

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**Desenvolvimento de triazóis derivados da piperina inibidores da CYP51
de *Trypanosoma cruzi*: Otimização de um modelo de previsão de
atividade teórica, síntese e atividade *in vitro***

Larissa Henriques Evangelista Castro

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de Triazóis Derivados da Piperina Inibidores da CYP51
de *Trypanosoma cruzi*: Otimização de um Modelo de Previsão de Atividade
Teórica, Síntese e Atividade *in vitro***

LARISSA HENRIQUES EVANGELISTA CASTRO

Sob Orientação do Professor

Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna

e Coorientação do Professor

Marco Edilson Freire de Lima

e

Demian Rocha Ifa

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química.

Seropédica, RJ
Dezembro, 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C355d Castro, Larissa Henriques Evangelista , 1990-
Desenvolvimento de triazóis derivados da piperina
inibidores da CYP51 de Trypanosoma cruzi: Otimização
de um modelo de previsão de atividade teórica, síntese
e atividade in vitro / Larissa Henriques Evangelista
Castro. - Seropédica, 2021.
174 f.: il.

Orientador: Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna.
Coorientador: Marco Edilson Freire de Lima.
Coorientador: Demian Rocha Ifa.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química,
2021.

1. Doença de Chagas. 2. Triazóis. 3. Esterol 14 alfa
desmetilase. 4. Semi-empírico. 5. Docagem molecular.
I. de Sant'Anna, Carlos Mauricio Rabello, 1965-,
orient. II. de Lima, Marco Edilson Freire, -,
coorient. III. Ifa, Demian Rocha, -, coorient. IV
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-graduação em Química. V. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LARISSA HENRIQUES EVANGELISTA CASTRO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química,
no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

TESE APROVADA EM 16/12/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna
(Dr.) UFRRJ (Orientador)

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima
(Dr^a.) UFRRJ

Cedric Stephan Graebin
(Dr.) UFFRJ

Gustavo Henrique Goulart Trossini
(Dr.) USP

Daniel Alencar Rodrigues
(Dr.) RCSI University of Medicine and
Health Sciences, Irlanda



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E
CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

Emitido em 16/12/2021

TERMO Nº 1340/2021 - PPGQ (12.28.01.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 21/12/2021 14:46)
AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: 387189

(Assinado digitalmente em 17/12/2021 18:14)
CARLOS MAURICIO RABELLO DE SANT ANNA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PPGQ (12.28.01.00.00.60)
Matrícula: 1220404

(Assinado digitalmente em 18/12/2021 08:35)
CEDRIC STEPHAN GRAEBIN
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: 1735975

(Assinado digitalmente em 17/12/2021 17:48)
DANIEL ALENCAR RODRIGUES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 032.749.571-51

(Assinado digitalmente em 17/12/2021 17:48)
GUSTAVO HENRIQUE GOULART TROSSINI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 212.537.378-51

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número:
1340, ano: **2021**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **17/12/2021** e o código de verificação: **9b1ecca4d3**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por abençoar minha trajetória até aqui, me agraciando com saúde, determinação, paciência e perseverança para aproveitar com sabedoria, cada oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais Aydée e Leonidas, agradeço pela educação, amor, incentivo e apoio durante toda minha vida e também durante minha trajetória acadêmica.

À Nina, que é parte fundamental da minha vida e está ao meu lado em todos os momentos, agradeço pela sua amizade sincera e pela alegria que ela me proporciona a cada instante.

Agradeço aos meus padrinhos Sueli e Otacir pelo carinho e torcida pelo meu crescimento. Agradeço à minha família pelo seu apoio e por ser meu alicerce. Em especial, à minha prima Ayda, que é como uma irmã, obrigada pela sua lealdade. Você é brilhante e sei que terá um futuro maravilhoso pela frente.

Agradeço muito aos meus amigos (mais que amigos, friends), que são a família que eu escolhi, ou a família que me escolheu. Obrigada pelos bons momentos, sempre com muitas risadas, jogos e descontração, sou grata por ter cada um na minha vida.

Sou muito grata e tenho uma enorme admiração pelo Carlos Mauricio, que é meu orientador desde a minha iniciação científica, passando pelo mestrado e agora também no doutorado. Obrigada pelo exemplo de profissional que você é, pela sua generosidade, seu incentivo e pela honra de trabalhar no seu grupo. Além disso, agradeço aos meus amigos do Laboratório de Modelagem Molecular da UFRRJ por toda ajuda e bons momentos compartilhados.

À Carol, agradeço muito por todo o apoio durante nossa jornada na pós-graduação, que permitiu que nossa amizade se estreitasse através de momentos de bastante trabalho no laboratório e de descontração jogando Pokémon Go por aí.

Agradeço ao meu coorientador Marco Edilson, pela orientação, paciência e por ter me recebido tão bem em seu grupo no Laboratório de Química Medicinal da UFRRJ, além disso, agradeço aos amigos de laboratório que sempre tornam esse trabalho mais prazeroso.

Agradeço ao Prof. Dr. Demian Ifa por me receber tão generosamente em seu laboratório durante o período de Doutorado Sanduíche (PDSE) na York University, no Canadá. Obrigada por toda a ajuda e apoio com o projeto e com essa experiência única de intercâmbio que enriqueceu tanto a minha vida. Sou muito grata também ao grupo de trabalho que me recebeu

muito bem e em especial, agradeço pela colaboração da Dr^a Shamina Prova que se tornou também uma grande amiga.

Agradeço aos membros da banca por aceitarem meu convite e pela colaboração com o enriquecimento deste trabalho.

Agradeço também a todos os grupos de colaboração que foram fundamentais para que este projeto fosse concluído, pois sem cooperação, não se faz ciência.

Ao PPGQ, aos professores e funcionários que me passaram valiosos conhecimentos que foram fundamentais para minha formação.

E sou muito grata à UFRRJ, que vem sendo minha segunda casa há tantos anos e que me trouxe tantas realizações.

Aos órgãos de fomento, CAPES, FAPERJ e CNPq, em especial ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior da Capes pela oportunidade.

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

RESUMO

CASTRO, L. H. E.; **Desenvolvimento de Triazóis Derivados da Piperina Inibidores da CYP51 de *Trypanosoma cruzi*: Otimização de um Modelo de Previsão de Atividade Teórica, Síntese e Atividade *in vitro***. 2021. 175 p. Tese (Doutorado em Química, Química Orgânica). Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2021

A doença de Chagas (DC) é uma doença tropical negligenciada causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* e apresenta milhões de casos em vários países. Atualmente, não existem vacinas que previnam a DC e só dois fármacos são usados para o tratamento. No Brasil, apenas o benzonidazol é usado e é pouco eficaz na fase crônica da doença. Dessa forma, pesquisas por novos fármacos tornam-se fundamentais. A enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51) faz parte da via de biossíntese de ergosteróis, que são fundamentais para a integridade da membrana celular do *T. cruzi*. A sua inibição causa a morte do parasito e pode ser promovida pela coordenação de compostos heterocíclicos com o átomo de ferro do grupo heme da enzima. Em trabalho anterior, foi construído um modelo de previsão de atividade teórica de compostos na CYP51 (*T. cruzi*), baseado em parâmetros experimentais e teóricos calculados por modelagem molecular, que foi usado no planejamento de compostos triazólicos derivados da piperina. No presente trabalho, o modelo teórico original foi otimizado usando o método semi-empírico PM7 no lugar do PM6 e um estudo de uma possível seletividade foi feito pela docagem dos compostos heterocíclicos na CYP51 de *T. cruzi* e de *H. sapiens*. Dos compostos planejados com o modelo original, os mais promissores foram sintetizados, tiveram suas atividades determinadas *in vitro* contra o *T. cruzi* e foram testados para a inibição da CYP51. O novo modelo apresentou um coeficiente de correlação múltipla levemente superior ao do original. O estudo de docagem indica uma provável seletividade dos compostos para a enzima do parasito. Os derivados apresentaram atividades contra as formas tripomastigotas, em acordo com as previsões feitas pelo modelo e baixa citotoxicidade em células de primatas. Ensaio preliminares de inibição enzimática indicaram que os compostos planejados pelo modelo são capazes de inibir, de fato, a CYP51 do parasito.

Palavras-chave: Doença de Chagas, triazóis, esterol 14 α -desmetilase, semi-empírico, docagem molecular.

ABSTRACT

CASTRO, L. H. E.; **Development of triazoles piperine derivatives inhibitors of *Trypanosoma cruzi*'s CYP51: optimization of a prediction model of theoretical activity, synthesis and *in vitro* activity.** 2021. 175 p. Thesis (PhD in Chemistry, Organic Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2021

Chagas disease (CD) is a neglected tropical disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* and presents millions of cases in several countries. Currently there are no vaccines for CD prevention and there are only two drugs for its treatment, but in Brazil, only benznidazole is used and is ineffective on disease's chronic phase. Thus, research for new drugs becomes essential. The enzyme sterol 14 α -desmethylase (CYP51) belongs to the ergosterol biosynthesis pathway, which are fundamental for the integrity of the *T. cruzi*'s cell membrane. Its inhibition causes the parasite's death and it can be promoted by the coordination of heterocyclic compounds with the iron atom of the enzyme's heme group. On a previous work, a theoretical model of activity prediction for new inhibitors of CYP51 (*T. cruzi*), based on experimental and theoretical parameters calculated by molecular modeling, which was used for design new triazole piperine derivatives. On this current work, the original theoretical model was optimized using the semi-empirical PM7 method instead of PM6 and a selectivity study was done by molecular docking of heterocyclic compounds in *T. cruzi*'s CYP51 and *H. sapiens*'s CYP51. The most promising compounds, planned by the original model, were synthesized, evaluated *in vitro* against *T. cruzi* and they were tested for CYP51 inhibition. The new model presented a multiple correlation coefficient slightly higher than the original. The docking study indicates a likely selectivity of the compounds for the parasite's enzyme. The compounds showed activities against trypomastigote forms, in agreement with the general predictions made by the model, and low cytotoxicity in primate cells. Preliminary enzyme inhibition assays indicated that the compounds designed with the model are in fact capable of inhibiting the parasite's CYP51.

Keywords: Chagas disease, triazoles, sterol 14 α -demethylase, semiempirical method, molecular docking.

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de interação de inibidores com a CYP51	57
Esquema 2: Análise retrossintética dos compostos da série B .	63
Esquema 3: Esquema da síntese dos derivados triazólicos planejados.	66
Esquema 4: Etapa de síntese do cloreto de acila a partir do ácido piperínico.	67
Esquema 5: Reação de síntese da hidrazida a partir do cloreto de ácido.	67
Esquema 6: Síntese dos intermediários hidrazinocarbotioamida a partir da acil hidrazida, para a posterior formação dos triazóis planejados.	68
Esquema 7: Síntese dos compostos triazólicos.	69
Esquema 8: Síntese dos compostos triazólicos alquilados.	69
Esquema 9: Síntese dos compostos triazólicos 3 metil-sulfóxido.	70
Esquema 10: Síntese dos compostos triazólicos 3 metil-sulfóxido.	70
Esquema 11: Etapas de síntese da hidrazida a partir do ácido piperínico.	102
Esquema 12: Proposta do mecanismo genérico de formação de cloretos de acila em presença de cloreto de oxalila (Adaptado de MARCH, 1985).	103
Esquema 13: Síntese dos intermediários hidrazinocarbotioamida a partir da acil hidrazida, para a posterior formação dos triazóis planejados.	106
Esquema 14: Mecanismo proposto para a obtenção dos intermediários carbotioamidas.	107
Esquema 15: Síntese dos compostos triazólicos.	108
Esquema 16: Mecanismo proposto para a formação dos derivados triazólicos.	108
Esquema 17: Síntese dos compostos triazólicos alquilados.	116
Esquema 18: Síntese dos compostos triazólicos 3 metil-sulfóxido.	125
Esquema 19: Proposta de fragmentação para o composto B3 $[M+H]^+$; $m/Z = 408,137814$ (20%); 304,07520 (30%); 135,04424 (10%); 105,07029 (100%).	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial dos casos da doença de Chagas, atualizada em abril de 2021. (Fonte: https://dndi.org/diseases/chagas/facts/)	25
Figura 2: Triatomíneos vetores da doença de Chagas (Fonte: Adaptado da campanha informativa sobre a doença de Chagas do Ministério da Saúde – 2021) (“Doença de Chagas — Português (Brasil),” 2021))	26
Figura 3: Formas do <i>T. cruzi</i> encontradas no vetor - epimastigota e nos hospedeiros vertebrados - amastigota e tripomastigota (Adaptado de (JUNQUEIRA et al., 2011)).	27
Figura 4: Ciclo de transmissão do <i>T. cruzi</i> (simplificado) (Fonte CDC – Centers for Disease Control and Prevention – Adaptado).	29
Figura 5: Estrutura química do princípio ativo dos dois tratamentos para a DC existentes, o nifurtimox (1) e o benzonidazol (2).	32
Figura 6: Estrutura do núcleo do esterol (3), do ergosterol (4) - biossintetizado por fungos e protozoários, e do colesterol (5)- biossintetizado por mamíferos; em destaque de vermelho, as diferenças entre as estruturas.	36
Figura 7: Esquema simplificado da via biossintética de formação do ergosterol com enzimas alvo de cada etapa em azul e seus respectivos inibidores em verde (Adaptado de (FRANÇA et al., 2014; OSORIO-MÉNDEZ; CEVALLOS, 2019)).	37
Figura 8: Exemplos de inibidores da síntese de ergosterol em <i>T. cruzi</i> : inibidores da esterol 14 α -demetilase: cetoconazol (6), fluconazol (7) e o itraconazol (8) tipifarnibe (9)	38
Figura 9: Etapas da reação de desmetilação do lanosterol no C14, catalisada pela CYP51 (WATERMAN & LEPESHEVA, 2005).	39
Figura 10: Representação do grupo heme ligado ao sítio ativo da CYP51 de <i>T. cruzi</i> (código no PDB: 46HO) interagindo com um resíduo de cisteína e com uma molécula de água, na ausência de um substrato. A enzima está na representação <i>cartoon</i> na cor cinza, o grupo heme e o resíduo de cisteína (CYS-380) estão representados na forma de bastões cinza.	40
Figura 11: Estruturas e respectivas atividades do ravuconazol (10), VFV (11), VNI (12), VT-1161 (13), compostos heterocíclicos com atividade sobre a CYP51 de <i>T. cruzi</i> (atividades em amastigotas).	42
Figura 12: Composto (14), com atividade contra <i>T. cruzi</i> (URBINA, et al., 2003).	42
Figura 13: Estrutura genérica dos compostos heterocíclicos com atividade anti <i>T. cruzi</i> , estudados por Andrini e colaboradores.	43

- Figura 14: Representação da formação de um complexo octaédrico, através da coordenação do íon Fe^{II} com os nitrogênios do anel do grupo heme, o enxofre da cisteína e um inibidor proposto. 44
- Figura 15: Reação de formação do composto fluorescente 3-ciano-7-hidroxycumarina (**15**, CHC) a partir do substrato VividTM BOMCC (**14**). 44
- Figura 16: Compostos heterocíclicos derivados da piperina selecionados para serem sintetizados. 62
- Figura 17: Diluição em série dos compostos utilizados nesse estudo, dos controles positivos e do controle negativo feita em DMSO. 73
- Figura 18: Estrutura cristalográfica da enzima 14 α -desmetilase do *T. cruzi* (PDB: 4H6O) representada na forma *cartoon* na cor verde; Na região central da enzima, encontra-se o grupo heme representado por bastões na cor verde e o inibidor co-cristalizado, representado por bastões na cor azul. 79
- Figura 19: Estrutura cristalográfica da enzima CYP51_{Hs} (PDB: 6UEZ) representada na forma *cartoon* na cor verde; na região central da enzima, em destaque, encontra-se o grupo heme representado por bastões (com átomos de C na cor verde), uma molécula de água e o lanosterol (substrato natural), representado por bastões com átomos de C na cor ciano. 80
- Figura 20: Sobreposição das estruturas cristalográficas da enzima CYP51_{Hs} (PDB: 6UEZ) na cor cinza com a enzima CYP51_{Tc} (PDB: 4H6O) na cor azul, ambas na forma *cartoon*; É possível observar algumas diferenças de posição de resíduos e alças entre as estruturas. 81
- Figura 21: Sobreposição dos resíduos do sítio ativo que diferem da estrutura da CYP51_{Tc} (em azul) para a CYP51_{Hs} (em cinza). 82
- Figura 22: Compostos heterocíclicos mesoiônicos (FRAUCHES-SANTOS, 2017) utilizados no estudo de interação com a CYP51_{Tc}. 85
- Figura 23: Comparação da sobreposição dos melhores resultados das docagens com inibidores **B1, B2, B3, B9, B10, B11** (que foram sintetizados e avaliados experimentalmente) (A) e **C1, C2, C3, C4** (B). A CYP51_{Tc} está representada em forma *cartoon* na cor cinza claro, o grupo heme com átomos de C da mesma cor, está representado em forma de bastões e os ligantes de ambas as séries estão representados com átomos de C na cor rosa em forma de bastões. 90
- Figura 24: Sobreposição das melhores poses geradas pela docagem dos compostos da **série B** na 6UEZ (CYP51_{Hs}) (enzima representada em *cartoon* cinza claro; grupo heme representado com bastões com átomos de C em cinza escuro e ligantes representados em bastões com átomos de C em rosa). A) sobreposição das poses dos compostos (**B14, B17-B20**) que

- interagiram pelo nitrogênio do anel triazólico. B) sobreposição das poses dos compostos (**B1-B3, B9, B10, B13 e B15**) que interagiram por outros grupos da estrutura. 92
- Figura 25: Sobreposição das melhores poses geradas pela docagem dos compostos da **série B** na 6UEZ (CYP51_{Hs}) mantendo a molécula de água presente no sítio ativo (enzima representada em *cartoon* cinza claro; grupo heme representado com bastões com átomos de C em cinza escuro e ligantes representados em bastões com átomos de C em rosa). A) sobreposição das poses dos compostos que interagiram pelo nitrogênio do anel triazólico, onde observa-se pouca relevância da interação com a molécula de água. B) sobreposição das poses dos compostos que interagiram por outros grupos da estrutura, nota-se que para alguns compostos, houve interação com a molécula de água. 94
- Figura 26: Estrutura da acilidrazida. 105
- Figura 27: Estrutura do derivado **B1**. 110
- Figura 28: Estrutura do derivado **B9**. 114
- Figura 29: Estrutura do derivado **B2**. 119
- Figura 30: Estrutura do composto **B10**. 123
- Figura 31: Estrutura do derivado **B3**. 128
- Figura 32: Estrutura do derivado **B11**. 134
- Figura 33: A): Elipsóides térmicos da unidade assimétrica do composto **B1** em um nível de 50% de probabilidade. Código das cores: cinza (carbono), azul (nitrogênio), vermelho (oxigênio), amarelo (enxofre) e branco (hidrogênio). Comprimentos de ligação selecionados (em Å): N1–N2: 1.368(2); N1–C2: 1.306(3); N2–C1: 1.338(3); N3–C1: 1.361(3); N3–C2: 1.381(2); C1–S1: 1.677(2); O1–C11: 1.370(3); O2–C9: 1.378(3). B) Detalhes de empacotamento do cristal com a interação intermolecular envolvendo o nitrogênio do triazol e o grupo tiona. Operação de simetria para gerar os átomos equivalentes: $i = -x, -y, -z$. 138
- Figura 34: Curva dose-resposta de log(concentração) x valores de fluorescência (normalizados), do controle positivo ($CI_{50} = 3,03 \mu\text{M}$) e do composto **B1** ($CI_{50} = 0,34 \mu\text{M}$) para o experimento 3, com leituras de fluorescência feitas após 1h de reação e adição de posaconazol ao final da reação. 142
- Figura 35: Viabilidade de parasitos (média de 3 experimentos) após tratamento de amastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen C2C4 LacZ) com **B1-B3 e B9-B11** por 120 h. Determinado por clivagem enzimática de CPRG pela βGal . 144
- Figura 36: Viabilidade de células LLC-MK2 (média de 3 experimentos) após tratamento com **B1-B3 e B9-B11** por 120 h. Determinado pela redução mitocondrial do sal de MTT. 145

Figura 37: Gráfico comparativo da viabilidade de *T. cruzi* (cores sólidas), determinado por clivagem enzimática de CPRG pela β Gal, em relação à viabilidade de células LLC-MK2 (padrão quadriculado), determinado pela redução mitocondrial do sal de MTT, após tratamento com **B1-B3**, **B9-B11** em diferentes concentrações por 120 h.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Dados relativos à preparação das soluções estoque dos inibidores.	73
Tabela 2: Solução principal – concentração e volumes finais e iniciais de CYP51, Vivid BOMCC e Solução tampão de fosfato de potássio, necessários para a preparação dessa mistura.	74
Tabela 3: Solução regeneradora de NADPH – concentração e volumes finais e iniciais de Glicose 6-fosfato, NADP e Glicose 6-phosfato desidrogenase para a preparação dessa mistura.	74
Tabela 4: Estrutura dos compostos estudados por Andriani e colaboradores e seus respectivos valores de CE_{50} .	82
Tabela 5: Estrutura dos compostos derivados da piperina descritos por (CASTRO, 2016).	84
Tabela 6: Valores de energia de solvatação (em kcal/mol) determinados utilizando o método SM5.8.	85
Tabela 7: Valores das pontuações da docagem (em duplicata) das séries A e B , com a respectiva distância (Å) entre o N heterocíclico e o Fe(II) do grupo heme (continua) (CASTRO, 2016).	87
Tabela 8: Resultados da pontuação, distância (Å) com os átomos envolvidos na interação e a energia torcional, obtidos com a docagem dos inibidores da série C com a estrutura 4H6O (CYP51 _{Tc}) usando a função ChemPLP e um raio de 10Å.	89
Tabela 9: Valores de pontuação, distância entre o íon Fe(II) do heme e os ligantes, energia torcional resultantes da docagem dos compostos da série B com a estrutura da CYP51 _{Hs} (6UEZ), feito sem as moléculas de água e em duplicata.	91
Tabela 10: Valores de pontuação, distância entre o íon Fe(II) do heme e o ligantes da série B com a estrutura da CYP51 _{Hs} (6UEZ) mantendo uma molécula de água presente na estrutura cristalográfica, feita em duplicata.	93
Tabela 11: Resultados de entalpia obtidos com o método PM7 para os sistemas referentes à interação dos inibidores da série A com a estrutura 4H6O da CYP51 _{Tc} .	95
Tabela 12: Resultados dos cálculos semi-empíricos com o método PM7 para os sistemas referentes à interação dos inibidores da série B com a estrutura 4H6O da CYP51 _{Tc} .	97
Tabela 13: Resultados dos cálculos semi-empíricos com o método PM6 para os sistemas referentes à interação dos inibidores da série C com a estrutura 4H6O da CYP51 _{Tc}	98

Tabela 14: Valores referentes ao ΔH_{int} (método PM7), ΔG_{solv} (método SM5.4 do Spartan'14), ΔE_{tor} (função <i>ChemPLP</i>), $\log CE_{50\text{exp}}$ e $\log CE_{50\text{calc}}$ calculado pela Equação 7, dos compostos da série A .	99
Tabela 15: Valores referentes ao ΔH_{int} (kcal/mol, método PM7), ΔG_{solv} (kcal/mol, método SM5.4 do Spartan'14), ΔE_{tor} (função <i>ChemPLP</i>) e $\log CE_{50}^{\text{calc}}$ calculado pela Equação 7, dos compostos da série B .	100
Tabela 16: Valores referentes ao ΔH_{int} (kcal/mol, método PM6), ΔG_{solv} (kcal/mol, método SM5.4 do Spartan'14), ΔE_{tor} (função <i>ChemPLP</i>) e $\log CE_{50}^{\text{calc}}$ calculado pela Equação 7, dos compostos da série C .	101
Tabela 17: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a acilidrazida.	105
Tabela 18: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado B1 .	110
Tabela 19: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado B9 .	114
Tabela 20: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado B2 .	119
Tabela 21: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o composto B10 .	123
Tabela 22: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado B3 .	129
Tabela 23: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o composto B11 .	134
Tabela 24: Dados cristalográficos e de refinamento estrutural para o derivado B1	139
Tabela 25: Valores de porcentagem de inibição dos compostos no experimento 1 após 1h de reação.	140
Tabela 26: Valores preliminares de CI_{50} (μM) dos controles positivos e dos compostos B1 , B2 , B9 , C1 , C2 e C3 calculados com os resultados do experimento 3, coeficiente de correlação (r^2) e número de pontos usados em cada correlação (n).	142
Tabela 27: Valores médios de IC_{50} (triplicata) calculados para B1-B3 , B9-B11 e o Bdz (controle positivo) em epistigotas e tripomastigotas de <i>T. Cruzi</i> e células hospedeiras LCC-MK2.	144

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Algoritmo Genético
AM1	<i>Austin Model 1</i>
Aq	Aquoso
CCDA	Cromatografia de Camada Delgada Analítica.
CCDC	<i>The Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massas
CYP51	Enzima citocromo P450 esterol 14 α -desmetilase
DFT	Teoria do Funcional da Densidade (do inglês, Density Functional Theory).
DMI	Inibidor da desmetilação de esteróis (do inglês, <i>Demethylation Inhibitors</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
CE ₅₀	Concentração de um composto capaz de induzir metade do efeito máximo esperado.
DC	Doença de Chagas.
GOLD	<i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i>
CI ₅₀	Concentração de inibidor capaz de inibir 50% da atividade enzimática.
LCAO	Combinação linear de orbitais atômicos (do inglês, <i>Linear Combination of Atomic Orbitals</i>).
MNDO	<i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i>
MNDO/d	<i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i> , incluindo orbitais d
MOPAC	<i>Molecular Orbital Package</i>
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina.
N _{LR}	Número de ligações rotacionáveis.
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PM3	<i>Parametric Method 3</i>
PM6	<i>Parametric Method 6</i>
PM7	<i>Parametric Method 7</i>
ppm	Partes por Milhão
RF	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio médio quadrático (do inglês, <i>root mean square deviation</i>).

SIB	Inibidores da biossíntese de esteróis (do inglês, <i>Steroids Biosynthesis Inhibitors</i>)
STO	Orbitais do tipo Slater (do inglês, <i>Slater type orbitals</i>).
T.A.	Temperatura Ambiente.
UV	Ultravioleta.
$\Delta E_{\text{tor.}}$	Energia torsional.
ΔG_{solv}	Energia de solvatação.
ΔH_{int}	Entalpia de interação.
3D	Tridimensional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Principais aspectos da Tripanossomíase americana	24
2.1.1 Agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
2.1.2 Ciclo do parasito	27
2.1.3 Fases e Transmissão	29
2.1.4 Tratamento	31
2.2. Desenvolvimento de Novos Fármacos em Potencial	33
2.2.1 Via de Biossíntese de Esteróis	35
2.2.2 Esterol 14 α -desmetilase (CYP51)	39
2.2.3 Compostos Azólicos com Ação anti- <i>T. cruzi</i>	40
2.2.4 Determinação da Inibição Enzimática	43
2.3. Modelagem molecular no desenvolvimento de novos fármacos	45
2.3.1 Métodos de Modelagem Molecular	46
3. JUSTIFICATIVA	52
4. OBJETIVOS	53
5. METODOLOGIA	54
5.1. Modelagem Molecular	54
5.1.1 Estrutura da Enzima	54
5.1.2 Construção dos Ligantes	54
5.1.3 Docagem Molecular	54
5.1.4 Cálculo de Entalpia de Interação CYP51-inibidor	56
5.1.5 Modelo Teórico para a Predição de Atividade Inibitória da CYP51	58
5.2. Síntese de Derivados da Piperina Planejados	61
5.2.1 Reagentes e Solventes	63

5.2.2	Equipamentos	64
5.2.3	Metodologia Geral para a Síntese dos Derivados Triazólicos	65
5.3.	Difração de Raio-X de Monocristal	71
5.4.	Inibição da CYP51 _{Tc} Detectada por Fluorescência	71
5.4.1	Solução dos Inibidores	72
5.4.2	Reação de Inibição Enzimática	73
5.5.	Avaliação de Atividade Biológica	74
5.5.1	Parasitas	74
5.5.2	Cultivo de Linhagem Células Mamíferas LLC-MK2	75
5.5.3	Atividade Anti-epimastigota	75
5.5.4	Ensaio de Atividade em Amastigotas de <i>T. cruzi</i>	76
5.5.5	Ensaio de Citotoxicidade em Células LLC-MK2	76
5.5.6	Tratamento Estatístico dos Dados de Atividade <i>in vitro</i>	76
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
6.1.	Modelagem Molecular	78
6.1.1	Comparação de Estruturas 3D de CYP51 _{Tc} e CYP51 _{Hs}	78
6.1.2	Séries de Ligantes	82
6.1.3	Dockagem Molecular	87
6.1.4	Cálculo de Entalpia de Interação CYP51-Inibidor	95
6.1.5	Modelo Teórico para a Predição de Atividade Inibitória na CYP51 _{Tc}	98
6.2.	Síntese de Compostos Planejados	102
6.2.1	Preparação da (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dieno-hidrazida	102
6.2.2	Preparação dos Intermediários 2-[(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3benzodioxol -5-il)penta-2,4-dienoil]-N-alquil/aryl-hidrazinocarbotioamida	106
6.2.3	Preparação dos Derivados Triazólicos (2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona)	108
6.2.4	Derivados da Piperina Triazólicos Alquilados	116
6.2.5	Síntese dos derivados oxidados metil-sulfóxido	125

6.2.6 Síntese dos Derivados Oxidados Metil-sulfona	136
6.3. Difração de Raios-X do Monocristal B1	136
6.4. Inibição da CYP51 _{Tc}	139
6.5. Avaliação da Atividade Biológica	143
7. CONCLUSÕES	147
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
9. ANEXOS	165

1. INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são geralmente causadas por parasitos e incidem originalmente em populações de baixa renda e em países menos desenvolvidos. Essas enfermidades também apresentam indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle (“PAHO/WHO - Chagas Disease,” 2018; WHO, 2007).

A tripanossomíase americana, conhecida popularmente como “doença de Chagas” (DC) é uma doença tropical negligenciada que afetava, originalmente, países pouco desenvolvidos econômica e socialmente, com a maioria dos casos na América Latina. Entretanto, a DC vem se disseminando em países da América do Norte, Europa, Oceania e Ásia (GASCON; BERN; PINAZO, 2010; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Ainda não existem vacinas disponíveis para a prevenção de CD (PEREIRA et al., 2015), e há apenas dois fármacos disponíveis para o seu tratamento, nifurtimox e benznidazol (COURA; CASTRO, 2002), o que torna urgente a busca por novos fármacos. No entanto, por se tratar de uma doença negligenciada, o investimento por parte de indústrias farmacêuticas é limitado para o desenvolvimento de novos fármacos, visto que a perspectiva de lucro não é promissora por ser uma doença que incide geralmente na parcela mais pobre da população (HOLT; GILLAM; NGONDI, 2012; HOUWELING et al., 2016).

Devido a esta questão, foram implementadas algumas iniciativas para incentivar pesquisas nesta área, como a DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative, Iniciativa para Doenças Negligenciadas, <https://www.dndi.org/>), uma organização sem fins lucrativos que tem contribuído para o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças negligenciadas, incluindo a DC.

Dentre as estratégias que vêm sendo exploradas para o desenvolvimento de fármacos está o uso de métodos de química computacional para auxiliar no planejamento estrutural de compostos, entendimento de mecanismos de ação e triagem, além de se determinar propriedades de compostos promissores para o tratamento da doença.

Estratégias computacionais para o planejamento de novos fármacos baseadas no alvo são bastante úteis. Um alvo promissor no caso da DC é a CYP51, uma enzima essencial para a sobrevivência do parasito causador da doença, o *Trypanosoma cruzi*. A CYP51 atua na via biossintética de ergosteróis, que são responsáveis pela função e estrutura da membrana plasmática, que pode ser inibida por alguns compostos heterocíclicos (CHEN; MENG; CHENG, 2002; FRIGGERI et al., 2019; HU et al., 2018).

Franklim e colaboradores desenvolveram novos triazóis derivados da piperina que é extraída e isolada da *Piper nigrum* (conhecida como pimenta do reino). O planejamento dos derivados foi baseado em uma estratégia de hibridização combinando a estrutura da amida natural da piperina, que apresenta atividade anti-*T. cruzi* (FREIRE-DE-LIMA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2004), com o núcleo 1,2,4-triazol-3-iona para uma possível coordenação com o átomo de ferro do grupo heme da CYP51 do *T. cruzi* (CYP51_{Tc}). Os compostos apresentaram bons resultados contra as formas epimastigotas (CI₅₀ = 50,75-13,22 µM) de *T. cruzi* e podem ser considerados compostos bioativos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (FRANKLIM et al., 2013).

A piperina é um alcaloide encontrado principalmente nos frutos da *Piper nigrum* e é seu principal metabólito secundário. Ela é originária da Índia, onde é amplamente utilizada na medicina popular. Além disso, algumas atividades biológicas vêm sendo atribuídas à esse produto natural, como por exemplo, atividade inseticida (DE PAULA et al., 2000), anti-inflamatória (WOO et al., 2007) e efeito anti-*T. cruzi* (FREIRE-DE-LIMA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2004).

Estudos recentes do grupo de Modelagem Molecular da UFRRJ, do qual este trabalho faz parte, apresentaram como resultado uma função que permite prever a atividade (teórica) de compostos tendo como alvo a CYP51_{Tc} (CASTRO, 2016). Esse modelo teórico foi construído com base em parâmetros teóricos calculados por modelagem molecular, ajustados a dados experimentais de inibidores heterocíclicos com atividade contra CYP51 descrita na literatura (ANDRIANI et al., 2013).

Nesse mesmo trabalho, foi avaliada a interação dos compostos triazólicos estudados por Franklim e colaboradores utilizando docagem molecular e o modelo teórico de predição de atividade para se avaliar se o mecanismo de ação poderia de fato se dar pela inibição da CYP51. Como os resultados foram positivos, propostas de modificação estrutural foram feitas com objetivo de melhorar a atividade dos compostos derivados da piperina.

Dando sequência a esse estudo, no presente projeto, foi feita uma tentativa de otimização do modelo teórico anterior utilizando-se cálculos semi-empíricos com método PM7 (ao invés do método PM6 usado originalmente); além disso, um estudo de docagem molecular também foi feito com a CYP51 humana, para a identificação de uma possível seletividade de compostos contra a enzima do parasito.

Paralelamente, os compostos planejados a partir dos triazóis derivados da piperina foram sintetizados, caracterizados e avaliados *in vitro* nas formas epimastigota, amastigota e tiveram também suas citotoxicidades avaliadas.

Adicionalmente, foram feitos estudos de docagem e cálculos semi-empíricos para uso do modelo para avaliar a possível atividade inibidora da CYP51 de compostos mesoiônicos. Esses compostos foram sintetizados no estudo de Frauches (2017) e foram incluídos no presente estudo por apresentarem estruturas promissoras, visto que possuem anéis heterocíclicos que poderiam promover a inibição da CYP51 do parasito.

Uma metodologia de inibição enzimática com detecção por fluorescência foi implementada para validar a hipótese inicial de que os compostos poderiam apresentar atividade tripanocida pela inibição do alvo proposto. Alguns compostos triazólicos derivados da piperina e compostos mesoiônicos foram avaliados com essa metodologia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Principais aspectos da Tripanossomíase americana

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são doenças infecciosas que ocorrem dentro da região tropical do planeta e incluem a tripanossomíase americana ou doença de Chagas (DC), malária, leishmaniose, esquistossomose, tripanossomíase africana, dengue, oncocercose e filariose linfática (FEASEY et al., 2010; HOTEZ; PECOUL, 2010). Essas doenças são responsáveis por um substancial morbidade e mortalidade no mundo e têm causado um claro ônus social e econômico para os países afetados (CONTEH; ENGELS; MOLYNEUX, 2010).

A DC apresenta grande morbidade e mortalidade, atingindo principalmente a parcela mais pobre e socialmente desfavorecida da população, que tem baixa visibilidade e voz política. Por isso, a doença acaba sendo relativamente negligenciada por líderes políticos, indústrias farmacêuticas e pesquisadores, no que diz respeito ao desenvolvimento de novos fármacos para seu tratamento (“PAHO/WHO - Chagas Disease,” 2018)

A DC já afeta boa parte do mundo todo, com cerca de 6 milhões de pessoas infectadas e 12 mil mortes por ano. A doença é endêmica na América Latina, estando presente em 21 países americanos que apresentam cerca de 173 mil casos anuais, havendo 75 milhões de pessoas em áreas com risco de contaminação (Figura 1). A DC, originalmente concentrava-se nas regiões rurais e com menor infraestrutura, mas atualmente, devido ao êxodo rural, o constante fluxo migratório mundial, a urbanização, o desmatamento e as mudanças climáticas, a doença tem se disseminado em áreas urbanas, inclusive em países desenvolvidos e, por isso, o número de casos em países não endêmicos vem aumentando de maneira preocupante (Figura 1) (“DNDi | Symptoms, transmission, and current treatments for Chagas disease,” 2021; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

2.1.1 Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

O protozoário flagelado *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas e apresenta alta diversidade genética e fenotípica. Ele é um protozoário flagelado que pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (LEVINE, 1980).

Ele circula entre vetores de várias espécies de três gêneros de insetos triatomíneos: *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius*, que também são conhecidos popularmente como percevejos, além do barbeiro (Figura 2). Além disso, podem estar presentes em cerca de 120 espécies de mamíferos hospedeiros como marsupiais, morcegos, roedores, carnívoros, Xenarthra (tatus), lagomorfos (coelhos e lebres) e primatas, além dos seres humanos, apresentando diversos e complexos ciclos de transmissão em ambientes silvestres e domésticos (COURA, 2015; “PAHO/WHO - Chagas Disease,” 2018; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2002).

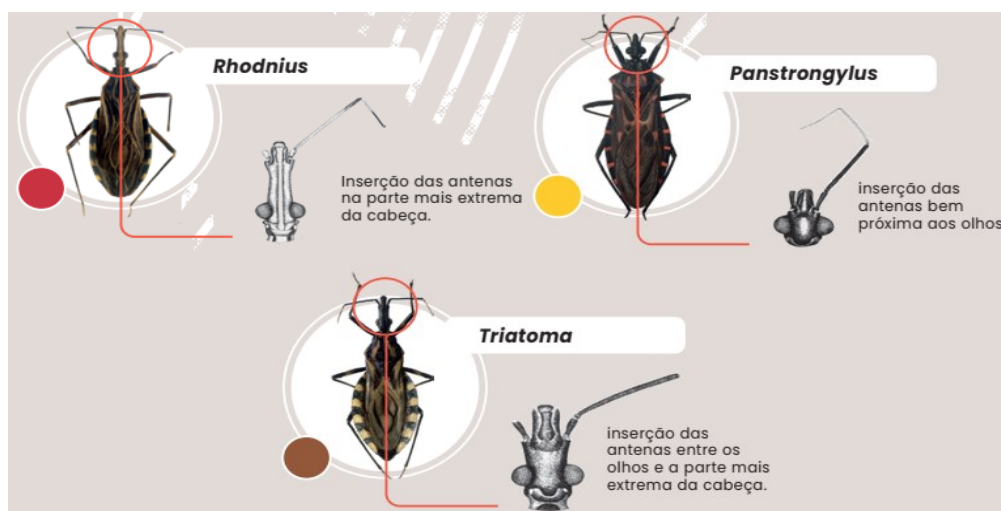


Figura 2: Triatomíneos vetores da doença de Chagas (Fonte: Adaptado da campanha informativa sobre a doença de Chagas do Ministério da Saúde – 2021) (“Doença de Chagas — Português (Brasil),” 2021))

A diversidade genética se reflete inclusive nas seis tipagens discretas em que o *T. cruzi* é classificado: de TcI até TcVI, que se relacionam inclusive com a distribuição demográfica, patogênese, características clínicas e resposta à terapia para o tratamento da doença (ZINGALES et al., 2012).

O *T. cruzi* pode se apresentar sob as formas amastigota, epimastigota, tripomastigota e promastigota (raramente nesta forma) (Figura 3). As amastigotas são formas de replicação intracelular, presentes na fase crônica da doença, que têm por característica não possuir organelas de locomoção, apresentar pouco citoplasma, núcleo grande e se multiplicar por divisão binária. As formas epimastigotas são encontradas no tubo digestivo do vetor, não são infectantes para os vertebrados, têm forma fusiforme e apresentam o cinetoplasto junto ao núcleo, possuindo flagelo, membrana ondulante e se multiplicam por divisão binária simples no vetor. As formas tripomastigotas são fusiformes e alongadas com flagelo de grande mobilidade próximo ao cinetoplasto, ocorrendo na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados e no tubo digestivo do vetor (PÉREZ-AYALA et al., 2011).

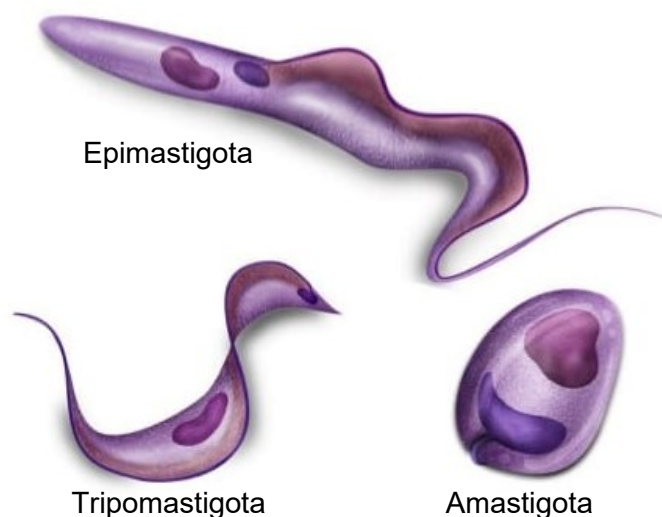


Figura 3: Formas do *T. cruzi* encontradas no vetor - epimastigota e nos hospedeiros vertebrados - amastigota e tripomastigota (Adaptado de (JUNQUEIRA et al., 2011)).

2.1.2 Ciclo do parasito

No hospedeiro, como por exemplo o ser humano, o *T. cruzi* apresenta-se sob as formas tripomastigotas e amastigotas, enquanto nos vetores ele se desenvolve nas formas de tripomastigotas e epimastigotas. (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2002).

Na forma mais tradicional de contágio, o *T. cruzi* infecta seus hospedeiros sob a forma de tripomastigota metacíclicas. O contágio ocorre geralmente quando o vetor se alimenta do sangue do indivíduo, excreta fezes contendo tripomastigotas, próximo ao local da picada, que costuma provocar um incômodo prurido e, quando o indivíduo coça a ferida,

as tripomastigotas penetram a epiderme pelo local da picada ou pelas mucosas, caso a pessoa leve as mãos contaminadas aos olhos, nariz e boca. Uma vez dentro das células do hospedeiro, as tripomastigotas se transformam em amastigotas (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2002).

As amastigotas se multiplicam por fissão binária no interior das células e posteriormente se transformam novamente em tripomastigotas, até que a célula se rompe e as tripomastigotas atingem a corrente sanguínea. Na corrente sanguínea, as tripomastigotas podem penetrar novas células do hospedeiro e reiniciar esse ciclo evolutivo, além de que um novo vetor pode se contaminar e transmitir o *T. cruzi*, caso se alimente do sangue desse indivíduo contaminado (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2002).

No vetor, o ciclo de vida do *T. cruzi* se inicia quando o triatomíneo se alimenta de sangue de algum mamífero infectado com tripomastigotas, as quais se diferenciam em epimastigotas, que se replicam no interior do intestino médio por fissão binária. As epimastigotas, então, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas novamente e são eliminadas juntamente com as fezes que podem, assim, contaminar um novo hospedeiro (VILLALTA; RACHAKONDA, 2019).

Na Figura 4, é possível observar um esquema simplificado das principais etapas do ciclo do *T. cruzi*, que se divide em dois estágios, um ocorre no triatomíneo e o outro no hospedeiro vertebrado.

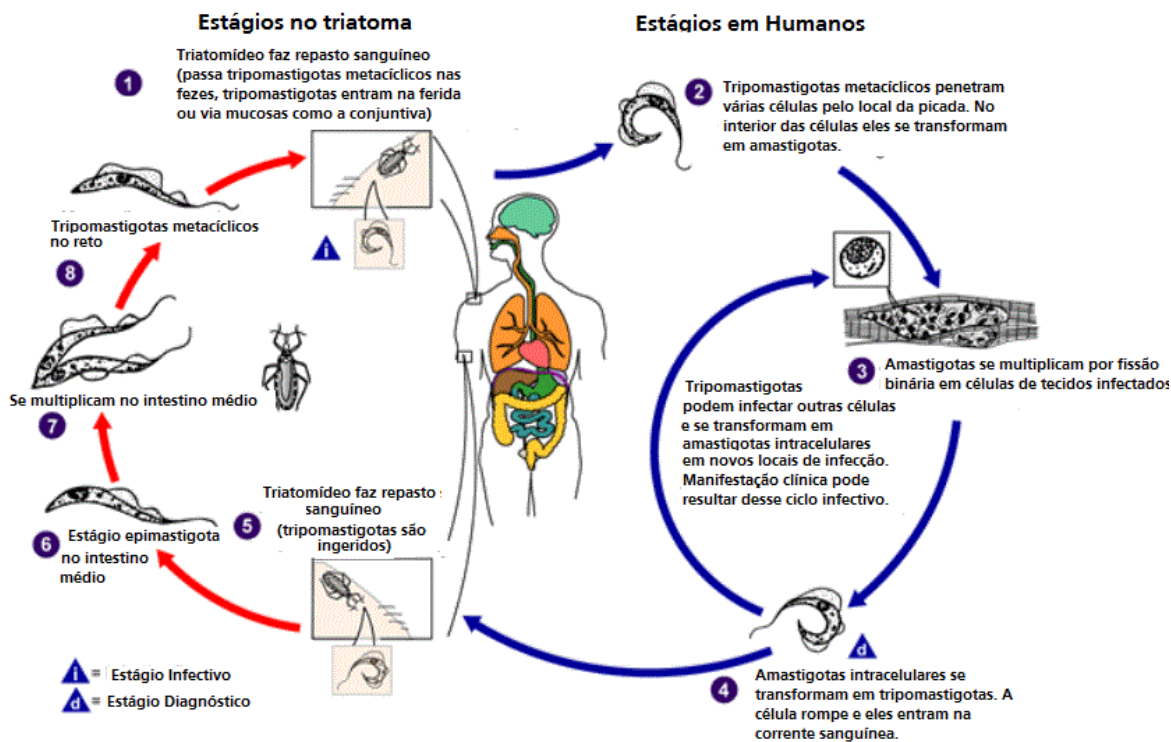


Figura 4: Ciclo de transmissão do *T. cruzi* (simplificado) (Fonte CDC – Centers for Disease Control and Prevention – Adaptado).

2.1.3 Fases e Transmissão

A doença geralmente apresenta duas fases: a fase aguda e a fase crônica, sendo que ambas apresentam sintomas distintos entre si e geralmente há um período de latência entre as fases, que é predominantemente assintomático (LARANJA et al., 2009). A fase aguda ocorre no estágio inicial da doença, assim que há a contaminação pelo parasito com duração de 4 a 8 semanas e a parasitemia diminui substancialmente a partir dos 90 dias. (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Após a fase aguda, ocorre um período de latência que é a forma indeterminada da doença em que o paciente não apresenta sintomas clínicos, nem apresenta sinais de comprometimento cardíaco ou digestivo, mas o indivíduo apresenta soropositividade para o *T. cruzi*, sendo possível a detecção por exames clínicos (PINTO DIAS, 1989).

Os mecanismos de transmissão do parasito podem ser primários (ou principais) e secundários. Os mecanismos primários englobam transmissão por vetor, transfusão sanguínea, transmissão oral, placentária ou congênita e durante o parto. Mecanismos secundários são menos frequentes e incluem acidentes de laboratório, manuseio de animais

infectados, ingestão de carne não cozida de animais infectados, transplantes de órgãos de doadores infectados com *T. cruzi*, transmissão sexual, dentre outros (COURA, 2007, 2015).

A forma de transmissão clássica, que é aquela feita pelo vetor, apresenta uma associação importante com as condições socioeconômicas menos favorecidas, pois ocorre principalmente em zonas rurais e mais pobres, onde o vetor se aloja em residências mais rústicas e acaba transmitindo o parasito quando se alimenta do sangue de seres humanos. O desmatamento e a urbanização mudaram esse cenário, acarretando num aumento da taxa de transmissão, pois há um maior contato das pessoas com o triatomíneo e porque o vetor passou a se adaptar em ambientes urbanos. Este processo inclusive, explica o grande aumento nos números de casos em áreas não endêmicas (COURA, 2015; COURA; DIAS, 2009; COURA; VÍAS, 2010; SCHMUNIS, 2007)

Em 2006 medidas preventivas possibilitaram certificação pela PAHO (Pan American Health Organization) de interrupção da transmissão vetorial por *Triatoma infestans* em países como Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. Com isso, outras maneiras de transmissão começaram a se destacar com o aparecimento de novos surtos subsequentes, como por exemplo a transmissão sanguínea, oral e vertical, além da transmissão por outros vetores (COURA, 2006, 2015).

A transmissão sanguínea é, provavelmente, o segundo mecanismo de transmissão mais expressivo. Esse fato era bastante evidente e restrito à América Latina, mas com o aumento da migração de pacientes infectados de regiões endêmicas para não endêmicas, esse tipo de transmissão passou a ter bastante relevância também em um âmbito global (COURA, 2015; COURA; VÍAS, 2010; SCHMUNIS, 2007).

O controle dos doadores possibilitou uma diminuição da transmissão por esse mecanismo, principalmente em países da América do Sul e Central, particularmente, Brasil, Chile e Uruguai. Entretanto, muitos países endêmicos e não endêmicos, como é o exemplo dos Estados Unidos da América, Espanha e países da Ásia, Europa e Oceania, não estabelecem controles tão efetivos para doação de sangue, o que representa um fator preocupante de risco para o aumento de transmissão (COURA, 2015; COURA; VÍAS, 2010).

Em paralelo, a transmissão oral que é a principal forma de transmissão de *T. cruzi* em vetores e mamíferos, também se destaca como transmissão em seres humanos principalmente nas regiões endêmicas, apresentando surtos de casos isolados, porém bastante expressivos em que há alimentos, bebidas e água contaminados com o parasito. Vale destacar casos de surtos de contaminação em países da América Latina, como

Colômbia e Venezuela por contaminação de sucos de goiaba, laranja e tangerina contaminados possivelmente com triatomíneos (ALARCÓN DE NOYA et al., 2010; DE NOYA et al., 2015; HERNANDEZ et al., 2009) e, no Brasil, alimentos, caldo de cana de açúcar, água ou sopa contaminados com triatomíneos infectados ou suas fezes (BASTOS et al., 2010; DIAS et al., 2008; STEINDEL et al., 2008), açaí (*Euterpe oleracea*) ou bacaba (*Oenocarpus bacaba*) contaminados por triatomíneos (NÓBREGA et al., 2009; PINTO et al., 2008; VALENTE et al., 2009).

Além disso, outras formas de transmissão que não envolvem a rota vetorial, também têm bastante peso no crescente número de casos de infectados pelo mundo, como por exemplo, a transmissão vertical que é aquela em que a mãe infectada contamina o filho durante a gravidez. Esse tipo de transmissão é estimado em cerca de 4,7% (variação de 3,9 a 5,6%) e essa taxa é maior nos países endêmicos (5%) do que nos países não endêmicos (2,7%) (HOWARD et al., 2014; LUQUETTI et al., 2015; MURCIA et al., 2013).

2.1.4 Tratamento

A DC não possui uma vacina que possibilite sua prevenção, restando assim as medidas preventivas relacionadas ao controle do contato dos seres humanos com vetores, condições de saneamento básico, controle de contaminação de alimentos e bebidas, medidas de controle para doação de sangue e órgãos etc.

Uma vez que a pessoa seja diagnosticada com a doença, existem atualmente apenas duas opções de tratamento possíveis e recomendados pela Organização Mundial de Saúde, os fármacos nifurtimox (1) e benzonidazol (2) (Figura 5), que são os únicos disponíveis desde as décadas de 60 e 70 até os dias de hoje (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019; PRATA et al., 1975; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2002).

Essa escassez de opções para o tratamento é um reflexo do quão negligenciada é essa doença, ainda mais considerando que a doença já foi descoberta há mais de 100 anos. Ambos fármacos apresentam altas taxas de cura na fase aguda; entretanto, há um decaimento na eficácia conforme a doença avança e, por isso, o tratamento na fase crônica não é tão promissor (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011).

O nifurtimox é administrado oralmente em três a quatro doses por 60 a 90 dias (BERN et al., 2007; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2002). Os efeitos colaterais são severos e responsáveis pela interrupção do tratamento em 14,5-75,0% dos casos (COURA;

CASTRO, 2002; JACKSON et al., 2010); eles compreendem anorexia, perda de peso, distúrbios neurológicos (irritabilidade, insônia, desorientação, alterações de humor, parestesias e neuropatia periférica), manifestações digestivas como náusea e vômito e, ocasionalmente, febre e erupção cutânea. No Brasil, o nifurtimox só é utilizado em casos em que o tratamento por benzonidazol não apresenta resposta, justamente por conta dos efeitos colaterais.

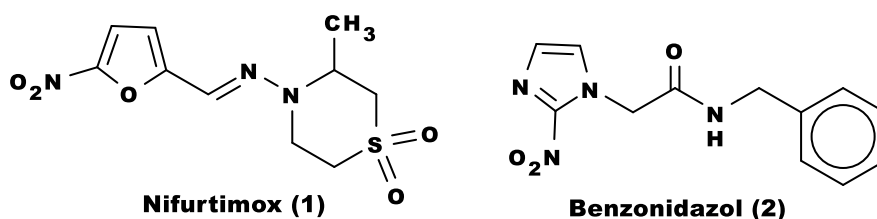


Figura 5: Estrutura química do princípio ativo dos dois tratamentos para a DC existentes, o nifurtimox (1) e o benzonidazol (2).

O nifurtimox, em especial, teve sua comercialização suspensa no Brasil, na Argentina, no Chile e no Uruguai na década de 80 devido à existência de cepas resistentes, além de apresentar alta toxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade, mesmo em dosagens baixas; sendo assim, atualmente somente o benzonidazol é utilizado para o tratamento da doença de Chagas. O benzonidazol é geralmente preferido em relação ao nifurtimox, devido ao seu melhor perfil de tolerabilidade, penetração no tecido e, possivelmente, eficácia (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Tanto o nifurtimox quanto o benzonidazol atuam através da formação de radicais livres e metabólitos eletrofilicos e, como os mecanismos celulares de defesa contra o estresse oxidativo são defectivos em *T. cruzi*, esses radicais livres são responsáveis pelo efeito tripanocida destes fármacos (MAYA et al., 2007) .

O benzonidazol atua através de três mecanismos de ação: ação tripanocida (formação de ligações covalentes com macromoléculas de *T. cruzi*, como DNA e citocromo P450); aumento da fagocitose e lise do parasita através de um mecanismo dependente do IFN- γ ; e, finalmente, inibição do crescimento do parasita, bloqueando a NADH-fumarato redutase (CALDAS; SANTOS; NOVAES, 2019).

Já para o nifurtimox, estudos apontam que o radical nitro sofra um ciclo redox com O_2 que ocasiona na produção de espécies oxidantes reativas que levam ao estresse oxidativo

do parasito que, por sua vez, apresenta uma certa deficiência de enzimas endógenas antioxidantes (BOIANI et al., 2010; GIULIVI; TURRENS; BOVERIS, 1988; NÚÑEZ-VERGARA et al., 1997). Entretanto, a elucidação total de sua ação ainda não está bem definida e também existem outras linhas de mecanismos propostos para sua ação (CERECETTO; GONZÁLEZ, 2011).

2.2. Desenvolvimento de Novos Fármacos em Potencial

O processo de desenvolvimento de um novo fármaco é uma tarefa complexa que requer muito tempo e um alto investimento, acima de 2 bilhões de dólares americanos (estimativa feita no ano de 2016), sendo que somente cerca de 12% dos compostos estudados chegam a ser aprovados (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016). Este processo consiste de várias etapas, que podem envolver desde a triagem de compostos ou o planejamento racional a partir da definição de um alvo de ação, até a determinação de atividade em etapas pré-clínicas e clínicas para a determinação de farmacocinética, toxicidade, perfil de segurança, dentre outros (DE RYCKER et al., 2018).

No caso da DC, um fármaco ideal deve ser eficaz nas fases aguda e crônica da doença, ser ativo contra todas as cepas e em indivíduos de todas as idades, com eficácia clínica superior ao benznidazol, ser administrado por via oral, além de não ter nenhuma contra-indicação ou interação com outros medicamentos e não ter genotoxicidade, teratogenicidade, efeito inotrópico e potencial pró-arrítmico (CHATELAIN, 2015).

Existem duas estratégias muito utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos que, inclusive, podem ser usadas em conjunto de maneira combinada, que são o planejamento de fármacos tendo como base a estrutura de um alvo específico (SBDD, do inglês *Structure Based Drug Design*) e o planejamento de fármacos tendo como base as estruturas dos ligantes (LBDD, do inglês *Ligand Based Drug Design*); inclusive, sempre que possível, é desejável usar as duas abordagens para chegar à conclusões consensuais, combinando as estratégias (SALDÍVAR-GONZÁLEZ; PRIETO-MARTÍNEZ; MEDINA-FRANCO, 2017).

O SBDD é uma das estratégias mais importantes para a busca novos candidatos a fármacos. Por isso, a identificação de rotas biossintéticas essenciais para a sobrevivência do parasito e suas enzimas constituintes torna-se de grande importância.

Os alvos mais investigados recentemente na literatura para o desenvolvimento de novos compostos bioativos para o tratamento da DC pertencem, predominantemente, à três

vias metabólicas mais importantes para a sobrevivência do parasito: a via de resistência ao estresse oxidativo, a da síntese de glicoconjugados de superfície e a mais estudada, a biossíntese de ergosterol (OSORIO-MÉNDEZ; CEVALLOS, 2019).

A via de resistência ao estresse oxidativo apresenta enzimas e compostos de baixa massa molecular (principalmente a glutathiona), que atuam como agentes redutores para equilibrar situações de estresse oxidativo no organismo do parasito (POOLE, 2015). O estresse oxidativo, por sua vez, é um processo em que células começam a ser danificadas devido à uma concentração elevada de moléculas de alto potencial oxidativo no organismo, mas, por outro lado, em concentrações adequadas, essas moléculas são essenciais para processos fisiológicos vitais, tais como a sinalização redox (SIES; BERNDT; JONES, 2017).

Como o *T. cruzi* é exposto a espécies tóxicas oxigenadas e nitrogenadas, oriundas do seu próprio metabolismo aeróbico e da resposta imune do hospedeiro, seu sistema antioxidante é responsável pela eliminação dessas espécies, principalmente com a proteção enzimática, ou através de compostos de baixa massa molecular contendo grupos tiol, como a glutathiona e a tripanotiona (KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008).

Estudos vêm explorando alvos do sistema antioxidante para o planejamento de compostos candidatos à novos fármacos para a DC, pois muitos deles são essenciais para *T. cruzi* e ausentes em mamíferos, principalmente enzimas envolvidas na síntese de tripanotiona (BENÍTEZ et al., 2016; PATTERSON et al., 2011; SPINKS et al., 2012), por isso a utilização de alvos dessa via em estudos para o desenvolvimento de novos fármacos tripanocidas é promissora, pois também não existem rotas biossintéticas alternativas (KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008), permitindo o desenvolvimento de inibidores tanto seletivos quanto efetivos, em tese.

Estudos apontam que alguns medicamentos contra tripanossomatídeos, inclusive os utilizados para a DC, teriam como um de seus mecanismos de ação a indução do estresse oxidativo no parasito e o bloqueio do sistema antioxidante, aumentando a suscetibilidade aos fármacos e, por conseguinte, sua eficácia (FAUNDEZ et al., 2005). Dessa forma, a identificação dos alvos moleculares específicos dentro desta via pode abrir a possibilidade de se desenvolver fármacos mais potentes e seletivos.

Além dessa via, existe também a via dos glicoconjugados de superfícies do *T. cruzi*, que assim como em outros protozoários, apresentam estrutura incomum relacionada, aparentemente, com sua sobrevivência e infectividade. Os glicoconjugados mais abundantes do *T. cruzi* são uma família de sialoglicoproteínas, que são semelhantes às mucinas. Elas contêm diferentes tipos de glicosilação e podem ser usadas como protótipos para a síntese

de compostos visando o desenvolvimento de inibidores específicos para a atividade de glicosiltransferases específicas envolvidas na biossíntese de O-glicanas no *T. cruzi*. Além disso, os carboidratos de superfície expressos por protozoários são diferentes dos de seus hospedeiros e podem, assim, ser utilizados para o desenvolvimento de vacinas, quimioterapia e estudos imunopatológicos (PREVIATO, 2017).

No *T. cruzi*, a biossíntese de todos os açúcares de nucleotídeos se inicia com a glicose-6-fosfato e, por isso, a hexocinase que promove a síntese de glicose-6-fosfato a partir da glicose, é importante não apenas na glicólise, mas também para a síntese de nucleotídeos (TURNOCK; FERGUSON, 2007). A regulação da hexocinase do *T. cruzi* é inibida por análogos não-hidrolisáveis do pirofosfato inorgânico, diferentemente do que ocorre em mamíferos em que a enzima pode ser inibida por frutose-1,6-difosfato, fosfoenol piruvato, malato ou citrato.

A via de biossíntese de esteróis é a mais estudada para o desenvolvimento de novos compostos tripanossomatídeos e o item a seguir a descreve mais detalhadamente, visto que o alvo estudado no presente projeto pertence a essa via.

2.2.1 Via de Biossíntese de Esteróis

Os esteróis são lipídeos derivadas de isoprenos produzidos na maioria das células eucarióticas e são essenciais para diversos processos ligados à manutenção da estrutura e função das membranas plasmática. Eles apresentam um núcleo esteroide com quatro anéis de carbono fusionados, três com seis átomos de carbono e um com cinco átomos de carbono (3) (Figura 6) (LEHNINGER & NELSON, 2011).

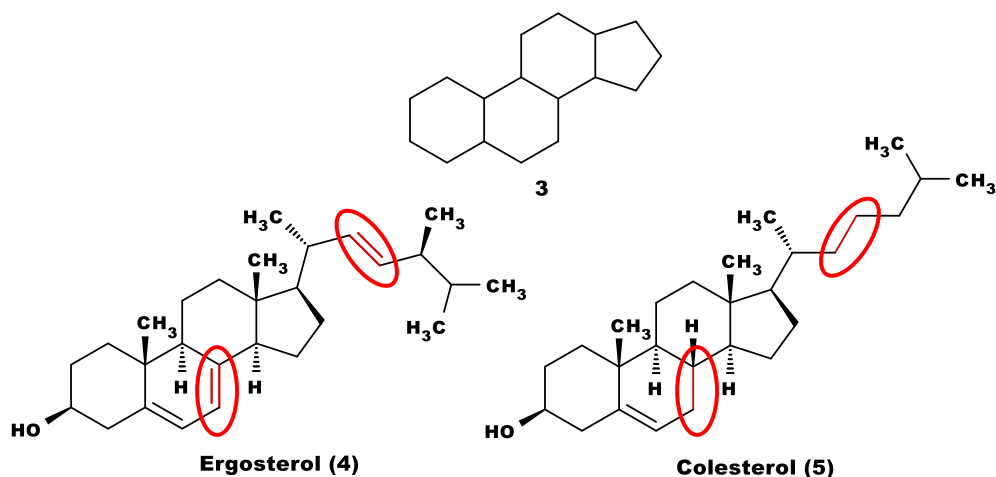


Figura 6: Estrutura do núcleo do esterol (3), do ergosterol (4) - biossintetizado por fungos e protozoários, e do colesterol (5)- biossintetizado por mamíferos; em destaque de vermelho, as diferenças entre as estruturas.

Enquanto o ser humano produz colesterol, o *T. cruzi* produz ergosterol, que é fundamental para o crescimento, desenvolvimento e proliferação em todas as fases do ciclo de vida e para sua sobrevivência. Assim, a inibição dessa via metabólica compromete a produção de ergosterol, bem como, bem como a integridade da membrana plasmática das células do parasito. Por isso, são considerados alvos promissores e bastante estudados para o desenvolvimento de novos inibidores para uso como tratamento da DC, inclusive através do reposicionamento de fármacos, aproveitando inibidores da CYP51 usados em doenças fúngicas, como o posaconazol (Figura 7) (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009).

A via biossintética do ergosterol pode ser dividida em via isoprenóide, que engloba desde a acetil-CoA até a formação do farnesil difosfato, e a via do esterol, que corresponde desde o farnesil difosfato até a formação dos esteróis de fato (Figura 7). Várias enzimas envolvidas nas etapas para a formação do ergosterol vêm sendo estudadas como alvos e as principais são a esqualeno sintase (SQS), esqualeno monooxigenase (SQLE), esterol 14 α -desmetilase (CYP51) e a esterol 24-C-metiltransferase (24MST) (LEPESHEVA et al., 2010). No processo de busca por inibidores desses alvos, alguns compostos se destacam como é o caso das estatinas, bifosfonatos (MARTIN et al., 2001), quinuclidinas (URBINA et al., 2004), alilaminas (LAZARDI; URBINA; DE SOUZA, 1990), azóis (FRANÇA et al., 2014) e azasteróis (GROS et al., 2006).

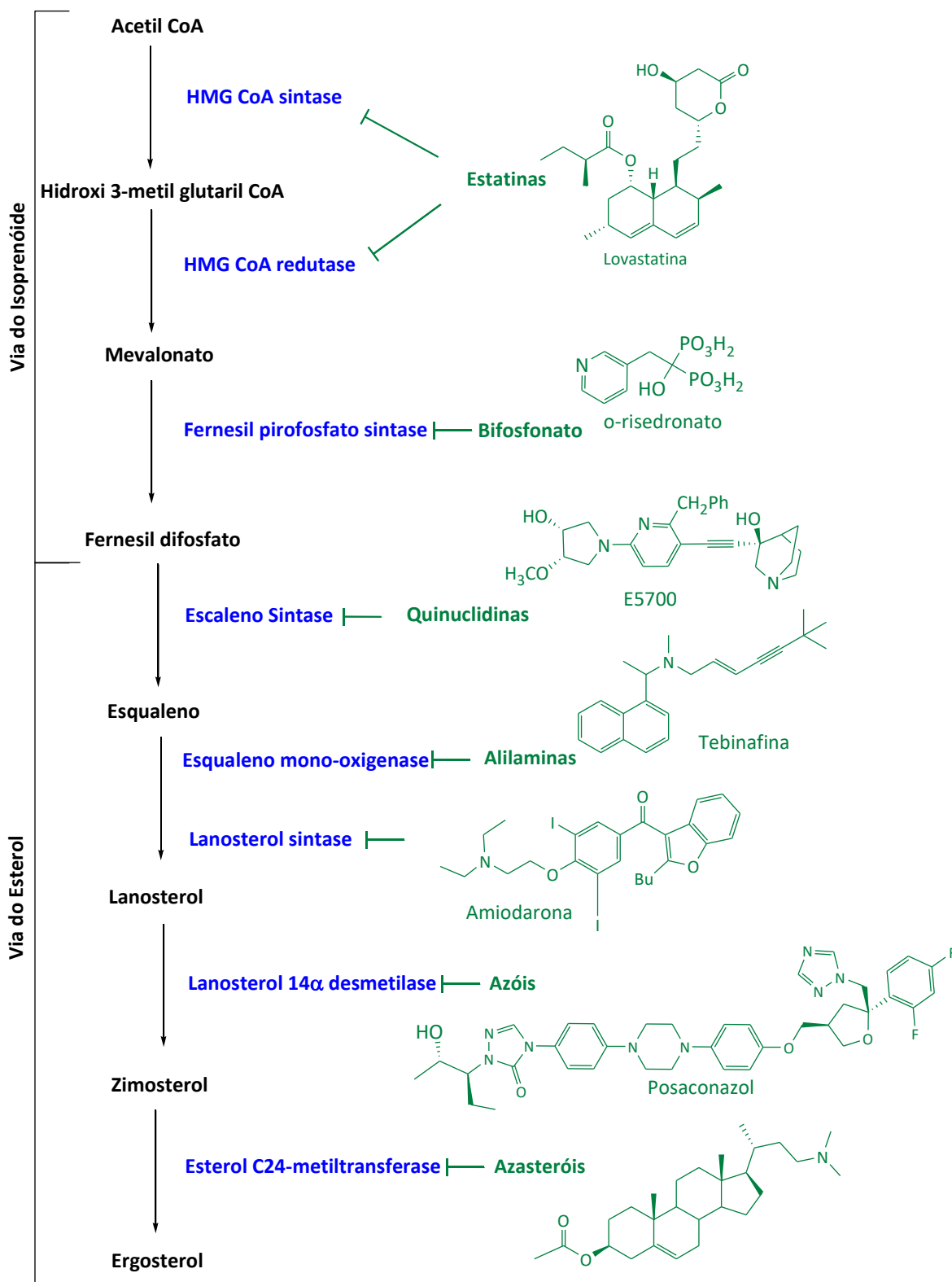


Figura 7: Esquema simplificado da via biossintética de formação do ergosterol com enzimas alvo de cada etapa em azul e seus respectivos inibidores em verde (Adaptado de (FRANÇA et al., 2014; OSORIO-MÉNDEZ; CEVALLOS, 2019)).

Dentre essas enzimas, a que mais se destaca pela quantidade de resultados promissores é a esterol 14 α -desmetilase (CYP51), que converte o substrato lanosterol em zimosterol, um precursor do ergosterol. A inibição da CYP51 interrompe completamente o crescimento de formas procíclicas e tripomastigotas do parasito, além de que parasitos com expressão diminuída da enzima se mostram menos infectivos para camundongos (DAUCHY et al., 2016; HAUBRICH et al., 2015).

Dentre os inibidores mais representativos da síntese de ergosterol têm-se os derivados azólicos inibidores da esterol 14 α -demetilase, cetoconazol, fluconazol e itraconazol, além do tipifarnibe que, embora seja um inibidor da farnesil-transferase de humanos, no *T. cruzi* ele inibe a CYP51 (Figura 8) (FRANÇA et al., 2014).

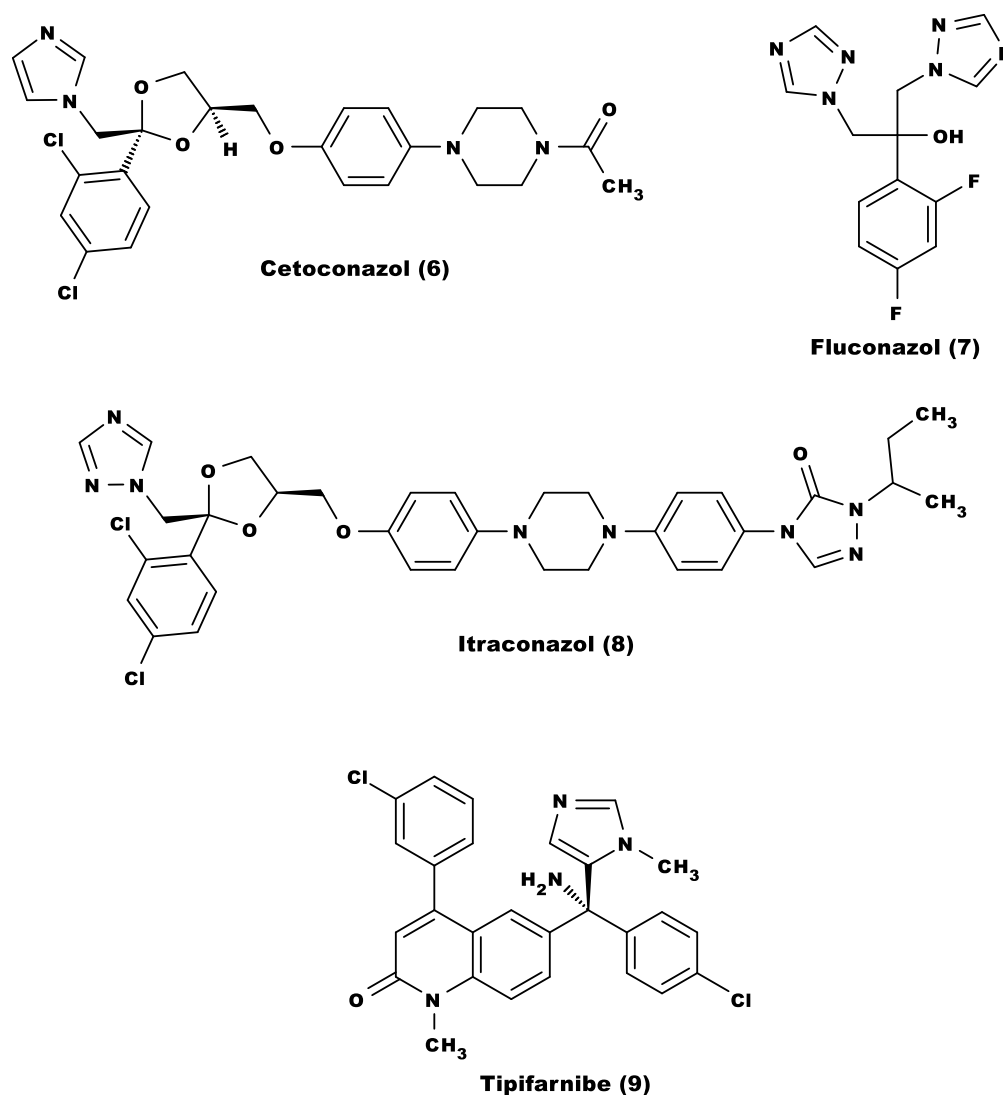


Figura 8: Exemplos de inibidores da síntese de ergosterol em *T. cruzi*: inibidores da esterol 14 α -demetilase: cetoconazol (6), fluconazol (7) e o itraconazol (8) tipifarnibe (9)

2.2.2 Esterol 14 α -desmetilase (CYP51)

A enzima esterol 14 α -desmetilase, ou CYP51, pertencente à superfamília do citocromo P450 encontrada tanto eucariotos quanto procariotos, possui a função de realizar processos de transferência de elétrons no meio biológico. As enzimas do citocromo P450 compreendem metaloenzimas que contêm um grupo heme e catalisam uma grande variedade de reações envolvendo compostos xenobióticos e endógenos.

A CYP51 desempenha um papel crucial na produção de esteróis e é alvo importante de fármacos (FRIGGERI et al., 2019; LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018). Na via biossintética do ergosterol, após a formação de lanosterol, a CYP51 catalisa uma reação limitante de remoção oxidativa do grupo 14 α -metil para produzir intermediários insaturados para a formação do zimosterol (YOSHIDA et al., 2000).

A reação ocorre em três etapas: primeiramente, o grupo 14-metila do substrato sofre uma monooxigenação régio e estereosseletiva, formando uma 14-hidroxi-metila, que em seguida é transformada em 14-carboxialdeído em um processo radicalar e, finalmente, o íon Fe(II) do grupo heme porfirínico promove uma série de oxidações radicalares formando o grupo 14-formila, quando há a eliminação de ácido fórmico com uma concomitante formação de uma ligação dupla entre as posições 14 e 15 do substrato (Figura 9) (SHYADEHI et al., 1996).

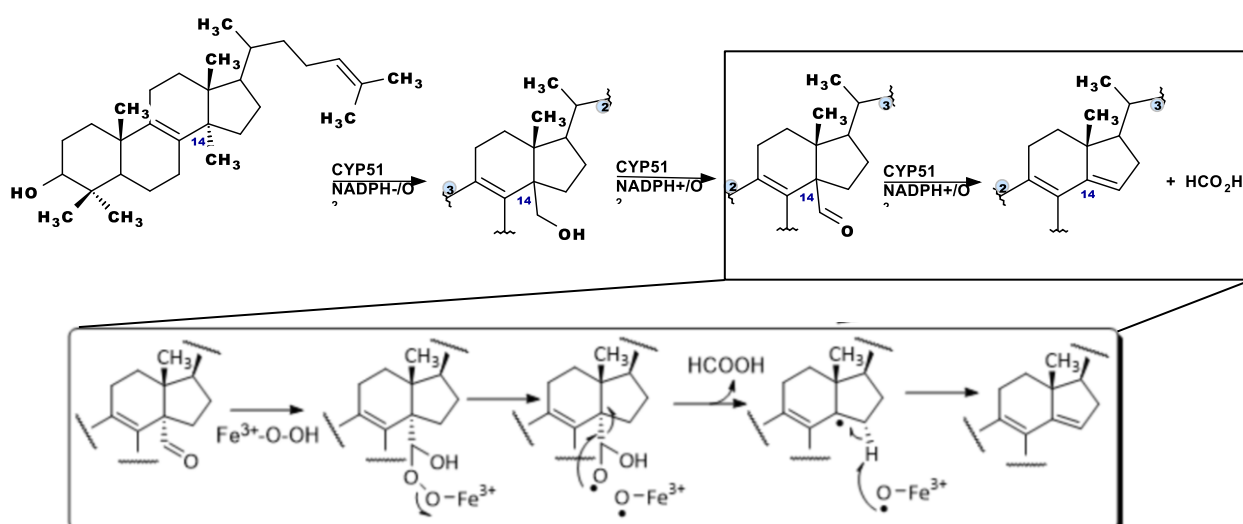


Figura 9: Etapas da reação de desmetilação do lanosterol no C14, catalisada pela CYP51 (WATERMAN & LEPESHEVA, 2005).

O grupo heme contém um íon Fe(II) complexado por nitrogênios pirrólicos de um macrociclo denominado porfirina, o qual encontra-se ligado à CYP51 através de uma ligação coordenada com o enxofre de um resíduo de cisteína; o íon Fe(II) também se coordena a uma molécula de água, (Figura 10) que é substituída pelo substrato quando ocorre a desmetilação (KADISH; SMITH; GUILARD, 2012; PODUST et al., 2004).

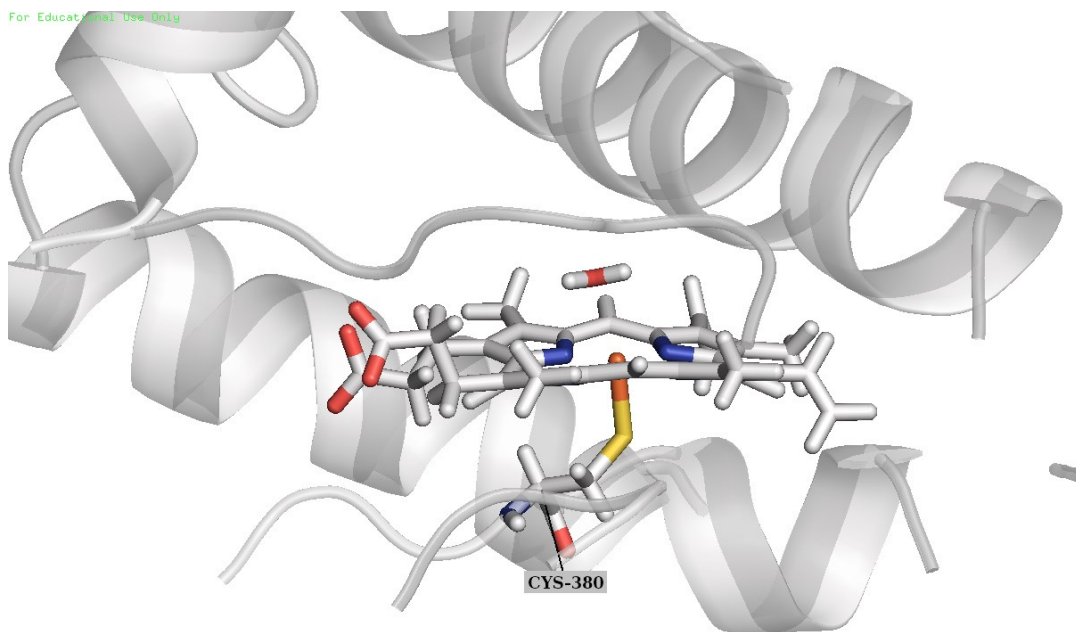


Figura 10: Representação do grupo heme ligado ao sítio ativo da CYP51 de *T. cruzi* (código no PDB: 46HO) interagindo com um resíduo de cisteína e com uma molécula de água, na ausência de um substrato. A enzima está na representação *cartoon* na cor cinza, o grupo heme e o resíduo de cisteína (CYS-380) estão representados na forma de bastões cinza.

Uma condição fundamental para que o processo de desmetilação ocorra é o posicionamento do substrato próximo ao heme da CYP51, pois ele auxilia nas reações do tipo redox que ocorrem durante a desmetilação (GENGERICH, 1990).

2.2.3 Compostos Azólicos com Ação anti-*T. cruzi*

Existem vários compostos que atuam inibindo diferentes etapas da biossíntese de ergosterol, os SBIs (do inglês, *Sterol Biosynthesis Inhibitors*), alguns apresentados na (Figura 7). Estatinas, bifosfonatos, inibidores da esqualeno sintase, alilaminas, inibidores da

oxidoesqualeno-ciclase, azóis e azasteróis foram estudadas no tratamento experimental da DC (FRANÇA et al., 2014).

No caso da CYP51, os principais compostos utilizados para a inibição dessa enzima são conhecidos como inibidores da desmetilação - DMI's (do inglês *demethylation inhibitors*), eles apresentam grupos azólicos e já têm atividade antifúngica bastante conhecida. Na CYP51, esses compostos heterocíclicos apresentam a capacidade de se complexar com o íon Fe(II) do grupo heme localizado no sítio ativo, impedindo assim que ele participe da reação de desmetilação (CHEN et al., 2010; LEPESHEVA et al., 2010).

Como os DMI azólicos atuam interrompendo a atividade da CYP51, (ALCAZAR-FUOLI, et al., 2008), são ativos por via oral e apresentam um amplo espectro de atividade antifúngica e baixa toxicidade, muitos triazóis, imidazóis, piridinas e pirimidinas têm sido estudados como inibidores da CYP51 de *T. cruzi* (PODUST; POULOS; WATERMAN, 2001a).

Testes indicam alta atividade dos DMI's contra o *T. cruzi*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e inclusive uma especificidade para a inibição da CYP51 do *T. cruzi* por vários azóis, inclusive o antifúngico posaconazol ($EC_{50} = 5$ nM), que apresenta uma boa atividade para a inibição da enzima (LEPESHEVA; VILLALTA; WATERMAN, 2011). A importância desses inibidores em estudos da ação anti-*T. cruzi* pode ser confirmada por esta classe ser a única que já alcançou triagens clínicas avançadas como candidatas a fármacos (GASCON, BERN, & PINAZO, 2010).

Infelizmente, resultados de ensaios clínicos em projetos importantes chamados CHAGASAZOL e STOP-CHAGAS não foram promissores. O CHAGASAZOL avaliou tanto o posaconazol quanto o ravuconazol (**10**) em monoterapia (CHATELAIN, 2015), e STOP-CHAGAS, estudou o uso de posaconazol associado e em monoterapia, mas não se mostraram promissores para tratar a DC crônica em humanos (MORILLO et al., 2017).

Por outro lado, azóis como o VFV (**11**), VNI (**12**) e VT-1161 (**13**) se mostraram seguros, altamente eficazes e seletivos para erradicar infecções por *T. cruzi* em modelos murinos (GUEDES-DA-SILVA et al., 2017; HOEKSTRA et al., 2016; LEPESHEVA et al., 2015).

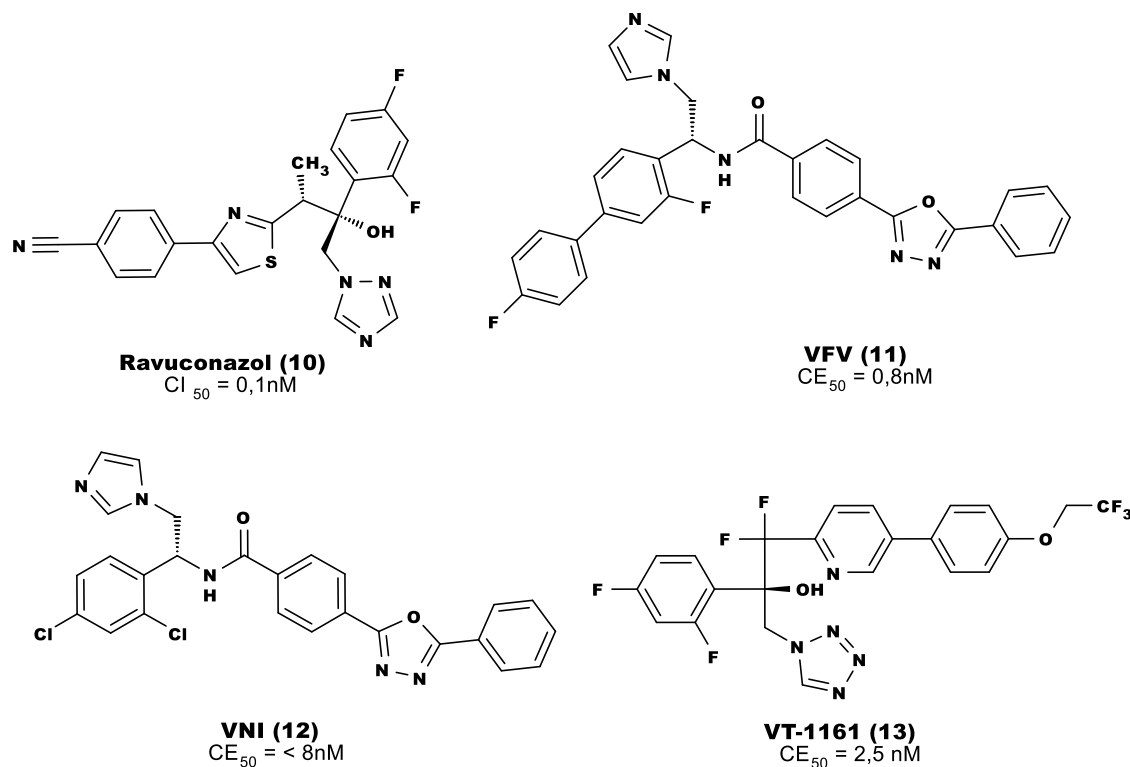


Figura 11: Estruturas e respectivas atividades do ravuconazol (10), VFV (11), VNI (12), VT-1161 (13), compostos heterocíclicos com atividade sobre a CYP51 de *T. cruzi* (atividades em amastigotas).

Urbina e colaboradores estudaram o composto (14) (Figura 12) em testes *in vitro* e *in vivo*, que apresentou boa atividade contra epimastigotas (concentração inibitória mínima - CIM=0,3-1,0 μM) e amastigotas (CIM=1,0 μM) do *T. cruzi*, além de apresentar um tempo de meia-vida longo e ausência de efeitos secundários tóxicos. Em uma avaliação da administração prolongada do composto em camundongos em ambas as fases da doença, se observou a sobrevivência e cura das cobaias em 80-100% dos casos (URBINA, et al., 2003).

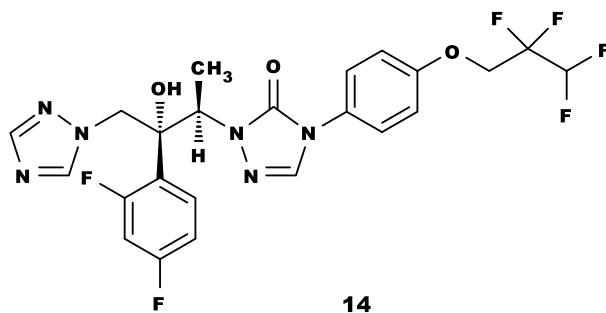


Figura 12: Composto (14), com atividade contra *T. cruzi* (URBINA, et al., 2003).

Andrini e colaboradores desenvolveram um estudo de triagem de alto rendimento, com uma série de compostos que possuem anéis heterocíclicos ligados à grupos com anéis lipofílicos sintetizados com diferentes espaçadores entre esses grupos, conforme apresentado na Figura 13. Esses compostos foram testados em ensaios *in vitro* com meio de cultura contendo formas tripomastigotas de *T. cruzi* e dois deles se destacaram demonstrando ser bons inibidores do processo de infecção por *T. cruzi* além de serem 160 vezes mais seletivos para o parasito. A estrutura cristalográfica da enzima CYP51 co-cristalizada com um dos inibidores que apresentou melhor atividade, corrobora a proposta de que, de fato, o mecanismo de atuação dos compostos seria pela inibição da CYP51 de *T. cruzi* (ANDRINE, et al., 2003).

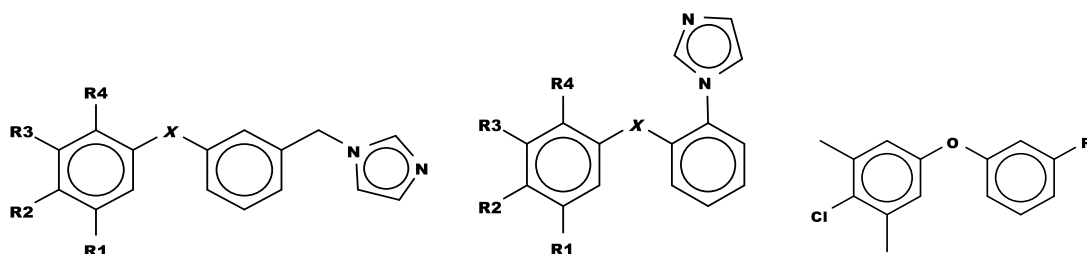


Figura 13: Estrutura genérica dos compostos heterocíclicos com atividade anti *T. cruzi*, estudados por Andrini e colaboradores.

2.2.4 Determinação da Inibição Enzimática

Como o grupo heme da CYP51 é parte fundamental para sua funcionalidade, como discutido anteriormente, o mecanismo de inibição da enzima consiste em promover a interação de compostos, como os DMI's que têm boa capacidade de complexação dos grupos heterocíclicos, com o íon Fe(II) do grupo heme, localizado na parte central da enzima. Quando tais compostos se coordenam ao íon Fe(II) da CYP51, eles impedem que o substrato se ligue ao sítio ativo da enzima, interrompendo assim sua conversão catalítica e, consequentemente a formação de esteróis (Figura 14).

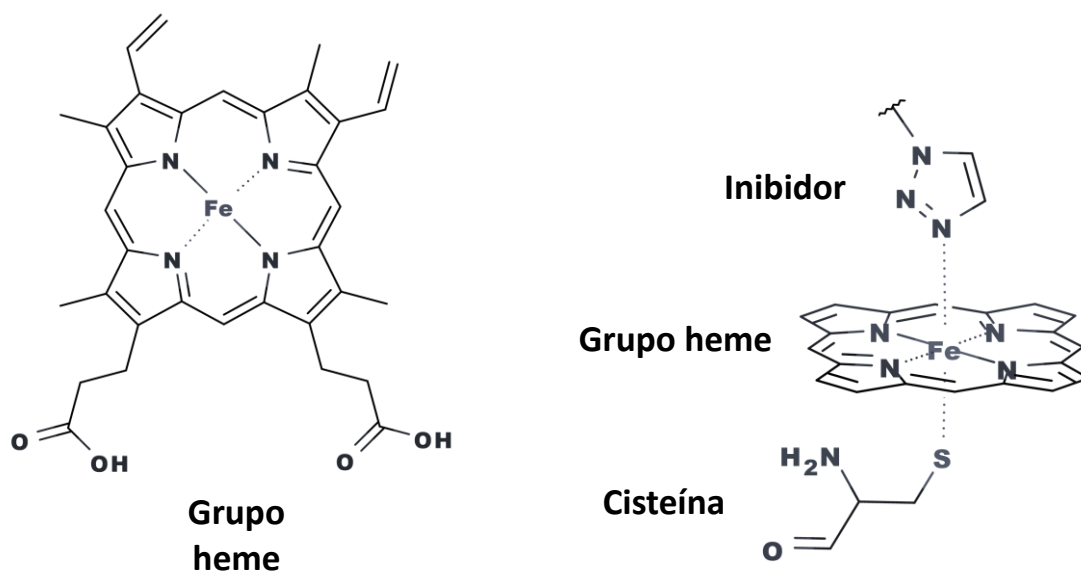


Figura 14: Representação da formação de um complexo octaédrico, através da coordenação do íon Fe^{II} com os nitrogênios do anel do grupo heme, o enxofre da cisteína e um inibidor proposto.

Uma metodologia que se mostrou bastante eficiente para a determinação da inibição da CYP51 foi proposta por Riley e colaboradores através de um procedimento de microtitulação rápida e de alto desempenho para avaliar o potencial inibitório de séries de compostos contra a CYP51 do parasito. Foi utilizado a *O*-desalquilação do substrato benziloximetilcianocumarina (**14**, BOMCC) ao produto fluorescente cianoidroxicumarina (**15**, CHC) (Fig. 15), que já era comumente utilizada para avaliar a atividade da enzima CYP3A4; nesse estudo observou-se também a atividade de *O*-desalquilação na presença de CYP51 de *T. cruzi* (RILEY et al., 2015).

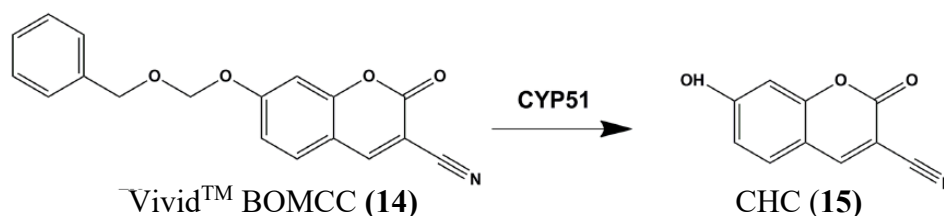


Figura 15: Reação de formação do composto fluorescente 3-ciano-7-hidroxycumarina (**15**, CHC) a partir do substrato Vidid™ BOMCC (**14**).

Para essa análise, utilizam-se bactossomos, que são membranas bacterianas contendo a enzima recombinante de interesse, para a avaliação da inibição enzimática da CYP51 de

T. cruzi através de ensaios de fluorescência como uma forma de determinação da atividade de compostos de atividade desconhecida (RILEY et al., 2015).

2.3. Modelagem molecular no desenvolvimento de novos fármacos

A modelagem molecular pode auxiliar o processo de desenvolvimento de novos compostos ativos, que é conhecido como desenvolvimento de fármacos auxiliado por computadores (*CADD*, do inglês *Computer-Aided Drug Design*). Ela é uma ferramenta de custo relativamente baixo e que pode encurtar o tempo total desse processo. É possível utilizá-la em diversas etapas do desenvolvimento de um fármaco, como na identificação de substâncias ativas (*hits*), otimização da sua atividade e melhora de perfis farmacocinético e farmacodinâmico (PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2019).

Uma estratégia que pode ser usada dentro do CADD para a busca por um novo fármaco é o planejamento de fármacos tendo como base a estrutura de um alvo específico (*SBDD*, do inglês *Structure Based Drug Design*). Alternativamente à SBDD, há também a estratégia LBDD (do inglês *Ligand Based Drug Design*), que se baseia na estrutura dos ligantes; inclusive, sempre que possível, é desejável usar mais de uma abordagem para chegar a conclusões consensuais, combinando as estratégias (SALDÍVAR-GONZÁLEZ; PRIETO-MARTÍNEZ; MEDINA-FRANCO, 2017). Para ambas as estratégias, existem programas gratuitos e de excelente qualidade para serem usados no planejamento ou mesmo na triagem virtual de substâncias (CORTÉS-RUIZ et al., 2018; GONZÁLEZ-MEDINA et al., 2017).

No caso da aplicação da estratégia SBDD às doenças parasitárias, o alvo escolhido precisa ser essencial para o parasito, ou seja, um alvo vital cuja inibição cause sua morte celular. Além disso, as proteínas-alvo devem ser susceptíveis à ação de compostos que se ligam com o alvo para alterar sua função da maneira pretendida, tendo assim sítios bem definidos com atributos físico-químicos adequados para permitir a previsão de locais de ligação de fármacos (SOSA et al., 2018).

O composto planejado precisa também apresentar uma seletividade para o alvo escolhido, ou seja, ou este não deve estar presente ou que não deve ser essencial para o hospedeiro, ou ainda o composto deve interagir preferencialmente no parasito (KAWASAKI; FREIRE, 2011).

2.3.1 Métodos de Modelagem Molecular

As técnicas da química computacional desempenham um papel cada vez mais significativo na busca de novos compostos com atividades biológicas específicas. O advento da computação de alto desempenho possibilitou o uso de experimentos virtuais como ferramenta de estudo e de previsões para experimentos de laboratório (AMINPOUR; MONTEMAGNO; TUSZYNSKI, 2019).

A modelagem molecular pode contribuir em todo o processo do planejamento racional de compostos candidatos a ensaios farmacológicos e testes clínicos, desde a descoberta de um protótipo até sua otimização, em termos de afinidade, especificidade, toxicidade e biodisponibilidade (OPERA, 2005; SANT'ANNA; C. M. R., 2009).

Além disso, a modelagem permite indicar teoricamente, dentre vários ligantes, quais teriam mais provavelmente atividade sobre determinado biorreceptor, sendo uma ferramenta para a triagem virtual (SCOTTI et al., 2007). Dessa maneira, as pesquisas para a síntese de compostos bioativos, testes *in vitro* e *in vivo* podem ser feitos apenas com aqueles que possuam melhor atividade prevista, buscando-se assim economia de tempo e recursos.

Podemos dividir os métodos de modelagem molecular em dois grupos genéricos: os métodos clássicos, que abrangem a mecânica molecular e a dinâmica molecular; e os métodos quânticos, que incluem os métodos *ab initio*, Teoria Funcional da Densidade e os semi-empíricos. Na escolha do método mais adequado, deve-se levar em consideração quais propriedades serão avaliadas, a precisão desejada e a capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos (SANT'ANNA, 2009) (AMINPOUR; MONTEMAGNO; TUSZYNSKI, 2019).

Uma investigação atomística detalhada de um sistema biológico onde reações químicas ocorram requer o conhecimento de sua estrutura eletrônica. A mecânica quântica pode tratar, dentre outros casos, de reações enzimáticas que envolvem a formação e a quebra de ligações ou a migração de elétrons. No entanto, em razão dos métodos *ab initio* serem computacionalmente bastante exigentes, os sistemas biológicos são particularmente desafiadores para eles por causa dos tamanhos desses sistemas (POLLACK, 2015).

Uma alternativa para contornar as limitações de métodos *ab initio* para cálculos de sistemas grandes é a possibilidade de resoluções híbridas de mecânica quântica / mecânica molecular (MQ / MM), que expandem significativamente o escopo dos cálculos da mecânica quântica para esses sistemas, dividindo o problema em duas partes, cada uma tratada com diferentes métodos computacionais. A parte do sistema que participa diretamente de uma

determinada reação química, como o sítio ativo, substratos e resíduos de aminoácidos diretamente participantes da interação é tratada com uma simulação de nível MQ. A parte restante da enzima, que não participa diretamente da reação e normalmente contém um número muito maior de átomos, é simulada por meio de mecânica molecular com um campo de força clássico (AMINPOUR; MONTEMAGNO; TUSZYNSKI, 2019).

Macromoléculas, como as proteínas, não atuam como entidades estáticas e isoladas, pois participam de numerosas interações com outras espécies de maneira e reconhecimento altamente específicos. A ligação entre dois sistemas interagentes tem componentes entálpicos (ΔH) e entrópicos (ΔS) e, como qualquer processo de equilíbrio químico, está associada à energia livre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Assim, para que se compreenda as forças que promovem o reconhecimento e a interação, é necessário que haja uma descrição detalhada da termodinâmica de interação, e uma correlação dos parâmetros termodinâmicos com as estruturas dos componentes da interação (BRONOWSKA, 2011).

É importante ressaltar que a modelagem molecular, para os fins práticos da Química Medicinal, deve estar sempre associada a resultados experimentais, isso porque é necessário que haja o trabalho de uma equipe multidisciplinar, em que os métodos computacionais serão empregados de modo integrado para facilitar e otimizar todo o processo de desenvolvimento de compostos bioativos, tendo em vista a grande complexidade de todo esse processo (SANT'ANNA; C. M. R., 2009).

2.3.1.1. *Docagem molecular*

A modelagem molecular utiliza métodos matemáticos para o cálculo de propriedades moleculares com a finalidade de compreensão e previsão do comportamento de sistemas moleculares, utilizando para tal computadores e programas na aplicação de tais métodos (SANT'ANNA, 2002). Estes métodos usam algoritmos que efetuam a minimização da energia a partir de uma geometria inicial do sistema molecular, os quais são bastante eficientes no caso de estruturas isoladas. O problema é bem mais difícil no caso de sistemas que envolvem sistemas maiores, como é o caso de complexos ligante/proteína. Para estes casos, um procedimento que tem sido amplamente usado é a docagem molecular, também chamada atracamento, ancoramento, ancoragem, acoplamento, entre outros.

A docagem molecular é bastante utilizada dentro da estratégia SBDD, pois se trata de uma técnica que permite avaliar as interações promissoras entre possíveis inibidores e sítios de interação de alvos conhecidos (geralmente enzimas e receptores celulares). Ela

também possibilita a previsão das orientações e conformações (poses) de moléculas (ligantes) mediante suas interações com sítios de um biorreceptor, formando assim complexos estáveis ligante-biorreceptor (KHAMIS; GOMAA; AHMED, 2015).

Resumidamente, na docagem molecular, os ligantes candidatos são primeiro posicionados nos sítios ativos predefinidos da estrutura alvo e possíveis conformações e orientações compatíveis com os resíduos de aminoácido dessa vizinhança são geradas de acordo com um algoritmo adequado, gerando as poses. Em seguida, esses complexos são classificados para que sejam definidas as interações ligante-alvo mais importantes, usando-se funções de pontuação, geralmente baseadas em campo de força ou modelos empíricos (FRADERA; BABAOGLU, 2017). Essa classificação pode ser obtida de várias maneiras, calculando-se, por exemplo, quantidades que se aproximam da energia livre de ligação para cada pose de ligante, mas com muitas simplificações, como o uso de uma estrutura alvo rígida (ou semirrígida) e previsões simplistas de entropia, entre outros. Entretanto, mesmo com tais aproximações, algumas funções de pontuação são capazes em alguns casos de funcionar muito bem quando comparadas a procedimentos que são muito mais exigentes computacionalmente (CASBARRA; PROCACCI, 2021).

As poses são geradas através de algoritmos de busca altamente eficientes onde se considera, em geral, o ligante como flexível e a proteína como rígida (VERDONK et al., 2003), sendo que muitos desses algoritmos empregam técnicas de inteligência artificial, como os algoritmos genéticos (AG), que são bastante eficientes na resolução de problemas com grande número de variáveis (LINDEN, 2006). O AG otimiza as soluções encontradas em um processo contínuo, sendo considerado um dos melhores algoritmos de otimização estocástica, encontrando soluções próximas às encontradas, por exemplo, na cristalografia de raios-X (DA COSTA FILHO; POPPI, 1999) (MORRIS et al., 1998).

Um AG é criado em 5 etapas: a codificação das variáveis, a criação da população inicial, a avaliação da resposta (aptidão), o cruzamento e a mutação. Inicialmente, são geradas aleatoriamente possíveis soluções, que descrevem como o ligante interage com a proteína, definidas por valores que descrevem sua translação, orientação e conformação na proteína. Com essas soluções geradas, tem-se a população inicial, que será mais diversificada se houver um número grande de soluções (REEVES, 1995).

A pontuação de aptidão é calculada a partir de funções específicas, que são modelos matemáticos usados para quantificar a interação através da avaliação da energia de ligação entre o ligante e o biorreceptor, por exemplo, para que seja possível ranqueá-las (LI; FU; ZHANG, 2019). Algumas soluções, selecionadas ao acaso, passarão por mutações

(alterações aleatórias) ou cruzamentos (permutas das informações entre indivíduos da população inicial). Por fim, as soluções da nova população são classificadas por sua pontuação de aptidão e, se houver soluções melhores do que as da população original, essas soluções serão substituídas (DA COSTA FILHO; POPPI, 1999; JONES et al., 1997).

Existem funções de escore baseadas em campo de força (*force-field-based scoring functions*), empíricas (*empirical scoring functions*) e baseadas em conhecimentos (*knowledge-based scoring*). Nas funções de pontuação baseadas em campo de força, as interações ligante/proteína são descritas utilizando termos de energia eletrostática e de van der Waals semelhantes aos usados na mecânica molecular e constituem a soma da energia interna do ligante e energia de interação entre o receptor e o ligante, que surge de interações intermoleculares envolvidas no reconhecimento molecular (KITCHEN et al., 2004).

As funções de pontuação empíricas reproduzem dados experimentais, como a energia de interação, como uma soma de várias funções parametrizadas, baseadas na aproximação de que a energia de interação pode ser representada por uma soma de termos individuais não correlacionados. Essas funções são mais simples do que as funções de campo de força, entretanto são dependentes de conjuntos de dados moleculares e por isso não podem ser recombinados facilmente em uma nova função de aptidão (KITCHEN et al., 2004).

Por último, as funções de escore baseadas em conhecimentos foram feitas para reproduzir estruturas experimentais ao invés de energias de interação. Os complexos ligante/proteína são modelados usando potenciais de interação atômica relativamente simples. Entretanto, sua derivação é baseada na informação codificada implicitamente em conjuntos limitados de complexos ligante/proteína. (KITCHEN et al., 2004)

Os dois fatores que dificultam a descrição das interações entre o bioligante e a proteína são a flexibilidade das estruturas da molécula do bioligante e da proteína, pois estes sofrem mudanças conformacionais durante a interação, e as moléculas de água que cercam tanto o bioligante como o sítio de interação da proteína e que devem ser deslocadas quando as duas moléculas vão interagir. Esses parâmetros podem ser incluídos no modelo, mas representam um custo computacional adicional que deverá ser considerado na análise da relação custo/benefício do modelo disponível que será adotado (SANT'ANNA; C. M. R., 2009).

Um bom programa de docagem deve ter a habilidade de reproduzir o modo de interação de ligantes identificado experimentalmente, geralmente por cristalografia de raios-X. Para testar isso, é feito um procedimento de redocagem em que o ligante é removido da estrutura cristalográfica do complexo ligante-proteína, e novamente inserido no sítio ativo

utilizando-se o programa de docagem. Faz-se então uma comparação entre os modos de ligação experimental e de docagem, determinando-se a raiz do desvio médio quadrático (RMSD, do inglês *root mean square deviation*), sendo que a predição do modo de interação é considerada bem-sucedida quando o RMSD está abaixo de um valor, usualmente de 2,0 Å (VERDONK et al., 2003).

2.3.1.2. Método semi-empírico

Os métodos quânticos semi-empíricos são uma variação simplificada da teoria da estrutura eletrônica, envolvendo aproximações e parâmetros que limitam a sua precisão, mas que possibilitam que grandes sistemas moleculares sejam modelados de maneira eficiente (THIEL, 2014). Como exemplo de métodos semi-empíricos, podemos citar o MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*) (DEWAR; THIEL, 1977), AM1 (Austin Model 1) (DEWAR et al., 1985), PM3 (Parametric Method 3) (STEWART, 1989), MNDO/d (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*, incluindo orbitais d) (THIEL, W.VOITYUK, 1992), PM6 (Parametric Method 6) (STEWART, 2007) e PM7 (Parametric Method 7) (STEWART, 2013b).

Os métodos semi-empíricos podem ser derivados das teorias de Hartree-Fock ou do funcional da densidade, usando aproximações sistemáticas e levando à esquemas computacionais eficientes que são mais rápidos do que cálculos *ab initio*. Tal eficiência numérica, em combinação com modernas instalações computacionais e algoritmos de escalonamento linear, permite a aplicação de métodos semi-empíricos a sistemas moleculares muito grandes com extensa amostragem conformacional (CHRISTENSEN et al., 2016).

No método semi-empírico, dentro do formalismo de Hartree-Fock, os métodos semi-empíricos utilizam algumas aproximações na resolução das equações e também introduzem parâmetros empíricos com finalidade de evitar o cálculo de algumas integrais da equação proposta por E. Schrödinger, considerando um tratamento apenas dos elétrons de valência e os elétrons centrais por meio de uma carga nuclear reduzida (assumindo uma blindagem completa) e de um potencial central efetivo no nível dos orbitais moleculares.

Para compensar os erros gerados pelas aproximações, são incorporados parâmetros empíricos no formalismo dos cálculos e calibrados contra os dados de referência experimentais ou teóricos confiáveis (ALCÁCER, 2007; THIEL, 2014). Esse artifício foi desenvolvido principalmente para reduzir o tempo de cálculo e a demanda da capacidade

computacional, permitindo assim, cálculos quânticos de sistemas constituídos por muitos átomos, como é o caso dos sistemas de interesse em estudos de compostos bioativos, permitindo a obtenção de propriedades termodinâmicas, cinéticas, cálculos de superfície de energia potencial, etc (MORGON; COUTINHO, 2007; SANTANNA, 2009).

Nesses cálculos, as equações de Hartree-Fock são resolvidas de forma autoconsistente, usando um conjunto de base mínimo de valência, formado por funções do tipo Slater (STO - *Slater type orbitals*) e construindo orbitais moleculares a partir do método LCAO (*Linear Combination of Atomic Orbitals*), tendo como base a teoria dos orbitais moleculares (MORGON; COUTINHO, 2007).

O programa MOPAC (Molecular Orbital Package), utilizado nesse projeto, disponibiliza a maioria dos avanços nos métodos semi-empíricos, como os Hamiltonianos PM6 (STEWART, 2007), suas modificações e PM7 (STEWART, 2013b), disponíveis na versão atual, além dos mais antigos MNDO, MINDO/3, AM1 e PM3. Os Hamiltonianos são utilizados na parte eletrônica do cálculo, para se obter orbitais moleculares, a energia que é convertida no calor de formação e sua derivada. Fazendo uso destes resultados, o programa pode calcular o espectro vibracional, quantidades termodinâmicas, efeitos de substituição isotópica, além de constantes de força de ligação para moléculas, radicais, íons e polímeros (STEWART, 1999).

Os métodos PM6 e PM7, utilizados nesse projeto, podem ser usados para sistemas que apresentem metais de transição, o que é um avanço quando comparados aos demais métodos, já que os metais de transição ofereciam alguns obstáculos, como por exemplo, a pouca quantidade de dados de referência, o fato da maioria deles serem compostos de camada aberta, além de ser mais difícil a resolução de equações do método auto consistente para esses metais (MORGON; COUTINHO, 2007; STEWART, 2013b).

3. JUSTIFICATIVA

A pesquisa por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas se justifica porque: (i) trata-se de uma enfermidade que causa sintomas graves principalmente na fase crônica da doença, causando comorbidades e mortes; (ii) não existe uma vacina para prevenção da infecção e há somente uma opção de tratamento no Brasil, o fármaco benzonidazol, que é pouco eficaz na fase crônica; (iii) trata-se de uma doença negligenciada, havendo pouco interesse e investimento por parte da indústria farmacêutica e dos governos para o desenvolvimento de novas opções de tratamento.

Sendo assim, a pesquisa aplicada tanto para a elucidação de mecanismos de ação contra o parasito causador da doença de Chagas, quanto para a descoberta de novos compostos bioativos, é de grande relevância para a descoberta de novos candidatos a fármacos para o tratamento dessa doença.

4. OBJETIVOS

A finalidade principal deste trabalho é o uso de métodos computacionais para auxiliar o planejamento racional de compostos triazólicos inibidores da CYP51 do *T. cruzi* como novos candidatos para o tratamento da doença de Chagas. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Otimização do modelo de previsão de atividade utilizado para o planejamento dos compostos estudados (CASTRO, 2016), incluindo a utilização do método semi-empírico PM7 para o cálculo de entalpia de interação da reação de inibição enzimática;
- Síntese e caracterização dos derivados da piperina planejados para atuarem no alvo estudado;
- Avaliação biológica *in vitro* da atividade dos compostos nas formas evolutivas do *T. cruzi*, citotoxicidade e avaliação da inibição enzimática da CYP51 pelos derivados heterocíclicos.
- Avaliar as diferenças de interação entre os compostos com os alvos enzimáticos do parasito e de *H. Sapiens* para que seja possível prever possíveis efeitos tóxicos dos derivados no organismo do hospedeiro e, caso necessário, propor modificações estruturais que aumentem a seletividade para a CYP51 do *T. cruzi*.

5. METODOLOGIA

5.1. Modelagem Molecular

5.1.1 Estrutura da Enzima

Para o estudo de interação dos compostos heterocíclicos com a enzima CYP51 de *T. cruzi* e humana, foi necessária, primeiramente, a obtenção de estruturas tridimensionais da enzima, o que foi conseguido através do banco de estruturas cristalográficas de proteínas, de domínio público, o *Protein Data Bank* (PDB, <http://www.rcsb.org/>). As enzimas selecionadas foram as de código 4H6O (ANDRIANI et al., 2013) de *T. cruzi* e 6UEZ (HARGROVE et al., 2020a) de *H. sapiens*.

5.1.2 Construção dos Ligantes

Neste trabalho, utilizaremos três séries de ligantes, a **série A** corresponde aos imidazóis estudados por Andriani e colaboradores (2013) (ANDRIANI et al., 2013)), a **série B** referente às 1,2,4-triazolo-3-tionas derivadas da piperina sintetizados por Castro (2016) (CASTRO, 2016) e a **série C**, de compostos heterocíclicos mesoiônicos (FRAUCHES-SANTOS, 2017). Todos os compostos foram construídos e tiveram suas energias minimizadas utilizando o método quântico de aproximação semi-empírica PM6 (STEWART, 2013b) do programa Spartan'14 (Wavefunction, Inc.).

5.1.3 Docagem Molecular

Os estudos de docagem molecular foram feitos no programa GOLD versões 5.4 e 5.6 (CCDC) que contém 4 funções de pontuação: *ASP* (MOOIJ; VERDONK, 2005), *ChemScore* (ELDRIDGE et al., 1997), *Goldscore* (JONES et al., 1997) e *ChemPLP* (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009), que é a atual função padrão do programa. A protonação dos resíduos das proteínas foi feita através do próprio programa, assumindo-se pH neutro.

Durante a docagem são geradas diversas geometrias (poses) para cada sistema ligante-proteína por meio de um algoritmo genético, que recebem uma classificação de acordo com a pontuação (ou score) de aptidão, um valor adimensional que quanto maior for, melhor será a interação proteína-ligante prevista. Foi usado o procedimento padrão de

docagem no GOLD, incluindo a apresentação das 10 melhores soluções para cada ligante ao final da docagem.

Usualmente, em um estudo de docagem molecular, é recomendável fazer uma redocagem inicialmente, que tem por objetivo avaliar e determinar qual a função de pontuação é a mais adequada para analisar as interações dos ligantes com o sítio de interação na proteína que se deseja estudar. Neste caso, como a função de pontuação mais adequada, ChemPLP (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009), já havia sido escolhida em estudos feitos anteriormente (CASTRO, 2016) e era necessário fazer uma comparação com esses resultados anteriores, adotamos a mesma função de pontuação e a etapa de redocagem não foi refeita.

A docagem molecular foi feita em triplicata com a função ChemPLP para todos os compostos estudados, utilizando-se a enzima de *T. cruzi* (CYP51_{Tc}) com código 4H6O e a de *Homo sapiens* (CYP51_{Hs}) com código 6UEZ depositadas no PDB (Protein Data Bank), com o objetivo de se obter informações sobre seletividade para interação preferencial pela enzima do parasito. O cátion ferro do grupo heme foi utilizado como centro para o raio máximo de interação de 10 Å durante a docagem. Deve aqui ser destacado que o programa GOLD usa os parâmetros específicos de interação ferro-ligantes no contexto de proteínas contendo o grupo heme descritos por Kirton e colaboradores (KIRTON et al., 2005). Esta parametrização estendida está disponível para o ajuste fino de interações envolvendo o metal, incluindo as interações metal-ligante que podem ser tratadas especificamente, dependendo dos contatos do metal.

Durante a docagem, geralmente removem-se as moléculas de água presentes na estrutura da enzima, mas tendo em vista que no sítio ativo da enzima CYP51_{Hs} 6UEZ havia uma molécula de água próximo ao grupo heme, que poderia participar da interação com os derivados durante a docagem, foi feita uma análise adicional, mantendo-se essa molécula presente e com movimentação livre durante a docagem (opção *toggle* no GOLD). Já no sítio ativo da CYP51_{Tc} (4H6O) não havia nenhuma molécula presente que pudesse ser mantida durante a docagem.

As poses de cada ligante foram selecionadas tendo como critério a pontuação na docagem e também a distância entre o nitrogênio triazólico dos compostos e o íon ferro do grupo heme, visto que a complexação do íon ferro com o composto heterocíclico é fundamental para promover a inibição da CYP51.

A partir da melhor pose de cada composto nos complexos enzima/ligante foram selecionados com o programa PyMOL versão acadêmica (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC), o ligante, o grupo heme e todos os aminoácidos com ao menos um átomo localizado dentro de um raio de 6 Å, tendo como centro o grupo heme. O recorte foi feito para diminuir o tamanho da estrutura com a qual seriam feitos os cálculos quânticos seguintes, incluindo apenas a parte da estrutura que interage diretamente com o ligante, diminuindo assim o tempo de duração desses cálculos.

Em cálculos quânticos, a carga total do sistema deve ser definida para se chegar a resultados corretos. Como foi utilizado um recorte do sítio ativo único para todos os complexos com os ligantes, as cargas do recorte da enzima eram as mesmas. Foi necessário redefinir a carga final apenas dos complexos em que os ligantes não eram neutros, o que pode ser feito com auxílio da palavra-chave CHARGES do programa MOPAC 2016 [Stewart Computational Chemistry].

5.1.4 Cálculo de Entalpia de Interação CYP51-inibidor

Os cálculos realizados para otimização e determinação da entalpia de interação dos complexos CYP51-ligante para os compostos imidazólicos (ANDRIANI et al., 2013) usados na construção do modelo de previsão de atividade (CASTRO, 2016), foram refeitos desta vez com o método semi-empírico PM7 do programa MOPAC 2016 [Stewart Computational Chemistry]. Duas mudanças existem no método PM7 em relação ao hamiltoniano anterior, uma para melhorar a descrição das interações não covalentes, essenciais em nosso estudo, e dois pequenos erros no formalismo NDDO foram retificados (STEWART, 2013a). Erros médios na geometria e ΔH_f foram reduzidos em relação ao PM6; para sistemas orgânicos em fase gasosa simples, o erro médio em comprimentos de ligação diminuiu em cerca de 5% e em ΔH_f diminuiu em cerca de 10% (STEWART, 2013a).

Além disso, cálculos foram feitos para novos compostos mesoiônicos (FRAUCHES-SANTOS, 2017) com o mesmo método PM6 com a finalidade de terem suas atividades teóricas determinadas também, pelo modelo já existente.

Seguindo a metodologia para minimização de energia descrita em trabalhos anteriores de nosso grupo, (CASTRO, 2016; ROCHA JR., 2009), primeiramente foi feita uma otimização das coordenadas dos hidrogênios da estrutura usando-se as palavras-chave “NOOPT” e “OPT-H”. Em seguida, a otimização é feita para todos os átomos da estrutura, inclusive do ligante e do grupo heme, com exceção das ligações peptídicas da proteína, que

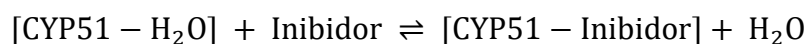
foram mantidas fixas no espaço para preservar a estrutura geral do sítio recortado da estrutura completa da enzima.

Os cálculos foram feitos considerando-se como meio ao redor do conjunto de átomos selecionados o interior de proteínas, visto que resultados anteriores apontaram esta opção como sendo a mais adequada para este sistema (CASTRO, 2016). Para isso, foi usada a aproximação de contínuo, através da palavra-chave EPS=4, referente à constante dielétrica que melhor descreve esse meio.

Para o cálculo de entalpia de interação, consideramos como estado inicial da reação, conforme representada no *Esquema 1*, o momento em que o íon Fe(II) presente no grupo heme da enzima CYP51 esteja também coordenado com um resíduo de cisteína e com uma molécula de água, que foi incluída na estrutura manualmente para a realização do cálculo (PODUST; POULOS; WATERMAN, 2001b) (PODUST, POULOS, & WATERMAN, 2001). É comum que em estruturas cristalográficas “vazias” da CYP51 haja uma molécula de água coordenada ao íon Fe(II).

No estado final, os inibidores irão interagir com a enzima na região do sítio ativo, próximo ao íon Fe(II), deslocando assim a molécula de água e formando um novo complexo da enzima com o ligante. Essa estratégia permitiu a igualdade do número de coordenações no íon Fe(II) durante a reação, garantindo uma reação isodêmica, ou seja, em que o tipo de ligações químicas quebradas nos reagentes é o mesmo que o tipo de ligações formadas nos produtos da reação.

Dessa forma, a entalpia de cada uma dessas etapas foi calculada separadamente para que a entalpia de interação pudesse ser calculada de acordo com **Equação 1**, com as entalpias de formação de cada sistema.



Esquema 1: Reação de interação de inibidores com a CYP51

$$\Delta H_{\text{int}} = [\Delta H_{(\text{E-I})} + \Delta H_{(\text{H}_2\text{O})}] - [\Delta H_{(\text{E-H}_2\text{O})} + \Delta H_{(\text{I})}]$$

Equação 1

Na **Equação 1**, ΔH_{int} é a entalpia envolvida na interação do inibidor com a enzima; $\Delta H_{(\text{E-I})}$ é a entalpia de formação do complexo enzima-inibidor; $\Delta H_{(\text{H}_2\text{O})}$ é a entalpia de formação da água; $\Delta H_{(\text{E-H}_2\text{O})}$ é a entalpia de formação do complexo enzima-molécula de água e $\Delta H_{(\text{I})}$ é a entalpia de formação do inibidor.

5.1.5 Modelo Teórico para a Predição de Atividade Inibitória da CYP51

Neste trabalho construímos um modelo teórico baseado na proposta desenvolvida em trabalhos anteriores, porém com um método de cálculo semi-empírico diferente, o método PM7 ao invés do PM6, para a determinação da entalpia de interação dos sistemas enzima-ligante, conforme discutido no item 5.1.4. Tanto o modelo original quanto o atual tiveram seu desenvolvimento baseado em valores experimentais de CE_{50} de compostos imidazólicos e dados teóricos calculados para criar uma função empírica capaz de determinar a atividade teórica de inibição da CYP51 de compostos de atividade desconhecida.

Essa metodologia tem como base as propostas desenvolvidas por Wang e colaboradores, no qual foi construído um modelo empírico para previsão da energia livre de interação de análogos de 1,2-diacilglicerol sintéticos e lactonas capazes de se ligar ao sítio ativo da proteína quinase C, utilizando valores experimentais de K_i e dados teóricos de entalpia de interação calculada pelo método semi-empírico PM3, além de termos entrópicos e de solubilidade (WANG et al., 1994).

A proposta se mostrou bastante versátil. Posteriormente, foi adaptada por Oliveira e colaboradores no estudo de inibidores da fosfodiesterase 4 utilizando valores experimentais de CI_{50} e dados teóricos de entalpia de interação calculada pelo método PM3, de entropia (número de ligações com perda de liberdade devido à interação com o sítio ativo) e de energia de solvatação calculada pelo método SM5.4 (CRAMER; TRUHLAR, 1992) (OLIVEIRA et al., 2006). Também foi usado no trabalho de Rocha na predição da atividade de inibidores da esterol 14 α -desmetilase (CYP51) (ROCHA JR., 2009; ROCHA, 2014, 2019).

Colodette e colaboradores ampliaram a aplicação do método para estudos de triagem virtual, usando o mesmo procedimento para gerar uma função de previsão de energia livre de Gibbs que foi aplicada em um projeto de triagem virtual com a quimioteca do LASSBio-UFRJ, levando à identificação de novos inibidores de fosfatidilinositol-4-quinases III beta (PI4KIII β) (COLODETTE et al., 2020)

Baseados na mesma metodologia, construímos um modelo de previsão de atividade inibitória da CYP51_{7c} por compostos heterocíclicos utilizando valores de CE_{50} de inibidores da literatura (ANDRIANI et al., 2013) e dados de entalpia de interação calculada pelo método PM6, o termo de variação de entropia torcional gerado durante a docagem com a

função ChemPLP do programa GOLD 5.2 e a energia de solvatação obtida com o método SM5.4 (CASTRO, 2016).

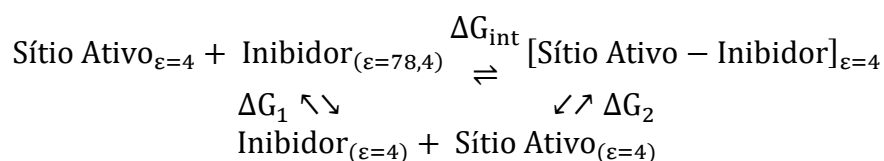
Esses modelos empíricos se baseiam no conceito de que é a energia livre de Gibbs de interação (ΔG_{int}) que determina a espontaneidade da formação de um complexo proteína-ligante, considerando que haja a interação de uma proteína como, por exemplo, uma enzima, com um ligante, em sistemas com número de partículas, temperatura e pressão constantes. Quanto mais negativo for o valor de ΔG_{int} , mais favorável será a formação do complexo e, portanto, mais efetivo será o ligante na modulação do alvo proteico como, por exemplo, a inibição de enzimas (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

O ΔG_{int} é constituído por termos entálpicos e entrópicos, de acordo com a equação 2, onde o ΔH_{int} é a entalpia de interação, T é a temperatura absoluta do sistema e ΔS_{int} é a entropia de interação.

$$\Delta G_{\text{int}} = \Delta H_{\text{int}} - T\Delta S_{\text{int}}$$

Equação 2

O processo da interação dos inibidores com a CYP51 pode ser conceitualmente descrito por um ciclo termodinâmico, dividido em duas etapas: inicialmente, há o transporte do inibidor da fase aquosa (descrita em nosso modelo como um contínuo com a constante dielétrica da água, $\epsilon=78,4$) para o interior da enzima (contínuo com $\epsilon=4$) (LI et al., 2013). Posteriormente, ocorre de fato a interação do inibidor com o sítio ativo da CYP51, conforme a representação no **Error! Reference source not found.**, que mostra assim que ΔG_{int} é o somatório de ΔG_1 e ΔG_2 (**Equação 3**).



$$\Delta G_{\text{int}} = \Delta G_1 + \Delta G_2$$

Equação 3

Variações de energia livre são relacionadas com constantes de equilíbrio pela equação $\Delta G^0 = -RT \ln K$. K é chamada constante do equilíbrio de associação na formação

do complexo ligante-proteína. Experimentalmente, no caso de inibidores enzimáticos, é mais comum que as constantes usadas sejam constantes de dissociação, expressas como K_i , as chamadas constantes de inibição. No caso de outras medidas de atividade, tais como CE_{50} , CI_{50} , etc, sendo estas linearmente relacionadas com K_i (como na equação de Cheng-Prusoff (YUNG-CHI; PRUSOFF, 1973), equações semelhantes podem ser propostas relacionando-as com ΔG_{int} . Por exemplo, no caso da CE_{50} :

$$\Delta G_{\text{int}} = RT \ln CE_{50} = 2,303RT \log CE_{50}$$

Equação 4

Então, é possível obter a Equação 5, substituindo **Equação 3** na Equação 4.

$$2,303RT \log CE_{50} = \Delta G_1 + \Delta G_2$$

Equação 5

Os dados de CE_{50} usados nesse novo modelo foram os mesmos utilizados no modelo construído anteriormente, a fim de possibilitar uma comparação dos métodos de cálculo; eles correspondem a dados de atividade de compostos imidazólicos estudados no trabalho de Andriani e colaboradores para a inibição da CYP51_{Tc} (ANDRIANI et al., 2013).

Para o modelo estudado, o termo ΔG_1 é relacionado com a solubilidade de cada inibidor estudado, expressa pela energia de solvatação (ΔG_{solv}) calculada pela função SM5.4 (CHAMBERS et al., 1996) do programa Spartan'14 (Wavefunction, Inc.). Tal relação pode ser feita pois o ΔG_1 corresponde à energia livre necessária para o transporte do inibidor da fase aquosa para a fase lipídica (interior da enzima), de maneira que a facilidade com que essa transferência ocorre, tem relação com a hidrofobicidade do inibidor, que por sua vez, é uma função da solubilidade do mesmo em fase aquosa (CASTRO, 2016).

O logaritmo da atividade pode apresentar uma dependência quadrática do termo ΔG_{solv} (WANG et al., 1994). Isso se deve ao fato de que no contexto de uma enzima de membrana, valores extremos de solubilidade são prejudiciais para a atividade, visto que valores muito positivos indicariam que a passagem do inibidor do meio aquoso para o interior da membrana não seria favorecida e, por outro lado, valores muito negativos para esse termo poderiam fazer com que o inibidor interagisse muito bem com a membrana ao invés de interagir com a enzima.

O termo ΔG_2 é composto por dois termos, um entálpico (ΔH_2) e um entrópico ($-T\Delta S_2$). Os valores de ΔH_2 incluídos para a construção do modelo foram determinados de acordo com o item 5.1.4 (ΔH_{int}) e o termo $-T\Delta S_2$ corresponde às variações de entropia dos inibidores provocadas pela interação com o sítio ativo da CYP51. Essa variação de entropia é resultante da perda da liberdade translacional, rotacional e conformacional quando um ligante se insere no sítio de interação da enzima, comparado ao estado inicial do ligante em solução aquosa (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003). De acordo com a termodinâmica estatística clássica, a entropia translacional de uma molécula é uma função de sua massa molecular e a entropia rotacional de uma molécula é uma função de seu momento de inércia. Ambos os termos entrópicos são combinados na chamada entropia de corpo rígido. Para moléculas de massas e volumes similares, como são as moléculas usadas no desenvolvimento do modelo, esse termo pode ser considerado aproximadamente constante e, portanto, é necessário apenas determinar a variação de entropia conformacional. Em nosso modelo, ela é representada pela energia torcional (ΔE_{tor}) calculada pela função *ChemPLP* do programa GOLD e é oriunda da perda entrópica proveniente do impedimento à livre rotação das ligações simples e acíclicas, resultante das interações entre o ligante e a proteína quando se forma o complexo ligante-proteína.

Finalmente, adotando as considerações citadas, é possível reescrever a Equação 5, conforme observa-se na Equação 6, sendo que os coeficientes c_1 - c_5 são usados pela calibração da função a partir de dados experimentais e determinados por um ajuste da equação aos valores de $\log CE_{50}$ através de uma análise por regressão linear múltipla.

$$RT \log CE_{50} = c_1(\Delta G_{solv} + c_2)^2 + c_3 \Delta H_{int.} + c_4 \Delta E_{tor.} + c_5$$

Equação 6

5.2. Síntese de Derivados da Piperina Planejados

Como o composto **B4** (com grupo fenetil) foi o único presente entre os 3 melhores previstos nos modelos do trabalho anterior (CASTRO, 2016) e no atual (vide Resultados), ele foi selecionado como o mais promissor para ser sintetizado. Adicionalmente, incluímos o composto **B12** (um dos mais ativos no modelo anterior e também bem avaliado no modelo atual) por este conter um grupo cicloexil, capaz de interagir favoravelmente com a mesma

cavidade hidrofóbica que o grupo fenetil (CASTRO, 2016), mas, sendo menos planar, poderia ter efeito positivo para a solubilidade do mesmo.

Também foram incluídos, por razões óbvias, os respectivos compostos que os antecedem nas suas rotas sintéticas (**B1**, **B2** e **B3** e **B9**, **B10** e **B11**, respectivamente). Dessa forma, no presente trabalho, buscamos reproduzir a síntese dos compostos **B1** (CASTRO, 2016), **B2** (CASTRO, 2016), **B9** (FRANKLIM et al., 2013) e **B10** (FRANKLIM et al., 2019) que já foram descritos na literatura e também estabelecer uma metodologia de oxidação para a obtenção dos compostos inéditos **B3**, **B4**, **B11** e **B12**. A Figura 16 traz os compostos planejados que foram selecionados para serem sintetizados.

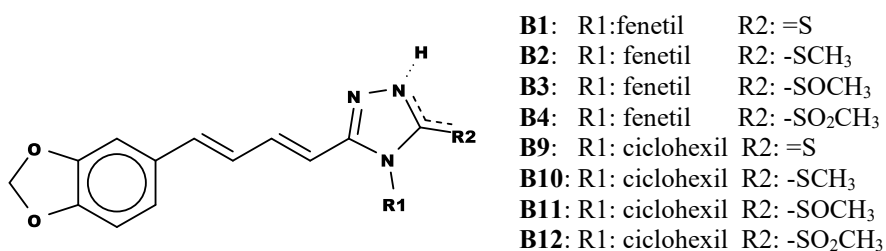
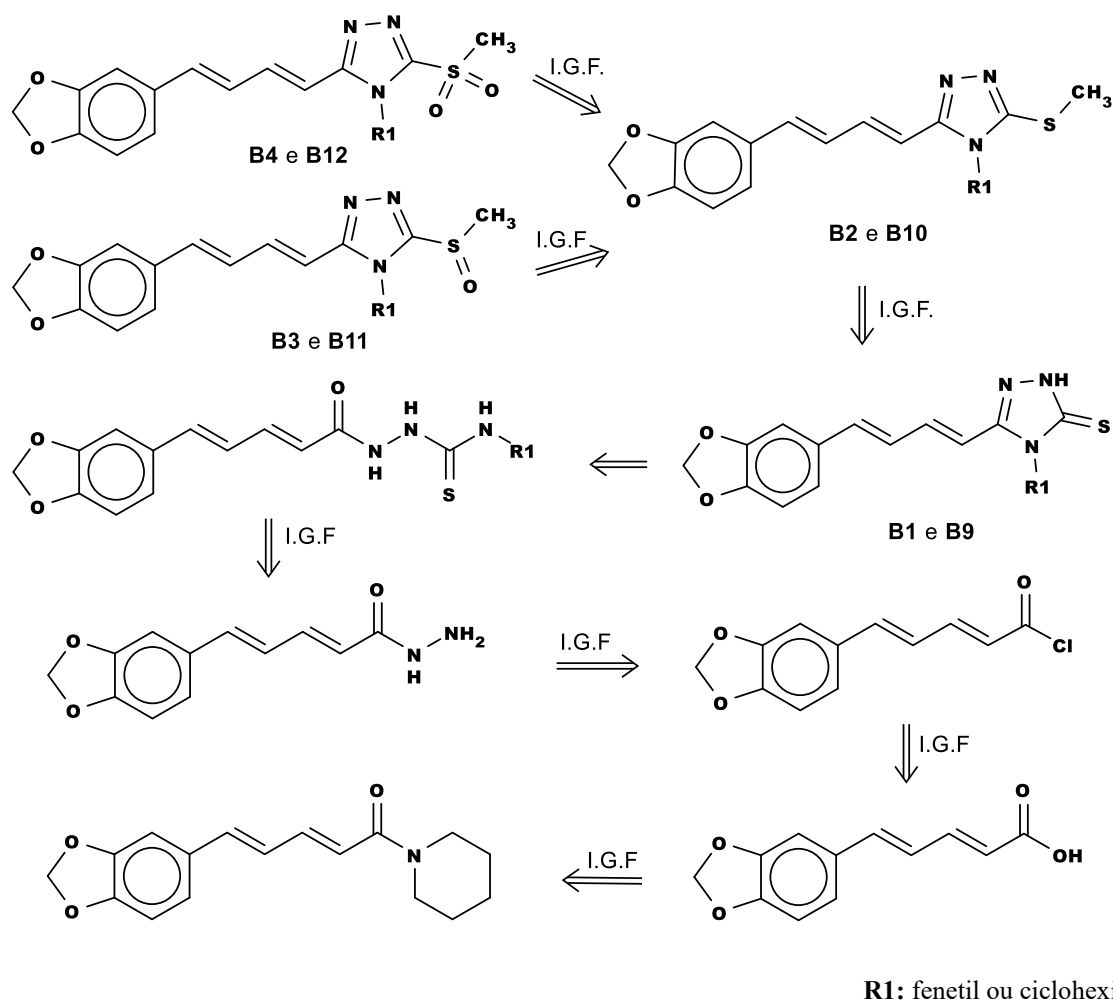


Figura 16: Compostos heterocíclicos derivados da piperina selecionados para serem sintetizados.

No Esquema 2 a seguir, podemos observar a análise retrossintética dos compostos da série **B**, derivados da piperina contendo anel 1,2,4-triazólico.



Esquema 2: Análise retróssintética dos compostos da **série B**.

Em nosso projeto, as etapas 1 e 2 da rota sintéticas não foram necessárias pois em nosso laboratório havia quantidade adequada de ácido piperínico em estoque. As etapas de síntese serão discutidas separadamente nos próximos tópicos.

5.2.1 Reagentes e Solventes

Foram usados acetato de etila, acetona, clorofórmio, diclorometano, etanol, éter etílico, metanol, solução de ácido clorídrico concentrado (37%) e hidróxido de sódio adquiridos pela empresa Vetec; cloreto de oxalila, hidrato de hidrazina, isotiocianatos de cicloexila, fenetila, iodeto de metila e peroximonossulfato de potássio - Oxone® (2KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Todos os solventes

e reagentes apresentavam grau de pureza adequado (entre 98 e 99,9%), não necessitando assim de tratamento prévio.

5.2.2 Equipamentos

Durante as reações químicas de síntese, foram utilizados os seguintes equipamentos:

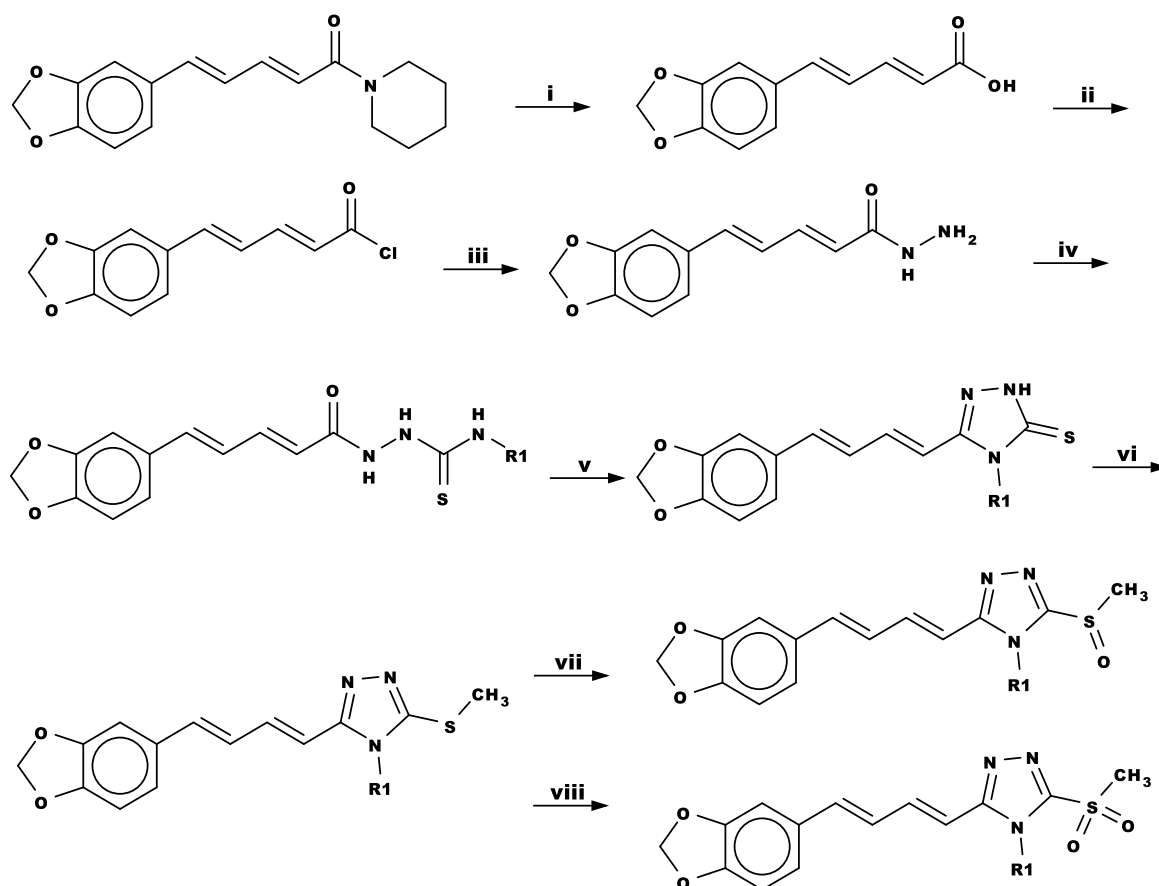
- Evaporador rotatório - Fisaton - Modelo 802.
- Placas de aquecimento e agitação - Corning e IKA.
- Reator de microondas - Modelo *Discover SP system* (CEM Inc, Matthews, NC, USA) no modo *open vessel*.
- Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA) foi feita em placas de alumínio com sílica gel (0,25 mm de espessura) com solvente apropriado. A câmara de revelação utilizada para a CCDA foi da marca Entela, modelo 58 Handheld, equipada com lâmpada UV com comprimento de onda de 254 e 365 nm.
- A pureza dos compostos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector DAD-SPD-M20A, Thermo com coluna C18 - Betasil (25cm x4.6mm x5um), solvente metanol (90%)/água (10%) com 20 μ L de volume de injeção (1mL/min), por 10 minutos e à 40° de temperatura.
- Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker (BrukerBioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany), na Central Analítica do Instituto de Química da UFRRJ. Os deslocamentos químicos estão referenciados em parte por milhão (ppm) com relação ao padrão interno Me_4Si e as constantes de acoplamento (J) em Hertz [Hz]. Solventes usados na solubilização das amostras: clorofórmio (CDCl_3) e dimetil-sulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$). Os espectros foram interpretados utilizando o programa ACD ^1D NMR Manager.
- Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos usando metanol como solvente e as análises foram feitas em Espectrômetro de Massas (Q-TOF, Micromass) de alta resolução com uma ionização de electrospray num modo positivo (no Laboratório de Espectrometria de Massas IQ/UNICAMP) e também com um Quadrupolo-Orbitrap (Thermo QExactive, Thermo Scientific) (em LABEM-LADETEC/UFRJ) com ionização electrospray em modo positivo, potência de resolução de 140.000 FWHM (largura total a meia potência) a m/z 200 e a dinâmica gama de aquisição de íons no analisador Orbitrap foi m/z 0-750. Outros parâmetros da fonte do ESI foram: i) taxa

de fluxo de gás de bainha = 10; ii) varrer o fluxo de gás = 0; iii) tensão de pulverização 3500 V ESI (+); vi) Temperatura capilar = 320 °C e v) S-Lens = 60 V. O processamento dos espectros de massa de alta resolução foi feito utilizando o programa Xcalibur, versão 2.2 (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha).

5.2.3 Metodologia Geral para a Síntese dos Derivados Triazólicos

Em nosso projeto, a síntese se inicia na etapa ii do Esquema 3, partindo do ácido piperínico, derivado da amida natural extraída dos frutos secos da pimenta do reino. Como já havia quantidade adequada do ácido em estoque, as etapas iniciais 1 e 2 da rota sintética não foram necessárias (Esquema 3). As etapas de síntese serão discutidas separadamente nos próximos tópicos.

O Esquema 3 mostra as etapas da rota de síntese dos derivados triazólicos. Os compostos são preparados partindo de um produto natural, uma amida extraída dos frutos secos da pimenta do reino (adquirida comercialmente). A primeira etapa consiste numa hidrólise que promove a conversão da piperina em ácido piperínico. A segunda, trata-se da formação de um cloreto de ácido a partir do ácido piperínico. Na terceira etapa, o cloreto de ácido sofre uma reação de substituição nucleofílica acílica para a formação da hidrazida. Na etapa quatro há uma reação com isotiocianatos variados de acordo com o grupamento de interesse a ser adicionado ao nitrogênio 4 do anel triazólico e este por sua vez, é formado em seguida com uma reação de ciclização que forma os derivados **B1** e **B9** (CASTRO, 2016; FRANKLIM et al., 2013).



i: 1)KOH/Etanol; Refluxo 12h.
2)HCl(aq) 10%, pH=3, 95%.

ii: (COCl)₂, T. A.

iii: NH₂NH₂.H₂O/CH₂Cl₂ seco
T. A., 75%.

iv: Isotiocianato de alquila,
refluxo (M.O.), 30 min.

v: NaOH(aq) 10%, refluxo
(M.O.), 30min.

vi: 1) KOH/Etanol, Refluxo (MO), 5min.
2) CH₃I/Etanol, Refluxo (MO), 1h.

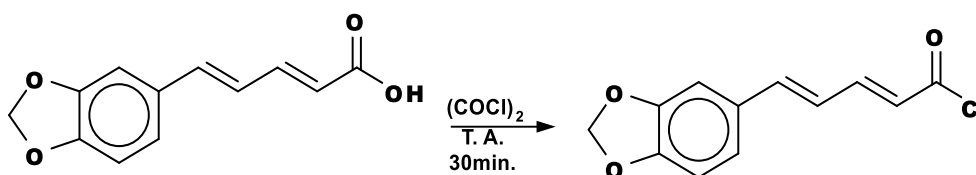
vii: Oxone /Metanol-H₂O
(Banho de gelo)

viii: Dietilamina-Oxone/
CH₃CN-H₂O
(Banho de gelo)

Esquema 3: Esquema da síntese dos derivados triazólicos planejados.

Uma reação de metilação na sexta etapa permite formar os derivados alquilados **B2** e **B10** com iodeto de metila e para a formação dos derivados oxidados **B3** e **B11** com grupo sulfóxido, na etapa 7 usa-se uma oxidação mais branda enquanto que, na etapa 8, usa-se uma metodologia para uma oxidação mais forte, promovendo assim a formação dos compostos **B4** e **B12** que apresentam um grupo sulfona.

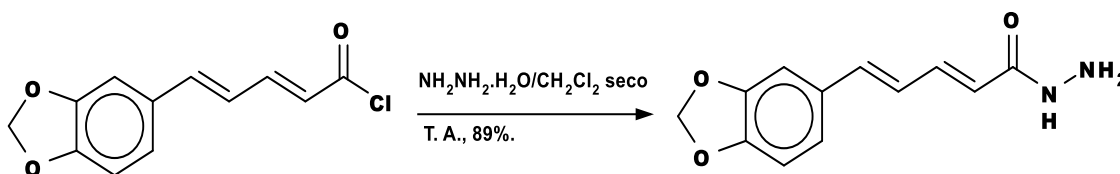
5.2.3.1. *Preparação do cloreto do ácido (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienóico*



Esquema 4: Etapa de síntese do cloreto de acila a partir do ácido piperínico.

A reação foi feita em um balão de fundo redondo de 250 mL de capacidade, equipado com barra de agitação magnética, septo de borracha e mantido sob atmosfera inerte (N_2). Foram adicionados 1,20 g (5,499 mmol) do ácido piperínico, disponível em nosso laboratório, seguido da adição de aproximadamente 3,631 mL (42,342 mmol) de cloreto de oxalila (Esquema 4). Esta solução foi submetida à agitação em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. A evolução da reação foi acompanhada por CCDA de maneira indireta com a formação do éster metílico, através da reação de uma pequena alíquota com metanol. Concluída a reação, o excesso de $(COCl)_2$ foi removido em evaporador rotatório, restando apenas o cloreto de acila, na forma de um sólido, de coloração alaranjada, que foi então utilizado na etapa seguinte, sem tratamento prévio, devido à sua instabilidade em atmosfera úmida (CASTRO, 2016; FRANKLIM et al., 2013).

5.2.3.2. *Preparação da (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienohidrazida*

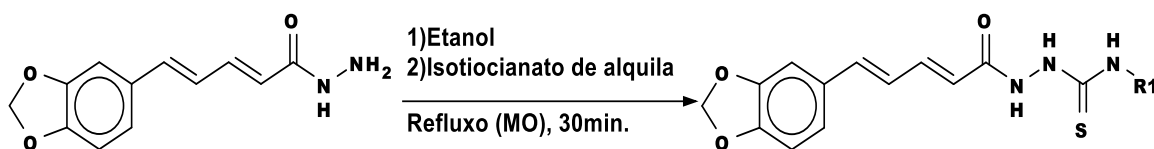


Esquema 5: Reação de síntese da hidrazida a partir do cloreto de ácido.

O cloreto de acila preparado na etapa de reação anterior foi usado imediatamente para a preparação da acilidrazida, a fim de evitar uma reação indesejada de hidrólise do

intermediário. O sólido foi dissolvido em 12 mL de diclorometano seco e esta solução, mantida sob atmosfera inerte e em banho de gelo, foi adicionada, gota a gota, sobre uma solução preparada paralelamente, contendo 2,5 mL de hidrato de hidrazina em 16 mL de CH_2Cl_2 seco em um balão de 125 mL, equipado com barra de agitação magnética e septo de borracha, mantido sob atmosfera de nitrogênio seco (Esquema 5). Após o término da adição, o meio reacional foi deixado por cerca de 30 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Por análise por CCDA verificou-se o término da reação. O solvente foi removido no evaporador rotatório e após adição de água destilada o produto foi filtrado sob pressão reduzida (CASTRO, 2016; FRANKLIM et al., 2013).

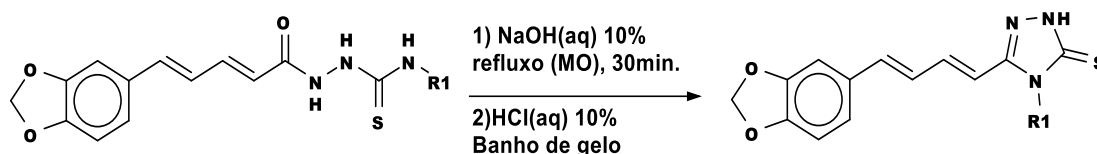
5.2.3.3. *Preparação dos intermediários 2-[(2E,4E)-5-(1,3benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-alkil/aryl-hidrazinocarbotioamida*



Esquema 6: Síntese dos intermediários hidrazinocarbotioamida a partir da acil hidrazida, para a posterior formação dos triazóis planejados.

Uma solução de 450 mg (1,94 mmol) de hidrazida em 23 mL de etanol foi preparada em um balão de 50 mL, contendo com barra de agitação magnética e condensador de refluxo, sobre esta suspensão adicionou-se o volume correspondente à 2,33 mmol do isotiocianato de alquila correspondente ao intermediário de interesse. A mistura foi então submetida à irradiação de microondas (80W, 78°C) sob refluxo por 30 min e a evolução da reação foi acompanhada por CCDA. Após o término da reação, a mistura foi colocada em evaporador rotatório para eliminação do etanol e logo em seguida o produto foi utilizado na etapa de ciclização seguinte, para a formação do triazol de interesse (CASTRO, 2016; FRANKLIM et al., 2013).

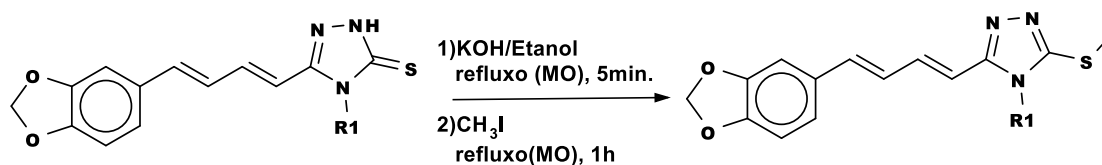
5.2.3.4. *Síntese dos derivados triazólicos (2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona-4-substituídos)*



Esquema 7: Síntese dos compostos triazólicos.

A hidrazinocarbotioamida correspondente obtida na reação anterior foi adicionada juntamente com $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ 10% (1 equivalente em relação ao substrato) à um balão de 50 mL contendo barra de agitação e refluxo. A mistura foi submetida à irradiação de micro-ondas mantida sob refluxo por 30 min (100 W e 100 °C). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. A solução foi resfriada com banho de gelo e acidificada com $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 10% até atingir pH 3,0 para a formação do precipitado (Esquema 7). A mistura reacional foi filtrada e lavada com água gelada por duas vezes e em seguida, os derivados **B1** e **B9** foram purificados pelo método de recristalização utilizando etanol (CASTRO, 2016; FRANKLIM et al., 2013).

5.2.3.5. *Síntese dos derivados triazólicos alquilados (2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-metilsulfeto-4-substituídos)*



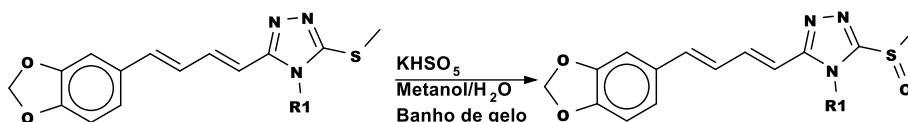
Esquema 8: Síntese dos compostos triazólicos alquilados.

Em um balão de 25 mL, equipado com agitador magnético e condensador de refluxo, foi preparada uma solução de 100 mg do triazol correspondente (**B1** e **B9**) em 5 mL de etanol, sobre a qual, foi adicionada uma solução 33,6 mg de KOH dissolvidos em 2 mL de etanol. A mistura reacional foi submetida à irradiação de micro-ondas por 5 minutos e em seguida, 1,5 equivalente de iodeto de metila foi adicionado e a mistura foi submetida novamente à irradiação em micro-ondas, por 1 h utilizando as mesmas condições anteriores

(Esquema 8) (adaptado de (FRANKLIM et al., 2019; NAVEENA; BOJA; KUMARI, 2010)).

O acompanhamento da reação foi feito por CCDA e ao final da reação, o solvente foi removido por evaporador rotatório sob pressão reduzida. Fez-se uma suspensão do sólido formado com $\text{KOH}_{(\text{aq})}$ 5% e fez-se uma extração com acetato de etila por três vezes. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório com pressão reduzida e os compostos **B2** e **B10** foram então, caracterizados por RMN (^1H e ^{13}C) e espectrometria de massas de alta resolução.

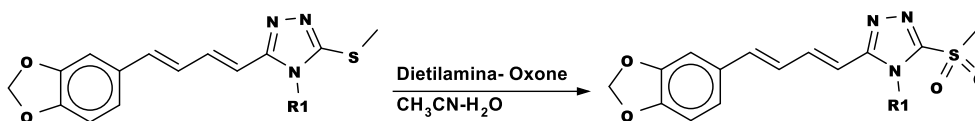
5.2.3.6. Síntese dos derivados triazólicos oxidados (2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-metilsulfóxido-4-substituídos)



Esquema 9: Síntese dos compostos triazólicos 3 metil-sulfóxido.

Para a síntese dos compostos **B3** e **B11**, primeiramente, foi preparada uma solução em balão de 25 mL com 1 equivalente do respectivo triazol (**B1** e **B9**) em 2mL de metanol. Paralelamente, uma outra solução foi preparada com 3 equivalentes de *Oxone*® (KHSO_5) em 2 mL de água, que em seguida foi adicionada ao balão, mantido sob agitação em temperatura ambiente por 4 dias (Esquema 9). Foi feito um acompanhamento da reação por CCDA e ao final da reação, uma extração com clorofórmio foi feita por três vezes, para em seguida o solvente orgânico ser removido em evaporador rotatório (TROST; CURRAN, 1981).

5.2.3.7. Síntese dos derivados alquilados oxidados (2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-metilsulfona-4-substituídos)



Esquema 10: Síntese dos compostos triazólicos 3 metil-sulfóxido.

Para a síntese dos compostos **B4** e **B12**, primeiramente, foi preparada uma solução em balão de 25 mL com 1 equivalente do respectivo triazol (**B1** e **B9**) em 2 mL de acetonitrila e 0,2 equivalentes de dietilamina. Paralelamente, uma outra solução foi preparada com 1,5 equivalentes de Oxone[®] em 4mL de água, que em seguida foi adicionada ao balão com a solução preparada previamente, mantido sob agitação por 1 dia, inicialmente em banho de gelo e após 6h de reação, a mesma foi mantida em temperatura ambiente. Foi feito um acompanhamento da reação por CCDA e ao final da reação, uma extração com clorofórmio foi feita por três vezes, para em seguida o solvente orgânico ser removido em evaporador rotatório (KUPWADE et al., 2017).

5.3. Difração de Raio-X de Monocristal

A difração de raio-X de monocristal foi feita no Laboratório de Difração de Raio-X (LDRX) na Universidade Federal Fluminense (UFF) em colaboração com o prof. Dr. Guilherme P. Guedes. Os dados de difração de raios-X do monocristal do composto B1 foram obtidos através de um difratômetro Bruker D8-Venture, usando radiação MoK α ($\lambda = 0.7107 \text{ \AA}$) em temperatura ambiente.

A obtenção dos dados e o refinamento de célula foram feitos usando Bruker Instrument Service v4.2.2 e APEX2, respectivamente. A redução dos dados foi feita usando o programa SAINT (“Bruker, APEX2 and SAINT Programs for Data Reduction, APEX2, SAINT and SADABS. (2013) Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.,” 2013).

Os coeficientes de absorção foram feitos usando reflexões equivalentes com programa SADABS (“Bruker, APEX2, SAINT and SADABS, APEX II. (2009) Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.,” 2009). A solução da estrutura e o refinamento por mínimos quadrados de matriz completa baseado em F^2 foi feito com SHELXS and SHELXL (SHELDRICK, 2008). Todos os átomos foram refinados anisotrópicamente, exceto os hidrogênios que foram tratados com refinamento de restrição. As imagens da estrutura foram feitas com o programa MERCURY (MACRAE et al., 2008).

5.4. Inibição da CYP51_{Tc} Detectada por Fluorescência

Esta etapa foi executada na York University, em Ontário, Canadá, durante período de doutorado sanduíche (PDSE) em colaboração com a Dr. Shamina S. Prova e orientação do Prof. Dr. Demian R. Ifa. Utilizaram-se os reagentes listados a seguir:

- Solução Tampão de fosfato de potássio 50mM (pH 7,4).
- Solução Tampão de bicarbonato de sódio 2% (m/v)
- 1 nmol/mL (1000pmol/mL) da CYP51_{Tc}: foi usada a solução fornecida pela CypEx (mantida à -80°C) e o degelo foi feito em banho de gelo.
- Substrato Vivid BOMCC (Thermo) 50 μM: Em um frasco contendo 1mg do substrato benziloximetilocianocumarina (BOMCC), foi adicionado 65 μL de 50 mM de solução tampão de fosfato de potássio 1 M (pH 7,4) para a preparação de uma solução estoque de BOMCC 50 mM.
- Solução de glicose-6-fosfato 200 μM: em um tubo eppendorff, 28,21 mg de sal glicose-6-fosfato de sódio (MW 282,12 g) foram solubilizados em 1mL de solução tampão de bicarbonato de sódio 2% para a preparação de uma solução 100 mM. Em um tubo de vidro, foi feita uma diluição a partir dessa solução preparada anteriormente, usando 20 μL da mesma em 9980 μL de solução tampão de bicarbonato de sódio 2% a fim de se obter uma solução de Glucose-6-Fosfato 200 μM.
- 100 μM NADP: uma solução de NADP 13 mM foi preparada adicionando 500 μL de solução tampão de bicarbonato de sódio 2% em um frasco contendo 5mg de NADP. Desta solução, 7,7 μL foram diluídos com 992.3 μL de solução tampão de bicarbonato de sódio 2% para formar uma solução de NADP 100 μM.
- Glicose-6-fosfato desidrogenase 0,5 unit/μL: para o preparo de uma solução de glicose-6-fosfato desidrogenase 0,5 unit/μL, foi adicionado 500μL de solução tampão de bicarbonato de sódio 2% em um frasco contendo 250 unidades de glicose-6-fosfato desidrogenase. Alíquotas de 100 foram separadas em eppendorffs para uso futuro.

5.4.1 Solução dos Inibidores

As soluções estoques dos compostos foram preparadas pesando-se determinada massa dos mesmos e adicionando 1 mL de DMSO (~2% m/v), conforme a Tabela 1. Em seguida, foram preparados 100 μL de soluções de 4 mM de cada composto para uso futuro com alíquotas da solução estoque e volumes de solução tampão adequados, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Dados relativos à preparação das soluções estoque dos inibidores.

Composto	Massa Molar (g/mol)	Massa Pesada (mg)	Concentração (mM)	Aliquota (µL)	Volume DMSO (µL)
B1	377	20,5	54,37666	7,36	92,64
B2	391	21,7	55,49872	7,21	92,79
B9	355	20,4	57,46479	6,96	93,04
B10	369	18,5	50,1355	7,98	92,02
C1	400,33	16,4	40,9662	9,76	90,24
C2	363,86	13,7	37,65184	10,62	89,38
C3	483,24	20,1	41,59424	9,62	90,38
C4	445,78	19,9	44,64085	8,96	91,04
Posaconazol	700,78	5,8	8,276492	48,33	51,67
Metimazol	114,17	6	52,55321	7,61	92,39

5.4.2 Reação de Inibição Enzimática

As reações de inibição enzimática foram feitas em microplacas pretas de 96 poços com um volume final de reação de 80 µL. Foram adicionados 40 µL dos inibidores I1 até I8, dos controles positivos posaconazol (Posa) e metimazol (Meti) e o controle negativo (CN), seguindo uma diluição em série preparada separadamente, com concentrações de 40, 20, 10, 2,5, 0,625, 0,16, 0,039 e 0,098 µM a partir da solução estoque 4mM, conforme a Figura 17.

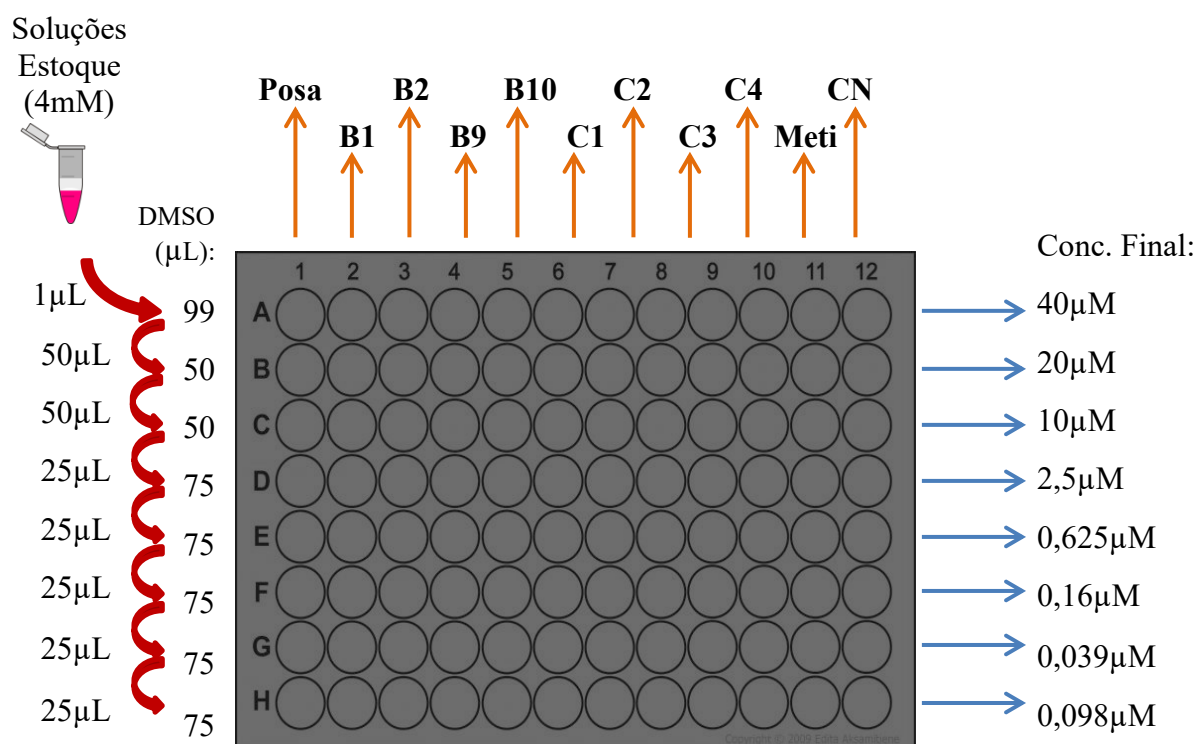


Figura 17: Diluição em série dos compostos utilizados nesse estudo, dos controles positivos e do controle negativo feita em DMSO.

Em seguida foram adicionados 26,08 μL da solução principal preparada previamente, contendo a enzima CYP51 e o substrato Vivid BOMCC em solução tampão de fosfato de potássio, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Solução principal – concentração e volumes finais e iniciais de CYP51, Vivid BOMCC e Solução tampão de fosfato de potássio, necessários para a preparação dessa mistura.

	CYP51	Vivid BOMCC	Tampão de fosfato de potássio	Total
Concentração Inicial	1.9 nmol/mL	50000 μM	50mM	
Concentração Final	37 pmol/mL	100 μM	50mM	
Volume por poço	1,56 μL	0,16 μL	24,36 μL	26,08 μL
Volume total 100 reações	156	16	2436 μL	2608 μL

Após adição de 26,08 μL à microplaca, a mesma foi pré-incubada por 5 minutos à 37°C em estufa. Em seguida, por fim, adicionou-se 13,92 μL da solução regeneradora de NADPH, preparada previamente, conforme a Tabela 3 e foi feita uma leitura inicial da fluorescência (Excitação 410nm e emissão 460 nm) à 37°C e outra após uma hora de reação. Após a primeira leitura, a placa foi mantida em estufa por 37°C e removida para fazer a leitura final.

Tabela 3: Solução regeneradora de NADPH – concentração e volumes finais e iniciais de Glicose 6-fosfato, NADP e Glicose 6-phosfato desidrogenase para a preparação dessa mistura.

	Glicose 6-fosfato	NADP	Glicose 6-fosfato desidrogenase	Total
Concentração inicial	200 μM	100 μM	0,5 U/ μL	
Concentração final	28 μM	2,2 μM	6 U/mL	
Volume por poço	11,2 μL	1,76 μL	0,96 μL	13,92 μL
Volume 100 reações	1120 μL	176 μL	96 μL	1392 μL

5.5. Avaliação de Atividade Biológica

5.5.1 Parasitos

As formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas no acervo de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) e mantido nas dependências do Laboratório

de Glicobiologia (UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil). As formas epimastigotas foram mantidas por transferências semanais a 28 ° C em meio de infusão de cérebro-coração (BHI) (Acumedia, Lansing, MI, EUA), suplementado com 10 mg de hemina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 20 mg de ácido fólico L-1 (Sigma) e soro fetal de vitela inativado pelo calor (FCS) a 10% (meio BHI-FCS, Gibco, Grand Island, NY, EUA) (FRANKLIM et al., 2013).

Já para os experimentos com as formas tripomastigotas, células LLC-MK2 com 50% de confluência em garrafas de cultura de 175 cm² de área de cultivo (T-175) foram infectadas com 5×10^7 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tulahuen C2C4 LacZ, transfectada com plasmídeo de *Escherichia coli* para a expressão citoplasmática da enzima beta-galactosidase (β Gal). Foi utilizado meio DMEM completo com 2,5 % SFB. Após 24 h, o meio foi removido e a monocamada de células lavada com tampão fosfato-salino (pH 7,2) (PBS). Meio DMEM completo com 2,5 % SFB foi adicionado à cultura e renovado a cada 2 dias. Formas tripomastigotas foram recolhidas do sobrenadante entre os 7º e 12º dias após a infecção e enriquecidas por centrifugação diferencial.

5.5.2 Cultivo de Linhagem Células Mamíferas LLC-MK2

As células LLC-MK2 (fibroblastos renais de *M. mulatta*, ATCC) foram mantidas em meio DMEM completo suplementado com 2,5 % de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 37°C com controle de umidade e atmosfera a 5% de CO₂. O inóculo foi obtido pelo tratamento da monocamada de células com solução aquosa de 0,25% m/v de tripsina e 1 mM de ácido etileno-diamino acético (EDTA) por 5 minutos. Passagens na proporção de 1:6 do volume do inóculo foram realizadas a cada 4 dias.

5.5.3 Atividade Anti-epimastigota

Para avaliação dos efeitos anti-epimastigotas, parasitas (1×10^5 células/mL) foram subcultivados na ausência ou presença de diferentes concentrações (0,5 a 25 μ g.mL⁻¹) dos compostos **B1-B3** e **B9-B11**, de uma solução estoque de 5,0 mg / mL – 1 em DMSO (Sigma). Os parasitas foram incubados em meio BHI-FCS com ou sem compostos em um volume final de 1,0 mL em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), e após 7 dias, os efeitos tóxicos dos compostos foram quantificados pela contagem direta dos epimastigotas vivos em uma câmara de Neubauer. Meio sem compostos, contendo uma concentração final comparável de DMSO (0,05%) foi usado como controle (FRANKLIM et al., 2013).

5.5.4 Ensaios de Atividade em Amastigotas de *T. cruzi*

Em uma placa de 96 poços transparente foram adicionadas células LLC-MK2 (1×10^4 células por/poço) em meio DMEM com 5% SFB. Após incubação por 2h a 37°C e 5% CO₂ para adesão, foram adicionados tripomastigotas de *T. cruzi* (2×10^5 / poço), da cepa Tulahuen C2C4. Após incubação por 24 h a 37°C e 5% CO₂ para infecção, os poços foram lavados com PBS a 37°C para remoção dos parasitos não internalizados. Os derivados **B1-B3** e **B5-B7** e o fármaco de referência benzonidazol (**Bzd**), pré-diluídos em DMSO (25 mM), foram adicionados em 4 concentrações em triplicata e diluição seriada (concentrações finais de 50, 10, 2 e 0,4 µM) em meio DMEM sem corante com 5% SFB para o volume final de 120 µL/poço. Foram mantidos também situações controle sem tratamento, com 0,2% v/v DMSO e branco (sem adição de parasitos). Após incubação por 120 h a 37°C /5% CO₂, adicionam-se 30 µL de solução de vermelho de clorofenol beta-galactopiranosídeo (CPRG) a 0,3 mg/mL contendo 0,5% v/v Igepal CA-630 em PBS. Seguindo-se incubação por mais 2 h nas mesmas condições. Após esse período a absorbância foi medida em $\lambda = 570$ nm.

5.5.5 Ensaios de Citotoxicidade em Células LLC-MK2

Em uma placa de 96 poços transparente foram adicionadas células LLC-MK2 (1×10^4 células/poço) em meio DMEM com 5% SFB. Após incubação por 24h a 37°C/5% CO₂ para adesão, os compostos **B1-B3** e **B5-B7** pré-diluídos em DMSO (25 mM) foram adicionados em 4 concentrações em triplicata e diluição seriada (concentrações finais de 50, 10, 2 e 0,4 µM) em meio DMEM-SVF com 5% SFB. Após incubação por 120 h a 37°C/5% CO₂, o meio foi removido e a monocamada de células lavada com PBS. Meio DMEM-SVF com 5% SFB foi repostado (100 µL/poço), juntamente com 20 µL/poço de solução 5 mg/mL de sal brometo de MTT em PBS. Após incubação por 2h a 37°C/5% CO₂, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazana de MTT solubilizados em DMSO (150 µL/poço). A absorbância foi medida em leitor de placas em $\lambda = 570$ nm.

5.5.6 Tratamento Estatístico dos Dados de Atividade *in vitro*

Os valores de absorbância obtidos dos experimentos *in vitro* foram descontados da média do controle branco e convertidos em valores percentuais de viabilidade relativos à média da triplicata do controle sem tratamento. Os dados referentes a três experimentos

independentes foram inseridos no software GraphPad Prism 7.00 para tratamento estatístico, incluindo cálculo da concentração inibitória do crescimento em 50% (CI₅₀).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Modelagem Molecular

Inicialmente, um estudo de modelagem molecular foi feito para se avaliar se haveria diferenças estruturais entre as enzimas CYP51_{Tc} e CYP51_{Hs} suficientes para permitir uma possível seletividade para os compostos estudados, reduzindo assim problemas de toxicidade.

Além disso, buscou-se a otimização da função de predição de atividade construída em nosso trabalho anterior (CASTRO, 2016), baseada em resultados de atividade experimental CE_{50} e dados teóricos calculados ΔG_{solv} , ΔH_{int} e ΔE_{tors} . No presente estudo, novos cálculos de ΔH_{int} foram feitos utilizando o método semi-empírico PM7 (STEWART, 2013b), que é uma otimização de métodos semi-empíricos anteriores, apresentando melhorias na descrição de interações não covalentes e, assim, podendo calcular mais precisamente as energias envolvidas na interação enzima-ligantes.

6.1.1 Comparação de Estruturas 3D de CYP51_{Tc} e CYP51_{Hs}

Nesse projeto, foram selecionadas duas estruturas de CYP51 disponíveis no PDB (4H6O (ANDRIANI et al., 2013) para *T. cruzi* e 6UEZ (HARGROVE et al., 2020b) para *Homo sapiens*), para se analisar uma possível seletividade dos compostos planejados para a enzima do parasito.

A estrutura 4H6O de CYP51_{Tc} se apresenta complexada com o inibidor NEU321 (1-(3-(4-cloro-3,5-dimetilfenoxi)benzil)-1*H*-imidazol) e foi obtida por difração de raios-x, apresentando uma resolução de 2,8 Å (ANDRIANI et al., 2013).

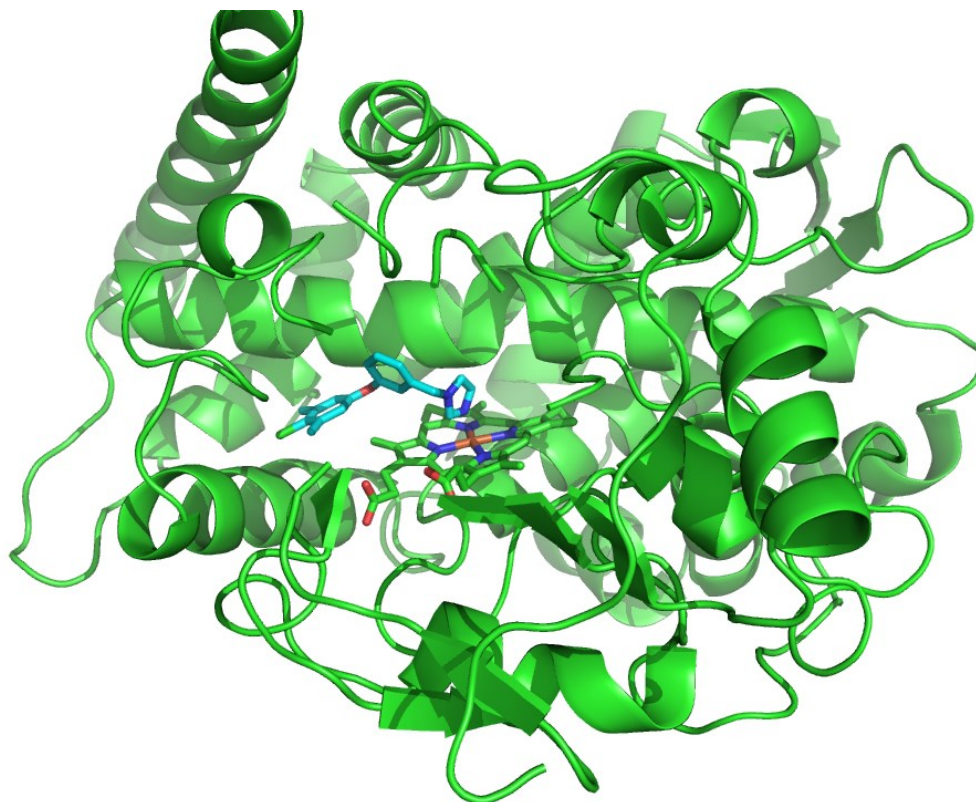


Figura 18: Estrutura cristalográfica da enzima 14 α -desmetilase do *T. cruzi* (PDB: 4H6O) representada na forma *cartoon* na cor verde; Na região central da enzima, encontra-se o grupo heme representado por bastões na cor verde e o inibidor co-cristalizado, representado por bastões na cor azul.

Já a enzima CYP51_{Hs} depositada no PDB com código 6UEZ, foi obtida por difração de raios-x, possuindo resolução de 1,98Å e se apresenta co-cristalizada com o substrato natural lanosterol (HARGROVE et al., 2020a), conforme pode ser visto na Figura 19.

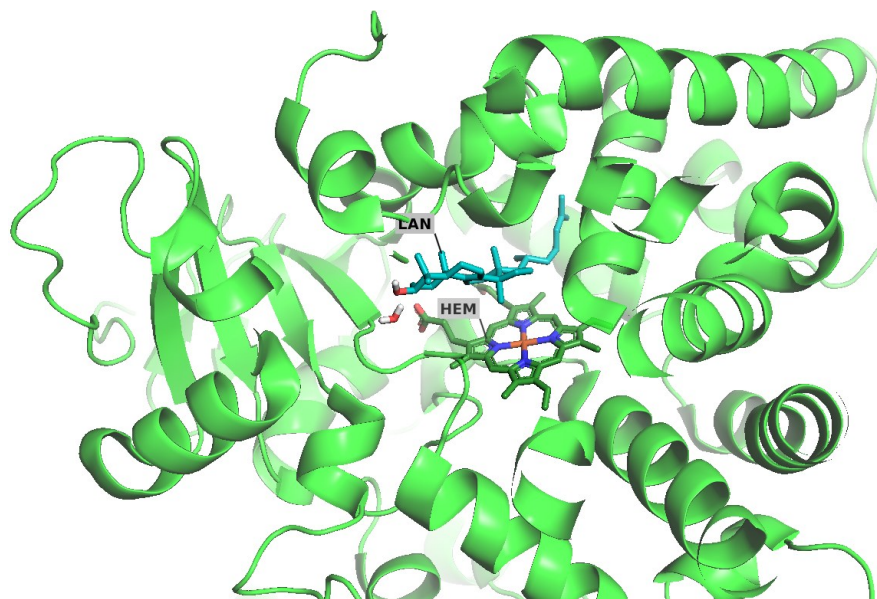


Figura 19: Estrutura cristalográfica da enzima CYP51_{Hs} (PDB: 6UEZ) representada na forma *cartoon* na cor verde; na região central da enzima, em destaque, encontra-se o grupo heme representado por bastões (com átomos de C na cor verde), uma molécula de água e o lanosterol (substrato natural), representado por bastões com átomos de C na cor ciano.

A seletividade dos compostos para a enzima do parasito em detrimento da enzima humana é desejável para evitar possíveis efeitos tóxicos aos hospedeiros humanos. Por isso, a identificação de diferenças estruturais relevantes entre as estruturas de CYP51 de ambas as espécies seria um bom indicativo que essa seletividade poderia ser alcançada para um composto de atividade promissora. Dessa forma, foi feito um alinhamento das sequências primárias das enzimas para identificar possíveis diferenças entre as estruturas, para que alguma seletividade pudesse ser explorada de acordo com os inibidores estudados.

Para tal, o servidor *T-Coffee* (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/index.html>) foi utilizado, que é um pacote de alinhamento para sequências de DNA, RNA ou proteínas (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). O alinhamento das sequências indicou um escore igual a 99 que representa um bom alinhamento o que pode sugerir que de uma maneira mais geral, a seletividade buscada poderia não ser tão facilmente obtida (Anexo 1).

Uma análise mais detalhada, especialmente dos sítios ativos, da sobreposição das enzimas foi feita com o programa PyMol versão acadêmica (Figura 20). Foi possível observar que, embora o alinhamento seja bom, há diferenças nas posições de resíduos de aminoácidos e alças das enzimas que ficam mais evidentes na Figura 21, além da presença de uma molécula de água próxima ao lanosterol na enzima humana, enquanto que a enzima

do parasito não apresenta nenhuma molécula de água no sítio ativo, fato este que pode ser melhor avaliado e explorado durante a docagem molecular.

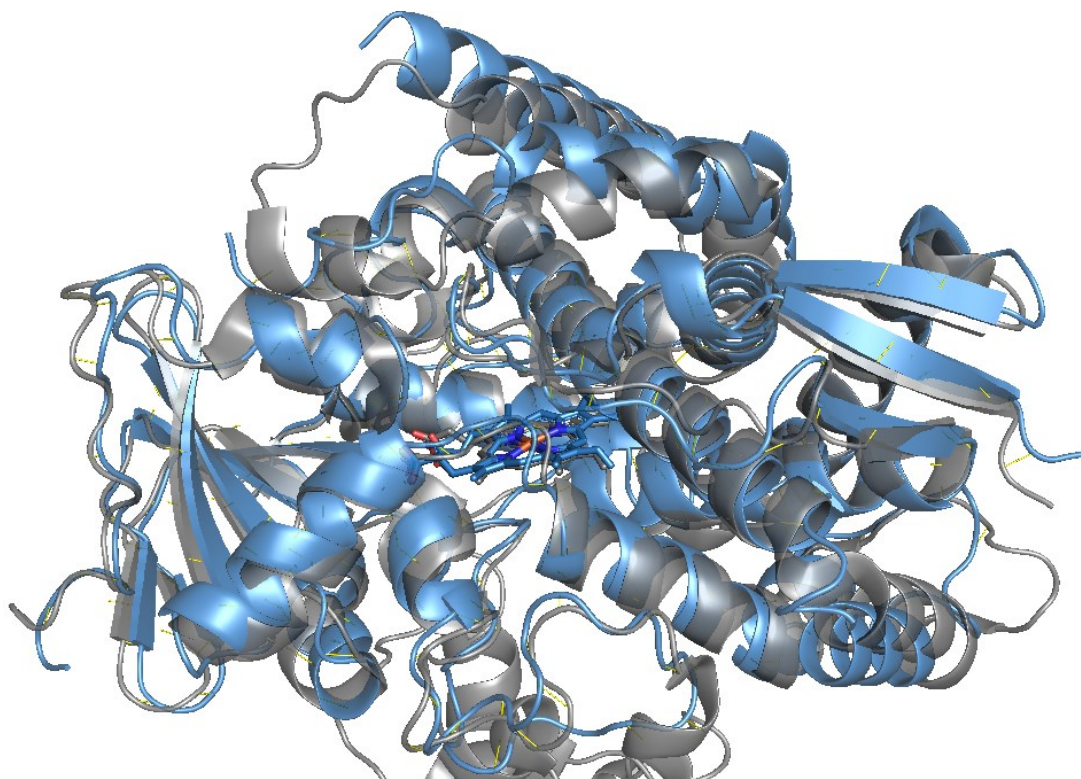


Figura 20: Sobreposição das estruturas cristalográficas da enzima CYP51_{Hs} (PDB: 6UEZ) na cor cinza com a enzima CYP51_{Tc} (PDB: 4H6O) na cor azul, ambas na forma *cartoon*; É possível observar algumas diferenças de posição de resíduos e alças entre as estruturas.

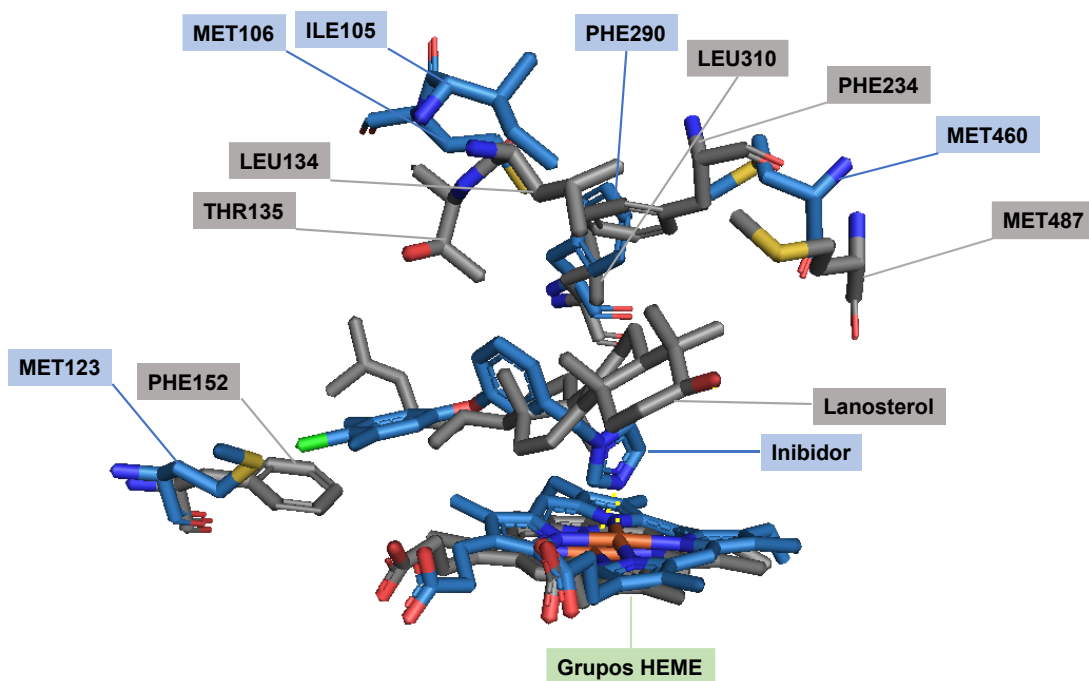
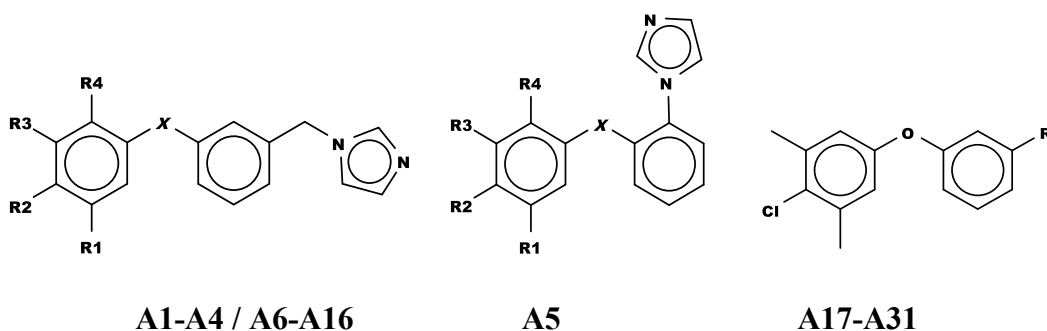


Figura 21: Sobreposição dos resíduos do sítio ativo que diferem da estrutura da CYP51_{Tc} (em azul) para a CYP51_{Hs} (em cinza).

6.1.2 Séries de Ligantes

Foram utilizadas 3 séries distintas durante a execução das etapas do projeto. A **Série A** (Tabela 4) contém compostos heterocíclicos com atividade (CE_{50}) descrita por Andriani e colaboradores (ANDRIANI et al., 2013). Foram utilizados anteriormente por nós para a construção de um modelo teórico de predição de atividade sobre a CYP51_{Tc} (CASTRO, 2016) e foram utilizados no presente trabalho para a construção de um novo modelo, com a finalidade de buscar uma possível otimização.

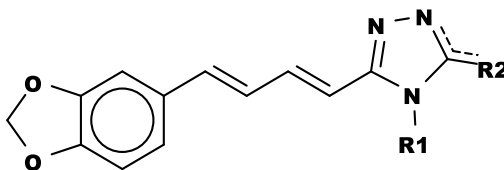
Tabela 4: Estrutura dos compostos estudados por Andriani e colaboradores e seus respectivos valores de CE_{50} .



Comp.	X	R1	R2	R3	R4	CE ₅₀ (nM)	Composto	R	CE ₅₀ (nM)*
A1	O(CH ₂) ₆	CH ₃	Cl	CH ₃	H	23	A17		1100
A2	O(CH ₂) ₅	CH ₃	Cl	CH ₃	H	2,5	A18		1100
A3	O(CH ₂) ₄	CH ₃	Cl	CH ₃	H	5,1	A19		2800
A4	O(CH ₂) ₅	CH ₃	H	H	H	443	A20		3700
A5	NHCONH	Cl	H	H	H	461	A21		3700
A6	NH	H	NO ₂	H	CH ₃	72	A22		5400
A7	NH	OCH ₃	H	H	H	167	A23		6200
A8	O	CH ₃	Cl	CH ₃	H	80	A24		11200
A9	O	Ph	H	H	H	282	A25		10700
A10	O	CH ₃	H	CH ₃	H	330	A26		9800
A11	O	CH ₃	H	H	H	330	A27		13400
A12	O	H	Cl	H	H	650	A28		14100
A13	O	H	H	H	CH ₃	771	A29		3400
A14	O	H	H	H	H	1630	A30		12300
A15	OCH ₃	H	Cl	H	H	42	A31		2200
A16	OCH ₂ CH ₃	H	Cl	H	H	530			

Foram utilizados também compostos da **Série B** (CASTRO, 2016), que são 1,2,4-triazóis derivados da piperina, planejados a partir de resultados de docagem molecular e determinação de atividade inibitória teórica sobre a CYP51_{Tc} (CASTRO, 2016). Cabe destacar que as estruturas dos compostos **B13 – B16** foram construídas de acordo com suas formas protonadas, devido ao caráter básico conferido pelo grupo piperidinil, então o N foi considerado protonado nessas estruturas.

Tabela 5: Estrutura dos compostos derivados da piperina descritos por (CASTRO, 2016).



Composto	R1	R2	logEC ₅₀ Calc*
B1	Fenetil	=S	2,01
B2	Fenetil	-SCH ₃	1,95
B3	Fenetil	-SOCH ₃	1,98
B4	Fenetil	-SO ₂ CH ₃	1,24
B5	Naftil	=S	1,77
B6	Naftil	-SCH ₃	2,33
B7	Naftil	-SOCH ₃	1,97
B8	Naftil	-SO ₂ CH ₃	1,29
B9	Cicloexil	=S	1,91
B10	Cicloexil	-SCH ₃	2,77
B11	Cicloexil	-SOCH ₃	2,03
B12	Cicloexil	-SO ₂ CH ₃	1,08
B13	1-piperidinil etil	=S	4,90
B14	1-piperidinil etil	-SCH ₃	7,68
B15	1-piperidinil etil	-SOCH ₃	5,85
B16	1-piperidinil etil	-SO ₂ CH ₃	9,02
B17	Bifenil	=S	1,85
B18	Bifenil	-SCH ₃	2,00
B17	Bifenil	-SOCH ₃	1,80
B18	Bifenil	-SO ₂ CH ₃	1,34

*(CASTRO, 2016)

A **série C** é constituída por compostos mesoiônicos que foram cedidos pelo grupo de síntese da Prof^a. Aurea Echevarria da UFRRJ (FRAUCHES-SANTOS, 2017) e foi incluída nesse estudo devido ao seu padrão estrutural desejável, pois apresentam anéis heterocíclicos que a princípio poderiam interagir com o sítio ativo do alvo, mas que, ao mesmo tempo, tem diferenças estruturais secundárias que poderiam ajudar a avaliar a abrangência do modelo construído. As estruturas dos compostos **C1** e **C3** foram construídas e foram utilizadas nos cálculos seguintes sem o contra-íon nas formas catiônicas, devido à consideração das situações em solução e no meio biológico (Figura 21).

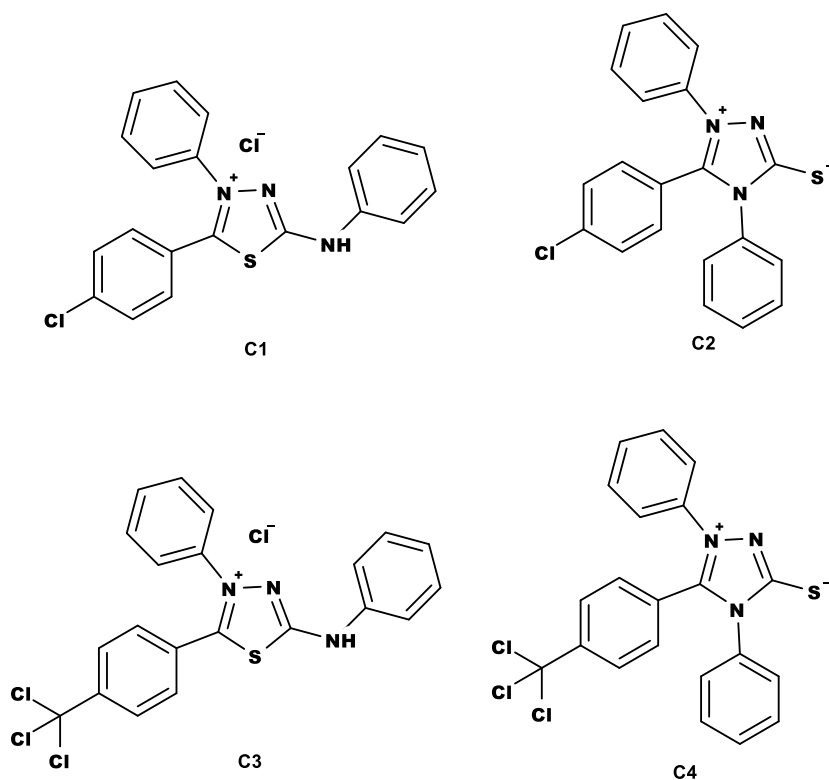


Figura 22: Compostos heterocíclicos mesoiônicos (FRAUCHES-SANTOS, 2017) utilizados no estudo de interação com a CYP51_{Tc}.

O programa Spartan'14 (Wavefunction, Inc.) foi utilizado para a construção e minimização de energia de todas as 3 séries (A, B e C) com o método PM3 (STEWART J. J., 1989) disponível no programa. Através dele, também foi possível a determinação de ΔG_{solv} dos ligantes pelo método SM5.8 (CRAMER; TRUHLAR, 1992) (Tabela 6), explorado posteriormente como um dos parâmetros para a construção dos modelos de previsão.

Tabela 6: Valores de energia de solvatação (em kcal/mol) determinados utilizando o método SM5.8.

Composto	ΔG_{solv} (kcal/mol)	Composto	ΔG_{solv} (kcal/mol)
A1	-8,70	A17	-7,68
A2	-8,80	A18	-10,10
A3	-8,73	A19	-5,82
A4	-9,00	A20	-53,81
A5	-15,62	A21	-10,62

A6	-13,29	A22	-6,22
A7	-12,32	A23	-52,86
A8	-9,26	A24	-11,52
A9	-10,53	A25	-5,79
A10	-8,23	A26	-7,59
A11	-9,70	A27	-6,56
A12	-9,85	A28	-8,46
A13	-9,43	A29	-9,51
A14	-9,70	A30	-6,69
A15	-10,28	A31	-7,19
A16	-10,10		
B1	-19,73	B11	-17,82
B2	-15,08	B12	-20,26
B3	-18,81	B13	-58,09
B4	-24,24	B14	-67,31
B5	-21,09	B15	-62,01
B6	-15,16	B16	-67,38
B7	-22,01	B17	-20,33
B8	-24,59	B18	-14,99
B9	-18,50	B19	-20,69
B10	-13,26	B20	-24,33
C1	-32,98	C3	-41,90
C2	-19,02	C4	-23,84

Os compostos **A20** e **A23** apresentam em sua estrutura um grupo amino terciário que apresenta um caráter básico considerável e, considerando-se um meio aquoso de pH neutro, provavelmente haveria uma protonação do átomo de nitrogênio desse grupo amino.

Um fato interessante sobre a atividade prevista dos compostos planejados (Tabela 5) é que os compostos **B13-B16** teoricamente apresentariam piores atividades, com valores de CE_{50} mais altos. Isso pode ser explicado pelos valores de energia de solvatação muito favoráveis calculados para os mesmos (com ΔG_{Solv} entre -58,09 e -67,38 kcal/mol), enquanto que, para os demais compostos, esses valores são menos favoráveis (com ΔG_{Solv} entre -13,26 e -24,59 kcal/mol). Isso poderia na prática representar um problema de permeabilidade dos compostos **B13-B16** para penetrarem na membrana celular do parasito.

No caso da **série C**, também levando em conta o pH neutro do meio, consideramos que os compostos **C1** (pKa = 8,76) e **C3** (pKa = 8,76) estariam na sua forma catiônica (com o N exocíclico ligado a um H; o contra-íon não foi incluído pois é esperado que no meio aquoso os íons estejam separados) e os compostos **C2** (pKa = 5,0) e **C4** (pKa = 5,0) estariam nas suas formas neutras (com o S exocíclico desprotonado). Os valores de pKa foram determinados utilizando o programa Marvin Sketch 14.10.27.0.

6.1.3 Docagem Molecular

6.1.3.1. Docagem molecular na CYP51 de *T. cruzi*

A docagem molecular dos inibidores das **séries A e B** na estrutura 4H6O já havia sido feita em trabalho anterior (Tabela 7) (CASTRO, 2016); dessa forma, os compostos da **série C** foram avaliados por docagem nessa mesma estrutura de CYP51_{Tc}, utilizando a mesma função ChemPLP, conforme discutido na METODOLOGIA, item 5.1.3, que já havia sido selecionada previamente. Um outro dado importante obtido a partir da docagem foi a energia torcional que é utilizada na função de predição de atividade como uma representação do termo entrópico dessa interação.

Tabela 7: Valores das pontuações da docagem (em duplicata) das **séries A e B**, com a respectiva distância (Å) entre o N heterocíclico e o Fe(II) do grupo heme (continua) (CASTRO, 2016).

Composto	Pontuação 1	Distância (Å)	Pontuação 2	Distância (Å)	Média das Pontuações
A1	85,68	2,50	86,79	2,61	86,23
A2	82,08	2,53	84,66	2,50	83,37
A3	76,79	2,48	78,92	2,54	77,86
A4	74,84	2,53	78,64	2,50	76,74
A5	61,71	2,58	62,65	2,64	62,18
A6	80,85	2,54	66,41	2,64	73,63
A7	74,97	2,58	78,92	2,47	76,94
A8	87,79	2,54	87,71	2,54	87,75
A9	82,60	2,61	*	*	82,60
A10	80,69	2,51	83,63	2,61	82,16
A11	79,09	2,53	83,38	2,61	81,24
A12	78,49	2,49	77,52	2,51	78,01

A13	65,53	2,46	73,79	2,64	69,66
A14	74,97	2,50	67,87	2,38	71,42
A15	82,27	2,58	83,06	2,61	82,66
A16	75,20	2,46	74,07	2,61	74,63
A17	93,27	2,36	94,23	2,36	93,75
A18	87,19	2,54	84,17	2,57	85,68
A19	87,74	2,61	81,75	3,70	84,74
A20	69,88	2,58	75,52	2,73	72,70
A21	66,95	4,14	66,13	4,40	66,54
A22	64,88	2,73	78,61	3,16	71,74
A23	62,17	3,98	68,13	3,29	65,15
A24	92,07	2,28	73,92	1,92	82,99
A25	76,08	3,27	83,18	3,37	79,63
A26	69,47	3,14	71,24	3,23	70,36
A27	82,18	4,24	93,27	2,70	87,73
A28	59,50	4,19	52,71	4,04	56,10
A29	80,38	2,51	73,83	2,64	77,10
A30	65,95	4,35	77,77	2,54	71,86
A31	83,52	2,47	72,73	4,18	78,13
B1	92,36	2,61	91,22	2,54	91,79
B2	95,24	2,61	97,32	2,61	96,28
B3	90,76	2,67	91,96	2,61	91,36
B4	88,44	2,61	85,80	2,64	87,12
B5	90,61	2,61	94,60	2,67	92,61
B6	85,27	2,19	96,89	2,53	91,08
B7	90,96	2,93	89,30	2,61	90,13
B8	87,47	2,61	86,34	2,83	86,91
B9	85,23	2,61	77,64	2,74	81,44
B10	86,44	2,67	87,70	2,76	87,07
B11	80,14	3,33	81,46	2,74	80,80
B12	83,08	2,83	82,45	2,80	82,77
B13	90,16	2,57	91,88	2,58	91,02
B14	88,78	2,31	92,33	2,64	90,55
B15	87,31	2,64	87,06	2,67	87,19
B16	84,66	2,67	87,63	2,83	86,14
B17	80,69	2,61	79,96	2,58	80,33
B18	87,71	2,25	87,54	2,18	87,63
B19	81,21	2,57	82,24	2,61	81,72
B20	75,56	2,57	77,01	2,59	76,29

*não houve nenhuma solução que apresentasse a interação de interesse.

A Tabela 8 contém os resultados de pontuação das melhores poses para cada ligante da série C e distâncias entre o íon Fe(II) do grupo heme e o ligante, feito em duplicata. Cabe ressaltar que a interação pretendida para esse tipo de inibição é entre o íon Fe(II) do grupo heme e o nitrogênio do anel heterocíclico, interação que não foi observada em nenhuma das soluções dessa série.

Tabela 8: Resultados da pontuação, distância (Å) com os átomos envolvidos na interação e a energia torcional, obtidos com a docagem dos inibidores da série C com a estrutura 4H6O (CYP51_{Tc}) usando a função ChemPLP e um raio de 10Å.

Ligante	1ª Docagem				2ª Docagem				Média das Pontuações
	Pont.	Distância	Interação	$\Delta E_{torc.}$	Pont.	Distância	Interação	$\Delta E_{torc.}$	
C1	66,29	2,86	Fe-Cl	0,80	55,84	3,48	Fe-S	1,82	56,84
C2	85,01	3,39	Fe-Ar	0,81	84,56	3,66	Fe-Ar	0,80	84,76
C3	87,45	3,53	Fe-Ar	0,89	85,95	3,52	Fe-Ar	1,16	86,70
C4	59,45	4,46	Fe-Cl	0,73	56,49	2,74	Fe-Ar	1,68	57,97

Comparando-se os dados de pontuação da docagem e as distâncias de interação das 3 séries, é possível observar que para a **série B** os compostos ficam numa posição semelhante no sítio ativo (Figura 23A), com uma curta distância entre o íon Fe(II) do heme e o nitrogênio dos ligantes, indicando uma coordenação efetiva, enquanto que para a **série C** não há uma boa sobreposição das poses, as quais parecem envolver somente interações menos efetivas com distâncias maiores (predominantemente forças atrativas do tipo íon-dipolo permanente ou íon-dipolo induzido).

Uma possível explicação para esse fato pode ser o maior impedimento estérico conferido pelos anéis aromáticos ligados no anel heterocíclico da **série C**, fato este que atrapalharia o posicionamento do mesmo próximo ao ponto de interação com o grupo heme. Esses resultados levam a sugerir que essa série não teria tanto potencial para interagir com a enzima em condições experimentais e, portanto, inibir a CYP51.

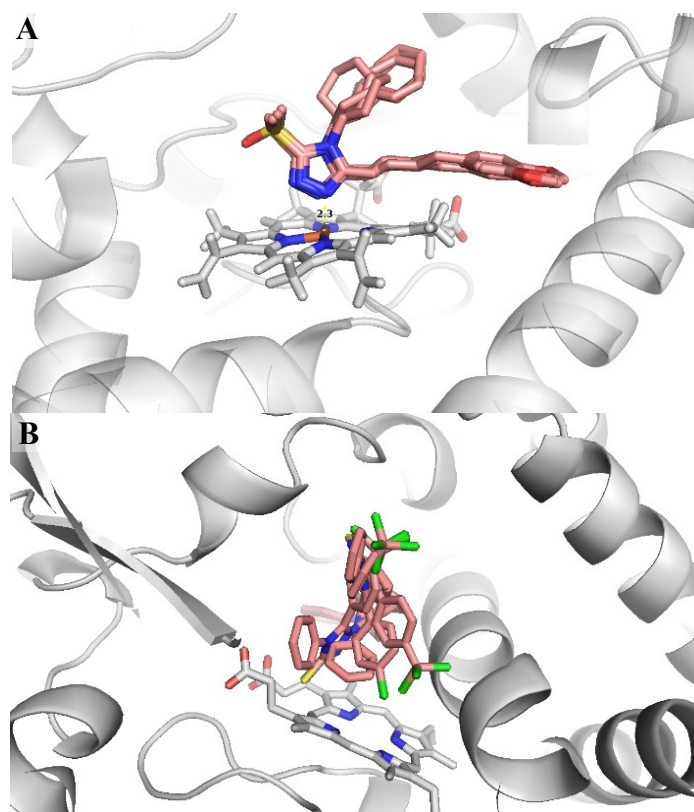


Figura 23: Comparação da sobreposição dos melhores resultados das docagens com inibidores **B1, B2, B3, B9, B10, B11** (que foram sintetizados e avaliados experimentalmente) (A) e **C1, C2, C3, C4** (B). A CYP51_{Tc} está representada em forma *cartoon* na cor cinza claro, o grupo heme com átomos de C da mesma cor, está representado em forma de bastões e os ligantes de ambas as séries estão representados com átomos de C na cor rosa em forma de bastões.

6.1.3.2. Docagem Molecular na CYP51 de *H. sapiens*

Foi feita uma docagem dos compostos planejados da **série B** na estrutura da CYP51_{Hs} (PDB: 6UEZ) com a finalidade de buscar alguma distinção de interações enzima-ligante que pudesse indicar uma possível seletividade dos compostos para a CYP51_{Tc}. Dessa forma, utilizamos os mesmos parâmetros da docagem feita anteriormente para tornar a comparação mais confiável, inclusive, removendo todas as moléculas de água para a docagem.

A Tabela 9 contém os valores de pontuação, distância entre o íon Fe(II) do grupo heme e o ligante (em Å), o grupamento do ligante que participa da interação e o valor de energia torcional (ΔE_{Torc}) para as docagens feitas em duplicata. É possível observar que embora os valores de pontuação sejam equiparáveis com as pontuações da docagem na CYP51_{Tc}, não houve em geral soluções com interação entre o nitrogênio triazólico dos

ligantes com o íon Fe(II) do grupo heme para os ligantes da **série B** e, em alguns casos, as poses ficaram com uma distância grande com relação ao íon Fe(II) e seus pontos de interação foram apenas com resíduos de aminoácidos mais distantes do sítio ativo.

Tabela 9: Valores de pontuação, distância entre o íon Fe(II) do heme e os ligantes, energia torcional resultantes da docagem dos compostos da série B com a estrutura da CYP51_{Hs} (6UEZ), feito sem as moléculas de água e em duplicata.

Ligante	Docagem 1			Docagem 2			Média Pont.
	Pont.	Distância (Å)/ Interação	$\Delta E_{\text{Torc.}}$	Pont.	Distância (Å)/ Interação	$\Delta E_{\text{Torc.}}$	
B1	96,35	*	0,72	97,65	*	1,33	97,00
B2	96,73	*	1,15	97,54	*	1,11	97,13
B3	95,96	*	1,93	95,84	*	1,85	95,90
B4	93,53	3,82/ Fe-fenetil	2,46	95,34	3,58/ Fe-fenetil	2,01	94,43
B5	90,42	3,33/ Fe-naftil	1,79	88,92	3,27/ Fe-naftil	2,07	89,67
B6	93,84	2,30/ Fe-naftil	2,52	94,22	2,34/ Fe-triazol	2,59	94,03
B7	84,81	3,27/ Fe-naftil	2,82	85,34	3,75 Fe-naftil	2,96	85,08
B8	81,41	3,42/ Fe-naftil	2,90	80,91	3,97/ Fe-naftil	3,05	81,16
B9	76,82	*	0,78	77,27	5,60	0,63	77,05
B10	80,62	*	1,40	80,22	*	1,24	80,42
B11	82,68	3,61/ Fe- ciclohexil	1,67	83,55	3,63/ Fe- ciclohexil	1,83	83,11
B12	80,23	3,57/ Fe-ciclohexil	2,30	80,60	3,59/ Fe- ciclohexil	2,22	80,42
B13	88,57	*	1,13	87,48	*	1,47	88,03
B14	90,83	2,36/Fe- triazol	1,30	92,67	2,37/ Fe- triazol	1,71	91,75
B15	91,27	*	2,18	90,43	*	2,23	90,85
B16	84,78	3,51/ Fe-piperidina	2,05	84,92	*	2,63	84,85
B17	71,08	2,67/ Fe- triazol	1,96	71,22	2,67 Fe- triazol	1,92	71,15
B18	88,62	2,57/ Fe- triazol	2,28	87,68	2,64/ Fe- triazol	2,68	88,15
B19	60,13	2,58/ Fe- triazol	3,26	56,72	2,60/Fe- triazol	3,35	58,43
B20	39,17	3,63/ Fe- triazol	4,07	35,28	2,86/ Fe- triazol	3,31	37,22

*não houve nenhuma solução que apresentasse interações com o ferro.

A análise das poses geradas pela docagem permitiu observar que apenas 5 ligantes (**B14, B17-B20**) interagiram com o ferro pelo nitrogênio do triazol e os mesmos formaram adicionalmente uma ligação de hidrogênio com o resíduo de alanina (ALA-144) conforme é possível observar na imagem A da Figura 24, já os demais compostos apresentaram uma distância maior em relação ao ferro e adicionalmente alguns formaram ligação de hidrogênio

com uma tirosina (TYR-131), conforme é possível observar os exemplos dos ligantes **B1-B3**, **B9**, **B10**, **B13** e **B15** na imagem B da Figura 24.

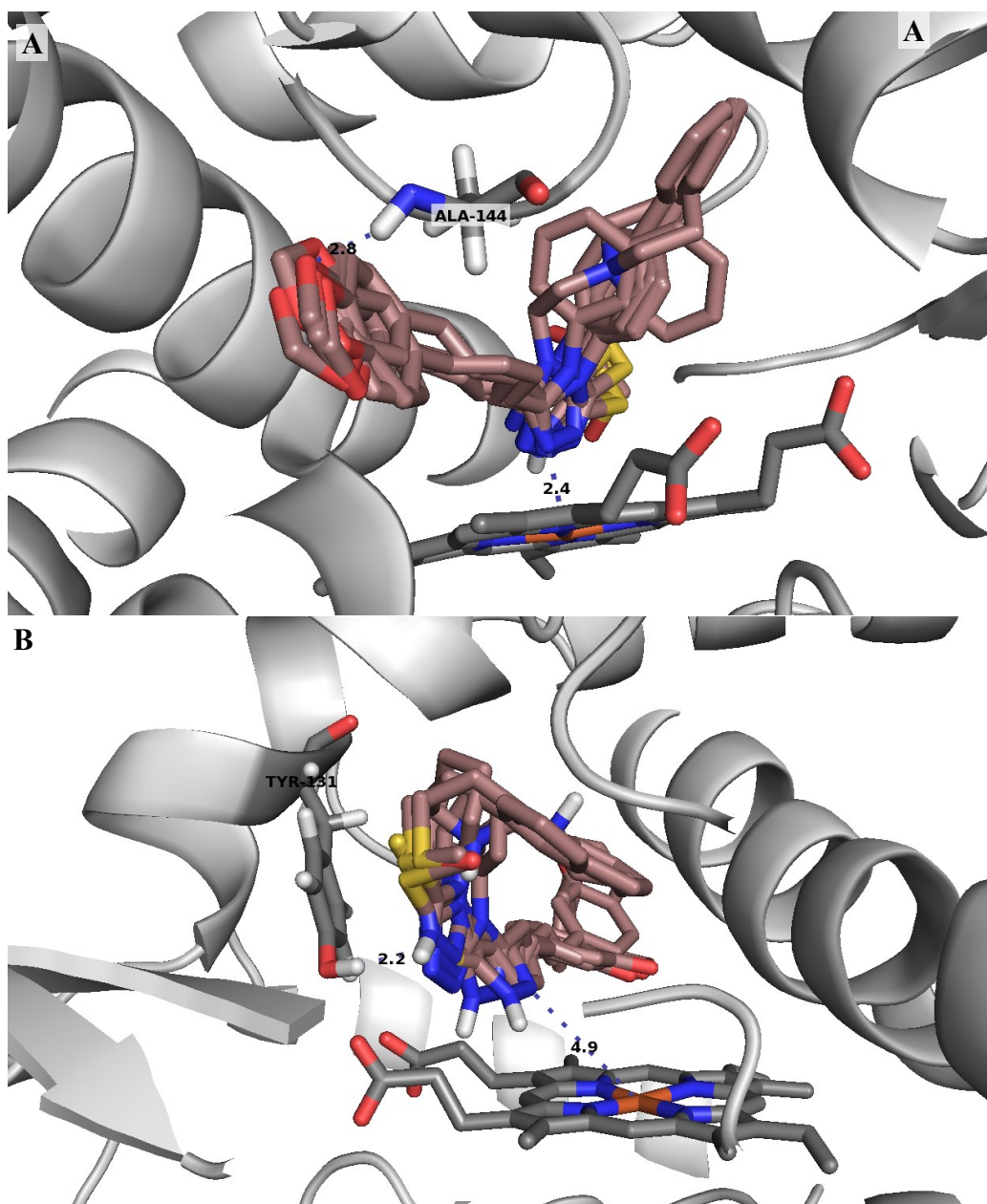


Figura 24: Sobreposição das melhores poses geradas pela docagem dos compostos da série **B** na 6UEZ (CYP51_{Hs}) (enzima representada em *cartoon* cinza claro; grupo heme representado com bastões com átomos de C em cinza escuro e ligantes representados em bastões com átomos de C em rosa). A) sobreposição das poses dos compostos (**B14**, **B17-B20**) que interagiram pelo nitrogênio do anel triazólico. B) sobreposição das poses dos compostos (**B1-B3**, **B9**, **B10**, **B13** e **B15**) que interagiram por outros grupos da estrutura.

Além disso, um outro aspecto explorado em uma outra docagem com essa enzima, foi a avaliação da relevância de uma molécula de água presente na estrutura cristalográfica da 6UEZ, em uma região próxima ao grupo heme no sítio ativo, e que poderia interagir de maneira favorável com os ligantes, favorecendo a inibição. Para tal, durante a definição dos parâmetros da docagem, na etapa de remoção das moléculas de água, a molécula 708 foi selecionada e em seguida a opção “Extract Waters for Docking” foi ativada, e em seguida, as demais moléculas de água foram deletadas para a docagem, dessa forma, o programa mantém apenas a molécula desejada, de forma ativa, durante o processo.

Tabela 10: Valores de pontuação, distância entre o íon Fe(II) do heme e o ligantes da série B com a estrutura da CYP51_{Hs} (6UEZ) mantendo uma molécula de água presente na estrutura cristalográfica, feita em duplicata.

Ligante	Pont.	Docagem 1			Docagem2		
		Distância (A) /Interação	Interação com água	Pontuação	Distância (A) /Interação	Interação com água	Média das pontuações
B1	91,80	X	sim	97,84	X	sim	94,82
B2	95,51	X	Sim	97,01	X	não	96,26
B3	92,28	X	Sim	90,06	X	não	91,17
B4	82,54	3,59/fenetil	Sim	88,94	3,29/fenetil	sim	85,74
B5	89,82	3,33/naftil	Não	90,47	3,31/naftil	não	90,15
B6	93,42	2,41/triazol	Não	96,44	2,31/triazol	não	94,93
B7	86,07	3,24/naftil	Sim	86,27	3,22/naftil	sim	86,17
B8	86,28	3,32/naftil	Sim	85,83	3,27/naftil	sim	86,06
B9	77,75	X	Não	79,86	3,61/ciclohexil	sim	78,81
B10	82,48	3,66/ciclohexil	Não	83,60	3,57/ciclohexil	sim	83,04
B11	80,10	3,60/ciclohexil	Sim	84,74	3,56/ciclohexil	sim	82,42
B12	81,06	3,86/ciclohexil	Sim	82,00	3,58/triazol	sim	81,53
B13	91,02	X	Sim	92,70	X	sim	91,86
B14	92,83	2,73/triazol	Não	92,45	2,70/triazol	não	92,64
B15	97,18	X	Sim	97,08	X	sim	97,13
B16	86,71	3,45/piperidina	Sim	86,91	3,56/piperidina	sim	86,81
B17	71,92	2,67/triazol	Não	72,09	2,67/triazol	não	72,00
B18	88,52	2,54/triazol	Não	89,42	2,64/triazol	não	88,97
B19	57,70	2,61/triazol	Não	60,19	2,61/triazol	não	58,94
B20	37,42	3,63/triazol	Não	39,06	3,74/triazol	não	38,24

Com essa nova docagem, foi possível observar que embora para alguns ligantes, tenha havido uma interação da molécula de água com os mesmos, essa interação não foi tão benéfica ao ponto de favorecer a interação pelo nitrogênio triazólico, ao contrário, a maioria das soluções em que essa interação ocorreu, não houve simultaneamente nenhuma interação com a água.

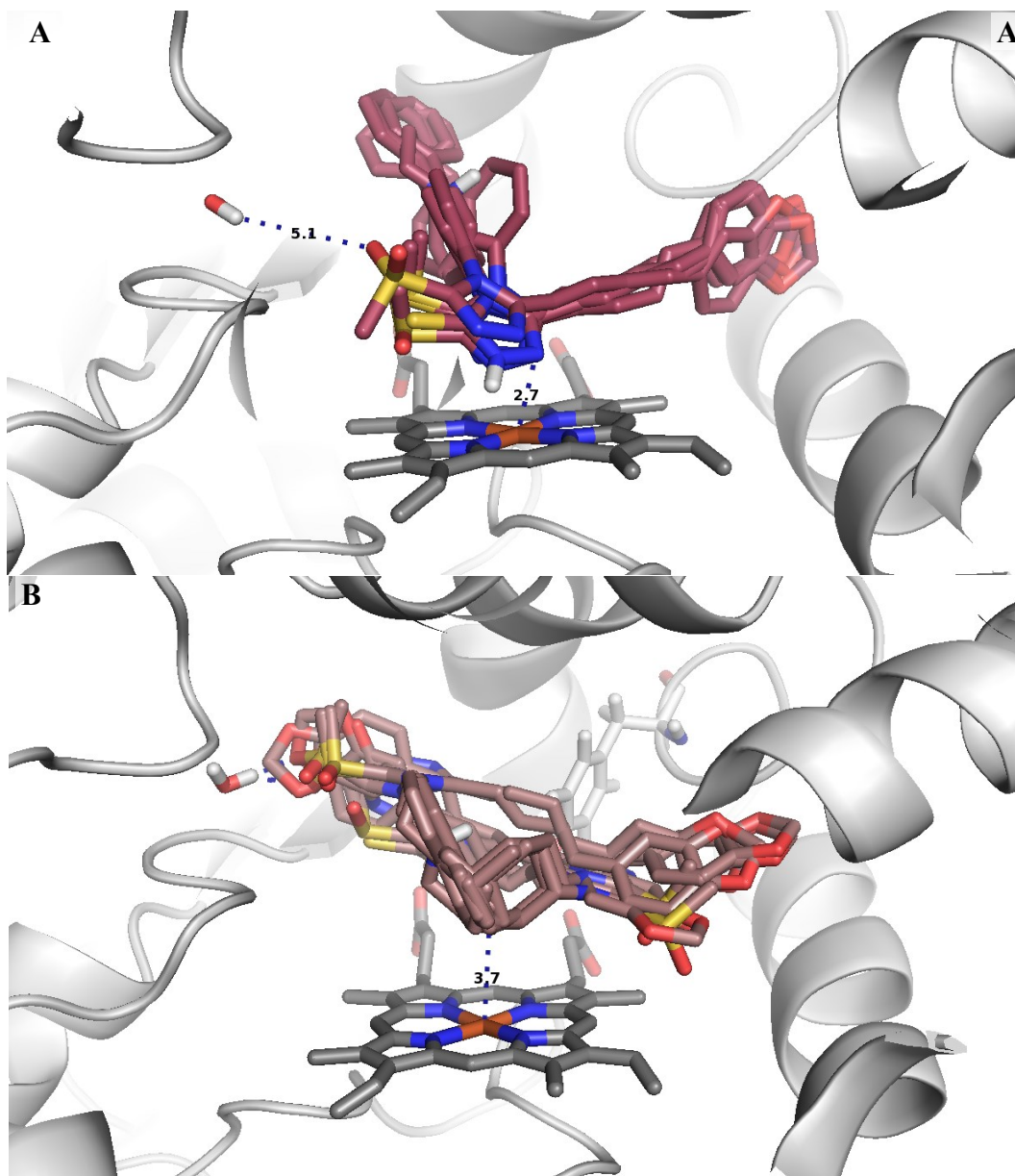


Figura 25: Sobreposição das melhores poses geradas pela docagem dos compostos da **série B** na 6UEZ (CYP51_{Hs}) mantendo a molécula de água presente no sítio ativo (enzima representada em *cartoon* cinza claro; grupo heme representado com bastões com átomos de C em cinza escuro e ligantes representados em bastões com átomos de C em rosa). A) sobreposição das poses dos compostos que interagiram pelo nitrogênio do anel triazólico, onde observa-se pouca relevância da interação com a molécula de água. B) sobreposição das

poses dos compostos que interagiram por outros grupos da estrutura, nota-se que para alguns compostos, houve interação com a molécula de água.

6.1.4 Cálculo de Entalpia de Interação CYP51-Inibidor

Os métodos PM6 e PM7 do programa MOPAC2016 foram utilizado para calcular os valores de entalpia dos complexos enzima-inibidor $\Delta H_{(E-I)}$, dos inibidores $\Delta H_{(I)}$, da água $\Delta H_{(H_2O)}$ e da enzima vazia $\Delta H_{(E)}$, conforme descrito na **Equação 1** do item 5.1.45. Para os compostos das **séries A e B**, foi utilizado o método PM7 com o objetivo de se desenvolver um novo modelo teórico com o método PM7 para comparação com o modelo desenvolvido anteriormente com o método PM6. Para os compostos da **série C**, as entalpias de interação foram determinadas utilizando o método PM6 e utilizando o método PM7, ainda não foram finalizados.

Foi avaliada a existência de uma correlação linear, utilizando o programa OriginPro 2019B, entre os valores de atividade ($\log CE_{50}$) dos compostos da **série A** e seus respectivos valores de ΔH_{int} calculados com o método PM7, que apresentou um coeficiente de correlação linear de Pearson baixo, $r=0,53$, como esperado da influência dos demais termos na energia livre de interação.

Tabela 11: Resultados de entalpia obtidos com o método PM7 para os sistemas referentes à interação dos inibidores da série A com a estrutura 4H6O da CYP51_{Tc}.

Ligante	$\Delta H_{(E-I)}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{(I)}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{int.}^*$	$\Delta H_{(E)}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{(H_2O)}$ (kcal/mol)
A1	-7487,48	-42,60	-94,72	-7412,79	-62,62
A2	-7457,41	-37,41	-69,84		
A3	-7437,89	-32,57	-55,15		
A4	-7391,49	-16,16	-25,17		
A5	-7336,34	28,75	-14,93		
A6	-7287,07	57,05	6,04		
A7	-7368,83	34,03	-52,69		
A8	-7448,86	8,51	-107,21		
A9	-7370,88	61,75	-82,48		
A10	-7354,46	18,74	-23,04		
A11	-7346,18	29,67	-25,69		

A12	-7346,61	30,17	-26,62
A13	-7340,24	30,05	-20,13
A14	-7376,15	39,90	-65,89
A15	-7386,55	25,37	-61,76
A16	-7348,37	17,49	-15,69
A17	-7334,25	35,84	-19,92
A18	-7350,75	26,45	-27,04
A19	-7379,25	21,37	-50,46
A20	-7282,48	54,30	13,38
A21	-7284,05	26,19	39,93
A22	-7284,82	41,72	23,63
A23	-7275,12	94,16	-19,12
A24	-7379,52	22,92	-52,28
A25	-7334,42	20,76	-5,02
A26	-7304,42	44,41	1,33
A27	-7281,56	40,76	27,85
A28	-7323,32	-19,61	46,45
A29	-7360,31	-28,50	18,35
A30	-7333,18	22,16	-5,18
A31	-7395,33	14,32	-59,49

*Calculado de acordo com a Equação 1

Observamos que os valores mais baixos foram os complexos formados pelos compostos **A1** e **A8**. Para o composto **A1**, ocorreu uma interação entre o oxigênio do ligante e a metila do grupo heme. Já para o **A8**, no complexo Inibidor-Enzima, é possível observar uma interação entre o grupo metila ligado ao anel aromático com o átomo de oxigênio do resíduo de tirosina (Tyr-89) que também participa de uma interação em forma de T ou do inglês, *T-shaped*, com o outro anel aromático, que se encontra ligado ao anel heterocíclico.

No caso do composto **A6** que experimentalmente se mostra um bom inibidor, mas em nossos cálculos, apresentou um valor de entalpia de interação positivo. Isso sugere que a formação do complexo não seria tão favorável e observamos que não ocorrem interações adicionais entre o composto e o sítio ativo, existindo apenas a interação do nitrogênio do anel heterocíclico com o ferro do grupo heme.

Para a **série B**, foram calculados os valores de entalpia com o método PM7 para que a atividade teórica fosse calculada utilizando o novo modelo e auxiliar na avaliação da eficácia do mesmo. Os valores encontrados podem ser observados na Tabela 12. Como esses compostos não têm atividade descrita em literatura, uma correlação linear da atividade com o ΔH_{int} não pôde ser determinada.

Tabela 12: Resultados dos cálculos semi-empíricos com o método PM7 para os sistemas referentes à interação dos inibidores da série B com a estrutura 4H6O da CYP51_{Tc}.

Ligante	$\Delta H_{(E-I)}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{(I)}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{\text{int.}}$ *	$\Delta H_{(E)}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{(H_2O)}$ (kcal/mol)
B1	-4793,58	44,55	-73,10	-4827,66	-62,62
B2	-4806,10	42,36	-83,43		
B3	-4853,16	7,63	-95,75		
B4	-4888,78	-45,62	-78,13		
B5	-4738,29	74,63	-47,89		
B6	-4776,35	71,77	-83,09		
B7	-4784,01	37,10	-56,08		
B8	-4844,43	-15,53	-63,87		
B9	-4799,66	7,58	-42,20		
B10	-4851,70	6,79	-93,45		
B11	-4868,51	-26,77	-76,71		
B12	-4874,86	-82,56	-27,27		
B13	-4697,52	131,72	-64,20		
B14	-4701,92	126,15	-63,04		
B15	-4669,65	84,01	11,38		
B16	-4776,15	35,78	-46,89		
B17	-4764,48	79,83	-79,28		
B18	-4770,97	76,64	-82,58		
B19	-4815,47	43,02	-93,46		
B20	-4869,09	-9,90	-94,16		

*Calculado de acordo com a **Equação 1**

O uso dos termos adicionais descritos na Equação 6 foi avaliado na busca de uma melhor função de previsão de atividade no modelo construído baseado em energia livre, que será discutido no próximo item.

Para a **série C**, foram calculados os valores de entalpia com o método PM6 para que a atividade teórica fosse calculada utilizando o modelo teórico já existente (Tabela 13). Cálculos adicionais estão sendo feitos com o método PM7 para a comparação e aplicação no

novo modelo construído, mas como ainda não puderam ser finalizados, a comparação dos resultados para essa série, ainda não é possível.

Tabela 13: Resultados dos cálculos semi-empíricos com o método PM6 para os sistemas referentes à interação dos inibidores da **série C** com a estrutura 4H6O da CYP51_{Tc}

Código	$\Delta H_{(E-I)}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{(I)}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{(E)}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{(H_2O)}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{int.}$ (kcal/mol)*
C1	-4408,93	239,90	-4714,05	-58,89	6,33
C2	-4537,57	139,93			-22,34
C3	-4401,55	234,14			19,47
C4	-4526,37	108,92			19,86

*Calculado de acordo com a **Equação 1**

6.1.5 Modelo Teórico para a Predição de Atividade Inibitória na CYP51_{Tc}

O modelo teórico (**Equação 7**, $r^2 = 0,83$) criado em trabalho anterior, foi feito através de uma regressão linear múltipla com os dados experimentais de EC_{50} da **série A** (ANDRINE, et al., 2003), além de valores teóricos de ΔH_{int} , ΔG_{solv} e ΔE_{tor} , de acordo com a Equação 6 discutida no item 5.1.5 da METODOLOGIA.

$$\log EC_{50} = (0,00503\Delta G_{solv} + 0,31582)\Delta G_{solv} + 0,01682\Delta H_{int} + 0,0723\Delta E_{tor} + 5,61266$$

Equação 7

No presente trabalho, buscamos utilizar como base o modelo já existente e avaliar a substituição do método semi-empírico PM6 pelo PM7 para a determinação do parâmetro referente à entalpia de interação do sistema. A construção do novo modelo foi feita seguindo a mesma metodologia, através de uma regressão linear múltipla utilizando o programa Origin 2019b. O coeficiente de correlação múltipla (r^2) obtido foi igual à 0,52 considerando todos os pontos (Tabela 14), mas removendo os 5 pontos que menos se adequavam à função por estarem fora da curva de correlação construída (**A2, A3, A5, A14 e A24**), foi possível obter uma nova função (Equação 8) com $r^2=0,86$.

Uma possível explicação para essa necessidade de remoção de alguns pontos que não puderam ser previstos pelo nosso modelo seria o fato de que os cálculos são baseados na

pose escolhida após a docagem. Possivelmente, a pose adotada não seria aquela que o composto iria se dispor durante a interação na realidade, principalmente para os compostos mais flexíveis (como o **A2** e **A3**), que apresentam mais possibilidades de posições durante a interação. Para tentar solucionar tal problema, poderia ser feito novos cálculos a partir de uma solução da docagem com conformação distinta.

Tabela 14: Valores referentes ao ΔH_{int} (método PM7), ΔG_{solv} (método SM5.4 do Spartan'14), ΔE_{tor} (função *ChemPLP*), $\log CE_{50}^{\text{exp}}$ e $\log CE_{50}^{\text{calc}}$ calculado pela Equação 7, dos compostos da **série A**.

Ligante	ΔH_{int} (kcal/mol)	ΔG_{solv} (kcal/mol)	ΔE_{tor}	$\log CE_{50}^{\text{exp}}$	$\log CE_{50}^{\text{calc}}$
A1	-94,72	-8,70	0,94	1,36	1,90
A2*	-69,84	-8,80	0,75	0,40	2,31
A3*	-55,15	-8,73	0,69	0,71	2,55
A4	-25,17	-9,00	1,11	2,65	2,60
A5*	-14,93	-15,62	1,47	2,66	1,12
A6	6,04	-13,29	0,58	1,86	2,36
A7	-52,69	-12,32	0,76	2,22	1,70
A8	-107,21	-9,26	0,41	1,90	1,92
A9	-82,48	-10,53	0,11	2,45	2,12
A10	-23,04	-8,23	0,66	2,52	3,10
A11	-25,69	-9,70	0,95	2,52	2,53
A12	-26,62	-9,85	1,02	2,81	2,43
A13	-20,13	-9,43	0,71	2,85	2,80
A14*	-65,89	-9,70	0,75	3,21	2,13
A15	-61,76	-10,28	0,48	1,62	2,21
A16	-15,69	-10,10	0,66	2,72	2,73
A17	-19,92	-7,68	0,70	3,04	3,26
A18	-27,04	-10,10	0,57	3,04	2,64
A19	-50,46	-5,82	1,24	3,45	3,06
A20	13,38	-53,81	1,46	3,57	3,62
A21	39,93	-10,62	0,43	3,57	3,45
A22	23,63	-6,22	0,92	3,73	4,08
A23	-19,12	-54,06	0,74	3,79	3,71
A24*	-52,28	-11,52	0,30	4,05	2,16
A25	-5,02	-5,79	0,59	4,03	4,03
A26	1,33	-7,59	0,13	3,99	3,90
A27	27,85	-6,56	0,78	4,13	4,12
A28	46,45	-8,46	0,22	4,15	4,19
A29	18,35	-9,51	0,53	3,53	3,38

A30	-5,18	-6,69	0,70	4,09	3,71
A31	-25,37	-7,19	0,66	3,34	3,34

*pontos removidos para a construção da nova equação

$$\log EC_{50} = (0,0771\Delta G_{solv} + 2,3119)^2 + 0,0127\Delta H_{int} - 0,608\Delta E_{tor} + 0,9811$$

Equação 8

A nova função construída com valores de ΔH_{int} calculados com o método PM7 ao invés do PM6 apresentou um coeficiente de correlação múltipla ligeiramente maior do que a função original, sugerindo assim que se trata de um modelo um pouco mais eficaz para a predição da atividade teórica de compostos. Em seguida, a determinação do $\log CE_{50}$ dos compostos foi feita utilizando o modelo ($\log CE_{50}^{calc}$, Tabela 14) e o coeficiente de Pearson (r) da correlação entre os dados experimentais ($\log CE_{50}^{exp}$) e os calculados foi igual à 0,68; removendo-se apenas dois pontos da curva (**A5** e **A24**), foi possível obter uma correlação com $r = 0,80$, mostrando assim a confiabilidade do modelo.

Em seguida, utilizamos o novo modelo construído para prever a atividade teórica dos compostos planejados para inibirem a CYP51_{Tc} referentes à **série B**. Os parâmetros utilizados para o cálculo e os valores de $\log CE_{50}^{calc}$ e CE_{50} podem ser encontrados na Tabela 15.

Tabela 15: Valores referentes ao ΔH_{int} (kcal/mol, método PM7), ΔG_{solv} (kcal/mol, método SM5.4 do Spartan'14), ΔE_{tor} (função *ChemPLP*) e $\log CE_{50}^{calc}$ calculado pela Equação 7, dos compostos da **série B**.

Ligante	ΔH_{int} (kcal/mol)	ΔG_{solv} (kcal/mol)	ΔE_{tor}	$\log CE_{50}$	CE_{50} (nM)
B1	-73,10	-19,73	1,19	-0,05	0,89
B2	-83,43	-15,08	0,99	0,64	4,36
B3	-95,75	-18,81	2,02	-0,73	0,19
B4	-78,13	-24,24	2,72	-1,47	0,03
B5	-47,89	-21,09	1,49	-0,07	0,85
B6	-83,09	-15,16	2,54	-0,31	0,48
B7	-56,08	-22,01	2,74	-1,02	0,09
B8	-63,87	-24,59	2,90	-1,42	0,04
B9	-42,20	-18,50	0,84	0,72	5,20
B10	-93,45	-13,26	0,84	0,94	8,77
B11	-76,71	-17,82	1,85	-0,24	0,58
B12	-27,27	-20,26	2,13	-0,10	0,79
B13	-64,20	-58,09	0,82	4,34	$2,18 \times 10^4$

B14	-63,04	-67,31	0,93	7,87	7,45 x 10 ⁷
B15	11,38	-62,01	1,76	6,13	1,34 x 10 ⁶
B16	-46,89	-67,38	2,51	7,15	1,40 x 10 ⁷
B17	-79,28	-20,33	2,29	-0,87	0,14
B18	-82,58	-14,99	2,25	-0,10	0,80
B19	-93,46	-20,69	3,29	-1,70	0,02
B20	-94,16	-24,33	3,58	-2,20	0,01

Existe uma correlação linear entre os valores de $\log CE_{50}$ calculados pela Equação 7 (feita com dados obtidos por PM6) e Equação 8 (feita com dados obtidos por PM7) que apresenta $r=0,92$. Entretanto, resultados anteriores feitos com o método PM6, indicaram que os compostos **B4**, **B12** e **B8** seriam os 3 mais ativos, mas utilizando o novo modelo construído com o método PM7, os 3 compostos mais ativos (teoricamente) seriam o **B20**, **B19** e **B4**.

Em seguida, utilizamos o modelo referente à Equação 7 para calcular a atividade teórica dos compostos da **série C** que não apresentam atividade descrita na literatura, justamente para ter um indicativo se os mesmos poderiam ser ativos para o alvo pretendido. Os parâmetros utilizados e os valores de atividade calculada se encontram na Tabela 16.

Tabela 16: Valores referentes ao ΔH_{int} (kcal/mol, método PM6), ΔG_{solv} (kcal/mol, método SM5.4 do Spartan'14), ΔE_{tor} (função *ChemPLP*) e $\log CE_{50}^{calc}$ calculado pela Equação 7, dos compostos da **série C**.

Ligante	ΔH_{int}^{PM6} (kcal/mol)	ΔG_{solv} (kcal/mol)	$\Delta E_{tors.}$	* $\log CE_{50}^{calc}$	* CE_{50}^{calc} (nM)
C1	6,33	-32,98	0,80	0,83	6,80
C2	-22,34	-19,02	0,80	1,11	12,82
C3	19,47	-41,90	0,89	1,60	39,99
C4	19,86	-23,84	0,73	1,33	21,33

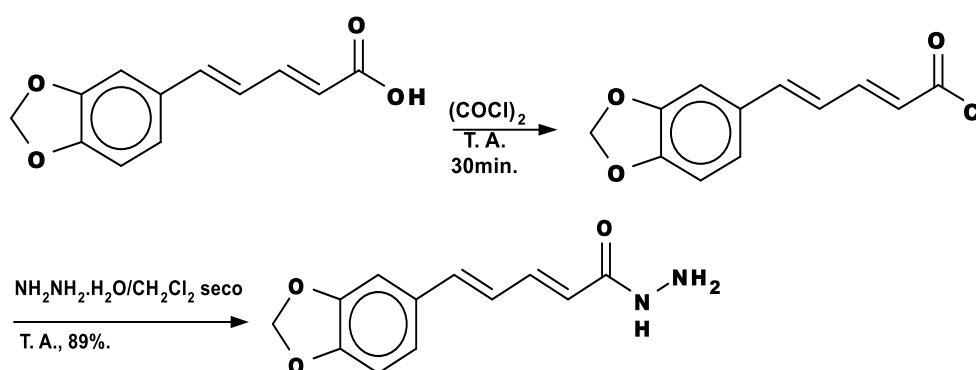
*Calculado com a equação 7

O resultado indica que todos os compostos devem ter alguma atividade e **C1** seria o mais ativo (meor valor de CE_{50} previsto). O composto **C1** teve o diferencial de ser o único que apresentou solução de docagem com interação pelo átomo de enxofre, que seria mais efetiva do que as demais soluções dos demais compostos, onde observamos interações com os anéis aromáticos ou por átomos de cloro. Embora os resultados de docagem não tenham sido tão promissores para a **série C** quanto a **série B**, os resultados de atividade teórica sugerem que eles podem causar inibição da CYP51_{Tc}.

6.2. Síntese de Compostos Planejados

Os compostos planejados da **série B** foram sintetizados tendo como base trabalhos anteriores realizados pelo grupo de síntese do laboratório de química medicinal (LaQMed) da UFRRJ, envolvendo compostos derivados da piperina (DE PAULA et al., 2000; FERREIRA, 2006; FERREIRA et al., 2012), principalmente no trabalho desenvolvido por Franklim e colaboradores (FRANKLIM et al., 2013) referente à síntese e avaliação de atividade dos compostos derivados da piperina, que foi usada como base para o planejamento de novos triazóis.

6.2.1 Preparação da (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dieno-hidrazida

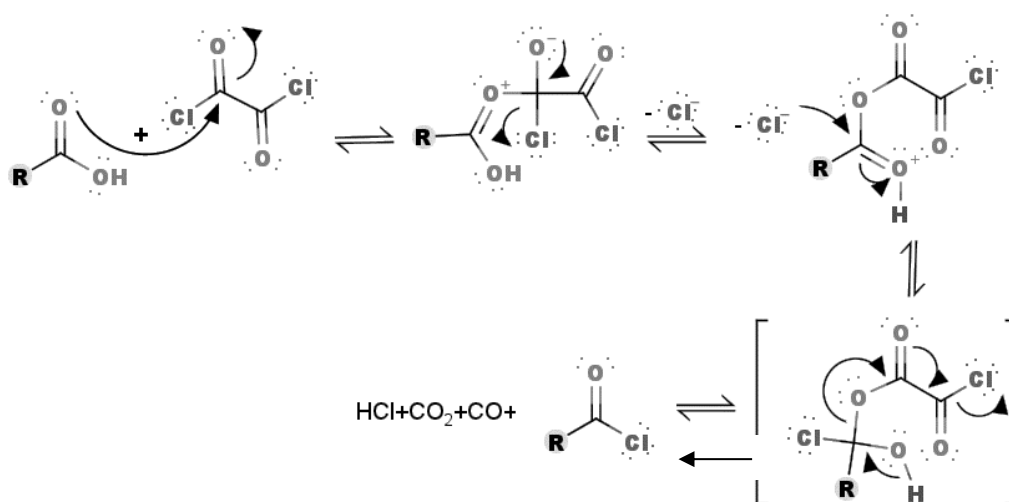


Esquema 11: Etapas de síntese da hidrazida a partir do ácido piperínico.

Para a formação da hidrazida, é necessário primeiramente uma etapa de reação para a formação de um cloreto de acila, através da reação do ácido piperínico com cloreto de oxalíla (COCl)₂ em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Essa primeira etapa é importante para que a etapa seguinte de Substituição Nucleofílica Acílica (S_NAc) seja possível. Isto porque os cloretos de ácido são mais reativos do que os ácidos carboxílicos, então essa reação prévia de ativação da carbonila que pode ser feita com (COCl)₂ ou cloreto de tioníla (SOCl₂) por exemplo, aumentando assim sua reatividade é essencial (MARCH, 1985).

Conforme estabelecido em trabalhos anteriores (CASTRO, 2016; FRANKLIM et al., 2013) nessa etapa a utilização do (COCl)₂ é adotada por ser vantajosa pois é um reagente mais reativo, os subprodutos que formam na reação (HCl, CO e CO₂) são voláteis e por isso

não contaminam o produto desejado. Além disso, esse reagente também possibilita que a reação seja feita em temperatura ambiente o que não seria possível, por exemplo, utilizando SOCl_2 , que requer a utilização de refluxo (MARCH, 1985). Nesta reação, como podemos observar na proposta mecanística representada no esquema, o oxigênio do ácido carboxílico ataca a espécie eletrofílica (o carbono do cloreto de oxalíla).



Esquema 12: Proposta do mecanismo genérico de formação de cloretos de acila em presença de cloreto de oxalíla (Adaptado de MARCH, 1985).

A reação foi feita em temperatura ambiente, apenas com agitação por meio de uma barra de agitação magnética e foi utilizado gás nitrogênio durante todo o procedimento, pois o produto formado é altamente reativo à umidade e por isso é necessário a utilização de atmosfera inerte.

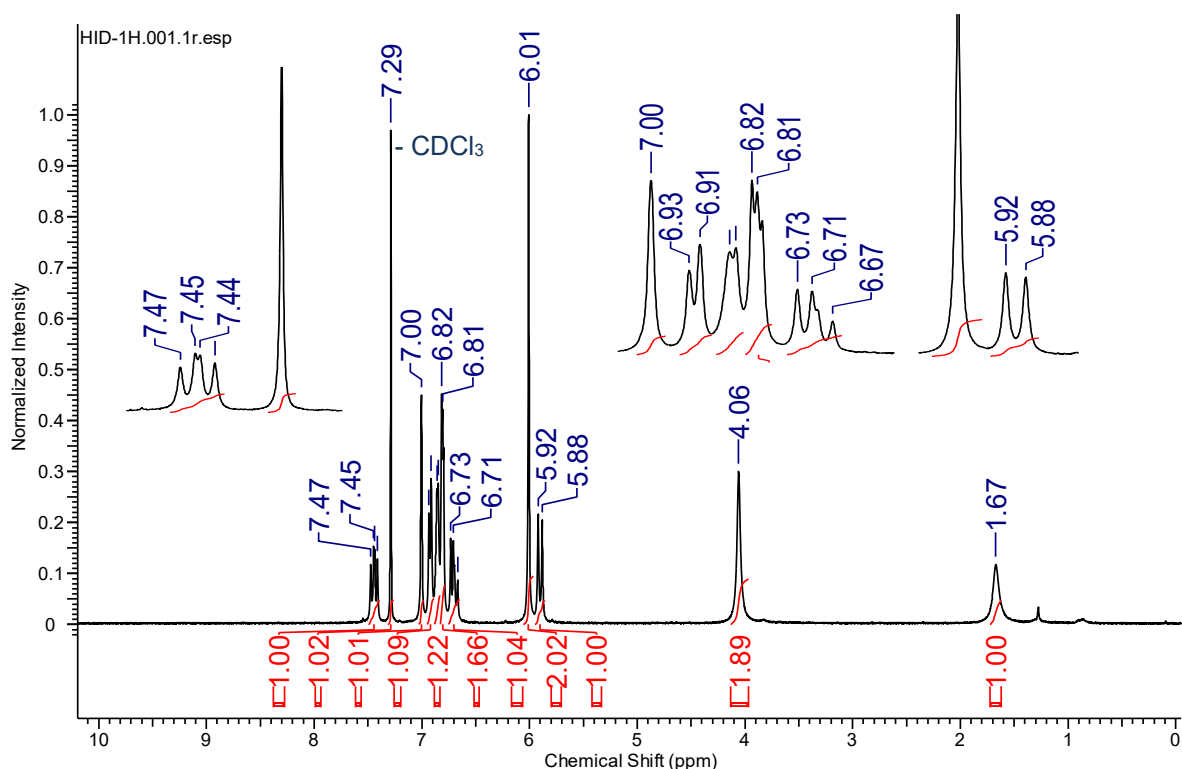
Um acompanhamento da reação foi feito por CCDA, porém a formação do produto é observada de maneira indireta, pois como o cloreto de ácido é bastante reativo, é necessário que seja feita uma reação de uma alíquota do produto com metanol, a fim de se obter o éster metílico correspondente. Do contrário, o produto reagiria com a umidade do ambiente, voltando ao ácido de partida, inviabilizando assim, a confirmação da formação do cloreto de ácido de interesse.

A alta reatividade do cloreto de ácido obtido também inviabiliza a quantificação do produto formado, nem sua purificação ou caracterização e por isso, produto foi imediatamente utilizado na etapa de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$ seguinte, para a formação da hidrazida.

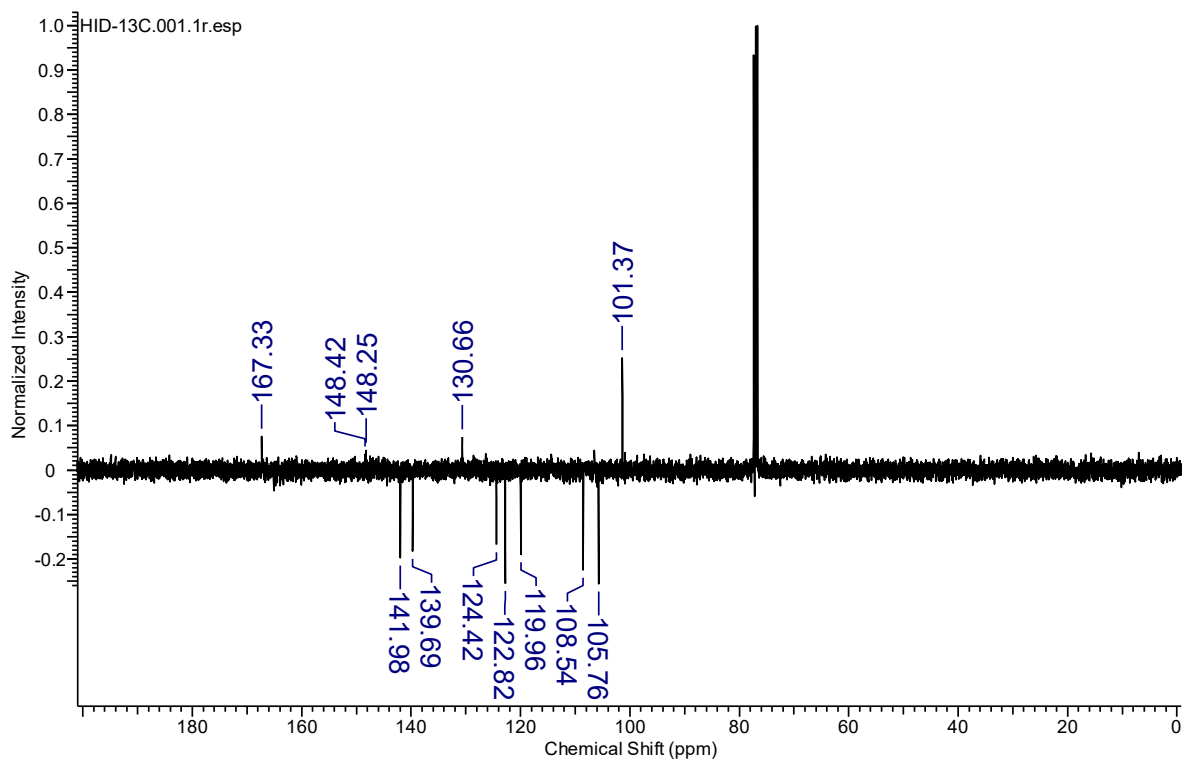
Na segunda etapa de reação, a preparação da hidrazida é feita através de uma reação de S_NAc entre o cloreto de acila e hidrazina monohidratada em diclorometano seco, em temperatura ambiente sob agitação, conforme o Esquema 11.

Conforme a metodologia bem estabelecida em nosso laboratório e descrito em literatura (CASTRO, 2016; FRANKLIM et al., 2013), essa reação é feita com a adição de cloreto de acila em CH_2Cl_2 seco sobre a solução da hidrazina monohidratada, nesta ordem, para evitar a formação de subprodutos (FRANKLIM, et al., 2013), como possivelmente a diacilidrazina e o oxadiazol (DE OLIVEIRA et al., 2012) de difícil separação. Essa exigência se baseia no fato de que mantendo um excesso de hidrazina, evita-se que a reação de S_NAc ocorra nos dois nitrogênios da mesma e forme-se os subprodutos indesejados.

A reação apresentou um rendimento de 89% e a hidrazida formada foi caracterizada por RMN 1H (Espectro 1) e RMN ^{13}C (Espectro 2), de acordo com as atribuições propostas que se encontram na Tabela 16, que foram condizentes com a literatura (CASTRO, 2016; FRANKLIM et al., 2013).



Espectro 1: RMN de 1H da acilidrazida (400 MHz) feito em $CDCl_3$.



Espectro 2: RMN de ^{13}C da acilidrazida (100 MHz) feito em CDCl_3

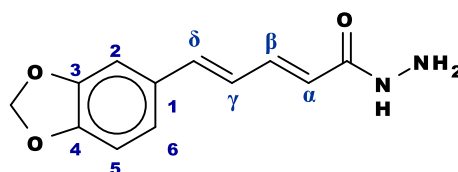


Figura 26: Estrutura da acilidrazida.

Tabela 17: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a acilidrazida.

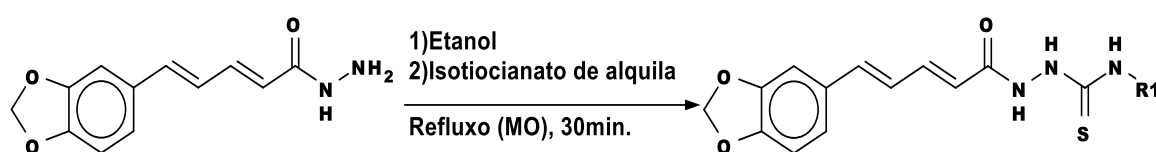
Posição	δ ^1H (ppm)	$J(\text{Hz})$	δ ^{13}C (ppm)
1	-		130,66 (C)
2	7,0 (s, 1H)		105,76 (CH)
3	-		148,42 (C)
4	-		148,25 (C)
5	6,92 (d, 1H)	8	108,54 (CH)
6	6,80-6,83 (m, 1H)		122,82 (CH)
α	5,90 (d, 1H)	14,8	119,96 (CH)
β	7,44 (dd, 1H)	14,8 e 11	141,98 (CH)
γ	6,67-6,73 (m, 1H)		124,42 (CH)

δ	6,86 (d, 1H)	4,45	139,69 (CH)
C=O	-		167,33 (C)
NH	1,67 (s, 1H)		-
NH ₂	4,06 (s, 2H)		-
OCH ₂ O	6,01 (s, 2H)		101,37 (CH ₂)

No Espectro 1 de RMN de ¹H observou-se um simpleto em δ 6,01 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, um dubleto δ 5,90 ppm referente ao hidrogênio α da cadeia olefínica, além de um grupo de sinais entre δ 6,85 e δ 7,44 ppm, com J_{trans} de 14,8 Hz de α e β acoplado entre si, referentes aos hidrogênios aromáticos e olefínicos da cadeia lateral, que são sinais bem característicos que confirmam a obtenção da hidrazida. Observou-se um simpleto em δ 4,06 ppm referente aos dois hidrogênios do grupamento NH₂ e um simpleto em δ 1,67 ppm referente ao grupamento NH (Tabela 17).

No Espectro 1 de RMN ¹³C notou-se um sinal em δ 167,33 ppm, referente ao carbono da carbonila da hidrazida, em δ 101,37 ppm referente ao carbono do anel metilenodioxílico, que também são sinais bem característicos do composto em questão, além dos demais sinais que podem ser observados na Tabela 17.

6.2.2 Preparação dos Intermediários 2-[(2E,4E)-5-(1,3benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-alkil/aril-hidrazinocarbotioamida



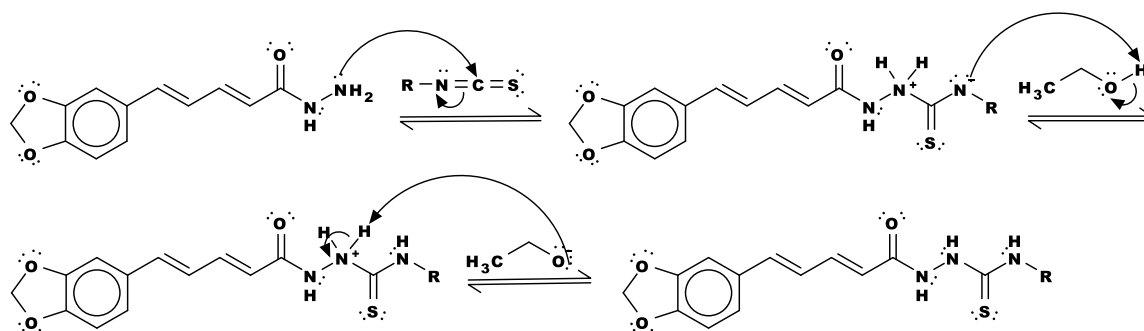
Esquema 13: Síntese dos intermediários hidrazinocarbotioamida a partir da acil hidrazida, para a posterior formação dos triazóis planejados.

A hidrazida é o intermediário comum na síntese dos triazóis planejados, pois a passagem por este intermediário está presente nas principais metodologias para formação deste núcleo heterocíclico através da conversão da hidrazida em um intermediário hidrazinocarbotioamida envolvendo geralmente, a utilização de isotiocianatos em condição de refluxo (CANSIZ et al., 2012; KHAN et al., 2010; MAVROVA et al., 2009).

Cansiz e colaboradores, em um trabalho para a identificação de novos inibidores da urease, sintetizaram triazóis através da reação com aquecimento convencional em refluxo por 4 horas, da hidrazida com isotiocianatos (em etanol) para formar hidrazinocarbotioamidas, estas por sua vez, posteriormente passaram por uma reação de ciclização intramolecular para formar os triazóis de interesse (CANSIZ et al., 2012).

No trabalho desenvolvido por Franklim e colaboradores, foi proposta uma adaptação nas metodologias clássicas, com a substituição do aquecimento convencional em chapa pela utilização de irradiação de micro-ondas com sistema aberto e refluxo, o que gerou uma diminuição significativa no tempo de reação (FRANKLIM et al., 2013, 2019). Tal metodologia, foi adotada com sucesso em trabalhos anteriores do nosso grupo e no presente trabalho (CASTRO, 2016), em que utilizamos os isotiocianatos de alquila, de acordo com cada derivado desejado, em etanol, com condição de refluxo, e irradiação de micro-ondas que possibilita um tempo bem menor de reação (30min), visto que nas metodologias clássicas, a reação pode durar várias horas (CANSIZ et al., 2012; KHAN et al., 2010; MAVROVA et al., 2009).

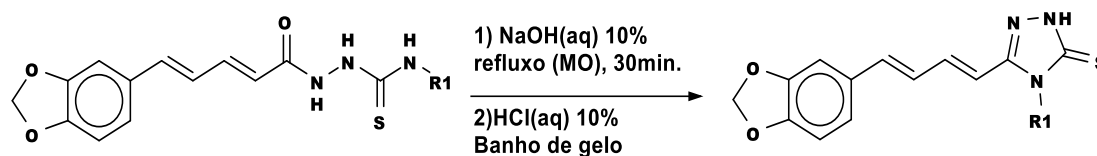
O Esquema 14 apresenta uma proposta mecanística para a reação de formação das hidrazinocarbotioamidas através da hidrazida.



Esquema 14: Mecanismo proposto para a obtenção dos intermediários carbotioamidas.

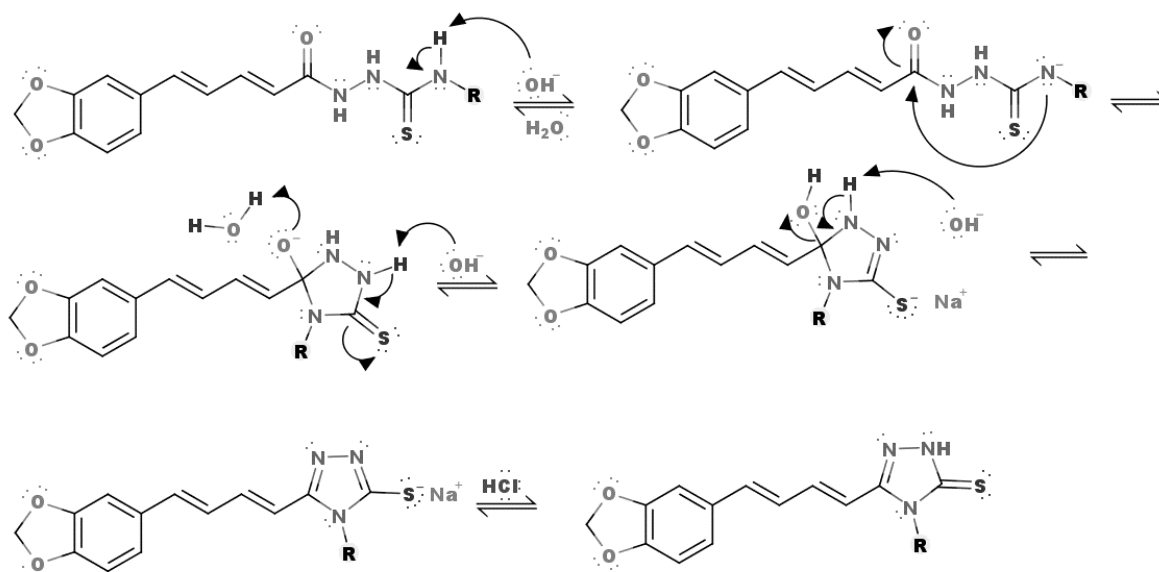
Os intermediários formados apresentaram coloração amarela e forma de sólido amorfo, eles foram imediatamente utilizados na etapa seguinte de ciclização do anel triazólico, para a formação dos compostos **B1**, **B5** e **B9**.

6.2.3 Preparação dos Derivados Triazólicos (2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona)



Esquema 15: Síntese dos compostos triazólicos.

Para a preparação dos derivados triazólicos, foi utilizada uma metodologia descrita na literatura em que se utiliza uma solução aquosa de NaOH e refluxo (CANSIZ et al., 2012; KHAN et al., 2010; MAVROVA et al., 2009), mas com uma adaptação para o uso de irradiação de micro-ondas em sistema aberto (100W e 100°C) para uma economia de tempo (CASTRO, 2016; FRANKLIM et al., 2013, 2019). O mecanismo proposto para a reação de ciclização que permite formar os derivados triazólicos pode ser observado no Esquema 16.



Esquema 16: Mecanismo proposto para a formação dos derivados triazólicos.

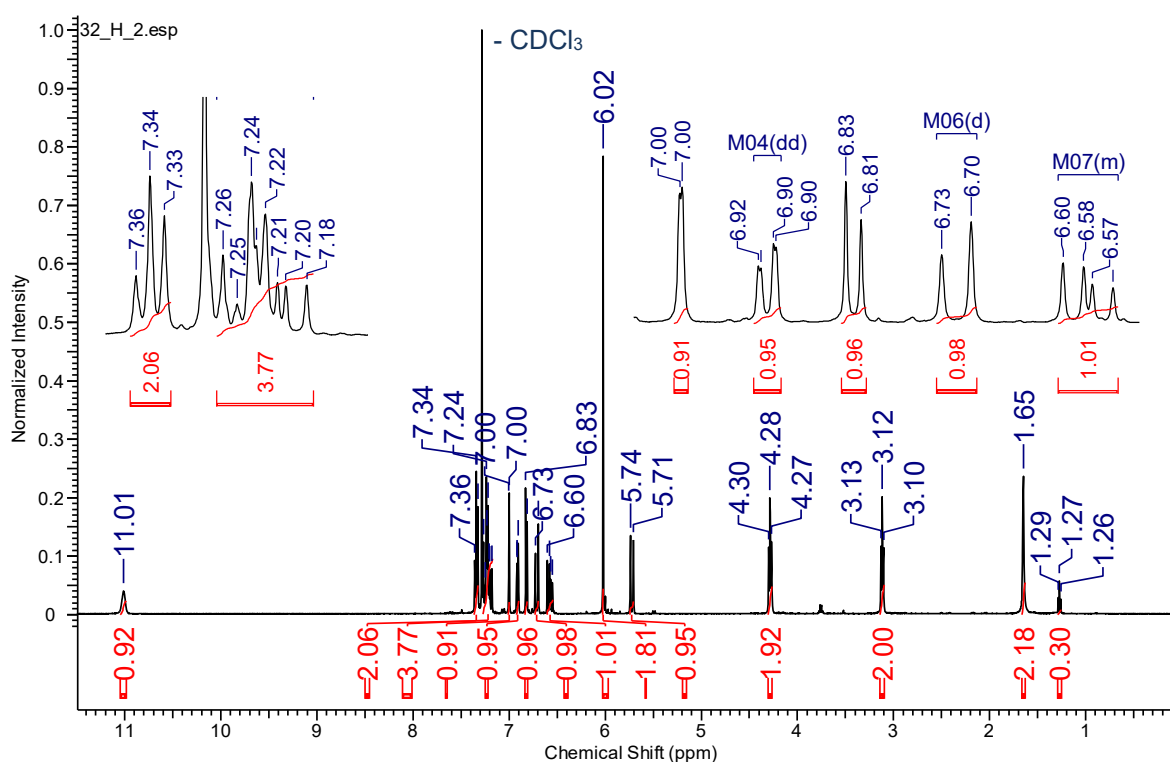
6.2.3.1. 3-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-(2-fenil)-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-5-tiona

Na reação de formação do derivado **B1**, após a adição de ácido clorídrico aquoso, observou-se a formação de um produto viscoso amorfo e por isso foi necessário fazer uma

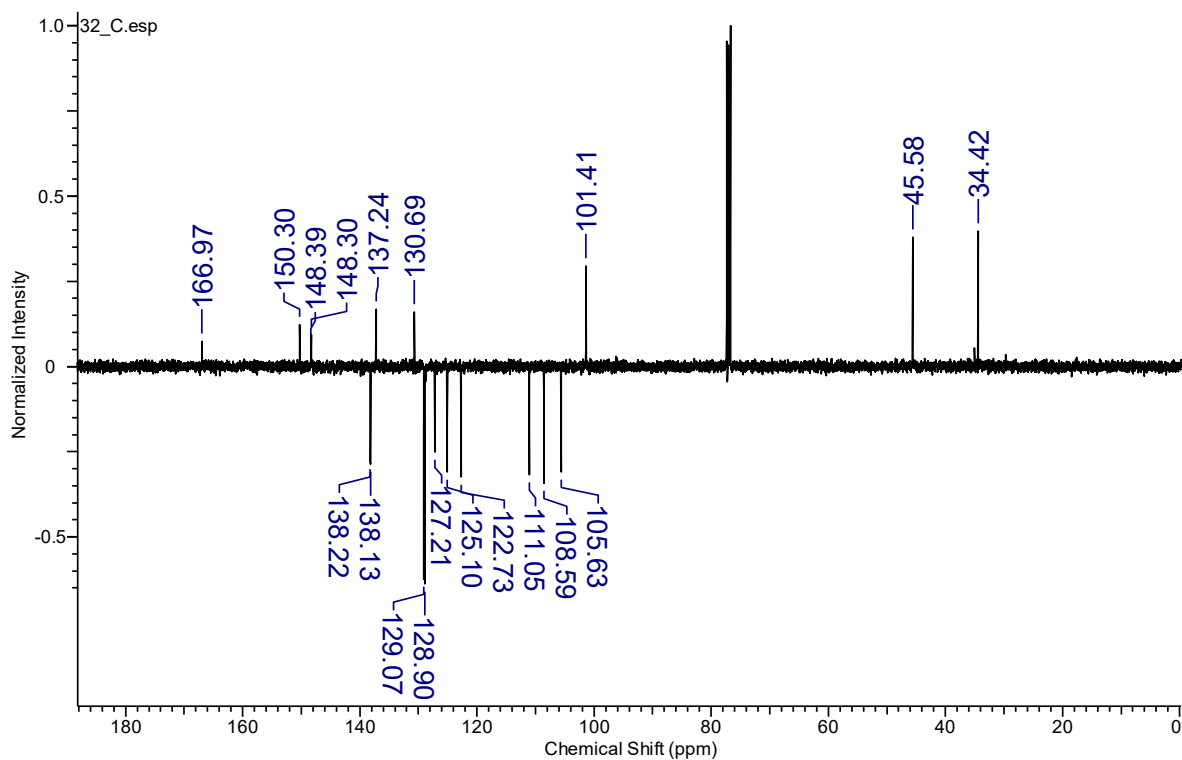
extração com acetato de etila (por três vezes), a fase orgânica foi filtrada em sulfato de sódio anidro (para a remoção de água residual) e após a remoção do solvente em rota evaporador, observou-se a formação de um sólido amorfo amarelo escuro.

Posteriormente, foi feita uma recristalização utilizando etanol para purificar o composto, que apresentou forma de um sólido com formato de agulhas, amarelo escuro, com um rendimento de 95%, a pureza determinada por HPLC (conforme as condições descritas no item 5.2.2) de 96% (Anexo 2) e PF = 212-213 °C.

A caracterização do derivado foi feita por RMN de ^1H (Espectro 3), de ^{13}C (Espectro 4) (condizente com a literatura), espectrometria de massas de alta resolução (Espectro 5) e difração de raios x dos cristais obtidos após a recristalização (item 6.3). As atribuições propostas podem ser observadas na Tabela 18.



Espectro 3: RMN ^1H do **B1** (500 MHz) feito em CDCl_3 .



Espectro 4: RMN ^{13}C do **B1** (100 MHz) feito em CDCl_3 .

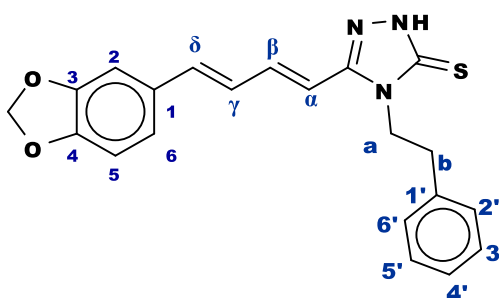


Figura 27: Estrutura do derivado **B1**.

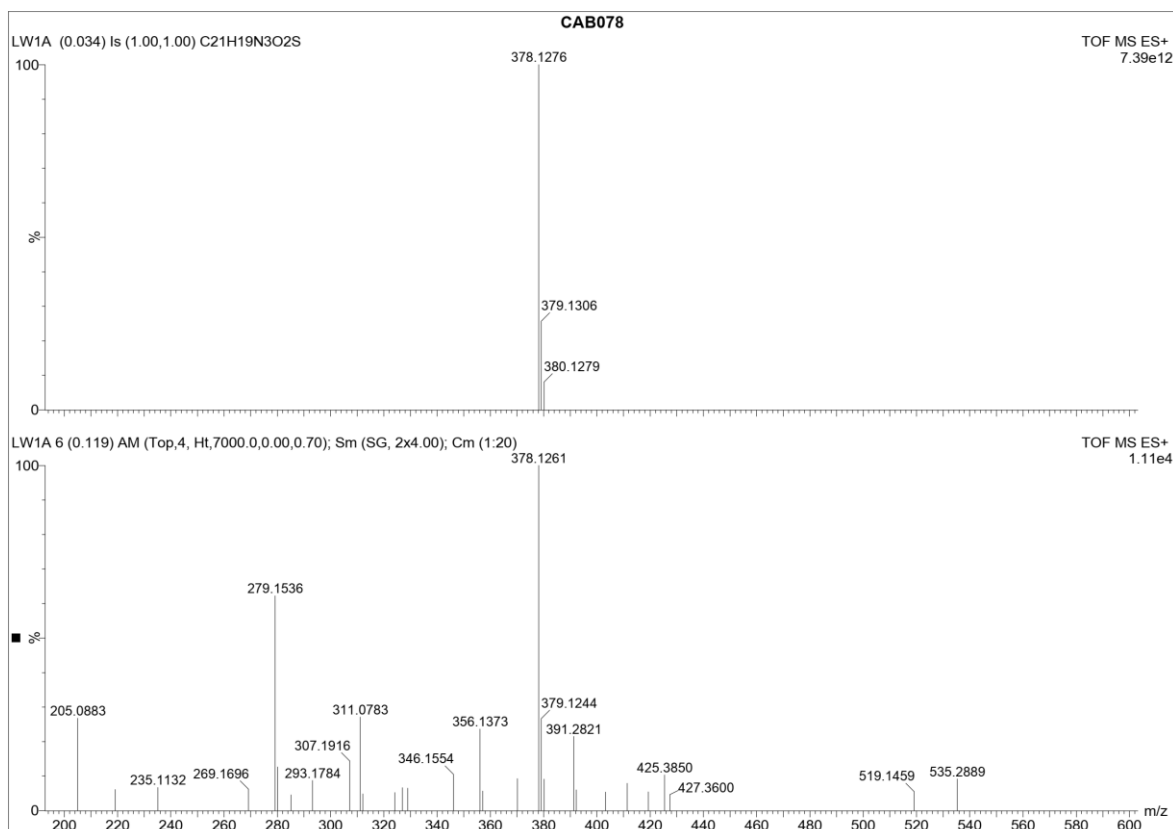
Tabela 18: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado **B1**.

Posição	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	-	130,69 (C)
2	7,00 (s, 1H)	1,3	105,63 (CH)
3	-	-	148,30 (C)
4	-	-	148,39 (C)
5	6,82 (d, 1H)	8,2	108,59 (CH)
6	6,91 (dd, 1H)	8,2 e 1,3	122,73 (CH)
1'	-	-	137,24 (C)

2'	7,18-7,26 (m, 1H)		127,21 (CH)
3'	7,34 (t, 1H)	1	129,07 (CH)
4'	7,18-7,26 (m, 1H)		128,90 (CH)
5'	7,34 (t, 1H)	1	129,07 (CH)
6'	7,18-7,26 (m, 1H)		127,21 (CH)
a	4,28 (t, 2H)	7,4	45,58 (CH ₂)
b	3,12 (t, 2H)	7,4	34,42 (CH ₂)
α	5,72 (d, 1H)	15,2	111,05 (CH)
β	7,18-7,26 (m, 1H)		138,22 (CH)
γ	6,54-6,60 (m, 1H)		125,10 (CH)
δ	6,71 (d, 1H)	15,2	138,13 (CH)
C=S	-		166,97 (C)
C=N	-		150,30 (C)
NH	11,01 (s, 1H)		-
OCH ₂ O	6,02 (s, 2H)		101,41 (CH ₂)

Os sinais observados tanto no espectro de RMN de ¹H, quanto no RMN ¹³C foram compatíveis com dados descritos na literatura para a caracterização do derivado (CASTRO, 2016). No espectro de RMN de ¹H observou-se um simpleto em δ 6,02 ppm (s, 2H), referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, os sinais entre δ 5,72 e δ 7,26 ppm com *J* de 15,2Hz referentes a cadeia olefínica e os sinais entre δ 6,82 ppm e δ 7,00 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos. Além destes, nota-se também sinais entre δ 7,18 ppm e δ 7,34 ppm correspondentes aos hidrogênios do anel aromático e os tripletos em δ 4,28 e 3,12 ppm com *J* de 7,4 Hz dos hidrogênios a e b, referentes ao grupo fenetil ligado ao anel triazólico, característico do composto **B1**. Observou-se ainda referente ao hidrogênio do NH do anel triazólico em δ 11,01 ppm.

No espectro de RMN ¹³C notou-se um sinal em δ 166,97 ppm, referente ao carbono ligado ao enxofre, outro em δ 150,30 ppm referente ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos no anel triazólico, além do sinal em δ 101,78 ppm referente ao carbono do anel metilenodioxílico. Observou-se também sinais entre δ 127,21 ppm e δ 129,07 ppm referentes aos CH e um sinal em δ 137,24 do carbono quaternário do anel aromático do grupo fenetil ligado ao anel triazólico. Além dos sinais do anel aromático e da cadeia olefínica, conforme a Tabela 19 que corroboram a caracterização da estrutura em questão.



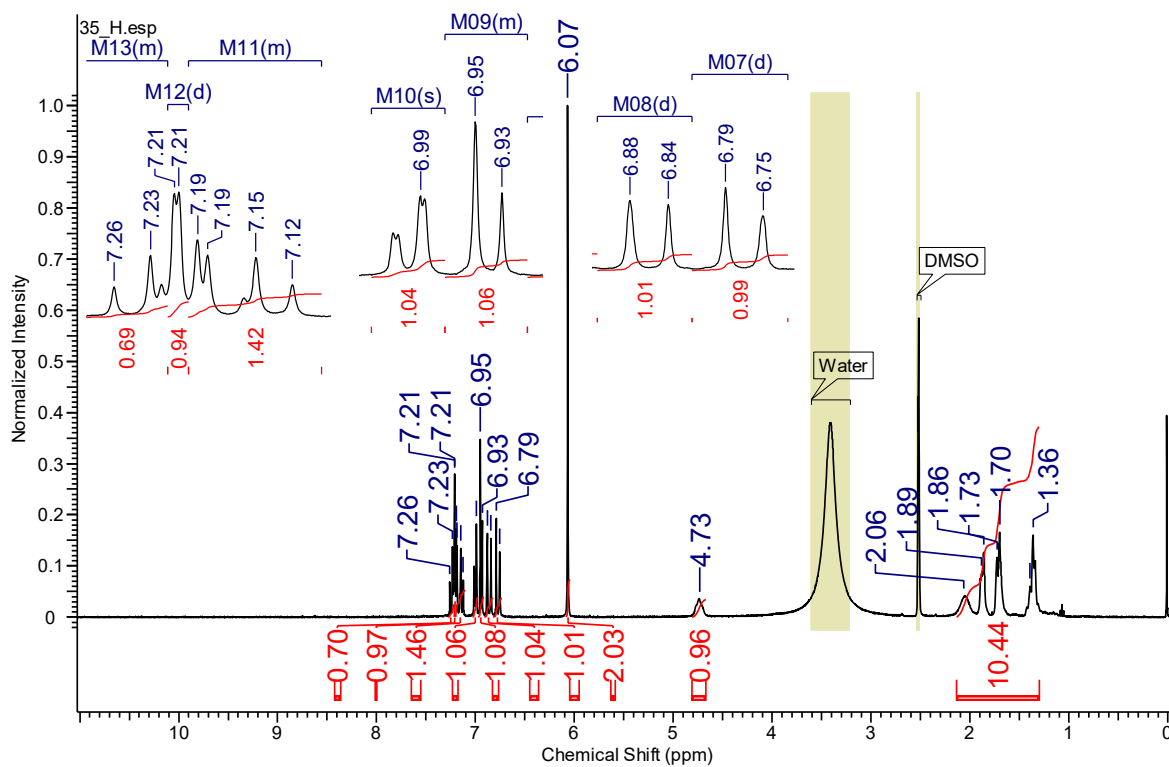
Espectro 5: Espectro de massas de alta resolução do composto **B1** – ES+ (em metanol).

Os espectros de massa indicam massa encontrada condizente com a massa esperada: HRMS-ES (m/z) $[M+H]^+$: encontrado 378.1261 esperada 378.1276. Como as quebras das fragmentações dos espectros são semelhantes para os derivados, serão apresentadas apenas as quebras referentes ao composto **B3** por ser um dos compostos inéditos.

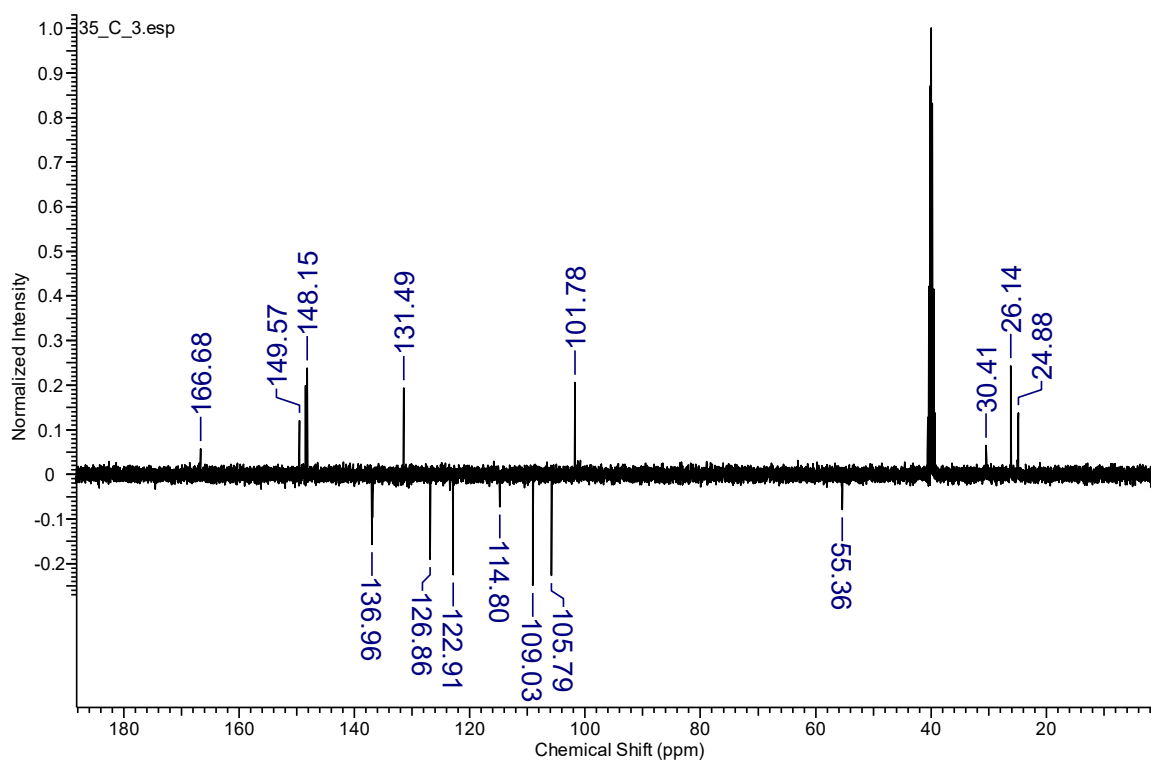
6.2.3.2. 3-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-ciclohexil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-5-tiona (**B9**)

Após a reação de formação do derivado **B9**, diferentemente do derivado **B1**, já se apresentou em forma de sólido amorfo amarelo, ao final da reação, então o produto foi filtrado e lavado com água destilada. Em seguida, foi feita uma recristalização utilizando etanol para purificar o composto, que apresentou forma de um sólido amarelo claro e um rendimento de 89%, pureza de 100% (Anexo 3) e o ponto de fusão determinado foi 246-248 °C, diferentemente do relatado em literatura (192-194°C (FRANKLIM et al., 2013)) mas as demais caracterizações permitem comprovar a formação do derivado desejado **B9**.

A caracterização do derivado foi feita por RMN de ^{13}C (Espectro 7), de ^1H (Espectro 6) e espectrometria de massas (e os dados obtidos foram condizentes com a literatura. As atribuições propostas podem ser observadas na Tabela 19.



Espectro 6: RMN ^1H do **B9** (500 MHz) feito em $\text{DMSO-}d_6$ (δ -ppm).



Espectro 7: RMN ^{13}C do **B9** (100 MHz) feito em DMSO-d (δ -ppm).

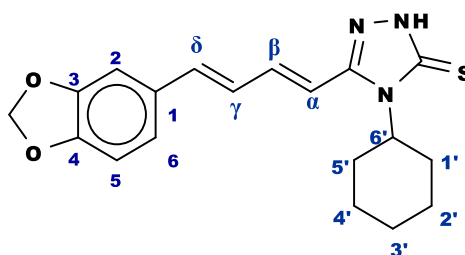


Figura 28: Estrutura do derivado **B9**.

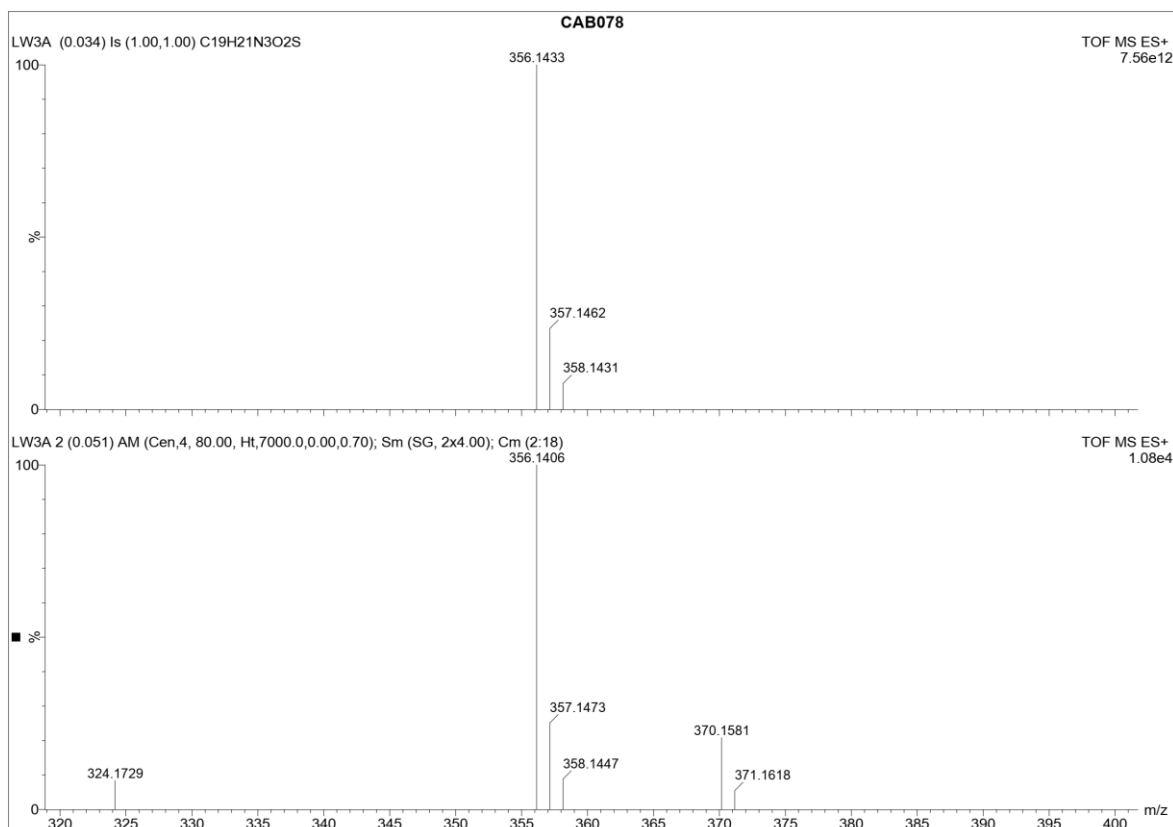
Tabela 19: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado **B9**.

Posição	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-		131,49 (C)
2	7,21 (d, 1H)	1,3	105,79 (CH)
3	-		148,15 (C)
4	-		148,45 (C)
5	6,94 (d, 1H)	8,0	109,03 (CH)
6	7,01 (dd, 1H)	8,0 e 1,51	122,91 (CH)
1'	1,35-2,07 (m, 10H)		55,36 (CH)
2'	1,35-2,07 (m, 10H)		30,41 (CH ₂)

3'	1,35-2,07 (m, 10H)		26,14 (CH ₂)
4'	1,35-2,07 (m, 10H)		24,88 (CH ₂)
5'	1,35-2,07 (m, 10H)		26,14 (CH ₂)
6'	4,73 (t, 1H)	11,5	30,41 (CH ₂)
α	6,77 (d, 1H)	14,4	114,80 (CH)
β	7,12-7,27 (m, 1H)		136,96 (CH)
γ	7,12-7,27 (m 1H)		126,86 (CH)
δ	6,86 (d, 1H)	14,8	136,86 (CH)
C=S	-		166,68 (C)
C=N	-		149,57 (C)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)		101,78 (CH ₂)

No espectro de RMN de ¹H a presença do grupo cicloexila, característico do composto **B9**, pode ser identificada pelos sinais entre δ 1,30 ppm e δ 2,15 ppm. O singlete em δ 6,07 ppm, pode ser atribuído aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, e os sinais entre δ 6,77 e δ 7,27 ppm referentes a cadeia olefínica com *J* de 14,4 e 14,8 para H _{α} e H _{δ} , respectivamente típicos de acoplamento de H trans. Os sinais entre δ 6,94 ppm e δ 7,21 ppm são referentes aos hidrogênios aromáticos, com *J* de 8,0 Hz para o H₅ e H₆, este que também apresenta um *J* de 1,51 Hz, já o H₂ apresenta um *J* de 1,2 Hz. A ausência do sinal referente ao hidrogênio do NH do anel triazólico pode ser oriundo de uma troca de hidrogênio com o solvente.

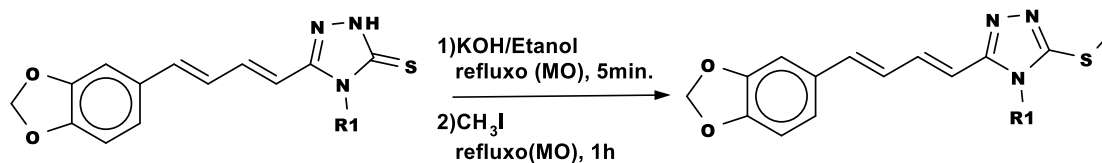
No espectro de RMN ¹³C o grupo cicloexila pode ser identificado através dos sinais entre δ 24,87 ppm e δ 30,41 ppm referentes aos CH₂ e o sinal em δ 55,36 ppm referente ao CH. O sinal em δ 166,68 ppm, pode ser atribuído ao carbono ligado ao enxofre e o outro em δ 149,57 ppm, foi atribuído ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos no anel triazólico. O sinal em δ 101,78 ppm, bem característico de compostos derivados da piperina, é referente ao carbono do anel metilenodioxílico, além dos demais sinais do anel aromático e da cadeia olefínica, conforme a Tabela 19 que corroboram a caracterização da estrutura em questão.



Espectro 8: Espectro de massas de alta resolução do composto **B9** – ES+ (em metanol).

Os espectros de massa indicam que a massa encontrada condizente com a massa esperada: HRMS-ES (m/z) $[M+H]^+$: encontrado 355,1433 esperada 355,1354.

6.2.4 Derivados da Piperina Triazólicos Alquilados



Esquema 17: Síntese dos compostos triazólicos alquilados.

Os derivados alquilados foram preparados utilizando para tal, uma metodologia proposta por Naveena e colaboradores (NAVEENA; BOJA; KUMARI, 2010), em que se utiliza uma solução etanólica de KOH e um haleto de alquila, neste caso, usamos o iodeto

de metila. Nesta metodologia original utiliza-se aquecimento e refluxo e a reação costuma durar aproximadamente 10h.

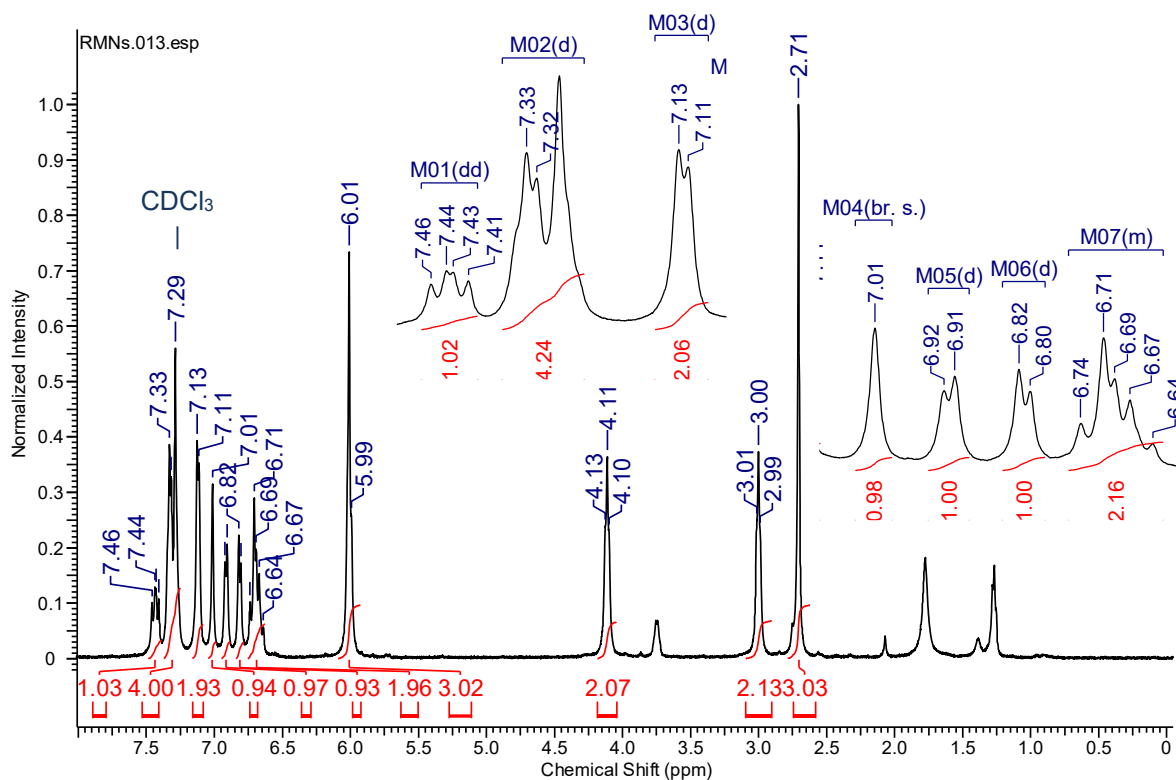
Já na metodologia adaptada e implementada por Franklim e colaboradores e reproduzida por Castro, a utilização de irradiação de micro ondas se mostrou bastante eficiente em termos de rendimentos e com relação principalmente ao tempo (e economia de recursos também) de reação que dura aproximadamente 2h.

Nesse tipo de reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), espera-se que haja quimiosseletividade, de maneira que o enxofre atue como o nucleófilo, visto que ele apresenta orbital HOMO com maior energia, quando comparado aos demais átomos. Assim, os elétrons de um dos pares solitários do enxofre se sobrepõem melhor porque sua energia mais alta é mais próxima à energia do orbital σ^* de alta energia da ligação C-I (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

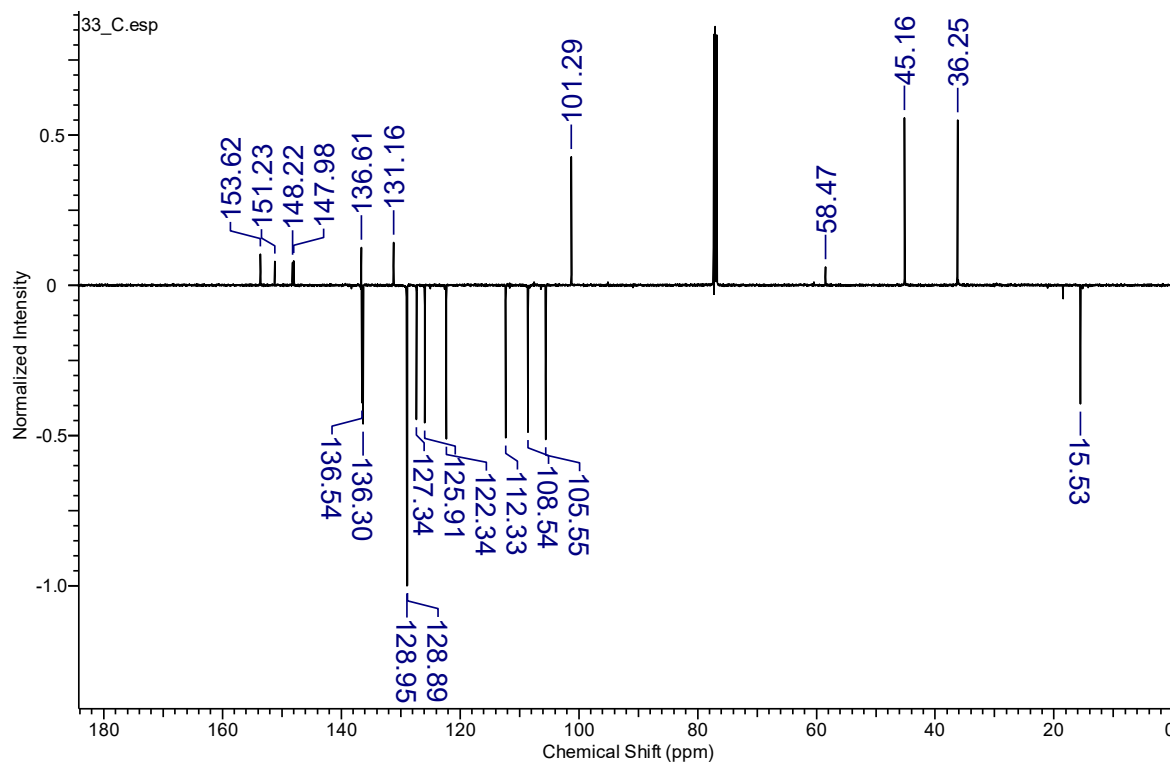
6.2.4.1. *3-[(1E,3E)-4-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-5-(metilsulfanil)-4-(2-fenetil)-4H-1,2,4-triazol (B2)*

A reação do derivado B2 teve 69% de rendimento e 99% de pureza. O produto apresentou aspecto amorfa e coloração laranja, com P. F. = 114-115 °C.

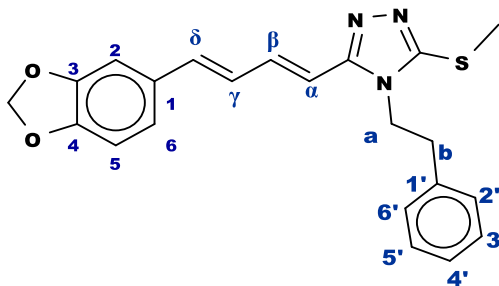
Ao final da reação foi feita uma extração e o solvente orgânico foi removido em rota evaporador, porém, o produto se apresentava com aspecto viscoso e por isso, o mesmo precisou ser deixado em geladeira com uma mistura de solventes – hexano (90%) e diclorometano (10%) – por cerca de uma semana. O solvente foi então removido em evaporador rotatório e o produto foi devidamente pesado e caracterizado por RMN de ^{13}C (Espectro 10), de 1H (Espectro 9) e espectrometria de massas, sendo que os dados obtidos são condizentes com os obtidos anteriormente (CASTRO, 2016). As atribuições propostas podem ser observadas na Tabela 20.



Espectro 9: RMN ¹H do **B2** (500 MHz) feito em CDCl₃.



Espectro 10: RMN ¹³C do **B2** (100 MHz) feito em CDCl₃.

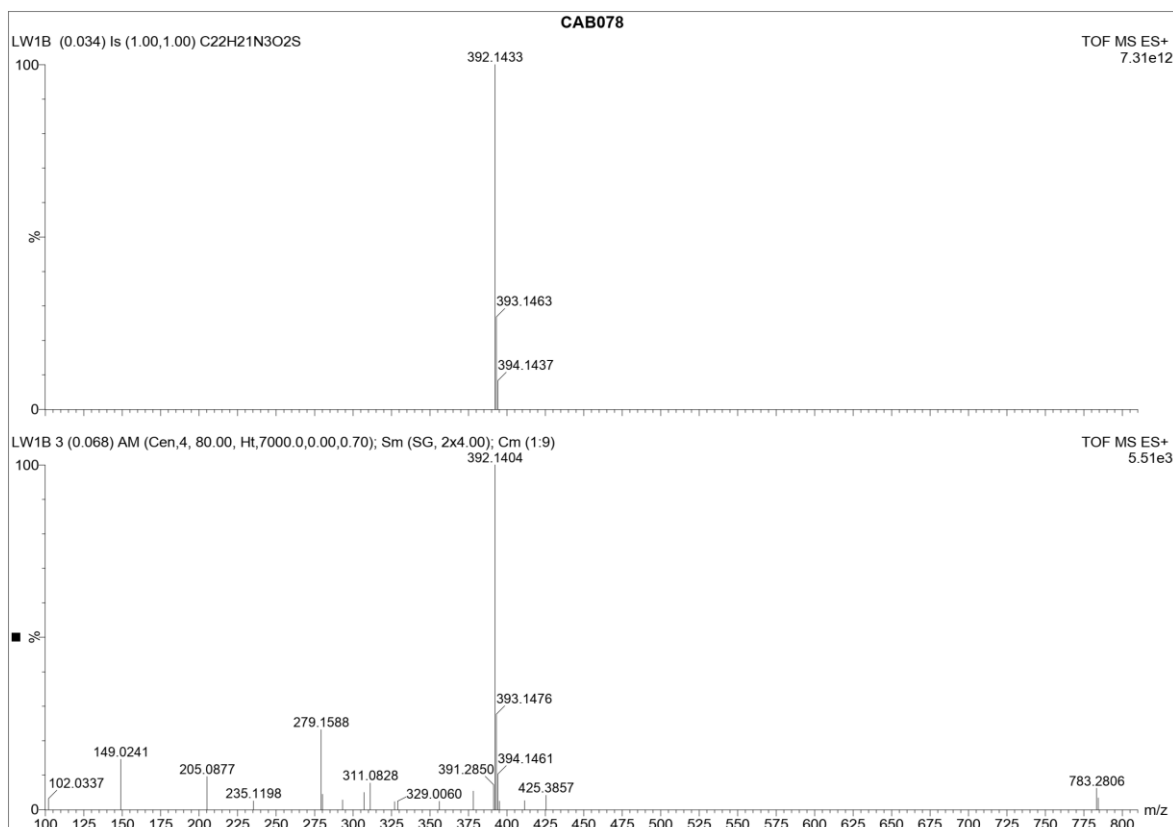
Figura 29: Estrutura do derivado **B2**.Tabela 20: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado **B2**.

Posição	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-		131,16 (C)
2	7,01 (s, 1H)		105,55 (CH)
3	-		148,22 (C)
4	-		147,98 (C)
5	6,81 (d, 1H)	7,4	108,54 (CH)
6	6,91 (d, 1H)	7,4	122,33 (CH)
1'	-		136,61 (C)
2'	7,12 (d, 1H)	6,3	127,34 (CH)
3'	7,25-7,35 (m, 1H)		128,95 (CH)
4'	7,25-7,35 (m, 1H)		128,89 (CH)
5'	7,25-7,35 (m, 1H)		128,95 (CH)
6'	7,12 (d, 1H)	6,3	127,346 (CH)
a	4,11 (t, 2H)	6,6	45,16 (CH ₂)
b	3,00 (t, 2H)	6,6	36,25 (CH ₂)
α	5,99 (m, 1H)		112,33 (CH)
β	7,43 (dd 1H)	14,8 e 10,4	136,54 (CH)
γ	6,64-6,74 (m, 1H)		125,91 (CH)
δ	6,64-6,74 (m, 1H)		136,30 (CH)
C-S	-		153,62 (C)
C=N	-		151,23 (C)
OCH ₂ O	6,01 (s, 2H)		101,29 (CH ₂)
S-CH ₃	2,71 (s, 3H)		15,53 (CH ₃)

No RMN de ^1H (Espectro 9), a reação de metilação para formação do **B2** pôde ser confirmada pelo aparecimento de um simpleto em δ 2,71 ppm, referente aos hidrogênios da metila adicionada ao átomo de enxofre, que para o composto **B1** não aparece. Além disso, referente ao grupo fenetila, o espectro apresenta os sinais entre δ 7,12 ppm e δ 7,35 ppm correspondentes aos hidrogênios do anel aromático e os sinais em 4,11 e 3,0 ppm com J de 6,6 Hz referentes aos hidrogênios H_a e H_b . Além dos demais sinais típicos desse derivado, como o simpleto em δ 6,01 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, os sinais entre δ 5,99 e δ 7,43 ppm referentes a cadeia olefinica com J (H_β) de 14,8 Hz típico de acoplamento trans e os sinais entre δ 6,82 ppm e δ 7,01 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos com J de 7,4 Hz para os H_5 e H_6 .

Já no espectro de RMN ^{13}C (Espectro 10) é possível observar o aparecimento de um sinal em δ 15,54 ppm referente ao carbono da metila, confirmando que a alquilação ocorreu de fato. Os sinais entre δ 127,36 ppm e δ 128,95 ppm referentes aos CH's e um sinal em δ 136,62 ppm do carbono quaternário, são referentes ao anel aromático do grupo ligado ao anel triazólico. O sinal em δ 153,63 ppm, referente ao carbono ligado ao enxofre e em δ 151,23 ppm é referente ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos no anel triazólico. Além dos sinais do anel aromático e da cadeia olefínica, conforme a Tabela 20 que corroboram a caracterização da estrutura em questão.

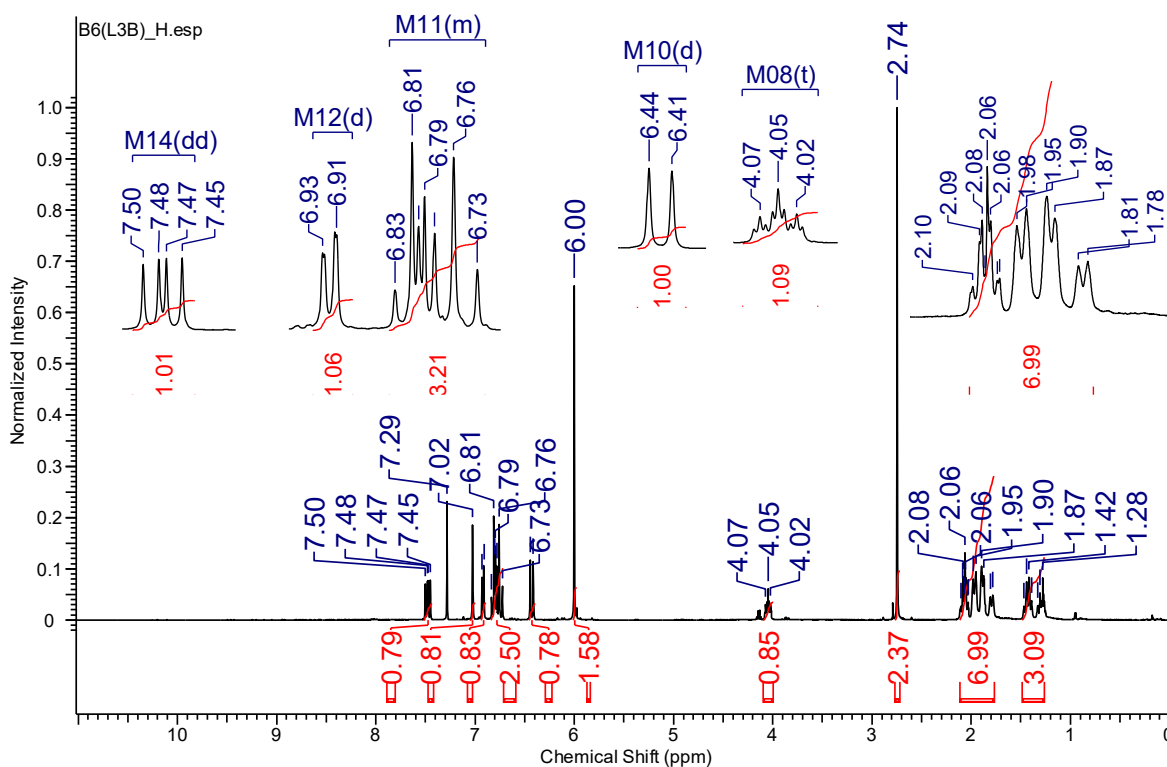
Os espectros de massa (Espectro 11) indicam que a massa encontrada é condizente com a massa esperada. HRMS-ES (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$: encontrada - 392,1433 e esperada - 392,1404.



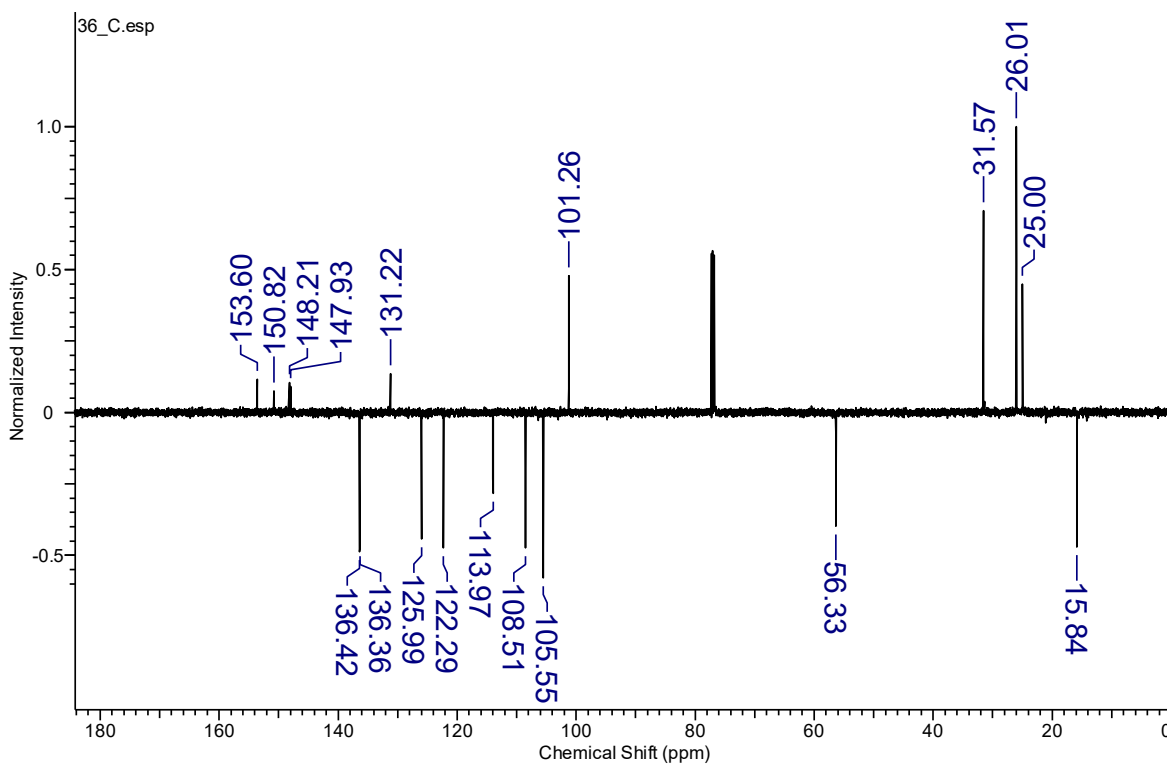
Espectro 11: Espectro de massas de alta resolução do composto **B2** – ES+ (em metanol).

6.2.4.2. *3-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-cycloexil-5 (metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol (B10)*

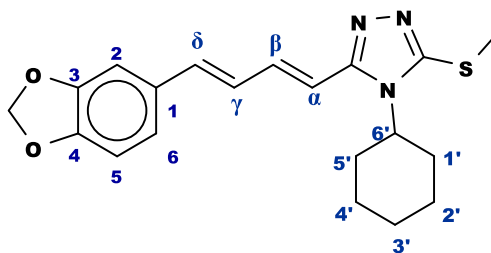
O derivado **B10** foi obtido na forma de um sólido amarelo amorfo com um rendimento de 84% e 100% de pureza. Sua caracterização foi feita por RMN de ^{13}C (Espectro 12), de ^1H (Espectro 13) e espectrometria de massas de alta resolução (Espectro 14), e as caracterizações são condizentes com a literatura (FRANKLIM et al., 2019). As atribuições propostas podem ser observadas na Tabela 21.



Espectro 12: RMN ^1H do **B10** (500 MHz) feito em CDCl_3 .



Espectro 13: RMN ^{13}C do **B10** - DEPTQ (100 MHz) feito em CDCl_3 .

Figura 30: Estrutura do composto **B10**.Tabela 21: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o composto **B10**.

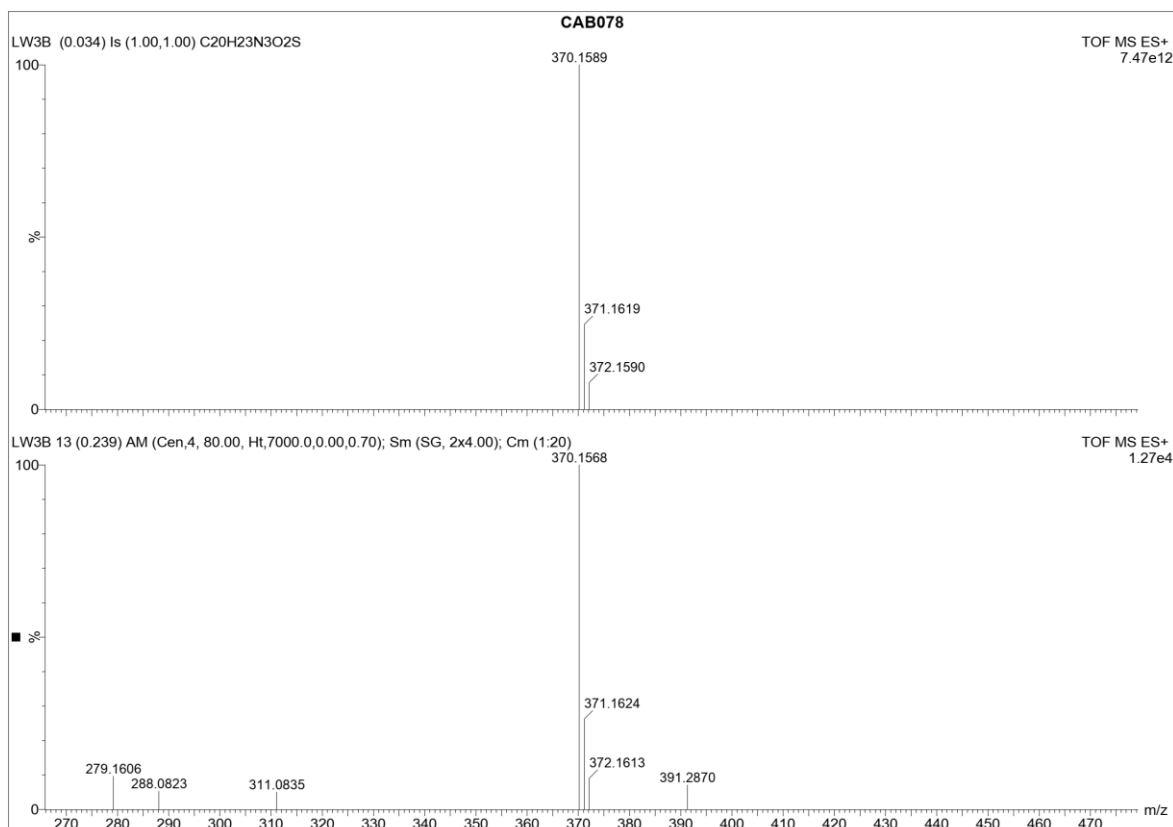
Posição	δ ^1H (ppm)		δ ^{13}C (ppm)
1	-		131,22 (C)
2	7,02 (s, 1H)		105,55 (CH)
3	-		148,21 (C)
4	-		147,93 (C)
5	6,79 (m, 1H)		108,51 (CH)
6	6,92 (d, 1H)	9,1	122,29 (CH)
1'	1,76-2,11(m, 2H)		31,57 (CH ₂)
2'	1,76-2,11(m, 1H) e 1,25-1,47 (m, 1H)		26,01 (CH ₂)
3'	1,76-2,11(m, 1H) e 1,25-1,47 (m, 1H)		25,00 (CH ₂)
4'	1,76-2,11(m, 1H) e 1,25-1,47 (m, 1H)		26,01 (CH ₂)
5'	1,76-2,11(m, 2H)		31,57 (CH ₂)
6'	4,05 (tt, 1H)	12,4 e 4	56,33 (CH)
α	6,43 (d, 1H)	15,2	113,97 (CH)
β	7,48 (dd, 1H)	15,2 e 10,2	136,42 (CH)
γ	6,79 (m, 1H)		125,99 (CH)
δ	6,79 (m, 1H)		136,36 (CH)
C-S	-		163,60 (C)
C=N	-		150,82 (C)
OCH ₂ O	6,00 (s, 2H)		101,26 (CH ₂)
S-CH ₃	2,74 (s, 3H)		15,84 (CH ₃)

A confirmação da reação de alquilação para a formação do B6 pode ser confirmada pelo aparecimento do simpleto em 2,74 ppm no espectro de RMN de ^1H (Espectro 12), com

integração para três hidrogênios, referente à metila que foi adicionada ao enxofre do anel triazólico. Há também os sinais entre δ 1,26 ppm e δ 2,10 ppm (integração para 10 H ao todo), além do triplo triplete em 4,05 ppm com J de 12,4 (axial) e 4,0 (equatorial) Hz, correspondentes aos hidrogênios do grupo cicloexila, característico do composto **B10**. Além disso, observou-se os demais sinais referentes a estrutura do derivado, como por exemplo, o simpleto em δ 6,00 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, os sinais entre δ 6,43 e δ 7,48 ppm referentes a cadeia olefínica com J de 15,2 Hz e os sinais entre δ 6,79 ppm e δ 7,02 ppm e J de 9,1 Hz (H_6) referentes aos hidrogênios aromáticos.

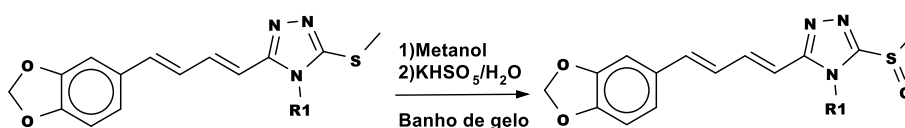
No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 13), o aparecimento do sinal em 15,84 ppm é referente ao carbono da metila adicionada ao enxofre do anel triazólico, o que permite confirmar a formação do derivado **B10** pela reação de alquilação. O composto B6 também pode ser identificado pelos sinais entre δ 25,00 ppm e δ 31,57 ppm referentes aos CH_2 e o sinal em δ 56,36 ppm referente ao CH, todos do grupo cicloexila. Há também a presença dos demais sinais do composto, como por exemplo em δ 163,60 ppm, referente ao carbono ligado ao enxofre, outro em δ 150,82 ppm referente ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos no anel triazólico, além do sinal em δ 101,26 ppm referente ao carbono do anel metilenodioxílico. Além dos demais sinais do anel aromático e da cadeia olefínica, conforme a Tabela 19 que corroboram para caracterização da estrutura em questão.

Os espectros de massa (Espectro 11) indicam que a massa encontrada é condizente com a massa esperada. HRMS-ES (m/z) $[M+H]^+$: encontrada - 370,1588 e esperada - 370,1511.



Espectro 14: Espectro de massas de alta resolução do composto **B10** – ES+ (em metanol).

6.2.5 Síntese dos derivados oxidados metil-sulfóxido



Esquema 18: Síntese dos compostos triazólicos 3 metil-sulfóxido.

Para a obtenção dos compostos oxidados com grupamento metil-sulfóxido ligado ao anel triazólico, a proposta inicial (CASTRO, 2016) procurou reproduzir e estabelecer a metodologia de Leonard e colaboradores (LEONARD; JOHNSON, 2002) para os compostos de interesse. Entretanto nas tentativas de síntese, a reação que previa um tempo de 2h, para nosso caso, durou quase 10 dias de reação e como a reação deveria ser feita em banho de gelo, a manutenção da baixa temperatura, tornou-se inviável em nossas condições

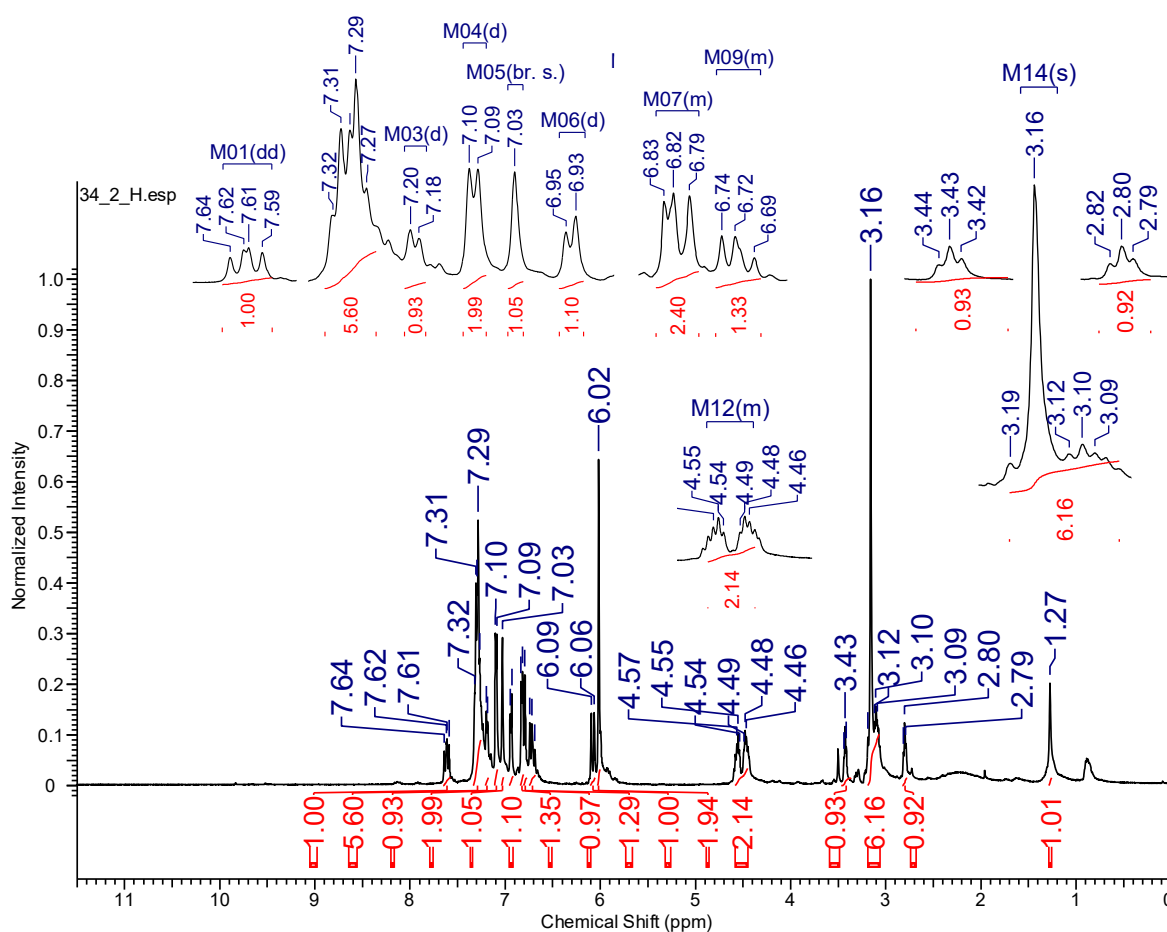
laboratoriais. Além disso, ao final da reação, observou-se a formação de muito subproduto e possivelmente produtos de degradação que não foram possíveis de serem identificados.

Posteriormente, foi feita uma tentativa de oxidação para a formação os compostos com grupo sulfona ligado ao anel triazólico, utilizando a metodologia proposta por Kupwade e colaboradores (KUPWADE et al., 2017) . A reação ocorreu como o previsto, mas a caracterização apontou que o composto formado foi com o grupo metil-sulfóxido e não o composto com grupo metil-sulfona (Esquema 18).

6.2.5.1. *3-[(1E,3E)-4-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-5-(metilsulfoxido)-4-(2-fenetil)-4H-1,2,4-triazol (B3)*

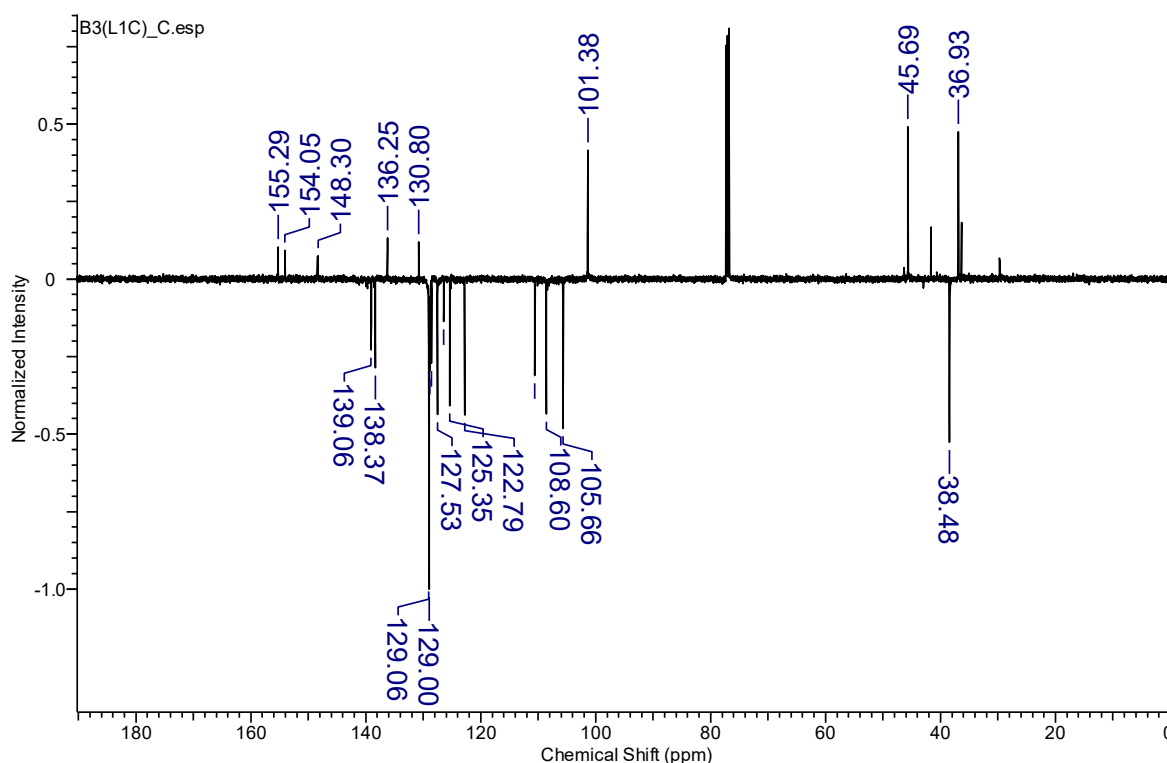
A reação era prevista para durar 2h, entretanto foi mantida sob agitação por 2 dias, sendo que inicialmente ela foi mantida em banho de gelo, conforme a metodologia sugeria, mas ao final do primeiro dia, a reação permaneceu em temperatura ambiente. Durante o primeiro dia, como o acompanhamento por CCDA indicava pouca formação do produto e muito reagente de partida (**B2**) sem grandes evoluções ao longo do tempo, mais um equivalente de KHSO_5 foi adicionado após 5 horas.

O produto formado foi extraído com clorofórmio por três vezes e por fim, o solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Como o produto se apresentava com aspecto viscoso, o mesmo foi mantido em refrigeração com uma mistura de solventes (hexano 95% / diclorometano 5%). Posteriormente o solvente foi removido e o **B3** se apresentou como sólido amarelo claro amorfo, com P.F.=80-81°C, 66% de rendimento e 100% de pureza.



Espectro 15: RMN ^1H do **B3** (500 MHz) feito em CDCl_3 .

No RMN de ^1H (Espectro 15), a reação de oxidação para a formação do **B3**, com a formação do grupo sulfóxido pode ser confirmada pela mudança no deslocamento do simpleto correspondente aos hidrogênios da metila ligada ao enxofre, para campo mais baixo em 3,16 ppm. Os demais sinais são compatíveis com o perfil do composto, como por exemplo os sinais entre δ 7,33 ppm e δ 7,10 ppm correspondentes aos hidrogênios do anel aromático da fenetila ligada ao anel triazólico, característico do composto **B3**. Além dos demais sinais característicos desse derivado, como o simpleto em δ 6,02 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, os sinais entre δ 7,26 e δ 6,80 ppm referentes a cadeia olefínica com J de 15,4 e 14,8 Hz e os sinais entre δ 7,03 ppm e δ 6,82 ppm com J de 7,7 Hz referentes aos hidrogênios aromáticos (Tabela 22).



Espectro 16: RMN ^{13}C do **B3** (100 MHz) feito em CDCl_3

Já no espectro de RMN ^{13}C (Espectro 16) é possível observar o aparecimento de um sinal em δ 38,48 ppm referente ao deslocamento do sinal da metila para campo mais baixo, confirmando a oxidação do enxofre formando o grupo sulfóxido e confirmando a formação do composto **B3**. Os sinais entre δ 126,41 ppm e δ 139,06 ppm referentes aos CH's e um sinal em δ 136,25 ppm do carbono quaternário, são referentes ao anel aromático do grupo fenetil. O sinal em δ 155,29 ppm, referente ao carbono ligado ao enxofre e em δ 154,05 ppm é referente ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos no anel triazólico. Além dos sinais do anel aromático e da cadeia olefínica, conforme a Tabela 20 que corroboram para caracterização da estrutura em questão.

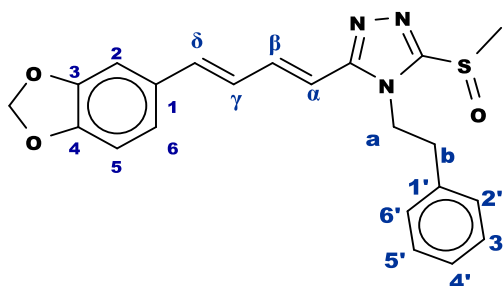
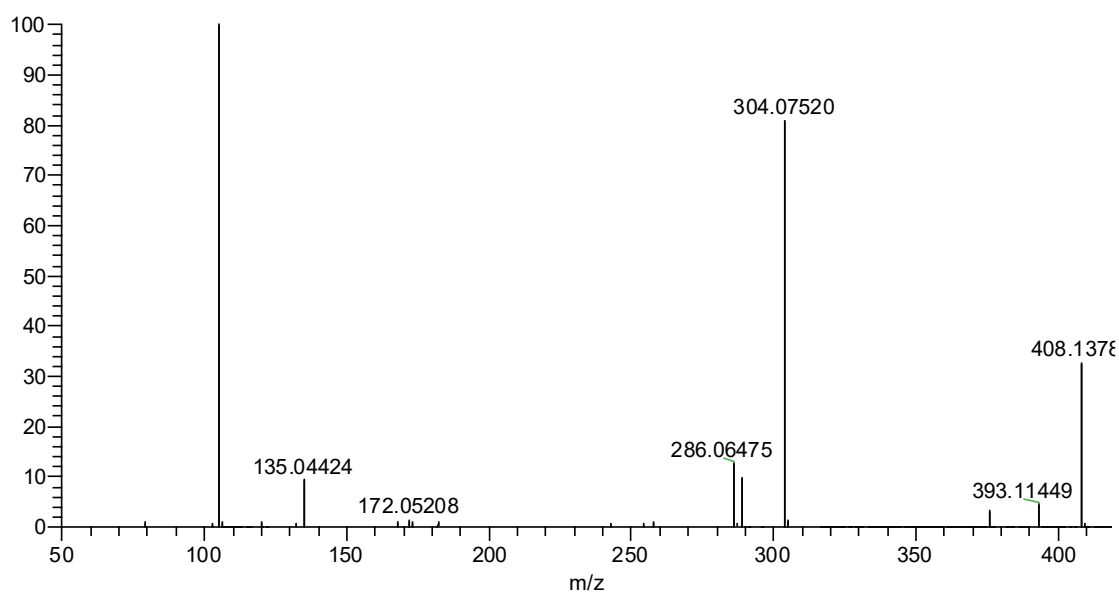


Figura 31: Estrutura do derivado **B3**.

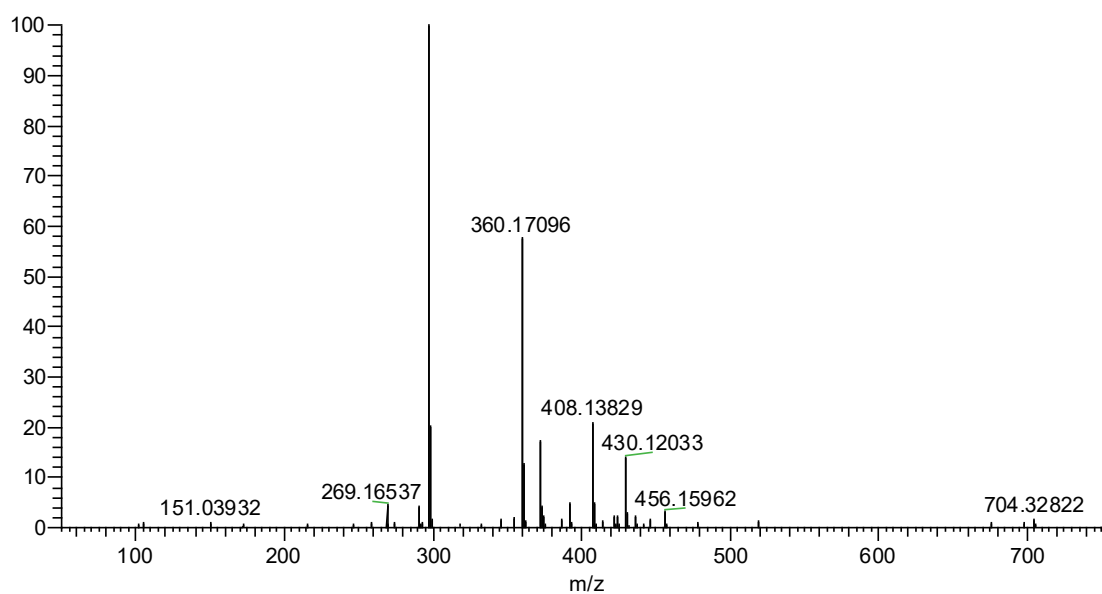
Tabela 22: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o derivado **B3**.

Posição	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-		130,80 (C)
2	7,03 (s, 1H)		105,66 (CH)
3	-		148,37 (C)
4	-		148,30 (C)
5	6,82 (d, 1H)	7,7	108,60 (CH)
6	6,94 (d, 1H)	7,7	122,79 (CH)
1'	-		136,25 (C)
2'	7,19 (d, 1H)	6,9	126,41 (CH)
3'	7,26-7,33 (m, 1H)		139,06 (CH)
4'	7,26-7,33 (m, 1H)		138,37 (CH)
5'	7,26-7,33 (m, 1H)		139,06 (CH)
6'	7,10 (d, 1H)	6,9	126,41 (CH)
a	4,45-4,58 (m, 2H)		45,69 (CH ₂)
b	3,05-3,2 (m, 2H)		36,93 (CH ₂)
α	6,08 (d, 1H)	15,4	110,57 (CH)
β	7,62 (dd 1H)	14,8 e 11	139,06 (CH)
γ	6,69-6,75 (m, 1H)		125,35 (CH)
δ	6,78-6,85 (m, 1H)		138,37 (CH)
C-S	-		155,29 (C)
C=N	-		154,05 (C)
OCH ₂ O	6,02 (s, 2H)		101,38 (CH ₂)
S-CH ₃	3,16 (s, 3H)		38,48 (CH ₃)

1978 Larissa L1Clinha InfDir pos 408 CE20 #1-100 RT: 0.01-0.89 AV: 100 NL: 6.46E7
T: FTMS + p ESI Full ms2 408.0000@hcd:

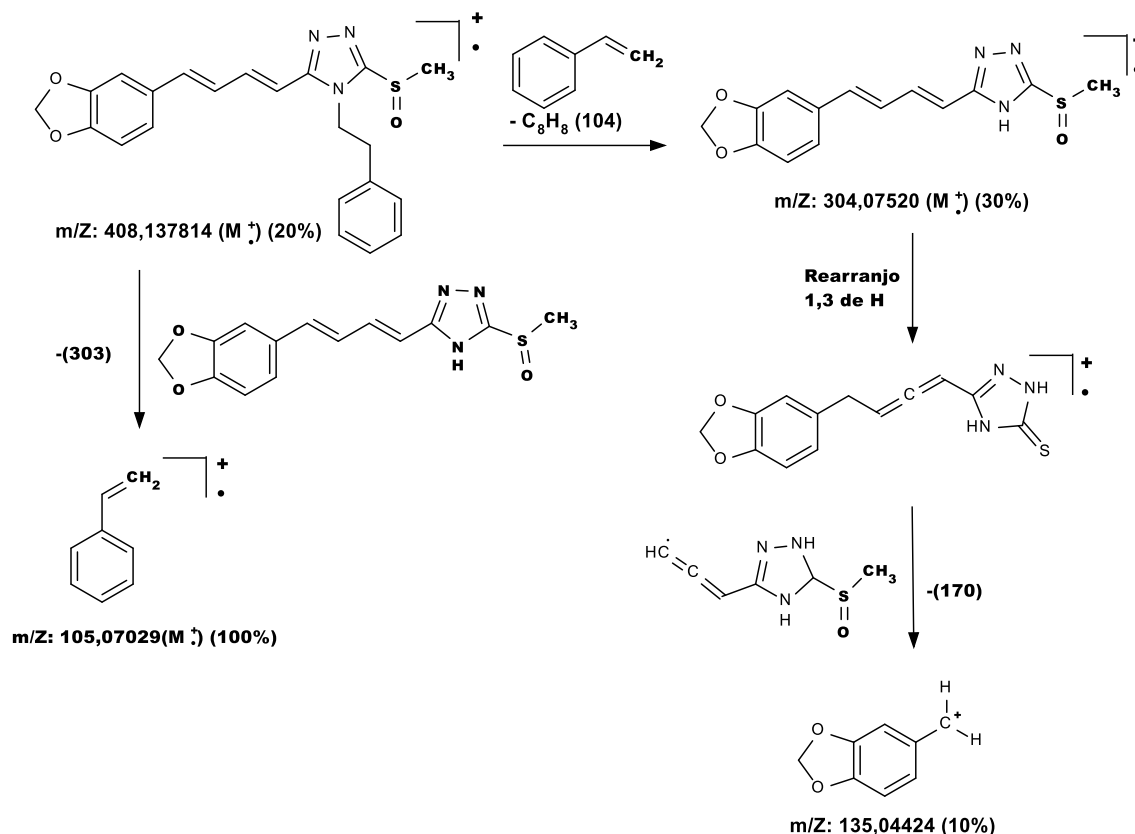


1975 Larissa L1Clinha InfDir pos #1-100 RT: 0.01-0.87 AV: 100 NL: 7.32E8
T: FTMS + p ESI Full ms [50.0000-750.0000]



Espectro 17: Espectro de massas de alta resolução do composto **B3** – ES+ (em metanol).

Os espectros de massa (Espectro 17) indicam que a massa encontrada é condizente com a massa esperada. HRMS-ES (m/z) $[M+H]^+$: encontrada 408,13829; esperada 408.13818. As fragmentações do composto se encontram no Esquema 19.



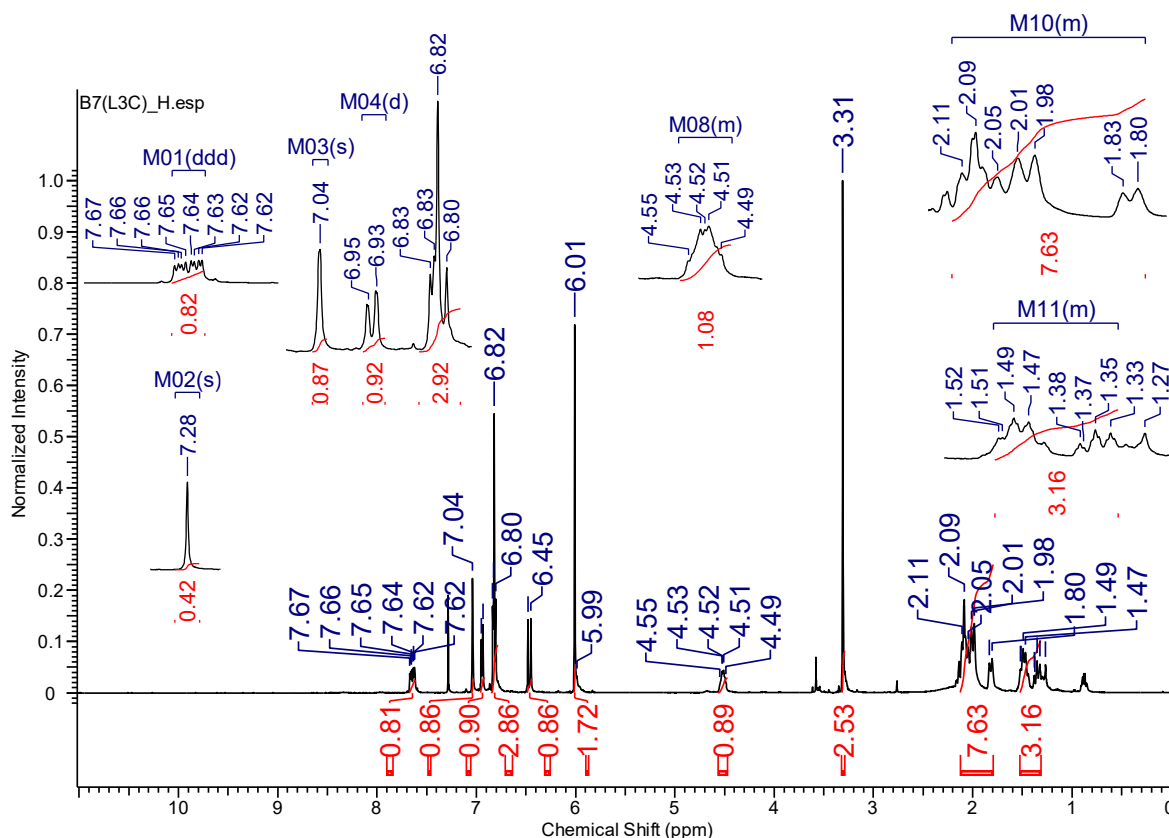
Esquema 19: Proposta de fragmentação para o composto B3 $[M+H]^+$; $m/Z = 408,137814 (20\%); 304,07520 (30\%); 135,04424 (10\%); 105,07029 (100\%)$.

6.2.5.2. 3-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-cycloexil-5 (metilsulfóxido)-4H-1,2,4-triazol (**B11**)

A reação de oxidação para formação do **B11** teve duração de cerca de 2 dias, inicialmente ela foi mantida em banho de gelo, conforme a metodologia sugeria, mas ao final do primeiro dia, a reação permaneceu em temperatura ambiente. Durante o primeiro dia, como o acompanhamento por CCDA indicava pouca formação do produto e muito reagente de partida (**B10**) sem grandes evoluções ao longo do tempo, mais um equivalente de $KHSO_5$ foi adicionado após 4 horas de reação.

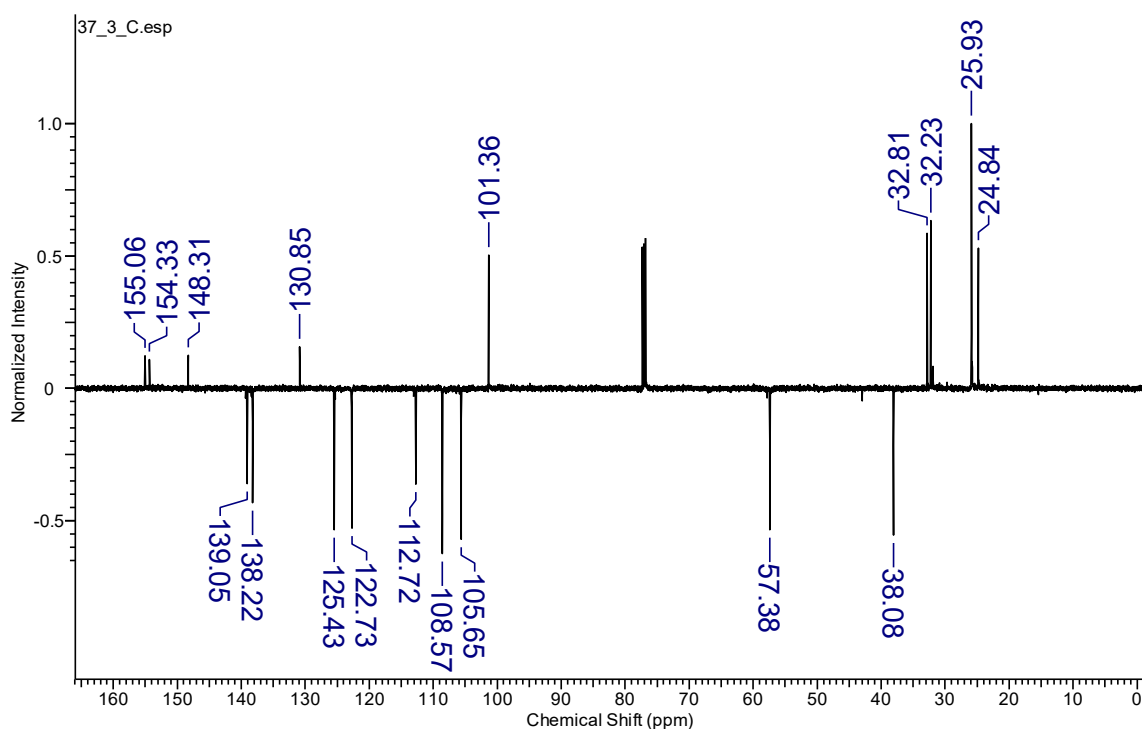
O produto formado foi extraído com clorofórmio por três vezes e por fim, o solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O produto final se apresentava com aspecto viscoso, e por isso, foi mantido em refrigeração com uma mistura de solventes (hexano 95% / diclorometano 5%). Posteriormente o solvente foi removido e o **B11** se apresentou como sólido amarelo claro amorfo, com P.F.= 118-119°C, 66% de

rendimento e 93% de pureza. Ele foi caracterizado por RMN de ^1H (Espectro 18) e ^{13}C (Espectro 19) e espectrometria de massas de alta resolução.



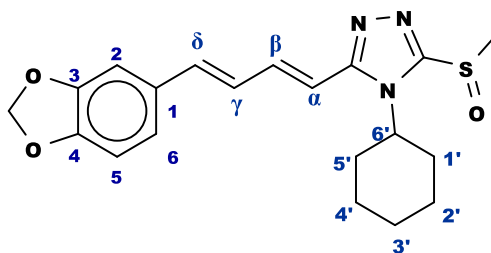
Espectro 18: RMN ^1H do **B11** (500 MHz) feito em CDCl_3 .

A confirmação da reação de oxidação para a formação do **B11** pôde ser feita pelo deslocamento do simpleto de 2,74 ppm para 3,31 ppm no espectro de RMN de ^1H (Espectro 18), com integração para três hidrogênios, referente à metila ligada ao enxofre. Há também os sinais entre δ 2,11 ppm e δ 1,30 ppm (integração para 10 H ao todo), além do sinal em 4,52 ppm, correspondentes aos hidrogênios do grupo cicloexila, característico do composto **B10**. Além disso, observou-se um os demais sinais referentes a estrutura do derivado, como por exemplo, o simpleto em δ 6,01 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, os sinais entre δ 6,43 e δ 7,48 ppm com J de 15,1 Hz, referentes a cadeia olefínica e os sinais entre δ 6,79 ppm e δ 7,02 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos, com J de 7,9 Hz para o H_6 .



Espectro 19: RMN ^{13}C do **B11** (100 MHz) feito em CDCl_3

No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 19), o deslocamento do sinal de 15,84 ppm para 38,08 ppm permite confirmar a ocorrência da reação de oxidação, pois ele é referente ao carbono da metila ligada ao enxofre do anel triazólico, o que ajuda a confirmar a formação do derivado **B11**. O composto **B11** também pode ser identificado pelos sinais entre δ 32,81; 32,23; 25,93 e 24,840 ppm referentes aos CH_2 e o sinal em δ 57,38 ppm referente ao CH, todos do grupo cicloexila. Há também a presença dos demais sinais do composto, como por exemplo em δ 155,06 ppm, referente ao carbono ligado ao enxofre, outro em δ 154,33 ppm referente ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos no anel triazólico, além do sinal em δ 101,36 ppm referente ao carbono do anel metilenodioxilico. Além dos demais sinais do anel aromático e da cadeia olefínica, que corroboram a caracterização da estrutura em questão.

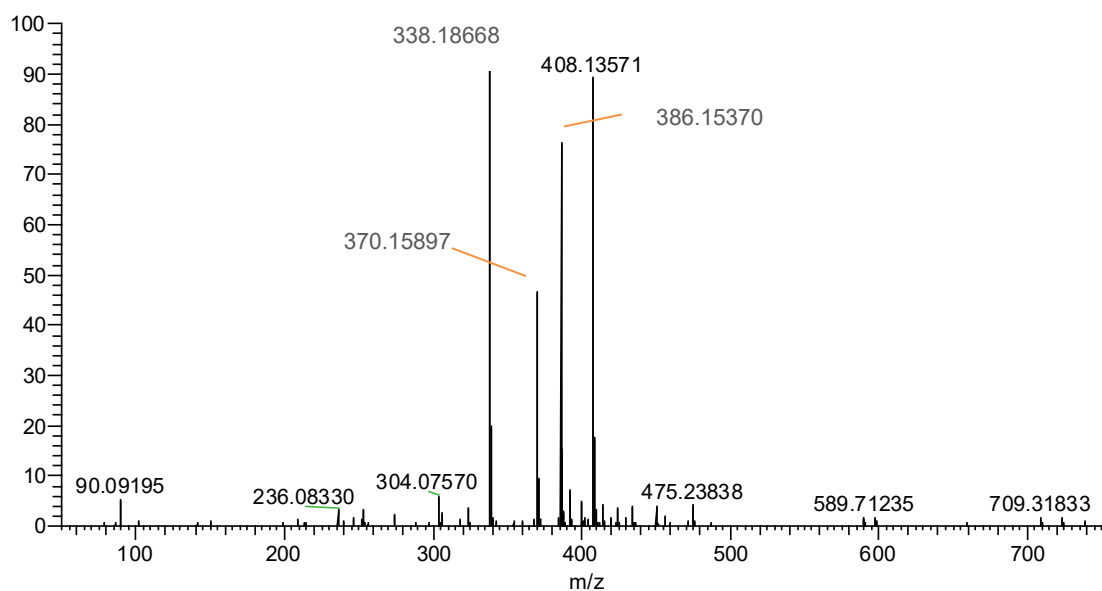
Figura 32: Estrutura do derivado **B11**.Tabela 23: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o composto **B11**.

Posição	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-		130,85 (C)
2	7,04 (s, 1H)		105,65 (CH)
3	-		148,31 (C)
4	-		148,28 (C)
5	6,79-6,84 (m, 1H)		108,57 (CH)
6	6,94 (d, 1H)	7,9	122,73 (CH)
1'	2,13-1,80/1,54-1,34 (m, 2H)		32,81 (CH ₂)
2'	2,13-1,80/1,54-1,34 (m, 2H)		25,93 (CH ₂)
3'	2,13-1,80/1,54-1,34 (m, 2H)		24,84 (CH ₂)
4'	2,13-1,80/1,54-1,34 (m, 2H)		25,93 (CH ₂)
5'	2,13-1,80/1,54-1,34 (m, 2H)		32,23 (CH ₂)
6'	4,52 (m, 1H)		57,38 (CH)
A	6,46 (d, 1H)	15,1	112,72 (CH)
β	7,64 (ddd, 1H)	15,1, 6,8 e 3,3	139,05 (CH)
Γ	6,79-6,84 (m, 1H)		125,43 (CH)
Δ	6,79-6,84 (m, 1H)		138,22 (CH)
C-S	-		165,06 (C)
C=N	-		154,33 (C)
OCH ₂ O	6,02 (s, 2H)		101,36 (CH ₂)
S-CH ₃	3,31 (s, 3H)		38,08 (CH ₃)

Os espectros de massa (Espectro 20) indicam que a massa encontrada é condizente com a massa esperada. HRMS-ES (m/z) $[M+H]^+$: encontrada 408,13829; esperada 408.13818.

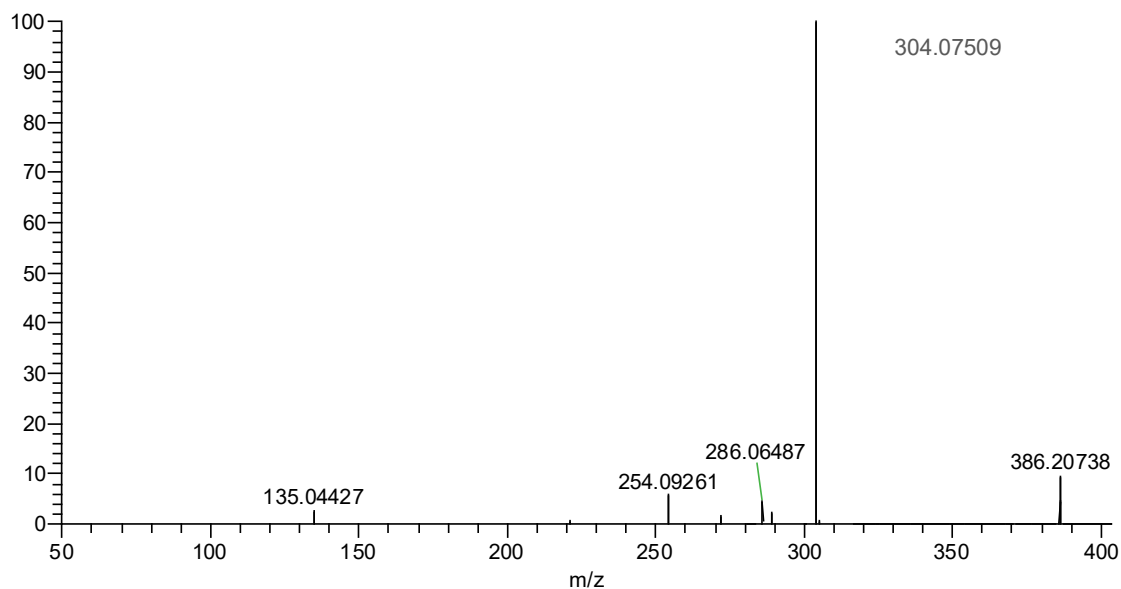
B11 – full scan

1980 Larissa L3C InfDir pos #1-100 RT: 0.01-0.87 AV: 100 NL: 2.10E8
T: FTMS + p ESI Full ms [50.0000-750.000]



B7 – fragmentação m/z 386

1983 Larissa L3C InfDir pos 386 CE15 #1-100 RT: 0.01-0.89 AV: 100 NL: 1.06E8
T: FTMS + p ESI Full ms2 386.0000@hcd



Espectro 20: Espectro de massas de alta resolução do composto B11 – ES+ (em metanol).

6.2.6 Síntese dos Derivados Oxidados Metil-sulfona

Para a síntese dos compostos oxidados com o grupo metil-sulfona, inicialmente foi usada a metodologia de Trost e Curran, em que se utiliza como oxidante 1 equivalente de Oxone® (KHSO₅) com reação feita em banho de gelo e agitação por 2 horas (TROST; CURRAN, 1981). Entretanto, durante a tentativa de síntese, foi necessário usar 3 equivalentes ao todo, pois o acompanhamento da reação por CCDA indicava pouca formação do produto. Além disso, a reação durou 3 dias e, ainda assim, houve formação de subprodutos e produtos de degradação. Ao final, o produto foi isolado e extraído por 3 vezes com clorofórmio. Os espectros de massa indicaram muitas impurezas, referentes aos subprodutos formados e por isso, a caracterização não foi possível.

Posteriormente, uma nova tentativa de síntese foi feita utilizando a metodologia de Kupwade e colaboradores utilizando Oxone, acetonitrila e dietilamina, que em seu trabalho, descreve um protocolo quimiosseletivo para a oxidação de sulfetos em sulfonas descrevendo o uso da dietilamida como um catalisador importante combinado com Oxone.

Em nossa tentativa de síntese, embora a oxidação tenha ocorrido, a caracterização do composto indicou que o produto formado era o composto com o grupo sulfóxido e não sulfona, conforme discutido anteriormente. Por isso, temos como perspectiva, a implementação de algumas adaptações na metodologia, como a proporção do oxidante e do catalisador, tendo como reagente de partida o próprio composto com grupo sulfóxido.

6.3. Difração de Raios-X do Monocristal B1

Os dados de difração de raios-X do cristal do composto **B1** permitiram confirmar, adicionalmente, a sua estrutura, além de definir inequivocamente a configuração de dupla ligação e também o estado tautomômico do anel heterocíclico para as estruturas utilizadas no estudo de modelagem molecular.

Monocristais do composto foram obtidos por evaporação lenta do solvente. O composto cristaliza-se no grupo espacial monoclinico $P2_1/n$ e a sua unidade assimétrica é mostrada na Figura 33. Um resumo do conjunto de dados do cristal, depositado no CCDC – CCDC ID: 1998583, bem como o refinamento, podem ser vistos na Tabela 24.

A estrutura molecular consiste num anel de 1,2,4-triazol-3-tiona substituído nas posições 3 e 4. Os comprimentos das ligações N1-N2 e C1-S1 são de 1.368(2) e 1.677(2) Å, enquanto a distância média de C-N é de 1.356 (2) Å. É importante destacar que o

comprimento da ligação N1-C2 é o mais curto dentro do anel de 1,2,4-triazol-3-tiona. Estes comprimentos de ligação são típicos quando comparados com compostos semelhantes descritos na literatura (MANJULA et al., 2015). A quarta posição do triazol é substituída por um grupo fenetil, cujo plano formado por átomos C16-C21 é quase paralelo ao anel 1,2,4-triazol-3-tiona, com o ângulo entre eles de aproximadamente 6°.

As distâncias de ligação C-C e C=C da cadeia carbônica conjugada de quatro membros, ligada à posição 5 do anel 1,2,4-triazol-3-tiona variam entre 1,426(3) e 1,451(3) Å e 1,328(3) a 1,330(3) Å, respectivamente. O plano que contém átomos C3-C6 é deslocado cerca de 15,5° a partir do heterociclo 1,2,4-triazol-3-tiona. Um anel 1,3- benzodioxol é ligado pela sua 4ª posição à extremidade da cadeia conjugada. N-H...S interações intermoleculares promovem dímeros moleculares no empacotamento do cristal, como visto na Figura 33. Os parâmetros geométricos associados a estas interações em **B1** ($N2 \cdots S1^i = 3,309(2)$ Å, $N2-H2 = 0,86$ Å, $H \cdots S1^i = 2,456$ Å, e $\angle N2-H2 \cdots S1^i = 171,6^\circ$) caem na faixa típica descrita na literatura. (MANJULA et al., 2015).

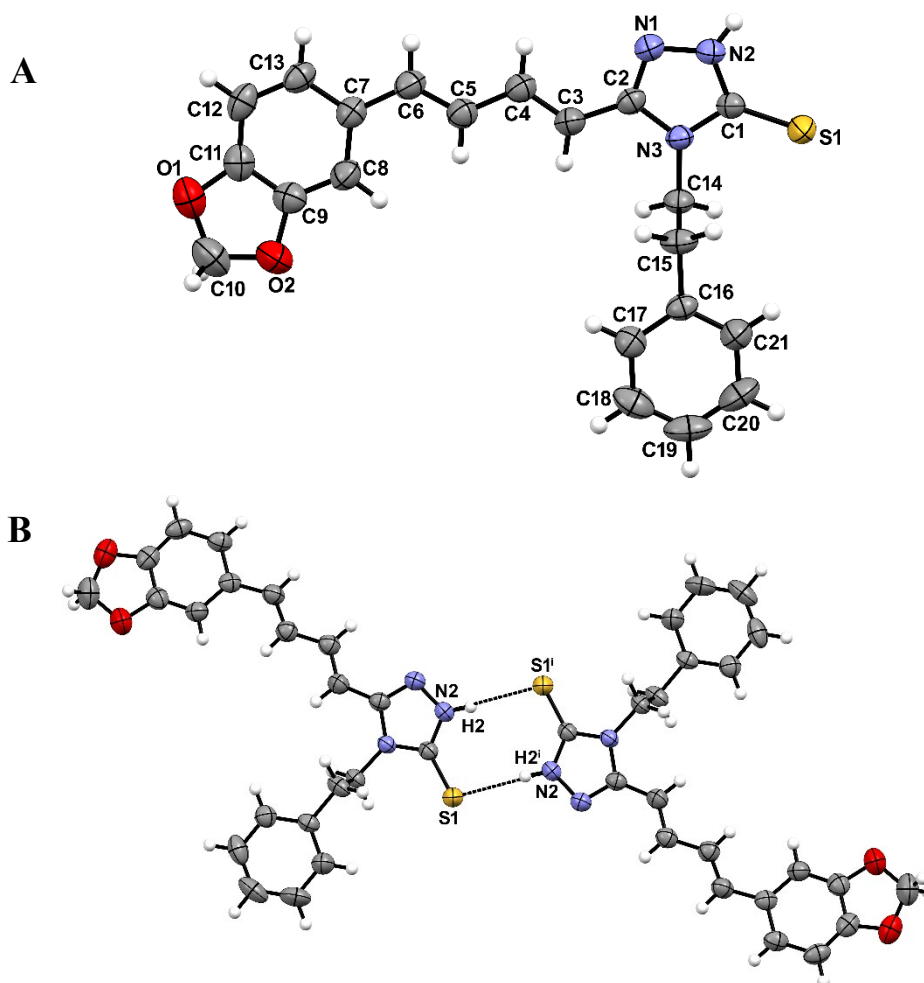


Figura 33: A): Elipsoides térmicos da unidade assimétrica do composto **B1** em um nível de 50% de probabilidade. Código das cores: cinza (carbono), azul (nitrogênio), vermelho (oxigênio), amarelo (enxofre) e branco (hidrogênio). Comprimentos de ligação selecionados (em Å): N1–N2: 1.368(2); N1–C2: 1.306(3); N2–C1: 1.338(3); N3–C1: 1.361(3); N3–C2: 1.381(2); C1–S1: 1.677(2); O1–C11: 1.370(3); O2–C9: 1.378(3). B) Detalhes de empacotamento do cristal com a interação intermolecular envolvendo o nitrogênio do triazol e o grupo tiona. Operação de simetria para gerar os átomos equivalentes: $i = -x, -y, -z$.

Tabela 24: Dados cristalográficos e de refinamento estrutural para o derivado B1

Cristalografia e refinamento do B1	
ID	1998583
Fórmula Empírica	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₂ S
Sistema cristalino	Monoclinico
Grupo especial	P21/n
Dimensão da célula unitária	a = 7.3894 (2) Å b = 25.0893 (11) Å c = 10.5287 (4) Å β = 104.645 (2)° Z = 4
Volume	1888.55 (12) Å ³

6.4. Inibição da CYP51_{Tc}

Esta etapa do projeto foi executada durante o período de doutorado sanduíche (PDSE da Capes) nas instalações do *Life Science Building* e do *Chemistry Building*, na York University, em Toronto, Ontário, sob orientação do Prof. Dr. Demian R. Iff com colaboração da Dr^a. Shamina S. Prova. Foi feita uma avaliação de atividade enzimática dos compostos **B1**, **B2**, **B9** e **B10**, mais os compostos da *série C* na CYP51 de *T. cruzi* com o objetivo de validar a proposta inicial de que os compostos heterocíclicos planejados, de fato tem atividade de inibição sobre a CYP51 de *T. cruzi*.

Nessa metodologia de inibição enzimática, de acordo com o trabalho de Riley e colaboradores, utiliza-se bactossomos - que são membranas bacterianas contendo a enzima recombinante de interesse - obtidos comercialmente pela CypEx - para a avaliação da inibição enzimática da CYP51 de *T. cruzi* através de ensaios de fluorescência como uma forma de triagem de compostos de atividade desconhecida. Os bactossomos utilizados são compostos pela membrana de *E. coli* contendo CYP51 de *T. cruzi* coexpressa com NADPH P450 redutase (mosquito, *A. gambiae*) e citocromo b5 (mosquito, *A. gambiae*) (RILEY et al., 2015).

Os compostos testados nessa etapa foram os compostos **B1**, **B2**, **B9**, **B10** e os compostos da *série C*. Os compostos oxidados não puderam ser testados, pois os mesmos só foram sintetizados com sucesso após o período desse intercâmbio.

Foi utilizado um critério de diluição da concentração dos compostos e dessa maneira, como a fluorescência observada é fruto da formação do composto 3-ciano-7-hidroxicumarina (CHC) a partir do substrato BOMCC (RILEY et al., 2015), pela CYP51, espera-

se que quanto maiores fossem as concentrações dos inibidores, menor seria a fluorescência devido à interrupção da formação do produto.

Foram selecionados para controle positivo o composto posaconazol e o metimazol, que são compostos com inibição forte e moderada da CYP51, respectivamente, com valores de CI_{50} descritos na literatura (RILEY et al., 2015), de maneira que fosse possível usá-los como parâmetro para avaliar a possível inibição por parte dos compostos inéditos usados nesse estudo, independentemente de quão ativo os compostos fossem.

Durante a primeira leitura, mantivemos a microplaca com tampa no leitor de fluorescência durante uma hora sob agitação à 37° C. As leituras foram feitas a cada minuto, como forma de monitorarmos a atividade da enzima durante o tempo de reação e utilizamos os valores referentes à uma hora de reação (Anexo 8) para avaliar a porcentagem de inibição dos compostos (Tabela 25) utilizando para tal a Equação 9. Quando o equipamento detecta um valor de fluorescência maior que 99999 ele indica uma mensagem de “overfluorescence” no resultado e para esses casos, foi considerado o valor (como uma estimativa) de 100000.

Os valores de porcentagem de inibição foram calculados (Tabela 25) para todos os experimentos como forma de avaliação do comportamento inibitório dos compostos, de acordo com a Equação 9, onde %I é a porcentagem de inibição de determinado composto, I_{CN} é o valor de fluorescência apresentado pelo controle negativo (maior valor de fluorescência observado), I é o valor de fluorescência do composto, I_{PC} é o menor valor de fluorescência apresentado pelo controle positivo (BELL et al., 2008).

$$\%I = \frac{I_{CN} - I}{I_{CN} - I_{CP}} * 100$$

Equação 9

Tabela 25: Valores de porcentagem de inibição dos compostos no experimento 1 após 1h de reação.

Conc.(μ M)	% de Inibição									
	Posa	B1	B2	B9	B10	C1	C2	C3	C4	Meti
40	88	16	49	33	97	65	103	76	99	101
20	62	34	64	77	100	87	103	41	50	85
10	100	107	108	78	105	103	106	91	71	63
2,5	99	76	108	99	99	106	107	92	105	59
0,625	55	107	109	105	107	102	103	108	99	79
0,16	100	101	106	108	87	108	93	106	107	82
0,039	78	107	89	85	109	107	42	0	20	0
0,0098	77	97	93	74	86	62	100	101	100	22

Ao final do processo, houve a condensação de parte da solução na tampa da microplaca o que pode ter causado uma interferência na leitura pelo leitor de micro-placas, por isso, nos demais experimentos, nós fizemos uma leitura no início da reação e mantivemos a microplaca em estufa à 37° durante uma hora para então, fazer a leitura final (não havendo também agitação durante esse tempo em estufa nem durante a leitura).

Para o segundo experimento, foram testados apenas o controle positivo posaconazol, o composto **B2** e o controle negativo, para avaliar a influência da alteração na metodologia na leitura de fluorescência. Além disso, após uma hora de reação, foi adicionado 1µL de posaconazol em todos os poços a fim de estabilizar o sinal de fluorescência, inibindo totalmente a reação e em seguida fez-se uma nova leitura (RILEY et al., 2015). Foi possível observar uma pequena variação nos valores de fluorescência após a adição do posaconazol (os valores das leituras encontram-se no Anexo 9).

Durante o experimento 3 (Anexo 10), a leitura de fluorescência foi feita após 1h de incubação da reação em estufa. Foi feita uma comparação dos resultados obtidos utilizando diferentes alturas de leitura (medidas a partir do fundo dos poços): 8 mm que era o padrão disponível no programa e foi utilizado nos experimentos anteriores, 7 mm, 6 mm e 5 mm. Observou-se que os resultados obtidos com uma altura de 5 mm aparentam ser mais confiáveis, com uma variação de fluorescência mais consistente conforme a variação de concentração de inibidor além de uma diferença mais coerente entre os resultados do controle positivo em comparação com o controle negativo.

O quarto e o quinto experimento, principalmente, apresentaram um comportamento diferente do esperado (Anexo 11 e Anexo 12), com valores de fluorescência muito semelhantes para concentrações distintas de inibidores. Este comportamento pode ser observado principalmente para os controles positivos e negativos. Tal resultado pode ter sido resultante de problemas no preparo ou principalmente por um indicativo de desnaturação da enzima, pois aparentemente o comportamento das respostas de fluorescência está sendo limitado pela eficiência da enzima e não mais pelas diferentes concentrações de inibidores.

Foi feita uma estimativa do comportamento de inibição e determinando o valor de CI_{50} , utilizando o programa Prism GraphPad 5, para cada um dos experimentos separadamente, apenas como um teste tendo em vista que os parâmetros experimentais foram distintos para cada leitura. Para a construção das curvas dose-resposta dos compostos, foi feita, primeiramente, uma normalização dos valores de fluorescência utilizando como parâmetro para 0 e 100%, o menor valor do controle positivo e a média dos valores do controle negativo, respectivamente. As curvas dose-resposta de atividade dos inibidores

apresentaram comportamento esperado para cada experimento principalmente analisando o controle positivo posaconazol, exceto para o experimento 4 e 5.

Na figura 5 podemos observar a curva dose-resposta do controle positivo posaconazol e do composto **B1** feitas com o logaritmo das concentrações e os valores de fluorescência normalizados, através delas foi possível determinar os valores de CI_{50} que podem ser encontrados na Tabela 26, juntamente com os valores de CI_{50} dos demais compostos obtidos com os resultados do experimento 3.

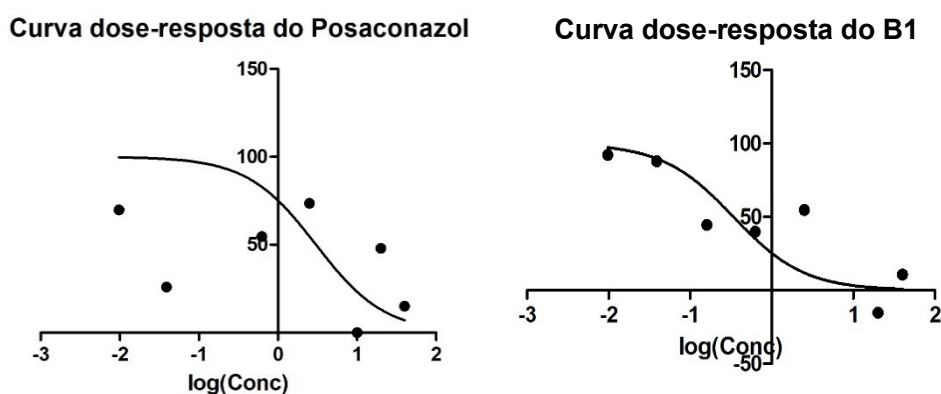


Figura 34: Curva dose-resposta de log(concentração) x valores de fluorescência (normalizados), do controle positivo ($CI_{50} = 3,03 \mu\text{M}$) e do composto **B1** ($CI_{50} = 0,34 \mu\text{M}$) para o experimento 3, com leituras de fluorescência feitas após 1h de reação e adição de posaconazol ao final da reação.

Tabela 26: Valores preliminares de CI_{50} (μM) dos controles positivos e dos compostos **B1**, **B2**, **B9**, **C1**, **C2** e **C3** calculados com os resultados do experimento 3, coeficiente de correlação (r^2) e número de pontos usados em cada correlação (n).

Experimento 3		
Composto	IC_{50} (μM)	n
Posa	3,03	7
B1	0,34	7
B2	1,93	8
B9	42,61	6
C1	21,08	7
C2	11,69	6
C3	33,88	6
Meti	104,5	7

Como nesta etapa do projeto foi feita uma tentativa de reprodução da metodologia e otimização das técnicas, os experimentos não puderam ser feitos em replicatas (com mesmas

condições) dentro do tempo do período no Canadá e, por isso, os resultados de CI_{50} obtidos devem até o momento ser considerados apenas um indicativo do comportamento inibitório dos compostos sobre a enzima-alvo, não tendo ainda validade estatística. Mesmo com essa limitação, é interessante notar que, em geral, os compostos mostraram-se ativos contra a enzima, corroborando o planejamento teórico, e que, em média, os compostos da série planejada B se mostraram mais ativos do que os da série C, também em acordo com as previsões do modelo teórico.

Uma vez que a metodologia seja implementada no PPGQ/UFRRJ, os parâmetros que serão utilizados para as futuras leituras complementares, serão as mesmas do experimento 3 para a realização da reação, inibição enzimática, leitura de fluorescência e tratamento de dados, para que seja possível a obtenção inequívoca dos valores de CI_{50} .

6.5. Avaliação da Atividade Biológica

Tendo em vista a confirmação da ação de compostos selecionados, planejados e sintetizados neste projeto, restava a confirmação da atividade sobre os parasitos. A avaliação da atividade experimental dos compostos **B1-B3 e B9-B11**, que foram escolhidos utilizando como critério a atividade teórica determinada pelo modelo de atividade, através de testes *in vitro* contra a forma evolutiva epimastigota, foi feita em colaboração com a Dr^a Tatiany Franklin, no Laboratório de Glicobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF-UFRRJ). Já os ensaios feitos na forma evolutiva amastigota e a avaliação de citotoxicidade dos mesmos compostos foram feitos em colaboração com o Me. Paulo Pitasse, no Instituto de Veterinária da UFRRJ.

Os compostos **B1-B3, B9-B11** foram avaliados *in vitro* contra a forma proliferativa epimastigota da cepa Y do *T. cruzi* com benznidazol (**Bdz**) como um fármaco de controle, conforme o item 5.5.3. Os valores de CI_{50} podem ser vistos na Tabela 27, sendo que os compostos com maior efeito tóxico contra as epimastigotas foram os triazóis **B1, B9, B10 e B2**. Embora os compostos com grupo metil-sulfóxido tenham apresentado valores de CI_{50} mais altos, também são valores promissores e, por isso, todos os compostos foram também avaliados na forma evolutiva amastigota.

Tabela 27: Valores médios de IC₅₀ (triplicata) calculados para **B1-B3**, **B9-B11** e o Bdz (controle positivo) em epimastigotas e tripomastigotas de *T. Cruzi* e células hospedeiras LCC-MK2.

Composto	CI ₅₀ (µM) ± DP ^a Epimastigota	CI ₅₀ (µM) ± DP ^a Amastigota	CI ₅₀ (µM) ± DP ^a LCC-MK2	IS ^b
B1	10,41±0,68	7,30±1,11	> 50	> 6,85
B2	14,73±0,41	6,13±2,24	21,45±14,34	3,50
B3	20,07±1,57	17,51±3,34	> 50	> 2,86
B9	10,90±0,15	7,70±0,59	32,65±11,14	4,24
B10	11,91±0,04	8,46±1,36	15,75±3,77	1,86
B11	31,09±0,11	27,59±9,51	> 50	> 1,81
Bdz	2,20±0,16	5,21±0,76	-	-

^a DP: Desvio Padrão; ^bIS: Índice de seletividade = CI₅₀^{LCC-MK2} / CI₅₀^{Trypomastigotas}

As Figura 35 e Figura 36 apresentam os resultados de viabilidade celular após o tratamento com os compostos *versus* em *T. cruzi* e em LLC-MK2, respectivamente, com os controles positivo e negativo. Os resultados de CI₅₀ para os ensaios feitos em amastigota se encontram na Tabela 27 e no Anexo 13, sendo que os mais ativos (em ordem decrescente) são **B2**, **B1**, **B9** e **B10**, que são os mesmos compostos mais ativos para epimastigotas e a diferença de atividade para os compostos oxidados é menor (Figura 37).

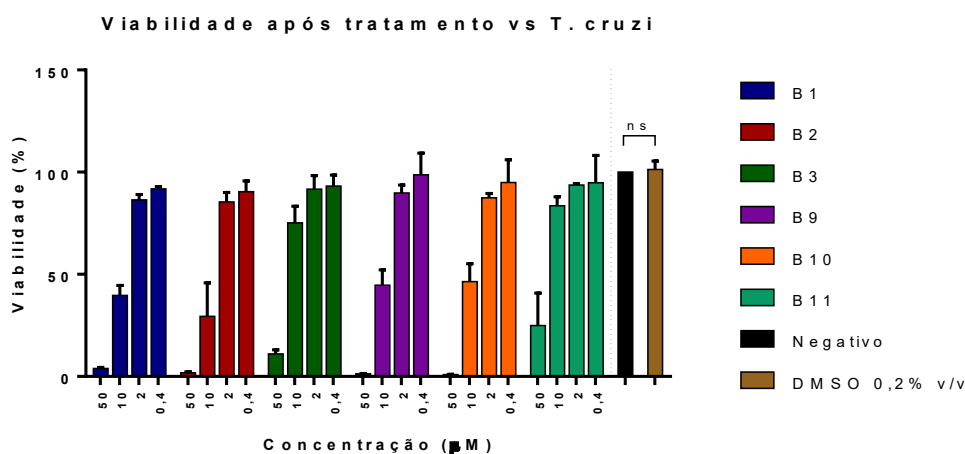


Figura 35: Viabilidade de parasitos (média de 3 experimentos) após tratamento de amastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen C2C4 LacZ) com **B1-B3** e **B9-B11** por 120 h. Determinado por clivagem enzimática de CPRG pela βGal.

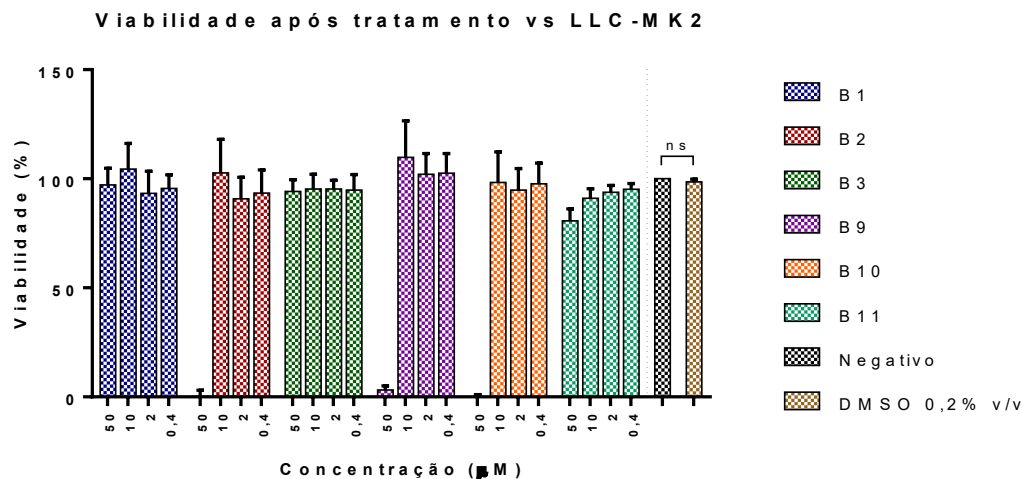


Figura 36: Viabilidade de células LLC-MK2 (média de 3 experimentos) após tratamento com **B1-B3** e **B9-B11** por 120 h. Determinado pela redução mitocondrial do sal de MTT.

Além disso, os resultados dos testes de toxicidade apontam uma boa viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com os inibidores, em especial, o **B1**, que foi um dos mais ativos contra o parasito; além disso, os compostos **B1**, **B3** e **B7** não puderam ter seus CI_{50} determinados, pois nem nas maiores concentrações testadas, houve toxicidade para as células LCC-MK2 (Figura 37).

Podemos também observar que os melhores IS (Tabela 27) são os dos compostos **B1**, **B9** e **B2**. A Figura 37 auxilia na observação da viabilidade celular frente a diferentes concentrações dos compostos estudados, em que podemos perceber que a viabilidade das células de mamífero continua alta em concentrações do inibidor próximo ao valor de CI_{50} , indicando assim uma toxicidade adequada.

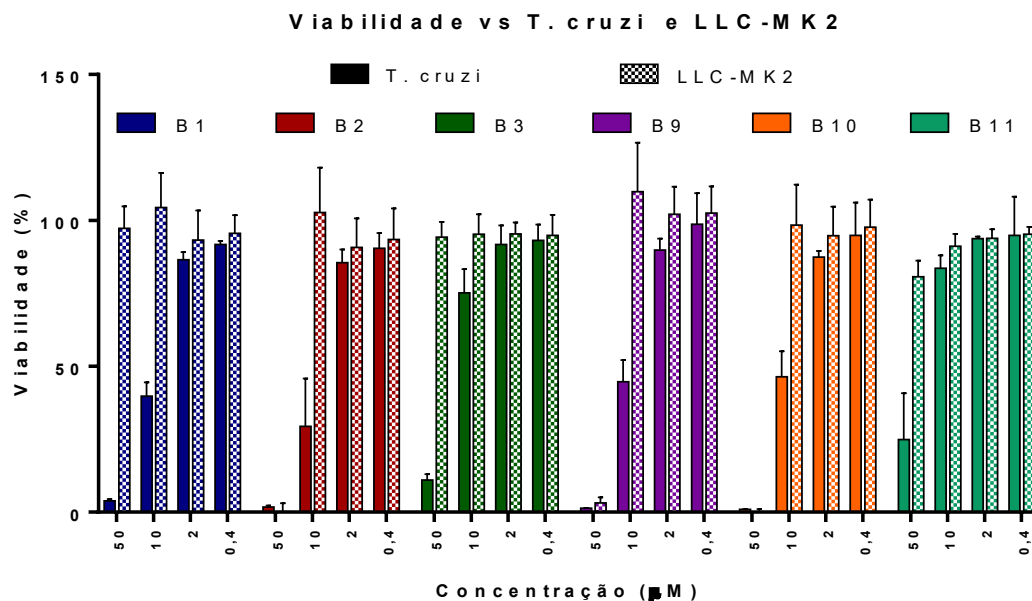


Figura 37: Gráfico comparativo da viabilidade de *T. cruzi* (cores sólidas), determinado por clivagem enzimática de CPRG pela β Gal, em relação à viabilidade de células LLC-MK2 (padrão quadriculado), determinado pela redução mitocondrial do sal de MTT, após tratamento com **B1-B3**, **B9-B11** em diferentes concentrações por 120 h.

Relacionando os resultados obtidos experimentalmente com células de primata, considerando que as enzimas geralmente apresentam boa conservação dentro de uma mesma ordem, com os resultados de docagem molecular (item 6.1.3.2), é possível inferir uma conformidade das previsões teóricas de que os inibidores não interagem tão bem com o sítio ativo da CYP51_{Hs} quando comparado com o sítio ativo da mesma enzima do parasito. Esta era uma preocupação inicial nesse desenvolvimento de novos compostos ativos planejados para esse alvo, justamente por ser uma enzima comum aos dois organismos, então isso poderia acarretar uma toxicidade indesejada para o hospedeiro, caso os compostos também inibissem a enzima do mesmo com a mesma potência.

Comparando os padrões de atividade experimental dos compostos com a atividade teórica calculado com o modelo de previsão original (CASTRO, 2016) usado para selecionar os compostos para síntese, observa-se que, para ambos, existe um padrão de diminuição de atividade para o composto oxidado (**B3** e **B11**), quando comparado com seu precursor alquilado (**B2** e **B10**) e não alquilado (**B1** e **B9**).

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi feito um estudo para o desenvolvimento de novos compostos triazólicos derivados da piperina, promissores para o tratamento da doença de Chagas através da inibição da CYP51 do agente etiológico da doença, *T. cruzi*.

Foram utilizadas, na etapa teórica, 3 séries de compostos heterocíclicos: compostos estudados por Andriani e colaboradores, que foram utilizados na construção de um modelo empírico de previsão de atividade, triazóis derivados da piperina, desenvolvidos através de estudos de modelagem molecular e com atividade teórica promissora determinada pelo modelo em questão, e compostos mesoiônicos sem atividade tripanocida descrita na literatura, cedidos pelo grupo da Profa. Aurea Echevarria (FRAUCHES-SANTOS, 2017).

Inicialmente, foi feita uma avaliação por docagem molecular, das semelhanças e diferenças da enzima do parasito e do ser humano, buscando-se identificar diferenças no sítio ativo que pudessem indicar uma seletividade para a enzima do parasito. Observamos que, embora as enzimas apresentem uma identidade elevada, o sítio ativo próximo ao grupo heme apresenta resíduos de aminoácidos distintos e em posições diferentes que possibilitam interações diferentes para a enzima de uma espécie em comparação com a outra.

Foi feita uma modificação no modelo teórico baseado em parâmetros experimentais e calculado desenvolvido por Castro (2016), utilizando agora o método semi-empírico PM7 no lugar do método PM6, usado originalmente; o novo modelo apresentou um coeficiente de correlação múltipla (r^2) igual à 0,86, um valor ligeiramente maior do que o obtido com o modelo original ($r^2=0,83$), indicando uma vantagem apenas pequena do método mais atual em relação ao anterior na construção do modelo de previsão. De fato, os valores de $\log CE_{50}$ calculados pelo modelo otimizado, apresentou correlação linear de $r=0,92$ com os valores de $\log CE_{50}$ calculados pelo modelo original. Entretanto, os compostos mais ativos de acordo com o novo modelo, não foram os mesmos que o modelo original apontou como mais promissores.

Os derivados **B1** (CASTRO, 2016), **B2** (CASTRO, 2016), **B9** (FRANKLIM et al., 2013) e **B10** (FRANKLIM et al., 2019) foram sintetizados e, a partir dos compostos **B2** e **B10**, foram feitas reações de oxidação para a obtenção dos derivados com grupo metil-sulfona inéditos (**B4** e **B12**), que apresentaram boa atividade teórica calculada pelos modelos de previsão de atividade. Entretanto, durante as tentativas de síntese, observou-se que as oxidações ocorreram de forma mais branda do que o esperado e formaram-se na verdade os compostos com grupo sulfóxido (**B3** e **B11**). Todos os derivados foram caracterizados por

RMN ^1H , RMN ^{13}C e espectrometria de massas. Como foi possível obter monocristais do composto **B1**, uma análise de difração de raios-X do mesmo foi feita também, permitindo uma melhor caracterização estrutural.

Os seis derivados foram testados *in vitro* contra as formas evolutivas epimastigotas de *T. cruzi*, com CI_{50} entre 10,41 μM (**B1**) e 31,04 μM (**B11**), e tripomastigota, em que os compostos apresentaram CI_{50} entre 6,13 μM (**B2**) e 27,59 μM (**B11**). A citotoxicidade dos compostos, avaliada com a viabilidade celular (em LLC-MK2), apresentou valores de CI_{50} entre 15,75 e maiores que 50 μM . Os compostos mais ativos na forma amastigota foram o **B2** com $\text{CI}_{50} = 6,13 \mu\text{M}$, que apresentou baixa citotoxicidade ($\text{CI}_{50} = 21,45 \mu\text{M}$ e $\text{IS} = 3,50$) e o **B1** com $\text{CI}_{50} = 7,30 \mu\text{M}$ e citotoxicidade ainda menor ($\text{CI}_{50} > 50 \mu\text{M}$ e $\text{IS} > 6,85$)

Por fim, estudos de inibição enzimática detectada por fluorescência foram feitos para os compostos **B1**, **B2**, **B9** e **B10** mais os compostos da série C, buscando comprovar o mecanismo proposto envolvendo a inibição da CYP51 de *T. cruzi*, e embora ainda não tenha sido possível obter valores de CI_{50} observamos que de fato há uma diminuição da atividade enzimática com os compostos que foram planejados para o alvo (série B), mais expressiva do que para os compostos mesoiônicos (série C), em concordância com as previsões teóricas.

Como perspectiva, temos a síntese de novos compostos planejados **B5-B8**, que também apresentaram atividade teórica promissora, a utilização novas metodologias ou adaptações nas que já foram testadas, para a síntese dos compostos com grupo metilsulfona a implementação da metodologia de inibição enzimática detectada por fluorescência no Instituto de Química da UFRRJ para que seja possível concluir os testes iniciados na York University e testar compostos de outros grupos de síntese que também trabalham com compostos heterocíclicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN DE NOYA, B. et al. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1308–1315, maio 2010.

ALCÁCER, L. **Introdução à química quântica computacional**. Rio de Janeiro: IST Press, Lisboa, 2007.

AMINPOUR, M.; MONTEMAGNO, C.; TUSZYNSKI, J. A. An Overview of Molecular Modeling for Drug Discovery with Specific Illustrative Examples of Applications. **Molecules**, v. 24, n. 9, 2019.

ANDRIANI, G. et al. Antitrypanosomal lead discovery: Identification of a ligand-efficient inhibitor of *Trypanosoma cruzi* CYP51 and parasite growth. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2556–2567, 2013.

BARRY, M. A. et al. A therapeutic nanoparticle vaccine against *Trypanosoma cruzi* in a BALB/c mouse model of Chagas disease. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 976–987, 2 abr. 2016.

BASTOS, C. J. C. et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in Northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, jun. 2010.

BELL, L. et al. Evaluation of fluorescence- and mass spectrometry-based CYP inhibition assays for use in drug discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 13, n. 5, p. 343–353, 2008.

BENÍTEZ, D. et al. Identification of Novel Chemical Scaffolds Inhibiting Trypanothione Synthetase from Pathogenic Trypanosomatids. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, 12 abr. 2016.

BERN, C. et al. **Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: A systematic review** **Journal of the American Medical Association** *JAMA*, , 14 nov. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18000201/>>. Acesso em: 1 set. 2020

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, 15 jun. 2010.

BRONOWSKA, A. K. Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design. **Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases**, 2 nov. 2011.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 1, p. 335–373, 28 jun. 2003.

Bruker, APEX2 and SAINT Programs for Data Reduction, APEX2, SAINT and SADABS. (2013) Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA. , 2013.

Bruker, APEX2, SAINT and SADABS, APEX II. (2009) Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA. , 2009.

CALDAS, I. S.; SANTOS, E. G.; NOVAES, R. D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1650915>, v. 20, n. 15, p. 1797–1807, 13 out. 2019.

CANSIZ, A. et al. 4-Allyl-5-pyridin-4-yl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione: Synthesis, experimental and theoretical characterization. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 91, p. 136–145, jun. 2012.

CASBARRA, L.; PROCACCI, P. Binding free energy predictions in host-guest systems using Autodock4. A retrospective analysis on SAMPL6, SAMPL7 and SAMPL8 challenges. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 35, n. 6, p. 721–729, 1 jun. 2021.

CASTRO, L. H. E. **Construção de um Modelo de Previsão de Atividade para o Planejamento e Síntese de Triazóis Promissores para Inibição da CYP51 de Trypanosoma cruzi.** Dissertação (Mestrado em Química) Seropédica, 2016.

CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Antiparasitic prodrug nifurtimox: revisiting its activation mechanism. **Future microbiology**, v. 6, n. 8, p. 847–850, 23 ago. 2011.

CHAGAS, C. J. R. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. **Memórias do Instituto Oswaldo**, p. 219–275, 1909.

CHAMBERS, C. C. et al. Model for aqueous solvation based on class IV atomic charges and first solvation shell effects. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 40, p. 16385–16398, 3 out. 1996.

CHATELAIN, E. **Chagas disease drug discovery: Toward a new era** **Journal of Biomolecular Screening** SAGE Publications Inc., , 30 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25245987/>>. Acesso em: 1 set. 2020

CHEN, C.-K. et al. Structural Characterization of CYP51 from Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei Bound to the Antifungal Drugs Posaconazole and Fluconazole. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. e651, 6 abr. 2010.

CHEN, H.-S.; MENG, H.-H.; CHENG, K.-C. A survey of methods used for the identification and characterization of inks. **Forensic Science Journal**, v. 1, n. 1, p. 1–14, 2002.

CHRISTENSEN, A. S. et al. Semiempirical Quantum Mechanical Methods for Noncovalent Interactions for Chemical and Biochemical Applications. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 9, p. 5301–5337, 11 maio 2016.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2nd. ed. [s.l.] Oxford University Press (OUP), 2012.

COLODETTE, N. M. et al. Novel phosphatidylinositol 4-kinases III beta (PI4KIII β) inhibitors discovered by virtual screening using free energy models. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 34, n. 10, p. 1091–1103, 1 out. 2020.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9710, p. 239–247, 2010.

CORTÉS-RUIZ, E. M. et al. Computational Methods to Discover Compounds for the Treatment of Chagas Disease. In: **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2018. v. 113p. 119–142.

COURA, J. R. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39 (Supl., p. 113–117, 2006.

COURA, J. R. **Chagas disease: What is known and what is needed - A background article**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **Anais...Fundacao Oswaldo Cruz**, 2007. . Acesso em: 5 maio. 2020

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. **Chronic phase of Chagas disease: Why should it be treated? A comprehensive review** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Fundacao Oswaldo Cruz, , 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762011000600001&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 1 set. 2020

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, jan. 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 31–40, 2009.

COURA, J. R.; VÍAS, P. A. **Chagas disease: A new worldwide challenge** *Nature*, 24 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature09221>>. Acesso em: 5 maio. 2020

CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. PM3-SM3: A general parameterization for including aqueous solvation effects in the PM3 molecular orbital model. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1089–1097, 1 nov. 1992.

DA COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Algoritmo genético em química. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 405–411, 1999.

DAUCHY, F.-A. et al. Trypanosoma brucei CYP51: Essentiality and Targeting Therapy in an Experimental Model. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005125, 17 nov. 2016.

DE NOYA, B. A. et al. Update on oral chagas disease outbreaks in Venezuela: Epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 377–386, 2015.

DE OLIVEIRA, C. S. et al. Synthetic Approaches and Pharmacological Activity of 1,3,4-Oxadiazoles: A Review of the Literature from 2000–2012. **Molecules** 2012, Vol. 17, Pages 10192-10231, v. 17, n. 9, p. 10192–10231, 27 ago. 2012.

DE PAULA, V. F. et al. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. **Pest Manag Sci**, v. 56, p. 168–174, 2000.

DE RYCKER, M. et al. **Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases** *Nature* Nature Publishing Group, , 26 jul. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30046073/>>. Acesso em: 1 set. 2020

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 1–19, 2009.

DEWAR, M. J. S. et al. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902–3909, 1985.

DEWAR, M. J. S.; THIEL, W. Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 99, p. 4899–4907, 1977.

DIAS, J. P. et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 296–300, 2008.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20–33, 1 maio 2016.

DNDi | Symptoms, transmission, and current treatments for Chagas disease. Disponível em: <<https://dndi.org/diseases/chagas/facts/>>. Acesso em: 5 dez. 2021.

Doença de Chagas — Português (Brasil). Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 5 dez. 2021.

ELDRIDGE, M. D. et al. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 11, n. 5, p. 425–445, 1997.

FAUNDEZ, M. et al. Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 126–130, jan. 2005.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British medical bulletin**, v. 93, n. 1, p. 179–200, mar. 2010.

FERREIRA, W. S. **Utilização da piperina como protótipo na síntese de novos antichagásicos da classe das 1,3,4- tiadiazólio-2- fenilaminidas** Seropédica, Rio de Janeiro, 2006.

FERREIRA, W. S. et al. Piperine, its Analogues and Derivatives: Potencial as Antiparasitic Drugs. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 208–224, 2012.

FRADERA, X.; BABAOGLU, K. **Overview of Methods and Strategies for Conducting Virtual Small Molecule Screening** Current protocols in chemical biology Curr Protoc Chem Biol, , 14 set. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28910858/>>. Acesso em: 28 jun. 2021

FRANÇA, R. R. F. et al. Inibidores potentes da enzima estero1 14 α -desmetilase contra *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1483–1516, 2014.

FRANKLIM, T. N. et al. Design, synthesis and trypanocidal evaluation of novel 1,2,4-triazoles-3- thiones derived from natural piperine. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6366–6382, 2013.

FRANKLIM, T. N. et al. Design, Synthesis, Trypanocidal Activity, and Studies on Human Albumin Interaction of Novel S-Alkyl-1,2,4-triazoles. **Article J. Braz. Chem. Soc**, v. 30, n. 7, p. 1378–1394, 2019.

FRAUCHES-SANTOS, C. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICORROSIVA DE CLORETOS DE 1, 3, 4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINAS E 1, 3, 4- TRIAZÓLIO-2-TIOLATOS EM MEIO ÁCIDO** Seropédica, Rio de Janeiro, 2017.

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitology Research**, v. 102 (5), 2008.

FRIGGERI, L. et al. Validation of Human Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Druggability: Structure-Guided Design, Synthesis, and Evaluation of Stoichiometric, Functionally Irreversible Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 10391–10401, 27 nov. 2019.

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

GIULIVI, C.; TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 243–251, 1 set. 1988.

GONZÁLEZ-MEDINA, M. et al. **Open chemoinformatic resources to explore the structure, properties and chemical space of molecules** RSC Advances Royal Society of Chemistry, , 21 nov. 2017. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/ra/c7ra11831g>>. Acesso em: 11 out. 2020

GROS, L. et al. New azasterols against *Trypanosoma brucei*: Role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2595–2601, ago. 2006.

GUEDES-DA-SILVA, F. H. et al. Antitrypanosomal activity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) inhibitors VNI and VFV in the swiss mouse models of chagas disease induced by the *Trypanosoma cruzi* Y strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 1 abr. 2017.

HARGROVE, T. Y. et al. A requirement for an active proton delivery network supports a compound I-mediated C–C bond cleavage in CYP51 catalysis. 2020a.

HARGROVE, T. Y. et al. A requirement for an active proton delivery network supports a compound I-mediated C–C bond cleavage in CYP51 catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 29, p. 9998–10007, 17 jul. 2020b.

HAUBRICH, B. A. et al. Discovery of an ergosterol-signaling factor that regulates *trypanosoma brucei* growth. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 2, p. 331–341, 1 fev. 2015.

HERNANDEZ, L. M. et al. **Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander 2008** *Revista Del Observatorio de Salud Pública de Santander* *Revista Del Observatorio de Salud Pública de Santander*, 2009. . Acesso em: 25 maio. 2020

HOEKSTRA, W. J. et al. Clinical Candidate VT-1161's Antiparasitic Effect In Vitro, Activity in a Murine Model of Chagas Disease, and Structural Characterization in Complex with the Target Enzyme CYP51 from *Trypanosoma cruzi*. 2016.

HOLT, F.; GILLAM, S. J.; NGONDI, J. M. Improving Access to Medicines for Neglected Tropical Diseases in Developing Countries: Lessons from Three Emerging Economies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1390, 28 fev. 2012.

HOTEZ, P. J.; PECOUL, B. “Manifesto” for Advancing the Control and Elimination of Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, maio 2010.

HOUWELING, T. A. J. et al. **Socioeconomic Inequalities in Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review** *PLoS Neglected Tropical Diseases* *Public Library of Science*, 2016. . Acesso em: 16 abr. 2020

HOWARD, E. J. et al. **Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A systematic review and meta-analysis** *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* *NIH Public Access*, jan. 2014. . Acesso em: 6 maio. 2020

HU, Y. et al. A Review of Recent Advances and Research on Drug Target Identification Methods. **Current Drug Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 209–216, 25 set. 2018.

JACKSON, Y. et al. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 10, 15 nov. 2010.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 4 abr. 1997.

JUNQUEIRA, A. C. V. et al. **Manual de Capacitação na Detecção de *Trypanosoma cruzi* para Microscopistas de Malária e Laboratoristas da Rede Pública** (J. R. Coura, Ed.) Rio de Janeiro, 2011.

KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. The porphyrin handbook: Phthalocyanines: Spectroscopic and electrochemical characterization. **The Porphyrin Handbook: Phthalocyanines: Spectroscopic and Electrochemical Characterization**, v. 16, p. 1–288, 2 dez. 2012.

KAWASAKI, Y.; FREIRE, E. **Finding a better path to drug selectivity** *Drug Discovery Today* *Drug Discov Today*, nov. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21839183/>>. Acesso em: 1 set. 2020

KHAMIS, M. A.; GOMAA, W.; AHMED, W. F. **Machine learning in computational docking** *Artificial Intelligence in Medicine* Elsevier, , 1 mar. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0933365715000032>>. Acesso em: 4 abr. 2021

KHAN, I. et al. Synthesis, antioxidant activities and urease inhibition of some new 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 11, p. 5200–5207, nov. 2010.

KIRTON, S. B. et al. Prediction of binding modes for ligands in the cytochromes P450 and other heme-containing proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 58, n. 4, p. 836–844, 1 mar. 2005.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, nov. 2004.

KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 1, p. 84–96, jan. 2009.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. **Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, nov. 2008. . Acesso em: 17 maio. 2021

KUPWADE, R. V. et al. Catalyst-free oxidation of sulfides to sulfoxides and diethylamine catalyzed oxidation of sulfides to sulfones using Oxone as an oxidant. **Research on Chemical Intermediates** 2017 **43:12**, v. 43, n. 12, p. 6875–6888, 7 jul. 2017.

LARANJA, F. S. et al. **Chagas' Disease A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study**, 2009. Disponível em: <<http://ahajournals.org>>. Acesso em: 9 jun. 2020

LAZARDI, K.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 11, p. 2097–2105, 1990.

LEONARD, N. J.; JOHNSON, C. R. Periodate Oxidation of Sulfides to Sulfoxides. Scope of the Reaction. **Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 282–284, 1 jan. 2002.

LEPESHEVA, G. I. et al. Crystal structures of *Trypanosoma brucei* sterol 14 α -demethylase and implications for selective treatment of human infections. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 3, p. 1773–1780, 15 jan. 2010.

LEPESHEVA, G. I. et al. VFV as a new effective CYP51 structure-derived drug candidate for chagas disease and visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 9, p. 1439–1448, 1 nov. 2015.

LEPESHEVA, G. I.; FRIGGERI, L.; WATERMAN, M. R. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: past, present and future. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1820–1836, 1 dez. 2018.

LEPESHEVA, G. I.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Targeting *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51). In: **Advances in Parasitology**. [s.l.] Academic Press, 2011. v. 75p. 65–87.

LEVINE, N. D. ET AL. A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozool.**, v. 27, p. 37–58, 1980.

LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. **An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking** *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* Springer Berlin Heidelberg, , 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>>. Acesso em: 22 abr. 2021

LI, L. et al. On the dielectric “constant” of proteins: Smooth dielectric function for macromolecular modeling and its implementation in DelPhi. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 4, p. 2126–2136, 9 abr. 2013.

LINDEN, R. **Algoritmos Genéticos: Uma importante ferramenta da inteligência computacional**. Rio de Janeiro: Editora Brasport, 2006.

LUQUETTI, A. O. et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 369–376, 14 mar. 2015.

MACRAE, C. F. et al. *Mercury CSD 2.0* – new features for the visualization and investigation of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, n. 2, p. 466–470, 1 abr. 2008.

MANJULA, P. S. et al. The crystal structures of three 3-methyl-1H-1,2,4-triazole-5-thiones, including a second polymorph of 4-[(E)-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene)amino]-3-methyl-1H-1,2,4-triazole-5(4H)-thione and a redetermination of 4-amino-3-methyl-1H-1,2,4-triazole-5(4H)-thione. **Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications**, v. 71, p. 1003–1009, 2015.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry-Reactions: Mecanism and Structure**. 3^a ed. ed. [s.l.] John Willey& Sons, 1985.

MARTIN, M. B. et al. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: A potential route to chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 909–916, 15 mar. 2001.

MAVROVA, A. T. et al. Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immunocompetent cells. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 1, p. 63–69, jan. 2009.

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 & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601–620, abr. 2007.

MOOIJ, W. T. M.; VERDONK, M. L. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 61, n. 2, p. 272–287, 1 nov. 2005.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. 1. ed. São Paulo: Editora e Livraria da Física, 2007.

MORILLO, C. A. et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. *Cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939–947, 28 fev. 2017.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and an empirical binding free energy function. **J. Comp. Chem**, v. 19, p. 1639–1662, 1998.

MURCIA, L. et al. Risk Factors and Primary Prevention of Congenital Chagas Disease in a Nonendemic Country. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 4, p. 496–502, 15 fev. 2013.

NAVEENA, C. S.; BOJA, P.; KUMARI, N. S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some disubstituted 1,3,4-oxadiazoles carrying 2-(aryloxymethyl)phenyl moiety. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 11, p. 4708–19, nov. 2010.

NÓBREGA, A. A. et al. Oral transmission of chagas disease by consumption of Açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–655, abr. 2009.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 1, p. 205–217, 8 set. 2000.

NÚÑEZ-VERGARA, L. J. et al. Nitro radical anion formation from nifurtimox. Part 1: Biological evidences in *Trypanosoma cruzi*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 1, p. 151–155, 1 jun. 1997.

OLIVEIRA, F. G. et al. Molecular docking study and development of an empirical binding free energy model for phosphodiesterase 4 inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 17, p. 6001–11, 1 set. 2006.

OPERA, T. I. **Chemoinformatics in drug discovery**. [s.l.] Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

OSORIO-MÉNDEZ, J. F.; CEVALLOS, A. M. **Discovery and genetic validation of chemotherapeutic targets for Chagas' disease** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* Frontiers Media S.A., , 7 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/>>. Acesso em: 7 set. 2020

PAHO/WHO - Chagas Disease. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921&lang=en>. Acesso em: 1 abr. 2020.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease** Washington, D.C, 2019. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/49653>>

PATTERSON, S. et al. Dihydroquinazolines as a novel class of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase inhibitors: Discovery, synthesis, and characterization of their binding mode by protein crystallography. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 6514–6530, 13 out. 2011.

PEREIRA, I. R. et al. A human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2015.

PÉREZ-AYALA, A. et al. Gastro-intestinal Chagas disease in migrants to Spain: Prevalence and methods for early diagnosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 25–29, jan. 2011.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.

PETRAGLIA KROPF, S.; MASSARANI, L. Carlos Chagas, A ciência para combater doenças tropicais. p. 16, 2009.

PINTO, A. Y. D. N. et al. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602–614, nov. 2008.

PINTO DIAS, J. C. **The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* SBMT, , 1989. . Acesso em: 9 jun. 2020

PODUST, L. M. et al. Estriol Bound and Ligand-free Structures of Sterol 14 α -Demethylase. **Structure**, v. 12, n. 11, p. 1937–1945, nov. 2004.

PODUST, L. M.; POULOS, T. L.; WATERMAN, M. R. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. v. 98, n. 6, 13 mar. 2001a.

PODUST, L. M.; POULOS, T. L.; WATERMAN, M. R. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 6, p. 3068–73, 13 mar. 2001b.

POLLACK, L. **Historical Series: National Lecture**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ks.uiuc.edu/events/NationalLecture2015/reflection/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

POOLE, L. B. **The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry** *Free Radical Biology and Medicine* Elsevier Inc., , 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25433365/>>. Acesso em: 12 set. 2020

PRATA, A. et al. Tratamento da Doença de Chagas pelo Nifurtimox (Bayer 2502). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 9, n. 6, p. 297–307, dez. 1975.

PREVIATO, L. **Macromoléculas: Carboidratos de superfície do Trypanosoma cruzi**. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/bioquimica/>>. Acesso em: 10 set. 2020.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D. et al. Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives. In: **In Silico Drug Design**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 19–44.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. **Chagas disease** *The Lancet* Elsevier, , 17 abr. 2010. . Acesso em: 7 jun. 2020

RIBEIRO, T. S. et al. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 13, p. 3555–3558, 5 jul. 2004.

RILEY, J. et al. Development of a Fluorescence-based Trypanosoma cruzi CYP51 Inhibition Assay for Effective Compound Triaging in Drug Discovery Programmes for Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–12, 2015.

ROCHA JR., J. G. **Desenvolvimento de um modelo empírico de predição de atividade de inibidores da esterol 14alfa-desmetilase (CYP51) utilizando o método semi-empírico PM6**. UFRRJ: [s.n.].

ROCHA, S. F. L. DA S. **Desenvolvimento de um Modelo Empírico de Predição da Atividade de Inibidores da Urease utilizando o Método Semi-Empírico PM6**. [s.l: s.n.].

ROCHA, S. F. L. DA S. **Desenvolvimento de um modelo empírico de predição da seletividade e da atividade de inibidores da Shp2 utilizando o método semi-empírico PM7**. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 29 jan. 2019.

SALDÍVAR-GONZÁLEZ, F.; PRIETO-MARTÍNEZ, F. D.; MEDINA-FRANCO, J. L. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. **Educacion Quimica**, v. 28, n. 1, p. 51–58, 1 jan. 2017.

SANT'ANNA; C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Rev. Virtual Quím**, v. 1, p. 49–57, 2009.

SANTANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos : Uma introdução Resumo Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos : Uma introdução. **Rev. Virtual Quim.**, v. 1, n. 1, p. 49–57, 2009.

SCHMUNIS, G. A. **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **Anais...Fundação Oswaldo Cruz**, out. 2007. . Acesso em: 5 maio. 2020

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 153–166, 2007.

SHELDRIK, G. M. **A short history of SHELXActa Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography**International Union of Crystallography, , 1 jan. 2008. . Acesso em: 31 mar. 2020

SHYADEHI, A. Z. et al. The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 alpha-demethylase of Candida albicans (other names are:

lanosterol 14 alpha-demethylase, P-45014DM, and CYP51). **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 21, p. 12445–12450, 1996.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715–748, 20 jun. 2017.

SOSA, E. J. et al. Target-Pathogen: A structural bioinformatic approach to prioritize drug targets in pathogens. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D413–D418, 1 jan. 2018.

SPINKS, D. et al. Design, synthesis and biological evaluation of Trypanosoma brucei Trypanothione Synthetase inhibitors. **ChemMedChem**, v. 7, n. 1, p. 95–106, 2 jan. 2012.

STEINDEL, M. et al. Characterization of Trypanosoma cruzi isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 1, p. 25–32, jan. 2008.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 209–220, 1 mar. 1989.

STEWART, J. J. P. **MOPAC 2000.00 Manual**. Tokyo, JapanFujitsu Limited, , 1999.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of molecular modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173–213, 2007.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1–32, 2013a.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1–32, jan. 2013b.

THIEL, W. Semiempirical quantum–chemical methods. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 4, n. 2, p. 145–157, 1 mar. 2014.

THIEL, W.VOITYUK, A. A. Extension of the MNDO formalism to d-orbitals - Integral approximations and preliminary numerical results. **Theor. Chim. Acta**, v. 81, p. 391–404, 1992.

TROST, B. M.; CURRAN, D. P. Chemoselective oxidation of sulfides to sulfones with potassium hydrogen persulfate. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n. 14, p. 1287–1290, 1 jan. 1981.

TURNOCK, D. C.; FERGUSON, M. A. Sugar nucleotide pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 8, p. 1450–1463, ago. 2007.

URBINA, J. A. et al. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2379–2387, 1 jul. 2004.

VALENTE, S. A. DA S. et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 3, p. 291–297, mar. 2009.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, n. 4, p. 609–623, 1 set. 2003.

VILLALTA, F.; RACHAKONDA, G. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 1161–1174, 2 nov. 2019.

WANG, S. et al. Protein kinase C. Modeling of the binding site and prediction of binding constants. **Journal of medicinal chemistry**, v. 37, n. 9, p. 1326–38, 29 abr. 1994.

WHO. **World Health Organization. Global plan to combat neglected tropical diseases 2008–2015.** Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69708/%0AWHO_CDS_NTD_2007.3_eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 7 out. 2019.

WOO, H.-M. et al. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes. **Life sciences**, v. 80, n. 10, p. 926–931, 13 fev. 2007.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **WHO Technical Report Series 905. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert Committee.** Geneva: [s.n.]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42443/WHO_TRS_905.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 abr. 2020.

YOSHIDA, Y. et al. Sterol 14-demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 273, n. 3, p. 799–804, 14 jul. 2000.

YUNG-CHI, C.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. **Biochemical pharmacology**, v. 22, n. 23, p. 3099–3108, 1 dez. 1973.

ZINGALES, B. et al. **The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications** *Infection, Genetics and Evolution*, mar. 2012. . Acesso em: 15 abr. 2020

9. ANEXOS

Anexo 1: Resultado do alinhamento das sequências FASTA das enzimas 4H6O (CYP51_{Tc}) e 6UEZ (CYP51_{Hs}) geradas pelo T-Coffee.

```

T-COFFEE, Version_11.00 (Version_11.00)
Cedric Notredame
CPU TIME:0 sec.
SCORE=99
*
  BAD AVG GOOD
*
4H6O_1|Chain      : 99
6UEZ_1|Chains    : 99
cons              : 9

4H6O_1|Chain      -----MAKKTPPVYPVTVPFLGHIVQFGKNPLEFMQRCKRDLKSGVFTTISIGGQRVTIVGDPHEH
6UEZ_1|Chains    MAKKTSSKGKLPPIYFSPIPFLGHAIAFGKSPIEFLENAYEKY-GPVFSFTMVGKTFTTYLLGSDAA

cons              * * * .:***** : ***.:**::.. .. . **::: : * : . * : ...

4H6O_1|Chain      SRFFSRNEILSPREVYT-IMTPVFGEGVAYAAPYPRMREQLNFLAEELTIAKQNFVPAIQHEVR
6UEZ_1|Chains    ALLFNSKNEDLNAEDVYSRLTTVPFGKVAYDVPNPVFLEQKKMLKSGLNIAHFQHVSIIEKETK

cons              : :*.:.** *...:*** : *****:*** . * : ** :.* . *.**:::..* .*:..:

4H6O_1|Chain      KFMAENWKEDEGVINLLEDCGAMIINTACQCLFGEDLRKRLNARHFAQLLSKMESSLI-PAAVFMP
6UEZ_1|Chains    EYFES--WGESGEKNVFEALSELIIILTASHCLHGKEIRSQLNEKVAQLY-ADLAGGFSHAAWLLP-

cons              ::: . :.* *:* * . :** **.:**.*:::..** : :.. :.. : * :

4H6O_1|Chain      WLLRLPLPQSARCREARAELQKILGEIIVAREKEEEASKDNNTSDLLGGLLKAVYRDGTRMSLHEVC
6UEZ_1|Chains    -----GWLPLPSFRRRDRAHREIKDIFYKAIQKRRQSQEKIDDILQTLLDATYKDRPLTDEVA

cons              . . . * . : : : * : :.. . : : : . * : * **.*:* * * : : . ** .

4H6O_1|Chain      GMIVAAMFAGQHTSTITTSWSMLHLMHPKNKKWLDKLHKEID----EFPAQLNYDNVDEMPFAER
6UEZ_1|Chains    GMLIGLLLAGQATSSSTSAWMGFFLAR--DKTLQKCYLEQKTVCGENLPLTYDQLK-DLNLLDR

cons              **::.. : :*** ** : *:* * : * : :*. . * : * . * . *.**:: : : : *

4H6O_1|Chain      CVRESIRDPLLMVMRMVKAEVKGSYVVPKGDIIACSPLLSHHDEEAFNPRLWDPERD-----
6UEZ_1|Chains    CIKETLRLRPPIMIMMRMARTPQTVAGYTIPPGHQCVSPTVNQRLKDSWVERLDFNPDRYLQDNP

cons              * : * : * * * : : * . . . * * . . ** : : : : : : : : * : *

```

4H6O_1|Chain -EKVDGAFIGFGAGVHKCIGQKFALLQVKITILATAFREYDFQLLRDEVDPDPDYHTMVVGP TLNQCL
 6UEZ_1|Chains ASGEKFAYVFPFGAGRHCIGENFAYVQIKTIWSTMLRLYEFDLIDGYFPTVNYTTMIHTPE--NPV

cons . . * : : **** * : *** : : ** : * : * * : * : * . . * : * ** : * : :

4H6O_1|Chain VKYTRKKKLPSHHHHH
 6UEZ_1|Chains IRYKRRSK-----

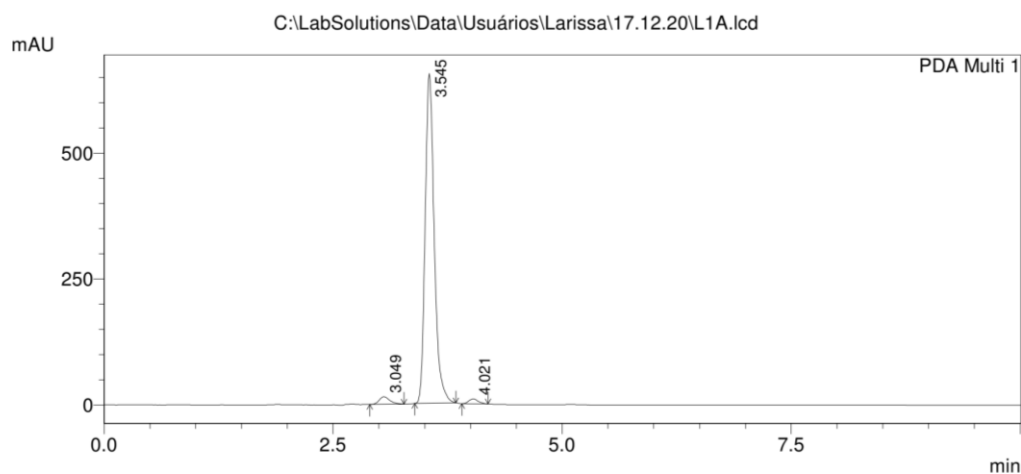
cons : : * . * : . *

Anexo 2: Resultados de análise de pureza do composto **B1** feito em CLAE.

17/12/2020 08:58:33 1 / 2

C:\LabSolutions\Data\Usuários\Larissa\17.12.20\L1A.lcd
 Acquired by : ROSANE
 Sample Name : L1A
 Injection Volume : 20 uL
 Method File Name : Heterociclos_PDA.lcmHPLC Prominence -Shimadzu- LC-20AT
 Detector DAD -SPD-M20A, forno CTO-20A
 Auto Sampler SIL-10AF - CBM-20A
 Coluna C18 - Betasil (25cm x4.6mm x5um) Thermo
 Método :Heterociclos_PDA
 Solvente: B:MeOH (90%) - A: H2O: AcOH1%(10%)
 Volume 20 uL - fluxo 1.0mL/min
 Time= 10 min
 PDA-350nm - Pressão= 109kgf/c
 Temp=40C

Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2020 08:37:35
 Data Processed : 17/12/2020 08:47:37



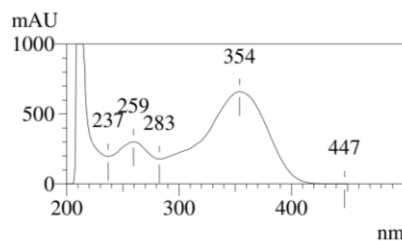
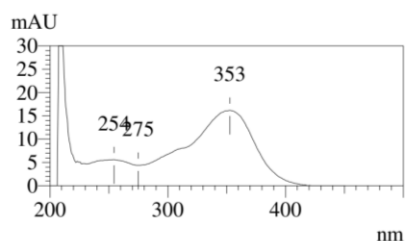
1 PDA Multi 1/350nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 350nm 4nm			
Name	Ret. Time	Area	Area %
RT3.049	3.049	122556	2.604
L1A	3.545	4515410	95.951
RT4.021	4.021	67992	1.445
		4705957	100.000

Retention Time : 3.049
 Compound Name : RT3.049

Retention Time : 3.545
 Compound Name : L1A



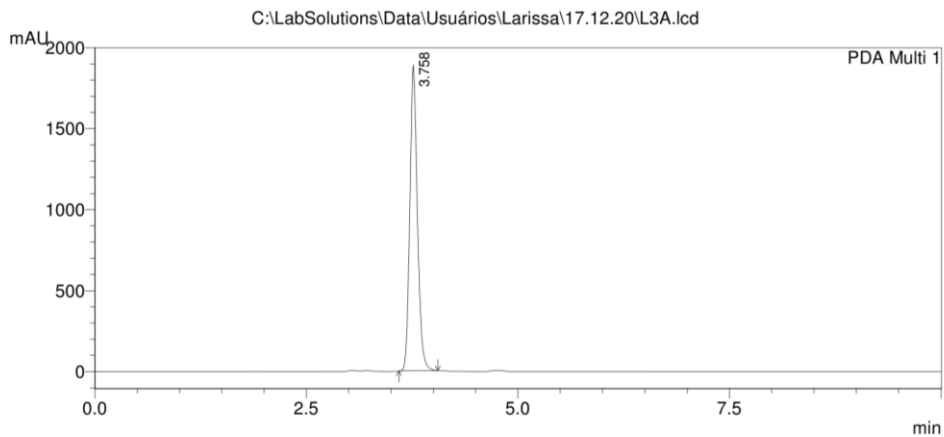
C:\LabSolutions\Data\Usuários\Larissa\17.12.20\L1A.lcd

Anexo 3: Resultados de análise de pureza do composto **B9** feito em CLAE.

17/12/2020 10:13:02 1 / 2

C:\LabSolutions\Data\Usuários\Larissa\17.12.20\L3A.lcd
 Acquired by : ROSANE
 Sample Name : L3A
 Injection Volume : 20 uL
 Method File Name : Heterociclos_PDA.lcmHPLC Prominence -Shimadzu- LC-20AT
 Detector DAD -SPD-M20A, forno CTO-20A
 Auto Sampler SIL-10AF - CBM-20A
 Coluna C18 - Betasil (25cm x4.6mm x5um) Thermo
 Método :Heterociclos_PDA
 Solvente: B:MeOH (90%) - A: H2O: AcOH1%(10%)
 Volume 20 uL - fluxo 1.0mL/min
 Time= 10 min
 PDA-350nm - Pressão= 109kgf/c
 Temp=40C

Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2020 09:41:01
 Data Processed : 17/12/2020 10:12:36



PeakTable

PDA Ch1 350nm 4nm			
Name	Ret. Time	Area	Area %
L3A	3.758	11734943	100.000
		11734943	100.000

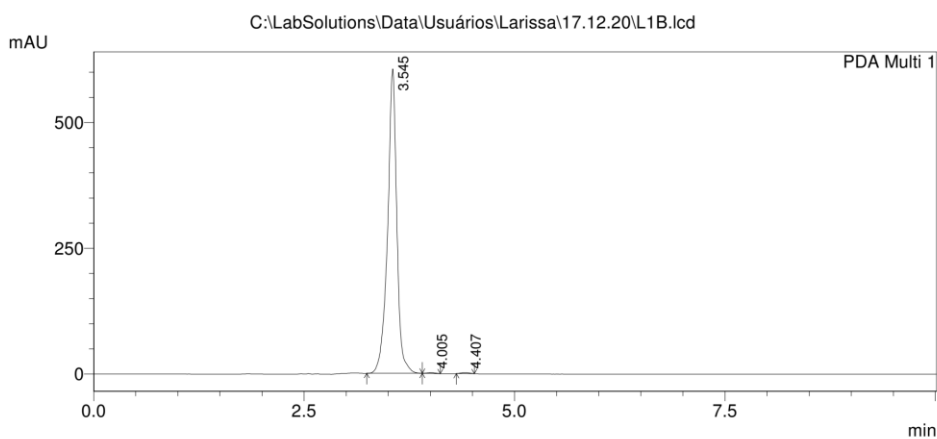
C:\LabSolutions\Data\Usuários\Larissa\17.12.20\L3A.lcd

Anexo 4: Resultados de análise de pureza do composto **B2** feito em CLAE.

17/12/2020 10:07:58 1 / 2

C:\LabSolutions\Data\Usuários\Larissa\17.12.20\L1B.lcd
 Acquired by : ROSANE
 Sample Name : L1B
 Injection Volume : 20 uL
 Method File Name : Heterociclos_PDA.lcmHPLC Prominence -Shimadzu- LC-20AT
 Detector DAD -SPD-M20A, forno CTO-20A
 Auto Sampler SIL-10AF - CBM-20A
 Coluna C18 - Betasil (25cm x4.6mm x5um) Thermo
 Método :Heterociclos_PDA
 Solvente: B:MeOH (90%) - A: H2O: AcOH1%(10%)
 Volume 20 uL - fluxo 1.0mL/min
 Time= 10 min
 PDA-350nm - Pressão= 109kgf/c
 Temp=40C

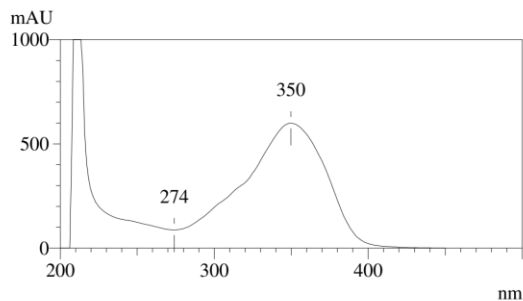
Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2020 09:06:43
 Data Processed : 17/12/2020 10:07:10



PeakTable

Name	Ret. Time	Area	Area %
L1B	3.545	4604619	99.404
RT4.005	4.005	12047	0.260
RT4.407	4.407	15550	0.336
		4632217	100.000

Retention Time : 3.545
 Compound Name : L1B

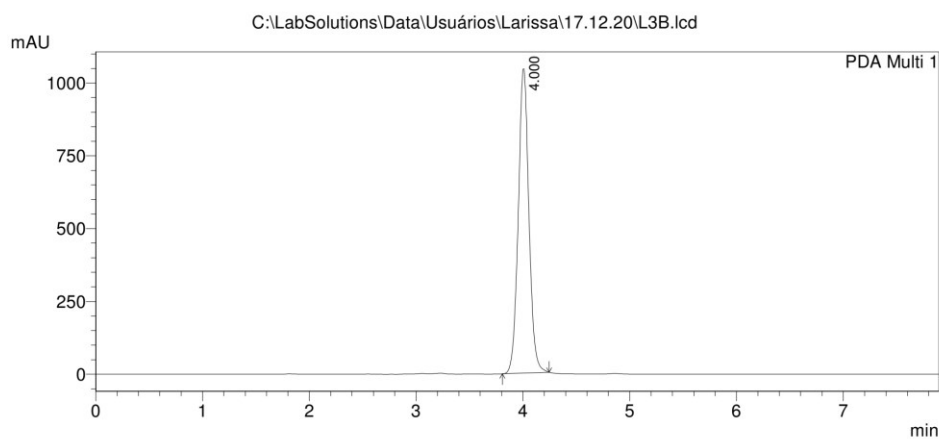


C:\LabSolutions\Data\Usuários\Larissa\17.12.20\L1B.lcd

Anexo 5: Resultados de análise de pureza do composto **B10** feito em CLAE.

17/12/2020 12:19:41 1 / 2

C:\LabSolutions\Data\Usuários\Larissa\17.12.20\L3B.lcd
 Acquired by : ROSANE
 Sample Name : L3B
 Injection Volume : 20 uL
 Method File Name : Heterociclos_PDA.lcmHPLC Prominence -Shimadzu- LC-20AT
 Detector DAD - SPD-M20A, forno CTO-20A
 Auto Sampler SIL-10AF - CBM-20A
 Coluna C18 - Betasil (25cm x4.6mm x5um) Thermo
 Método :Heterociclos_PDA
 Solvente: B:MeOH (90%) - A: H2O: AcOH1%(10%)
 Volume 20 uL - fluxo 1.0mL/min
 Time= 10 min
 PDA-350nm - Pressão= 109kgf/c
 Temp=40C
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2020 10:05:35
 Data Processed : 17/12/2020 12:19:06



PeakTable

PDA Ch1 350nm 4nm			
Name	Ret. Time	Area	Area %
L3B	4.000	7224102	100.000
		7224102	100.000

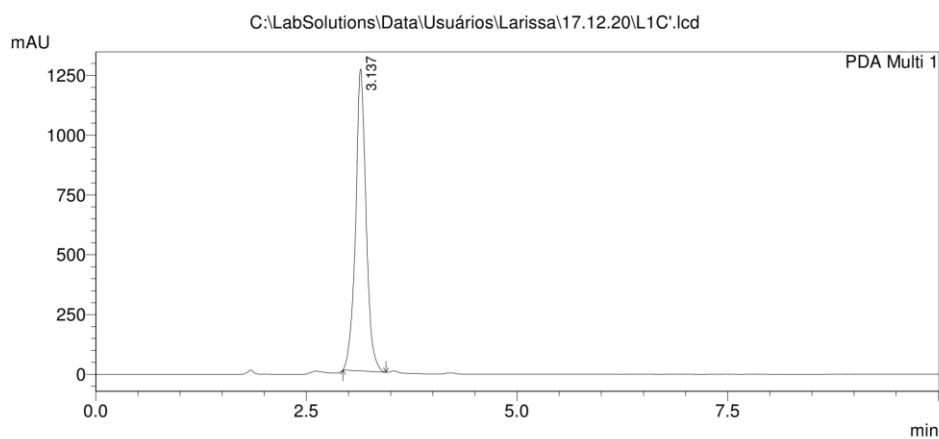
Anexo 6: Resultados de análise de pureza do composto **B3** feito em CLAE.

17/12/2020 10:11:36 1 / 2

C:\LabSolutions\Data\Usuários\Larissa\17.12.20\L1C'.lcd

Acquired by : ROSANE
 Sample Name : L1C'
 Injection Volume : 20 uL
 Method File Name : Heterociclos_PDA.lcmHPLC Prominence -Shimadzu- LC-20AT
 Detector DAD -SPD-M20A, forno CTO-20A
 Auto Sampler SIL-10AF - CBM-20A
 Coluna C18 - Betasil (25cm x4.6mm x5um) Thermo
 Método :Heterociclos_PDA
 Solvente: B:MeOH (90%) - A: H2O: AcOH1%(10%)
 Volume 20 uL - fluxo 1.0mL/min
 Time= 10 min
 PDA-350nm - Pressão= 109kgf/c
 Temp=40C

Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2020 09:29:35
 Data Processed : 17/12/2020 10:10:41



PeakTable

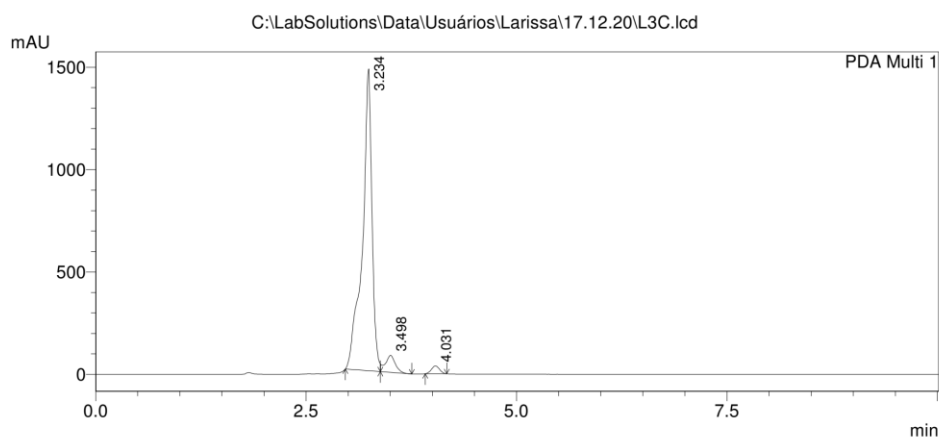
PDA Ch1 350nm 4nm			
Name	Ret. Time	Area	Area %
L1C'	3.137	10910274	100.000
		10910274	100.000

Anexo 7: Resultados de análise de pureza do composto **B11** feito em CLAE.

17/12/2020 12:15:11 1 / 2

C:\LabSolutions\Data\Usuários\Larissa\17.12.20\L3C.lcd
 Acquired by : ROSANE
 Sample Name : L3C
 Injection Volume : 20 uL
 Method File Name : Heterociclos_PDA.lcmHPLC Prominence -Shimadzu- LC-20AT
 Detector DAD -SPD-M20A, forno CTO-20A
 Auto Sampler SIL-10AF - CBM-20A
 Coluna C18 - Betasil (25cm x4.6mm x5um) Thermo
 Método :Heterociclos_PDA
 Solvente: B:MeOH (90%) - A: H2O: AcOH1%(10%)
 Volume 20 uL - fluxo 1.0mL/min
 Time= 10 min
 PDA-350nm - Pressão= 109kgf/c
 Temp=40C

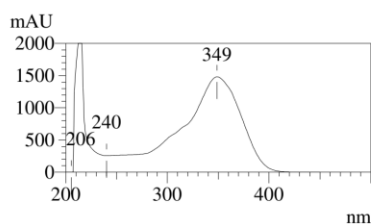
Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2020 11:05:30
 Data Processed : 17/12/2020 12:14:29



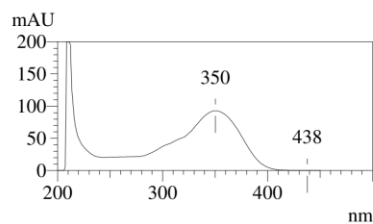
PeakTable

PDA Ch1 350nm 4nm			
Name	Ret. Time	Area	Area %
L3C	3.234	11659756	92.682
RT3.498	3.498	666943	5.301
RT4.031	4.031	253629	2.016
		12580328	100.000

Retention Time : 3.234
 Compound Name : L3C



Retention Time : 3.498
 Compound Name : RT3.498



C:\LabSolutions\Data\Usuários\Larissa\17.12.20\L3C.lcd

Anexo 8: Valores de fluorescência obtidos no experimento 1 em 1 hora de reação.

Conc. (µM)	Posa	B1	B2	B9	B10	C1	C2	C3	C4	Meti	DMSO
40	25531	86376	58833	71883	18137	45407	12757	35935	15846	14659	14904
20	47536	71140	45768	34458	15726	26684	12434	64909	57562	28230	52237
10	15362	9303	8707	33954	11274	12912	10625	23205	39555	46769	15124
2,5	16482	35411	8720	16322	15922	10077	9740	21789	10714	50391	45344
0,625	53796	9821	8075	11266	9521	13654	12455	8629	15791	33358	49170
0,16	15429	14214	9882	8979	25948	8664	21048	10364	9663	30951	13250
0,039	33760	9231	24629	28390	7774	9400	64280	100000	83000	100000	21855
0,0098	35080	18062	21192	37144	27587	47773	15582	14930	15719	81028	100000

Anexo 9: Leituras de fluorescência do experimento 2, após 1 hora de reação.

Conc.(µM)	Sem Adição de Posa			Com Adição de Posa		
	Posa	B2	DMSO	Posa	B2	DMSO
20	7059	10306	9046	7317	10956	8673
10	6767	7874	9981	5301	8051	8200
5	5763	9207	8742	5712	9318	8611
2,5	5859	8666	9009	5589	8554	8908
0,625	5461	8611	9013	5590	8516	8923
0,16	5596	8871	8807	5540	8685	8937
0,039	6052	8653	9905	6009	8579	8634
0,0098	7784	8665	9060	7803	8610	9019

Anexo 10: Leituras de Fluorescência do experimento 3 feita após uma hora de reação (com adição de posaconazol).

Conc (µM)	Posa	B1	B2	B9	B10	C1	C2	C4	C4	Meti	DMSO
40	33898	62351	26809	56702	43583	21281	25545	64870	59488	45592	70459
20	29717	27228	19193	28515	48373	74741	51113	19807	100000	29399	15333
10	25794	36590	66703	41362	87700	67720	27204	100000	100000	49820	45694
2,5	31868	41560	18684	17315	19496	100000	32951	16830	21299	48989	24402
0,625	20837	36562	55244	46512	62607	85048	30602	32497	100000	32966	80933
0,16	41405	47664	55021	67390	38331	47967	16722	56359	100000	40011	58403
0,039	17459	28173	49053	28136	52906	58048	25588	49648	61818	38808	43799
0,0098	27971	42246	27943	18752	21903	21112	31397	20677	100000	25110	15073

Anexo 11: Leituras de fluorescência do experimento 4 em 1 hora de reação e após adição de posaconazol.

Conc. (µM)	Posa	B1	B2	B9	B10	C1	C2	C3	C4	Meti	DMSO
40	26686	44639	35605	80735	100000	100000	87040	56975	43995	82846	100000
20	31173	38053	39389	60839	48191	100000	100000	80648	42494	43103	28544
10	32819	44522	41196	50783	35708	57680	83804	49840	56658	43022	100000
2,5	37149	33359	51828	50087	41227	100000	67839	68769	100000	40716	35544
0,625	28696	39854	41928	47434	60960	54975	100000	100000	63966	38550	28212
0,16	24235	36695	43504	50130	39495	100000	89249	90249	54062	31339	37822
0,039	23945	40061	35428	63054	55071	63073	100000	43723	49888	38592	32721

0,0098 22166 38758 36819 40185 61685 85650 100000 100000 54650 47162 35023

Anexo 12: Leituras de fluorescência do experimento 5 em 1 hora de reação e após adição de posaconazol.

Conc. (µM)	Posa	B1	B2	B9	B10	C1	C2	C3	C4	Meti	DMSO
40	30639	29597	57998	46903	22257	22006	11890	26207	21467	19395	16912
20	22798	35708	23643	17752	30136	18937	14283	14078	15614	29189	36640
10	24411	18986	27231	37856	41098	26217	26626	21621	12693	19490	14984
2,5	26680	23734	19274	22861	28975	60500	15733	14994	100000	10591	18449
0,625	28737	27774	36544	40316	27218	16882	23456	20349	20128	14437	21752
0,16	26506	62633	30546	24785	100000	27566	19497	17770	16071	18267	18695
0,039	21233	23937	29308	61687	38614	22155	22458	23071	15180	20689	40321
0,0098	31227	32394	59897	86611	56523	24119	21643	24893	20382	27520	18277

Anexo 13: Valores de CI₅₀ calculados para **B1-B3** e **B5-B7** por experimento.

Composto	Vs .<i>T. cruzi</i> (tripomastigotas)					Vs .LLC-MK2					Seletividade
	Exp1	Exp2	Exp3	Média	DP	Exp1	Exp2	Exp3	Média	DP	
B1	6,84	8,57	6,51	7,30	1,11	> 50 µM	> 50 µM	> 50 µM	> 50 µM	-	> 6,85
B2	3,91	8,39	6,10	6,13	2,24	14,07	12,31	37,98	21,45	14,34	3,50
B3	14,37	21,01	17,14	17,51	3,34	> 50 µM	> 50 µM	> 50 µM	> 50 µM	-	> 2,86
B5	8,06	8,03	7,02	7,70	0,59	39,32	19,79	38,83	32,65	11,14	4,24
B6	7,50	7,85	10,01	8,46	1,36	12,24	15,28	19,73	15,75	3,77	1,86
B7	17,24	29,60	35,94	27,59	9,51	> 50 µM	> 50 µM	> 50 µM	> 50 µM	-	> 1,81
Benznidazol	4,67	5,74	-	5,21	0,76	-	-	-	-	-	-