1
0976	Leu	(R,S)	<i>m</i>	6,6	6,5	6,7
0997	Leu	(S,S)	<i>m</i>	7,4	7,0	7,8
0979	Leu	(R,S)	<i>p</i>	6,9	6,8	6,6
0998	Leu	(S,S)	<i>p</i>	7,2	6,8	7,4
0977 ^a	Leu	(R,S)	<i>m,p</i>	6,6	6,8	6,4
1000 ^a	Leu	(S,S)	<i>m,p</i>	7,4	6,9	7,8
1018	Phe	(R,S)	<i>m</i>	5,6	5,8	6,2
1001	Phe	(S,S)	<i>m</i>	6,2	5,9	7,3
0980	Phe	(R,S)	<i>p</i>	6,0	6,0	6,4
0999	Phe	(S,S)	<i>p</i>	6,1	5,7	7,0
1019	Phe	(R,S)	<i>m,p</i>	5,8	5,8	6,1
1074 ^a	Phe	(S,S)	<i>m,p</i>	6,0	5,8	7,1

^a Os compostos utilizados nas simulações foram destacados em azul.

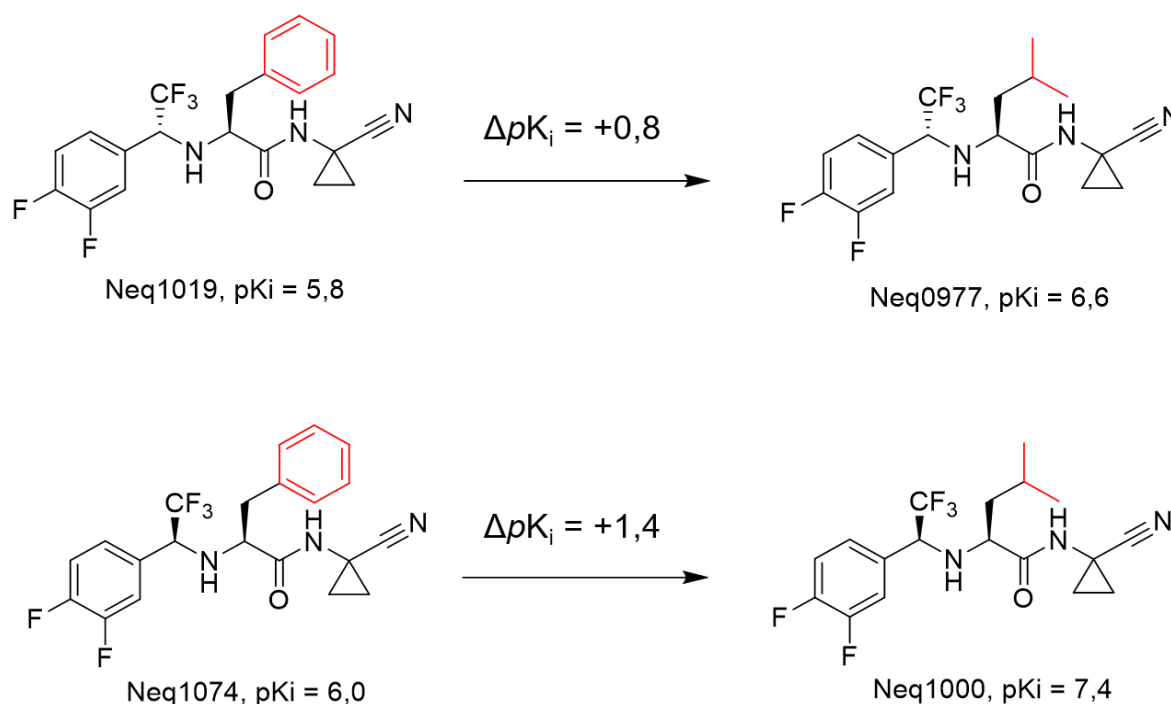
Fonte: Autoria própria.

Apesar da similaridade estrutural, nota-se que, em alguns casos, foi possível observar diferenças de afinidade maiores que 1,0 unidade logarítmica entre as cisteíno proteases. Essas diferenças de afinidade são denominadas de seletividade, e resultam das interações não-covalentes entre os compostos e as cadeias laterais dos subsítios das enzimas (103). As maiores seletividades foram obtidas para os compostos derivados da fenilalanina, que são menos ativos na cruzaína e na LmCPB, e mais ativos na catepsina L, ao passo que os valores de inibição dos derivados da leucina são mais próximos entre si para as três enzimas.

Com relação à cruzaína, é possível notar que todos os compostos apresentaram afinidade maior ou igual à do composto protótipo (Neq0594, $pK_i^{Cz} = 5,6$). Os derivados da leucina apresentaram valores de pK_i maiores que os derivados da fenilalanina, sendo em torno de dez vezes mais ativos ($\Delta pK_i \approx 1,0$). Essa é uma observação interessante, tendo em vista que a literatura apresenta diversos exemplos de inibidores potentes de cruzaína com grupos aromáticos em P2, como anéis

aromáticos substituídos com bromo e pirimidinas (35,64). Todavia, em outro trabalho (82) em que foram produzidos compostos análogos aos desse projeto, a mesma preferência por leucina em P2 foi identificada. A Figura 15 compara as atividades de dois pares moleculares que variam em P2, mostrando o efeito positivo da substituição de fenilalanina por leucina em P2.

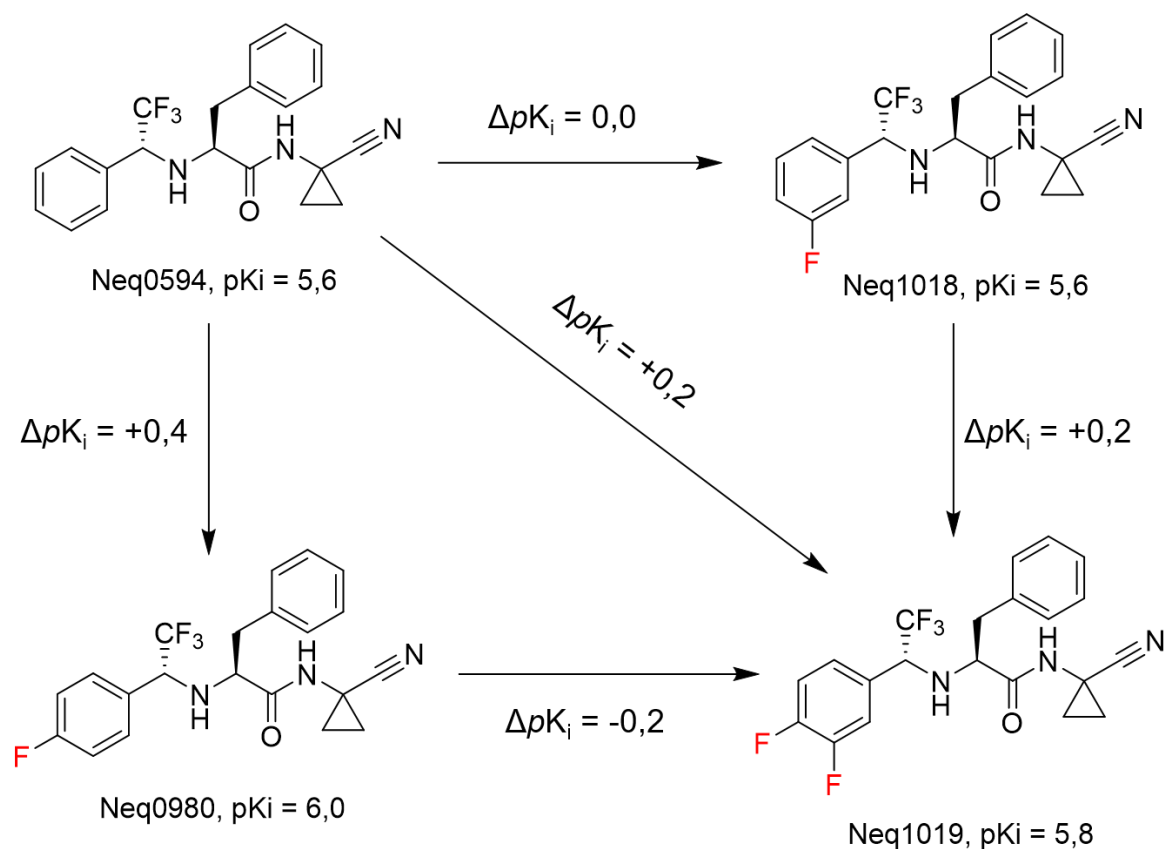
Figura 15 - Pares moleculares variando em P2 e variação da atividade na cruzaina.



Fonte: Autoria própria.

A introdução dos átomos de flúor em P3, conforme demonstrado na Figura 16, praticamente não altera a atividade em comparação aos derivados sem flúor publicados anteriormente (44,82), o que demonstra que a substituição H/F em P3 foi bioisostérica para a cruzaina. Nesse caso, qualquer diferença de atividade tripanossomicida que venha a ser observada com relação ao Neq0594 não poderá ser atribuída a uma alteração na inibição da cruzaina. Esse resultado contrasta com o verificado para catepsina S em um trabalho com moléculas semelhantes, para a qual foi observada uma maior atividade de compostos contendo flúor na posição *p*. Isso provavelmente se deve ao tamanho reduzido do subsítio S3 na catepsina S, em relação ao da cruzaina (51).

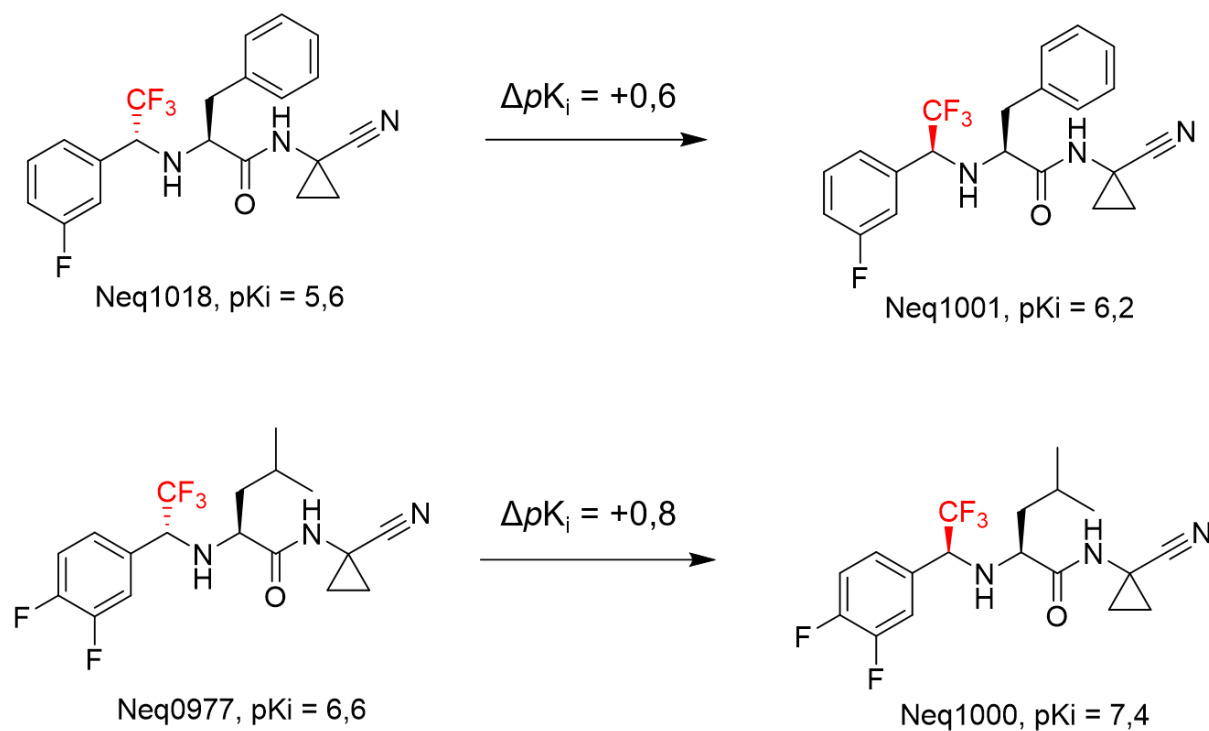
Figura 16 - Pares moleculares variando na posição dos átomos de flúor e variação da atividade na cruzaina.



Fonte: Autoria própria.

Por fim, a estereoquímica do grupo TFEA mostrou-se relevante para alguns pares de compostos, sendo o isômero (*S,S*), em geral, mais ativo que o (*R,S*), com ΔpK_i variando de +0.1 a +0.8. A preferência pelo isômero (*S,S*) foi observada em outros trabalhos para inibidores de cruzaina (21,34,50) e catepsinas K (55,56,62,75) e S (51). Esses dados reforçam a ideia de que a atividade tripanossomicida do Neq0594, de estereoquímica (*R,S*), não se deve exclusivamente à inibição da cruzaina. A Figura 17 apresenta dois pares que variam na estereoquímica do grupo TFEA e a mudança na atividade para a cruzaina.

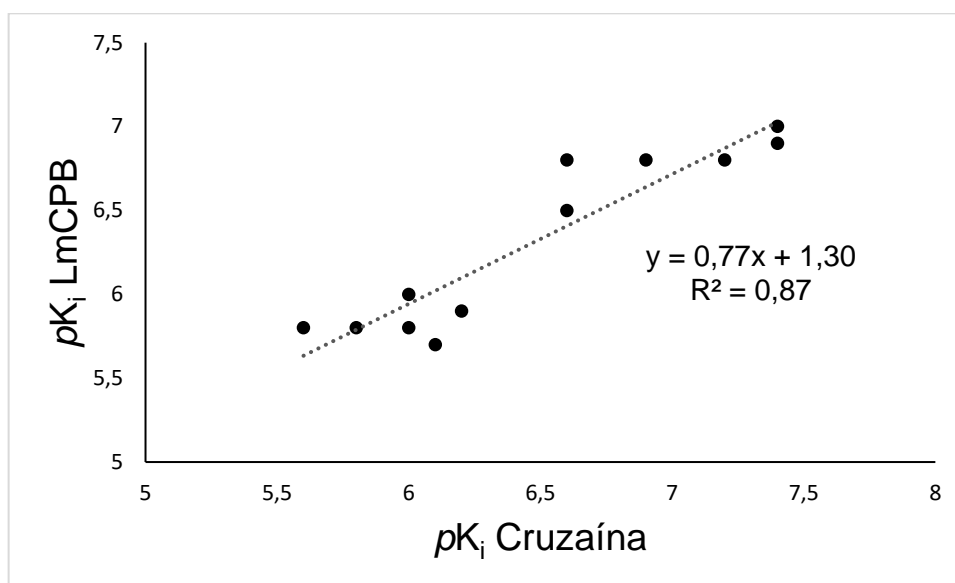
Figura 17 - Pares moleculares variando na estereoquímica do grupo TFEA e variação da atividade na cruzaina.



Fonte: Autoria própria.

Os valores de inibição da enzima LmCPB apresentaram pouca variação considerando a posição do átomo de flúor e a estereoquímica do grupo TFEA, mas, assim como na cruzaina, os derivados da leucina são cerca de dez vezes mais ativos que os análogos derivados da fenilalanina. Para a série de compostos do projeto, é possível observar uma correlação linear ($R^2 = 0,87$) quando se comparam as atividades inibitórias para cruzaina e LmCPB (Figura 18).

Figura 18 - Gráfico de correlação entre os valores de pK_i para as enzimas cruzaina e LmCPB.



Fonte: Autoria própria.

Essa linearidade não é observada para as outras relações (cruzaina \times Cat L e LmCPB \times Cat L, gráficos não mostrados) e pode ser classificada como um efeito extratermodinâmico, indicando uma semelhança entre o modo de ação dos compostos nas duas enzimas de protozoários. Esse tipo de correlação também não foi observado em um trabalho recente comparando diversos tipos de cisteíno proteases (103).

Os valores de pK_i para catepsina L são semelhantes aos da cruzaina para os compostos derivados da leucina. Entretanto, os derivados da fenilalanina são mais ativos frente a catepsina L do que às outras enzimas. Esse resultado pode ser compreendido considerando que catepsinas de mamíferos apresentam um subsítio S2 profundo e costumam aceitar grupos P2 volumosos (63,103). A seletividade observada para esses compostos é maior para os isômeros (S,S), tanto em relação à cruzaina como em relação ao isômero (R,S), para os quais ΔpK_i chega a +1,1 para os compostos Neq1001 e Neq1074.

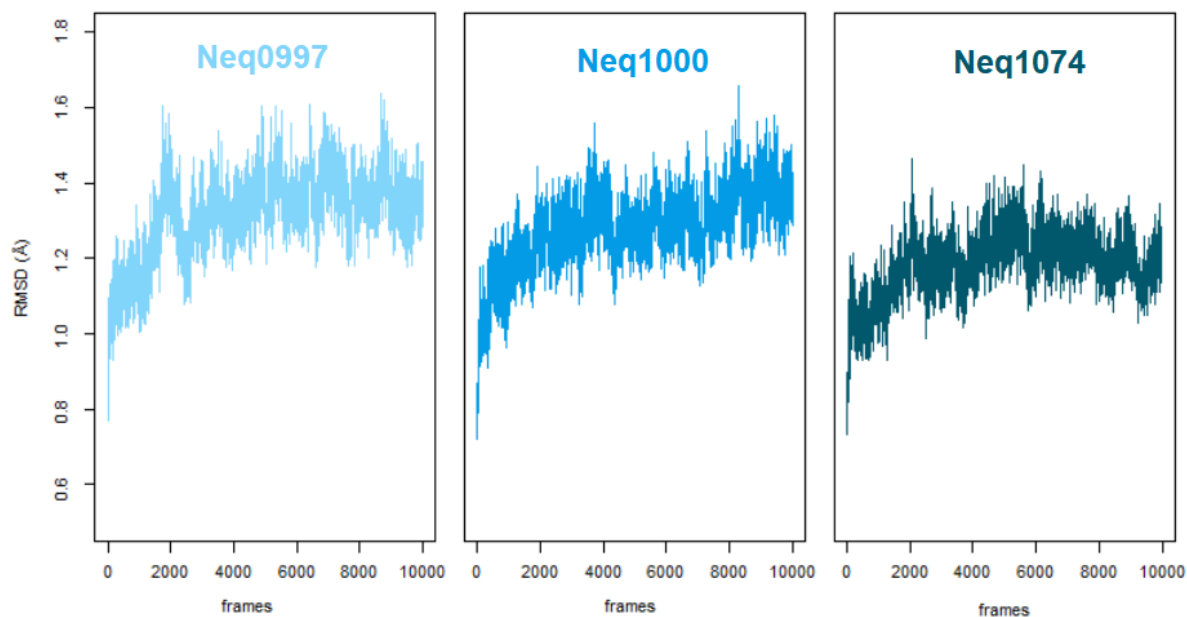
3.5 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular é um método computacional que pode ser utilizado para explorar as interações de um inibidor com o sítio ativo de uma proteína. Nas simulações, os átomos são tratados como esferas com raio, massa e carga definidos, e as ligações químicas, como molas ligando essas esferas. As estruturas do inibidor e da enzima são posicionadas em um ambiente contendo moléculas de água e íons, e, utilizando um modelo de mecânica clássica, as forças de atração ou repulsão entre os átomos são calculadas, os átomos são movidos de acordo com essas interações e o processo se repete por diversos passos, que representam períodos de 1 a 2 femtossegundos, produzindo simulações que podem durar de alguns nanossegundos até alguns segundos (104).

As simulações realizadas levam em conta a natureza dinâmica das moléculas biológicas, permitindo observar mudanças conformacionais e poses de ligação mais estáveis, bem como as interações mais importantes, determinadas pela proximidade entre grupos do inibidor e da enzima durante a simulação. Alguns parâmetros gerados nas simulações serão discutidos a seguir. A numeração dos resíduos de aminoácidos foi feita com base na cruzipaína, a forma recombinante da cruzaina usada nesses estudos.

O RMSD (*root-mean-square deviation*) é um parâmetro que mede o desvio da estrutura do sistema em relação à conformação inicial. A tendência é que, após um tempo suficiente de simulação, o sistema se estabilize, o que é representado pela presença de um patamar na curva de RMSD. Idealmente, valores abaixo de 1,5 Å indicam que o sistema foi adequadamente estabilizado e não desvia significativamente da estrutura inicial. A Figura 19 apresenta os gráficos de RMSD obtidos para os compostos Neq0997, Neq1000 e Neq1074. Os valores foram obtidos utilizando a função *Trajectory Analysis* do programa *VMD* (86), e os gráficos foram gerados em *R* (98).

Figura 19 - Gráficos de RMSD para o Neq0997, Neq1000 e Neq1074, respectivamente.

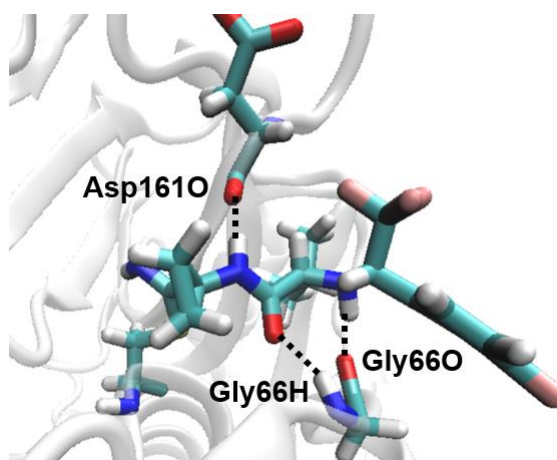


Fonte: Autoria própria.

Os gráficos de RMSD indicam pouco desvio em relação à estrutura inicial e uma estabilização após cerca de 40 ns (4000 *frames*). Esses dados mostram a importância de se ter utilizado uma estrutura inicial correspondente à enzima em complexo covalente com uma dipeptidilnitrila: uma vez que a estrutura inicial correspondia a uma conformação de baixa energia, não foi necessário muito tempo de simulação para que o sistema se estabilizasse.

Diversos estudos apontaram a importância das ligações de hidrogênio entre os inibidores peptídicos e os resíduos Gly66 e Asp161 da cruzaina (32,33,49). Essas três interações foram observadas para todas as moléculas durante as simulações, e a Figura 20 mostra as ligações de hidrogênio para o composto Neq1000. As distâncias médias dessas interações, com o desvio padrão, são mostradas na Tabela 2.

Figura 20 - Neq1000 ligado à cruzaina, com destaque para as ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor e o átomo de oxigênio do resíduo Asp161 (Asp161O) e os átomos de hidrogênio e oxigênio do resíduo Gly66 (Gly66H e Gly66O).



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Distâncias médias e desvios padrão (Å) para as ligações de hidrogênio entre os inibidores e os resíduos Gly66 e Asp161 da cruzaina.

Ligação de hidrogênio	Neq0977	Neq1000	Neq1074
Gly66H	2,09 (0,16)	2,15 (0,21)	2,52 (0,31)
Gly66O	1,95 (0,15)	1,91 (0,13)	1,90 (0,13)
Asp161O	1,91 (0,13)	1,93 (0,14)	1,96 (0,17)

Fonte: Autoria própria.

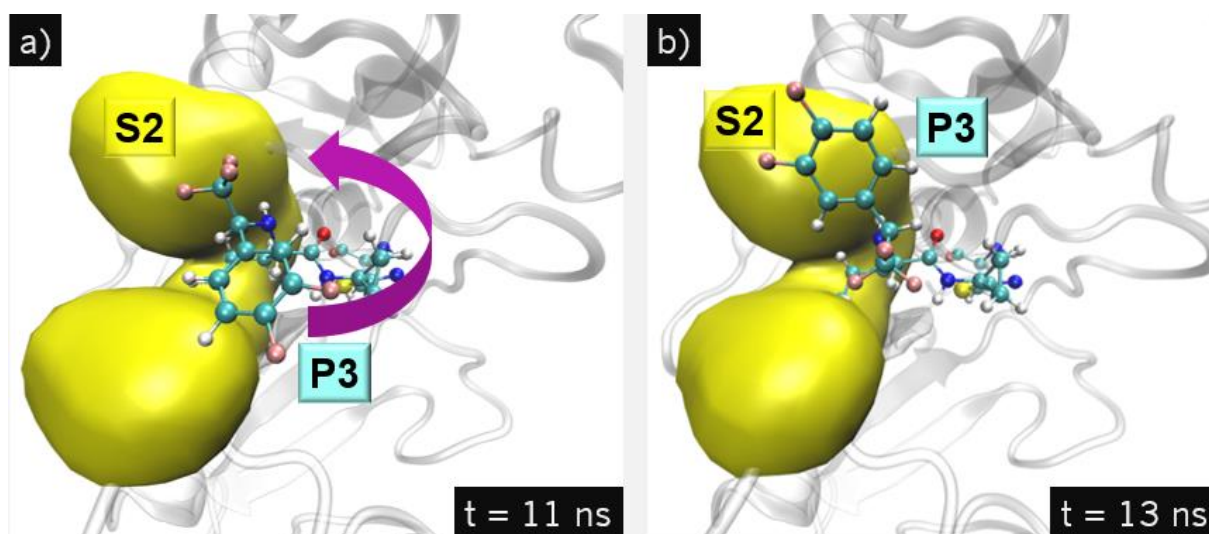
Os valores de distâncias de interação apresentados são condizentes com a existência de ligações de hidrogênio entre os inibidores e a cruzaina. Entretanto, a distância média para a ligação de hidrogênio entre o inibidor Neq1074 e Gly66H é maior que para os outros inibidores. O Neq1074 é o único da série que apresenta fenilalanina na região P2, e é também o que apresenta a menor atividade contra a cruzaina. Dessa forma, pode-se supor que parte da diferença de atividade observada se deve à menor eficiência dessa interação, visto que na série de compostos sintetizados, os derivados da leucina são mais ativos para a cruzaina que os derivados da fenilalanina. Além disso, observa-se que a estereoquímica do grupo TFEA não tem influência significativa nessas interações de hidrogênio, conforme demonstrado pelas distâncias médias similares para o par Neq0997 e Neq1000.

Uma inspeção visual das simulações permite que se façam algumas observações a respeito das interações de cada substituinte com seus respectivos subsítios. A região P1 dos inibidores produzidos apresenta o grupo ciclopropila, um substituinte pequeno, que não interage significativamente com resíduos de aminoácidos na região S1 ou S1'. Todavia, é possível observar a proximidade entre grupos capazes de formar ligação de hidrogênio, que são: o oxigênio da carbonila dos inibidores e o hidrogênio do grupo OH da Ser29, e o grupo NH do tioimidato com o oxigênio da carbonila da Gln19.

As simulações não permitem uma quantificação das interações hidrofóbicas entre P2 e S2, mas, devido à proximidade, é possível postular interações com as cadeias laterais dos aminoácidos Leu67, Met68, Ala138 e Leu160. Nas moléculas derivadas da leucina, observou-se que os grupos metila passam a maior parte do tempo voltados na direção do subsítio S2, devido a essas interações hidrofóbicas. Também foi observado que os grupos carboxilato das cadeias laterais dos resíduos Asp161 (próximo a P1) e Glu208 (próximo a P2) não estão voltados na direção da molécula, devido à ausência de grupos capazes de favorecer essas interações. A introdução de substituintes polares em P1 e em P2 podem levar a interações favoráveis com esses grupos e a maiores atividades inibitórias. De forma análoga, foi observada uma proximidade entre os grupos metilas de P2 e grupos NH dos resíduos Met68, Val139 e His162, indicando que derivados contendo grupos polares substituindo hidrogênios em uma das metilas pode também levar à formação de interações polares.

Na região P3, observa-se que o grupo CF_3 fica exposto ao solvente e não interage com a enzima, exceto por breves interações com o grupo NH do resíduo Gln159, que pode ser descrito como uma interação dipolar, já que a capacidade dos átomos de flúor de atuarem como aceptores de ligação de hidrogênio não é clara. Uma movimentação de P3 foi observada após 12 ns de simulação para o Neq1000: o grupo gira em torno da ligação C–N da TFEA, o que leva o anel aromático a se aproximar do resíduo Leu67, conforme mostrado na Figura 21. Uma vez que na conformação anterior o grupo P3 estava longe de resíduos hidrofóbicos, e que o grupo se manteve nessa posição até o final da simulação, pode-se postular que essa rotação leva a um estado de menor energia, que explica parcialmente a maior atividade do Neq1000 em relação aos outros compostos, para os quais não foi observada rotação.

Figura 21 - Rotação em torno da ligação C–N da TFEA, levando o grupo P3 de uma conformação próxima ao resíduo Leu160 (a), na parte inferior do subsítio S2, destacado em amarelo, para uma conformação próxima a Leu67 (b), na parte superior de S2.



Fonte: Autoria própria.

Para o Neq1000, o átomo de hidrogênio adjacente ao grupo CF_3 se aproxima ($D_{\text{média}} = 4,54 \text{ \AA}$) do átomo de oxigênio do resíduo Ser64 após 12 ns de simulação, mas não deve haver a formação de uma ligação de hidrogênio fraca ($\text{C-H}\cdots\text{O}$), cuja distância costuma ser da ordem de 3.4 \AA (105). Essa interação também não foi observada nas outras simulações. Em nenhum dos compostos foi observada a existência de interações entre o anel aromático em P3 e grupos polares dos resíduos mais próximos, como Ser61 (OH), Ser64 (OH), Asn70 (CONH_2) e Gln159 (NH), o que justifica o bioisosterismo da substituição H/F em P3. Entretanto, a proximidade com esses grupos sugere que a utilização de substituintes polares nessa região, além de aumentar a hidrossolubilidade, pode aumentar a atividade inibitória devido a essas interações polares.

4 Conclusões

Com base na literatura e na experiência anterior do grupo, foi possível planejar rotas de síntese que se mostraram eficientes, com bons rendimentos e valores de excesso enantiomérico. Assim, foi produzida uma série de compostos relacionados ao protótipo Neq0594, dos quais doze são derivados fluorados em P3. A caracterização dos compostos e a obtenção de cromatogramas em coluna quiral possibilitaram a confirmação da estrutura e da pureza enantiomérica, maior que 95%.

A atividade dos compostos produzidos foi medida por ensaios fluorimétricos em diversas enzimas. Os derivados com o grupo isobutila (derivados da leucina) em P2 apresentaram maior atividade inibitória frente à cruzaina, ao passo que os derivados com o grupo benzila (derivados da fenilalanina) foram mais ativos e seletivos para catepsina L. Os ensaios também demonstraram que a substituição H/F em P3 não influenciou a atividade, confirmando o efeito bioisostérico. Além disso, foi observada a existência de uma correlação linear (efeito extratermodinâmico) entre as atividades inibitórias nas enzimas de protozoários (cruzaina e LmCPB).

Com as simulações utilizando dinâmica molecular foi observada a manutenção das interações do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Gly66 e Asp161 da cruzaina, que são as mais importantes para inibidores peptídicos. Não foram observadas interações dipolares ou multipolares envolvendo os átomos de flúor em P3, cujas interações majoritárias foram de natureza hidrofóbica. Apesar disso, espera-se que os compostos apresentem maior estabilidade metabólica e biodisponibilidade, e tanto o cálculo dos parâmetros físico-químicos quanto as simulações sugerem modificações a serem realizadas nas estruturas de eventuais derivados, como o aumento da polaridade e da rigidez estrutural.

5 Referências

- 1 DNDI. **Doença de Chagas: chegou o momento de acabar com 110 anos de invisibilidade.** Disponível em: <https://www.dndial.org/2019/comunicacao-e-informacao/press-releases/doenca-de-chagas-chegou-o-momento-de-acabar-com-110-anos-de-invisibilidade/>. Acesso em: 8 maio 2019.
- 2 WIGGERS, H. J. et al. Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. 1–11, 2013.
- 3 BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.
- 4 LONGO, D. L. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 456–466, 2015.
- 5 MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601–620, 2007.
- 6 CARVALHO, T. U. **ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL - Estudo microscopia óptica.** Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>. Acesso em 10 maio 2019.
- 7 PROKOPCZYK, I. M. et al. Integration of methods in cheminformatics and biocalorimetry for the design of trypanosomatid enzyme inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 17–33, 2014.
- 8 LECAILLE, F.; KALETA, J.; BROMME, D. Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4459–4488, 2002.
- 9 DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. Cruzipain, the Major Cysteine Protease of *Trypanosoma cruzi*: A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine Development and Drug Target . A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3174–3202, 2009.

10 WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: Mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, n. 31, p. 1–24, 2009.

11 SIQUEIRA-NETO, J. L. A quick fix for Chagas disease therapy: a new trick using an old drug. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 123–124, 2018.

12 SBARAGLINI, M. L. et al. Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 1, p. 91–95, 2016.

13 URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 55–68, 2010.

14 BOIANI, M. et al. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 12, p. 1736–1745, 2010.

15 PAIVA, C. N.; MEDEI, E.; BOZZA, M. T. ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. 1–19, 2018.

16 DOYLE, P. S.; ENGEL, J. C. Contribution to New Therapies for Chagas Disease. Em: JÄGER, T.; KOCH, O.; FLOHÉ, L. (Eds.). **Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery**. First ed. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p. 473–487.

17 JAISHANKAR, P. et al. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 624–628, 2008.

18 SERRANO, M. et al. Identification of Structure-Stabilizing Interactions in Enzymes: A Novel Mechanism to Impact Enzyme Activity. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 76, n. 1–2, p. 59–71, 2018.

19 MCKERROW, J. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 263–269, 2009.

20 MCKERROW, J. H. The diverse roles of cysteine proteases in parasites and their suitability as drug targets. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1–3,

2018.

21 NICOLL-GRIFFITH, D. A. Use of cysteine-reactive small molecules in drug discovery for trypanosomal disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 4, p. 353–366, 2012.

22 FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 180, p. 49–61, 2017.

23 REIS, F. C. G. et al. The substrate specificity of cruzipain 2, a cysteine protease isoform from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p. 215–220, 2006.

24 ARAFET, K.; FERRER, S.; MOLINER, V. Computational Study of the Catalytic Mechanism of the Cruzain Cysteine Protease. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 2, p. 1207–1215, 2017.

25 OTTO, H.-H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 1, p. 133–171, 1997.

26 LEE, C. U.; GROSSMANN, T. N. Reversible covalent inhibition of a protein target. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 35, p. 8699–8700, 2012.

27 TOH, E. C. Y. et al. Cysteine Protease Inhibitors: from Evolutionary Relationships to Modern Chemotherapeutic Design for the Treatment of Infectious Diseases. **Current Protein and Peptide Science**, v. 11, p. 725–743, 2010.

28 SANTOS, A. M. et al. Experimental study and computational modelling of cruzain cysteine protease inhibition by dipeptidyl nitriles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, p. 24317–24328, 2018.

29 ARAFET, K.; FERRER, S.; MOLINER, V. First Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Studies of the Inhibition Mechanism of Cruzain by Peptidyl Halomethyl Ketones. **Biochemistry**, v. 54, n. 21, p. 3381–3391, 2015.

30 DEATON, D. N.; KUMAR, S. Cathepsin K Inhibitors: Their Potential as Anti-Osteoporosis Agents. **Progress in medicinal chemistry**, v. 42, p. 245–375, 2004.

31 ZHAI, X.; MEEK, T. D. Catalytic Mechanism of Cruzain from *Trypanosoma cruzi* As Determined from Solvent Kinetic Isotope Effects of Steady-State and Pre-Steady-State Kinetics. **Biochemistry**, v. 57, n. 22, p. 3176–3190, 2018.

32 SILVA, D. G. **Planejamento, síntese e avaliação de inibidores da enzima cruzaina e de agentes tripanossomicidas derivados de imidazopiridina**. 2017. 199 f. Universidade de São Paulo. 2017.

33 MÉNDEZ-LUCIO, O. et al. Computational study on the inhibition mechanism of cruzain by nitrile-containing molecules. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 35, p. 28–35, 2012.

34 BEAULIEU, C. et al. Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 24, p. 7444–7449, 2010.

35 MARTINEZ-MAYORGA, K. et al. Cruzain inhibitors: efforts made, current leads and a structural outlook of new hits. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 7, p. 890–898, 2015.

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

37 POLTICELLI, F. et al. Probing the Cruzain S2 Recognition Subsite: A Kinetic and Binding Energy Calculation Study. **Biochemistry**, v. 44, p. 2781–2789, 2005.

38 BRYANT, C. et al. Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 21, p. 6218–6221, 2009.

39 HERNANDEZ, A. A.; ROUSH, W. R. Recent advances in the synthesis, design and selection of cysteine protease inhibitors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 459–465, 2002.

40 SILVA, D. G. et al. A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 5031–5035, 2017.

41 ASAAD, N. et al. Dipeptidyl nitrile inhibitors of Cathepsin L. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 4280–4283, 2009.

42 BETHEL, P. A. et al. Design of selective Cathepsin inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 4622–4625, 2009.

43 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.

44 BURTOLOSO, A. C. B. et al. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2017.

45 TRAUBE, T.; SHOKHEN, M.; ALBECK, A. A new method for filtering of reactive “warheads” of transition-state analog protease inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, p. 134–138, 2014.

46 MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. Cysteine Protease Inhibitors as Chemotherapy for Parasitic Infections. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 639–644, 1999.

47 ENGEL, J. C. et al. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 4, p. 725–734, 1998.

48 DOYLE, P. S. et al. A cysteine protease inhibitor cures Chagas’ disease in an immunodeficient-mouse model of infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3932–3939, 2007.

49 AVELAR, L. A. A. et al. Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–24, 2015.

50 NDAO, M. et al. Reversible Cysteine Protease Inhibitors Show Promise for a Chagas Disease Cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1167–1178, 2014.

51 GAUTHIER, J. Y. et al. The identification of potent, selective, and bioavailable cathepsin S inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 17, p. 4929–4933, 2007.

52 CIANNI, L. et al. Leveraging the cruzain S3 subsite to increase affinity for reversible covalent inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 79, p. 285–292, 2018.

53 SCHIRMEISTER, T. et al. Evaluation of dipeptide nitriles as inhibitors of rhodesain, a major cysteine protease of *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 45–50, 2017.

54 ZWICKER, J. D. et al. Optimization of dipeptidic inhibitors of cathepsin L for improved *Toxoplasma gondii* selectivity and CNS permeability. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 10, p. 1972–1980, 2018.

55 FRIZLER, M. et al. Development of Nitrile-Based Peptidic Inhibitors of Cysteine Cathepsins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 294–322, 2010.

56 GAUTHIER, J. Y. et al. The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 923–928, 2008.

57 FLEMING, F. F. et al. Nitrile-Containing Pharmaceuticals: Efficacious Roles of the Nitrile Pharmacophore. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 7902–7917, 2010.

58 SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2014. 517 p.

59 SILVA, D. G. et al. Highly predictive hologram QSAR models of nitrile-containing cruzain inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 35, n. 15, p. 3232–3249, 2017.

60 MEANWELL, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 2529–2591, 2011.

61 ALVES, L. C. et al. Analysis of the S2 subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of *Leishmania mexicana*, and cruzain of *Trypanosoma cruzi*, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, n. 2, p. 137–143, 2001.

62 LI, C. S. et al. Identification of a potent and selective non-basic cathepsin K inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 1985–1989, 2006.

63 LECAILLE, F. et al. Subsite specificity of trypanosomal cathepsin L-like cysteine proteases Probing the S2 pocket with phenylalanine-derived amino acids. **European Journal of Biochemistry**, v. 2741, p. 2733–2741, 2001.

64 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, p. 2380–2392, 2014.

65 KASSAHUN, K. et al. Pharmacokinetics and metabolism in rats, dogs, and monkeys of the cathepsin K inhibitor odanacatib: Demethylation of a methylsulfonyl moiety as a major metabolic pathway. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 6, p. 1079–1087, 2011.

66 RIPKA, A. S.; RICH, D. H. Peptidomimetic design. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, p. 441–452, 1998.

67 PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 3147–3176, 1996.

68 HAGMANN, W. K. The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 15, 2008.

69 BOHM, H.-J. et al. Fluorine in Medicinal Chemistry. **ChemBioChem**, v. 5, p. 637–643, 2004.

70 VOLONTERIO, A.; BRAVO, P.; ZANDA, M. Synthesis of Partially Modified Retro and Retroinverso ψ [NHCH(CF₃)]-Peptides. **Organic Letters**, v. 2, n. 13, p. 1827–1830, 2000.

71 MOLTENI, M.; VOLONTERIO, A.; ZANDA, M. Stereocontrolled Synthesis of ψ [CH(CF₃)NH]Gly-Peptides. **Organic Letters**, v. 5, n. 21, p. 3887–3890, 2003.

72 MOLTENI, M. et al. Fluorinated peptidomimetics: synthesis, conformational and biological features. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 125, p. 1735–1743, 2004.

73 SANI, M.; VOLONTERIO, A.; ZANDA, M. The Trifluoroethylamine Function as Peptide Bond Replacement. **ChemMedChem**, v. 2, p. 1693–1700, 2007.

74 HUGHES, G. et al. Diastereoselective Reductive Amination of Aryl Trifluoromethyl Ketones and α -Amino Esters. **Angewandte Chemie**, v. 119, p. 1871–1874, 2007.

75 BLACK, W. C. et al. Trifluoroethylamines as amide isosteres in inhibitors of cathepsin K. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 4741–4744, 2005.

76 FLETTERICK, R. J. et al. A target within the target: probing cruzain's P1' site to define structural determinants for the Chagas' disease protease. **Structure**, v. 8, n. 8, p. 831–840, 2002.

77 HOLSINGER, L. J. et al. **Compounds that Inhibit Protease Cathepsin S and HCV Replication**. WO/2009/055467 A2. World Intellectual Property Organization, 2009.

78 BERGER, A. A. et al. Deciphering the Fluorine Code - The Many Hats Fluorine Wears in a Protein Environment. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 9, p. 2093–2103, 2017.

79 ZHOU, Y. et al. Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II-III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 2, p. 422–518, 2016.

80 BLAKEMORE, D. C. et al. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. **Nature Chemistry**, v. 10, p. 383–394, 2018.

81 STUMPFE, D.; BAJORATH, J. Exploring Activity Cliffs in Medicinal Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 2932–2942, 2012.

82 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.

83 GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7512–7515, 1997.

84 DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small

molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42717, 2017.

85 MOTT, B. T. et al. Identification and Optimization of Inhibitors of Trypanosomal Cysteine Proteases: Cruzain, Rhodesain, and TbCatB. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 52–60, 2010.

86 HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

87 SØNDERGAARD, C. R. et al. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 7, p. 2284–2295, 2011.

88 OLSSON, M. H. M. et al. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 2, p. 525–537, 2011.

89 HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 17, p. 1–17, 2012.

90 CASE, D. A. et al. **AMBER2018**. University of California, San Francisco, 2018.

91 WANG, J. et al. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **Journal of molecular graphics & modelling**, v. 25, n. 2, p. 247–260, 2006.

92 JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983.

93 WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 2004.

94 MAIER, J. A. et al. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **Journal of chemical theory and computation**, v. 11, n. 8, p. 3696–3713, 2015.

95 RYCKAERT, J. P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of

the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 3, p. 327–341, 1977.

96 LAMEIRA, J. et al. Predicting the affinity of halogenated reversible covalent inhibitors through relative binding free energy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 21, n. 44, p. 24723–24730, 2019.

97 ROE, D. R.; CHEATHAM, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 7, p. 3084–3095, 9 Jul. 2013.

98 R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria, 2017.

99 CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. 1st. ed. [s.l.] Oxford University Press, 2001. 1490 p.

100 HAN, S.; KIM, Y. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 60, n. 672, p. 2447–2467, 2004.

101 FRAY, M. J. Investigation of Epimer Formation in Amide-Coupling Reactions: An Experiment for Advanced Undergraduate Students. **Journal of Chemical Education**, v. 91, p. 136–140, 2014.

102 MONTALBETTI, C. A. G. N. et al. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 740, p. 10827–10852, 2005.

103 CIANNI, L. et al. Can Cysteine Protease Cross-Class Inhibitors Achieve Selectivity? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 23, p. 10497–10525, 12 Dec. 2019.

104 DURRANT, J. D. et al. Computational Identification of Uncharacterized Cruzain Binding Sites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, p. 1–11, 2010.

105 FERREIRA DE FREITAS, R.; SCHAPIRA, M. A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. **MedChemComm**, v. 8, n. 10, p. 1970–1981, 2017.

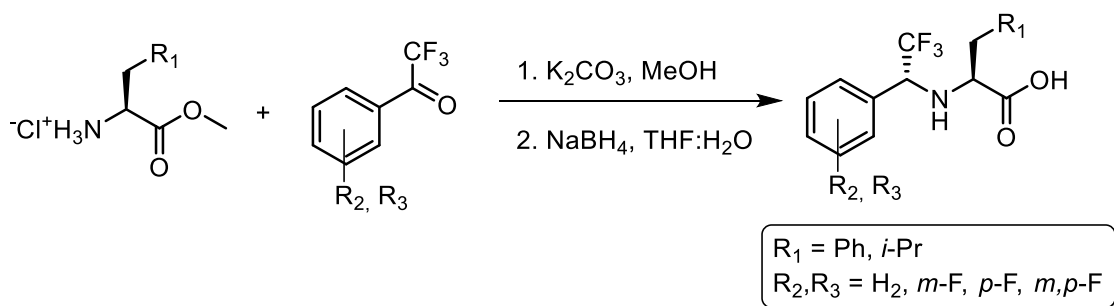
6 Anexo

6.1 Procedimentos experimentais e dados das caracterizações

6.1.1 Considerações gerais

Os procedimentos gerais utilizados para a síntese das moléculas do projeto são descritos a seguir. Os dados das caracterizações foram resumidos em forma de texto, e utilizou-se o ponto como separador decimal para não haver confusão com as vírgulas que separam os números. Cada composto é apresentado com três denominações: o código referente ao banco de dados do NEQUIMED/IQSC/USP (código Neq), o código individual atribuído por quem o sintetizou e a nomenclatura obtida no programa *Chemdraw Professional 17.0*, em inglês, que não corresponde obrigatoriamente à nomenclatura oficial da IUPAC.

6.1.2 Procedimento geral para a preparação dos (*R,S*)-trifluorometilaminoácidos

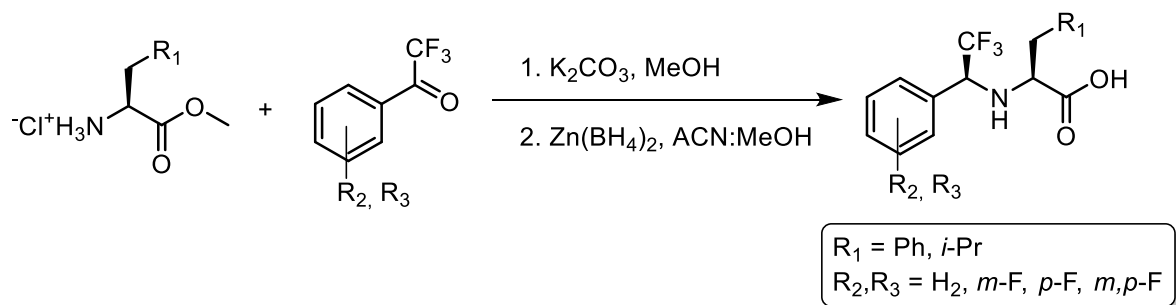


Em um balão de duas bocas, conectado a um condensador de refluxo, os aminoésteres (1,0 mmol) foram dissolvidos em 10 mL de metanol anidro, sob atmosfera de argônio. Em seguida, 3,0 equivalentes de carbonato de potássio (K_2CO_3) seco em estufa a 120 °C e 1,1 equivalentes de 2,2,2-trifluoroacetofenona foram adicionados à solução. A reação permaneceu sob agitação magnética por 18 h a 50

°C. Ao término da reação, o conteúdo do balão foi filtrado em papel e concentrado sob pressão reduzida.

A imina formada foi imediatamente utilizada na próxima etapa, para evitar hidrólise, não necessitando de purificação. O sólido (ou óleo) foi solubilizado em uma mistura de THF:H₂O (95:5) e reduzido com oito equivalentes de NaBH₄ por 6 h. Ao término da reação, o solvente foi evaporado, o resíduo foi dissolvido em 10 mL de H₂O destilada e o pH ajustado para 10 com solução de NaOH 1 mol L⁻¹. A solução foi extraída com acetato de etila (3 x 15 mL) e a fase aquosa foi acidificada com solução de ácido clorídrico 2 mol L⁻¹ até pH 2, e novamente extraída com acetato de etila (5 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer o produto puro em rendimentos moderados.

6.1.3 Procedimento geral para a preparação dos (S,S)-trifluorometilaminoácidos



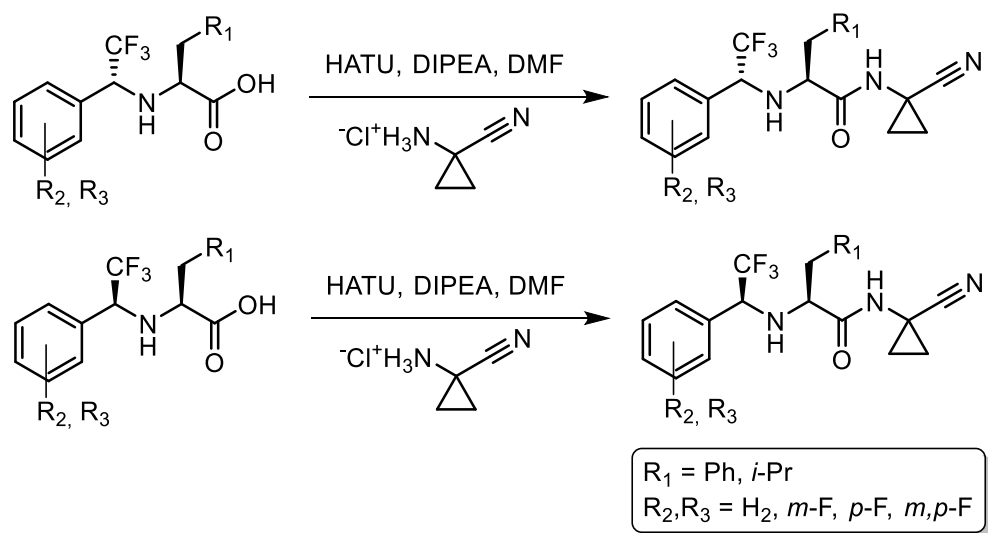
Em um balão de duas bocas, conectado a um condensador de refluxo, os aminoésteres (1,0 mmol) foram dissolvidos em 10 mL de metanol anidro, sob atmosfera de argônio. Em seguida, 3,0 equivalentes de carbonato de potássio (K₂CO₃) seco em estufa a 120 °C e 1,1 equivalentes de 2,2,2-trifluoroacetofenona foram adicionados à solução. A reação permaneceu sob agitação magnética por 18 h a 50 °C. Ao término da reação, o conteúdo do balão foi filtrado em papel e concentrado sob pressão reduzida.

Concomitantemente à reação anterior, iniciou-se o preparo da solução de boridreto de zinco, na proporção de 4 equivalentes da quantidade teórica de imina. Dessa forma, 2 equivalentes de cloreto de zinco foram adicionados a um balão de

fundo redondo de 25 mL e o sal foi seco sob vácuo, utilizando um soprador térmico para fundi-lo até que não fosse mais observado desprendimento de bolhas. Ao balão foram adicionados 4 equivalentes de boroidreto de sódio e, sob argônio, foram adicionados 4 mL de dimetoxietano (DME) seco. A solução foi agitada por 18 h a temperatura ambiente. Antes de utilizar a solução para a redução, a agitação foi interrompida para que o cloreto de sódio formado precipitasse, permanecendo parte do boroidreto de zinco em solução.

A imina formada foi concentrada sob pressão reduzida e imediatamente utilizada na próxima etapa, para evitar hidrólise, não necessitando de purificação. O sólido (ou óleo) formado foi dissolvido em 1 mL de metanol anidro sob atmosfera de argônio e, em seguida, 5 mL de acetonitrila foram adicionados à solução. O balão foi imerso em um banho de gelo seco e acetona, com temperatura controlada de -40 ± 5 °C. Uma vez atingida a temperatura, 4 mL da solução de $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ foram adicionados com uma seringa, e a mistura foi agitada por 3 h a -40 °C, sob argônio. Ao término da reação, adicionou-se água (5 mL) e solução de ácido clorídrico 2 mol L^{-1} até pH 2. A mistura foi então extraída com acetato de etila (3 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada sob pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica-gel utilizando como eluente uma mistura de acetato de etila e hexano, fornecendo o produto em rendimentos moderados.

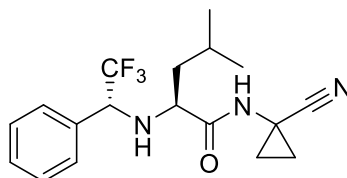
6.1.4 Procedimento geral para a preparação das trifluorometilamino dipeptidil-nitrilas



Em um balão contendo o ácido carboxílico foram adicionados 1,3 equivalentes de ciclopropilaminonitrila e 1,1 equivalentes de HATU. Sob atmosfera de argônio, os reagentes foram dissolvidos em 1,0 mL de dimetilformamida (DMF), e, em seguida, 4,0 equivalentes de diisopropiletilamina (DIPEA) foram adicionados gota a gota à solução. A reação permaneceu sob agitação magnética a temperatura ambiente por 16 h. Após o término, adicionou-se à solução 15 mL de acetato de etila e, em seguida, a mistura foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 15 mL) e com solução saturada de cloreto de sódio (2 x 15 mL). A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e, após filtração, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto resultante foi purificado em coluna cromatográfica de sílica-gel utilizando como eluente uma mistura de acetato de etila e hexano, fornecendo os produtos em bons rendimentos.

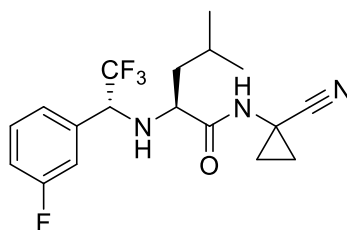
6.1.5 Dados das caracterizações

Neq0981 (SH17): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-4-methyl-2-(((R)-2,2,2-trifluoro-1-phenylethyl)amino)pentanamide



Sólido branco. **Ponto de fusão:** 79.0 – 81.5 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, ppm): 7.67 (s, 1H), 7.45 – 7.35 (m, 3H), 7.35 – 7.27 (m, 2H), 3.88 – 3.71 (m, 1H), 3.04 (dd, *J* = 9.6, 1.6 Hz, 1H), 1.98 (db, *J* = 8.5 Hz, 1H), 1.63 – 1.15 (m, 7H), 0.83 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.54 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H). **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃, ppm): 175.00 (s), 133.31 (s), 129.63 (s), 129.11 (s), 128.10 (s), 124.97 (q, *J* = 280.7 Hz), 119.84 (s), 63.81 (q, *J* = 29.2 Hz), 58.94 (s), 42.63 (s), 24.63 (s), 23.18 (s), 20.88 (s), 20.07 (s), 16.93 (s), 16.42 (s). **FTIR** (cm⁻¹): 3320.89, 2959.07, 2934.34, 2872.17, 2242.74, 1672.21, 1491.93, 1369.63, 1264.17, 1170.92, 1119.27, 704.66. [α]_D²³: -104.31° (MeOH, *c* = 1.0×10⁻²). **Pureza:** 98.50%, *t_R* = 26.009 min. Molécula preparada pelo Dr. Anwar Shamim.

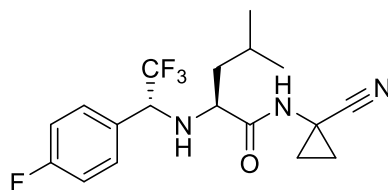
Neq0976 (SH22): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-4-methyl-2-(((R)-2,2,2-trifluoro-1-(3-fluorophenyl)ethyl)amino)pentanamide



Sólido branco. **Ponto de fusão:** 111.2 – 112.3 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃, ppm): 7.58 (s, 1H), 7.40 (td, *J* = 8.0, 5.8 Hz, 1H), 7.16 – 7.05 (m, 3H), 3.92 – 3.82 (m, 1H), 3.09 – 3.00 (m, 1H), 2.01 (dd, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 1H), 1.65 – 1.34 (m, 5H), 1.31 – 1.17 (m, 2H), 0.86 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.61 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H). **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃, ppm): 174.83 (s), 162.95 (d, *J* = 248.3 Hz), 135.74 (d, *J* = 6.9 Hz), 130.78 (d, *J* = 8.2 Hz), 124.68 (q, *J* = 280.8 Hz), 124.20 (d, *J* = 2.7 Hz), 119.81 (s), 116.75 (d, *J* = 21.0 Hz), 115.05 (d, *J* = 22.5 Hz), 63.31 (qd, *J* = 29.6, 1.4 Hz), 58.91 (s), 42.66 (s), 24.66

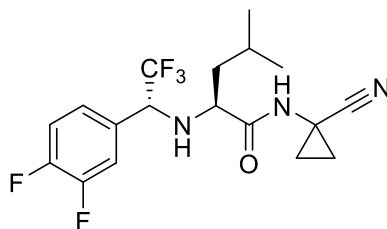
(s), 23.14 (s), 20.96 (s), 20.12 (s), 16.91 (s), 16.46 (s). **FTIR** (cm^{-1}): 3324.29, 2959.95, 2934.13, 2872.84, 2243.16, 1675.44, 1594.02, 1488.02, 1451.29, 1369.46, 1301.01, 1262.27, 1179.46, 1151.16, 1122.84, 789.41, 714.20. $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: -95.79° (MeOH, $c = 1.0 \times 10^{-2}$). **HRMS**: m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 372.16935; encontrada: 372.16772. **Pureza**: 94.96%, $t_{\text{R}} = 26.315$ min. Molécula preparada pelo Dr. Anwar Shamim.

Neq0979 (SH15): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-4-methyl-2-(((R)-2,2,2-trifluoro-1-(4-fluorophenyl)ethyl)amino)pentanamide



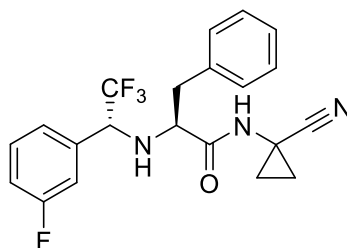
Sólido branco. **Ponto de fusão**: $73.7 - 74.3^\circ\text{C}$. **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 7.59 (s, 1H), 7.33 (dd, $J = 8.6, 5.2$ Hz, 2H), 7.15 – 7.07 (m, 2H), 3.85 (dq, 1H), 3.03 (dtb, 1H), 1.97 (dd, $J = 9.1, 2.4$ Hz, 1H), 1.66 – 1.16 (m, 7H), 0.86 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (126 MHz, CDCl_3 , ppm): 174.89 (s), 163.33 (d, $J = 249.3$ Hz), 130.02 (d, $J = 8.4$ Hz), 129.23 (d, $J = 2.8$ Hz), 124.82 (q, $J = 280.9$ Hz), 119.81 (s), 116.20 (d, $J = 21.7$ Hz), 63.06 (q, $J = 29.4$ Hz), 58.88 (s), 42.67 (s), 24.67 (s), 23.14 (s), 21.01 (s), 20.11 (s), 16.91 (s), 16.46 (s). **FTIR** (cm^{-1}): 3323.14, 2960.00, 2933.98, 2872.92, 2243.26, 1673.43, 1607.65, 1512.29, 1426.63, 1369.84, 1266.11, 1227.86, 1173.39, 1122.26, 829.43. $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: -97.57° (MeOH, $c = 1.0 \times 10^{-2}$). **HRMS**: m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 372.16935; encontrada: 372.16733. **Pureza**: 95.06%, $t_{\text{R}} = 26.321$ min. Molécula preparada pelo Dr. Anwar Shamim.

Neq0977 (SH23): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-2-(((R)-1-(3,4-difluorophenyl)-2,2,2-trifluoroethyl)amino)-4-methylpentanamide



Sólido branco. **Ponto de fusão:** 73.3 – 74.8 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃, ppm): 7.47 (s, 1H), 7.29 – 7.14 (m, 2H), 7.12 – 7.07 (m, 1H), 3.88 (p, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.00 (dt, *J* = 9.2, 3.8 Hz, 1H), 2.08 – 1.92 (m, 1H), 1.65 – 1.14 (m, 7H), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.63 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃, ppm): 174.87 (s), 151.11 (dd, *J* = 253.7, 14.6 Hz), 150.66 (dd, *J* = 252.5, 14.6 Hz), 130.45 (s), 125.17 – 124.88 (m), 124.63 (q, *J* = 280.8 Hz), 119.90 (s), 118.10 (dd, *J* = 16.3, 1.9 Hz), 117.31 (dd, *J* = 14.9, 3.9 Hz), 62.84 (q, *J* = 29.6 Hz), 58.87 (s), 42.78 (s), 24.75 (s), 23.17 (s), 21.18 (s), 20.22 (s), 16.95 (s), 16.56 (s). **FTIR** (cm⁻¹): 3324.95, 2960.45, 2934.93, 2873.39, 2243.43, 1674.42, 1612.67, 1518.73, 1496.49, 1439.06, 1369.66, 1282.19, 1265.11, 1179.84, 1153.68, 1125.69, 822.29. $[\alpha]_D^{23}$: -87.24° (MeOH, *c* = 1.0×10⁻²). **HRMS:** *m/z* calculada para C₁₈H₂₁F₅N₃O [M+H]⁺: 390.15993; encontrada: 390.15861. **Pureza:** 99.00%, *t_R* = 26.724 min. Molécula preparada pelo Dr. Anwar Shamim.

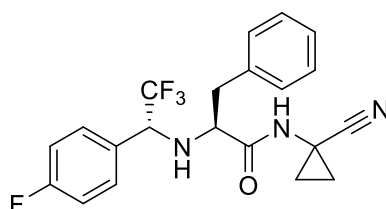
Neq1018 (SH26): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-4-methyl-2-(((R)-2,2,2-trifluoro-1-(3-fluorophenyl)ethyl)amino)pentanamide



Sólido branco. **Ponto de fusão:** 71.1 – 71.6 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, ppm): 7.60 (s, 1H), 7.25 – 7.15 (m, 3H), 7.11 (td, *J* = 8.0, 5.8 Hz, 1H), 6.98 – 6.87 (m, 3H), 6.55 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.66 (dq, *J* = 15.1, 7.5 Hz, 1H), 3.18 – 3.05 (m, 2H), 2.55 (td, *J* = 12.0, 3.3 Hz, 1H), 2.01 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 1.58 – 1.44 (m, 2H), 1.26 – 1.08 (m, 2H). **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃, ppm): 173.59 (s), 162.74 (d, *J* = 248.2 Hz), 135.74 (s), 134.79 – 134.56 (m), 130.51 (d, *J* = 8.2 Hz), 129.28 (s), 129.02

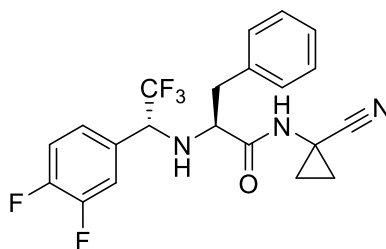
(s), 127.76 (s), 124.58 (q, $J = 287.8$ Hz), 124.05 (s), 119.77 (s), 116.57 (d, $J = 21.0$ Hz), 114.67 (d, $J = 22.7$ Hz), 63.24 (qd, $J = 29.7, 1.4$ Hz), 61.74 (s), 39.34 (s), 20.21 (s), 17.10 (s), 16.60 (s). **FTIR** (cm^{-1}): 3330.07, 3064.95, 3029.51, 2927.18, 2242.68, 1683.80, 1593.90, 1488.45, 1452.63, 1258.91, 1165.17, 1121.26, 850.97, 789.50, 715.64, 700.88. $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: -64.38° (MeOH, $c = 1.0 \times 10^{-2}$). **HRMS**: m/z calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 406.15370; encontrada: 406.15228. **Pureza**: 98.92%, $t_{\text{R}} = 26.184$ min. Molécula preparada pelo Dr. Anwar Shamim.

Neq0980 (SH27): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-3-phenyl-2-(((R)-2,2,2-trifluoro-1-(4-fluorophenyl)ethyl)amino)propanamide



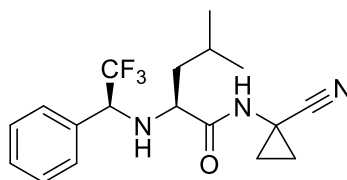
Sólido branco. **Ponto de fusão**: $79.5 - 80.7$ °C. **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 7.58 (s, 1H), 7.22 – 7.15 (m, 3H), 6.95 – 6.90 (m, 2H), 6.84 – 6.77 (m, 2H), 6.69 (dd, $J = 8.6, 5.2$ Hz, 2H), 3.72 – 3.61 (m, 1H), 3.15 – 3.04 (m, 2H), 2.60 – 2.50 (m, 1H), 2.00 (dd, $J = 9.9, 1.8$ Hz, 1H), 1.58 – 1.44 (m, 2H), 1.23 – 1.17 (m, 1H), 1.14 – 1.06 (m, 1H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, CDCl_3 , ppm): 173.64 (s), 163.12 (d, $J = 248.9$ Hz), 135.96 (s), 129.70 (d, $J = 8.5$ Hz), 129.25 (s), 129.09 (s), 128.26 – 128.09 (m), 127.56 (s), 124.73 (q, $J = 283.7$ Hz), 119.78 (s), 115.95 (d, $J = 21.8$ Hz), 62.93 (q, $J = 29.2$ Hz), 61.72 (s), 39.35 (s), 20.19 (s), 17.05 (s), 16.57 (s). **FTIR** (cm^{-1}): 3330.20, 3029.27, 2922.71, 2852.61, 2242.61, 1683.38, 1605.95, 1511.09, 1493.82, 1263.55, 1225.59, 1165.41, 1120.77, 826.46. $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: -62.01° (MeOH, $c = 7.1 \times 10^{-3}$). **HRMS**: m/z calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 406.15370; encontrada: 406.15184. **Pureza**: 99.56%, $t_{\text{R}} = 26.242$ min. Molécula preparada pelo Dr. Anwar Shamim.

Neq1019 (SH29): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-2-(((R)-1-(3,4-difluorophenyl)-2,2,2-trifluoroethyl)amino)-3-phenylpropanamide



Sólido branco. **Ponto de fusão:** 93.1 – 93.7 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, ppm): 7.56 (s, 1H), 7.26 – 7.17 (m, 3H), 6.99 – 6.86 (m, 3H), 6.53 – 6.38 (m, 2H), 3.66 (dq, *J* = 10.0, 7.4 Hz, 1H), 3.17 – 3.05 (m, 2H), 2.57 – 2.46 (m, 1H), 1.98 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 1.59 – 1.46 (m, 2H), 1.26 – 1.07 (m, 2H). **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃, ppm): 173.46 (s), 150.92 (dd, *J* = 250.7, 11.9 Hz), 150.32 (dd, *J* = 249.2, 11.3 Hz), 135.87 (s), 129.30 (s), 129.00 (s), 127.82 (s), 124.69 (dd, *J* = 6.3, 4.0 Hz), 124.47 (q, *J* = 280.3 Hz), 119.77 (s), 117.71 (d, *J* = 17.6 Hz), 116.69 (d, *J* = 18.1 Hz), 62.72 (q, *J* = 29.2 Hz), 61.79 (s), 39.36 (s), 20.22 (s), 17.05 (s), 16.62 (s). **FTIR** (cm⁻¹): 3334.88, 3063.85, 3029.96, 2926.37, 2242.97, 1684.01, 1612.71, 1518.71, 1494.04, 1438.88, 1264.14, 1169.60, 1152.33, 1123.85, 821.88, 699.81. $[\alpha]_D^{23}$: -47.77° (MeOH, *c* = 7.4×10⁻³). HRMS: *m/z* calculada para C₂₁H₁₉F₅N₃O [M+H]⁺: 423.14428; encontrada: 424.14268. **Pureza:** 95.47%, *t_R* = 26.720 min. Molécula preparada pelo Dr. Anwar Shamim.

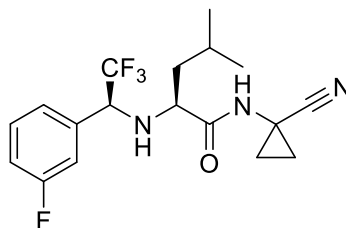
Neq0635 (NP01): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-4-methyl-2-(((S)-2,2,2-trifluoro-1-phenylethyl)amino)pentanamide



Sólido branco. **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, ppm): 7.45 – 7.24 (m, 6H), 4.11 – 3.98 (m, 1H), 3.35 (dt, *J* = 9.2, 4.7 Hz, 1H), 2.16 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 1.83 – 1.70 (m, 1H), 1.63 – 1.33 (m, 4H), 1.05 – 0.89 (m, 7H), 0.85 – 0.76 (m, 1H). **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃, ppm): 175.21 (s), 134.29 (s), 129.50 (s), 129.05 (s), 128.40 (s), 125.42 (q, *J* = 282.5 Hz), 119.83 (s), 63.86 (q, *J* = 28.7 Hz), 60.09 (s), 42.67 (s), 24.86 (s), 23.15 (s), 21.82 (s), 19.96 (s), 16.86 (s), 16.31 (s). **FTIR** (cm⁻¹): 3316.17, 2957.84, 2871.09, 2252.15,

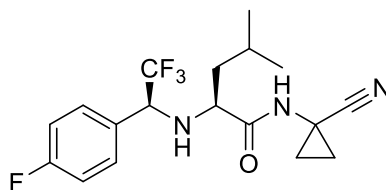
1682.92, 1524.61, 1469.27, 1368.64, 1329.87, 1261.99, 1168.30, 1152.53, 1106.39, 926.30, 886.54. $[\alpha]_D^{23}$: +30.32° (MeOH, $c = 1.1 \times 10^{-2}$). **Pureza**: >99%, $t_R = 29.603$ min.

Neq0997 (NP02): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-4-methyl-2-(((S)-2,2,2-trifluoro-1-(3-fluorophenyl) ethyl)amino)pentanamide



Sólido branco. **Ponto de fusão**: 142.0 – 143.3 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 7.43 – 7.31 (m, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.15 – 7.02 (m, 3H), 4.13 – 3.97 (m, 1H), 3.32 (dt, $J = 9.2, 4.8$ Hz, 1H), 2.11 (dd, $J = 16.4, 11.3$ Hz, 1H), 1.78 – 1.69 (m, 1H), 1.62 – 1.37 (m, 4H), 1.06 – 0.81 (m, 8H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, CDCl_3 , ppm): 175.05 (s), 162.88 (d, $J = 247.7$ Hz), 136.60 (d, $J = 7.0$ Hz), 130.75 (d, $J = 8.2$ Hz), 125.16 (q, $J = 282.6$ Hz), 124.41 (d, $J = 2.5$ Hz), 119.79 (s), 116.62 (d, $J = 21.0$ Hz), 115.39 (d, $J = 22.5$ Hz), 63.36 (qd, $J = 29.0, 1.6$ Hz), 60.02 (s), 42.71 (s), 24.88 (s), 23.13 (s), 21.85 (s), 20.07 (s), 16.88 (s), 16.44 (s). **FTIR** (cm^{-1}): 3319.91, 2958.55, 2958.55, 2958.55, 2958.55, 1683.58, 1591.77, 1522.59, 1357.91, 1322.33, 1263.55, 1263.55, 1156.53, 1156.53, 1109.20. $[\alpha]_D^{23}$: +26.04° (MeOH, $c = 8.1 \times 10^{-3}$). **HRMS**: m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 372.16935; encontrada: 372.16777. **Pureza**: 98.08%, $t_R = 24.283$ min.

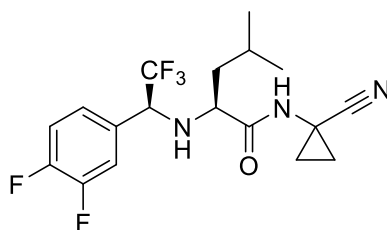
Neq0998 (NP03): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-4-methyl-2-(((S)-2,2,2-trifluoro-1-(4-fluorophenyl)ethyl)amino)pentanamide



Sólido branco. **Ponto de fusão**: 144.7 – 145.5 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, CDCl_3 , ppm): 7.40 – 7.29 (m, 2H), 7.17 (s, 1H), 7.14 – 7.03 (m, 2H), 4.10 – 3.99 (m, 1H), 3.35 – 3.28 (m, 1H), 2.09 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 1.78 – 1.73 (m, 1H), 1.59 – 1.40 (m, 4H), 1.07 – 0.82

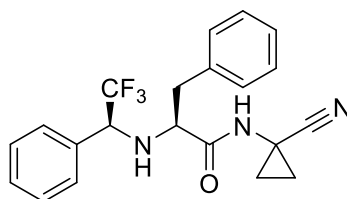
(m, 8H). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , ppm): 175.09 (s), 163.32 (d, $J = 249.2$ Hz), 130.28 (d, $J = 8.5$ Hz), 130.04 (s), 125.31 (q, $J = 282.7$ Hz), 119.79 (s), 116.16 (d, $J = 21.8$ Hz), 63.09 (q, $J = 28.9$ Hz), 59.90 (s), 42.71 (s), 24.92 (s), 23.13 (s), 21.90 (s), 20.10 (s), 16.83 (s), 16.52 (s). **FTIR** (cm^{-1}): 3330.57, 2959.73, 2918.35, 2873.98, 2249.39, 1686.45, 1605.70, 1522.36, 1511.68, 1481.06, 1325.07, 1260.81, 1170.03, 1106.46. $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: $+26.84^\circ$ (MeOH, $c = 8.8 \times 10^{-3}$). **HRMS**: m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 372.16935; encontrada: 372.16805. **Pureza**: 97.43%, $t_{\text{R}} = 24.375$ min.

Neq1000 (NP07): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-2-(((S)-1-(3,4-difluorophenyl)-2,2,2-trifluoroethyl)amino)-4-methylpentanamide



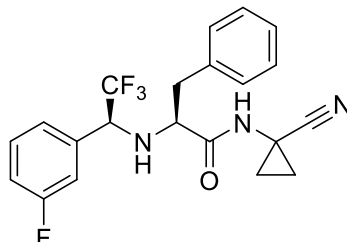
Sólido branco. **Ponto de fusão**: 151.5 – 153.4 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) 7.25 – 7.17 (m, 2H), 7.15 – 7.05 (m, 2H), 4.10 – 4.00 (m, 1H), 3.32 (dt, $J = 8.9, 5.3$ Hz, 1H), 2.09 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 1.83 – 1.71 (m, 1H), 1.59 – 1.41 (m, 4H), 1.12 – 0.97 (m, 2H), 0.97 – 0.90 (m, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , ppm): 174.95 (s), 151.03 (dd, $J = 253.8, 14.8$ Hz), 150.53 (dd, $J = 252.1, 14.5$ Hz), 131.17 – 130.96 (m, $J = 4.2$ Hz), 125.05 (q, $J = 282.0$ Hz), 125.18 – 124.94 (m), 119.75 (s), 118.04 (d, $J = 15.6$ Hz), 117.50 (d, $J = 17.4$ Hz), 62.81 (qd, $J = 29.4, 1.7$ Hz), 59.83 (s), 42.73 (s), 24.91 (s), 23.11 (s), 21.90 (s), 20.17 (s), 16.86 (s), 16.62 (s). **FTIR** (cm^{-1}): 3332.15, 2960.31, 2872.82, 2252.99, 1683.62, 1520.96, 1482.40, 1286.48, 1261.58, 1173.99, 1150.94, 1116.18. $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: $+18.94^\circ$ (MeOH, $c = 1.0 \times 10^{-2}$). **HRMS**: m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{F}_5\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 390.15993; encontrada: 390.15833. **Pureza**: 95.34%, $t_{\text{R}} = 26.376$ min.

Neq0631 (NP04): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-3-phenyl-2-(((S)-2,2,2-trifluoro-1-phenylethyl)amino)propanamide



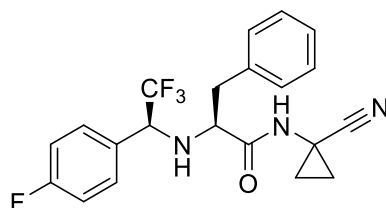
Sólido branco. **Ponto de fusão:** 130.1 – 131.5 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃, ppm): 7.43 – 7.24 (m, 9H), 7.23 – 7.17 (m, 2H), 4.04 – 3.95 (m, 1H), 3.43 (dd, *J* = 12.4, 6.4 Hz, 1H), 3.08 (qd, *J* = 13.9, 6.2 Hz, 2H), 2.23 – 2.18 (ddb, 1H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 1.06 – 0.98 (m, 1H), 0.93 – 0.85 (m, 1H). **FTIR** (cm⁻¹): 3307.56, 3064.05, 3031.75, 2926.41, 2242.19, 1672.24, 1495.37, 1455.46, 1265.34, 1168.65, 1122.53. $[\alpha]_D^{23}$: +63.89° (MeOH, *c* = 1.2 × 10⁻²). **Pureza:** 98.57%, *t_R* = 25.541 min.

Neq1001 (NP05): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-3-(3-fluorophenyl)-2-(((S)-2,2,2-trifluoro-1-(3-fluorophenyl)ethyl)amino)propanamide



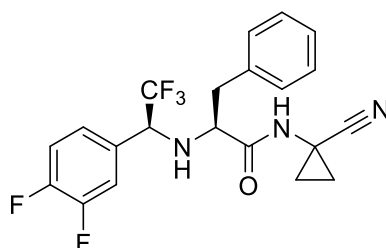
Sólido branco. **Ponto de fusão:** 141.2 – 142.3 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃, ppm): 7.40 – 7.27 (m, 4H), 7.23 – 7.14 (m, 3H), 7.13 – 7.06 (m, 1H), 7.06 – 6.96 (m, 2H), 4.03 – 3.94 (m, 1H), 3.38 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.12 – 3.01 (m, 2H), 2.25 – 2.16 (m, 1H), 1.52 – 1.41 (m, 2H), 1.07 – 0.89 (m, 2H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃, ppm): 173.45 (s), 162.91 (d, *J* = 247.8 Hz), 135.86 (s), 135.59 (d, *J* = 7.2 Hz), 130.76 (d, *J* = 8.2 Hz), 129.36 (s), 129.21 (s), 127.65 (s), 124.78 (q, *J* = 282.1 Hz), 124.64 (d, *J* = 2.7 Hz), 119.60 (s), 116.85 (d, *J* = 21.0 Hz), 115.65 (d, *J* = 22.5 Hz), 63.09 (qd, *J* = 29.1, 1.6 Hz), 60.92 (s), 38.22 (s), 20.09 (s), 16.89 (s), 16.55 (s). **FTIR** (cm⁻¹): 3319.93, 3064.80, 3029.99, 2927.35, 2242.85, 1674.13, 1594.09, 1489.80, 1453.09, 1260.94, 1164.51, 1122.97, 963.57, 851.69. $[\alpha]_D^{23}$: +56.78° (MeOH, *c* = 9.6 × 10⁻³). HRMS: *m/z* calculada para C₂₁H₂₀F₄N₃O [M+H]⁺: 406.15370; encontrada: 406.15235. **Pureza:** 96.93%, *t_R* = 25.887 min.

Neq0999 (NP06): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-3-phenyl-2-(((S)-2,2,2-trifluoro-1-(4-fluorophenyl)ethyl)amino)propanamide



Sólido branco. **Ponto de fusão:** 135.8 – 137.0 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, ppm): 7.40 – 7.13 (m, 8H), 7.13 – 7.03 (m, 2H), 4.04 – 3.94 (m, 1H), 3.38 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.13 – 2.99 (m, 2H), 2.19 (ddb, *J* = 6.8, 4.4 Hz, 1H), 1.56 – 1.40 (m, 2H), 1.08 – 0.89 (m, 2H). **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃, ppm): 173.51 (s), 163.42 (d, *J* = 249.5 Hz), 135.90 (s), 130.52 (d, *J* = 8.4 Hz), 129.36 (s), 129.18 (s), 129.04 – 128.63 (m), 127.62 (s), 124.92 (q, *J* = 283.3 Hz), 119.62 (s), 116.20 (d, *J* = 21.8 Hz), 62.73 (q, *J* = 29.0 Hz), 60.69 (s), 38.08 (s), 20.07 (s), 16.80 (s), 16.62 (s). **FTIR** (cm⁻¹): 3313.03, 3064.29, 3029.79, 2924.63, 2854.47, 2242.25, 1672.10, 1606.34, 1511.82, 1494.96, 1298.95, 1265.74, 1227.36, 1166.12, 1120.62, 859.69, 830.00. $[\alpha]_D^{23}$: +62.87° (MeOH, *c* = 8.8 × 10⁻³). HRMS: *m/z* calculada para C₂₁H₂₀F₄N₃O [M+H]⁺: 406.15370; encontrada: 406.15189. **Pureza:** 99,47%, *t_R* = 25.786 min.

Neq1074 (NP08): (S)-N-(1-cyanocyclopropyl)-2-(((S)-1-(3,4-difluorophenyl)-2,2,2-trifluoroethyl) amino)-3-phenylpropanamide

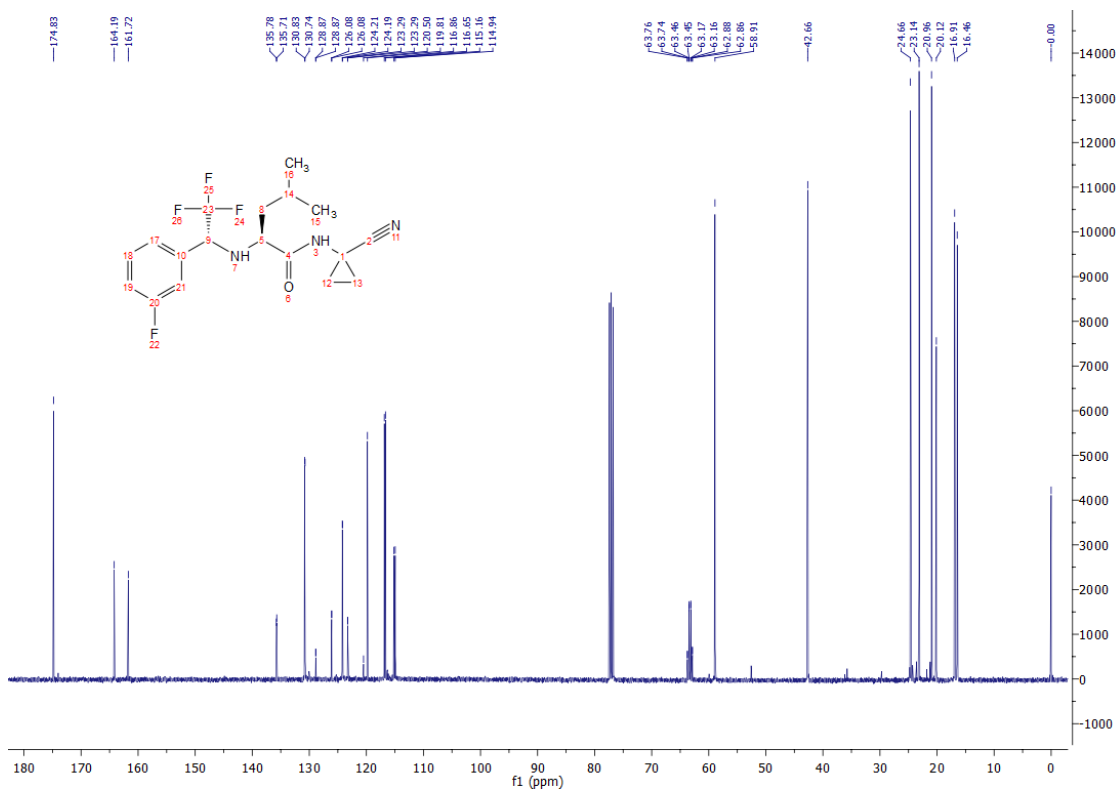
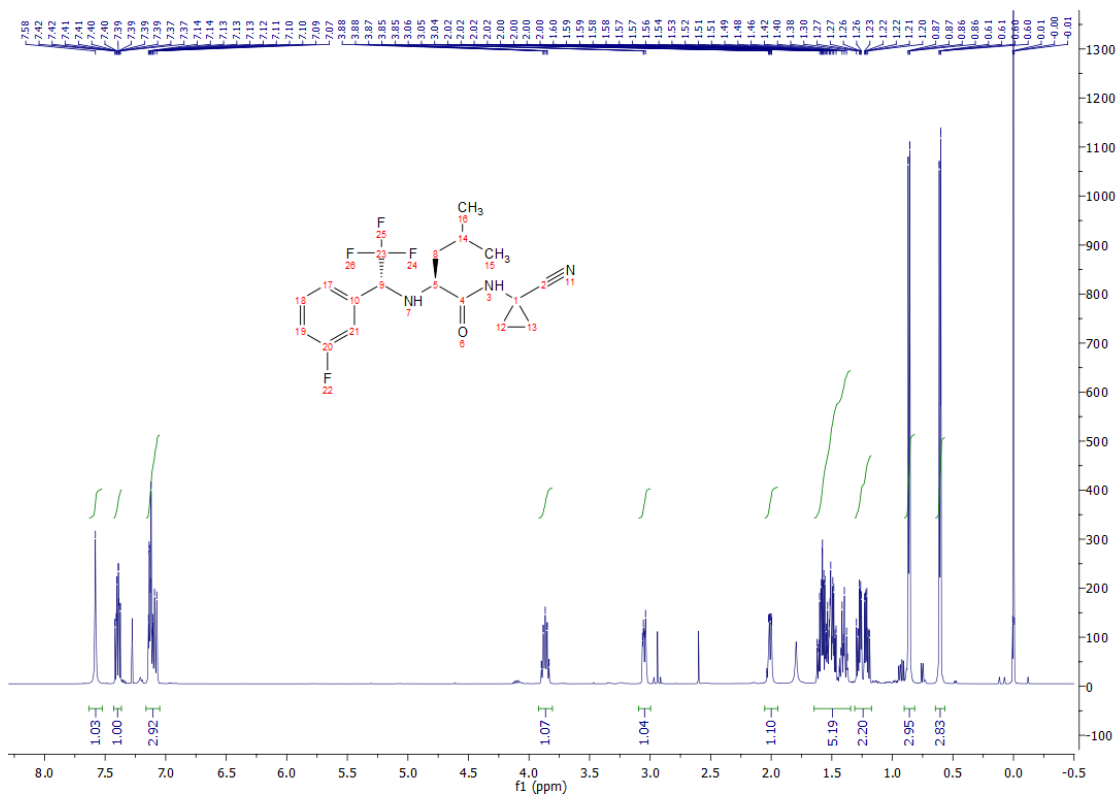


Sólido branco (Rendimento = 49%). **Ponto de fusão:** 136.6 – 138.8 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃, ppm) 7.40 – 7.27 (m, 3H), 7.23 – 7.14 (m, 3H), 7.14 – 7.08 (m, 1H), 7.08 – 6.98 (m, 2H), 4.04 – 3.90 (m, 1H), 3.36 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.06 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.19 (dd, *J* = 7.2, 4.2 Hz, 1H), 1.56 – 1.43 (m, 2H), 1.10 – 0.93 (m, 2H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃, ppm): 173.14 (s), 151.06 (dd, *J* = 253.9, 14.5 Hz), 150.48 (dd, *J* = 254.3, 16.7 Hz), 135.68 (s), 129.94 (t, *J* = 4.0 Hz), 129.23 (s), 129.15 (s), 127.62 (s), 125.11 (dd, *J* = 6.1, 3.9 Hz), 124.55 (q, *J* = 282.2 Hz), 119.42 (s), 117.97 (dd, *J* = 17.1, 0.8

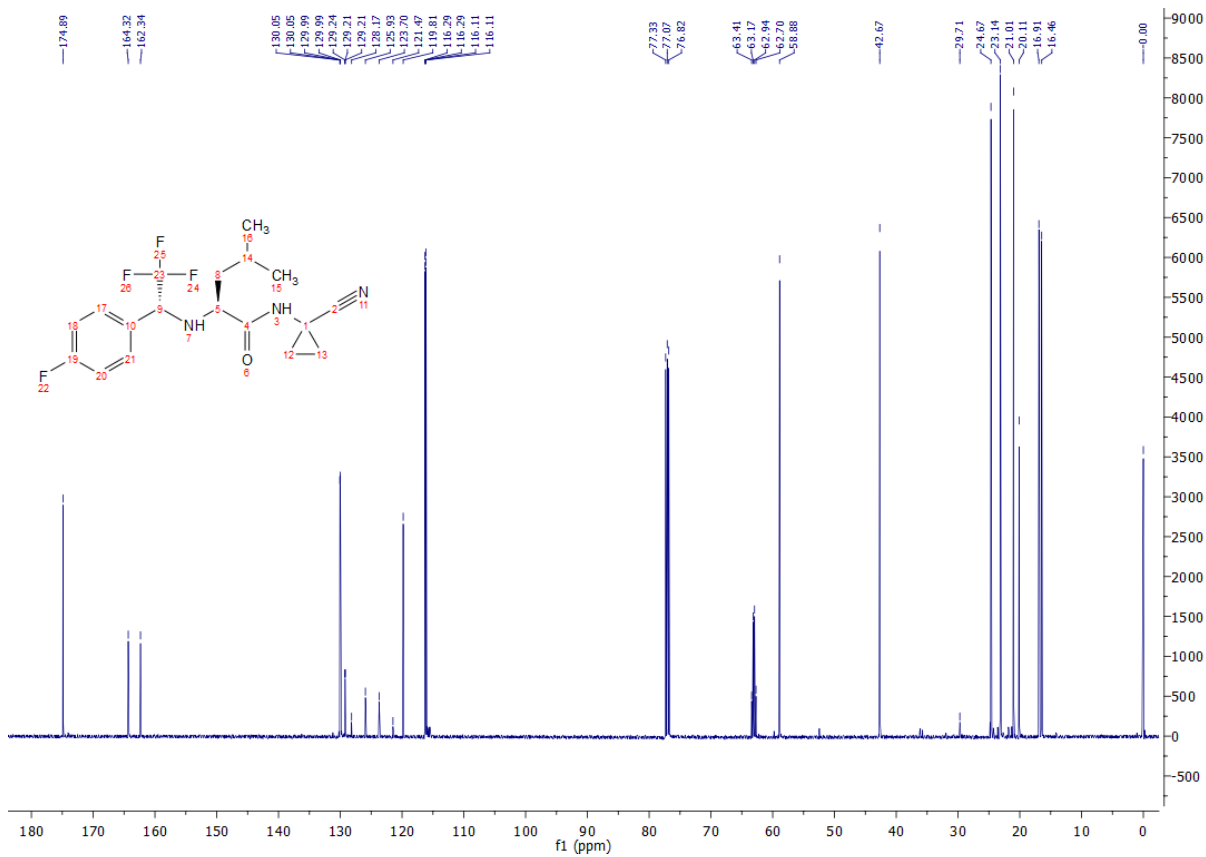
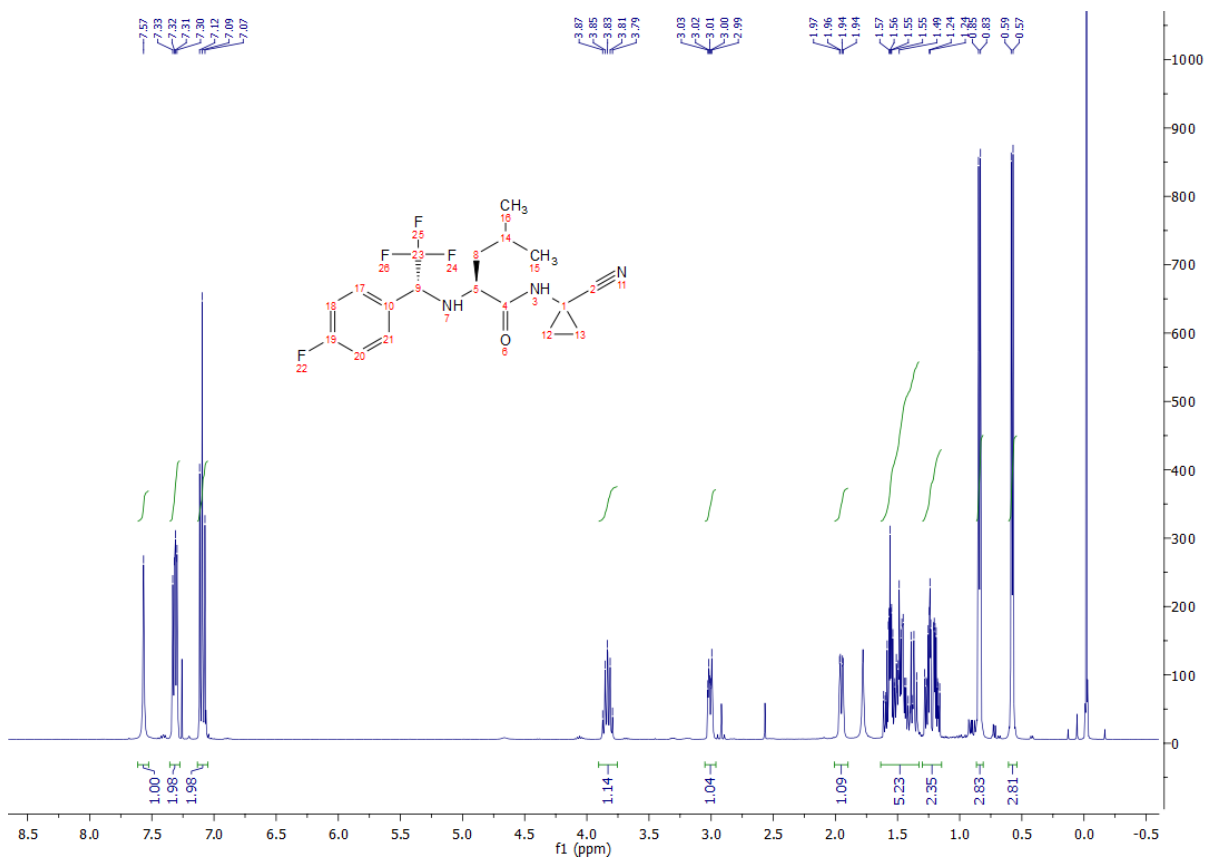
Hz), 117.61 (d, $J = 18.0$ Hz), 62.45 (q, $J = 29.4$ Hz), 60.71 (s), 38.14 (s), 20.03 (s), 16.76 (s), 16.54 (s). **FTIR** (cm^{-1}): 3344.47, 3320.24, 3029.93, 2245.61, 1683.06, 1609.60, 1520.28, 1291.15, 1261.10, 1211.24, 1176.43, 1152.52, 1136.65, 1125.09, 1092.07, 827.27. $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: $+71.65^\circ$ (MeOH, $c = 9.0 \times 10^{-3}$). **HRMS**: m/z calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{F}_5\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 424.14428; encontrada: 424.14704. **Pureza**: $>99\%$, $t_{\text{R}} = 25.1$ min.

6.1.6 Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN dos compostos inéditos

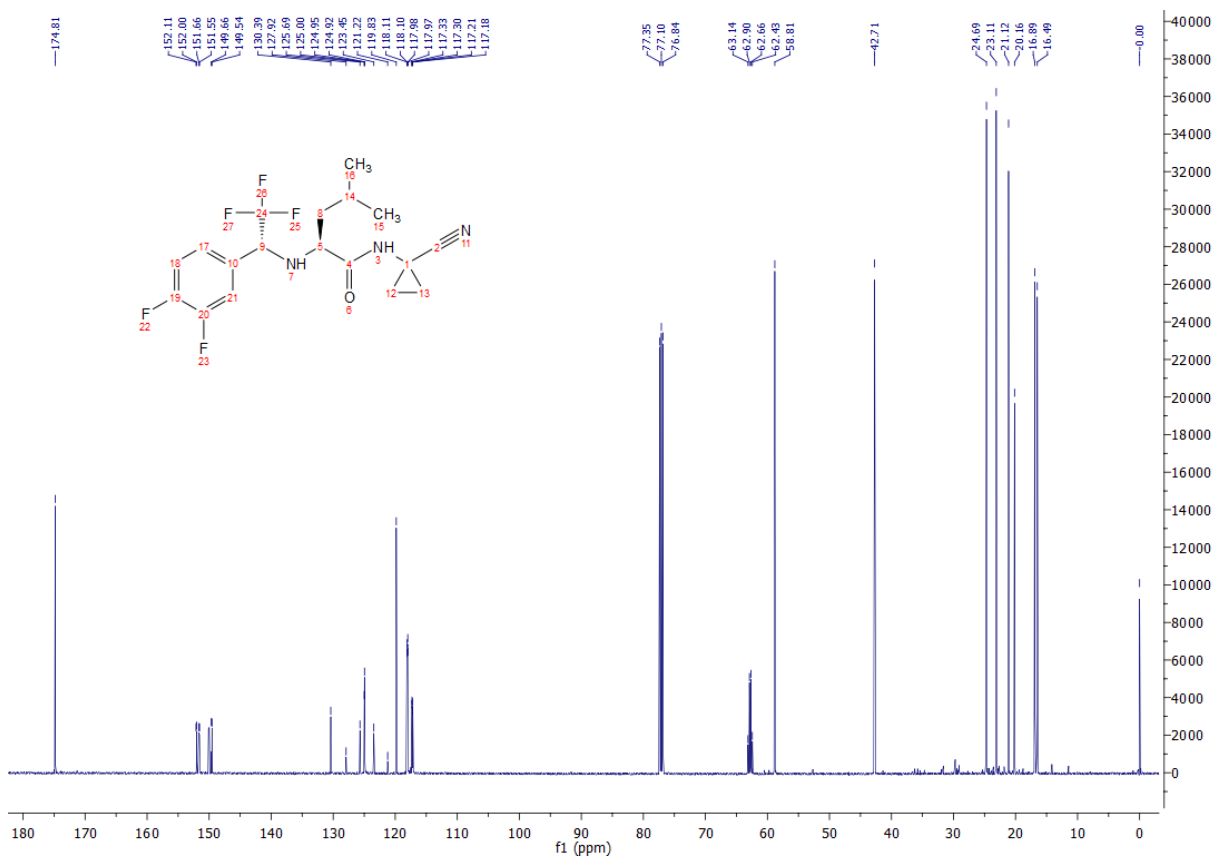
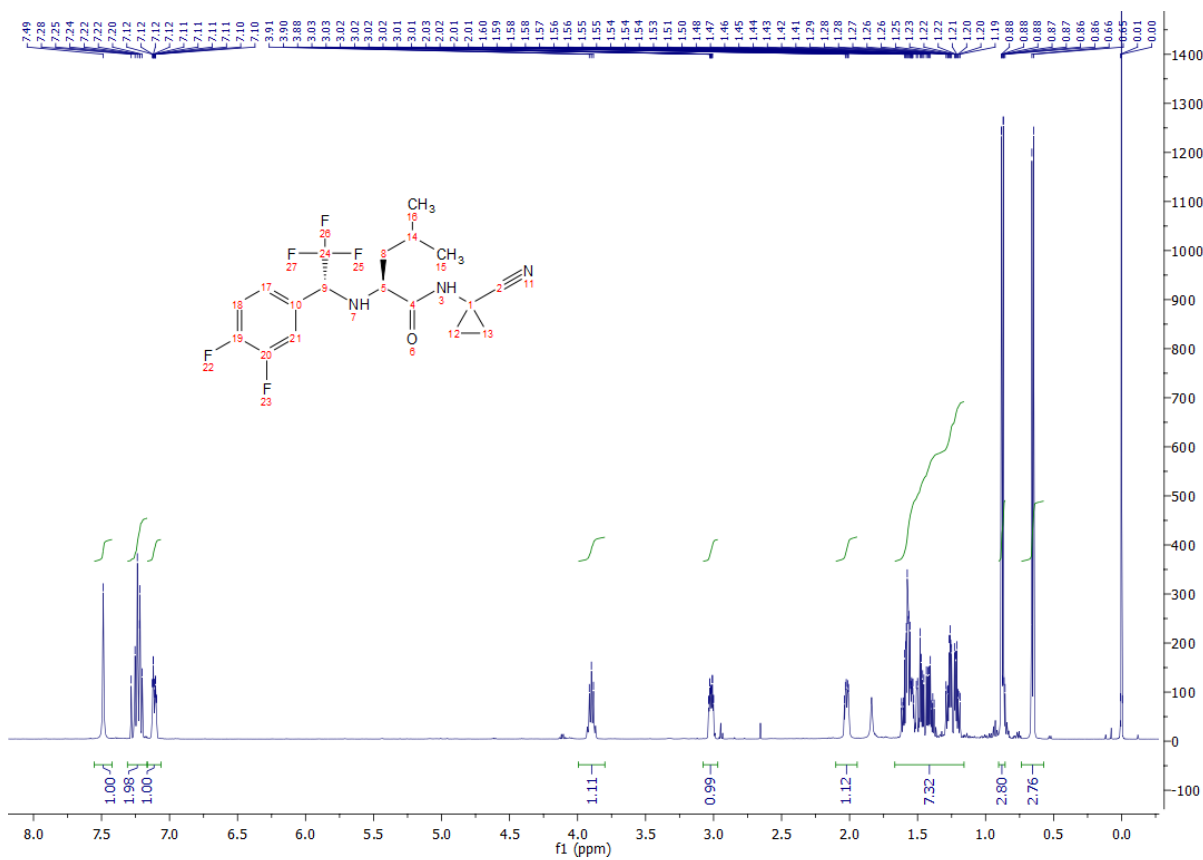
Neq0976 (SH22)



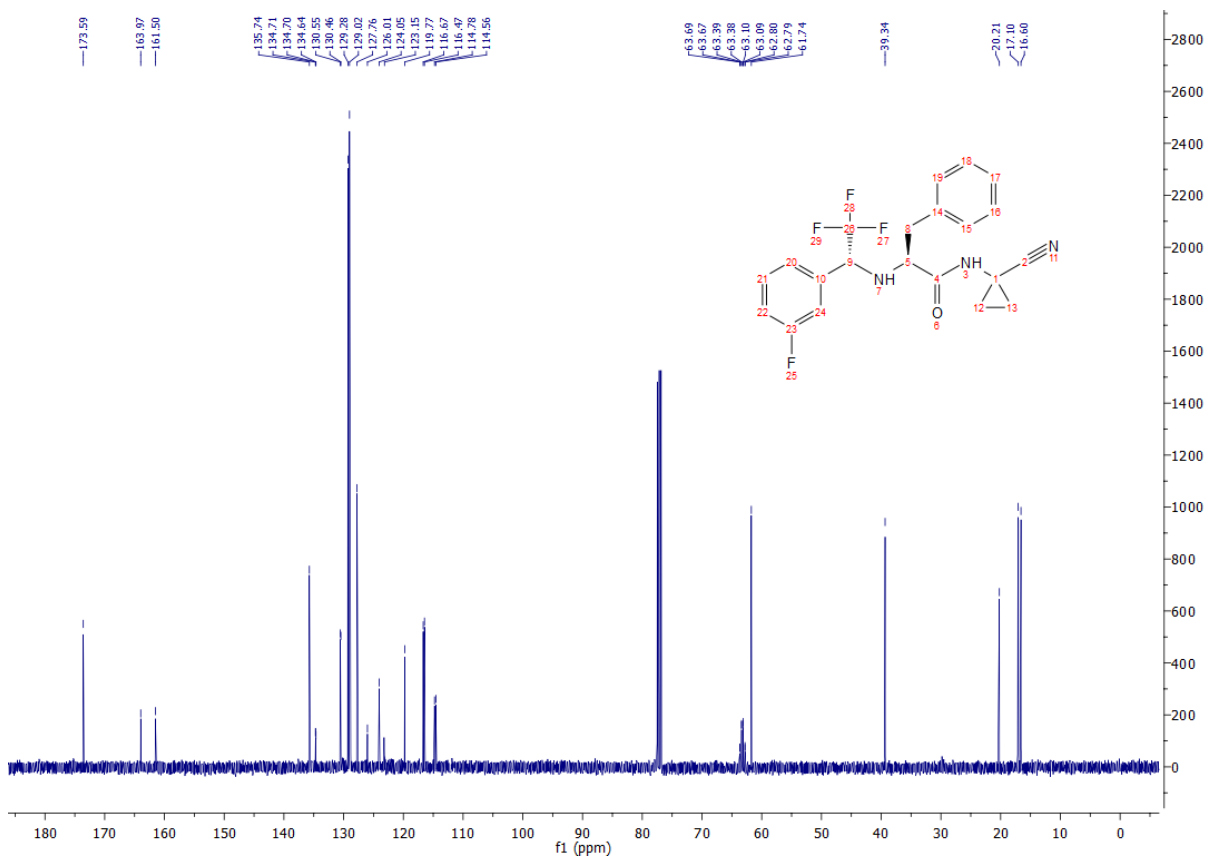
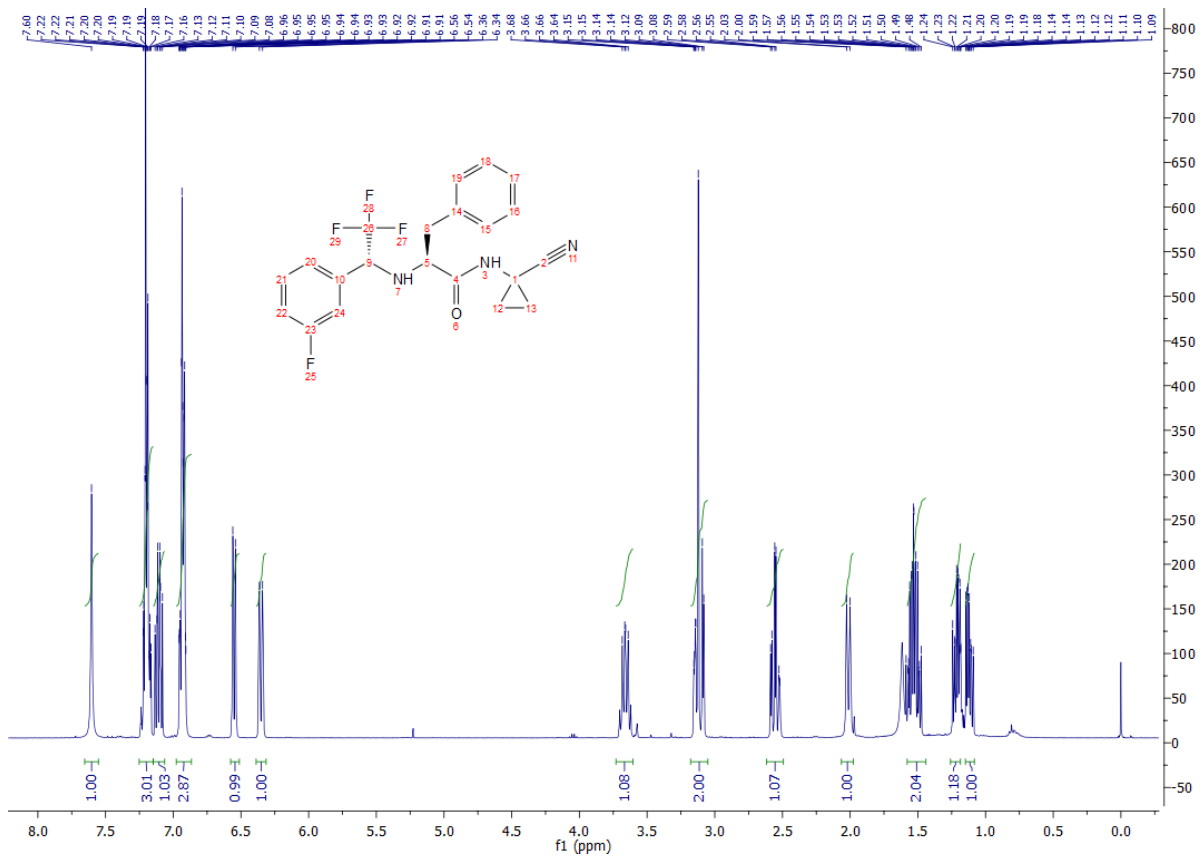
Neq0979 (SH15)



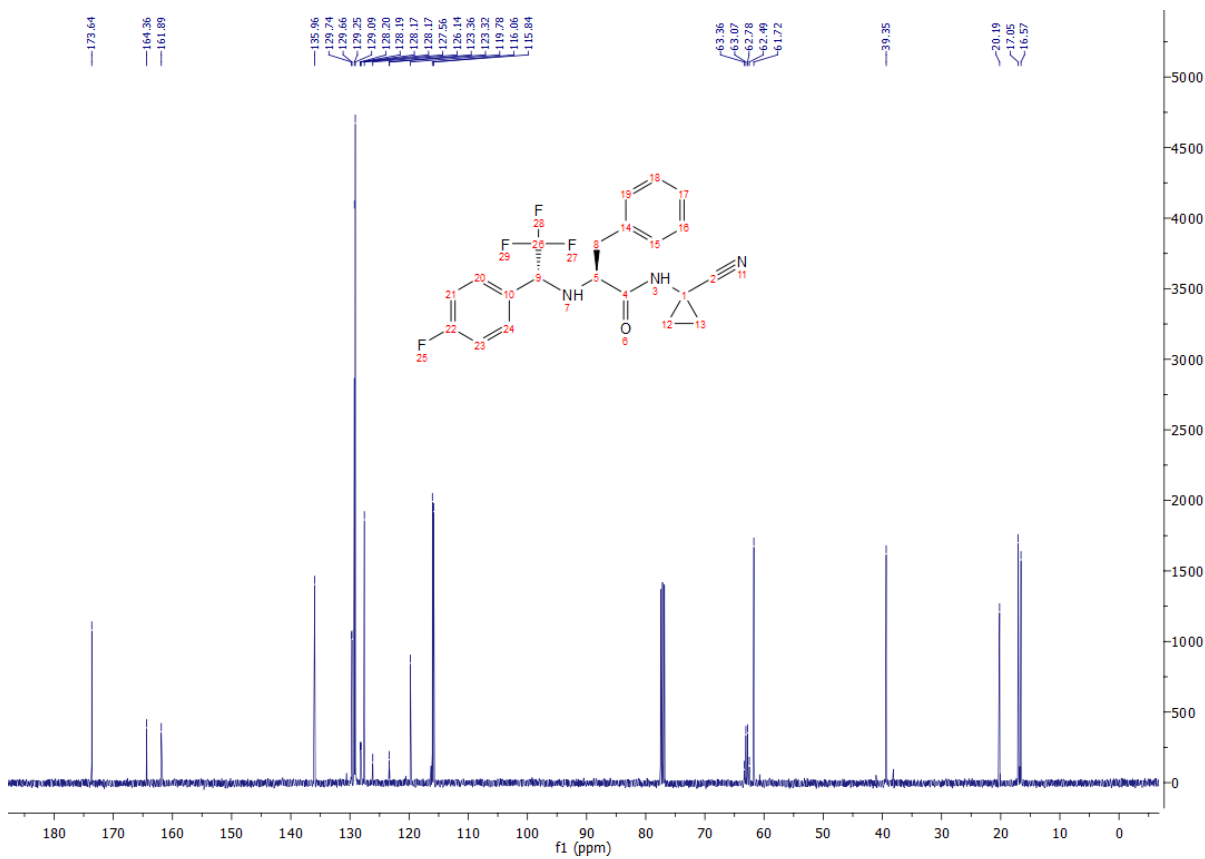
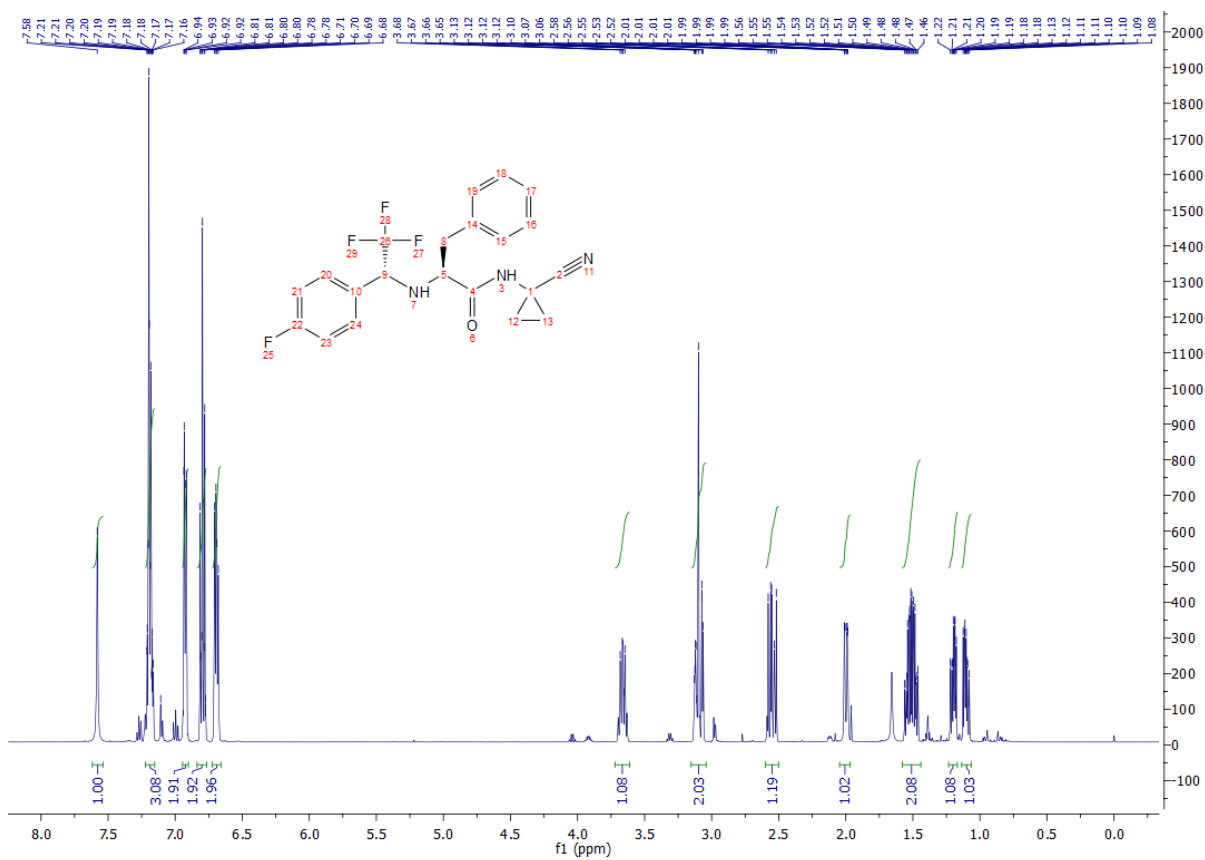
Neq0977 (SH23)



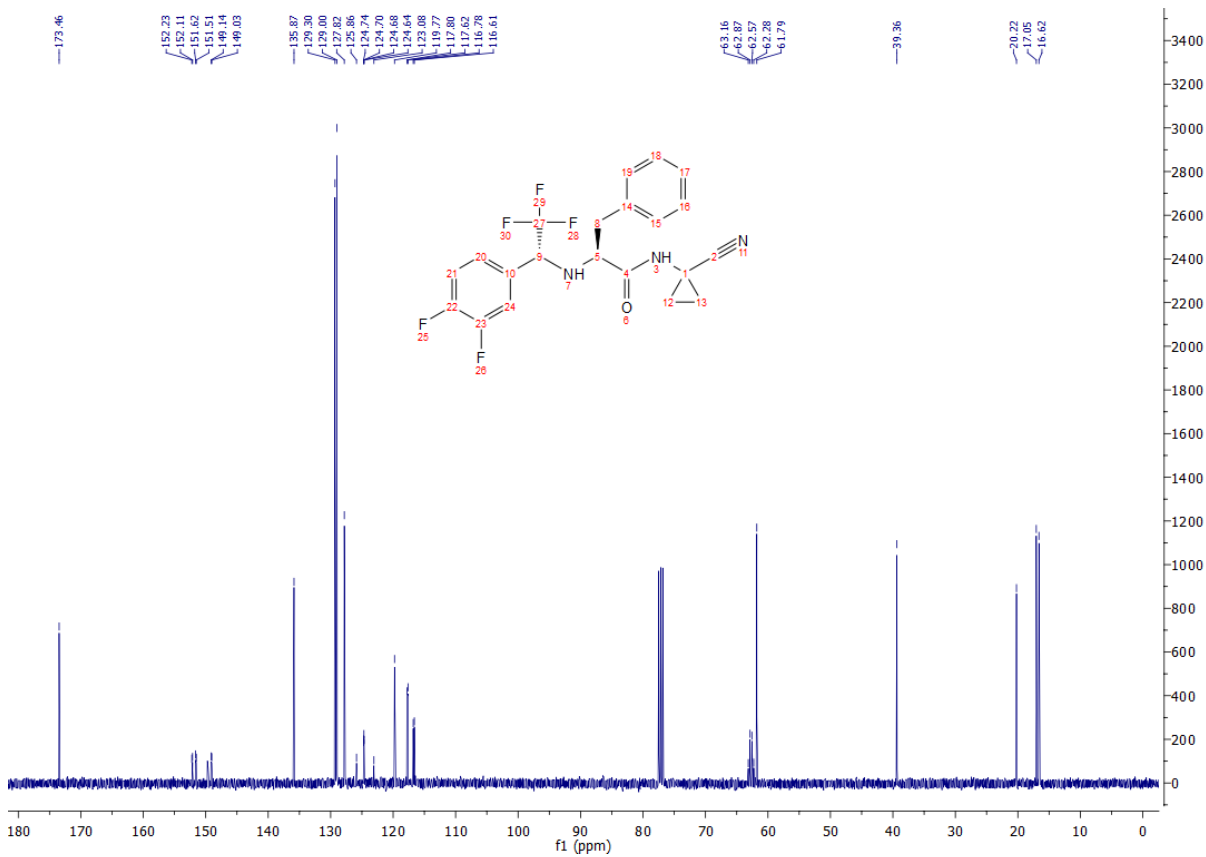
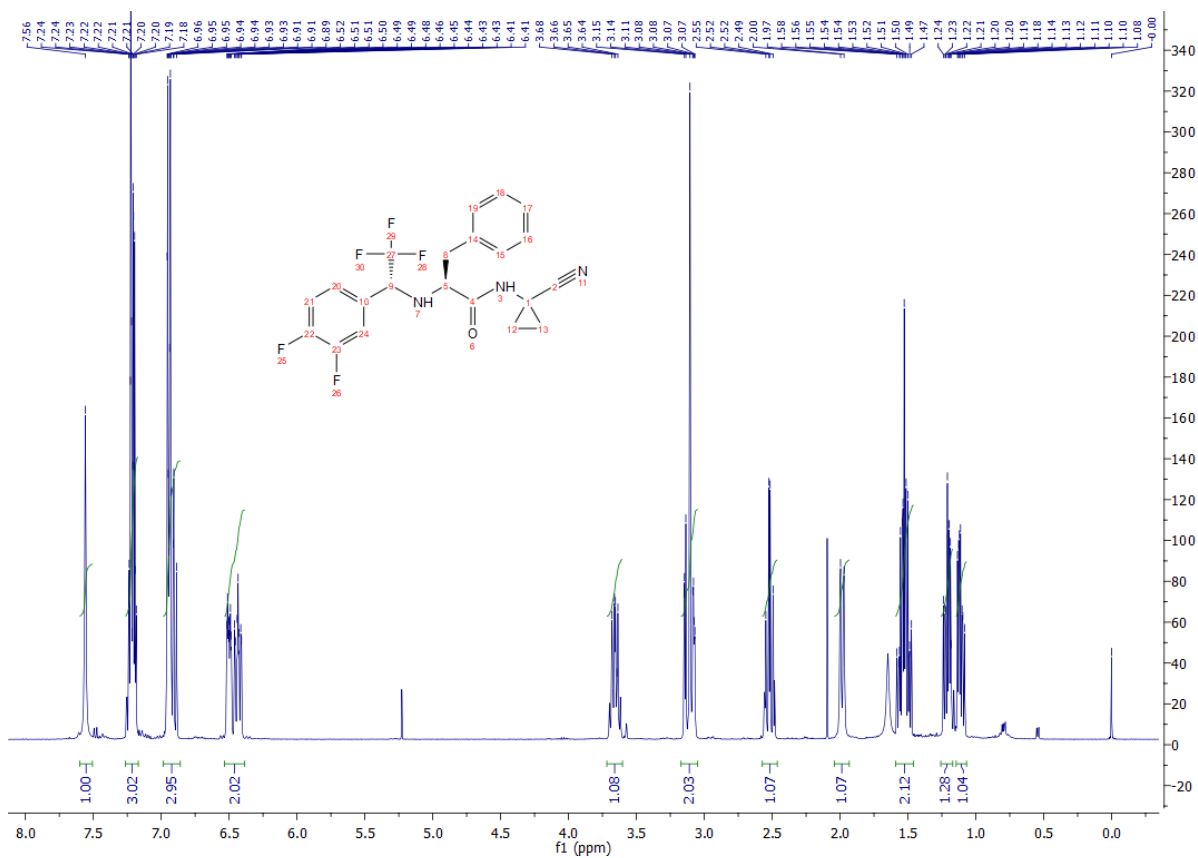
Neq1018 (SH26)



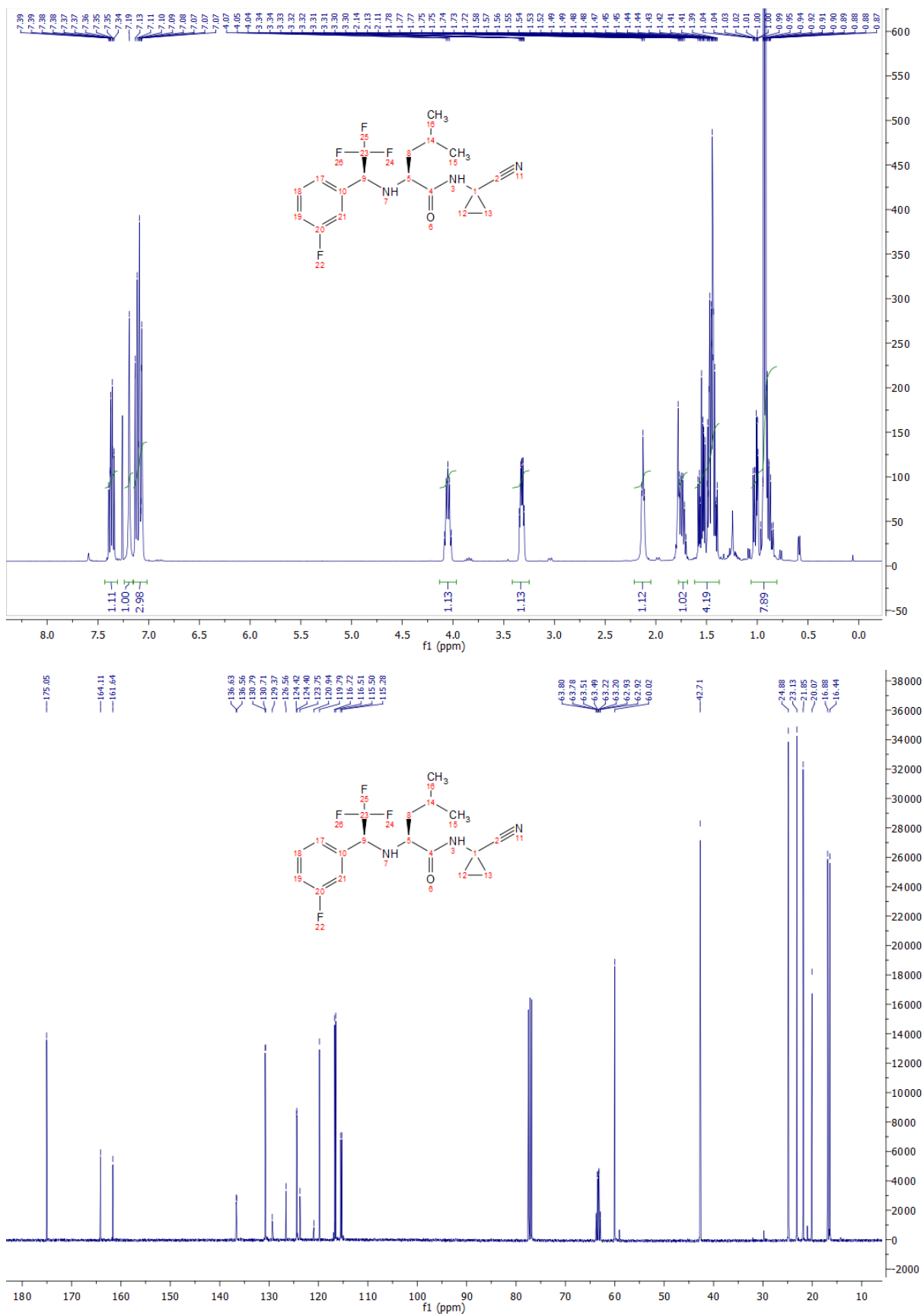
Neq0980 (SH27)



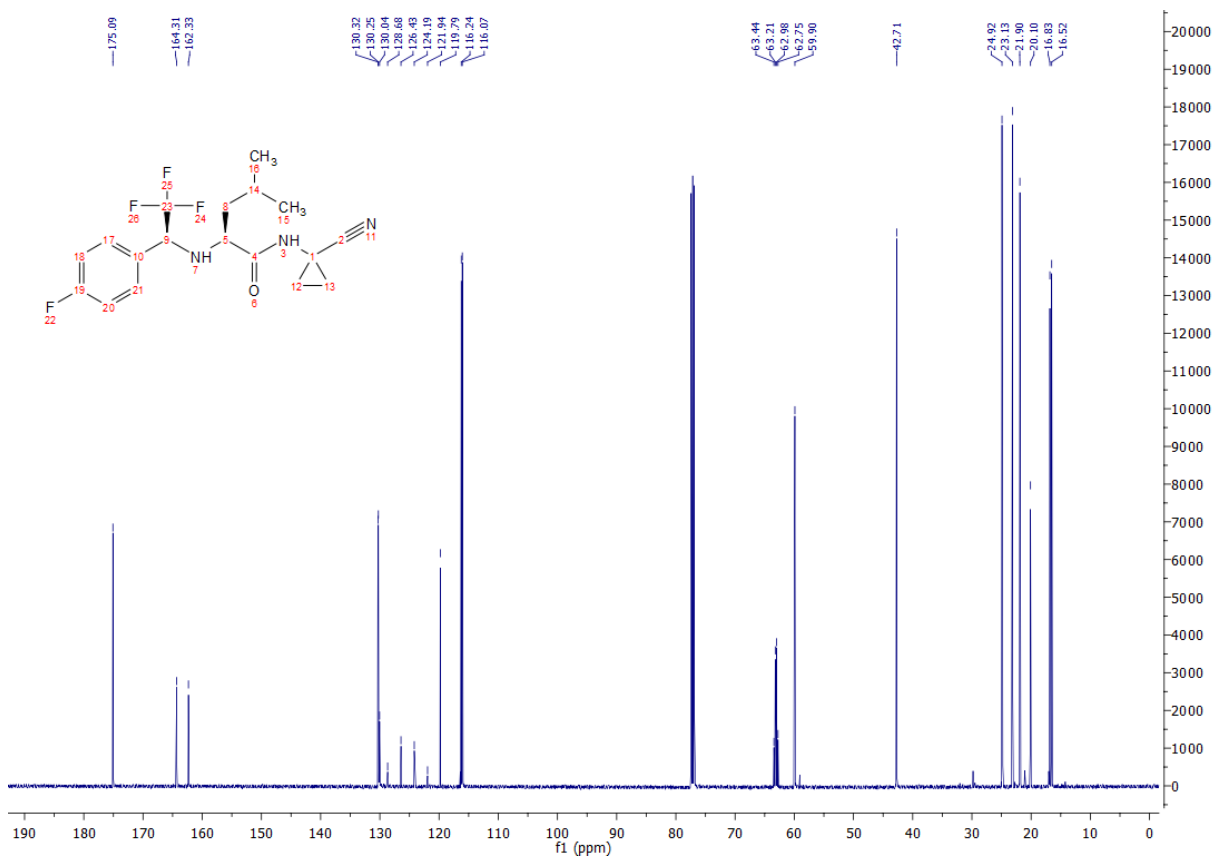
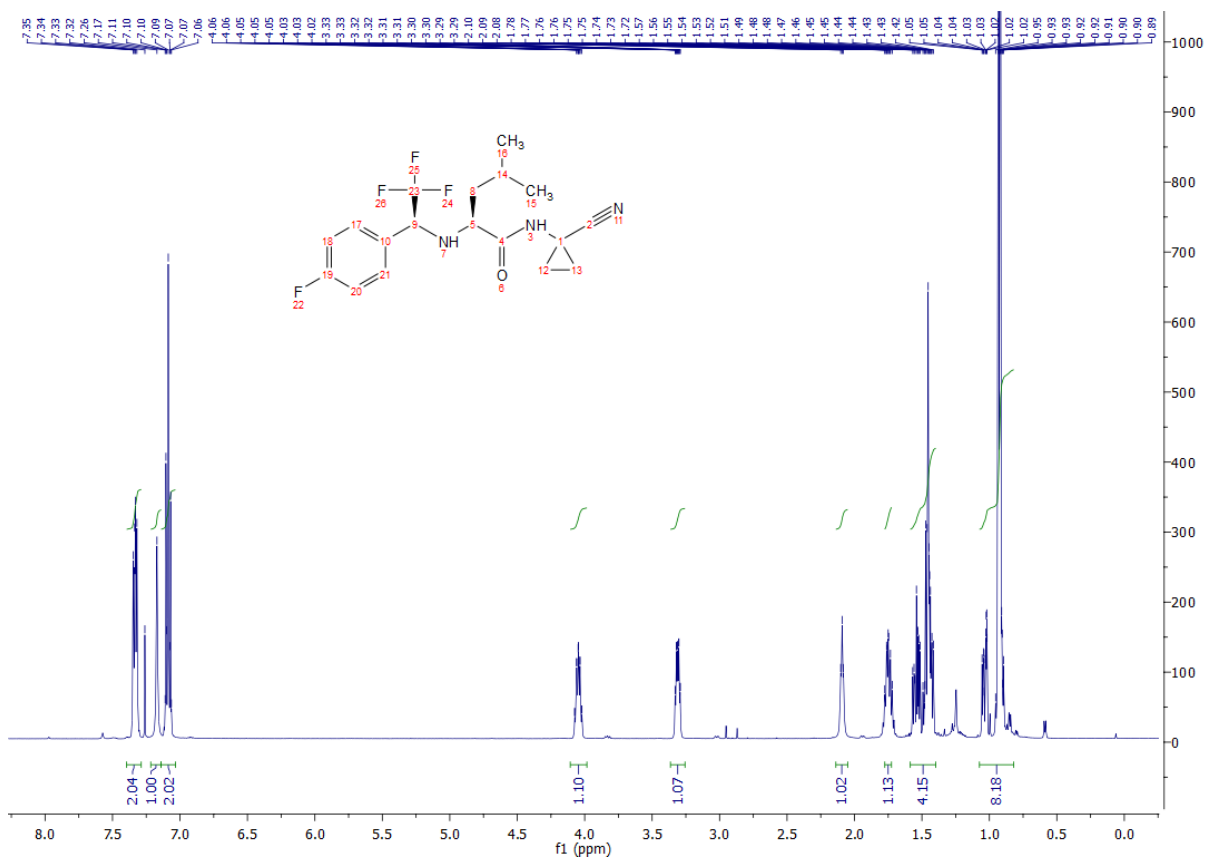
Neq1019 (SH29)



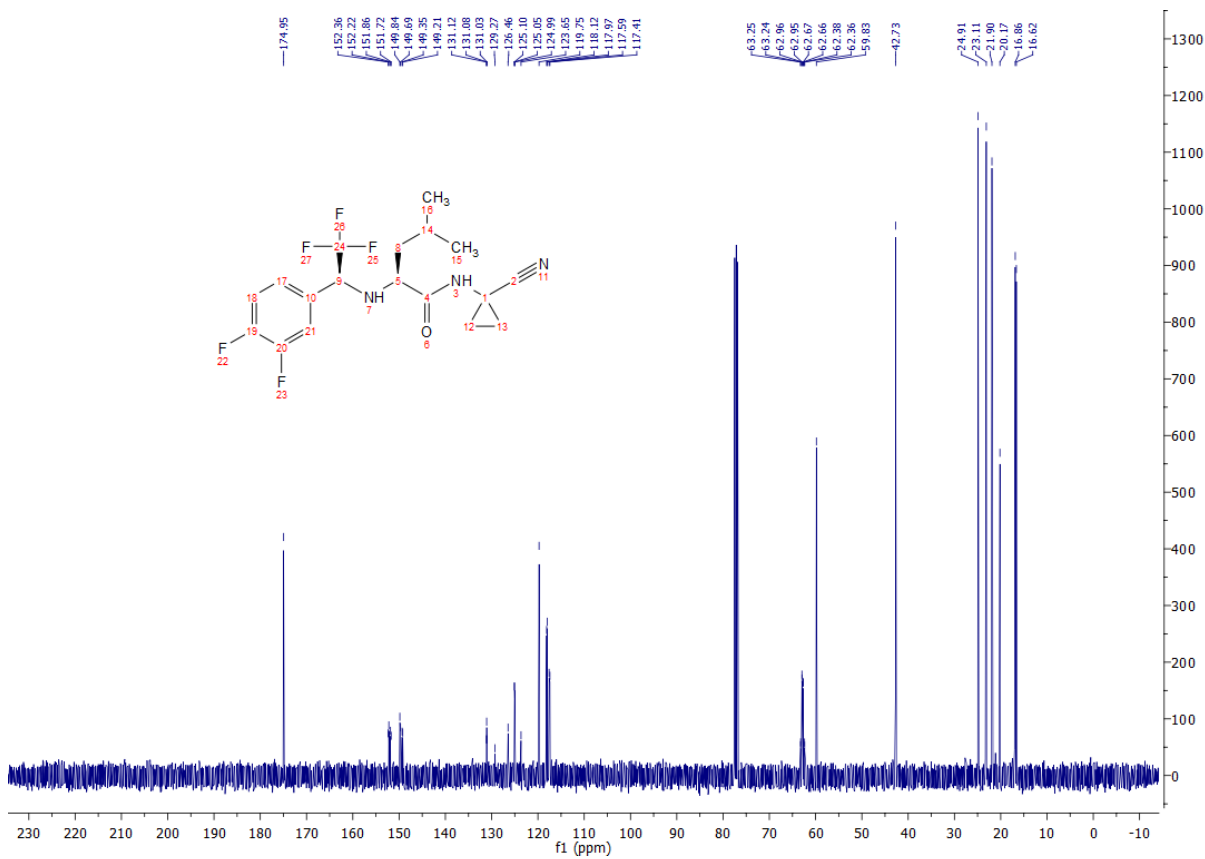
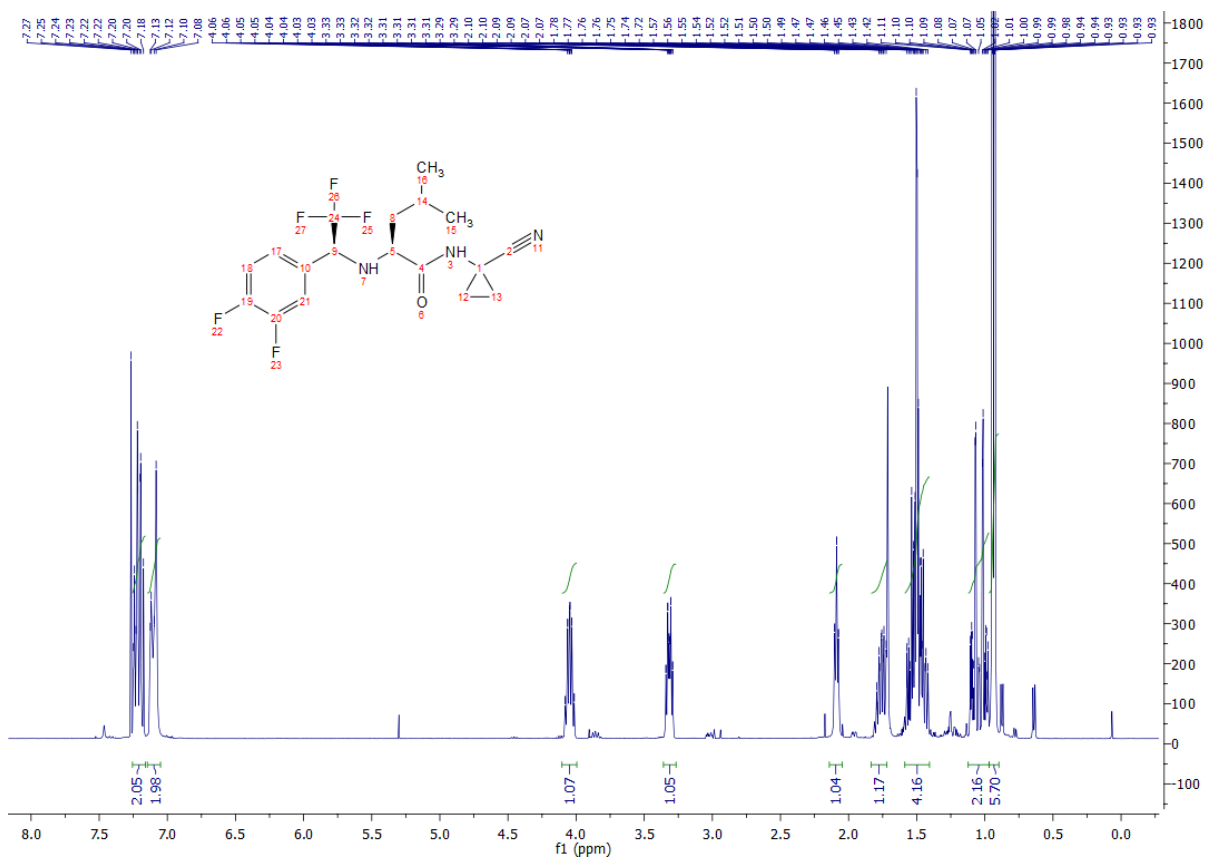
Neq0997 (NP02)



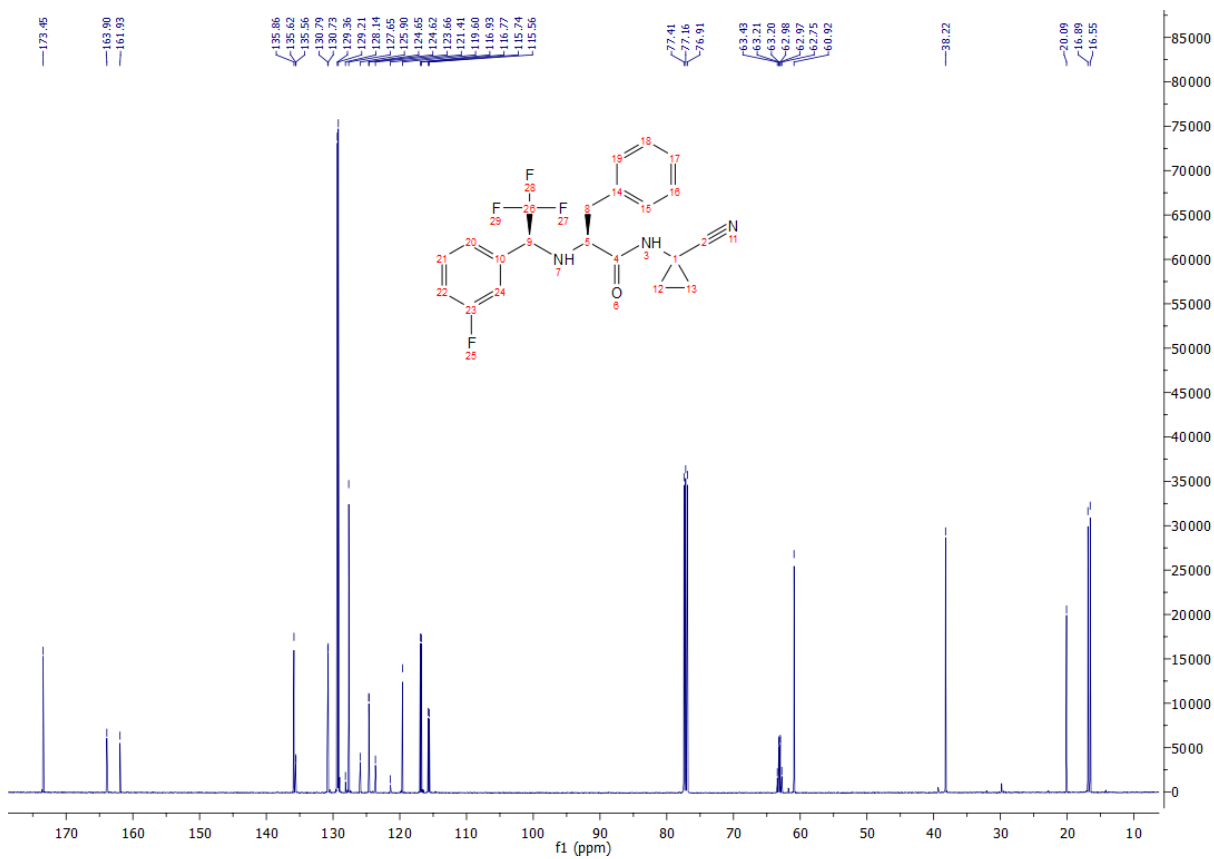
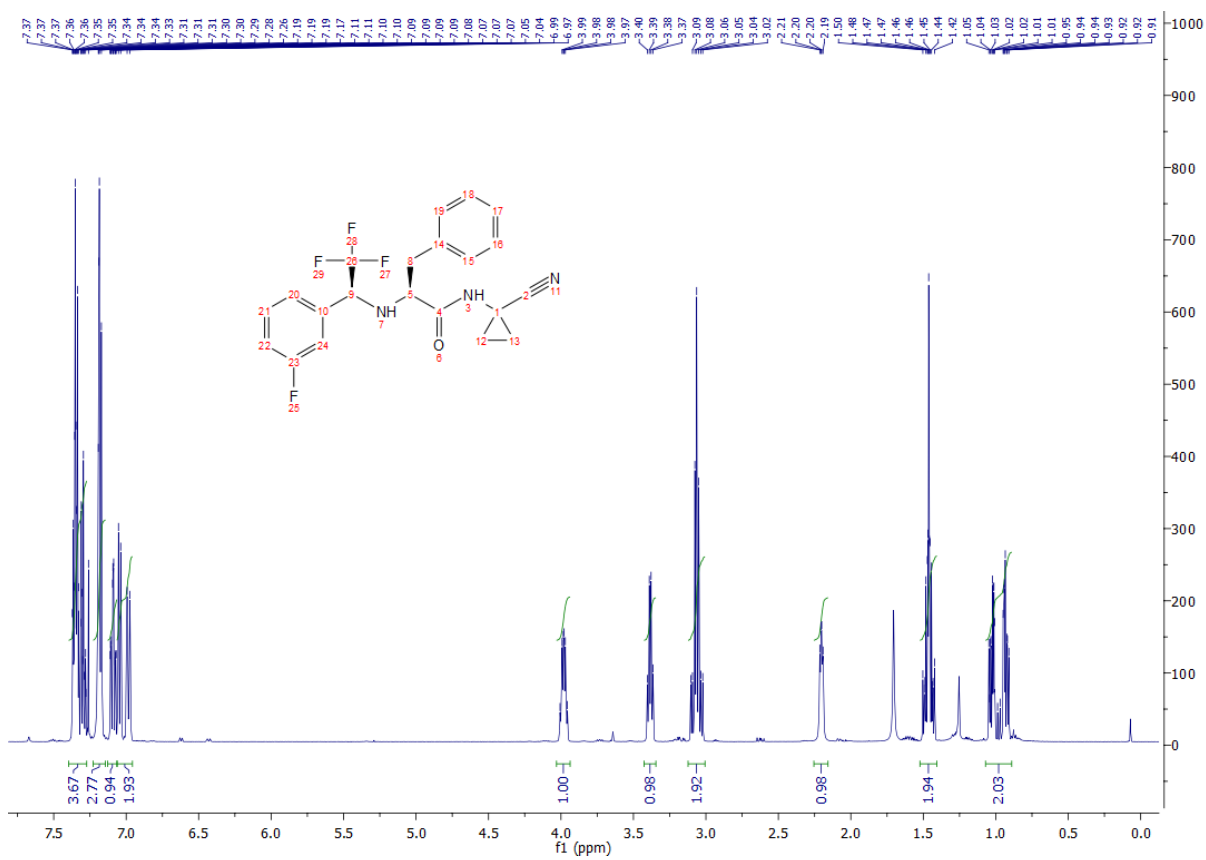
Neq0998 (NP03)



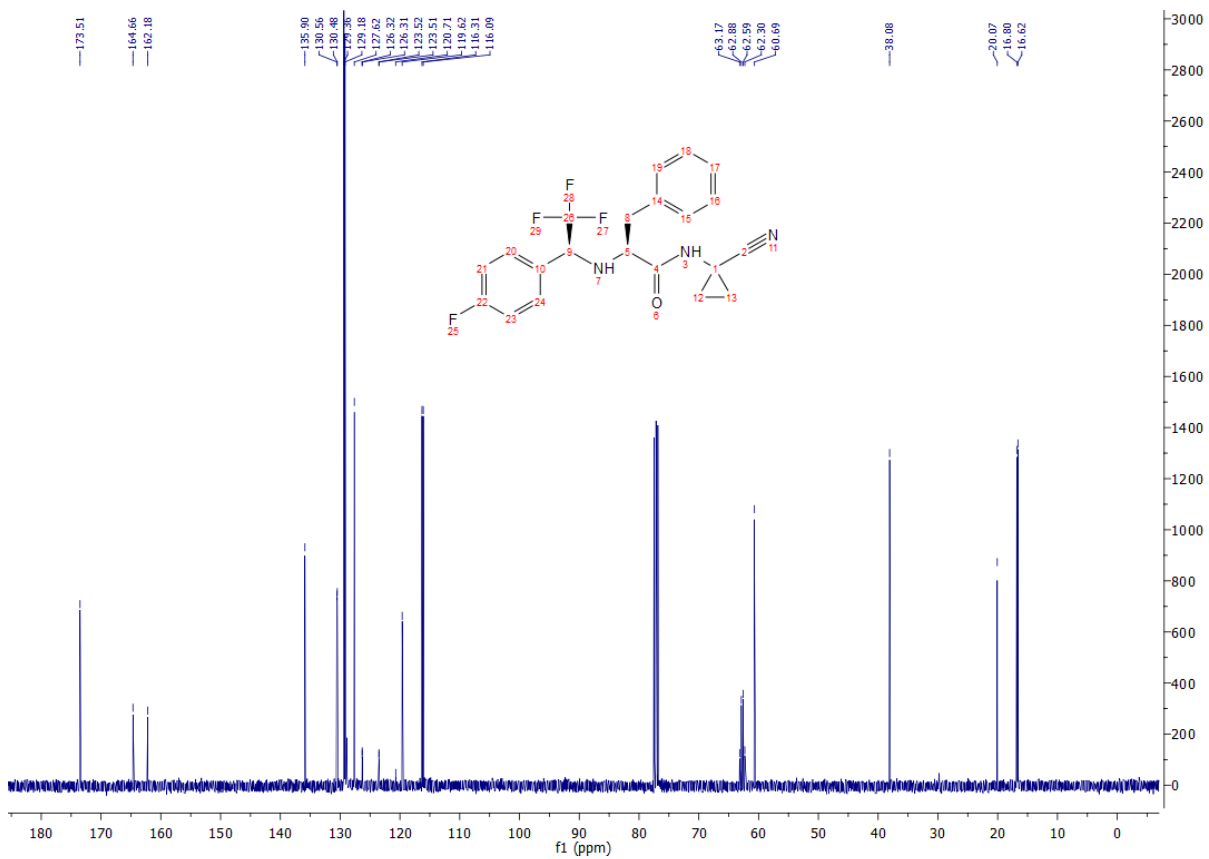
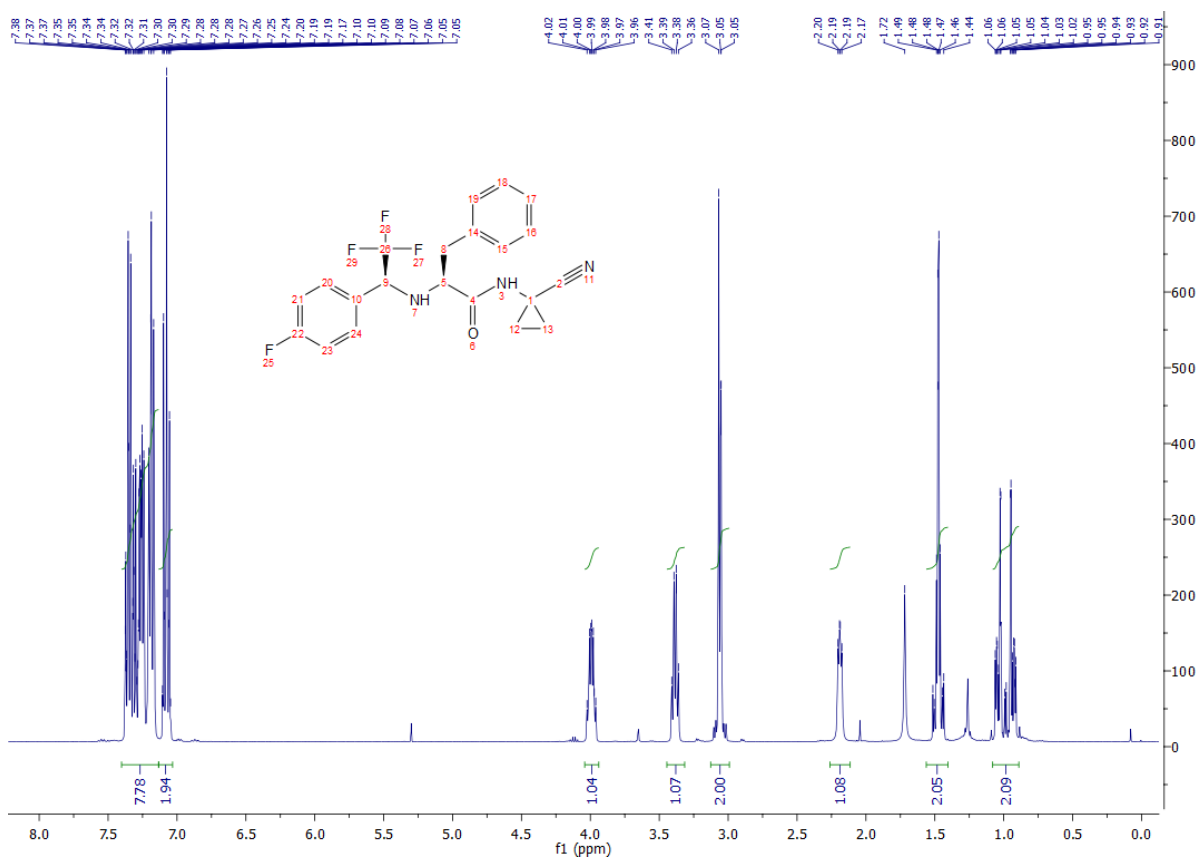
Neq1000 (NP07)



Neq1001 (NP05)



Neq0999 (NP06)



Neq1074 (NP08)

