UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA - ESENFAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS -PPGCF

EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS INIBIDORES DE ENZIMAS DO PARASITO *Trypanosoma cruzi:* SÍNTESE, *DOCKING* E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.

Maceió - AL
2015

EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS INIBIDORES DE ENZIMAS DO PARASITO *Trypanosoma cruzi:* SÍNTESE, *DOCKING* E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Escola de Enfermagem e Farmácia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino

Maceió - AL
2015

Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Roselito de Oliveira Santos

S586p Silva Júnior, Edeildo Ferreira da.
Planejamento de potenciais inibidores de enzimas do parasito *Trypanosoma cruzi*: síntese, *docking* e avaliação biológica / José Edeildo Ferreira da Silva Júnior. – Maceió, 2014.
118 f. : il.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.
Co-Orientação: Thiago Mendonça de Aquino
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 114-118.

1. Doença de chagas-docking 2. *Trypanosoma cruzi*. 3.Tiofeno-tiazolidina I. Título.

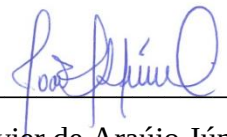
CDU: 616.937

Folha de Aprovação

EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

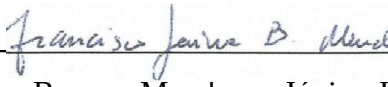
PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS INIBIDORES DE ENZIMAS DO PARASITO *Trypanosoma cruzi:* SÍNTESE, *DOCKING* E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 10 de Março de 2015.



(Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior, UFAL) (Orientador)

(Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino, UFAL) (Co-orientador)



(Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior, UFAL) (Examinador Externo)

(Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo, UFAL) (Examinador Interno)

AGRADECIMENTOS

À minha família, Pai, Mãe e Irmão, pelo apoio e suporte em todos os momentos da execução das atividades relacionadas ao meu trabalho.

À Valéria Brandão, minha noiva, por todo apoio, paciência, compreensão e ajuda com algumas etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior pelo compromisso e responsabilidade na orientação desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino pelo constante incentivo, compromisso e ensinamentos passados a mim.

Ao Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo por seu constante incentivo em fazer-me buscar conhecimentos sobre a aplicação de técnicas computacionais no estudo de novos compostos e potenciais atividades biológicas destes.

Ao meu amigo Paulo Henrique Barcellos França, por sua disponibilidade em ajudar e pela execução de parte dos cálculos de *docking* presentes nesse trabalho.

Ao meu amigo Daniel Lira da Silva, por sua disponibilidade em ajudar e por suas sugestões referentes à organização do trabalho como um todo.

Ao meu amigo Adilson Rodrigues Sabino, técnico no Laboratório de RMN da UFAL, por seus ensinamentos sobre diferentes técnicas utilizadas em RMN transmitidos a mim.

Ao MSc. Jair Lage de Siqueira Neto, da University of California, San Diego, pela disponibilidade e execução dos ensaios biológicos em formas amastigotas do parasito *T. cruzi*.

Ao Dr. Diogo Rodrigo Magalhães Moreira, do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-BA, pela disponibilidade e execução dos ensaios biológicos em formas tripomastigotas do parasito *T. cruzi.*

Ao graduando João Paulo Noé da Silva, do laboratório de Biologia Celular da UFAL, pela disponibilidade e execução dos ensaios de MTT.

Aos alunos de iniciação científica, Camila Rocha, Evellyn Santos, Felipe Luciano, e Welber Felix, pela parceria e execução das atividades relacionadas a obtenção dos compostos descritos nesse trabalho.

RESUMO

As doenças negligenciadas configuram um grande problema de saúde pública mundial, quantificando um total de 1 bilhão de pessoas acometidas por algum tipo de infecção de origem bacteriana, viral ou parasitária. Dentre elas, podemos destacar a Doença de Chagas, causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, a qual acomete mais de 8 milhões de pessoas em todo o mundo. No intuito de se descobrir novos compostos ativos capazes de combater o *T. cruzi* de maneira eficaz, desenvolvemos neste trabalho a síntese de novos protótipos de fármacos tiofeno-2-tioureicos e 2-iminotiazolidínicos racionalmente planejados com potencial atividade antichagásica, avaliação biológica e estudo de *docking*. Para a síntese dos compostos planejados, partiu-se de derivados tiofenos polissubstituídos, sintetizados via reação de *Gewald*, os quais foram convertidos em derivados tioureicos e, em seguida, ciclizados com cinco diferentes di-eletrófilos, gerando derivados tiofeno-2-iminotiazolidínicos. Os intermediários e compostos finais foram sintetizados com rendimentos entre 40 e 98%, e caracterizados por RMN. Para o estudo de docking, inicialmente foi realizada a minimização das energias dos ligantes pelo *software ArgusLab*®, usando o método AM1, e aplicando os *softwares AutoDock Tools*® e *AutoDock Vina*®, empregando o método de *Gasteiger*. Todos os compostos foram submetidos à avaliação *in vitro* de suas atividades anti-*T. cruzi*, e a série mais ativa foi selecionada para ensaio de citotoxicidade (MTT) em células da linhagem *J774*. Foi possível determinar as enzimas envolvidas nos prováveis mecanismos de ação para os ligantes. Foi observado que, em 50% dos casos, a enzima *Tc*DHFR é o principal alvo dos novos composto, em formas amastigotas. Os ensaios farmacológicos em formas amastigotas e tripomastigotas, linhagem de células *C2C12* e *MK2* funcionaram como métodos de validação dos estudos teóricos. O composto ***3d***, provavelmente desenvolve seu mecanismo de ação através da inibição da enzima *Tc*TS (IC_{50}= 10.3 µM), em formas tripomastigotas do parasito. Já o composto ***7c***,possivelmente atua por meio da inibição da enzima *Tc*DHFR (IC_{50}= 9.2 µM) em formas amastigotas. Em adicional, foi proposto que o composto ***7b*** desenvolve sua atividade através da inibição da enzima *Tc*DHFR (IC_{50}= 5.0 µM). Por fim, foi verificado que os compostos mais ativos obtidos neste trabalho se mostraram mais eficientes do que o fármaco benznidazol, padrão-ouro utilizado na clínica farmacológica da doença de Chagas, além destes apresentarem baixa citotoxicidade (CC_{50}> 100 µM).

Palavras-chaves: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. *Docking.* Tiofeno. Tiazolidina.

ABSTRACT

Neglected diseases constitute a major public health problem worldwide, quantifying a total of 1 billion people suffering from some kind of infection of bacterial, viral or parasitic origin. Among them, we can highlight Chagas disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, which affects more than 8 million people around the world. In order to discover new active compounds against *T. cruzi*, developed herein the synthesis of new prototypes of thiophene-2-thioureic and 2-iminothiazolidine rationally designed with potential antichagasic activity, biological evaluation and study docking. Initially, the start material was the polysubstituted thiophene derivatives synthesized via Gewald reaction, which were converted into thioureic derivatives and then cyclized with five different electrophiles, generating thiophene-2-iminothiazolidine derivatives. The intermediates and final compounds were synthesized in yields between 40 and 98%, and characterized by NMR. For docking study was initially performed by minimizing the energy of the ligands by *ArgusLab*® software, using AM1, and applying the software *AutoDock Tools*® and *AutoDock Vina*®, using the *Gasteiger* method. All compounds were evaluated in the anti-*T. cruzi* assays, *in vitro*, and the most active serie was selected for the cytotoxicity assay (MTT) in J774 cell line. It was possible to determine the enzymes involved in the probable mechanisms of action for the ligands. It has been observed that in 50% of cases, *Tc*DHFR enzyme is the main target of the new compounds, in amastigotes. The pharmacological tests in amastigotes and trypomastigotes, line of *C2C12* and *MK2* cells was established as validation for the theoretical studies. The compound ***3d*** probably develops its mechanism of action by inhibition of the enzyme *Tc*TS (IC_{50}= 10.3 µM) in trypomastigotes of the parasite. Since the compound ***7c*** possibly acts by inhibition of the enzyme *Tc*DHFR (IC_{50}= 9.2 µM) in amastigotes. In additional, it was proposed that the compound ***7b*** carries out its activity by inhibition of the enzyme *Tc*DHFR (IC_{50} = 5.0 µM). Finally, it was observed that the most active compounds obtained in this study were more effective than the benznidazole, gold standard drug used in pharmacotherapy clinical of the Chagas disease, additionally has a low cytotoxicity (CC_{50}> 100 µM).

Key-words: Chagas Disease. *Trypanosoma cruzi*. *Docking.* Thiophene. Thiazolidine

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
ALA	Alanina
AM1	*Austin Model 1*
ARG	Arginina
ASN	Asparagina
ASP	Ácido aspártico
BnZ	Benznidazol
CC_{50}	Concentração citotóxica para matar 50% de uma população
CCD	Cromatografia de camada delgada
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
$CHCl_3$	Clorofórmio
*c*LogP	Logaritmo do coeficiente de partição água/óleo
CYP	Citocromo P
CYS	Cisteína
DHB	Di-idrobiopteridina
DHF	Di-idrofolato redutase
DMF	Dimetilformamida
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
E_F	Energia de afinidade final
E_{FG}	Energia de afinidade global
EtOH	Etanol
GLY	Glicina
GMP	Monofosfato de guanosina
*h*DHFR	Di-idrofolato redutase do hospedeiro
*h*DHODH	Di-idro-orotato desidrogenase do hospedeiro
Hex	Hexano
HX	Hipoxantina
IC_{50}	Concentração inibitória de 50% de uma resposta
ILE	Isoleucina
IMP	Monofosfato de inosina
J	Constante de acoplamento
Ki	Constante de inibição

LEU	Leucina
LYS	Lisina
MeOH	Metanol
MET	Metionina
MTX	Metotrexato
NFx	Nifurtimox
PDB ID	Identidade no *Protein Data Bank*
PHE	Fenilalanina
PRPP	Fosforribosilfosfato
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	Desvio padrão quadrático médio
SER	Serina
*Tc*CR	Cruzaína do *T. cruzi*
*Tc*DHFR	Di-idrofolato redutase do *T. cruzi*
*Tc*DHODH	Di-idro-orotato desidrogenase do *T. cruzi*
*Tc*HGFRT	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase do *T. cruzi*
*Tc*PTR	Pteridina redutase do *T. cruzi*
*Tc*TR	Tripanotiona redutase do *T. cruzi*
*Tc*TS	Trans-sialidase do *T. cruzi*
THF	Tetraidrofolato
TMQ	Trimetrexato
TMS	Tetrametilsilano
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
VAL	Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 18
2.1 Transmissão, Ciclo Biológico e Patogenia 19
2.2 Farmacologia do *Trypanosoma cruzi* 21
2.3 Enzimas do *Trypanosoma cruzi* como alvo para planejamento de novos protótipos antichagásicos 23
2.3.1 Enzima *trans*-sialidase (*Tc*TS) 23
2.3.2 Enzima di-idrofolato redutase (*Tc*DHFR) 26
2.3.3 Enzima pteridina redutase (*Tc*PTR) 27
2.3.4 Peptidases tripanossomatídeas 28
2.3.4.1 Cruzaína (*Tc*CR) 28
2.3.5 Enzima tripanotiona redutase (*Tc*TR) 31
2.3.6 Enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (*Tc*HGFRT) 32
2.3.7 Enzima di-idro-orotato desidrogenase (*Tc*DHODH) 34
3 OBJETIVOS 37
3.1 Objetivo Geral 37
3.2 Objetivos Específicos 37
4 MATERIAS E MÉTODOS 39
4.1 Seção Experimental 39
4.1.1 Cromatografias 39
4.1.2 Pontos de fusão 39
4.1.3 Caracterização estrutural por RMN ^{1}H e ^{13}C 39
4.1.4 Reagentes e solventes 39
4.1.5 Equipamentos 40
4.2 Planejamento Racional dos Potenciais Inibidores das Enzimas Tripanossomais 40
4.2.1 Seleção do núcleo heterociclo 40
4.2.2 Aplicando o bioisosterismo clássico divalente 42
4.2.3 Verificação do efeito de impedimento estérico à tioureia. 43
4.2.4 Composição da série tiofeno-2-tioureia. 44
4.2.5 Aplicando o bioisosterismo não-clássico de fechamento de anel 44
4.2.6 Composição da série tiofeno-2-iminotiazolidinona 46

4.3 Ensaios Computacionais Empregados na Avaliação de Novos Inibidores com Ação Anti-*T. cruzi*.....46
4.3.1 Determinação do *c*LogP 46
4.3.2 Estudos de ancoragem (*Docking* Molecular) 47
4.3.2.1 *Softwares* Utilizados.....47
4.3.2.2 Seleção das enzimas 48
4.3.2.3 Preparo dos ligantes.....48
4.3.2.4 Preparo da enzima 49
4.3.2.5 Determinação dos parâmetros de busca.....50
4.3.2.6 Interpretação dos resultados 50
4.3.2.6.1 Energia de ligação 51
4.3.2.6.2 Interações do complexo ligante-enzima 51
4.4 Procedimentos Reacionais.....52
4.4.1 Método geral para obtenção dos derivados 2-aminotiofeno-3-carboxilatos (*1a-b*) 52
4.4.2 Método geral para obtenção dos derivados 2-tioureidotiofeno-3-carboxilatos (*2a-d*) 52
4.4.3 Método geral para obtenção dos derivados 2-tiazolidinenoiminotiofeno-3-carboxilatos (*3a-d, 4a-d, 5a-d, 6a-d, e 7a-d*).....53
4.5 Ensaios Biológicos.....54
4.5.1 Avaliação antichagásica preliminar.....54
4.5.1.1 Formas amastigotas 54
4.5.1.2 Formas tripomastigotas 55
4.5.2 Avaliação da viabilidade celular por MTT.....55
5 RESULTADOS E DISCUSÃO.....58
5.1 Compostos 2-aminotiofeno-3-carboxilatos (*1a-b*).....58
5.1.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *1a* e *1b.* 58
5.1.2 Caracterização por RMN de ^{1}H e ^{13}C 59
5.1.2.1 2-amino-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*1a*) 59
5.1.2.2 2-amino-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de propila (*1b*).....60
5.2 Compostos 2-tioureicotiofeno-3-carboxilatos (*2a-d)* 60
5.2.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *2a-d.* 60
5.2.2 Caracterização por RMN de ^{1}H e ^{13}C 61
5.2.2.1 2-(3-feniltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*2a*) 61
5.2.2.2 2-(3-feniltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de isopropila (*2b*)

5.2.2.3 2-(3-aliltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*2c*).....62
5.2.2.4 2-(3-aliltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de isopropila (*2d*) 63
5.3 Compostos tiofeno-2-iminotiazolidinona-3-carboxilatos 63
5.3.1 Série *3a-d.*.....63
5.3.1.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *3a-d.* 63
5.3.1.2 Caracterização da série *3a-d* por RMN de ^{1}H e ^{13}C.....64
5.3.1.2.1 2-(4-oxo-3-feniltiazolidin-2-ilidenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*3a*).....65
5.3.1.2.2 2-(4-oxo-3-feniltiazolidin-2-ilidenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de isopropila (*3b*).....65
5.3.1.2.3 2-(4-oxo-3-aliltiazolidin-2-ilidenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*3c*).....66
5.3.1.2.4 2-(4-oxo-3-aliltiazolidin-2-ilidenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de isopropila (*3d*).....66
5.3.2 Série *4a-d*.....67
5.3.2.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *4a-d.* 67
5.3.2.2 Caracterização da série *4a-d* por RMN de ^{1}H e ^{13}C.....68
5.3.2.2.1 2-((3-etoxicarbonila)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-feniltiazolidina-5-carboxilato de etila (*4a*) 69
5.3.2.2.2 2-((3-etoxicarbonila)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-feniltiazolidina-5-carboxilato de isopropila (*4b*) 69
5.3.2.2.3 2-((3-etoxicarbonila)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-aliltiazolidina-5-carboxilato de etila (*4c*) 70
5.3.2.2.4 2-((3-etoxicarbonila)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-aliltiazolidina-5-carboxilato de isopropila (*4d*) 70
5.3.3 Série *5a-d*.....71
5.3.3.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *5a-d* 71
5.3.3.2 Caracterização da série *5a-d* por RMN de ^{1}H e ^{13}C.....72
5.3.3.2.1 2-(3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-metil-3-feniltiazolidina-5-carboxilato de etila (*5a*) 73
5.3.3.2.22-(3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-metil-3-feniltiazolidina-5-carboxilato de isopropila (*5b*) 73
5.3.3.2.32-(3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-metil-3-aliltiazolidina-5-carboxilato de etila (*5c*) 74

5.3.3.2.42-(3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-metil-3-aliltiazolidina-5-carboxilato (*5d*) 74
5.3.4 Série *6a-d* 75
5.3.4.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *6a-d.* 75
5.3.4.2 Caracterização da série *6a-d* por RMN de ^{1}H e ^{13}C 76
5.3.4.2.1 Ácido 2-(3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)4-oxo-3-fenil-tiazolidina-5-carboxílico (*6a*) 76
5.3.4.2.2 Ácido 2-(3-isopropoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-fenil-tiazolidina-5-carboxílico (*6b*) 77
5.3.4.2.3 Ácido 2-((3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ila)metileno)-4-oxo-3-aliltiazolidina-5-carboxílico (*6c*) 77
5.3.4.2.4 Ácido 2-(3-isopropoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-aliltiazolidina-5-carboxílico (*6d*) 78
5.3.5 Série *7a-d* 78
5.3.5.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *7a-d.* 79
5.3.5.2 Caracterização da série *7a-d* por RMN de ^{1}H e ^{13}C 80
5.3.5.2.1 2-(3,4-difeniltiazol-2(3*H*)-iladimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-car-boxilato de etila (*7a*) 80
5.3.5.2.2 2-((3,4-difeniltiazol-2(3*H*)-ilaimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-car-boxilato de isopropila (*7b*) 80
5.3.5.2.3 2-(3-alil-4-feniltiazol-2(3*H*)-iladenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*7c*) 81
5.3.5.2.4 2-(3-alil-4-feniltiazol-2(3*H*)-iladenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de isopropila (*7d*) 81
5.4 *Docking* molecular 82
5.4.1 Análise dos compostos e seus respectivos sítios de ligação 85
5.4.1.1 Série *2a-d.* 85
5.4.1.2 Série *3a-d.* 88
5.4.1.3 Série *4a-d* 92
5.4.1.4 Série *5a-d* 94
5.4.1.5 Série *6a-d* 97
5.4.1.6 Série *7a-d* 100
5.5 Atividade Antichagásica Preliminar em Formas Amastigotas (*in vitro*) 103
5.6 Atividade Antichagásica em Formas Tripomastigotas (*in vitro*) 105

5.7 Relação entre os Estudos de *Docking* e Ensaios Biológicos 106
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 109
Referências 112

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças negligenciadas são responsáveis pelo adoecimento de mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo. Deste total de enfermos, 8 milhões são decorrentes da infecção pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas (MOREIRA *et al.*, 2014; SERAFIM *et al.*, 2014; PAPADOPOULOU *et al.*, 2014).

Após mais de cem anos da descoberta desta patologia, ainda hoje a terapia farmacológica empregada não é totalmente eficiente. Tal fato é proveniente de mecanismos que o parasito desenvolve para garantir sua sobrevivência no organismo do hospedeiro. Estes mecanismos estão diretamente relacionados à resistência do parasito frente aos fármacos antichagásicos e às infecções recorrentes (SERAFIM *et al.*, 2014; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de resistência em algumas cepas do *T. cruzi* aos fármacos padrão-ouro, nifurtimox e benznidazol, constitui um importante problema de saúde pública atualmente (SERAFIM *et al.*, 2014). Em adição, esses fármacos são produtores de metabólitos ativos que têm a capacidade de interagir com o DNA do hospedeiro e causar efeitos deletérios, incluindo câncer (KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014; MORENO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014; MERLINO *et al.*, 2014).

A sobrevivência do *T. cruzi* nas células do hospedeiro é garantida pela existência de enzimas que exercem diversos papéis, em diferentes processos como, absorção, penetração, sobrevivência (mecanismo de resistência), infectividade, evasão ao sistema imune, nutrição e crescimento (KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014).

As principais enzimas relacionadas às atividades anteriormente citadas são as *trans*-sialidase (*Tc*TS), di-idrofolato redutase (*Tc*DHFR), pteridina redutase (*Tc*PTR), cruzaína (*Tc*CR), tripanotiona redutase (*Tc*TR), hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (*Tc*HPRT), fumarato redutase (*Tc*FR), e di-idro-orotato desidrogenase (*Tc*DHODH) (NERES *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2014; SERAFIM *et al.*, 2014; PAPADOPOULOU *et al.*, 2014). Portanto, o planejamento de novos fármacos capazes de interagir com tais enzimas, de forma efetiva, sem afetar o hospedeiro, é extremamente viável, porém tal objetivo constitui o principal desafio da química medicinal na busca de novos protótipos antichagásicos(SCHORMANN *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2014).

As modificações moleculares de protótipos pré-estabelecidos representam uma estratégia bastante promissora na obtenção de novos compostos biologicamente ativos. Esse

processo é capaz de melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas desses protótipos. (SERAFIM *et al.,* 2014).

Este trabalho aborda as principais enzimas relacionadas aos ciclos infecciosos e de resistência relacionados ao parasito *T. cruzi,* com a finalidade inicial de desenvolver protótipos racionalmente planejados, através da análise estrutural de diversos compostos ativos encontrados na literatura, com atividade antichagásica. Em seguida, são aplicadas técnicas contidas no âmbito da bioinformática, cruzando informações obtidas por meio do *docking* molecular, sugerindo um provável mecanismo de ação para os novos compostos sintetizados.

Espera-se, ao final deste trabalho, desenvolver moléculas potencialmente ativas contra o parasito *Trypanosoma cruzi*, via inibição enzimática, que possam ser, futuramente, empregadas como uma nova classe alternativa de fármacos mais eficiente, menos tóxicos e de baixos custos para a população.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Atualmente, as doenças negligenciadas tropicais configuram um grande problema de saúde pública mundial, quantificando um total de 1 bilhão de pessoas acometidas por algum tipo de infecção de origem bacteriana, viral ou parasitária (PAPADOPOULOU *et al.*, 2014).

Os tripanossomas são parasitos protozoários unicelulares pertencentes ao gênero *Trypanosoma* (ordem: *Kinetoplastea*, *Excavata*) (KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014), cujo é composto por três distintos cinetoplastídeos conhecidos por causarem doenças em humanos: leishmanioses, causado pela *Leishmania*, doença do sono, causada pelo *Trypanosoma brucei*, e a doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi* (BILBAO-RAMOS *et al.*, 2012; OH *et al.*, 2014; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014).

Dados epidemiológicos evidenciam que cerca 100 milhões de pessoas estão vivendo em 21 países considerados endêmicos, destas 8 milhões estão infectadas e, ainda 41 mil novos casos são reportados todos os anos (SERAFIM *et al.*, 2014). Por conseguinte, a doença de Chagas tem sido considerada a enfermidade tropical "mais preocupante" da atualidade (MOREIRA *et al.*, 2014; SERAFIM *et al.*, 2014; PAPADOPOULOU *et al.*, 2014). Porém, mesmo com tantos dados expressivos, esta patologia é considerada pela Organização Mundial de Saúde, como sendo a 13ª doença tropical mais negligenciada dentre todas as outras pertencentes a essa classificação (CABALLERO *et al.*, 2014).

Os hospedeiros infectados, quando não tratados adequadamente, podem servir como reservatório para o parasito, carregando-o para regiões que não são endêmicas, mas existe a presença de vetores, favorecendo o surgimento de casos em regiões anteriormente não acometidas por tal enfermidade. Dessa forma, conduzindo a uma ameaça emergente para tal região (SCHORMANN *et al.*, 2010; PAPADOPOULOU *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Segundo Serafim e colaboradores (2014), atualmente vários casos estão sendo reportados em países não endêmicos, a exemplo do Japão, Austrália e Espanha.

A incidência da doença vem sendo controlada através de medidas simples como a eliminação do vetor com inseticidas e avaliação sorológica de pacientes (CAPUTTO *et al.*, 2011).

2.1 Transmissão, Ciclo Biológico e Patogenia

A doença de Chagas é transmitida para humanos por diversas maneiras, dentre elas, picada do inseto triatomíneo hematófago, transfusão sanguínea com sangue infectado (SCHORMANN *et al.*, 2003; NERES *et al.*, 2009; SCHORMANN *et al.*, 2010; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014), transplante de órgãos, ou de mãe para o filho, durante o período gestacional (SCHORMANN *et al.*, 2010; PAPADOPOULOU *et al.*, 2014).

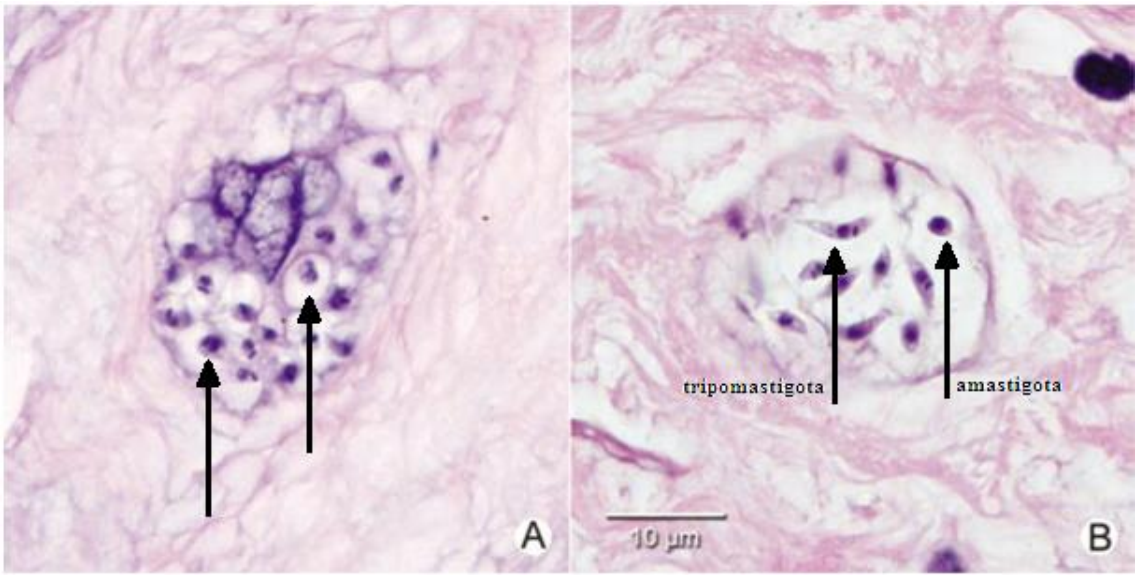
O *T. cruzi* é transmitido principalmente através das fezes do inseto *Triatoma infestans* (Figura 1), conhecido popularmente como barbeiro, infectado durante o repasto sanguíneo, ou através das membranas mucosas, ou seja, através da ingestão de alimentos e/ou água contaminada, o que na maioria dos casos, geram surtos da doença (PINHEIRO, 2012; MILLER III & ROITBERG, 2013; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014).

Figura 1 – Inseto *Triatoma infestans*, principal vetor responsável pela transmissão da doença de Chagas.

Fonte: PINHEIRO, 2012.

O parasito se multiplica nas células do hospedeiro, sob a forma amastigota (Figura 2A) que, posteriormente, se diferencia na forma infecciosa, tripomastigota (Figura 2B), onde tais formas são liberadas após a ruptura da célula do hospedeiro, dando continuidade ao ciclo biológico (Figura 3) (KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014).

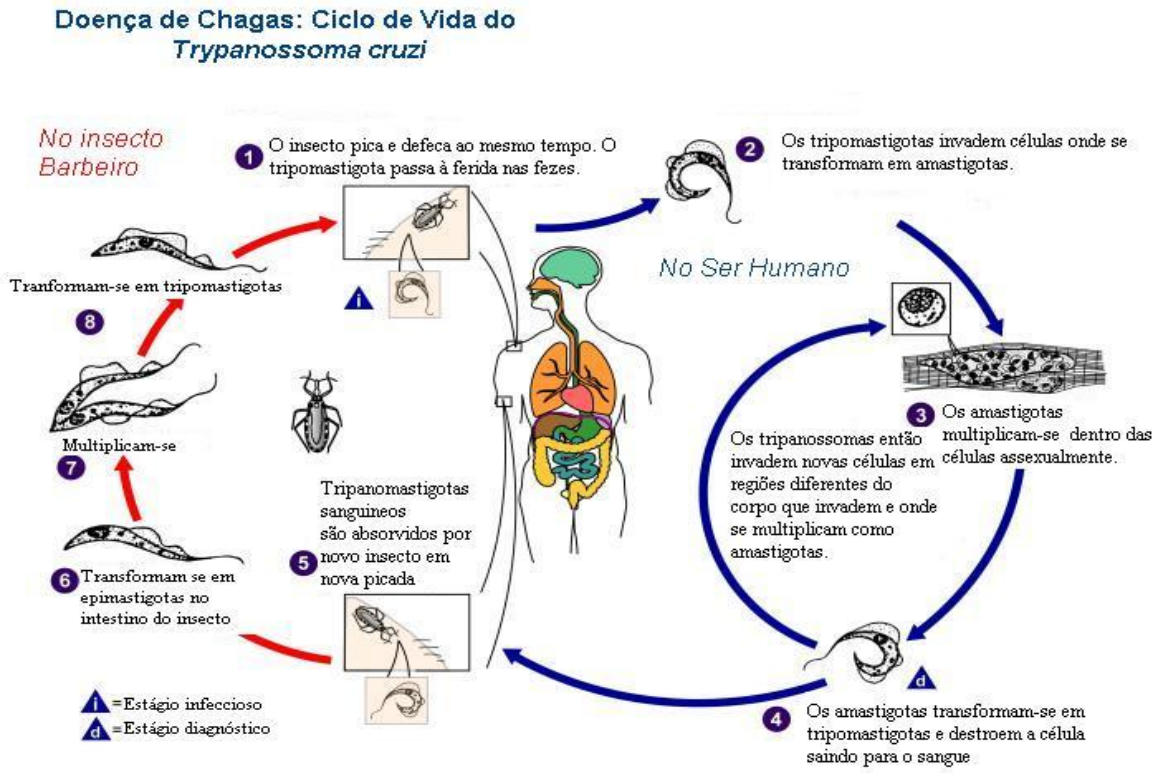
Figura 2 – Principais formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* em células do hospedeiro.



Fonte: BERN *et al.*, 2009. (EDITADO).

Nota: Em **A**, ninho de formas amastigotas, corado por hematoxilina/eosina. Em **B**, ninho de formas amastigotas e tripomastigotas, corado por hematoxilina/eosina.

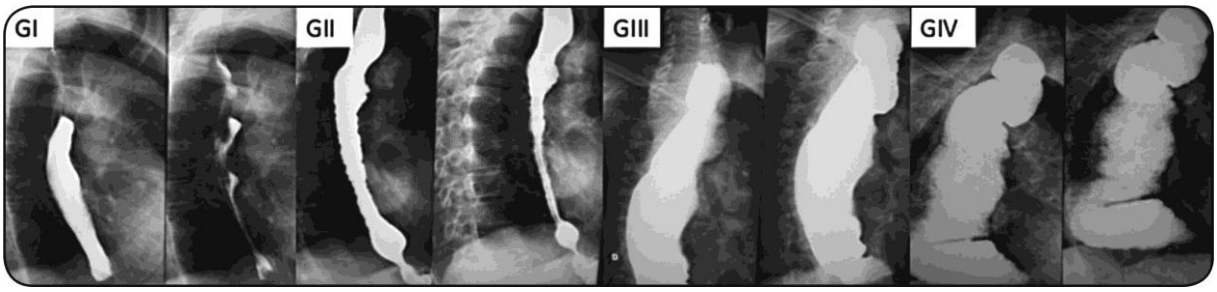
Figura 3 – Ciclo biológico do parasito.



Fonte: PINHEIRO, 2012.

A infecção se divide em dois estágios: inicial (agudo) e crônico (SOARES *et al.*, 2012; PAPADOPOULOU *et al.*, 2014). Durante o estágio inicial alguns pacientes podem ser assintomáticos, nesses casos, comumente não ocorre o diagnóstico adequado da doença. As mais importantes manifestações clínicas da fase crônica são insuficiência cardíaca (cardiomiopatia Chagásica e arritmias, em 90 % dos casos) e síndromes gastrointestinais (megaesôfago e megacólon) (Figura 4) (FREYMANN *et al.*, 2000; ESTEVEZ *et al.*, 2011; PAPADOPOULOU *et al.*, 2014).

Figura 4 – Radiologia de esôfagos de pacientes em diferentes estágios da doença.



Fonte: SOUZA *et al.*, 2013.

Nota: Em **GI**, fase início do estágio crônico. Em **GII** e **GIII**, evolução do quadro crônico. Em **GIV**, estágio crônico avançado.

As lesões durante a fase crônica estão associadas à circulação do parasito no organismo do hospedeiro. Alguns dados recentes mostram que o período de circulação do parasito está diretamente relacionado com os efeitos deletérios da doença. Portanto, o sucesso do tratamento depende da total eliminação do *T. cruzi* do organismo do hospedeiro (KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014).

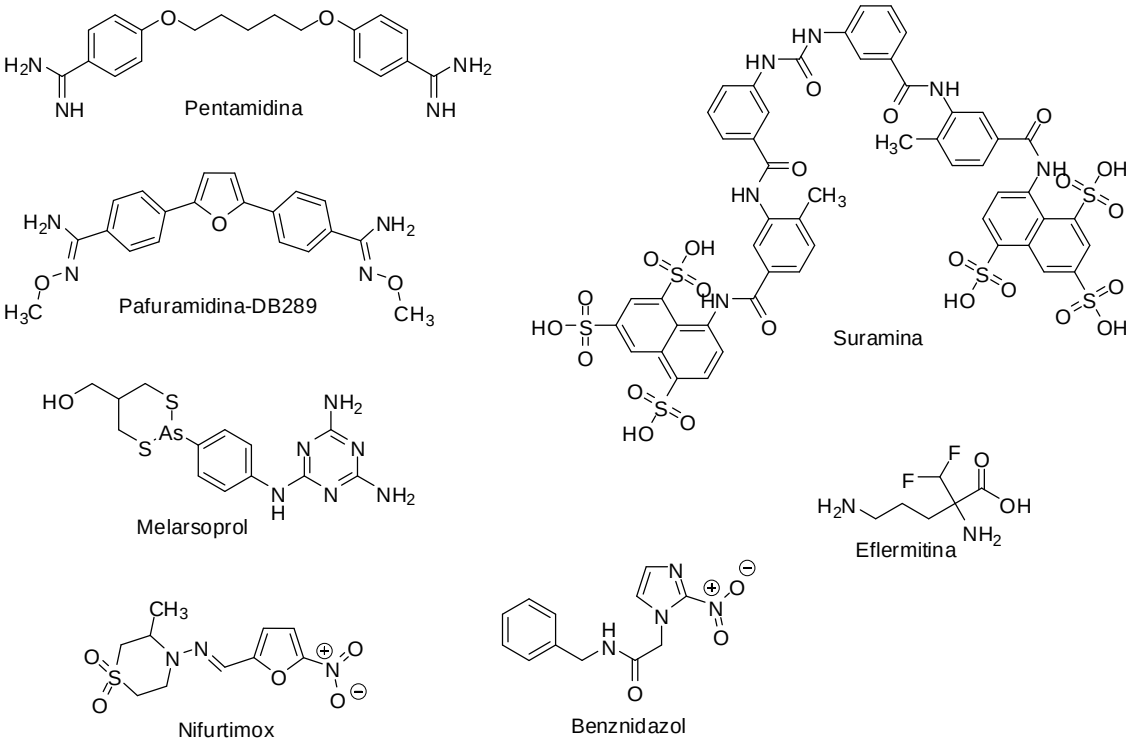
2.2 Farmacologia do *Trypanosoma cruzi*

A descoberta da doença de Chagas tem mais de 100 anos, e ainda a terapia farmacológica antichagásica não é completamente efetiva (SERAFIM *et al.*, 2014; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2014).

Os fármacos estabelecidos como padrão-ouro para o tratamento clínico da doença são eficazes quando administrados na fase aguda da doença (SCHORMANN *et al.*, 2003; NERES *et al.*, 2009; SCHORMANN *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2014; SERAFIM *et al.*, 2014), são estes, Nifurtimox (NFx) – *Lampit*® e Benznidazol (BnZ) – *Rochagan*® (Figura 5) (NERES

et al., 2009; SERAFIM *et al.*, 2014; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2014).

Figura 5 – Principais fármacos empregados na terapia antitripanossomal.



Fonte: KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014 (EDITADO).

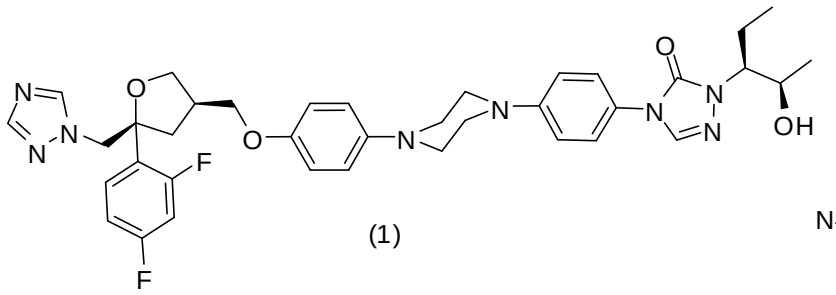
O NFx e o BnZ atuam aumentando as espécies radicalares (principalmente, ânion superóxido $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2), produzindo metabólitos eletrofílicos, bem como, aumentando o consumo de oxigênio pelo parasito. Porém, no caso do BnZ, este é capaz de gerar metabólitos que interagem com o DNA do hospedeiro, causando severos efeitos adversos, dificultando a adesão do paciente ao tratamento (KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014; MORENO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014; MERLINO *et al.*, 2014). Dentre os efeitos indesejáveis podem ser citados anorexia, vômitos e polineuropatia periférica (CABALLERO *et al.*, 2014).

Pouco mais de 80% dos pacientes em estágio crônico, tratados com tais fármacos, não atingem a cura completa, ou seja, o NFx e BnZ não são eficazes em acabar com a carga parasitária do hospedeiro (SERAFIM *et al.*, 2014; OH *et al.*, 2014).

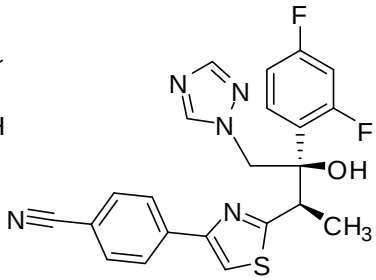
Atualmente, existe uma tendência em combinar fármacos na terapia clínica de pacientes portadores da doença de Chagas, com a finalidade de evitar o surgimento de cepas resistentes de *T. cruzi* (MOREIRA *et al.*, 2014).

Alguns novos candidatos a fármacos têm apresentado um bom espectro de ação antichagásico, tendo como alvo a via da biossíntese do ergosterol, exemplos, posaconazol **(1)** e ravuconazol **(2)**, porém ainda estão em fase de testes clínicos (CARDOSO *et al.*, 2014).

O posaconazol **(1)** tem como alvo a enzima esterol-14α-desmetilase (CYP51), porém o mecanismo de ação desse fármaco não está totalmente elucidado. Além disso, o posaconazol **(1)** falhou em eliminar o parasito em ensaios experimentais em primatas. Ademais, inibidores do CYP51 são capazes de inibir outras enzimas importantes para o metabolismo de outros fármacos como, por exemplo, a via do CYP3A4 (PAPADOPOULOU *et al.*, 2014).



(1)

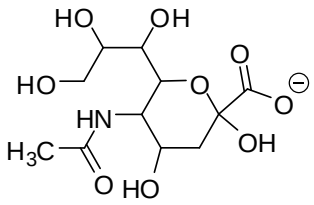


(2)

2.3 Enzimas do *Trypanosoma cruzi* como alvo para planejamento de novos protótipos antichagásicos

2.3.1 Enzima *trans*-sialidase (*Tc*TS)

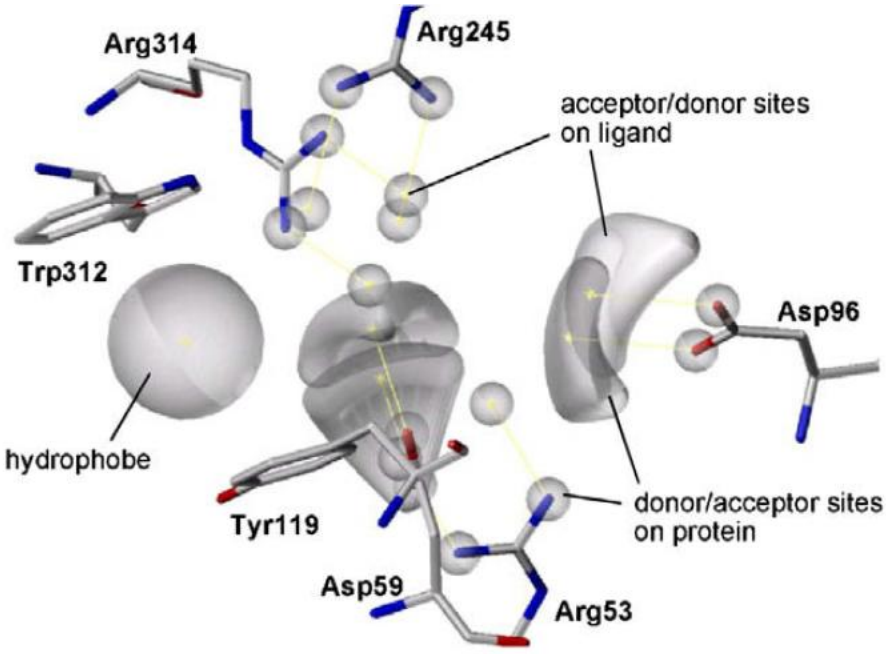
A busca por novos fármacos anti-*T. cruzi* é extremamente importante, pois não há fármacos eficazes para o tratamento de pacientes em estágio crônico. Um importante alvo de estudo para o planejamento de novos protótipos com ação antichagásica é a enzima *trans*-sialidase (*Tc*TS) (NERES *et al.*, 2009). Tal enzima tem a importante função de evitar que a resposta do sistema imune do hospedeiro destrua o parasito. Essa enzima transfere resíduos de ácido siálico **(3)** para a superfície do parasito, garantindo a sobrevivência deste (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002; NERES *et al.*, 2009; MILLER III & ROITBERG, 2013; KUMAR *et al.*, 2014).



(3)

O sítio ativo da *Tc*TS exibe algumas características conservadas de sialidases microbianas, incluindo a presença de uma tríade ARG35, ARG245 e ARG314, que interage com a carga negativa do grupo carboxilato do ácido siálico. Além disso, a principal diferença desta sialidase para outras sialidases é a presença de um segundo sítio, definido por dois resíduos chave, TYR119 e TRP312, que acomodam a porção lactosil de substratos doadores e aceptores, e que é crucial para a atividade da *Tc*TS (Figura 6) (NERES *et al.*, 2009).

Figura 6 – Composição do sítio ativo para a enzima *Tc*TS.

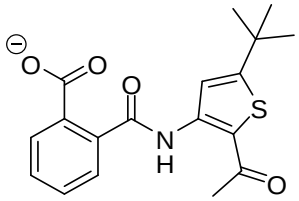


FONTE: NERES *et al.*, 2009.

Nota: No lado esquerdo, sítio hidrofóbico. No lado direito superior, sítio aceptor/doador no ligante. No lado direito inferior, sítio aceptor/doador na proteína.

Os inibidores de *Tc*TS podem ser classificados em duas categorias, miméticos do ácido siálico, ou análogos de substratos doadores e aceptores (NERES *et al.*, 2009).

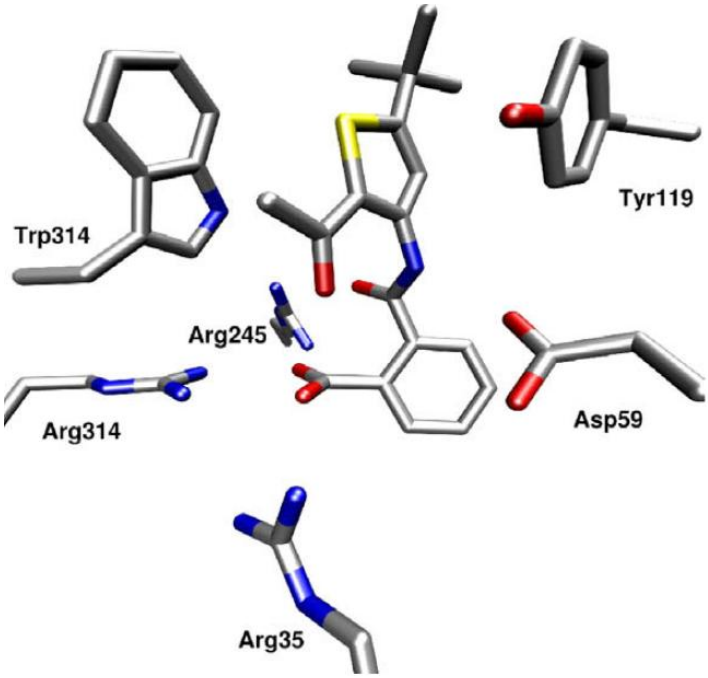
O núcleo tiofeno tem uma determinada influência no desempenho de compostos, no que diz respeito à atividade antichagásica. Tal fato foi evidenciado no trabalho de Neres e colaboradores (2009), onde o melhor composto da série apresentou um anel tiofeno em sua estrutura **(4)** (IC_{50}270µM, igual a 84% de inibição).



(4)

Ainda de acordo com Neres e colaboradores (2009), foi determinado que um bom ligante deve ter a menor carga negativa interagindo com a tríade de Argininas e, na maioria dos casos, um grupo hidrofóbico colocado entre as cadeias de TYR119 e TRP312, ocupando o sítio aceptor do **(3)** (Figura 7).

Figura 7 – Composto com anel tiofênico no sítio enzimático ativo da *Tc*TS.



Fonte: NERES *et al.*, 2009.

Ademais, a *Tc*TS é considerada um alvo válido para o planejamento de novos fármacos, principalmente porque não há nenhuma enzima análoga no organismo humano (MILLER III & ROITBERG, 2013).

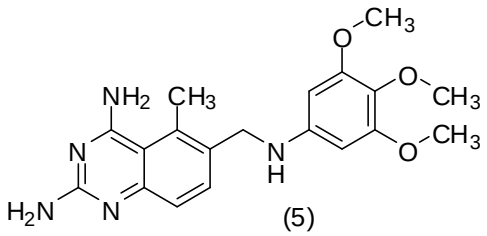
2.3.2 Enzima di-idrofolato redutase (*Tc*DHFR)

De modo geral, todos os organismos necessitam de folato. Formas reduzidas de folato e seus derivados são necessários para a síntese de biomoléculas, tais como proteínas, DNA e RNA (SCHORMANN *et al.,* 2010; KRYSHCHYSHYN *et al.,* 2014).

A di-idrofolato redutase (DHFR) do *T. cruzi* (*Tc*DHFR) é extremamente essencial ao parasito, e representa um alvo potencial para o planejamento racional de novos fármacos anti-*T.cruzi* (SCHORMANN *et al.,* 2010; KRYSHCHYSHYN *et al.,* 2014).

Em geral, a ação de fármacos sobre essa enzima encontra-se relacionada à quimioterapia antineoplásica. Porém, a maioria dos inibidores da DHFR é utilizada no tratamento de infecções bacterianas e outros parasitos (SCHORMANN *et al.,* 2010).

O trimetrexato (TMQ) **(5)** é o fármaco mais efetivo como inibidor da DHFR conhecido na literatura. É extremamente eficaz na inibição do crescimento das formas amastigotas e promastigotas de *T. cruzi, in vitro* (SCHORMANN *et al.,* 2010).

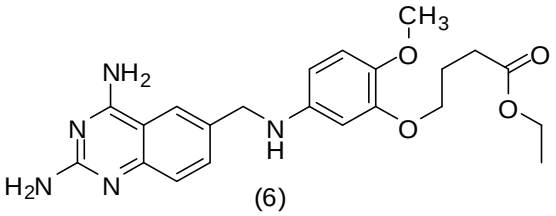


(5)

Um bom protótipo com ação sobre a *Tc*DHFR deve ser capaz de interagir com o resíduo MET49, e não interagir com a PHE31, pois a interação com este último, implicaria em uma maior afinidade pela DHFR do hospedeiro (*h*DHFR), causando efeitos indesejáveis (SCHORMANN *et al.,* 2010).

Schormann e colaboradores (2010) sintetizaram uma série de moléculas potencialmente inibidoras da *Tc*DHFR, porém tais moléculas demonstraram uma alta afinidade à *h*DHFR. A melhor substância sintetizada **(6)** apresentou IC_{50}= 23.8 nM e Ki= 1.3 nM para a *Tc*DHFR; e IC_{50}= 68.3 nM e Ki= 9.6 nM para a *h*DHFR. Ainda de acordo com esse

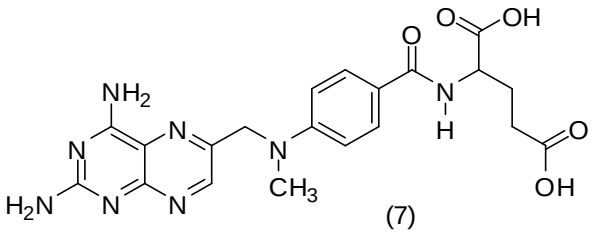
autor, modificações químicas não obtiveram sucesso em aumentar a atividade em *Tc*DHFR e diminuir em *h*DHFR.



(6)

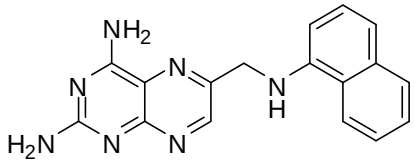
2.3.3 Enzima pteridina redutase (*Tc*PTR)

A Pteridina Redutase 1 (PTR1) é a principal enzima envolvida no resgate e redução de pteridinas não conjugadas no *T. cruzi.* Em adição, essa enzima catalisa a redução do folato a di-idrofolato (DHF) e tetraidrofolato (THF). A PTR1 é 200 vezes menos sensível ao fármaco antifolato, metotrexato (MTX) **(7)**, do que a *Tc*DHFR, o que compromete a efetividade de outros fármacos antifolato. Essa enzima tem sido encontrada somente em parasitos da família *Trypanosomatidae* (gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*), e em alguns patógenos de vegetais (SCHORMANN *et al.*, 2003). Em geral, a *Tc*PTR se mostra um importante alvo, combinado à *Tc*DHFR, para o desenvolvimento de novos fármacos tripanomicidas(SCHORMANN *et al.*, 2003). Existe também a PTR2, que possui 95% de similaridade com a PTR1, além de todos os aminoácidos do sítio ativo desta conservados em sua estrutura (SCHORMANN *et al.*, 2003). A PTR2 atua apenas na pteridina reduzida e substratos de folato. Porém, tal enzima só é capaz de reduzir à di-idrobiopteridina (DHB) e DHF, e não à biopteridina ou folato. Além disso, o perfil de inibição pelo MTX para ambas (PTR1 e PTR2) é praticamente o mesmo (SCHORMANN *et al.*, 2003).



(7)

De acordo com Schormann e colaboradores (2003), foi sintetizada uma série de compostos análogos ao MTX (Ki= 5.52 µM e Energia de ligação= -45.0 kcal/mol), onde o melhor composto **(8)** foi mais ativo e um pouco menos seletivo (Ki= 1.13 µM, e Energia de ligação= -39.2 kcal/mol).



(8)

2.3.4 Peptidases tripanossomatídeas

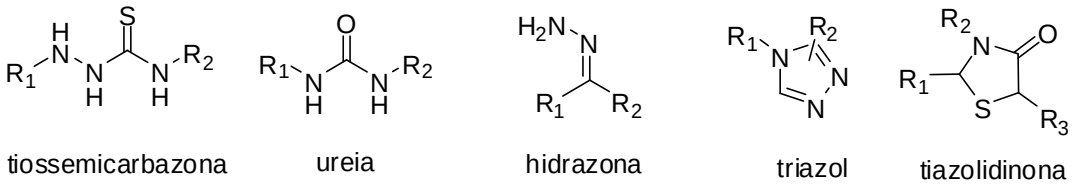
As distintas espécies de tripanossomas apresentam um grande e variado número de peptidases intra- e/ou extracelulares. Tais peptidases executam papéis cruciais no ciclo biológico do parasito, tais como absorção, penetração, sobrevivência, infectividade, evasão ao sistema imune, nutrição e crescimento (KRYSHCHYSHYN *et al.,* 2014).

2.3.4.1 Cruzaína (*Tc*CR)

A Cruzaína (*Tc*CR), a maior cisteína protease tripanossomal, está envolvida nos processos de invasão, diferenciação e proliferação do parasito nas células do hospedeiro (MOREIRA *et al.,* 2014; SERAFIM *et al.,* 2014; KRYSHCHYSHYN *et al.,* 2014; CARDOSO *et al.,* 2014). É expressa em todos os estágios de desenvolvimento do parasito. De modo geral, esta protease é mais expressa do que as serinas-, treoninas-, e metalo-proteases, apresentando uma morfologia complexa, sob a forma de uma mistura de isoformas (CAPUTTO *et al.,* 2011). Tal enzima é responsável por produzir substâncias pro-inflamatórias que exercem importantes papéis nas manifestações clínicas, anteriormente abordadas (KRYSHCHYSHYN *et al.,* 2014). Adicionalmente, também é responsável por degradar as proteínas celulares do hospedeiro e contribuir com retorno da infecção (MOREIRA *et al.,* 2014).

As buscas por novos inibidores da *Tc*CR referem-se à investigação de peptídeos e compostos tipo-peptídeos, tais como ureias, hidrazonas, triazóis e tiossemicarbazonas (Figura 8) (MOREIRA *et al.,* 2014; CARDOSO *et al.,* 2014).

Figura 8 – Principais grupos encontrados em compostos recentemente desenvolvidos para a terapia antichagásica.

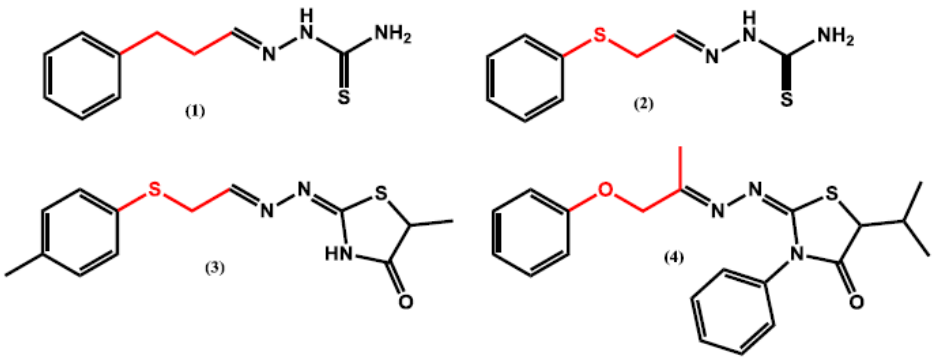


Fonte: Autor, 2014.

As tiossemicarbazonas foram inicialmente desenvolvidas como inibidores potentes de catepsina-L, uma das principais proteases envolvidas em tumores cancerígenos. Porém, devido à homologia e propriedades físico-químicas similares entre a *Tc*CR e a catepsina-L, foi observado que aril-tiossemicarbazonas eram potentes inibidores da enzima *Tc*CR. Além disso, foi determinado que o principal resíduo de aminoácido relacionado à atividade anti-*T. cruzi* nessa enzima era a CYS25 (MOREIRA *et al.*, 2014).

Em um trabalho desenvolvido por Moreira e colaboradores (2014), foram sintetizados compostos derivados de tiossemicarbazonas com os objetivos de observar o efeito de diferentes aromáticos introduzidos ao esqueleto principal, avaliar o efeito de impedimento estérico, o efeito espaçador, e o efeito do bioisosterismo de anel (introdução de uma tiazolidinona à tiossemicarbazona) (Figura 9).

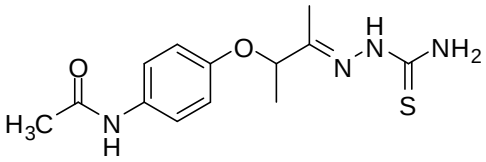
Figura 9 – Esqueletos químicos relacionados à inibição da cruzaína.



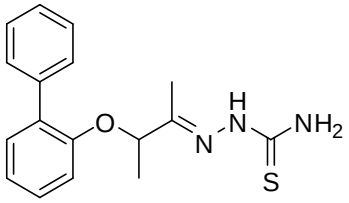
Fonte: MOREIRA *et al.*, 2014.

Dentre estas séries, foram identificados os compostos mais ativos **(10)**, IC_{50} igual a 71.5 µM (em epimastigotas) e CC_{50} igual a 1.4 µM (em tripomastigotas), e **(11)**, com

IC_{50}igual a 2.2 µM (em epimastigotas) e CC_{50} igual a 1.1 µM (em tripomastigotas). Por fim, tais compostos foram considerados como sendo equivalentes do BnZ.

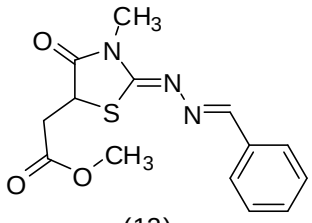


(10)



(11)

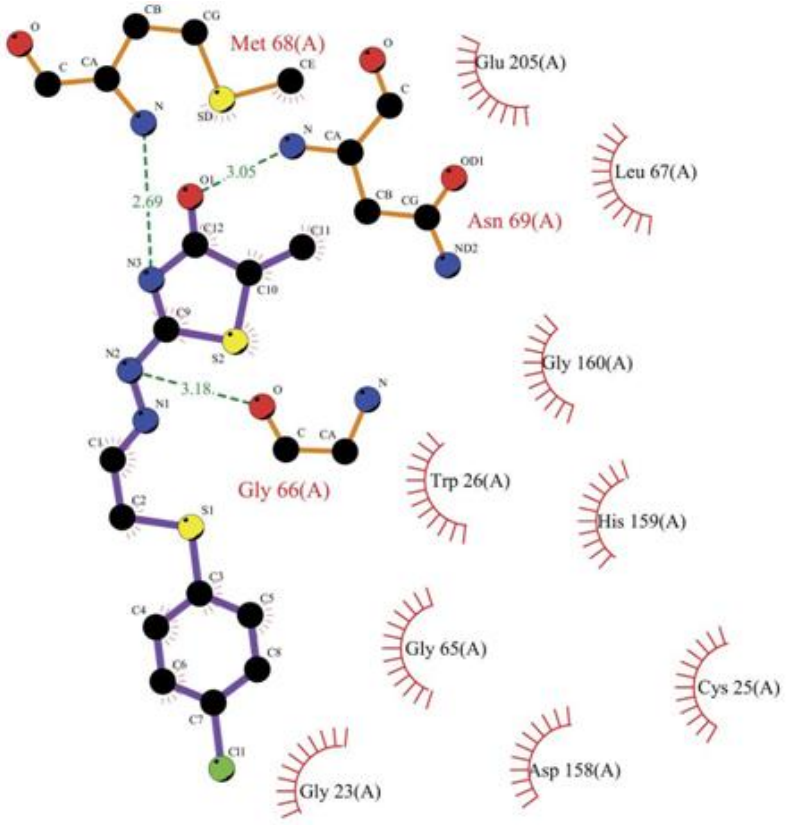
Em paralelo, derivados contendo um anel tiazolidinona apresentam uma boa efetividade frente à *Tc*CR (KRYSHCHYSHYN *et al.,* 2014; HARYLYUK *et al.,* 2014; CARDOSO *et al.,* 2014). De acordo com Kryshchyshyn e colaboradores (2014), o análogo **(12)** apresentou interessantes resultados em ensaios experimentais com formas epimastigotas. Além disso, foi observado que a presença do oxigênio (=O) do anel tiazolidinona é fundamental para a redução da toxicidade às células do hospedeiro (LEITE *et al.,* 2006).



(12)

No estudo de Leite e colaboradores (2006) foi mostrado que um determinado composto, contendo um anel tiazolidinona, apresentou a melhor atividade dentro de uma série de compostos anti-*Tc*CR. Além disso, foram identificados os principais resíduos relacionados à atividade biológica, GLY66, MET68 e ASN69 (Figura 10).

Figura 10 – Derivado tiazolidínico em complexo com o sítio ativo da enzima Cruzaína.



Fonte: LEITE *et al.*, 2006.

Nota: Em azul, ligações do ligante. Em laranja, ligações não pertencentes ao ligante. Em tracejado azul, comprimento das interações. Átomos em preto, átomos participantes de interações hidrofóbicas. Meia-lua, resíduos que interagem com o ligante hidrofobicamente.

2.3.5 Enzima tripanotiona redutase (*Tc*TR)

A tripanotiona redutase(*Tc*TR) é um importante alvo para fármacos em tripanossomatídeos. Essa enzima, dependente de NADPH, catalisa a redução da tripanotiona dissulfida ditiol em tripanotiona, desencadeando uma cascata de eventos responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, esta enzima está relacionada com a capacidade de sobrevivência do parasito a fármacos geradores de espécies radicalares (RODRIGUES *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2014).

O principal benefício de utilizar essa enzima como alvo para planejamento de fármacos é que esta apresenta uma morfologia muito diferente da enzima equivalente em humanos, a glutationa redutase. Desse modo, é mais provável a ação desses fármacos sobre a

*Tc*TR sem que haja interferências sobre a glutationa redutase do hospedeiro (RODRIGUES *et al.*, 2012).

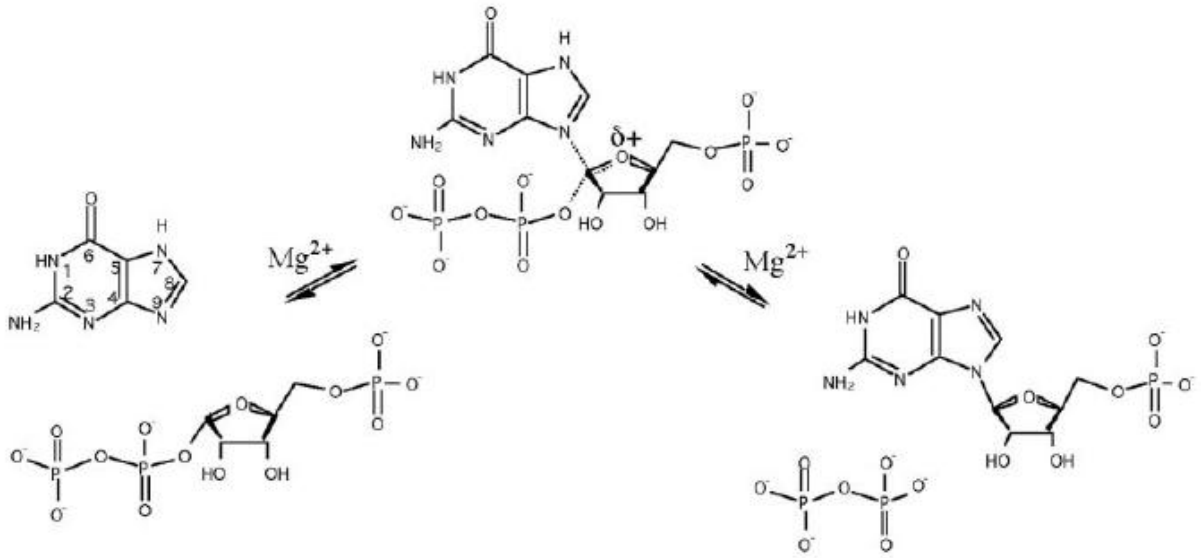
De acordo com Rodrigues e colaboradores (2012), em um estudo *in silico* mostrou que as interações, via ponte de hidrogênio com a LYS60 (lisina) e π-π *stacking* com o cofator FAD, são extremamente necessárias para o desenvolvimento da atividade inibitória sobre essa enzima.

2.3.6 Enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (*Tc*HGFRT)

A hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (*Tc*HGFRT) é uma importante enzima do *T.* cruzi, responsável pelo resgate de hipoxantina (HX) e bases guaninas (BG) dos reservatórios (*pool*) de nutrientes do hospedeiro para a síntese de nucleotídeos purinas (FREYMANN *et al.*, 2000).

A *Tc*HGPRT catalisa a transferência de um resíduo fosforribosil da fosforribosilfosfato (PRPP) para uma base purina (HX ou BG) para formar um ribonucleotídeo purina, monofosfato inosina (IMP) ou monofosfato de guanosina (GMP) (Figura 15) (FREYMANN *et al.*, 2000).

Figura 15 – Reação catalisada por *Tc*HGFRT.

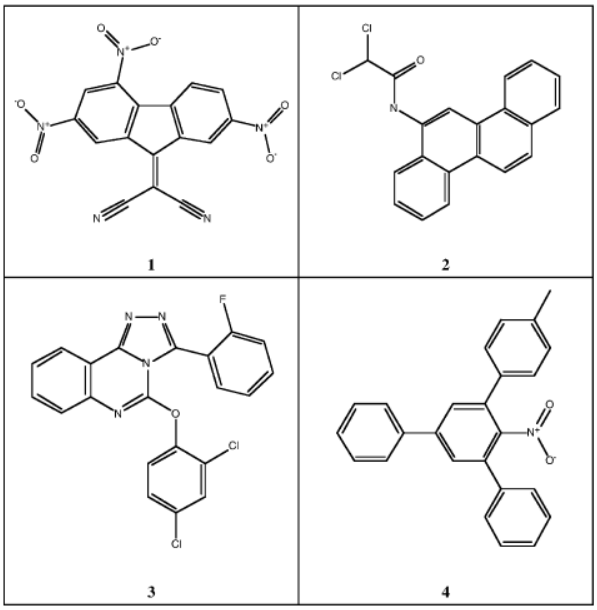


Fonte: FREYMANN *et al.*, 2000.

Nota: A *Tc*HGFRT catalisa a adição reversível da 6-oxopurina à posição C1’ da ribose da PRPP.

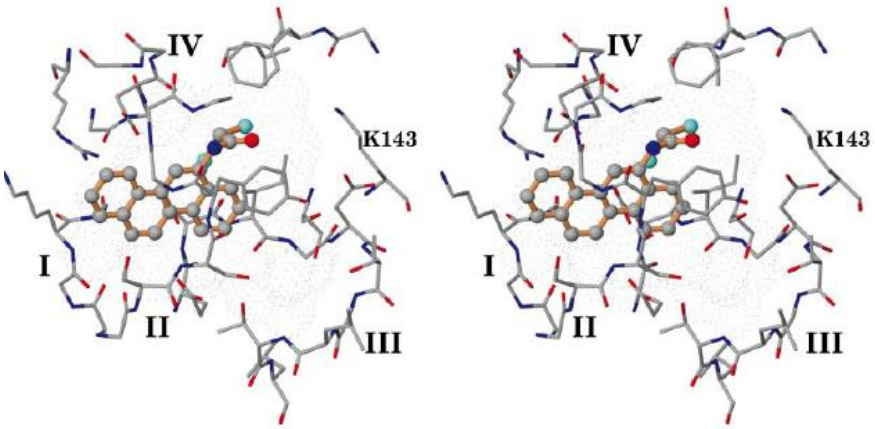
De acordo com Freymann e colaboradores (2000), alguns compostos sintetizados (Figura 16) visando ação sobre a enzima *Tc*HGFRT, são eficazes através de interações com os resíduos PHE164, ILE113, VAL165 e LEU170, dados comprovados em estudos experimentais e computacionais. Ainda nessa série sintetizada, o composto2 mostrou ser o candidato mais eficaz em se ligar ao sítio ativo da enzima (Figura 17).

Figura 16 – Compostos potencialmente ativos sobre a *Tc*HGFRT.



Fonte: FREYMANN *et al.*, 2000.

Figura 17 – Ancoragem do composto 2 na *Tc*HGFRT.



Fonte: Adaptado de FREYMANN *et al.*, 2000.

Nota: I, II, III, e IV são as prováveis conformações mais estáveis do ligante na macromolécula.O resíduo K143 significa LYS143.

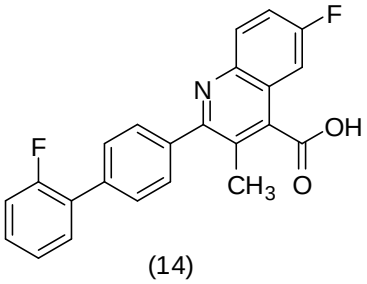
2.3.7 Enzima di-idro-orotato desidrogenase (*Tc*DHODH)

Pirimidinas são indispensáveis para todas as formas de células. Nucleotídeos pirimidinas são precursores para formas ativadas de carboidratos, lipídeos e nucleotídeos derivados de vitaminas (cofatores) (PINHEIRO *et al.,* 2013).

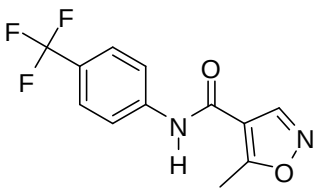
A di-idro-orotato desidorgenase (DHODH) é uma flavoenzima que catalisa a oxidação de (*S*)-di-idro-orotato a orotato, a quarta enzima da única etapa redox da via da biossíntese *de novo* de pirimidina (LIU *et al.*, 2000; INAOKA *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.,* 2012, 2013).

Recentes pesquisas no campo da química medicinal têm demonstrado grandes potenciais terapêuticos relacionados a essa enzima. Alguns inibidores da di-idro-orotato desidrogenase humana(*h*DHODH) têm sido investigados devido sua aplicabilidade nos tratamentos de artrites reumatoides, doenças autoimunes, câncer e psoríase. (PINHEIRO *et al.,* 2012, 2013).

Existem dois fármacos inibidores dessa enzima em humanos, onde se encontram em fase de ensaios clínicos, Brequinar **(14)** – antitumoral e imunossupressivo; e Leflunomida **(15)** – imunossupressivo e antipsoríatico (LIU *et al.*, 2000; PINHEIRO *et al.,* 2012, 2013).



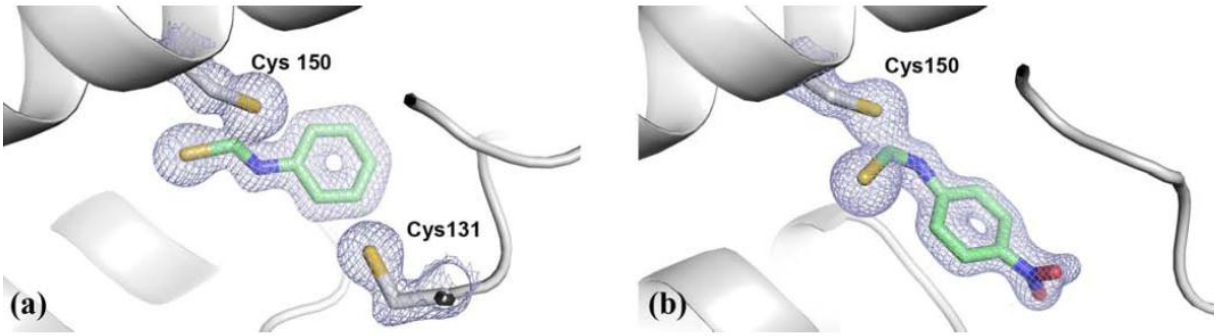
(14)



(15)

Os aminoácidos relacionados ao desenvolvimento da atividade inibitória sobre esse sítio enzimático são CYS131 e 150 (Figura 20). Tal fato foi comprovado através de ensaios de ancoragem com dois compostos, o isofeniltiocianato e o 4-nitrofenilisotiocianato. Porém, este último se mostrou mais ativo frente à enzima (PINHEIRO *et al.*,2012, 2013).

Figura 20 – Aminoácidos chaves no sítio de inibição para enzima *Tc*DHODH.



FONTE: PINHEIRO *et al.*, 2013.

Nota: Em **a**, fenilisotiocianato. Em **b**, 4-nitrofenilisotiocianato.

Em humanos e algumas espécies de bactérias, esses resíduos catalíticos observados na *Tc*DHODH são substituídos por uma SER215 (serina). Além disso, apresenta dois resíduos conservados, THR218 (treonina) e PHE129 (LIU *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Síntese de novos protótipos de fármacos tiofeno-2-tioureicos e 2-iminotiazolidínicos racionalmente planejados com potencial atividade antichagásica.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar uma série de derivados tiofeno-2-tioureicos;
- Sintetizar uma série de derivados 2-iminotiazolidínicos;
- Caracterizar estruturalmente os compostos sintetizados através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (^{1}H) e carbono treze (^{13}C);
- Determinar o ponto de fusão e *c*LogP dos derivados obtidos;
- Utilizar técnicas contidas na bioinformática para avaliar o potencial inibidor dos derivados sintetizados em ensaios de ancoragem molecular (*docking*);
- Avaliar os derivados sintetizados em células infectadas com formas amastigotas e tripomastigotas do parasito (*in vitro*);
- Avaliar a viabilidade celular em ensaios de MTT para a melhor série de compostos;
- Propor um provável mecanismo de ação para os derivados mais ativos das séries obtidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Seção Experimental

4.1.1 Cromatografias

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de Sílica Gel 60 F_{254} da MERCK® de 0,25 mm de espessura. A visualização das mesmas para interpretação dos resultados foi realizada através de luz emissora de radiação ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

4.1.2 Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram determinados utilizando equipamento *MSTecnopon*®, modelo *PFMII Digital*, em tubos capilares contendo cada um das amostras individualmente.

4.1.3 Caracterização estrutural por RMN ^{1}H e ^{13}C

Os espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C foram obtidos em equipamento *Brüker*®, modelo *Avance DRX* 400 MHz – *UltraShield*®, utilizando $CDCl_3$ e DMSO-d_6 como solventes analíticos. Sobre os espectros, os deslocamentos químicos (δ) foram computados em partes por milhão (ppm), onde foi empregado tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As constantes de acoplamento (*J*) inerentes aos sinais de RMN de ^{1}H foram computadas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram instituídas da seguinte maneira: singleto (*s*), singleto largo (*sl*), dubleto (*d*), duplo dubleto (*dd*), tripleto (*t*), quarteto (*q*), quinteto (*qi*), sexteto (*sex*), septeto (*sep*), e multipleto (*m*).

4.1.4 Reagentes e solventes

2-Clroacetoacetato de etila
Acetato de sódio anidro
Água destilada
Anidrido maléico
Dimetil formamida (DMF)
Dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d_6)
Dioxano absoluto
Acetato de etila absoluto

Bromo acetofenona	Clorofórmio deuterado ($CDCl_3$)
Dietil-2-bromomalonato	Diclorometano
Cianoacetato de etila	Metanol absoluto
Cianoacetato de propila	Clorofórmio absoluto
Cicloexanona	Hexano absoluto
2-Cloroacetato de etila	Tolueno absoluto
Etanol absoluto	Fenilisotiocianato
Sulfato de sódio anidro	Alilisotiocianato

4.1.5 Equipamentos

Bomba de alto vácuo	Estufa
Evaporador rotativo	Placas de agitação e aquecimento
Vidrarias apropriadas	Computadores (*i7*)
Capela com exaustão	Balança analítica (4 casas decimais)
Balança semi-analítica	Freezer
Citômetro de fluxo	Espectrofotômetro

4.2 Planejamento Racional dos Potenciais Inibidores das Enzimas Tripanossomais

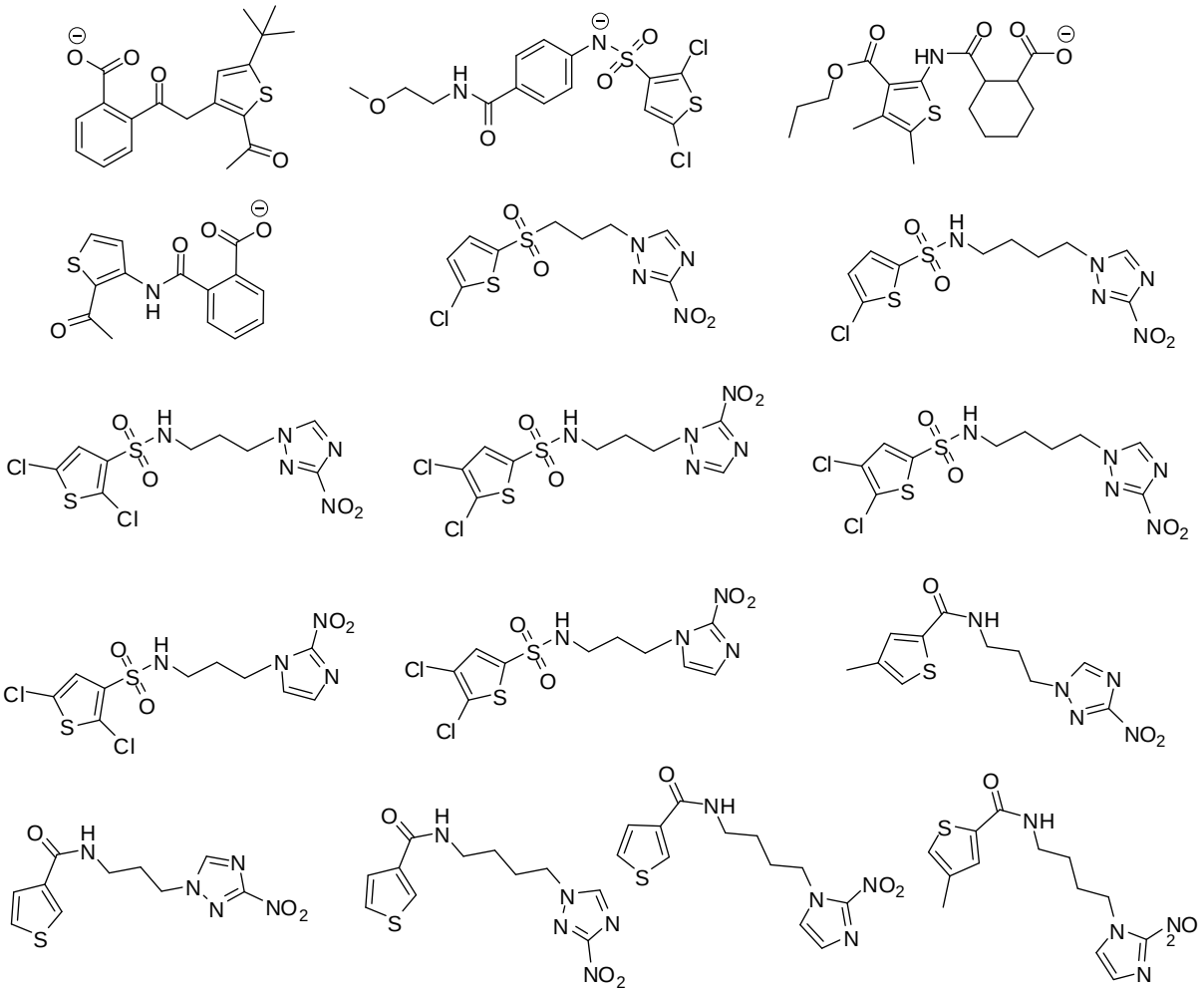
Após aprofundamento em bases literárias que abordam o assunto, decidiu-se criar moléculas com regiões estruturais oriundas de diversos estudos realizados *in silico* e *in vitro.*

Várias observações acerca dos grupamentos farmacofóricos, toxicofóricos e auxofóricos culminaram no início da criação das moléculas.

4.2.1 Seleção do núcleo heterociclo

A utilização de anéis contendo heteroátomos é uma realidade no planejamento de compostos com atividade antichagásica. De acordo com Neres e colaboradores (2009), o anel tiofênico contido na estrutura de uma série de compostos avaliados em sua pesquisa foi de extrema importância para a ação inibitória sobre a enzima *Tc*TS. Tal anel tiofênico ocupa a região seletivamente hidrofóbica do sítio ativo da *Tc*TS. Portanto, foi desejado obter um derivado tiofênico como modelo inicial, devido sua frequente aplicação em compostos antichagásicos (Figura 21).

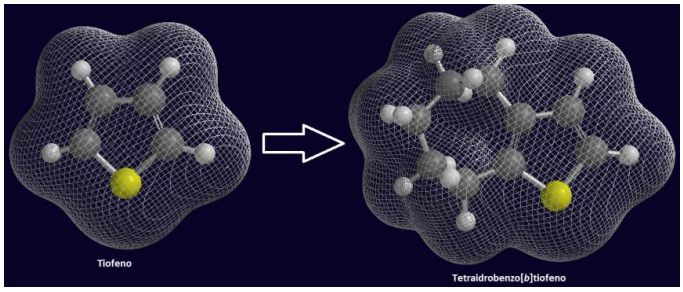
Figura 21 – Principais tiofenos ativos sobre o parasito *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: NERES *et al.*, 2009 e PAPADOPOULOU *et al.*, 2014. (EDITADO).

Porém, decidiu-se aumentar a hidrofobicidade da região do anel tiofeno, com a finalidade de melhorar a afinidade entre o ligante e o sítio hidrofóbico da *Tc*TS, acoplando-se um cicloexano ao tiofeno (Figura 22).

Figura 22 – Modificação do volume hidrofóbico do anel tiofênico.

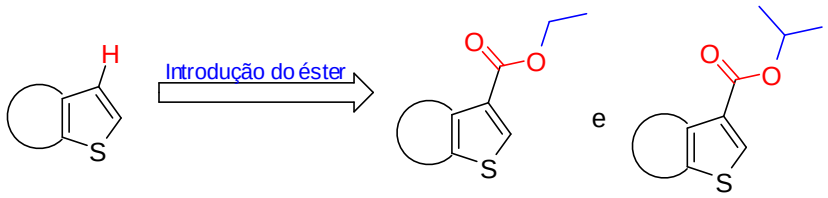


Fonte: Autor, 2015.

Nota: Modificação do volume hidrofóbico do tiofeno. Figura elaborada através do *software ArgusLab*, onde o volume estérico foi calculado usando o *Austin Model 1* (AM1).

Além disso, ainda de acordo com Neres e colaboradores (2009), há um sítio doador/aceptor para os ligantes no sítio da *Tc*TS, cujo este é fundamental para a atividade inibitória desses ligantes. Portanto, foi decidido introduzir um grupo polar (éster) à estrutura do anel tiofênico, contendo um grupo de maior e outro de menor volume (Figura 23).

Figura 23 – Ésteres selecionados para a avaliação da afinidade do ligante no sítio doador/aceptor da *Tc*TS.



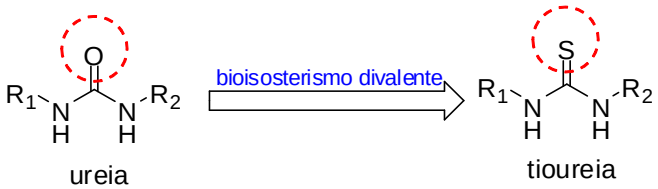
Fonte: Autor, 2015.

4.2.2 Aplicando o bioisosterismo clássico divalente

Como abordado na fundamentação teórica deste trabalho, derivados da ureia tem sido largamente empregados como compostos antichagásicos. Kryshchyshyn e colaboradores (2014) enfatizam que normalmente há uma redução da toxicidade desses compostos quando ocorre uma substituição do átomo de oxigênio (=O), da ureia, por um átomo de enxofre (=S), favorecendo a inibição da sobre a enzima *Tc*CR.

Portanto, decidiu-se planejar um fragmento ureia, porém com uma provável redução da toxicidade do derivado final. Para tanto, foi aplicada a técnica de bioisosterismo clássico divalente, gerando uma tioureia (Figura 24).

Figura 24 – Conversão de ureia em tioureia via bioisosterismo clássico.



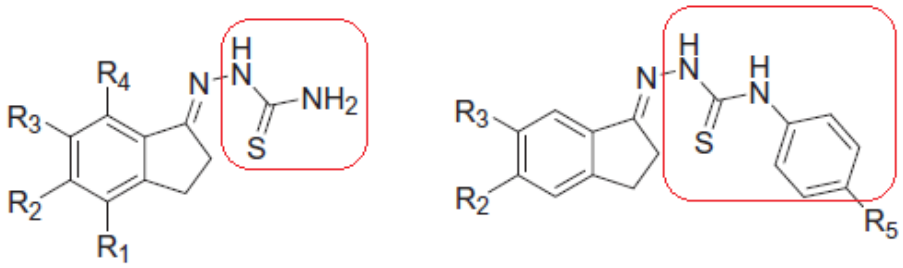
Fonte: Autor, 2015.

4.2.3 Verificação do efeito de impedimento estérico à tioureia.

Após a escolha do núcleo heterociclo, como domínio hidrofóbico, e da tioureia, como grupo toxicofórico, foi iniciada a busca por grupos auxofóricos, onde foi decidido, inicialmente, aumentar o volume na região *N*-terminal com um grupo hidrofóbico rígido e outro mais flexível.

De acordo com Caputto e colaboradores (2011), compostos sintetizados contendo uma modificação hidrofóbica na região *N*-terminal da tioureia (Figura 25) se mostraram mais efetivos do que o fármaco padrão-ouro NFx, em ensaios *in vitro*. Tal modificação permitiu que essa série de compostos fosse ativa via inibição da *Tc*CR.

Figura 25 – Compostos modificados na região *N*-terminal.

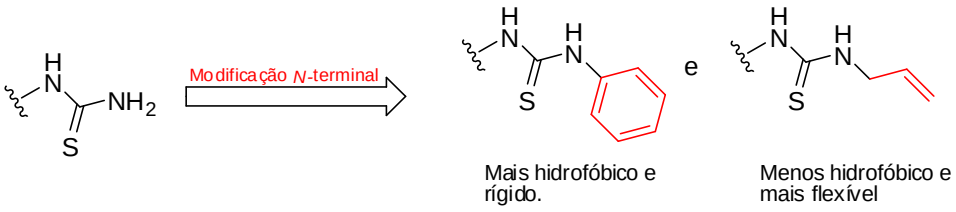


Fonte: CAPUTTO*et al.*, 2011.

Nota: Aumento do volume hidrofóbico *N*-terminal da tioureia, através da introdução de um grupamento volumoso rígido.

Por fim, além do grupo rígido (fenila), decidiu-se incluir um grupamento hidrofóbico menos volumoso e mais flexível. Nesse caso, preferiu-se o grupamento alila como tal (Figura 26), com a finalidade de verificar mudanças conformacionais do ligante no sítio ativo das enzimas estudas.

Figura 26 – Grupamentos *N*-terminais selecionados para planejamento dos novos inibidores.

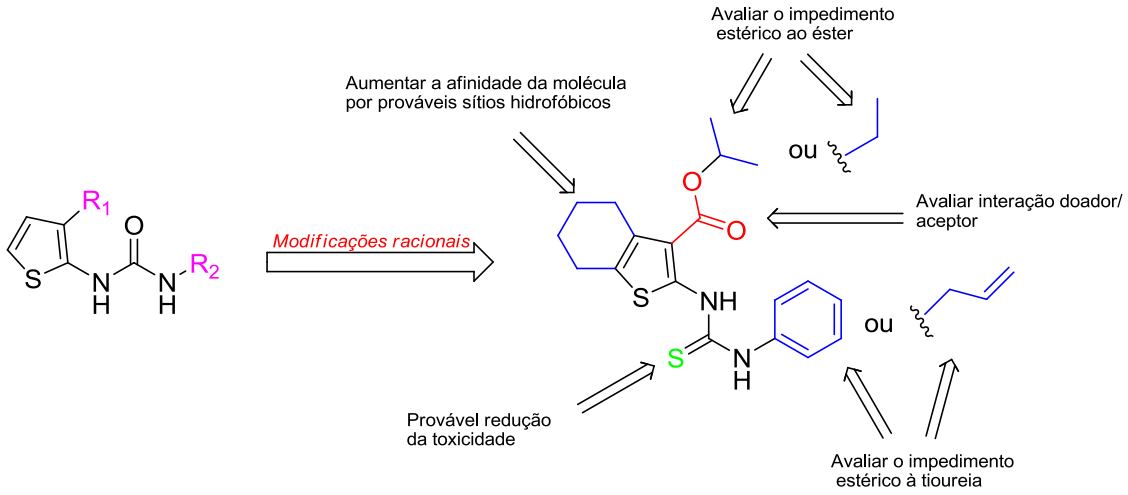


Fonte: Autor, 2015.

4.2.4 Composição da série tiofeno-2-tioureia.

Após a análise dos dados contidos na literatura, a primeira estrutura racionalmente planejada foi desenvolvida (Figura 27).

Figura 27 – Estrutura química da série tiofeno-2-tioureia.



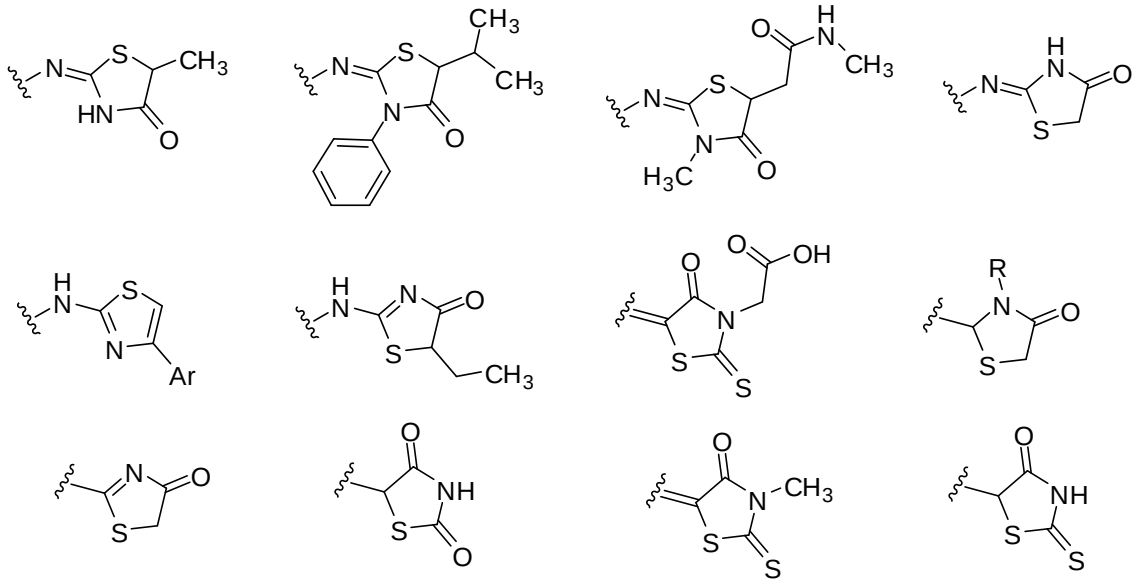
Fonte: Autor, 2015.

Nota: À esquerda, protótipo; À direita, novo esqueleto químico planejado racionalmente, caracterizando uma das séries a ser avaliada biologicamente.

4.2.5 Aplicando o bioisosterismo não-clássico de fechamento de anel

De acordo com Cardoso e colaboradores (2014), foi verificado que a ciclização da região tiossemicarbazona (fragmento detentor de atividade anti-*T. cruzi*), gerando uma tiazolidina, fornecia um aumento da atividade biológica. Além disso, diversas pesquisas de vários autores (MOREIRA *et al.*; KRYSHCHYSHYN *et al.*; HAVRYLYUK *et al.*; CARDOSO *et al.*, 2014) enfatizam a importância do anel tiazolidina para a atividade inibitória sobre enzimas do parasito *Trypanosoma cruzi*. Na figura 28 estão agrupados vários exemplos de anéis tiazolidínicos encontrados em alguns compostos obtidos por tais autores.

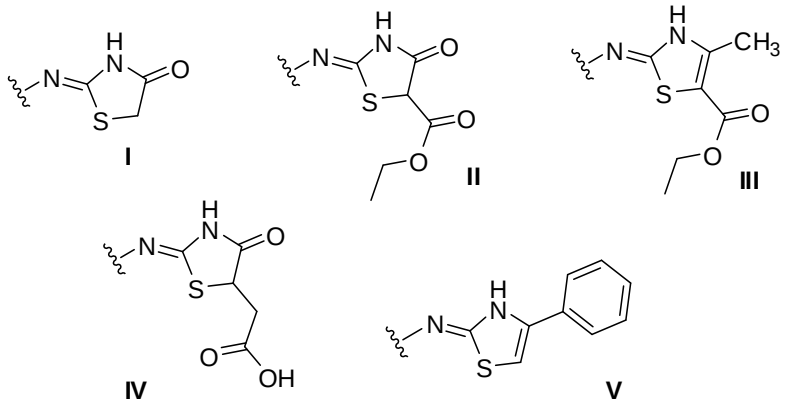
Figura 28 – Principais anéis tiazolidínicos encontrados em compostos bioativos contra *Trypanosoma cruzi.*



Fonte: MOREIRA *et al.*; KRYSHCHYSHYN *et al.*; HAVRYLYUK *et al.*; CARDOSO *et al.*, 2014. (EDITADO).

Dessa forma, foi planejada a ciclização da série de compostos tiofeno-2-tioureicos, via técnica bioisostérica não-clássica de fechamento de anel. Foram selecionados diferentes substituintes para os anéis tiazolidínicos da nova série de compostos almejados (Figura 29). Tais substituintes desses anéis tem a função de subsidiar informações sobre os efeitos polares (hidrofobicidade ou hidrofilicidade), volume (impedimento estérico), e flexibilidade (grau de liberdade) e rigidez dos ligantes sobre as interações ocorridas nos sítios enzimáticos analisados.

Figura 29 – Diferentes substituintes nos anéis tiazolidínicos planejados para a nova série de inibidores.

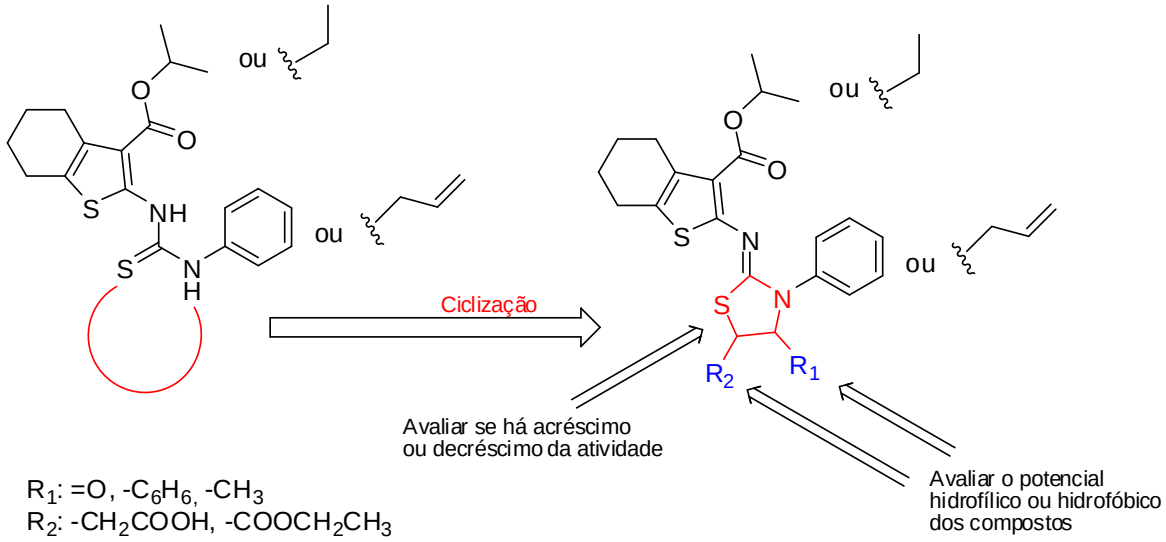


Fonte: Autor, 2015.

4.2.6 Composição da série tiofeno-2-iminotiazolidinona.

A fundamentação teórica funcionou como matéria-prima para o planejamento molecular de compostos potencialmente ativos contra o parasito *Trypanosoma cruzi*. Dessa forma, foi desenvolvido o esqueleto químico para a nova série de compostos, tiofeno-2-iminotiazolidínicos (Figura 30).

Figura 30 - Estrutura química da série tiofeno-2-iminotiazolidinona ou tiofeno-2-tiazolidina).



Fonte: Autor, 2015.

4.3 Ensaios Computacionais Empregados na Avaliação de Novos Inibidores com Ação Anti-*T. cruzi*

4.3.1 Determinação do *c*LogP

O dado físico-químico *c*LogP para cada composto foi obtido utilizando o *software on-line* OSIRIS *Properties Explorer*®, disponível em http://www.organic-hemistry.org/prog/peo/.

4.3.2 Estudos de ancoragem (*Docking* Molecular)

4.3.2.1 *Softwares* Utilizados

Todas as estruturas tridimensionais dos protótipos foram desenhadas utilizando o *software* gratuito *ArgusLab*®, como bem a execução da minimização das energias, empregando-se o *Austin Model* 1 (AM1).

Para a execução dos experimentos de ancoragem molecular foi utilizado um *software* gratuito amplamente empregado no campo científico computacional, o *AutoDock Tools*®, versão 1.5.6, desenvolvido por Stefano Forli e colaboradores, de1999 a 2011, no *Molecular Graphics Laboratory*, *the Scripps Research Institute, La Jolla,* Califórnia, Estados Unidos da América. Segundo BABA & AKAHO (2011), o *AutoDock* é um dos mais empregados e usuais *softwares* da área computacional.

Para a otimização das energias de ligação estimadas para a formação do complexo ligante-receptor pelo *AutoDock Tools*®, foi utilizado o *software*, *AutoDock Vina*®, pois este apresenta uma melhor função *scoring* (Equação 1), a qual foi desenvolvida através da otimização de alguns algoritmos internos do programa (TROTT & OLSON, 2009).

$$c = \sum_{i<j} f_{t_i t_j}(r_{ij})$$

Equação 1 – Função *Scoring* do *AutoDock Vina.*

Onde cada átomo (i) e cada tipo de átomo (t_i), além de um conjunto de funções de interações entre esses átomos ($f_{t_i t_j}$), em uma determinada distância interatômico (r_{ij}), são iguais à contribuição global (c) (TROTT & OLSON, 2009). Tal valor pode ser visto, de maneira resumida, como a soma de contribuições intra- e intermoleculares (Equação 2) (TROTT & OLSON, 2009).

$$c = c_{intra} + c_{inter}$$

Equação 2 – Contribuição global.

As funções de interação ($f_{t_i t_j}$) são definidas como a distância da superfície relativa interatômicas $d_{ij} = r_{ij} - R_{ti} - R_{tj}$, onde R_t é o raio de *Van Der Waals* do tipo de átomo em

questão (TROTT & OLSON, 2009). A função otimizada utilizada pelo *AutoDock Vina* está expressa na equação 3, abaixo:

$$f_{t_i t_j}(r_{ij}) \equiv h_{t_i t_j}(d_{ij}),$$

Equação 3 – Função de otimização usada pelo *AutoDock Vina*.

Onde h_{ij} é uma soma das interações estéricas, idêntica para todos os pares de átomos, interações hidrofóbicas e, quando aplicável, ligação de hidrogênio (TROTT & OLSON, 2009).

Para a visualização dos resultados calculados através do *AutoDock Tools*®, bem como, cálculos das distâncias das interações ligante-receptor e elaboração de figuras, foi utilizado o *software PyMol*®, versão 0.99, desenvolvido por DeLano e Lam (2006), na *DeLano Scientific LLC, South San Francisco,* Califórnia, Estados Unidos da América.

4.3.2.2 Seleção das enzimas

Foram utilizados alguns critérios de seleção para a escolha do alvo a ser realizado o estudo de ancoragem. Tais critérios foram:

- Enzimas frequentemente estudadas como alvo terapêutico para planejamento de novos candidatos a fármacos;
- Enzimas provenientes de estudos de elucidação estrutural para agentes tripanossomicidas;
- Enzimas similares ou provenientes de estudos relacionados ao *T. cruzi*;

Dessa forma, foram selecionadas as enzimas: *Tc*PTR (PDB ID: 1MXF); *Tc*CR (PDB ID: 1U9Q); *Tc*TR (PDB ID: 1BZL); *Tc*DHFR (PDB ID: 2H2Q); TcHGFRT (PDB ID: 1TC2); *Tc*TS (1S0I); *Tc*DHODH (2DJX), obtidas no *RSCBProtein Data Bank* (*PDB*).

4.3.2.3 Preparo dos ligantes

Após a conversão das estruturas tridimensionais, as ligações *sigma* (σ) dos ligantes foram admitidas como flexíveis e as ligações *pi* (π) foram mantidas fixas.

A flexibilidade adicionada às estruturas dos ligantes permitiu fornecer as 100 conformações mais estáveis para cada um dos ligantes, quando complexados à enzima.

4.3.2.4 Preparo da enzima

De acordo Cosconati e colaboradores (2010), devem ser adicionados hidrogênios e cargas às enzimas, pois em alguns casos, estas podem apresentar um número de hidrogênios incompatível. Em seguida, foi realizada uma varredura, verificando o número de átomos adicionados e se esses novos hidrogênios estavam coerentemente localizados, no que diz respeito ao número de ligações.

Quando se tem uma estrutura alvo complexada com um determinado ligante, deve-se ser realizado um *redocking* da conformação co-cristalizada desse ligante. Isso fornece muitos benefícios, incluindo validação da preparação do alvo, obtenção dos parâmetros para os cálculos de *docking*, e a validação do método para previsão da conformação ligante (COSCONATI *et al.,* 2010). Todas essas recomendações anteriores foram seguidas.

Devido as enzimas estarem complexadas com ligantes no arquivo disponibilizado no *PDB,* necessitou-se eliminar algumas coordenadas da mesma. Tais coordenadas poderiam gerar falsos resultados, quanto ao número de prováveis interações com aminoácidos e/ou energia de ligação relacionada à formação dos complexos ligante/receptor. Dessa forma, foram extraídas todas as moléculas de água contidas na estrutura, coordenadas codificadas por "*HETATM"*, e os ligantes complexados, coordenadas codificadas por *"CONNECT"*.

As enzimas foram admitidas como sendo rígida, pois o estudo de ancoragem assume muitos ou todos os receptores como rígidos, além de comprimentos e ângulos de ligação fixos, caracterizando assim o ponto fraco da técnica computacional (TROTT & OLSON, 2009; COSCONATI *et al.,* 2010). Nesse caso, para a execução dos experimentos de ancoragem, é fundamental escolher uma estrutura alvo com um inibidor ou substrato ligado, pois esta é forçada a permanecer em uma conformação que é mais relevante à ligação de novos compostos (COSCONATI *et al.,* 2010). Por fim, todas as cargas parciais dos átomos foram adicionadas através do método matemático de *Gasteiger*.

4.3.2.5 Determinação dos parâmetros de busca

Após o preparo das enzimas e dos ligantes, foi processada a confecção dos parâmetros de busca. As coordenadas *x, y* e *z* foram extraídas dos arquivos originais obtidos através do *PDB.*

A caixa de busca foi admitida ter uma dimensão 40 $Å^2$ para tal procedimento. Porém, o intervalo de busca entre os pontos da caixa foi fixado em 0.375 Å.

Como modelo matemático para a execução dos cálculos de ancoragem propriamente ditos, aplicou-se o Algoritmo Genético Lamarckiano (*Lamarckian G.A.*), padronizado da seguinte maneira:

- Número de execução de Algoritmos Genéticos (*G.A.*)= 100;
- Tamanho da população= 150;
- Número máximo de avaliações= 2.500.000,00;
- Número máximo de gerações= 27.000;
- Taxa de mutação genética= 0.02%;
- Taxa de *crossover*= 0.8%;
- Distribuição da variância de *Cauchy* para mutação genética= 1.0%.

Ademais, parâmetros como energia (em kcal/mol), números aleatórios e, tamanho foram mantidos como *padrão.*

4.3.2.6 Interpretação dos resultados

O *docking* molecular objetiva, através da previsão de ligações não covalentes, reproduzir os potenciais químicos que determinam a principal conformação ligante e a energia de ligação desta (TROTT & OLSON, 2009; COSCONATI *et al.*, 2010).

A característica chave de um bom programa de ancoragem é sua habilidade para reproduzir modelos ligantes experimentais de compostos (VERDONK *et al.*, 2003).

Por fim, foram considerados dois critérios para a interpretação dos resultados produzidos pelo *software*, descritos a seguir.

4.3.2.6.1 Energia de ligação

O campo de força de energia livre é baseado em um campo de força mecânico molecular, que inclui dispersão/repulsão, ligação de hidrogênio, eletrostáticos, dessolvatação e entropia de torção (COSCONATI *et al.,* 2010).

A conformação que apresentou a menor energia de ligação (em kcal/mol) para a formação do complexo foi considerada como sendo a mais viável. Além disso, esta deve apresentar um somatório dos desvios padrão quadráticos (RMSD) ≤ 2,0 Å, pois a previsão de um modelo de ligação só é considerada ótima quando o valor de RMSD está abaixo de 2,0 Å (VERDONK *et al.*, 2003).

O métodos de cálculos energético desenvolvidos pelo *AutoDock Tools*®têm um erro típico de ± 2 Kcal/mol na previsão da energia de ligação. Dessa forma, não se recomenda utilizar apenas esse parâmetro como medida para selecionar os melhores ligantes (COSCONATI *et al.,* 2010). Para tanto, foi aplicado o *software AutoDock Vina*® para a execução e correções desses valores energéticos.

4.3.2.6.2 Interações do complexo ligante-enzima

Vários aspectos das conformações obtidas devem ser usados para determinar os melhores compostos, tais como a presença de contatos chaves dos ligantes com aminoácidos críticos no sítio ativo, similaridade de conformações com ligantes conhecidos, ou presença de doadores ou aceptores de ligação de hidrogênio no complexo ligante/receptor (COSCONATI *et al.,* 2010).

Foram estabelecidos como critérios de avaliação: interações realizadas pelos ligantes anteriormente complexados às enzimas e informações obtidas na literatura. Nesta etapa foram levados em consideração critérios tais como a natureza do tipo de ligação (hidrofóbica, eletrostática, dipolo-dipolo ou de hidrogênio), e os aminoácidos envolvidos na formação do complexo ligante/enzima.

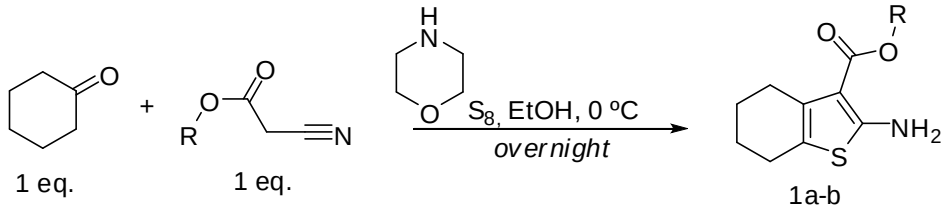
4.4 Procedimentos Reacionais

4.4.1 Método geral para obtenção dos derivados 2-aminotiofeno-3-carboxilatos (*1a-b*)

Os componentes desta série foram utilizados como material de partida para os demais compostos de outras séries. Dessa forma, não foram planejados como compostos antichagásicos.

Em uma solução contendo 1,0 mmol de cicloexanona em 50 mL de Etanol, foram adicionados 1,0 mmol do correspondente cianoéster, 1,0 mmol de enxofre elementar e 1,0 mmol de morfolina, como base catalítica (Esquema 1). A mistura foi mantida sob agitação a 0 ºC, permitindo-se atingir temperatura ambiente, durante *overnight.* Após o término da reação, verificado por CCD, foi procedida uma partição líquido-líquido (AcOEt:H_2O), seguida por execução da separação, via coluna cromatográfica. As frações puras obtidas foram juntas e evaporadas por redução da pressão. Por fim, foi procedida uma recristalização em EtOH:H_2O, como sistema solvente/antissolvente (PUTEROVÁ *et al.*, 2010; EL-SHARKWY *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2014).

Esquema 1 – Obtenção de compostos *1a-b*.



1a: R= Etila;
2b: R= *i*-Propila.

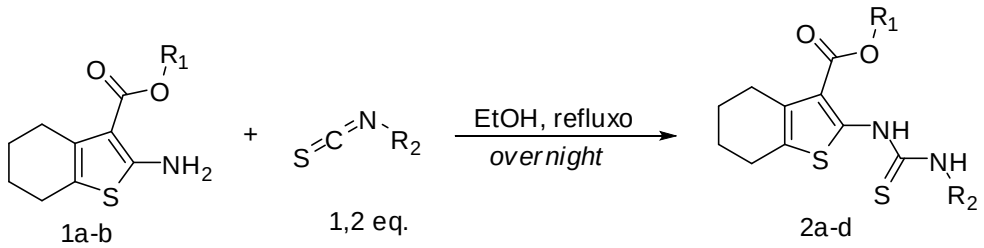
Fonte: Autor, 2015.

4.4.2 Método geral para obtenção dos derivados 2-tioureidotiofeno-3-carboxilatos (*2a-d*)

Uma solução contendo 1,0 mmol de ***1a*** ou ***1b*** em 50 mL de etanol foi acrescida de 1,2 mmol do correspondente isotiocianto (fenil ou alil) (Esquema 2). A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação, durante *overnight*. O fim da reação foi verificado por CCD, então, procedeu-se uma partição líquido-líquido, seguida por uma coluna cromatográfica, utilizando Hex/ActOEt 8:2 como sistema eluente. Todas as frações puras obtidas foram evaporadas por redução da pressão, rendendo o produto (no caso, compostos **2a** e ***2c*)**. Para a

obtenção dos compostos ***2b*** e ***2d,*** foi realizada uma recristalização em $CHCl_3$/MeOH, como sistema solvente/antissolvente.

Esquema 2 – Obtenção de compostos da série *2a-d*.



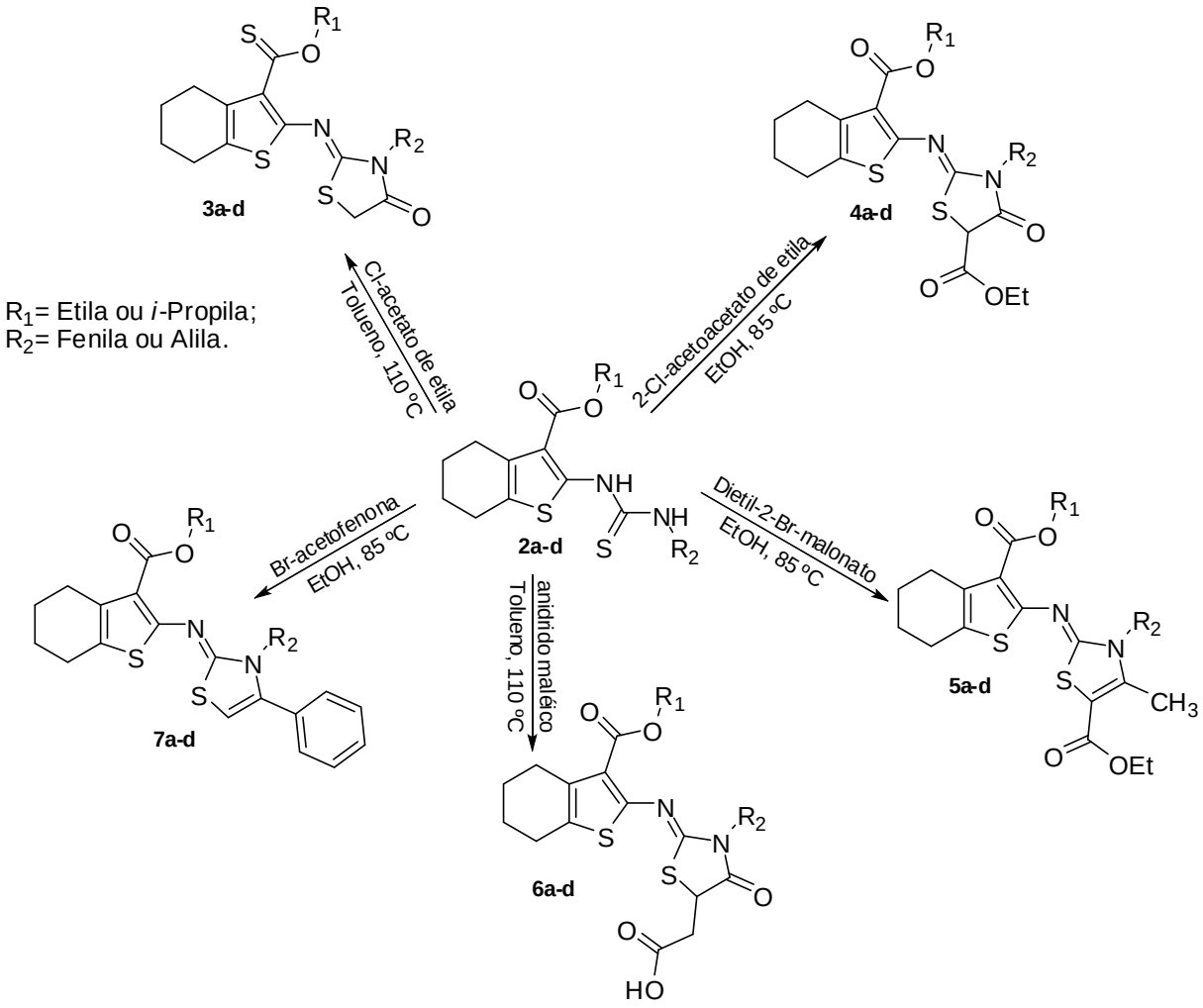
2a: R_1= Etila; R_2= Fenila
2b: R_1= *i*-Propila; R_2= Fenila
2c: R_1= Etila; R_2= Alila
2d: R_1= *i*-Propila; R_2= Alila

Fonte: Autor, 2015.

4.4.3 Método geral para obtenção dos derivados 2-tiazolidinenoiminotiofeno-3-carboxilatos (*3a-d, 4a-d, 5a-d, 6a-d, e 7a-d*)

Uma solução contendo 1,0 mmol de ***2a-d,*** em etanol (para ***2a*** e ***2c***) ou tolueno (para ***2b*** e ***2d***), foi acrescida de 2.0 mmol do correspondente agente ciclizante (Esquema 3). A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação durante *overnight*. Após a finalização da reação, verificada por CCD, procedeu-se uma partição líquido-líquido, seguida por uma coluna cromatográfica, utilizando Hex/ActOEt 8:2 como sistema eluente. Todas as frações puras obtidas foram evaporadas por redução da pressão, rendendo os produtos.

Esquema 3 – Obtenção de compostos da série *3a-d, 4a-d, 5a-d, 6a-d e 7a-d*.



Fonte: Autor, 2015.

4.5 Ensaios Biológicos

4.5.1 Avaliação antichagásica preliminar

4.5.1.1 Formas amastigotas

Formas amastigotas do *T. cruzi* foram obtidas de cultura de células *C2C12* e plaqueadas em placas de 96 poços (4.0 x10^5 parasitos/poço), em triplicata, utilizando meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50μg/mL de gentamicina. Os compostos foram solubilizados em 0.1% de DMSO (Dimetilsulfóxido), diluídos em meio RPMI e

ajustados na concentração de 10 μM. O controle negativo recebeu somente DMSO e meio. Como controle positivo, BnZ (*Rochagan*®) foi utilizado na concentração de 10 μM. Após 24 horas de incubação em estufa de CO_2 a 37 ^{o} C, 400 ng/mL de iodeto de propídio foram adicionados e incubados por 5 minutos. Ao final, os parasitos foram analisados por citometria de fluxo e os resultados foram avaliados em relação ao controle sem droga (MOREIRA *et al.*, 2014).

Ao final das análises dos experimentos, foi possível determinar a IC_{50} e a CC_{50} para alguns compostos.

4.5.1.2 Formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram obtidas de cultura de células *MK2* e plaqueadas em placas de 96 poços (4.0 x10^5 parasitos/poço), em triplicata, utilizando meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50μg/mL de gentamicina. Os compostos foram solubilizados em DMSO (Dimetilsulfóxido), diluídos em meio RPMI e ajustados na concentração de 25 μM. O controle negativo recebeu somente DMSO e meio. Como controle positivo, BnZ (*Rochagan*®) foi utilizado na concentração de 25 μM. Após 24 horas de incubação em estufa de CO_2 a 37 ^{o} C, 400 ng/mL de iodeto de propídio foram adicionados e incubados por 5 minutos. Ao final, os parasitos foram analisados por citometria de fluxo e os resultados foram avaliados em relação ao controle sem droga (MOREIRA *et al.*, 2014).

4.5.2 Avaliação da viabilidade celular por MTT

Para verificar efeito da melhor série de compostos sobre a viabilidade celular foi utilizado o ensaio citotoxicidade *in vitro* por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) utilizando macrófagos *J774* pré-cultivados (BERRIDGE *et al.*, 1996). Trata-se de um ensaio colorimétrico baseado na atividade mitocondrial da célula devido a redução do MTT a cristais de formazan. Os compostos foram incubados em duas concentrações (10 μM e 100 μM) por 24 h. Como grupos controles, foram utilizados apenas células e meio de cultura, DMSO (0,05%) e células tratadas com *Tween* (3%). Decorridas as 24 horas, as células foram incubadas com MTT durante 4 horas. Após a incubação com MTT, os poços foram lavados com PBS (*Phosphate Buffered Saline* – tampão fosfato-salino), em seguida, foram adicionados 150 μL de DMSO, esperou-se 15 minutos e,então,foi realizada a leitura em

aparelho de espectrofotômetro *Thermo Plate®*, *Modelo RS 232*, no comprimento de onda de 540 nm.

RESULTADOS E DISCUSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSÃO

5.1 Compostos 2-aminotiofeno-3-carboxilatos (*1a-b*)

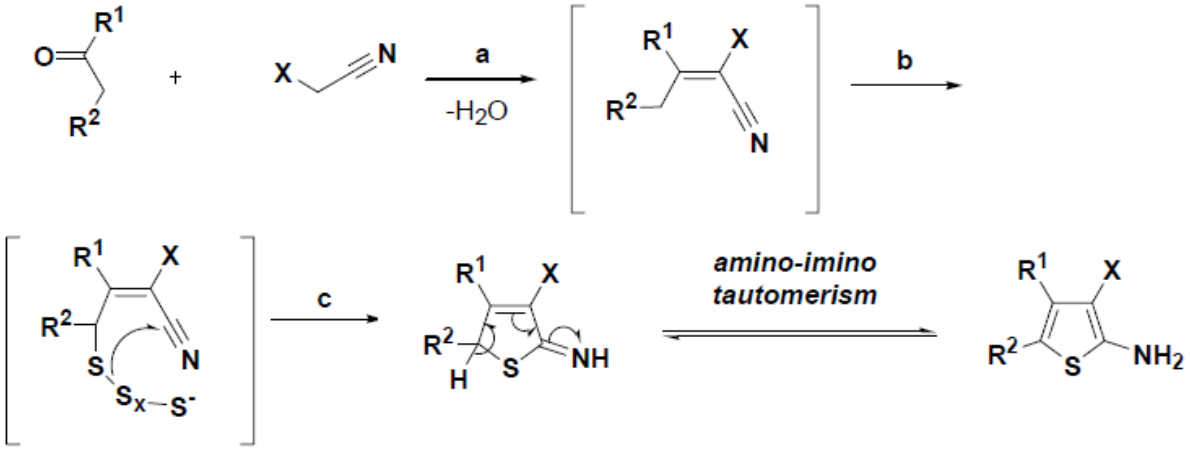
Os compostos ***1a*** e ***1b*** foram obtidos sem maiores dificuldades envolvendo as etapas reacionais e/ou de purificação, como descrito na literatura.

Tendo em vista os rendimentos obtidos, não foi necessário otimizar os parâmetros reacionais, pois estes foram bastante satisfatórios.

5.1.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *1a* e *1b*.

O mecanismo reacional via *Gewald*, consiste de uma reação *one-pot* com três componentes: uma carbonila cetônica; uma α-acetonitrila ativada; e enxofre elementar. Inicialmente, ocorre a uma condensação, via *Knoevenagel-Cope*, entre o composto carbonílico e à acetonitrila, com a liberação de uma molécula de água. Posteriormente, a base (nesse caso, morfolina) desprotona o grupo metileno da nitrila e, em seguida, ocorre a adição do enxofre (*S*-nucleófilo). Por fim, ocorre um ataque intramolecular desse nucleófilo à nitrila, favorecendo a ocorrência de tautomerismo amino-imínico, gerando o anel tiofênico polissubstituído como produto (Esquema 4) (FEROCI *et al.*, 2008; PUTEROVÁ *et al.*, 2010).

Esquema 4 – Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *1a-b*.

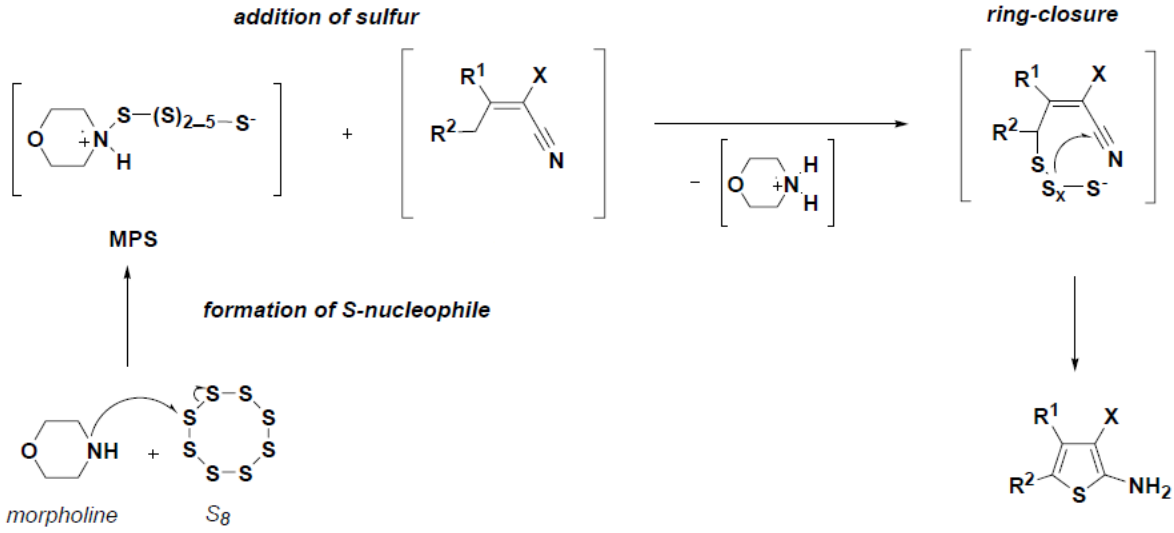


Fonte: PUTEROVÁ *et al.*, 2010.

Nota: Em **a,** condensação via Knoevenagel-Cope; em **b,** adição do enxofre, seguida do ataque intramolecular do enxofre à nitrila; em **c,** fechamento do anel.

O *S*-nucleófilo é formado pelo ataque da base ao enxofre elementar (S_8) (Esquema 5), em paralelo à desprotonação causada no cianoéster de etila (PUTEROVÁ *et al.*, 2010).

Esquema 5 – Formação do *S*-nucleófilo na reação de *Gewald*.



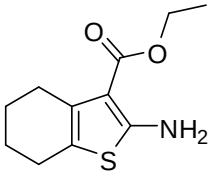
FONTE: PUTEROVÁ *et al.*, 2010.

Nota: Formação do S-nucleófilo; MPS: morfolina polissulfida; seguida da adição do enxofre; desprotonação; ataque intramolecular; fechamento do anel.

5.1.2 Caracterização por RMN de ^{1}H e ^{13}C

Foi verificada a formação dos derivados ***1a*** e ***1b*** pelos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, sinais característicos, como os sinais referentes aos hidrogênios da metila (R-CH_3) e da amina (R-NH_2) em torno de δ 1.2 ppm e δ 7.1 ppm, respectivamente. Na análise de RMN de ^{13}C é característica do sinal do carbono ligado à amina primária em torno de δ 165.1 ppm, além da quantidade exata de carbonos contidos na molécula.

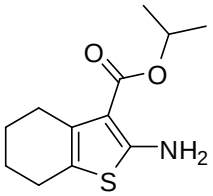
5.1.2.1 2-amino-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*1a*)



- Aspecto: Sólido cristalino amarelo intenso; MM: 225.08 g/mol; rendimento: 98%; PF: 134-135 ºC; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2).

- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, DMSO-d_6):δ= 1.21 (3H, *t*, *J*= 7.1 Hz); 1.58-1.68 (4H, *m*); 2.35-2.39 (2H, *m*); 2.53-2.57 (2H, *m*); 4.11 (2H, *q*, *J*= 7.3 Hz); 7.14 (1H, *sl*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, DMSO-d_6):δ= 14.18; 22.34; 22.76; 23.88; 26.49; 58.71; 103.16; 115.96; 131.50; 163.19; 165.32 (ver apêndice A).

5.1.2.2 2-amino-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de propila (*1b*)



- Aspecto: Sólido amorfo amarelo pálido; MM: 239.10 g/mol; rendimento: 70%; PF: 67-68 ºC; R_f: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2).
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, DMSO-d_6): δ= 1.20 (6H, *d*, *J*= 6.0 Hz); 1.58-1.67 (4H, *m*); 2.34-2.39 (2H, *m*); 2.52-2.57 (2H, *m*); 4.96 (1H, *sep*, *J*=6.3 Hz); 7.12 (1H, *sl*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, DMSO-d_6): δ= 22.32; 22.83; 23.17; 24.30; 27.01; 66.43; 103.43; 116.43; 116.16; 131.85; 162.78; 165.21 (ver apêndice B).

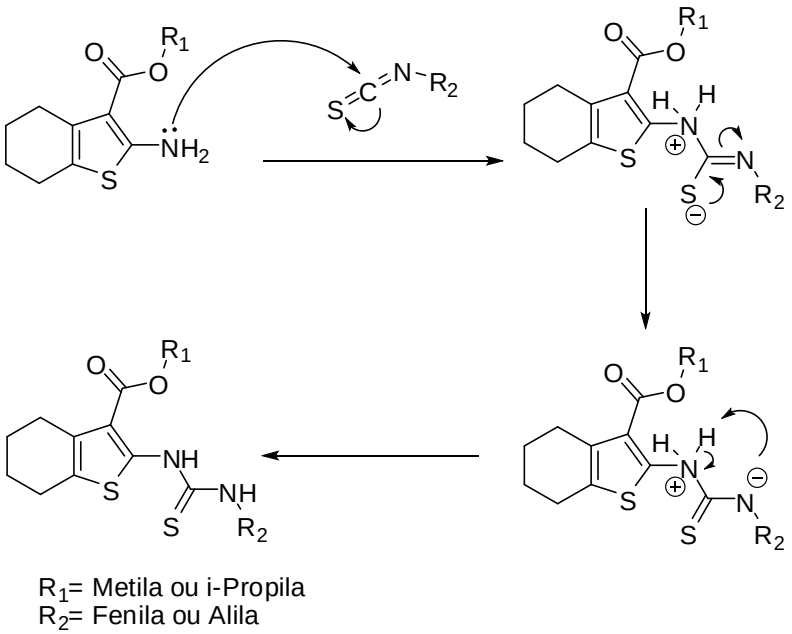
5.2 Compostos 2-tioureicotiofeno-3-carboxilatos (*2a-d)*

Com relação a esta série, os compostos ***2a*** e ***2c*** foram obtidos facilmente, pois não ocorreram problemas envolvendo as etapas reacionais e/ou de purificação, como descrito na literatura. Porém, os compostos ***2b*** e ***2d*** foram obtidos em baixos rendimentos, entre 15 e 20%, provavelmente, relacionados às tentativas de purificação pelo método de recristalização. Diante desse fato, optou-se por realizar a recristalização destes em $CHCl_3$:MeOH, rendendo os produtos de modo satisfatório.

5.2.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *2a-d.*

O mecanismo é considerado simples, onde ocorre um ataque nucleofílico da amina ao carbono *sp* do derivado isotiocianato. Em seguida, o enxofre sp^2 se comporta como uma carbonila, restabelecendo a ligação dupla, e fazendo com que a carga se desloque para o nitrogênio vizinho que, por sua vez, abstrai o próton intramolecular do nitrogênio vizinho, estabilizando a molécula final (Esquema 6) (MADDANI & PRABHU, 2010).

Esquema 6 - Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos da série *2a-d.*

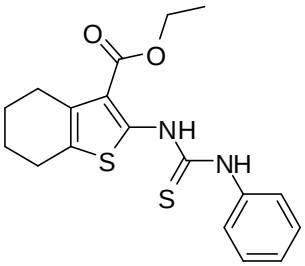


Fonte: Autor, 2015.

5.2.2 Caracterização por RMN de ^{1}H e ^{13}C

Foi verificada a formação dos compostos ***2a-d*** pelos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, sinais característicos, como os sinais referentes aos hidrogênios dos nitrogênios da tioureia (R_2NH) em torno de δ 6.9 ppm e δ 12.0 ppm, respectivamente. Na análise de RMN de ^{13}C é característica do sinal do carbono da tiocarbonila em torno de δ 170.0 ppm, além da quantidade exata de carbonos contidos na molécula.

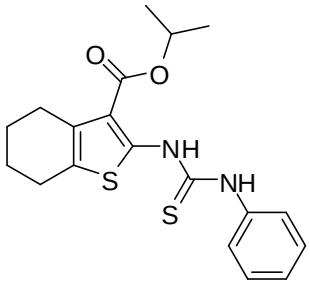
5.2.2.1 2-(3-feniltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*2a*)



- Aspecto: Sólido amorfo branco; MM: 360.10 g/mol; rendimento: 98%; PF: 199-200 ºC; cLogP:4.73; R_f: 0.50 (Hex/AcEOt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$):1.25 (3H, *t*, *J*= 7.5 Hz); 1.73-1.81 (4H, *m*); 2.62-2.66 (2H, *m*); 2.71-2.74 (2H, *m*); 4.13 (2H, *q*, *J*= 7.9 Hz); 7.33-7.39 (2H, *m*); 7.46-7.50 (3H, *m*); 7.98 (1H, *sl*); 12.17 (1H, *sl*).

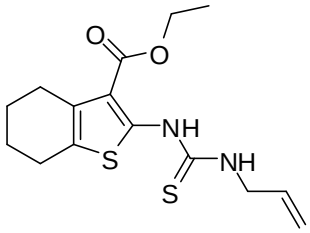
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): 14.24; 22.91; 23.00; 24.37; 26.36; 60.426; 113.36; 125.63; 135.89; 149.81; 166. 33; 176. 22 (ver apêndice C).

5.2.2.2 2-(3-feniltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de isopropila (*2b*)



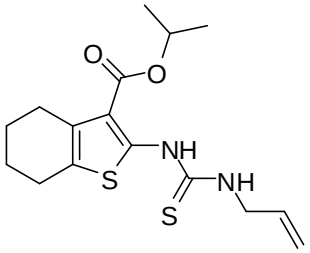
- Aspecto: Sólido amorfo marrom pálido; MM: 374.11 g/mol; rendimento: 60%; PF: 194-195 ºC; cLogP: 5.09; R_f: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^1H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): 1.24 (6H, *d*, *J*= 5.7 Hz); 1.74-1.80 (4H, *m*); 2.62-2.66 (2H, *m*); 2.70-2.74 (2H, *m*); 5.01 (1H, *sep*, *J*= 6.1; 7.45-7.49 (2H, *m*); 7.33-7-37 (3H, *m*); 7.93 (1H, *sl*); 12.30 (1H, *sl*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 21.96; 22.95; 23.01; 24.38; 26.48; 68.14; 125.55; 126.86; 127.66; 129.97; 130.82; 135.95; 149.80; 166.14; 176.23; 113.45 (ver apêndice D).

5.2.2.3 2-(3-aliltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*2c*)



- Aspecto: Sólido amorfo marrom pálido; MM: 324.10 g/mol; rendimento: 67%; PF: 173-174 ºC; cLogP: 3.7; R_f: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2).
- RMN ^1H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ=1.38 (3H, *t*, *J*= 7.0 Hz); 1.74-1.82 (2H, *m*);2.62-2.65 (2H, *m*);2.74-2.78 (2H, *m*);4.13-4.14 (2H, *m*); 4.32 (2H, *q*, *J*= 7.2 Hz); 5.26-5.36 (2H, *m*); 5.91-5.92 (1H, *m*); 6.34 (1H, *sl*); 12.15 (1H, *sl*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 14.32; 22.93; 26.41; 46.70; 60.69; 112.06; 118.40; 126.37; 130.56; 131.90; 151.10; 167.53; 177.16 (ver apêndice E).

5.2.2.4 2-(3-aliltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de isopropila (*2d*)



- Aspecto: Sólido amorfo marrom pálido; MM: 338,11 g/mol; rendimento: 80%; PF: 140-141 ºC;cLogP: 4.06; R_f: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2).
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.35 (6H, *t*, *J*= 6.2 Hz); 1.75-1.81 (4H, *m*); 2.61-2.65 (2H, *m*); 2.73-2.77 (2H, *m*); 4.14-4.15 (2H, *m*); 5.34-5.35 (1H, *m*); 5.19-5.26 (2H, *m*); 5.92 (1H, *sep*, *J*= 9.5 Hz); 6.29 (1H, *sl*); 12.19 (1H, *sl*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 22.07; 22.96; 23.01; 24.36; 26.52; 46.71; 68.40; 118. 41; 126.35; 130.60; 150.91; 167.07 (ver apêndice F).

5.3 Compostos tiofeno-2-iminotiazolidinona-3-carboxilatos

Foram obtidos 20 compostos pertencentes a esta classe, divididos em cinco séries, sendo todos estes inéditos na literatura.

5.3.1 Série *3a-d.*

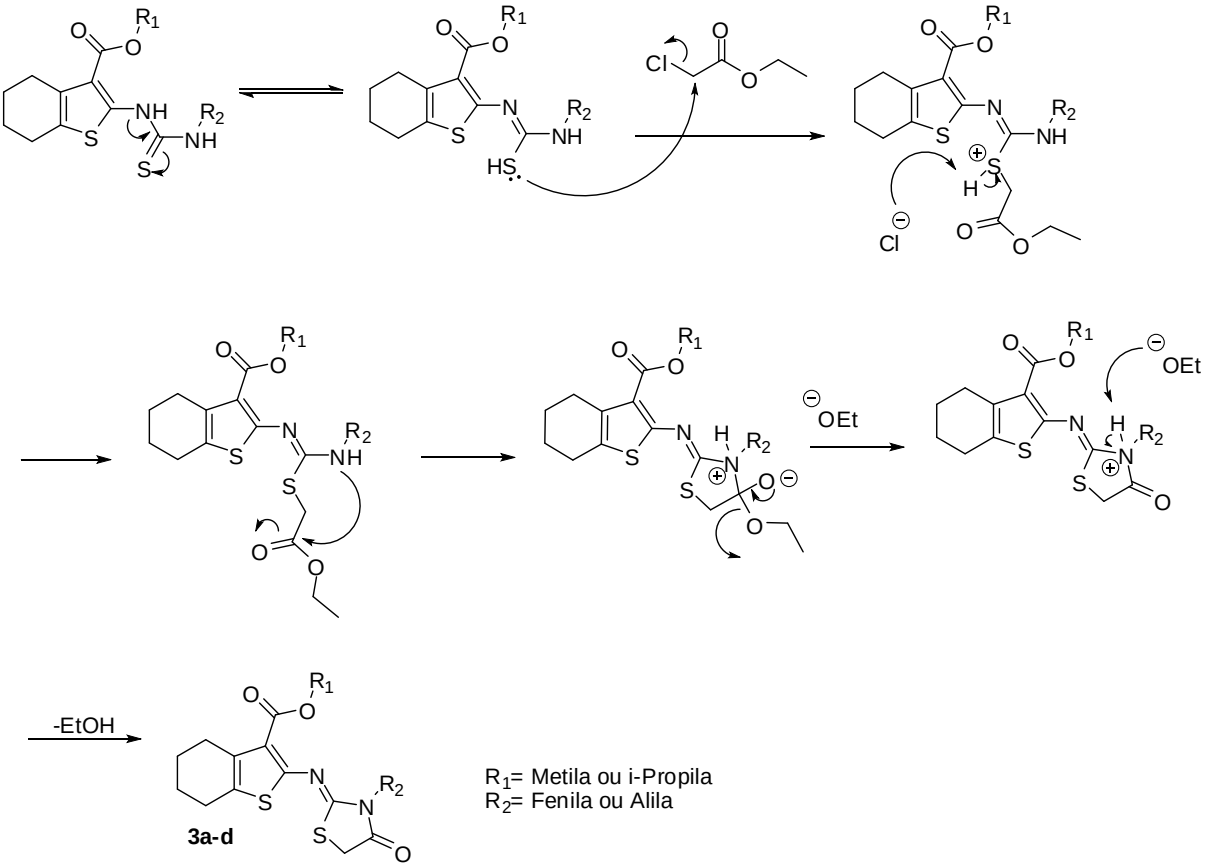
Inicialmente, esta série foi obtida em baixos rendimentos (cerca de 10% a 20%), decorrentes de problemas relacionados à solubilidade e às etapas de purificação. Porém, foi almejado rendimentos maiores e, para tanto optou-se por substituir o solvente utilizado no processo. Assim sendo, o EtOH, anteriormente utilizado como solvente, foi substituído por tolueno, porém todos os outros parâmetros reacionais foram mantidos. Por fim, os rendimentos obtidos foram satisfatórios.

5.3.1.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *3a-d.*

Inicialmente, ocorre a formação de um equilíbrio tautomérico na região da tioureia. Em seguida, ocorre o ataque da tiocarbonila ao agente ciclizante (nesse caso, 2-cloroacetato de etila), via *S*-alquilação. Posteriormente, ocorre o ataque intramolecular do par de elétrons

da amina (R_2NH) à carbonila da função éster, seguido pela saída de etanol, conduzindo à formação do anel tiazolidinona, não substituído na posição 5 (Esquema 7) (AQUINO, 2007).

Esquema 7 – Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *3a-d.*

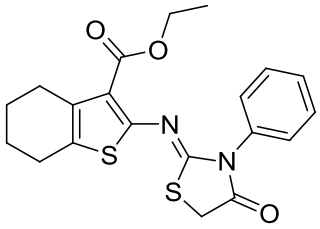


Fonte: Autor, 2015.

5.3.1.2 Caracterização da série *3a-d* por RMN de ^{1}H e ^{13}C

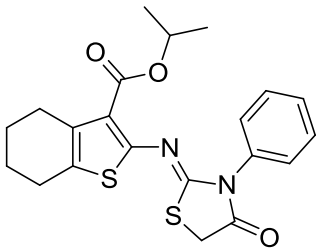
Foi verificada a formação dos compostos ***3a-d*** por espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, sinais característicos, como os sinais referentes ao par de hidrogênios do anel tiazolidinona em torno de δ 3.8 ppm. Na análise de RMN de ^{13}C é característica do sinal do carbono carbonílico do anel tiazolidinona em torno de δ 166.0.

5.3.1.2.1 2-(4-oxo-3-feniltiazolidin-2-ilidenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*3a*)



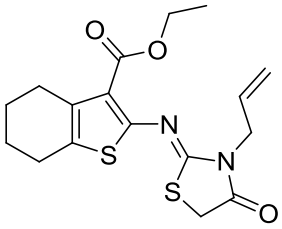
- Aspecto: Sólido amorfo branco; rendimento: 95%; MM: 400.09 g/mol; PF: 195-196 ºC; cLogP: 4.10; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.30 (3H, *t*, *J*= 7.2 Hz); 1.77-1.92 (4H, *m*); 2.73-2.77 (2H, *m*); 2.91-2.95 (2H, *m*); 3.83 (2H, *s*); 4.21 (2H, *q*, *J*= 7.1 Hz); 7.31-7.34 (2H, *m*); 7.52-7.56 (3H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 14.13; 22.18; 23.21; 25.13; 25.28; 35.02; 62.01; 129.00; 129.29; 129.97; 130.23; 130.57 (ver apêndice G).

5.3.1.2.2 2-(4-oxo-3-feniltiazolidin-2-ilidenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de isopropila (*3b*)



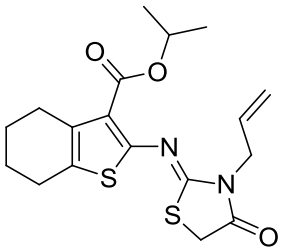
- Aspecto: Óleo amarelo escuro; MM: 414.11 g/mol; rendimento: 60%; cLogP: 4.46; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.20 (6H, *d*, *J*= 6.0 Hz); 1.80-1.89 (4H, *m*); 2.60-2.76 (2H, *m*); 2.68-293 (2H, *m*); 3.84 (2H, *s*); 5.85 (1H, *sep*, *J*= 6.2 Hz); 7.30-7.35 (2H, *m*); 7.50-7.56 (3H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 14.08; 22.00; 24.74; 34.19; 61.61; 128.95; 129.56; 130.48; 132.00; 135.35; 155.16; 158.51; 162.17; 168.26 (ver apêndice H)

5.3.1.2.3 2-(4-oxo-3-aliltiazolidin-2-ilidenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*3c*)



- Aspecto: Sólido amarelo intenso; MM: 364.09 g/mol; rendimento: 68%; PF: 94-95 ºC; cLogP: 3.28; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$):δ= 1.21 (3H, *t*, *J*= 7.2 Hz); 1.70-1.79 (4H, *m*); 2.54-2.60 (2H, *m*); 2.66-2.72 (2H, *m*); 3.82 (2H, *s*); 4.17 (2H, *q*, *J*= 7.1 Hz); 4.35-4.37 (2H, *m*); 5.12-5.16 (2H*m*); 5.28-5.30 (1H, *m*)
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$):δ= 14.48; 22.23; 22.56; 23.06; 25.01; 25.11; 25.48; 26.23; 33.42; 45.52; 45.53; 50.71; 60.19; 119.16; 129.56; 130.69; 134.56 (ver apêndice I).

5.3.1.2.4 2-(4-oxo-3-aliltiazolidin-2-ilidenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de isopropila (*3d*)



- Aspecto: Sólido amarelo intenso; MM: 378,11 g/mol; rendimento: 55%; PF: 133-134 ºC; cLogP: 3.64; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ=1.28 (6H, *d*, *J*= 7.6 Hz); 1.67-1.72 (4H, *m*); 2.53-2.58 (2H, *m*); 2.66-2.69 (2H, *m*); 4.06 (2H, *s*); 5.08-5.10 (2H, *m*); 5.11-5.19 (2H, *m*); 5.20-5.32 (1H, *m*)
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 21.97; 22.16; 22.92; 24.36; 26.51; 46.62; 68.43; 118.48; 130.70; 166.99 (ver apêndice J).

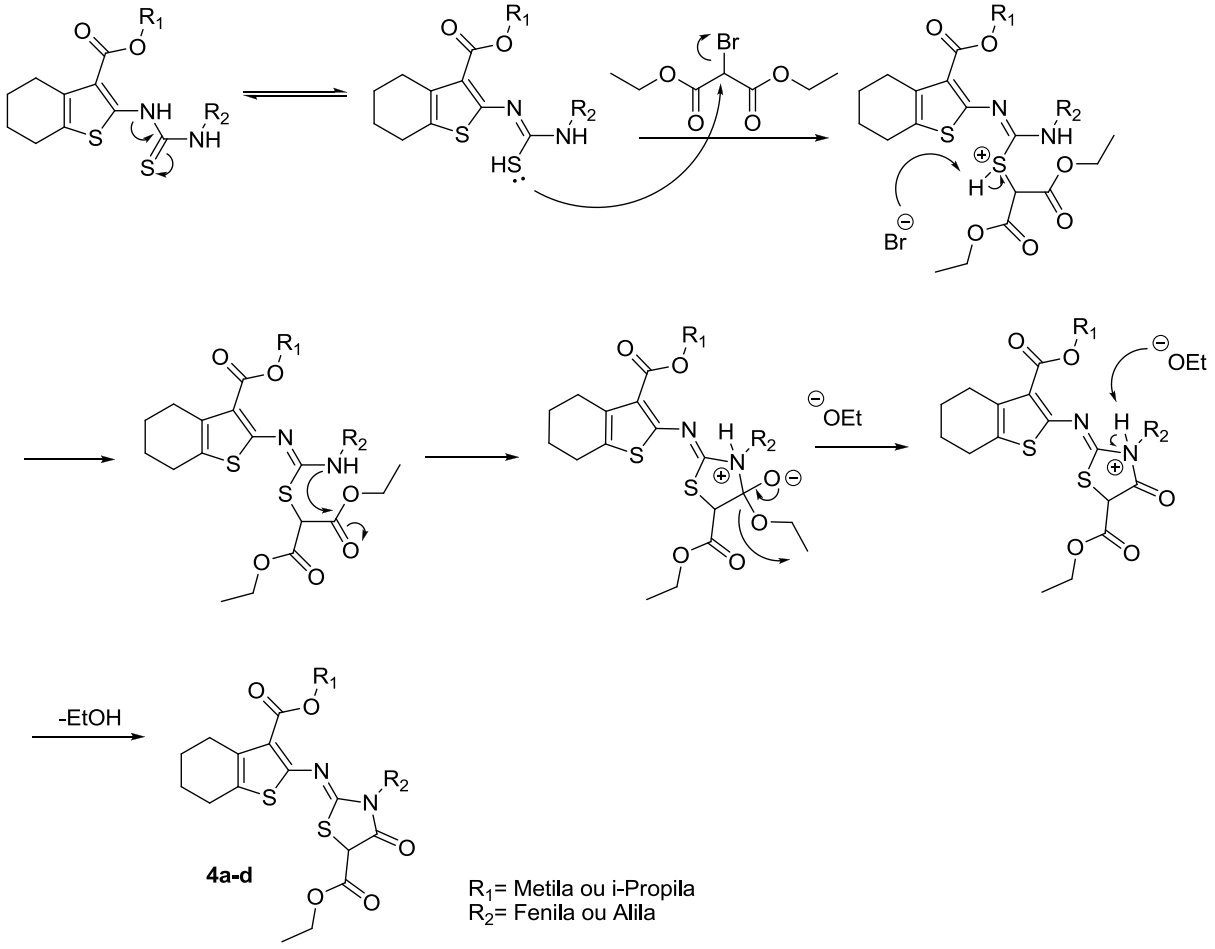
5.3.2 Série *4a-d*

Os compostos contidos nesta série foram obtidos sem interferentes envolvendo as etapas sintéticas e/ou de purificação, não necessitando de otimização dos parâmetros reacionais.

5.3.2.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *4a-d*.

Após a ocorrência do tautomerismo na região da tiocarbonila, o par de elétrons do enxofre ataca o agente ciclizante, 2-bromomalonato. Em seguida, o íon bromônio abstrai o próton do átomo de enxofre carregado, estabilizando-o. Posteriormente, o par de elétrons da amina (R_2NH) ataca a carbonila do éster etílico, fechando o anel de cinco membros. Por fim, a carga negativa do oxigênio restabelece a carbonila, causando a saída de uma molécula de etanol, estabilizando a estrutura final (Esquema 7) (SMITH & MARCH, 2001; CAREY & SYNDBERG, 2007; AQUINO, 2007).

Esquema 7 – Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos da série *4a-d*

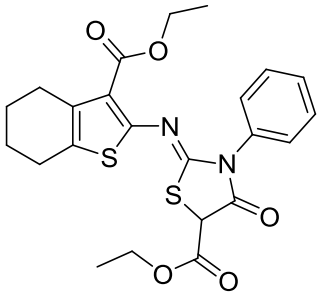


Fonte: Autor, 2015.

5.3.2.2 Caracterização da série *4a-d* por RMN de ^{1}H e ^{13}C

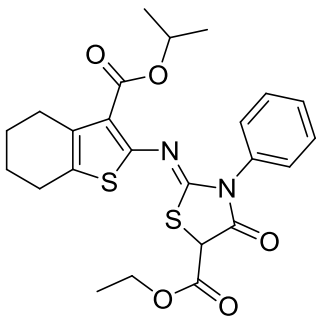
Foi verificada a formação dos compostos ***4a-d*** por espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, sinais característicos, como os sinais referentes ao hidrogênio do carbono quiral do anel tiazolidinona em torno de δ 4.41 ppm, bem como os sinais sobrepostos das metilas (RCH_3) e metilenos (R_2CH_2). Na análise de RMN de ^{13}C é característica do sinal do carbono carbonílico do anel tiazolidinona em torno de δ 160.0 ppm.

5.3.2.2.1 2-((3-etoxicarbonila)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-feniltiazolidina-5-carboxilato de etila (*4a*)



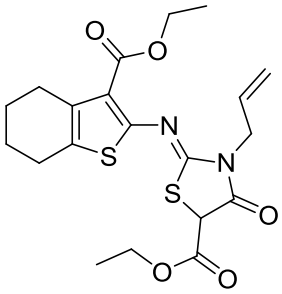
- Aspecto: Óleo verde escuro; MM: 472.11 g/mol; rendimento: 60%; cLogP: 3.64; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.48 (6H, *t*, *J*= 7.5 Hz); 1.75-1.82 (4H, *m*); 2.53-2.63 (2H, *m*); 2.67-2.75 (2H, *m*); 4.32 (2H, *q*, *J*= 7.2 Hz); 4.41 (1H, *s*); 4.43 (2H, *q*, *J*= 7.2 Hz); 7.3-7.37 (5H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 14.35; 14.59; 23.05; 29.01; 60.14; 61.36; 117.39; 121.36; 122.47; 124.24; 125.57; 128.34 (ver apêndice K).

5.3.2.2.2 2-((3-etoxicarbonila)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-feniltiazolidina-5-carboxilato de isopropila (*4b*)



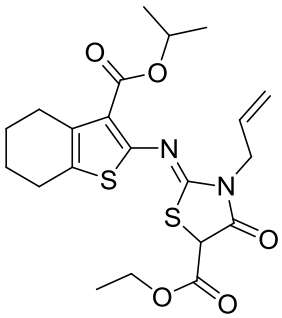
- Aspecto: Óleo verde escuro; MM: 486.13 g/mol; rendimento: 70%; cLogP: 4.33; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2).
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.16 (6H, *d*, *J*= 6.1 Hz); 1.33 (3H, *t*, *J*= 6.1 Hz);1.74-1.8 (4H, *m*); 2.60-2.65 (2H, *m*); 2.67-2.76 (2H, *m*); 4.30 (1H, *s*); 4.31 (2H, *q*, *J*= 6.9 Hz); 5.04 (1H, *sep*, *J*= 6.1 Hz); 7.30-7.35 (2H, *m*); 7.51-7.56 (3H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 14.38; 14.49; 21.96; 22.79; 23.18; 24.77; 25.09; 26.27; 61.10; 67.08; 127.57; 128.79; 129.48; 129.86; 134.03; 146.50; 161.86; 163.69 (ver apêndice L).

5.3.2.2.3 2-((3-etoxicarbonila)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-aliltiazo-lidina-5-carboxilato de etila (*4c*)



- Aspecto: Sólido amorfo alaranjado; MM: 436.11 g/mol; rendimento: 40%; cLogP: 4.69; PF: 60-61 ºC; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ¹H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ=1.24 (6H, *t*, *J*= 7.5 Hz); 1.75-1.87 (4H, *m*); 2.64-2.72 (2H, *m*); 2.86-2.93 (2H, *m*); 3.34-3.36 (2H, *m*); 3.48 (4H, *q*, *J*= 6.3 Hz); 4.25-4.75 (2H, *m*); 4.69-4.75 (1H, *m*).
- RMN ¹³C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 21.69; 23.22; 25.05; 32.97; 38.46; 54.60; 121.95; 123.77; 126.21; 130.78; 130.78; 132.61; 156.99; 163.69; 173.14 (ver apêndice M).

5.3.2.2.4 2-((3-etoxicarbonila)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-aliltiazo-lidina-5-carboxilato de isopropila (*4d*)



- Aspecto: Óleo marrom escuro; MM: 450.13 g/mol; rendimento: 75%; cLogP: 3.51; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ¹H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.18 (6H, *d*, *J*= 7.0 Hz); 1.24 (3H, *t*, *J*= 7.0 Hz);1.75-1.81 (4H, *m*); 2.59-268 (2H, *m*); 2.83-2.93 (2H, *m*); 3.35-3.36 (2H, *m*); 3.48 (2H, *q*, *J*= 6.6 Hz); 4.02 (1H, *sep*, *J*= 6.6 Hz);4.25-4.33 (3H, *m*).
- RMN ¹³C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 12.06; 14.08; 26.27; 29.31; 37.23; 46.68; 47.90; 60.70; 61.31; 118. 29; 118.59; 131.09; 145.71; 153.94 (ver apêndice N).

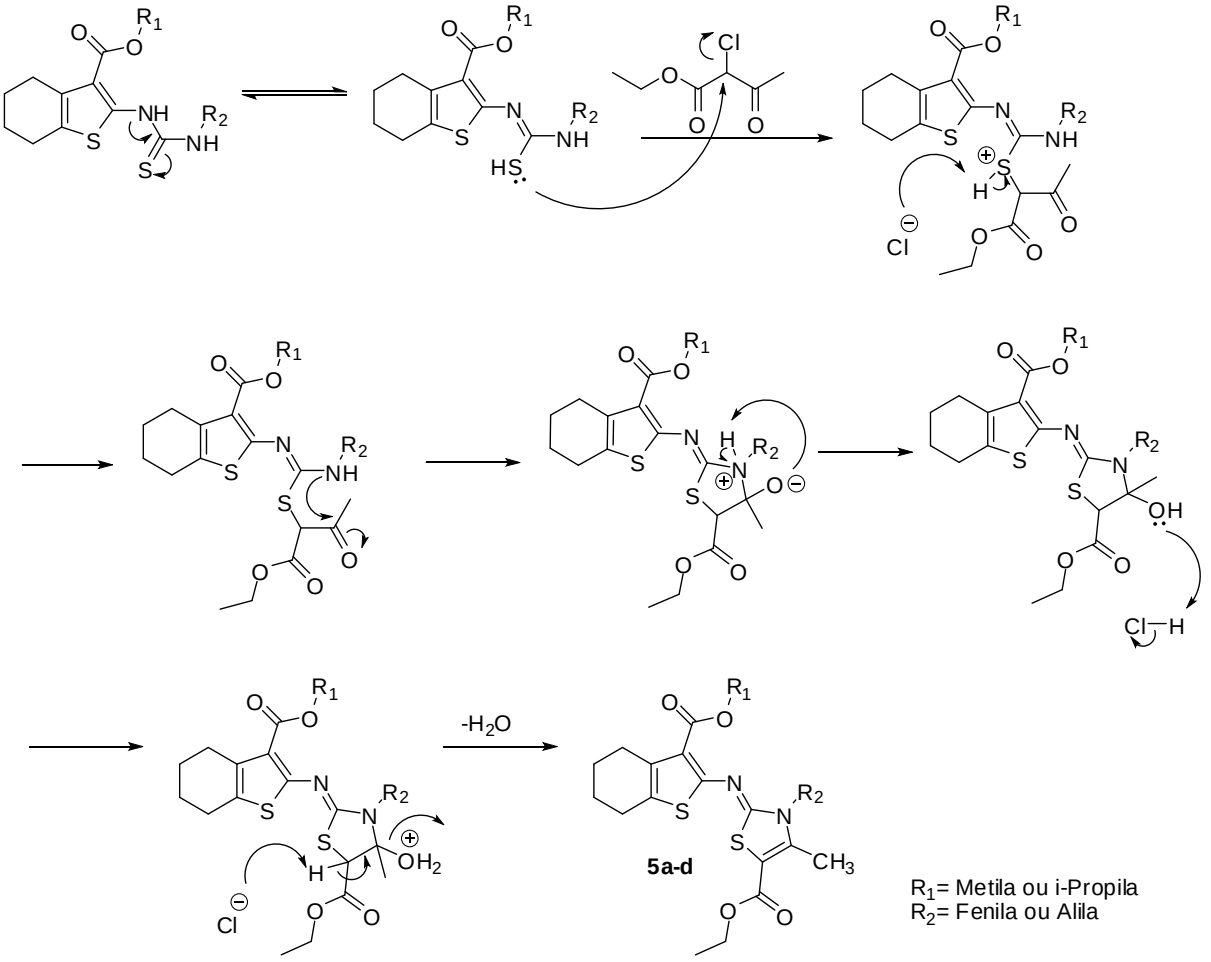
5.3.3 Série *5a-d*

Os compostos contidos nesta série foram prontamente obtidos sem maiores dificuldades que comprometessem os rendimentos finais.

5.3.3.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *5a-d*

Após a ocorrência do tautomerismo inicial, o enxofre ataca o agente ciclizante, 2-cloroacetoacetato de etila, causando a saída do átomo de cloro. Em seguida, o íon cloreto abstrai o próton do enxofre carregado, estabilizando-o. Posteriormente, ocorre o ataque o par de elétrons da amina (R_2NH) ao carbonila cetônica, fechando o anel de cinco membros. Logo após, o oxigênio carregado negativamente faz uma captura intramolecular de um hidrogênio vizinho. A espécie ácida formada doa seu hidrogênio à hidroxila formada. Por fim, o íon cloreto favorece uma reação de β-eliminação ao abstrair um hidrogênio, consequentemente, liberando uma molécula de água, estabilizando o anel tiazolidínico (Esquema 8) (SMITH & MARCH, 2001; CAREY & SYNDBERG, 2007; AQUINO, 2007).

Esquema 8 – Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos da série *5a-d*

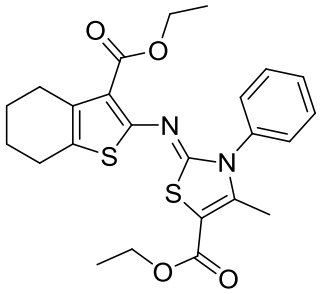


Fonte: Autor, 2015.

5.3.3.2 Caracterização da série *5a-d* por RMN de ^{1}H e ^{13}C

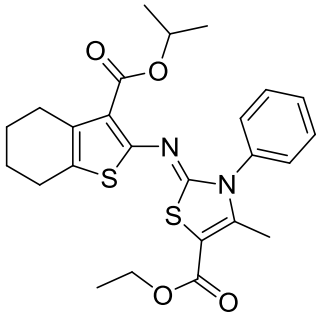
Foi verificada a formação dos compostos ***5a-d*** por espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, sinais característicos, como os sinais referentes aos hidrogênios da metila do anel tiazolidínico em torno de δ 2.5 ppm, bem como os sinais sobrepostos das metilas (RCH_3) e metilenos (R_2CH_2). Na análise de RMN de ^{13}C é característica do sinal do carbono carbonílico do anel tiazolidinona em torno de δ 166.0 ppm.

5.3.3.2.1 2-(3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-metil-3-feniltiazolidina-5-carboxilato de etila (*5a*)



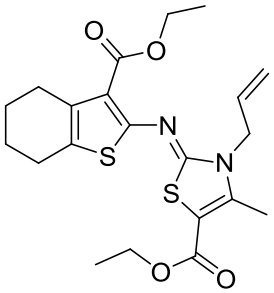
- Aspecto: Sólido amorfo alaranjado escuro; MM: 470.13 g/mol; rendimento: 60%;cLogP: 3.87; PF: 130-131 ºC; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ¹H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.30 (6H, *t*, *J*= 7.5 Hz); 1.8-1.89 (4H, *m*); 2.58 (3H, *s*),2.69-2.78 (2H, *m*); 2.88-2.95 (2H, *m*); 4.25 (4H, *q*, *J*= 6.6 Hz); 7.30-7.35 (2H, *m*); 7.50-7.56 (3H, *m*).
- RMN ¹³C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 14.09; 22.20; 22.97; 25.10; 25.41; 54.03; 62.94; 119.93; 129.33; 130.05; 130.47; 131.73; 132.45; 135.15; 158.52; 165.63 (ver apêndice O).

5.3.3.2.22-(3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-metil-3-feniltiazo lidina-5-carboxilato de isopropila (*5b*)



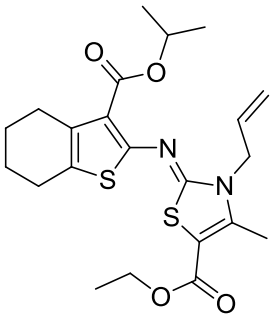
- Aspecto: Sólido amorfo alaranjado escuro; MM: 484.15 g/mol; rendimento: 45%; cLogP: 4.59; PF: 69-70 ºC; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ¹H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.23 (3H, *t*, *J*= 7.5 Hz); 1.33 (6H, *d*, *J*= 7.5 Hz); 1.48-1.78 (4H, *m*); 2.58 (3H, *s*); 2.69-2.78 (2H, *m*); 2.88-2.95 (2H, *m*); 4.14 (2H, *q*, *J*= 6.3 Hz); 5.13 (1H, *sep*, *J*= 6.6 Hz); 7.28-7.35 (2H, *m*); 7.51-7.55 (3H, *m*)
- RMN ¹³C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 14.38; 22.61; 41.50; 42.42; 81.61; 87.71; 121.64; 122.86; 125.86; 125.60; 129.26; 137.79 (ver apêndice P).

5.3.3.2.32-(3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-metil-3-aliltiazo lidina-5-carboxilato de etila (*5c*)



- Aspecto: Sólido amorfo alaranjado claro; MM: 434.13 g/mol; rendimento: 47%; cLogP: 4.95; PF: 80-81 ºC; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.29 (6H, *t*, *J*= 6.8 Hz); 1.78-1.84 (4H, *m*); 2.66-2.71 (2H, *m*); 2.81-2.87 (2H, *m*); 2.62 (3H, *s*); 4.27 (4H, *q*, *J*= 6.4 Hz); 4.73-4.74 (2H, *m*); 5.91-6.00 (3H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 21.39; 23.22; 25.05; 39.06; 54.30; 121.95; 124.69; 125.60; 130.78; 132.30; 149.06; 149.06; 157.29; 163.69 (ver apêndice Q).

5.3.3.2.42-(3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-metil-3-aliltiazo lidina-5-carboxilato (*5d*)



- Aspecto: Óleo marrom escuro; MM: 448.15 g/mol; rendimento: 75%; cLogP: 3.77; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.29 (6H, *d*, *J*= 6.8 Hz); 1.33 (3H, *t*, *J*= 7.3 Hz); 1.78-1.84 (4H, *m*); 2.62 (3H, *s*);2.66-2.71 (2H, *m*); 2.81-2.87 (2H, *m*); 4.27 (2H, *q*, *J*= 6.4 Hz); 5.15-5.06 (2H, *m*); 5.25 (1H, *sep*, *J*= 6.6 Hz); 5.91-6.0 (3H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 12.919; 14.413; 22.161; 22.870; 23.263; 25.274; 26.390; 47.111; 60.99; 66.99; 102.26; 117.77; 117.84; 119.25; 127.24; 131.61; 134.15; 146.44; 154.16; 156.52; 162.02; 164.04 (ver apêndice R).

5.3.4 Série *6a-d*

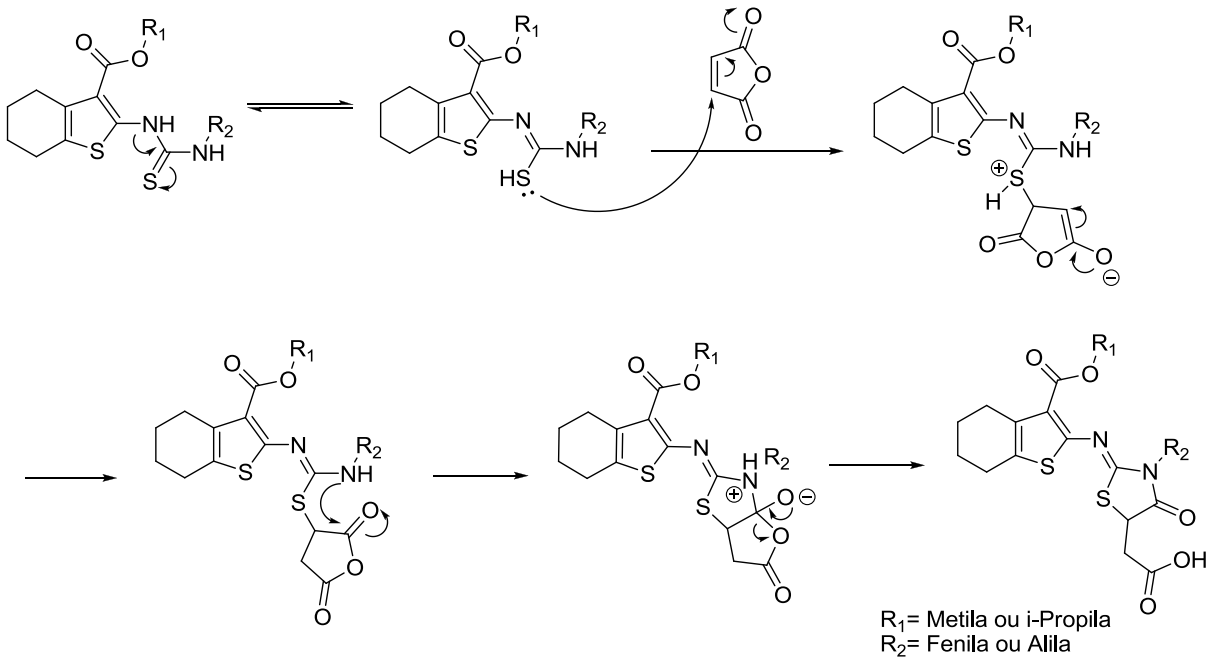
Na obtenção dos compostos contidos nesta série, apenas os compostos ***6b*** e ***6d*** apresentaram rendimentos baixos, em torno de 10 e 15%. Porém, optou-se por modificar a estequiometria das reações, passando de 1:2 para 1:6.5. Após a utilização do agente ciclizante em grande excesso, foram obtidos os compostos em rendimentos satisfatórios.

5.3.4.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *6a-d*.

A utilização do anidrido maleico como agente ciclizante pode gerar o mesmo produto por duas direções envolvendo um único mecanismo reacional. Em uma das direções, inicia-se com aminólise seguida de uma adição *tia-Michael*, enquanto, a outra pode ser desenvolvida na direção contrária (AQUINO, 2007).

Inicialmente, ocorre a formação de um equilíbrio tautomérico entre as formas da tioureia. Em seguida, o par de elétrons da tiocarbonila (R-SH) ataca o carbono *α,β*-insaturado do heterociclo do anidrido maleico, deslocando a dupla ligação, deixando a carbonila negativamente carregada, mas logo retornando, via efeito de ressonância. Logo após, ocorre o segundo ataque, o par de elétrons da amina (R_2NH) ataca a carbonila e, em seguida, ocorre uma protonação do enolato intermediário formado, seguida de uma aminólise, conduzindo à formação do anel 4-tiazolidinona com uma função ácida na posição 5 deste (SMITH & MARCH, 2001; CAREY & SUNDBERG, 2007; AQUINO, 2007) (Esquema 9).

Esquema 9 – Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *6a-d*.

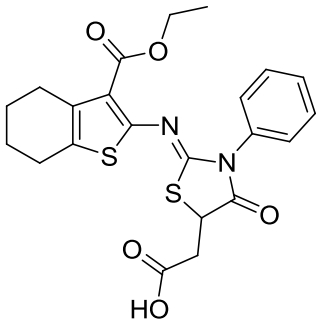


FONTE: Autor, 2015.

5.3.4.2 Caracterização da série *6a-d* por RMN de ^{1}H e ^{13}C

Foi verificada a formação dos compostos ***6a-d*** por espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, sinais característicos, como os sinais referentes aos hidrogênios do metileno do anel tiazolidinona em torno de δ 3.0 e 3.5 ppm, . Na análise de RMN de ^{13}C é característica do sinal do carbono carbonílico do anel tiazolidinona em torno de δ 166.0 ppm.

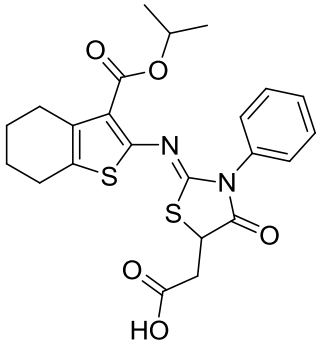
5.3.4.2.1 Ácido 2-(3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)4-oxo-3-fenil-tiazolidina-5-carboxílico (*6a*)



- Aspecto: Sólido amorfo vermelho escuro;MM:458.10 g/mol; rendimento: 80%; PF: 99-100 ºC; cLogP: 3.95; R_f: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2)

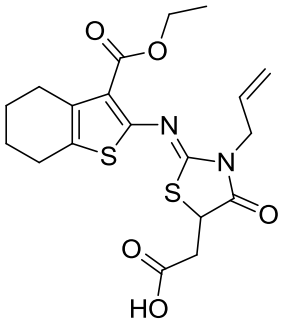
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.24 (3H, *t*, *J*= 7.4 Hz); 1.75-1.82 (4H, *m*); 2.62-2.65 (2H, *m*); 2.70-2.74 (2H, *m*); 3.00 (1H, *dd*, *J*= 4.5 Hz); 3.30 (1H, *dd*, *J*= 4.5 Hz); 4.17 (2H, *q*, *J*= 7.3 Hz); 4.50 (1H, *dd*, *J*= 4.5 Hz); 7.39-7.43 (3H, *m*); 7.50-7.53 (2H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 13.64; 21.26; 23.08; 35.85; 59.34; 127.00; 128.08; 128.30; 133.08; 152.00; 155.69; 168.87; 162.87; 171.78; 172.65 (ver apêndice S).

5.3.4.2.2 Ácido 2-(3-isopropoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-fenil-tiazolidina-5-carboxílico (*6b*)



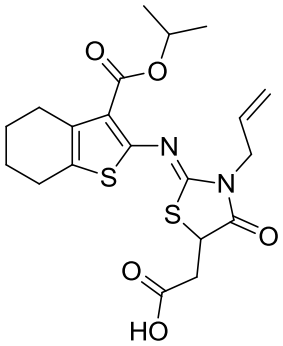
- Aspecto: Óleo alaranjado; MM: 472.11 g/mol; rendimento: 70%; cLogP: 4.31; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.15 (6H, *d*, *J*= 6.6 Hz); 1.65-1.74 (4H, *m*); 2.52-2.57 (2H, *m*); 2.61-2.65 (2H, *m*); 3.00-3.10 (1H, *dd*, *J*= 4.4 Hz); 3.27 (1H, *dd*, *J*= 4.5 Hz); 4.44 (1H, *dd*, *J*= 4.5 Hz); 5.01 (1H, *sep*, *J*= 6.2 Hz); 7.31-7.36 (3H, *m*); 7.39-7.43 (2H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 22.15; 22.76; 23.13; 25.05; 26.44; 37.65; 43.79; 67.61; 127.80; 129.02; 129.25; 134.19; 152.84; 157.12; 163.18; 173.81 (ver apêndice T).

5.3.4.2.3 Ácido 2-((3-etoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ila)metileno)-4-oxo-3-aliltiazolidina-5-carboxílico (*6c*)



- Aspecto: Óleo vermelho escuro; MM: 422.10 g/mol; rendimento: 86%; cLogP: 3.13; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.21 (3H, *t*, *J*= *7.2*Hz); 1.68-1.75 (4H, *m*); 2.56-2.61 (2H, *m*); 2.65-2.68 (2H, *m*); 2.80 (1H, *dd*, *J*= 4.5 Hz); 3.26 (1H, *d*, *J*= 7.4 Hz); 4.17 (2H, *q*, *J*= 6.9 Hz); 4.32-4.38 (2H, *m*); 5.21 (2H, *dd*, *J*= 4.5 Hz); 5.83-5.85 (1H, *m*); 8.35 (1H, *sl*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 22.64; 23.02; 25.03; 26.16; 37.55; 43.99; 45.59; 60.21; 119.11; 120.22; 129.71; 130.41; 134.48; 151.83; 154.89; 163.79; 172.65; 174.85 (ver apêndice U).

5.3.4.2.4 Ácido 2-(3-isopropoxicarbonila-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilaimino)-4-oxo-3-aliltiazolidina-5-carboxílico (*6d*)



- Aspecto: Sólido amorfo alaranjado; MM: 436.11 g/mol; rendimento: 90%; PF: 139-140 ºC; cLogP: 3.49; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.28 (6, *d*, *J*= 5.6 Hz); 1.76-1.84 (4H, *m*); 2.64-2.68 (2H, *m*); 2.72-2.76 (2H, *m*); 2.87 (1H, *dd*, *J*= 4.5 Hz); 3.34 (1H, *dd*, *J*= 4.5 Hz); 4.43 (1H, *dd*, *J*= 4.5 Hz); 5.21-5.24 (1H, *m*); 5.94 (1H, *sep*, *J*= 8.0 Hz).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 22.20; 22.68; 23.11; 25.05; 26.30; 37.66; 44.13; 45.64; 67.55; 119.24; 120.60; 129.73; 130.49; 134.31; 151.93; 163.32; 172.69; 174.32; 211.52 (ver apêndice V).

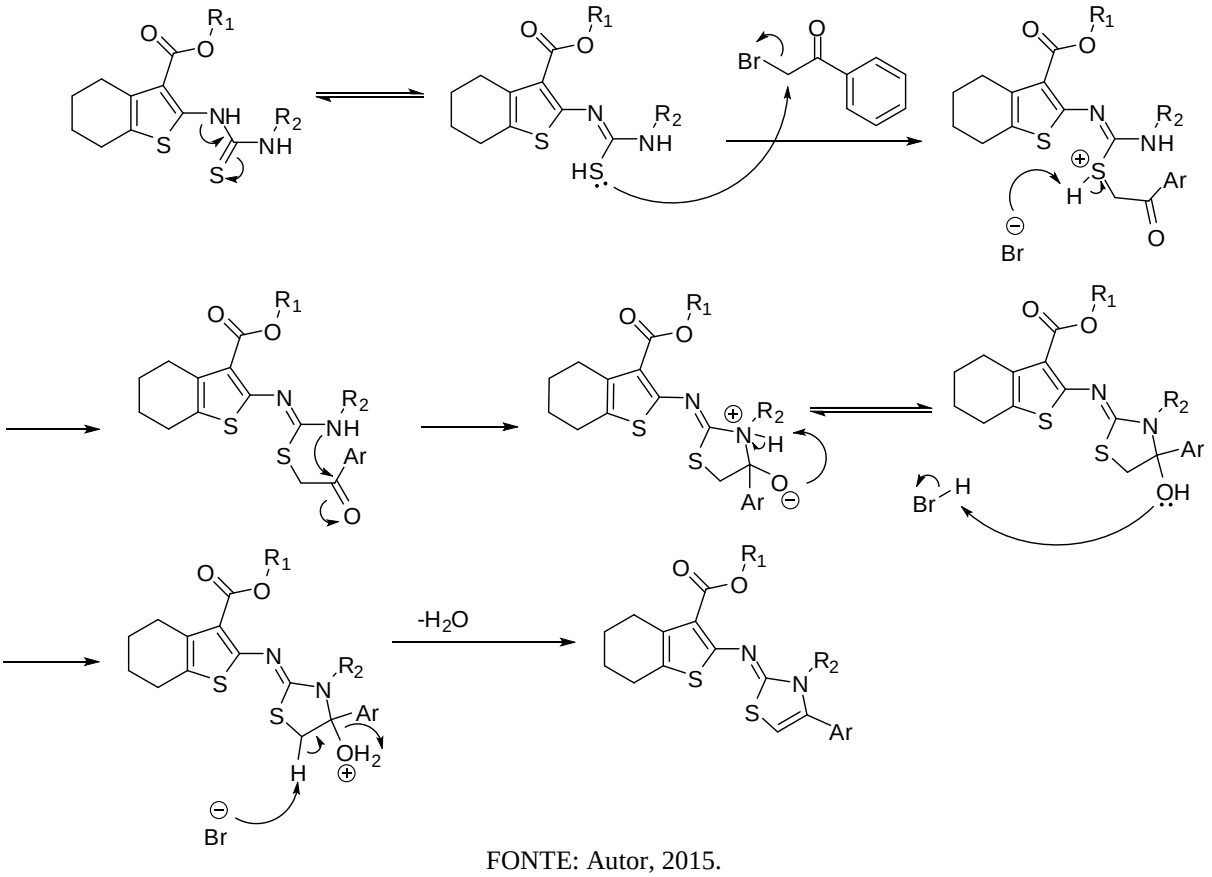
5.3.5 Série *7a-d*

Todos os compostos desta série foram obtidos sem interferências envolvendo as etapas reacionais e/ou de purificação.

5.3.5.1 Mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos *7a-d.*

Inicialmente, ocorre a formação de um equilíbrio tautomérico entre as formas da tioureia. Em seguida, o par de elétrons da tiocarbonila ataca o carbono α-halogenado da bromoacetofenona, provocando a saída do grupo abandonador, posteriormente o íon bromônio abstrai o próton da tiocarbonila, estabilizando-a. Em seguida, ocorre o ataque intramolecular do par de elétrons livre da amina à carbonila. Logo após, a o oxigênio, carregado negativamente, abstrai o próton do nitrogênio positivamente carregado, estabilizando a estrutura formada. Por fim, a espécie ácida formada protona a hidroxila do anel formado, o que favorece uma β-eliminação, através de uma desidratação, e gera o anel substituído com um anel aromático na posição 4 (Esquema 10) (SMITH & MARCH, 2001; CAREY & SUNDBERG, 2007; VARA *et al.*, 2008).

Esquema 10 - Mecanismo reacional para a formação dos compostos *7a-d*.

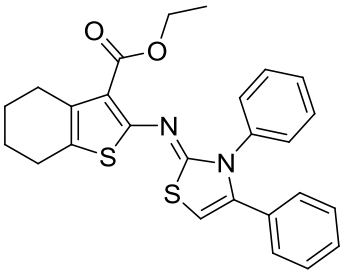


FONTE: Autor, 2015.

5.3.5.2 Caracterização da série *7a-d* por RMN de ^{1}H e ^{13}C

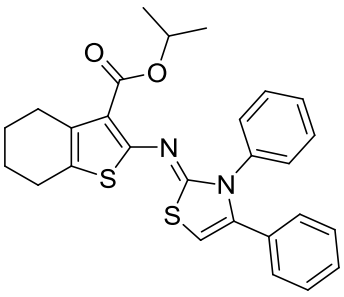
Foi verificada a formação dos compostos ***7a-d*** por espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, sinais característicos, como os sinais referentes ao hidrogênio do anel tiazolidínico e dos aromáticos em torno de δ 6.0 ppm e δ 7.0-7.5 ppm, respectivamente. Na análise de RMN de ^{13}C é característica do sinal do carbono sp^2 do anel tiazolidinona em torno de δ 152.0ppm.

5.3.5.2.1 2-(3,4-difeniltiazol-2(3*H*)-iladimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-car-boxilato de etila (*7a*)



- Aspecto: Sólido amorfo amarelo pálido; MM: 460.13 g/mol; rendimento: 85%; PF: 120-121 ºC; cLogP: 6.73; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ=1.16 (3H, *t*, *J*= 7.6 Hz); 1.76-1.83 (4H, *m*); 2.59-2.66 (2H, *m*); 2.72-2.78 (2H, *m*); 4.14 (2H, *q*, *J*= 6.2 Hz); 6.19 (1H, *s*); 7.06-7.13 (3H, *m*); 7.32-7.35 (4H, *m*); 7.21-7.29 (3H, *m*)
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 14.37; 22.84; 23.24; 23.43; 25.20; 26.28; 59.68; 99.04; 126.58; 127.75; 128.32; 128.38; 128.57; 128.79; 128.88 (ver apêndice W).

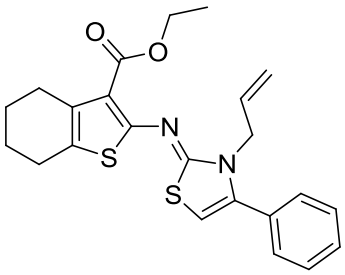
5.3.5.2.2 2-((3,4-difeniltiazol-2(3*H*)-ilaimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-car-boxilato de isopropila (*7b*)



- Aspecto: Óleo verde escuro; MM: 474.14 g/mol; rendimento: 60%; cLogP: 7.09; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)

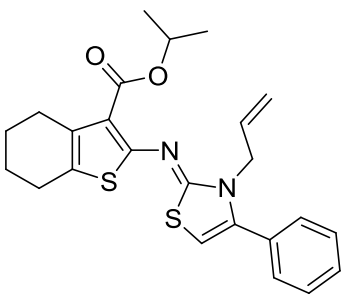
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.19 (6H, *d*, *J*= 7.6 Hz); 1.75-1.82 (4H, *m*); 2.59-2.66 (2H, *m*); 2.72-2.78 (2H, *m*); 5.11 (1H, *sep*, *J*= 6.7 Hz); 6.16 (1H, *s*); 7.06-7.13 (2H, *m*); 7.29-7.35 (8H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 22.03; 22.88; 23.24; 25.08; 26.35; 29.76; 66.87; 99.09; 117.83; 126.56; 127.69; 128.52; 128.78; 131.33; 134.11; 137.36; 139.88; 157.53; 161.48; 163.86 (ver apêndice X).

5.3.5.2.3 2-(3-alil-4-feniltiazol-2(3*H*)-iladenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (*7c*)



- Aspecto: Óleo verde escuro; MM: 424.13 g/mol; rendimento: 48%; cLogP: 5.91; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)
- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.22 (6H, *d*, *J*= 7.6 Hz); 1.76-1.87 (4H, *m*); 2.67-2.71 (2H, *m*); 2.75-2.79 (2H, *m*); 4.16 (2H, *q*, *J*= 6.7 Hz); 4.52-4.53 (2H, *m*); 5.16-5.17 (2H, *m*); 5.95-5.96 (1H, *m*); 6.05 (1H, *s*); 7.36-7.39 (2H, *m*); 7.42-7.48 (3H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 22.31; 24.44; 25.96; 45.77; 60.09; 107.62; 110.06; 126.68; 128.14; 128.31; 129.56; 134.13; 151.50; 154.85; 163.38; 172.83; 172.83; 174.66 (ver apêndice Y).

5.3.5.2.4 2-(3-alil-4-feniltiazol-2(3*H*)-iladenoimino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de isopropila (*7d*)



- Aspecto: Óleo verde escuro; MM: 438.14 g/mol; rendimento: 45%; cLogP: 6.27; R_f: 0.50 (Hex/AcOEt 8:2)

- RMN ^{1}H (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 1.29 (6H, *d*, *J*= 6.0 Hz); 1.78-1.85 (4H, *m*); 2.67-2.71 (2H, *m*); 2.76-2.79 (2H, *m*); 4.51-4.54 (2H, *m*); 4.95-5.00 (2H, *m*); 5.19 (1H, *sep*, *J*= 6.1 Hz); 5.92-6.01 (1H, *m*); 6.05 (1H, *s*); 7.38-7.41 (2H, *m*); 7.43-4.46 (3H, *m*).
- RMN ^{13}C (400 MHz, ppm, $CDCl_3$): δ= 22.15; 23.00; 23.30; 25.25; 26.48; 48.30; 66.80; 98.12; 117.41; 125.78; 128.64; 129.20; 129.42; 131.25; 132.78; 140.37 (ver apêndice Z).

5.4 *Docking* molecular

Após a execução de todos os experimentos de *docking*, utilizando os *softwares* descritos na metodologia deste trabalho, os resultados para as energias de afinidade ligante/enzima foram agrupados na tabela 1. É possível observar que os ligantes racionalmente planejados apresentam, de modo geral, uma interessante afinidade para algumas enzimas analisadas, quando comparados com seus respectivos padrões. Basicamente, a função desses padrões é funcionar como controle positivo para os experimentos virtuais.

Tabela 1 – Energia de Afinidade Final para a formação dos complexos ligante/enzima.

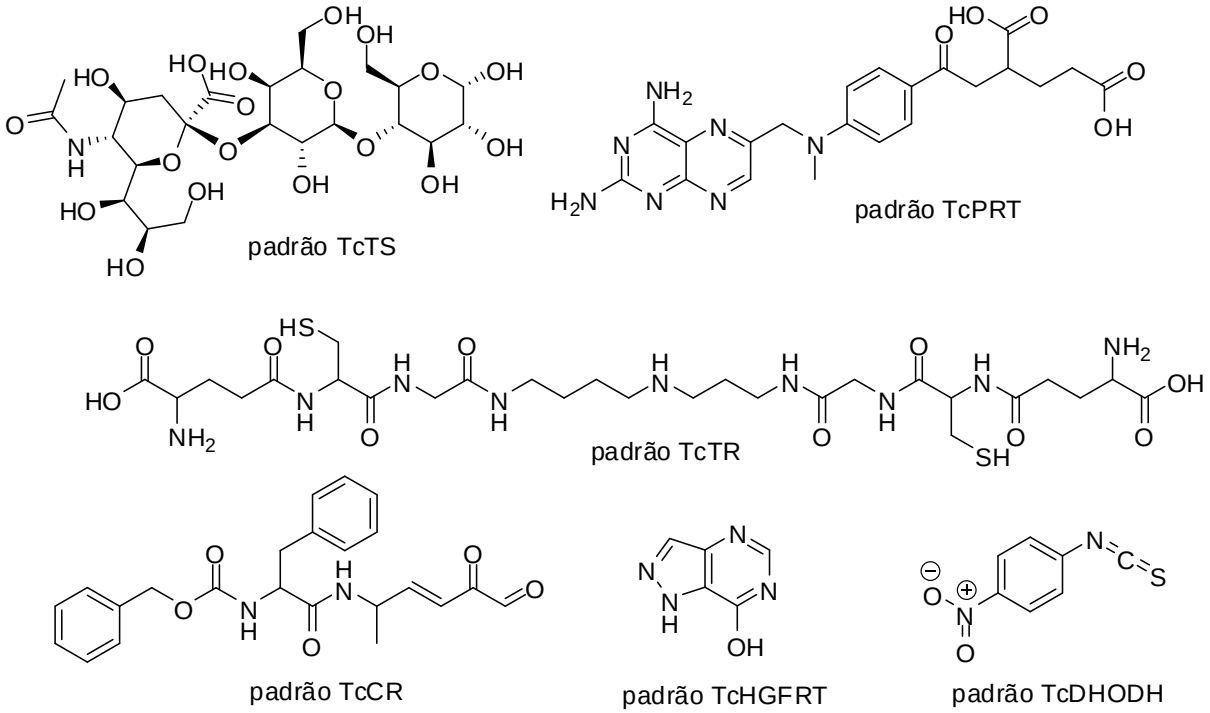
Compostos	*Tc*TS	*Tc*PTR	*Tc*CR	*Tc*TR	*Tc*HGFRT	*Tc*DHFR	*Tc*DHODH
2a	-7.34	-6.91	-6.13	-7.29	-6.79	-7.49	-4.62
2b	-6.48	-6.84	-5.60	-6.63	-6.36	-6.30	-5.40
2c	-5.95	-5.66	-5.36	-5.83	-5.85	-5.84	-5.49
2d	-6.00	-5.95	-5.16	-5.81	-4.92	-5.93	-5.12
3a	-7.09	-6.92	-5.88	-7.04	-6.22	-7.24	-3.40
3b	-7.27	-6.93	-5.72	-7.31	-6.12	-7.29	-4.72
3c	-6.96	-6.42	-5.56	-6.17	-5.80	-6.45	-5.85
3d	-7.29	-6.33	-5.59	-6.20	-6.35	-6.29	-5.93
4a	-6.57	-7.08	-5.72	-6.29	-6.08	-6.39	-1.47
4b	-7.74	-6.92	-6.15	-7.10	-6.74	-7.96	-3.60
4c	-6.53	-7.00	-5.66	-6.65	-6.01	-6.78	-3.83
4d	-6.69	-6.53	-5.62	-6.82	-6.50	-6.44	-3.28
5a	-6.17	-6.88	-5.89	-6.65	-6.03	-7.50	-3.48
5b	-6.83	-7.38	-6.22	-6.26	-6.70	-7.08	-4.29
5c	-7.01	-6.97	-5.46	-5.80	-5.43	-6.71	-4.04
5d	-7.28	-7.07	-5.85	-6.70	-5.98	-7.62	-3.49
6a	-8.75	-7.67	-5.48	-7.33	-6.53	-6.77	-4.08
6b	-7.71	-7.82	-5.62	-6.57	-7.34	-7.86	-4.12
6c	-7.82	-7.52	-5.24	-6.42	-6.21	-7.05	-4.13
6d	-7.98	-7.37	-5.29	-6.28	-6.10	-6.68	-3.99
7a	-7.37	-7.58	-6.38	-7.37	-7.10	-7.61	-5.84
7b	-7.78	-7.76	-6.74	-7.46	-6.77	-8.32	-3.91
7c	-7.76	-7.33	-6.50	-6.87	-6.35	-8.11	-5.02
7d	-7.53	-7.66	-5.97	-6.48	-5.96	-7.94	-2.96
Padrão	-11.85	-8.22	-9.60	-8.80	-5.26	Não*	-6.40

Fonte: Autor, 2015.

Nota: Energias de afinidade finais (E_F) estimadas em kcal/mol, através do seguinte cálculo: Energia calculada pelo *AutoDock Tools*® + Energias calculadas pelo *AutoDock Vina*® / 2. ***Padrão:*** ligantes em complexos com suas respectivas enzimas (arquivo original do *PDB*); ***Não*:*** enzima sem ligante complexado.

De modo geral, observa-se que os ligantes planejados neste trabalho apresentam afinidades maiores do que as observadas nos ligantes padrões (Figura 31) complexados com seus respectivos alvos moleculares.

Figura 31 – Ligantes padrões utilizados nos ensaios computacionais deste trabalho.



FONTE: Autor, 2015.

Considerando as energias de afinidade finais (E_F), pode-se determinar a energia de afinidade global (E_{FG}) das séries planejadas, de maneira que torna-se possível propor as melhores séries de compostos potencialmente inibidores de enzimas do parasito *T. cruzi.*

Na tabela 2, estão mostradas as E_{FG} para cada série de compostos, sendo possível visualizar uma maior tendência à inibição da *Tc*TS por 50% destes compostos.

Tabela 2 – Energias de afinidade global para as séries sintetizadas.

Série	*Tc*TS	*Tc*PTR	*Tc*CR	*Tc*TR	*Tc*HGFRT	*Tc*DHFR	*Tc*DHODH
2a-d	-6.44	-6.34	-5.56	-6.39	-5.98	-6.39	-5.15
3a-d	-7.15	-6.65	-5.68	-6.68	-6.12	-6.81	-4.97
4a-d	-6.88	-6.88	-5.78	-6.71	-6.33	-6.89	-3.04
5a-d	-6.82	-7.07	-5.85	-6.35	-6.03	-7.22	-3.82
6a-d	-8.06	-7.59	-5.40	-6.65	-6.54	-7.09	-4.08
7a-d	-7.61	-7.58	-6.39	-7.04	-6.54	-7.99	-4.43

FONTE: Autor, 2015.

Nota: E_{FG}(em kcal/mol) determinadas através do seguinte cálculo: E_F para **a + b + c + d /4.**

5.4.1 Análise dos compostos e seus respectivos sítios de ligação

5.4.1.1 Série *2a-d.*

Ao analisar tais compostos, percebe-se que estes tem uma maior afinidade pela enzima *Tc*TS, sendo a ordem de afinidade, ***2a*** **>** ***2b*** **>** ***2d*** **>** ***2c***.

Dentre os compostos contidos nessa série, o ***2a*** é considerado o de maior afinidade pela a *Tc*TS, contribuindo com uma E_F= -7.34 kcal/mol. Este (Figura 32, A) apresenta a região do tetraidrobenzotiofeno localizada no sítio hidrofóbico da enzima que, segundo Neres e colaboradores (2009), composto por TYR119 e TRP312, favorecendo uma melhor interação ligante/enzima. Ainda com relação ao composto ***2a***, um dos nitrogênios da tioureia interage com o sítio aceptor/doador, através da doação de um hidrogênio (R_2NH) dessa tioureia para o resíduo aceptor da ASP96 (Figura 33). Por fim, o éster etílico (em R_1) encontra-se localizado próximo a outro sítio aceptor/doador importante da enzima, ARG53. Todas essas informações corroboram com dados obtidos por Neres e colaboradores (2009), quando este trata de compostos ativos sobre esta enzima.

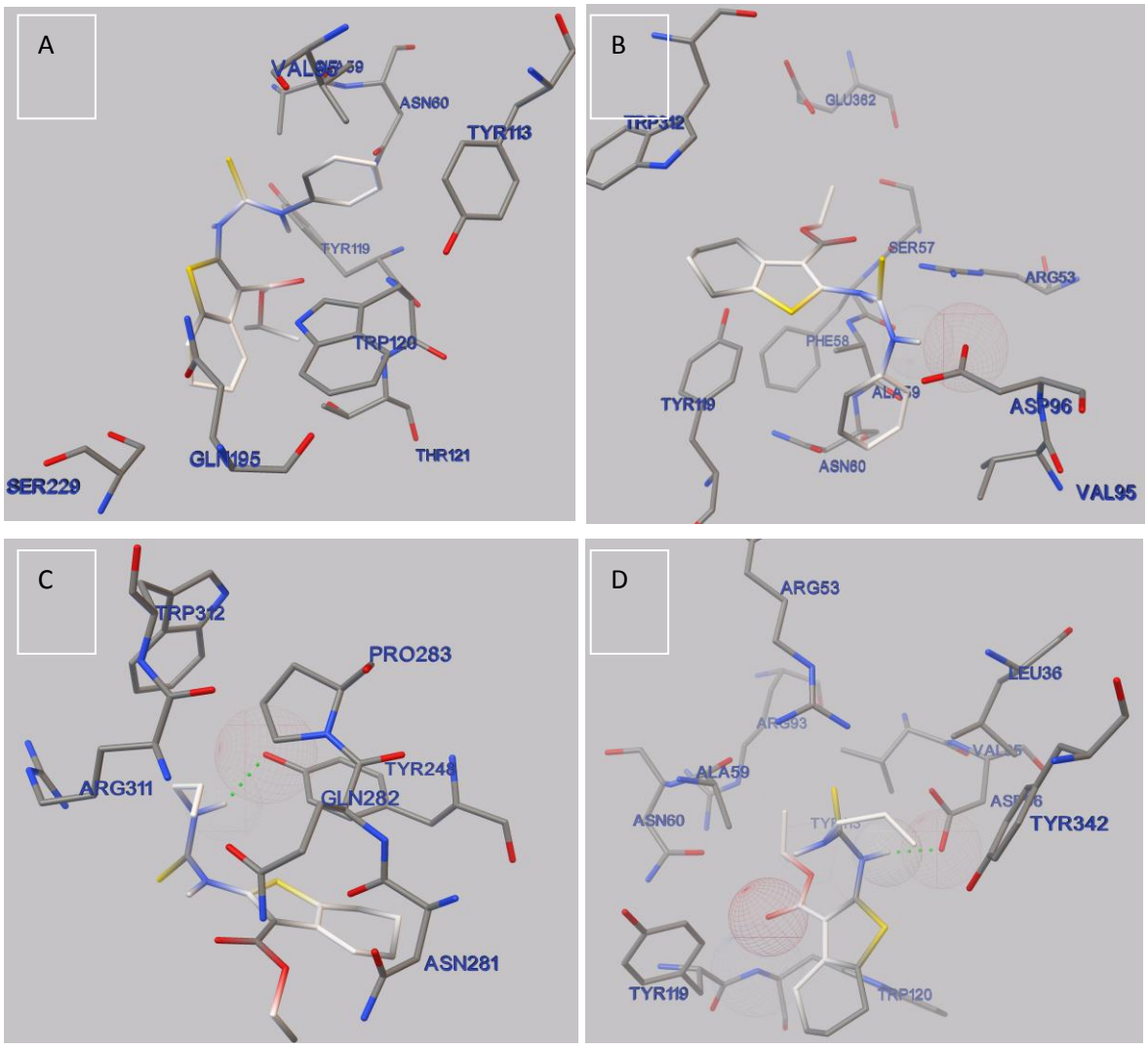
Já o composto ***2b*** apresenta a segunda maior contribuição energética da série (E_F= -6.48 kcal/mol), tal fato advém da conformação deste ser menos estável do que a observada para o composto ***2a***, pois esta afasta o nitrogênio (R_2NH) da tioureia do resíduo aceptor, ALA59. Porém, a fenila na posição *N*-terminal da tioureia encontra-se em uma região bastante hidrofóbica, composta por TYR113, TYR119 e TRP120, conferindo certa estabilidade ao complexo (Figura 32, B). Por fim, de acordo com Neres e colaboradores (2009), um bom inibidor da *Tc*TS possui um núcleo tiofeno localizado entre os resíduos TRP312 e TYR119,

porém o composto ***2b*** apresenta o núcleo tetraidrobenzotiofeno localizado em desacordo com tal afirmação, sugerindo a explicação para a redução da afinidade deste em relação ao ***2a***.

O composto ***2c*** contribui com a menor E_F para a série, uma vez que este encontra-se totalmente afastado de importantes sítios da *Tc*TS (Figura 32, C). Porém, a conformação adotada possibilita a interação com o resíduo TYR248, fornecendo certa estabilidade ao complexo formado.

Na análise do composto ***2d*** com seus respectivos resíduos (Figura 32, D), chega-se a conclusão que o principal resíduo estabilizante para a formação do complexo encontra-se no sítio aceptor/doador ASP96. Além disso, a carbonila do éster etílico (em R_1) realiza uma ligação de hidrogênio com a TYR119, funcionado como um sítio aceptor de hidrogênio.

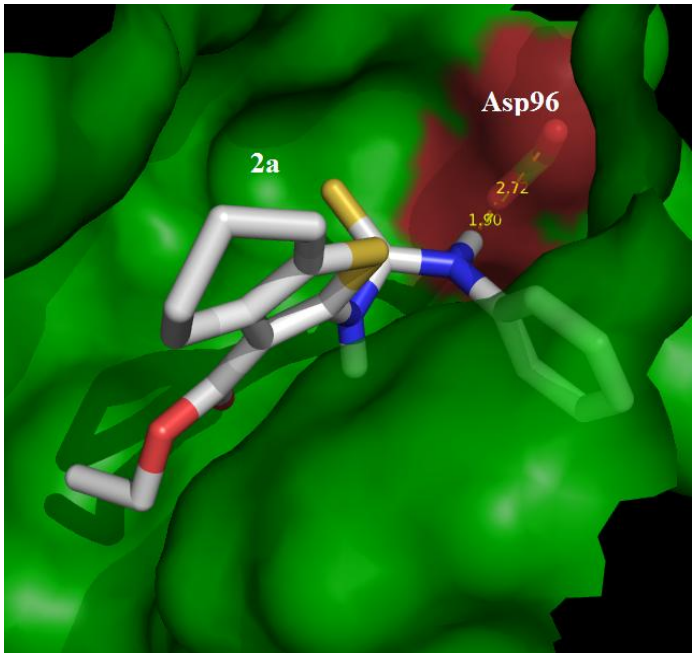
Figura 32 – Compostos da série *2a-d* em complexo com a enzima *Tc*TS.



Fonte: Autor, 2015.

Nota: Em A, composto*2a*. Em B, composto *2b*. Em C, composto *2c*. Em D, composto *2d*. Linha pontilhada verde, ligação de hidrogênio. Esferas, átomos participantes de ligações de hidrogênio.

Figura 33 – Interação do *2a* com o domínio aceptor ASP96.

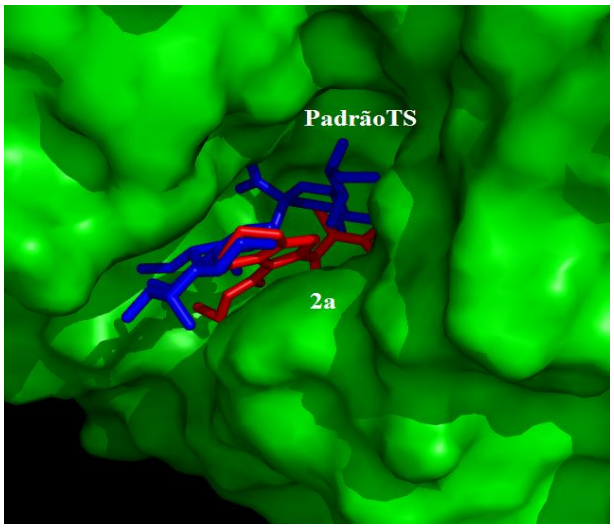


Fonte: Autor, 2015.

Nota: Distância da interação determinada em Ångström.

A análise mais aprofundada do composto ***2a*** sugere que este seja capaz de se ligar exatamente no mesmo sítio (tipo-fenda) do inibidor padrão da *Tc*TS observado no arquivo original do *PDB* (Figura 34), validando a metodologia empregada nos experimentos de *docking*.

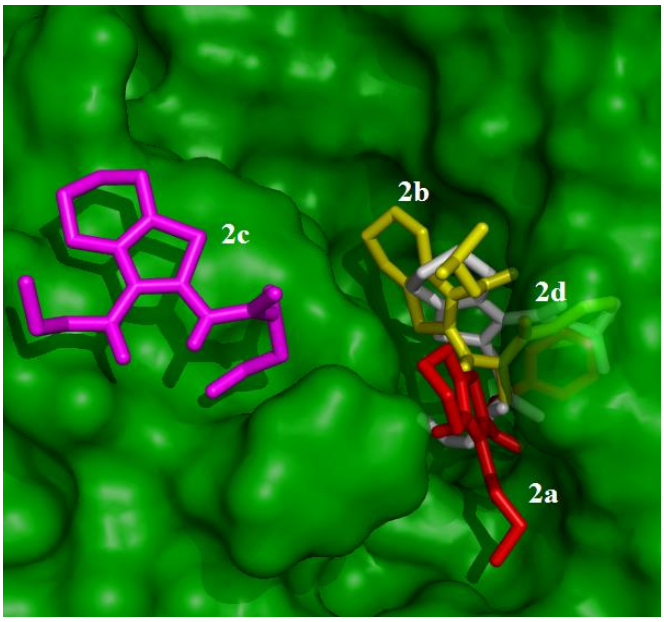
Figura 34 – Visualização do composto *2a* e o padrão no sítio inibitório da *Tc*TS.



Fonte: Autor, 2015.

Ao visualizar o *cluster* (Figura 35) para essa série de compostos, verifica-se que os compostos ***2b*** e ***2d*** também são capazes de interagirem no mesmo local em que o *padrãoTS* (exerce sua atividade. Porém, ainda percebe-se que o composto ***2c*** encontra-se muito afastado dessa fenda, o que corrobora com sua baixa afinidade para essa enzima (E_F= -5.95 kcal/mol).

Figura 35 – Visualização do *cluster* para os compostos *2a-d.*



Fonte: Autor, 2015.

Nota: Em vermelho, *2a*; Em amarelo, *2b*; Em rosa, *2c*; Em branco, *2d.*

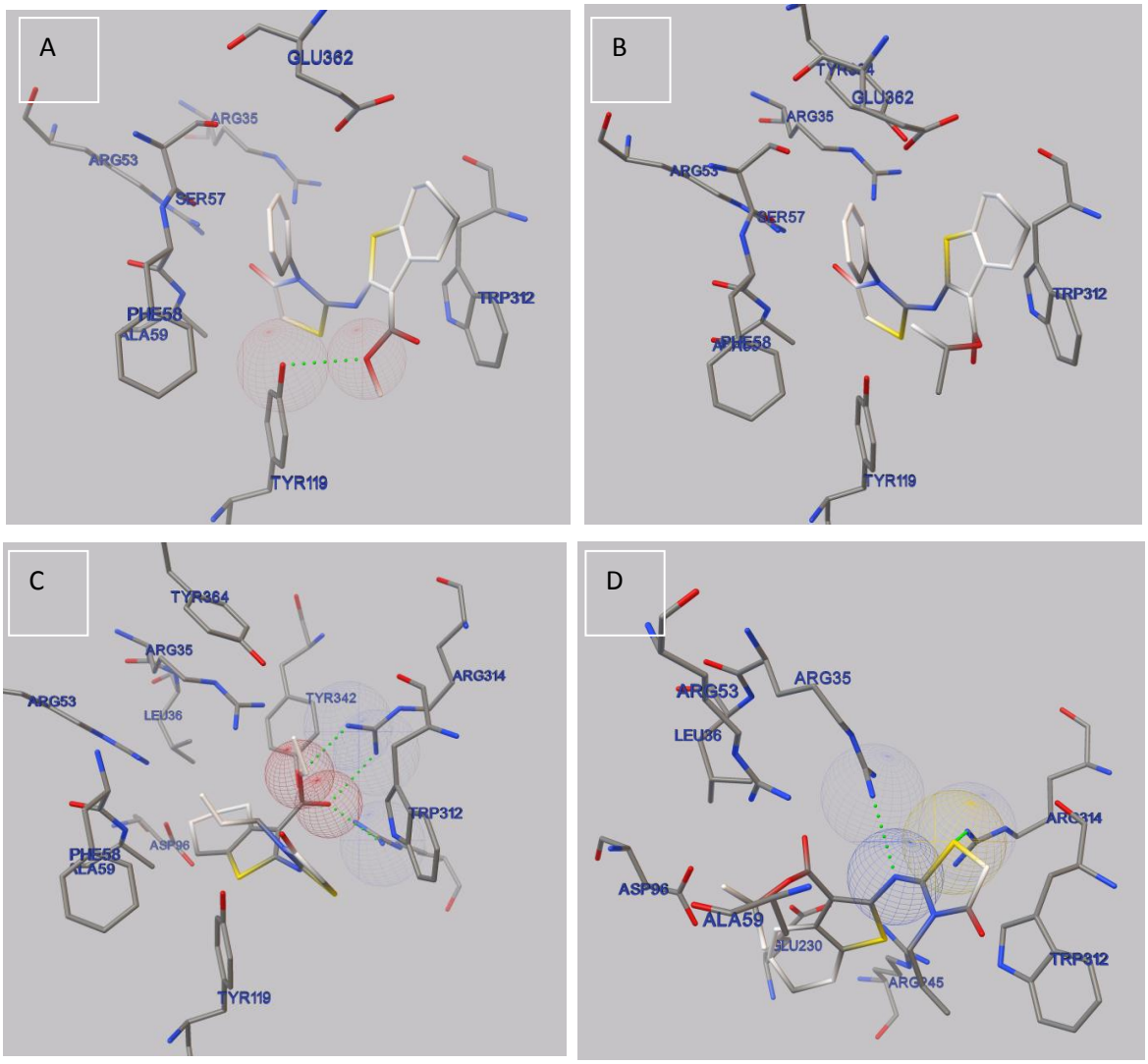
5.4.1.2 Série *3a-d.*

Ao observar as energias de afinidades finais (E_F) entre esta série e as enzimas estudadas evidencia que esta tenha uma maior afinidade pela enzima *Tc*TS (E_{FG}= -7.15 kcal/mol). Além disso, nota-se que os compostos pertencentes à série obedecem uma ordem de afinidade, sendo ***3d > 3b > 3a > 3c.***

O composto ***3d*** é responsável pela maior contribuição energética da série (E_F= -7.29 kcal/mol). Tal composto (Figura 36, A) é capaz de interagir, através de uma ponte de hidrogênio, com a amina terminal (R-NH_2) do resíduo ARG35. Em adição, o átomo de enxofre pertencente ao anel tiazolidinona funciona como um domínio aceptor para a ligação de um hidrogênio proveniente da amina terminal do resíduo ARG314. Este último está relacionado à atividade sobre *Tc*TS (Neres *et al.*,2009).

Na figura 37 é mostrado o sítio ativo da enzima em complexo com composto ***3d,*** além das respectivas distâncias entre os átomos participantes das interações.

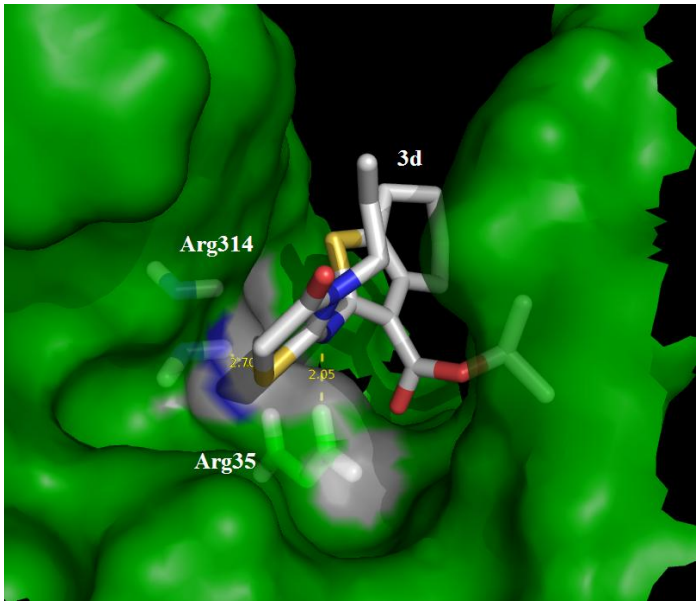
Figura 36 - Compostos da série *3a-d* em complexo com a enzima *Tc*TS e suas respectivas interações.



Fonte: Autor, 2015.

Nota: Em A, composto *3a*. Em B, composto *3b.* Em C, composto *3c*. Em D, composto *3d*. Linha pontilhada verde, ligação de hidrogênio. Esferas, átomos participantes de ligações de hidrogênio.

Figura 37 – Composto *3d* em complexo com a enzima *Tc*TS.

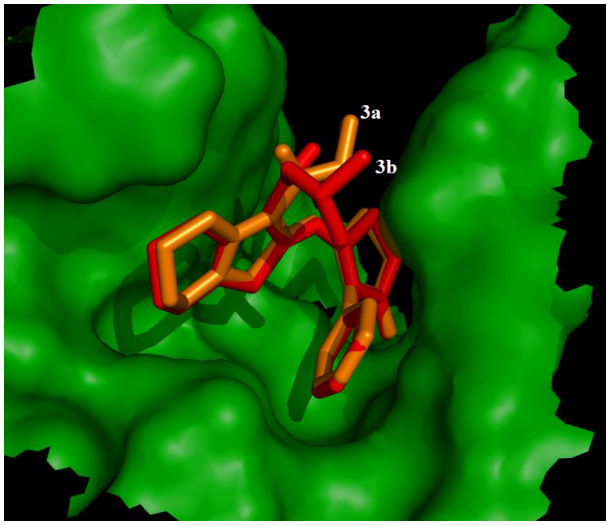


Fonte: Autor, 2015.

Nota: Distância das interações determinadas em Ångström.

Ao analisar os compostos ***3a*** e ***3b*** é possível verificar que ambos apresentam uma conformação ligante bastante aproximada entre si (Figura 38). Porém, sobre o composto ***3a,*** pode-se afirmar que a ligação de hidrogênio ocorrida entre o éster etílico (em R_1) e a hidroxila da TYR119 desfavorece a afinidade do composto pela enzima e, consequentemente, reduz a estabilidade do complexo. Já com relação ao composto ***3b***, a *iso*-propila (em R_1) impede a ocorrência dessa interação com a TYR119, porém este grupo químico encontra-se localizado no domínio hidrofóbico da *Tc*TS, o que explica o aumento da afinidade de ***3b*** em relação a ***3a*** (Figura 36, B).

Figura 38 – Semelhanças entre as conformações ligantes dos compostos *3a*e *3b*.

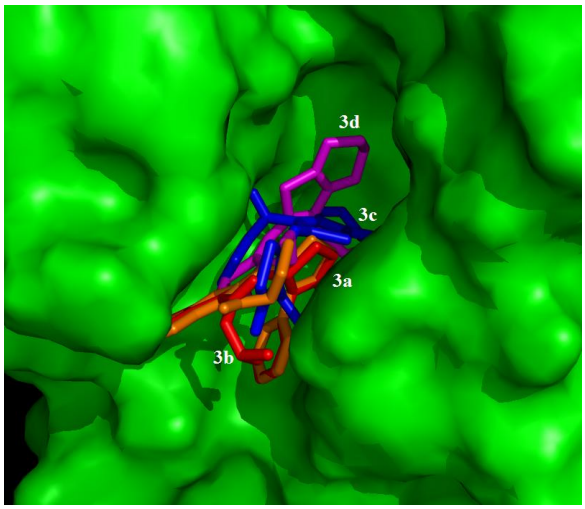


Fonte: Autor, 2015.

Nota: Em laranja, *3a;* Em vermelho, *3b.*

Apesar do composto ***3c*** apresentar algumas interações com um resíduo envolvido na atividade de compostos sobre à *Tc*TS (nesse caso, ARG314), este se mostra em uma conformação desfavorável à interação com os domínios estabelecidos por Neres e colaboradores (2009) (Figura 36, C). Na figura 39 é mostrado o *cluster* para a série de compostos, onde percebe-se que o composto ***3d*** apresenta um melhor encaixe na fenda do sítio ativo da enzima em questão.

Figura 39 – Visualização do *cluster* dos compostos da série *3a-d*.



Fonte: Autor, 2015.

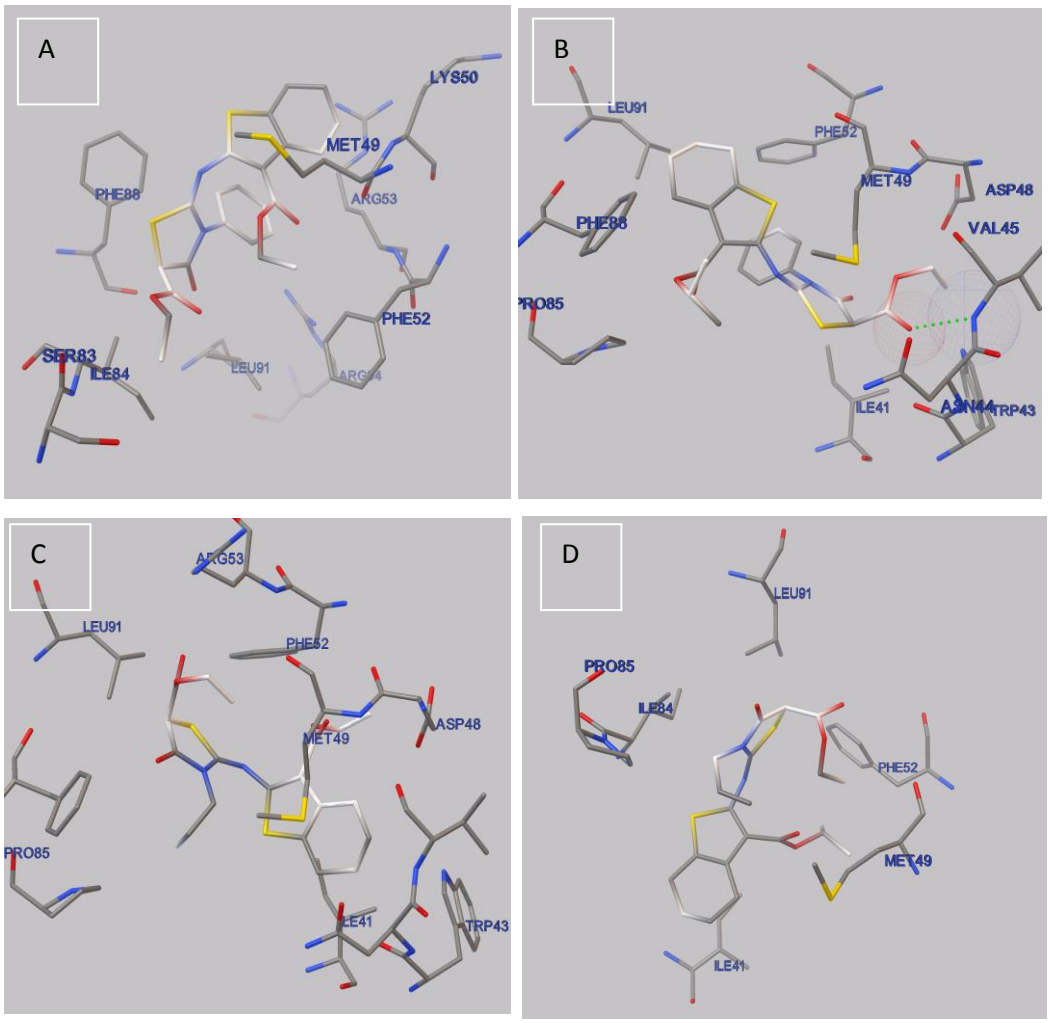
Nota: Em laranja, *3a;* Em vermelho, *3b;* Em azul, *3c;* Em rosa, *3d.*

5.4.1.3 Série *4a-d*

Esta série de compostos preferencialmente atua sobre a *Tc*DHFR, com uma E_{FG}= -6.89 kcal/mol, sendo a ordem de afinidade entre os compostos, ***4b*** **>** ***4c*** **>** ***4d*** **>** ***4a***.

Dentre os compostos pertencentes a esta série, o ***4b*** é responsável pela maior contribuição energética, apresentando uma E_F= -7.96 kcal/mol. Ainda, este é capaz de interagir, via ponte de hidrogênio, com o resíduo VAL45 (Figura 40, B). Tal interação é permitida devido a carbonila do éster etílico (posição 5 do anel tiazolidinona) funcionar como um grupo aceptor de hidrogênio (Figura 41).

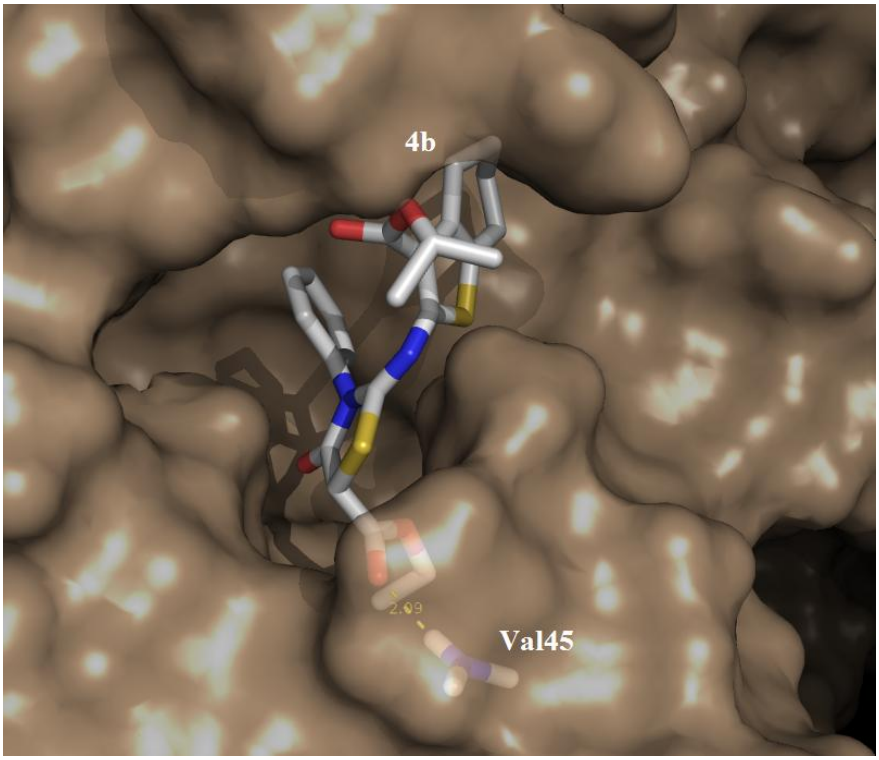
Figura 40 - Compostos da série *4a-d* em complexo com a enzima *Tc*DHFR e suas respectivas interações.



Fonte: Autor, 2015.

Nota: Em A, composto *4a*. Em B, composto *4b*. Em C, composto *4c*. Em D, composto *4d*. Linha pontilhada verde, ligação de hidrogênio. Esferas, átomos participantes de ligações de hidrogênio.

Figura 41 – Composto *4b* em complexo com a enzima *Tc*DHFR.



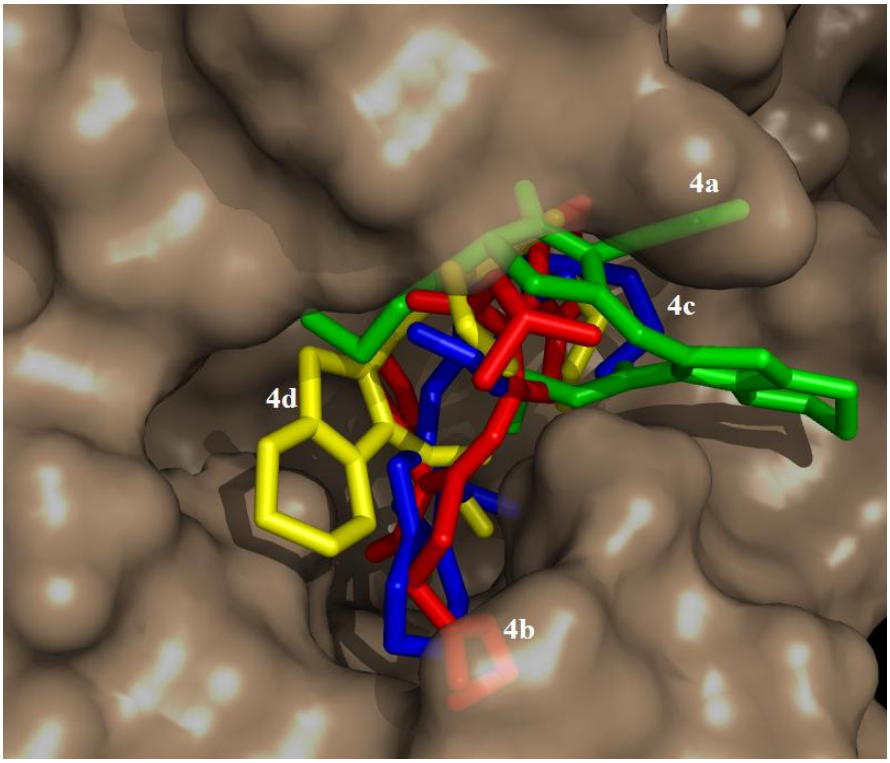
Fonte: Autor, 2015.

Nota: Distância da interação determinada em Ångström.

Em geral, observa-se que todos os compostos desta série apresentam o resíduo MET49 em suas respectivas interações com o sítio ativo da *Tc*DHFR, o qual de acordo com Schormann e colaboradores (2010), está relacionado com a atividade sobre tal enzima (Figura 40). Em adição, nenhum dos compostos é capaz de interagir com o resíduo PHE31, o que iria acarretar em uma maior seletividade à *h*DHFR por parte desses compostos (SCHORMANN *et al.*, 2010).

Todos os compostos da série se ligam no mesmo local no sítio ativo da enzima, formando um *cluster* (Figura 42).

Figura 42 – Visualização do *cluster* dos compostos da série *4a-d*.



Fonte: Autor, 2015.

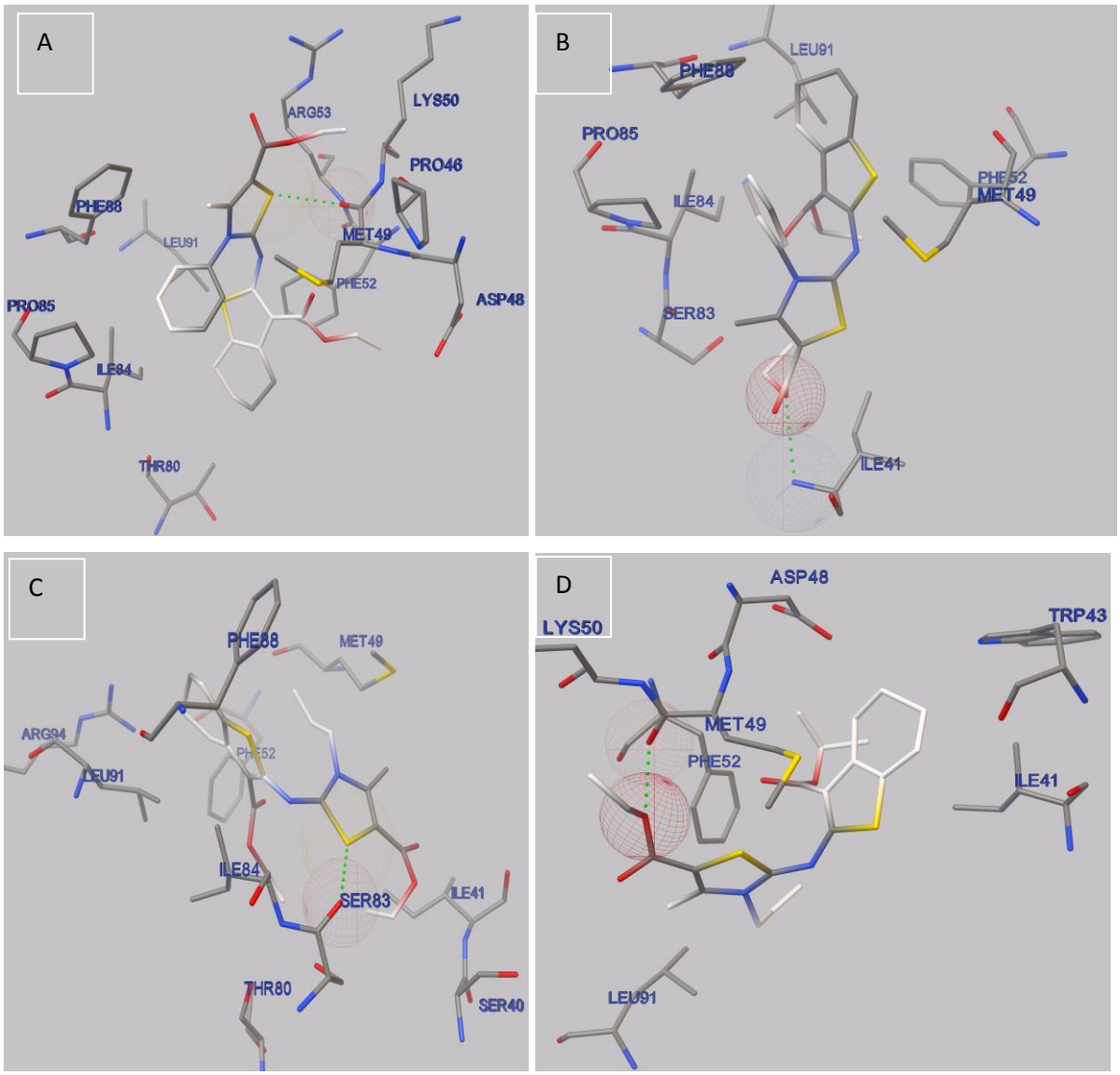
Nota: Em verde, 4*a;* Em vermelho,*4b;* Em azul, *4c;* Em amarelo, 4*d.*

5.4.1.4 Série *5a-d*

Tal série de compostos apresenta uma maior afinidade pela a enzima *Tc*DHFR (E_{FG}= -7.22 kcal/mol), sendo a ordem de afinidade entre eles, ***5d* > *5a* > *5b* > *5c***.

O composto ***5d*** representa o maior contribuinte energético desta série, apresentando uma E_F= -7.62 kcal/mol. Este é capaz de interagir, via ponte de hidrogênio, com o principal resíduo envolvido na inibição desta enzima, MET49 (SCHORMANN *et al.*, 2010). Tal interação é proveniente do fato de que o átomo de oxigênio do éster etílico funciona como um aceptor para o hidrogênio da hidroxila (-OH) da MET49 (Figura 43, D).

Figura 43 - Compostos da série *5a-d* em complexo com a enzima *Tc*DHFR e suas respectivas interações.



Fonte: Autor, 2015.

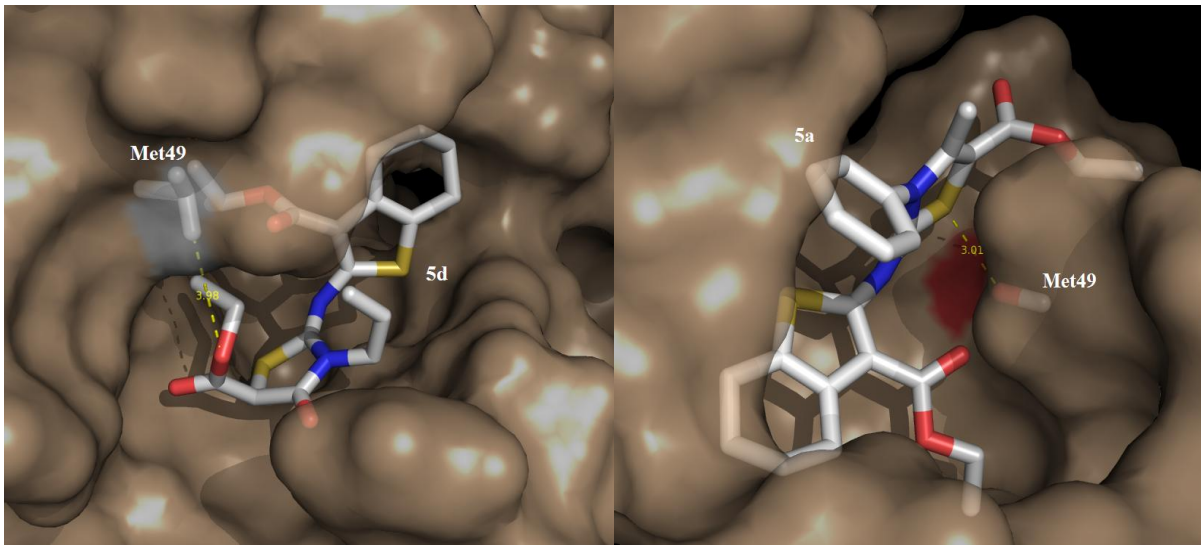
Nota: Em A, composto *5a*. Em B, composto *5b*. Em C, composto *5c*. Em D, composto *5d*. Linha pontilhada verde, ligação de hidrogênio. Esferas, átomos participantes de ligações de hidrogênio.

Com relação ao composto ***5a***, este também é capaz de interagir, via ponte de hidrogênio, com a MET49, porém o átomo aceptor dessa interação é o enxofre contido no anel tiazolidínico (Figura 43, A).

Quando se compara o ***5a*** com o ***5d***, em termos de distância da interação com a MET49, percebe-se que apesar da interação do ***5a*** ser mais próxima (3.01 Å), o que sugere uma ligação mais forte e estável, porém tal fato é contrariado ao observar as E_F dos compostos ***5a*** e ***5d*** (3.98 Å) (Figura 44). A explicação para essa divergência está relacionada

às conformações adotadas pelos compostos ***5a*** e ***5d***. Ao analisar o *cluster* da série (Figura 45), percebe-se que a interação entre o ***5a*** e a MET49 desfavorece a conformação deste, impedindo a completa entrada deste à fenda do sítio ativo. Essa conformação adotada sugere uma redução da estabilidade e, consequentemente, afinidade do ***5a*** pela enzima.

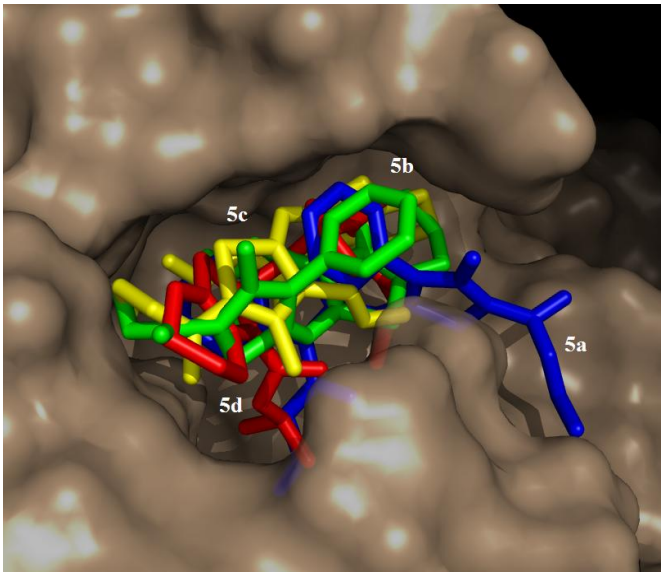
Figura 44 – Compostos *5d* e *5a* e suas interações com a MET49.



Fonte: Autor, 2015.

Nota: Distância da interação determinada em Ångström.

Figura 45 – Visualização do *cluster* para os compostos da série *5a-d.*



Fonte: Autor, 2015.

Nota: Em azul, *5a;* Em verde,*5b;* Em amarelo, *5c;* Em vermelho, *5d.*

Por fim, todos os compostos (Figura 43) da série são capazes de interagir com o principal resíduo relacionado à atividade inibitória desta enzima, MET49 (SCHORMANN *et al.*, 2010).

5.4.1.5 Série *6a-d*

Esta série apresenta a maior afinidade pela *Tc*TS observada dentre todas as séries, com uma E_{FG}= -8.06 kcal/mol. Ainda, tal afinidade obedece a seguinte ordem entre os compostos: ***6a* >*6d*> *6c* > *6b*.**

O composto ***6a*** (Figura 46, A) apresenta interações que contribuem com a estabilidade do complexo, estas ocorrem entre o átomo de oxigênio da hidroxila (-OH) da função ácida, na posição 5 do anel tiazolidinona, e as aminas terminais (-NH_2) dos resíduos ARG35 e ARG314. Este último está relacionado à atividade antichagásica (Neres *et al.*, 2009). Adicionalmente, a interação do oxigênio do éster etílico (=O) com a hidroxila (-OH) da TYR119, impedindo o encaixe adequado do tetraidrobenzotiofeno entre os resíduos TYR119 e TRP312, reconhecidos como domínio hidrofóbico (Neres *et al.*, 2009).

Na figura 47, são mostradas as distâncias relativas às interações entre o composto ***6a*** os aminoácidos do sítio ativo da *Tc*TS.

Figura 46 – Conformações e interações para os compostos *6a-d.* *(continua)*

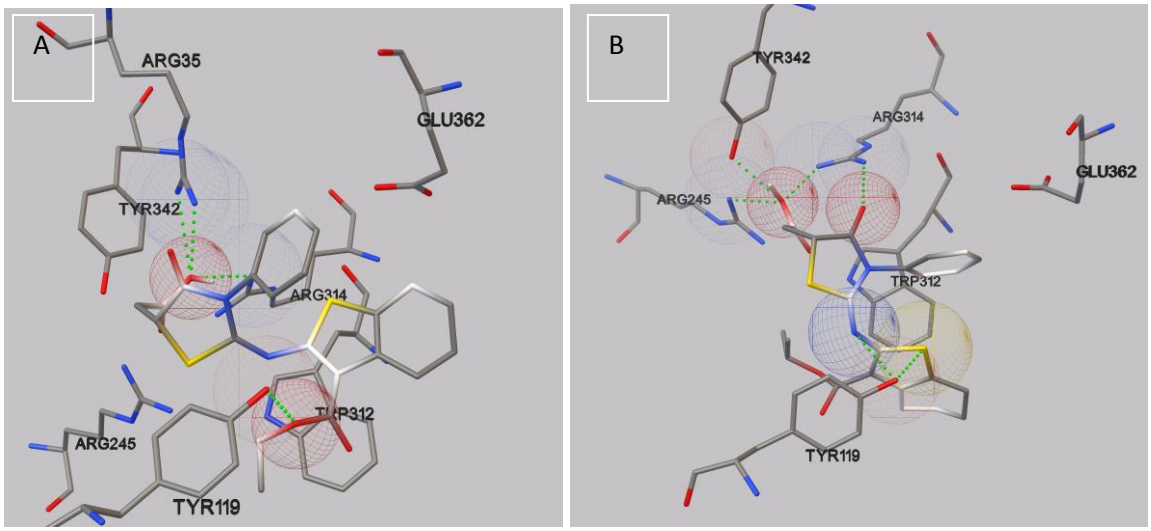
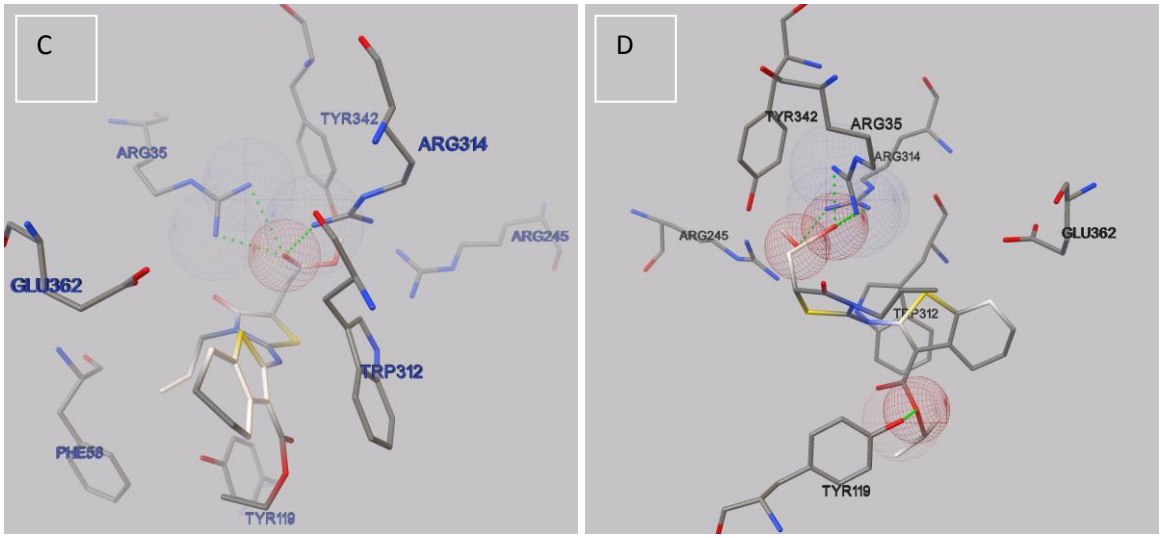


Figura 46 – Conformações e interações para os compostos *6a-d.* *(conclusão)*

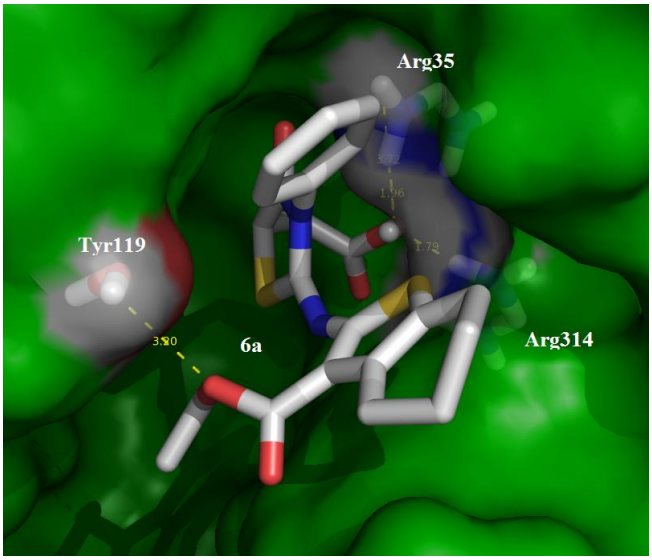


Fonte: Autor 2015.

Nota: Em A, composto *6a*. Em B, composto *6b*. Em C, composto *6c*. Em D, composto *6d*. Linha pontilhada verde, ligação de hidrogênio. Esferas, átomos participantes de ligações de hidrogênio.

Ao analisar os compostos ***6a*** e ***6c***, observa-se que estes apresentam uma conformação muito semelhante entre si, apenas havendo uma mudança conformacional na região R_1 destes compostos (Figura 47).

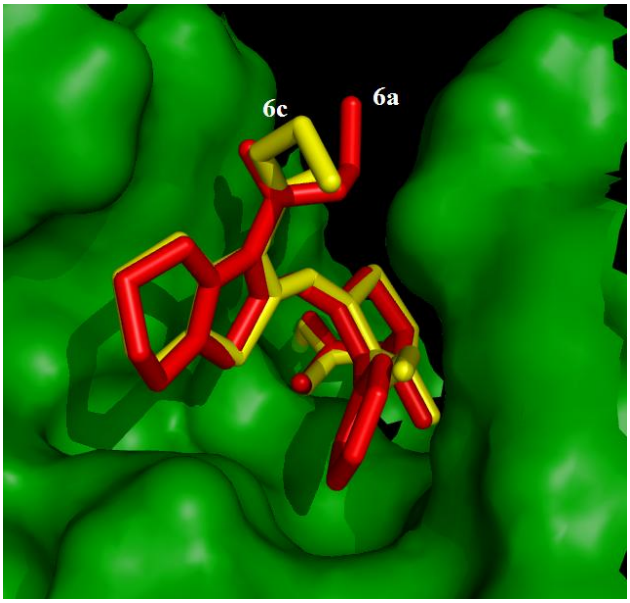
Figura 47 – Composto *6a* em complexo com a enzima *Tc*TS.



Fonte: Autor, 2015.

Nota: Distâncias entre as interações determinadas em Ångström.

Figura 47 – Semelhança entre as conformações dos compostos *6a* e *6c*.



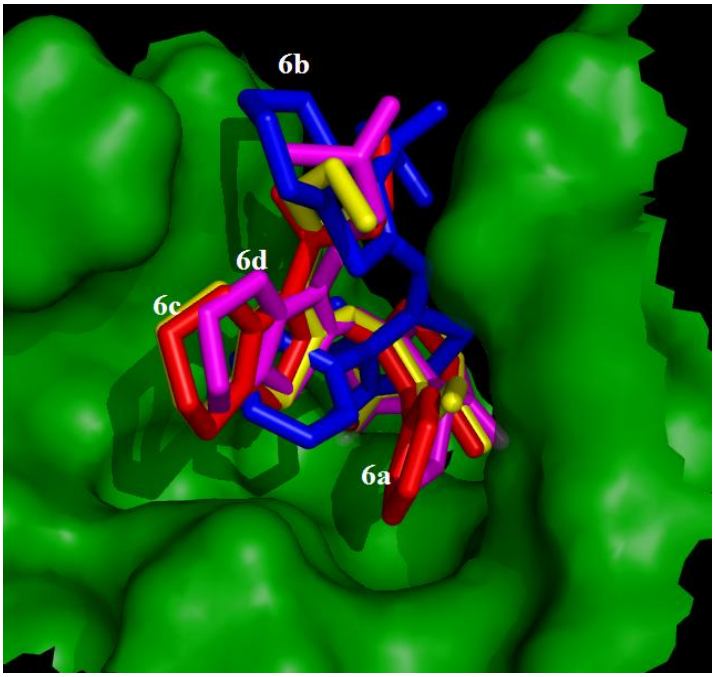
Fonte: Autor, 2015.

Nota: Em vermelho, *6a;* Em amarelo, *6c*.

Com relação ao composto ***6b*** (Figura 46, B), observa-se que este apresenta o tetraidrobenzotiofeno posicionado entre os resíduos TYR119 e TRP312 (domínio hidrofóbico), porém percebe-se que há um pequeno deslocamento na conformação, devido aos átomos de enxofre do anel tiofeno e do nitrogênio da imina estarem funcionando como aceptores de ligação de hidrogênio, no caso, proveniente da hidroxila (-OH) da TYR119.

No geral, para todos os compostos desta série (Figura 46), o grupamento ácido do anel tiazolidinona é extremamente fundamental à afinidade pela *Tc*TS, onde tal grupo é capaz de ocupar o domínio aceptor/doador do sítio ativo da mesma, composto basicamente por ARG314 e ARG245 (Neres *et al.,* 2009). Já a interação com a TYR119 se mostra intimamente ligada à afinidade, tal interação, quando hidrofóbica, favorável, quando aceptora/doador de hidrogênio, desfavorável. Porém, visualizando o *cluster* (Figura 49) percebe-se que todos os compostos apresentam a mesma fenda como sítio de ligação na enzima *Tc*TS.

Figura 49 – Visualização do *cluster* para os compostos da série *6a-d.*



Fonte: Autor, 2015.

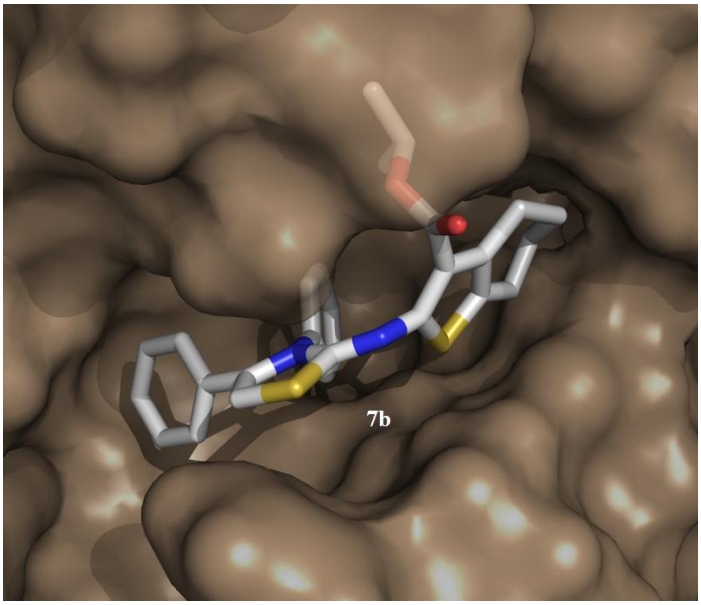
Nota: Em vermelho, *6a;* Em azul, *6b;* Em amarelo, *6c*; Em rosa, *6d*.

5.4.1.6 Série *7a-d*

Esta série de compostos pode ser considerada como a mais promissora, uma vez que, analisando as colunas da tabela 2, verifica-se esta apresenta afinidades para quatro das sete enzimas estudadas, sendo elas, *Tc*CR, *Tc*TR, *Tc*THGFRT e *Tc*DHFR. Porém, em termos de seletividade, os compostos de ***7a-d*** têm maior afinidade pela enzima *Tc*DHFR (E_{FG}= -7.99 kcal/mol), obedecendo a seguinte ordem: ***7b*** > ***7c*** > ***7d*** > ***7a***.

O composto ***7b*** apresenta uma excelente complementaridade com a fenda do sítio ativo da *Tc*DHFR, garantindo-lhe uma E_F= -8.32 kcal/mol (Figura 50). Além disso, é capaz de interagir com o resíduo crítico desta enzima, MET49 (Figura 51, B) (SCHORMANN *et al.*, 2010). Estes dados estão relacionados com observações obtidas nas pesquisas de Leite e colaboradores (2006), onde sugerem que quanto maior a lipofilicidade de um determinado composto, este tende a apresentar um valor de IC_{50} menor.

Figura 50 – Composto *7b* no sítio ativo da enzima *Tc*DHFR.



Fonte: Autor, 2015.

Figura 51 – Conformações e interações para os compostos *7a-d.* *(continua)*

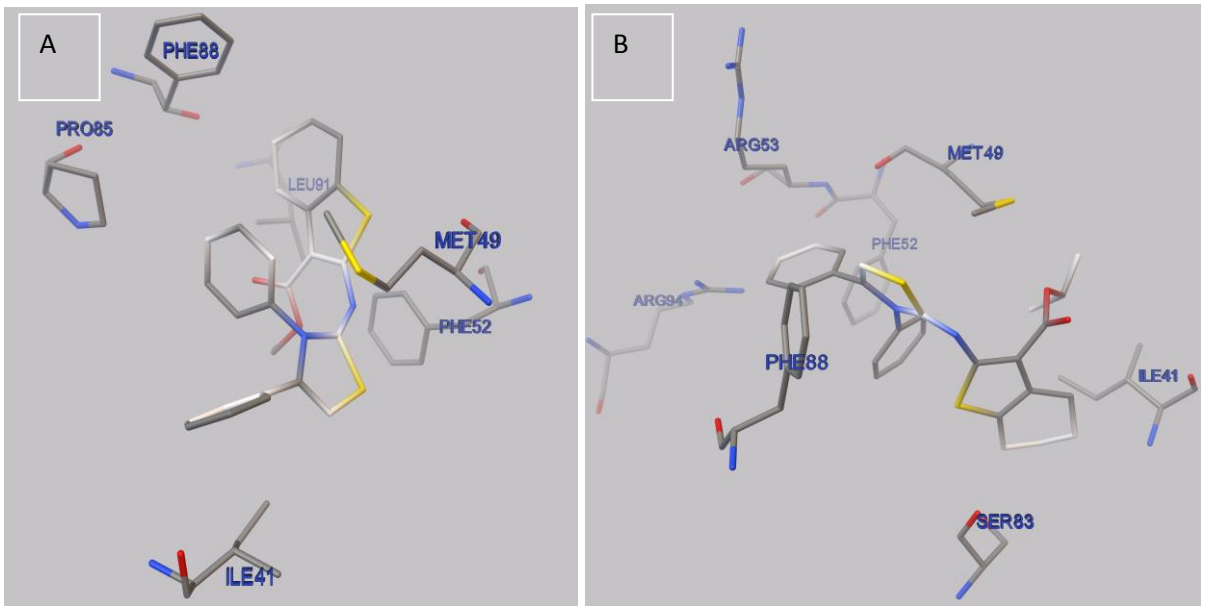
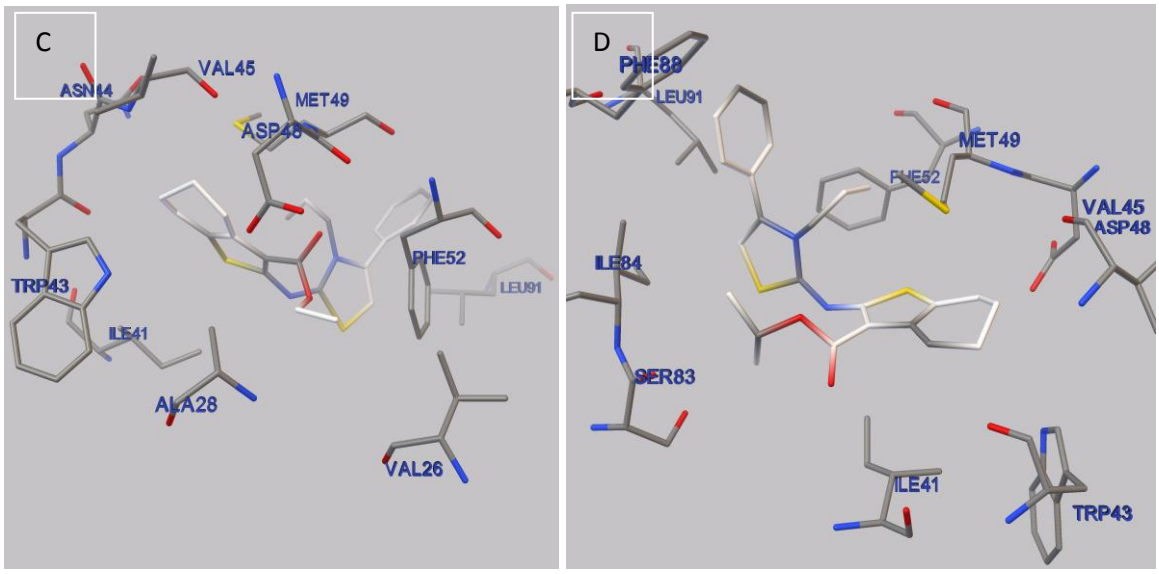


Figura 51 – Conformações e interações para os compostos *7a-d.* *(conclusão)*

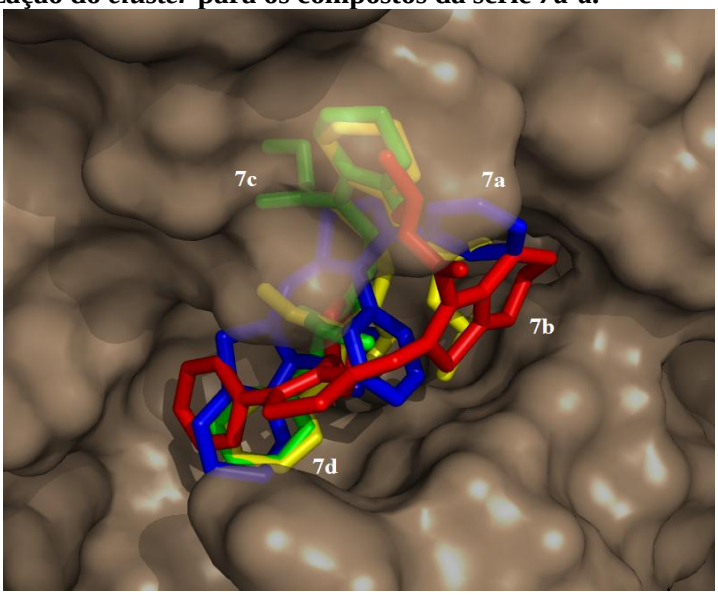


Fonte: Autor 2015.

Nota: Em A, composto *7a*. Em B, composto *7b*. Em C, composto *7c*. Em D, composto *7d*.

De modo geral, a série ***7a-d*** interage hidrofobicamente com o sítio ativo desta enzima, onde a MET49 está presente em todos os complexos ligante/enzima analisados (Figura 51). Por fim, é possível observar as semelhanças entre as conformações adotadas por estes compostos no *cluster* formado por esta série (Figura 52).

Figura 52 – Visualização do *cluster* para os compostos da série *7a-d.*



Fonte: Autor, 2015.

Nota: Em azul, *7a;* Em vermelho, *7b;* Em verde, *7c;* Em amarelo, *7d.*

5.5 Atividade Antichagásica Preliminar em Formas Amastigotas (*in vitro*)

A tabela 3 mostra os resultados para a avaliação biológica dos compostos de cada série frente às células infectadas com formas amastigotas do parasito *T. cruzi*.

A grande maioria dos compostos não apresenta atividade significante para inibir 50% dos parasitos na concentração de 10 µM, portanto, não possibilitando estimar a IC_{50} para tais compostos.

Compostos relacionados à inibição das enzimas *Tc*TS e *Tc*DHFR se mostraram detentores de elevadas toxicidades, são eles, ***4a***, ***5b*** e ***6b***, com CC_{50} de 7.2 µM, 9.8 µM e 5.0 µM, respectivamente. Desse modo, a toxicidade elevada desses compostos sugere que os mesmo não possam ser continuados dentro do estudo de desenvolvimento de novos compostos antichagásicos, pois são capazes de matar as células do hospedeiro em uma concentração que não afeta o parasita intracelular, portanto, tais compostos foram descartados dos estudos.

Tabela 3 – Resultados da avaliação da atividade antichagásica e citotóxica, *in vitro*, dos compostos sintetizados sobre células *C2C12* infectadas com formas amastigotas do parasito *T. cruzi*. **(continua)**

Compostos	**Amastigotas de *Trypanosoma cruzi***	
	IC_{50} (µM)	**CC_{50} (µM)**
2a	>10	>10
2b	>10	>10
2c	>10	>10
2d	>10	>10
3a	>10	>10
3b	>10	>10
3c	>10	>10
3d	>10	>10
4a	>10	7.2
4b	>10	>10
4c	>10	>10
4d	>10	>10
5a	>10	>10
5b	>10	9.8
5c	>10	>10
5d	>10	>10

Tabela 3 – Resultados da avaliação da atividade antichagásica e citotóxica, *in vitro*, dos compostos sintetizados sobre células *C2C12* infectadas com formas amastigotas do parasito *T. cruzi*. **(conclusão)**

6a	>10	>10
6b	>10	>10
6c	>10	>10
6d	>10	5.0
7a	>10	>10
7b	5.0	>10
7c	9.2	>10
7d	>10	>10
BnZ	10.0	>10
DMSO+RPMI	>10	>10

Fonte: Autor, 2015.

Nota: Concentração máxima testada= 10 µM; ***Bnz*** – Benznidazol, controle positivo; **DMSO+RPMI** – controle negativo.

Com relação aos compostos detentores de atividade anti-*T. cruzi* significante na concentração de 10 µM, ***7b*** e ***7c***, apresentaram melhores resultados do que o fármaco padrão-ouro utilizado como controle positivo, sendo o ***7b*** o mais promissor. Além disso, ambos os compostos não apresentaram CC_{50} na concentração testada, igual ao BnZ.

Devido dois compostos da série ***7a-d*** terem sido considerados ativos em concentrações significativas (<10 µM), foi realizado um ensaio de MTT para a série, utilizando concentrações de 10 e 100 µM (Tabela 4).

Tabela 4 – Viabilidade celular para a série *7a-d* em ensaio de citotoxicidade.

Composto	Concentração	% viabilidade celular	Concentração	% viabilidade celular
7a	10 µM	92.0	100 µM	80.0
7b	10 µM	85.0	100 µM	73.0
7c	10 µM	78.0	100 µM	68.0
7d	10 µM	57.0	100 µM	52.0
Tween a 3%	10 µM	6.00	100 µM	0.16
DMSO a 0.05%	10 µM	>99.0	100 µM	99.0

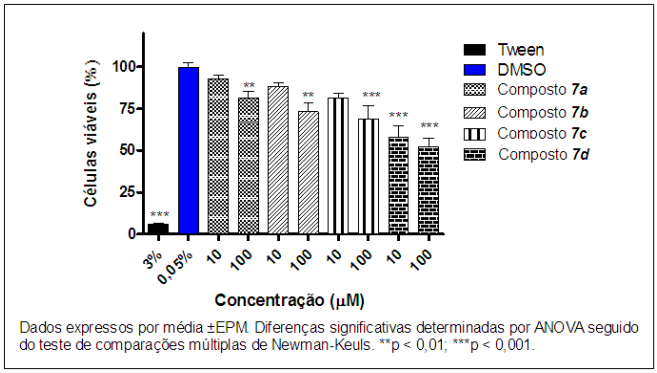
Fonte: Autor, 2015.

Nota: Tween a 3%, controle de morte; DMSO a 0.05%, controle de vida.

O gráfico 1 ilustra os resultados obtidos nos ensaios de MTT, mostrados na tabela 4 (acima)**.** É verificado que a série testada apresenta uma toxicidade relativamente baixa.

Com relação aos compostos ativos ***7b*** e ***7c***, estes apresentam CC_{50} maior do que 100 µM, o que sugere uma equivalência ao BnZ, pois de acordo com dados da literatura obtidos por Moreira e colaboradores (2014), o BnZ apresenta CC_{50}>100 µM.

Gráfico 1 – Resultados dos ensaios de MTT para a série *7a-d.*



Fonte: Autor, 2015.

Nota: EPM: erro padrão médio.

5.6 Atividade Antichagásica em Formas Tripomastigotas (*in vitro*)

Após a obtenção dos resultados da avaliação biológica sobre as formas amastigotas, foram realizados ensaios em formas tripomastigotas do parasito *T. cruzi* (Tabela 5).

É observado que o composto ***3d*** é o mais eficaz dentre os demais, apresentando 84% de inibição das tripomastigotas, a 25 µM. Além disso, foi verificado que este apresenta uma IC_{50} menor do que o fármaco usando como controle positivo, BnZ.

Tabela 5 - Resultados da avaliação da atividade antichagásica, *in vitro,* dos compostos sintetizados sobre células *MK2* infectadas com formas tripomastigotas do parasito *T. cruzi*.

(continua)

Compostos	**Tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi***	
	% inibição (25 µM)	**IC_{50} (µM)**
2a	1.6	>25
2b	5.8	>25
2c	11.9	>25
2d	15.1	>25

Tabela 5 - Resultados da avaliação da atividade antichagásica, *in vitro*, dos compostos sintetizados sobre células *MK2* infectadas com formas tripomastigotas do parasito *T. cruzi* ***(conclusão)***

3a	3.2	>25
3b	27.0	>25
3c	4.5	>25
3d	84.1	10.3
4a	10	>25
4b	7.7	>25
4c	7.1	>25
4d	6.7	>25
5a	9.0	>25
5b	27.7	>25
5c	16.7	>25
5d	6.7	>25
6a	6.4	>25
6b	6.4	>25
6c	5.1	>25
6d	7.7	>25
7a	5.8	>25
7b	4.5	>25
7c	5.1	>25
7d	6.1	>25
BnZ	100.0	11.4
DMSO+RPMI	0.01	>25

Fonte: Autor, 2015.

Nota: **BnZ** – controle positivo; **DMSO+RPMI** – controle negativo.

De modo geral, não foram obtidas as IC_{50} para os demais compostos testados, sugerindo que doses mais elevadas sejam necessárias para a obtenção de tais resultados.

5.7 Relação entre os Estudos de *Docking* e Ensaios Biológicos

De acordo com os dados obtidos e expressos nas tabelas 1, 2, 3 e 5, pode-se afirmar que há uma relação entre os resultados do estudo de *docking* e os compostos que se mostraram ativos nos ensaios biológicos desenvolvidos.

Ao observar a tabela 2, percebe-se que a série ***7a-d*** apresenta uma afinidade maior pela enzima *Tc*DHFR (E_{FG}= -7.99 kcal/mol), sendo os melhores compostos, ***7b*** e ***7c***, resultados refletidos na tabela 3. Desse modo, pode-se sugerir que tais compostos possam desempenhar seu mecanismo de ação através da inibição da *Tc*DHFR de formas amastigotas, impedindo a redução do folato e, consequentemente, conduzindo à morte do parasito (SCHORMANN *et al.*, 2010; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014).

Com relação ao composto ***3d***, este se mostrou com maior afinidade pelo sítio ativo da enzima *Tc*TS (E_F= -7.29 kcal/mol) e apresentou atividade sobre formas tripomastigotas (IC_{50}= 10.3 µM). Porém, este não se mostrou ativo para células infectadas com formas amastigotas do *T. cruzi*. Tal fato, provavelmente está relacionado à fisiologia do parasito, uma vez que, a enzima *Tc*TS é expressa apenas na estágio tripomastigota (COLLI, 1993). Desse modo, não causa controvérsia entre os resultados biológicos, além de validar os ensaios de *docking*.

Ademais, a baixa porcentagem de inibição das formas tripomastigotas que alguns compostos apresentaram, provavelmente esta relacionada à baixa solubilidade destes e/ou fatores fisiológicos dos parasitos.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conclui-se que as metodologias sintéticas empregadas foram bastante eficazes, possibilitando a obtenção de um total de 24 compostos finais, com rendimentos variando em 40 e 98%, sem a utilização de catalisadores. Desse total de compostos, quatro são pertencentes à classe dos tioureicos e vinte tiazolidínicos.

Todos os derivados obtidos foram satisfatoriamente caracterizados e validados pelas de técnicas de RMN de hidrogênio e carbono treze.

De modo geral, os compostos obtidos apresentaram valores de cLogP elevados, sugerindo uma alta lipofilicidade para estes. Em adição, este fato pode estar diretamente relacionado à atividade desempenhada por estes.

De acordo com ensaios de *docking* molecular,cinquenta por cento dos compostos obtidos apresentaram afinidade pela enzima *Tc*TS e, os demais pela *Tc*DHFR. Dentre estes, três se mostraram bastante promissores como possíveis fármacos antichagásicos em ensaios biológicos.

Por fim, o composto ***3d*** se mostrou como um provável inibidor da *Tc*TS, em tripomastigotas, e os compostos ***7b*** e ***7c,*** inibidores da *Tc*DHFR em formas amastigotas, ambos com valores de IC_{50} menores do que o fármaco padrão, benznidazol. Além disso, os respectivos compostos ativos apresentaram baixa toxicidade, não sendo observada morte em 50% da população de células *MK2*em dose até 100 μM.

Após a análise dos resultados contidos neste trabalho, objetiva-se variar as regiões anteriormente planejadas para os compostos ***3d, 7b*** e ***7c***, com a finalidade de observar a influência de novos substituintes sobre as interações críticas observadas e/ou surgimento de nova interações capazes de contribuir com a formação do complexo. Inicialmente, almeja-se modificar o volume hidrofóbico dos compostos, variando o anel de seis membros (tetraidrobenzotiofeno), sendo este, substituído anéis de sete e oito membros. Tal modificação visa aumentar o contato destes novos ligantes com o sítio hidrofóbico presente nas enzimas, através do aumento do volume espacial.

Com relação ao composto ***3d***, além da modificação hidrofóbica, pretende-se substituir o volume do grupamento ligado ao éster, de maneira a reduzir o número de carbonos. Esta modificação visa desproteger mais o grupo éster que, neste caso, funciona como domínio aceptor da molécula.

Para os compostos ***7b*** e ***7c***, objetiva-se verificar a influencia de novos substituintes ligados ao anel aromático proveniente do agente ciclizante bromoacetofenona.

Provavelmente, a utilização de um grupo *p*-cloro neste anel acarretaria em um aumento da hidrofobicidade da molécula, o que conduziria ao aumento da atividade biológica destes.

Após a avaliação de todas estas modificações supracitadas em ensaios de *docking* molecular, observando as interações e os resíduos envolvidos nestas, rendendo bons resultados, a nova série de compostos será sintetizada. Em seguida, esta será testada em ensaios com amastigotas e tripomastigotas, com a finalidade de observar o aumento da atividade biológica.

Além disso, as séries de compostos testadas neste trabalho e a nova série de compostos futuros serão estudas mediantes ensaios visando atividade leishmanicida, uma vez que esta também está contida na família *Trypanosomatidae.*

Por fim, as informações futuramente obtidas com esta nova série de compostos alimentará o banco de dados sobre ligantes e alvos importantes do *T. cruzi* e *Leishmania sp.*, cujo está em pleno andamento, com informações que irão auxiliar o desenvolvimento de novos protótipos com atividade antichagásica e/ou leishmanicida.

REFERÊNCIAS

Referências

AQUINO, Thiago Mendonça. **Síntese e Avaliação das Atividades Anti-*Toxoplasma gondii* e Anti microbiana de Benzaldeído 4-Fenil-3-tiossemicarbazonas e Derivados 2[(Fenilmetile no)hidrazono]-3-fenil-4- tiazolidinona-5-substituídos.** 2007. 217 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Recife, PE, 2007.

BABA, N.; AKAHO, E. VSDK: Virtual Screening of Small Molecules Using AutoDock Vina on Windows Platform. **Bioinformation**, v. 6, n. 10, p. 387-388, 2011.

BERN, C. et al. Congenital *trypanosoma cruzi* Transmission in Santa Cruz, Bolivia. **Clinical Infection Diseases,** v. 49, n. 11, p. 1667-1674, 2009.

BILBAO-RAMOS, P. et al. Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities. **Parasitology International,** v. 61, n. 4, p. 604-613, 2012.

BERRIDGE, M. V. et al. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, n. [*s.l*], p. 14-19, 1996.

BUSCHIAZZO, A. et al. The Crystal Structure and Mode of Action of *Trans*-Sialidase, a Key Enzyme in *Trypanosoma cruzi* Pathogenesis. **Molecular Cell**, v. 10, n. 4, p. 757-768, 2002.

CABALLERO, A. B. et al. Triazolopyrimidine compounds containing first-row transition metals and their activity against the neglected infectious Chagas disease and leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 85, n. [*sl*], p. 526-534, 2014.

CAPUTTO, M. E. et al. Thiosemicarbazones Derived From 1-indanones as New Anti-*Trypanosoma cruzi* Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v. 19, n. 22, p. 6818-6826, 2011.

CARDOSO, M. V. O. et al. 2-Pyridyl Thiazoles as Novel Anti-*Trypanosoma cruzi* Agents: Structure Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 86, n. [*sl*], p. 48-59, 2014.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. (Org.). **Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms**. 5. ed., Springer, 2007, 1199 p.

COLLI, W. Trans-sialidase: A Unique Enzyme Activity Discovered in the Protozoan *Trypanosoma cruzi*. **Faseb Journal**, v. 7, n. 13, p. 1257-1264, 1993.

COSCONATI, S. et al. Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. **Expert Opinion Drug Discovery,** v. 5, n. 6, p. 597-607, 2010.

EL-SHARKAWY, K. A.; EL-SAYED, N. N. E.; ZAKI, M. Y. Uses of 2-Amino-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile in the Synthesis of Heterocyclic Compounds with Anticonvulsant, Behavioral and CNS Antidepressant Activities. **International Research Journal of Pure & Applied Chemistry,** v. 2, n. 1, p. 91-104, 2012.

ESTEVEZ, Y. et al. Trypanocidal Properties, Structure-Activity Relationship and Computational Studies of Quinoxaline 1,4-di-N-oxide Derivatives. **Experimental Parasitology,** v. 127, n. 4, p. 745-751, 2011.

FEROCI, M. et al. Activation of Elemental Sulfur by Electrogenerated Cyanomethyl Anion: Synthesis of Substituted 2-Aminothiophenes by the Gewald Reaction. **Advanced Synthesis and Catalysis,** v. 350, n. [*sl*], p. 2740-2746, 2008.

FREYMANN, D. M. et al. Efficient Identification of Inhibitor Targeting the Closed Active Site Conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. **Chemistry & Biology,** v. 7, n. 12, p. 957-968, 2000.

HAN, L. Y. et al. PEARLS: Program For Energetic Analysis Of Receptor-Ligand System. **Journal of Chemistry & Informatic Modelling,** v. 46, n. 1, p. 445-450, 2006.

HAN, Y.; TANG, W. Q.; YAN, C. G. Gewald-type Reaction of Double Activated 2,3-diarylcyclopropanes with Elemental Sulfur for Synthesis of Polysubstituted 2-aminothiophenes. **Tetrahedron Letters,** v. 55, n. 8, p. 1441-1443, 2014.

HAVRYLYUK, D.; ZIMENKOVSKY, B.; KARPENKO, O. et al. Synthesis of Pyrazoline-Thiazolidinone Hybrids with Trypanocidal Activity. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 85, n. [*sl*], p. 245-254, 2014.

INAOKA, D. K. et al. Structures of *Trypanosoma cruzi* Dihydroorotate Dehydrogenase Complexed with the Substrates and Products: Atomic Resolution Insights into Mechanisms of Dihydroorotate Oxidation and Fumarate Reduction. **Biochemistry,** v. 47, n. 41, p. 10881-10891, 2008.

KRYSHCHYSHYN, A. et al. Trends in Research of Antitrypanosomal Agents Among Synthetic Heterocycles. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 85, n. [*sl*], p. 51-64, 2014.

KUMAR, M. et al. *In silico* Investigation of Medicinal Spectrum of Imidazo-azines from the Perspective of Mutitarget Screening Against Malaria, Tuberculosis and Chagas Disease. **Journal of Molecular Graphics and Modelling,** v. 50, n. [*sl*], p. 1-9, 2014.

LEITE, A. C. L. et al. Synthesis, Docking, and *in vitro* Activity of Thiosemicarbazones, Aminoacyl-thiosemicarbazides and Acyl-thiazolidones Against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 3749-3757, 2006.

LIU, S. et al. Structures of Human Dihydroorotate Dehydrogenase in Complex with Antiproliferative Agents. **Structure,** v. 8, n. 1, p. 25-33, 2000.

MADDANI, M. R.; PRABHU, K. R. A Concise Synthesis of Substituted Thiourea Derviatives in Aqueous Medium. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 7, p. 2327-2332, 2010.

MILLER III, B. R.; ROITBERG, A. E. Design of e-Pharmacophore Models Using Compound Fragments for the *Trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi:* Screening for Novel Inhibitor Scaffolds. **Journal of Molecular Graphics and Modelling,** v. 45, n. [*sl*], p. 84-97, 2013.

MOREIRA, D. R. M. et al. Conformational Restriction of Aryl Thiosemicarbazones Produces Potent and Selective anti-*Trypanosoma cruzi* Compounds Which Induce Apoptotic Parasite Death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, n. [*sI*], p. 467-478, 2014.

MORENO-RODRÍGUEZ, A. et al. *In vitro* Antiparasitic Activity of New Thiosemicarbazones in Strains of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 87, n. [*sl*], p. 23-29, 2014.

NERES, J. et al. Discovery of Novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi Trans*-Sialidase from *in silico* Screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 3, p. 589-596, 2009.

OH, S. et al. Synthesis and Biological Evaluation of 2,3-dihydroimidazo[1,2-*a*]benzimidazole Derivatives Against *Leishmania donovani* and *trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 84, n. [*sl*], p. 395-403, 2014.

OLIVEIRA, P. et al. *Trypanosoma cruzi:* Genoma Characterization of Phosphatidylinositol Kinase Gene Family (PIK and PIK-related) and Identification of Novel PIK Gene. **Infection, Genetics and Evolution,** v. 25, n. [*sl*], p. 157-165, 2014.

PAPADOPOULOU, M. V. et al. Novel Nitro(triazole/imidazole)-based Heteroarylamides/Sulfonamides as Potential Antitrypanosomal Agents. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 87, n. [*sl*], p. 79-88, 2014.

PINHEIRO, M. P.; EMERY, F. S.; NONATO, M. C. Target Sites for the Design of Anti-trypanosomatid Drugs Based on the Structure of Dihydroorotate Dehydrogenase. **Current Pharmaceutical Design,** v. 19, n. 14, p. 2615-2627, 2013.

PINHEIRO, Matheus Pinto. Planejamento de inibidores das enzimas di-idroorotato desidrogensae de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major***.** 2012. 169f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

PUTEROVÁ, Z.; KRUTOSÍKOVÁ, A.; VÉGH, D. Gewald Reaction: Synthesis, Properties and Applications of Substituted 2-aminothiophenes. **Arkivoc,** v. 1, n. [*sl*], p. 209-246, 2010.

RODRIGUES, R. F. et al. Investigation of Trypanothione Reductase Inhibitory Activity by 1,3,4-Thiadiazolium-2-aminide Derivatives and Molecular Docking Studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 1760-1766, 2012.

SCHORMANN, N. et al. Docking and Biological Activity of Pteridine Analogs: Search for Inhibitors of pteridina Reductase Enzymes from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 635, n. 1-3, p. 37-44, 2003.

SCHORMANN, N. et al. Synthesis and Characterization of Potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Dihydrofolate Reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 4056-4066, 2010.

SERAFIM, R. A. M. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Hybrid Bioisoster Derivatives of *N*-acylhydrazone and Furoxan Groups With Potential and Selective Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 82, n. [*sI*], p. 418-425, 2014.

SINGH, S.; GUPTA, A. K.; VERMA, A. Molecular Properties and Bioactivity Score of The *Aloe vera* Antioxidant Compounds in Order to Lead Finding. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences,** v. 4, n. 2, p. 876-881, 2013.

SMITH, M. B.; MARCH, J. (Org.). **Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**. 5. ed., Wiley Inter-Science, 2001, 2083 p.

SOARES, M. B. P. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Nicotinamide. **Acta Tropica,** v. 122, n. 2, p. 224-229, 2012.

SOUZA, D. H. S. et al. Current Epidemiological Profile of Chagasic Megaesophagus in Central Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 46, n. 3, p. 316-321, 2013.

TAVARES, L. C. A Abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry,** v. 31, n. 2, p. 455-461, 2009.

VARA, Y. et al. Regiochemistry of the Microwave-assisted Reaction Between Aromatic Amines and α-bromoketones to Yiled Substituted 1H-indoles. Organic Biomolecular Chemistry, v. 6, n. [sl], p. 1763-1772, 2008.

VERDONK, M. L. et al. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. Proteins: Structure, Function, and Genetics, v. 52, n. [sl], p. 609-623, 2003.