

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Construção de um Modelo de Previsão de Atividade para o
Planejamento e Síntese de Triazóis Promissores para Inibição
da CYP51 de *Trypanosoma cruzi***

Larissa Henriques Evangelista Castro

2016



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

**CONSTRUÇÃO DE UM MODELO DE PREVISÃO DE ATIVIDADE
PARA O PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE TRIAZÓIS
PROMISSORES PARA INIBIÇÃO DA CYP51 DE *Trypanosoma cruzi***

LARISSA HENRIQUES EVANGELISTA CASTRO

Sob Orientação do Professor

Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna

e Coorientação do Professor

Marco Edilson Freire de Lima

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química Orgânica.

Seropédica, RJ
Dezembro, 2016

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

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

H355c Henriques Evangelista Castro, Larissa, 1990-
Construção de um Modelo de Previsão de Atividade
para o Planejamento e Síntese de Triazóis Promissores
para Inibição da CYP51 de Trypanosoma cruzi / Larissa
Henriques Evangelista Castro. - 2016.
102 f.

Orientador: Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna.
Coorientador: Marco Edilson Freire de Lima.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Química, 2016.

1. Doença de Chagas. 2. Docagem. 3. Método semi
empírico. 4. Esterol 14alfa-desmetilase. 5. Compostos
triazólicos. I. Rabello de Sant'Anna, Carlos Mauricio,
1965-, orient. II. Freire de Lima, Marco Edilson, -,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

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

LARISSA HENRIQUES EVANGELISTA CASTRO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química Orgânica.

Dissertação aprovada em 02/12/16

Prof. Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna, DEQUIM , UFRRJ
(Orientador)

Prof^a.Dr^a. Isabelle Karine da Costa Nunes, UFRJ

Prof^a.Dr^a. Renata Barbosa Lacerda, DCFAR/ICBS, UFRRJ

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar à Deus por abençoar e proteger sempre meus familiares e a mim, além de ter me proporcionado determinação, paciência e perseverança para aproveitar com sabedoria, cada oportunidade de crescimento obtida.

Aos meus pais Aydée e Leonidas, agradeço por todo amor, compreensão e incentivo durante toda minha vida, inclusive durante minha trajetória acadêmica. Pela educação que me foi passada, sempre baseada nos exemplos de integridade, caráter e humanidade, presentes em seus ensinamentos e atitudes.

Agradeço aos meus padrinhos Sueli e Otacir pelo carinho que têm comigo e por sempre incentivarem meu crescimento. Agradeço à minha família pelo seu apoio, por torcerem pelo meu sucesso e acreditarem no meu potencial. Em especial, à minha prima Ayda pelo seu companheirismo e sua lealdade, por ser uma grande amiga de todas as horas.

À Nina, que é parte fundamental da minha vida, por sua amizade sincera e pela alegria que ela nos proporciona a cada instante, mostrando que a felicidade pode ser encontrada nas coisas mais simples da vida.

Agradeço também aos meus amigos pelos bons momentos vividos juntos, com muitas risadas, brincadeiras e descontrações, sou grata por estarem por perto também nos momentos não tão agradáveis e pela certeza de que sempre estaremos juntos.

Agradeço ao Henrique pelo grande apoio que me deu durante toda a nossa graduação, e na etapa de pós-graduação também, sua ajuda foi fundamental para as pequenas e grandes conquistas dessa jornada que enfrentamos.

Tenho uma grande gratidão pelo Carlos Mauricio por aceitar me orientar em minha vida acadêmica, desde a iniciação científica durante a graduação, até o mestrado e futuramente no doutorado. Muito obrigada por ser esse profissional dedicado, prestativo, atencioso e generoso. Além disso, agradeço aos meus amigos do Laboratório de Modelagem Molecular da UFRRJ por toda ajuda e bons momentos compartilhados.

Agradeço ao meu coorientador Marco Edilson, por ter aceitado me auxiliar na minha pesquisa, me recebendo generosamente em seu grupo no Laboratório de Química Medicinal da UFRRJ, além disso, agradeço aos novos amigos que fiz, por terem me recebido tão bem.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que foi, sem dúvida uma segunda casa para mim. Na rural, eu tive, não somente a oportunidade de crescimento acadêmico e profissional, mas também a possibilidade de um grande crescimento pessoal, conhecendo

amigos importantes que levarei para minha vida e também, me proporcionando momentos únicos que ficarão para sempre na memória.

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

Aos órgãos de fomento, CAPES, FAPERJ e CNPq.

RESUMO

CASTRO, L. H. E.; **Construção de um Modelo de Previsão de Atividade para o Planejamento e Síntese de Triazóis Promissores para Inibição da CYP51 do *Trypanosoma cruzi***. 2016. 103p. Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2016

O *Trypanosoma cruzi* é o parasito causador da tripanossomíase americana (Doença de Chagas), uma doença tropical negligenciada antes restrita à América do Sul, América Central e México, mas que vem apresentando um número cada vez maior de casos no mundo. Atualmente, o tratamento da Doença de Chagas no Brasil é limitado ao uso do fármaco benzonidazol, que é pouco eficaz para a fase crônica da doença e causa efeitos colaterais agressivos, o que torna a pesquisa por novos fármacos imprescindível. Uma estratégia adotada para o desenvolvimento de compostos bioativos contra *T. cruzi* consiste na inibição de uma enzima essencial para a integridade da membrana celular do parasito, a enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51), causada pela coordenação de compostos contendo anéis heterocíclicos com o átomo de ferro do grupo heme presente na enzima, fundamental para a atividade. Dessa maneira, foram utilizadas nesse estudo técnicas de modelagem molecular, incluindo docagem molecular e cálculos quânticos semi-empíricos, para analisar a interação de uma série de compostos heterocíclicos de atividade conhecida sobre a CYP51 do *T. cruzi* e com isso se obter informações necessárias para a construção de um modelo efetivo para a previsão teórica da atividade destes compostos. O modelo proposto apresentou um bom coeficiente de correlação múltipla com os termos utilizados para sua construção, com um $r^2=0,84$. Esse modelo foi utilizado para o planejamento de novos triazóis derivados da piperina, com atividade teórica calculada promissora contra a CYP51 de *T. cruzi*. Alguns dos melhores compostos foram selecionados e sintetizados neste projeto, com a proposta de serem avaliados em testes *in vitro* e *in vivo* contra a doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas, docagem, método semi-empírico, esterol 14 α - desmetilase, compostos triazólicos.

ABSTRACT

CASTRO, L. H. E.; **Construction of a Theoretical Model for Prediction of Activity for The Design and Synthesis of Promising Triazoles as Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* CYP51.** 2016. 102p. Dissertation (Master in Chemistry, Organic Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2016

Trypanosoma cruzi is the parasite that causes american trypanosomiasis (or Chagas disease), a neglected tropical disease previously restricted to South and Central Americas and Mexico, but now with several cases around the world. Currently in Brazil, the treatment of Chagas disease is done, only using benznidazole, which is not effective for the disease's chronic phase and causes aggressive side effects, which explains the necessity of researches to find novel anti-Chagas compounds. A strategy adopted for the development of bioactive compounds against *T. cruzi* consists on the inhibition of the sterol 14 α -demethylase enzyme (CYP51), which is essential for the parasite's cellular membrane integrity. The inhibition can be achieved by a complexation of heterocyclic ring-containing compounds with the iron atom of heme group, present on CYP51. Thus, molecular modeling techniques were used on this study to analyze the interaction of a heterocyclic compounds (with known activity) with *T. cruzi* CYP51 in order to obtain the necessary information to construct an effective model for the theoretical activity prediction of these and also novel compounds. The proposed model presented a good multiple correlation coefficient ($r^2 = 0.84$) with the terms used to its construction. The model was used to help the design of novel piperine derivatives with a triazole ring, that presented promising theoretical activities against *T. cruzi* CYP51, calculated by the model. The most promising compounds were selected and synthesized with the purpose of being tested *in vitro* and *in vivo* against *T. cruzi*.

Keywords: Chagas disease, docking, semi-empirical, sterol 14 α -demethylase, triazolic compounds.

Índice de Esquemas

Esquema 1: Via da biossíntese do ergosterol. Em azul estão as enzimas e em roxo os seus inibidores respectivos. (FRANÇA, et al., 2014)	29
Esquema 2	41
Esquema 3	42
Esquema 4: Esquema da síntese dos derivados triazólicos planejados a partir da piperina.	68
Esquema 5: Síntese do cloreto de ácido.	69
Esquema 6: Proposta do mecanismo genérico de formação de cloretos de acila em presença de cloreto de oxalila (Adaptado de MARCH, 1985).	70
Esquema 7: Síntese da hidrazida.	70
Esquema 8: Síntese dos intermediários para a formação dos triazóis planejados.	73
Esquema 9: Mecanismo proposto para a obtenção dos intermediários carbotoamidas.	73
Esquema 10: Síntese dos compostos triazólicos.	74
Esquema 11: Mecanismo proposto para a obtenção dos derivados triazólicos.	74
Esquema 12: Proposta de fragmentação para o composto L1A. $m/z = 377$ (40%), 273 (30%), 172 (50%) e 135 (100%).	81
Esquema 13: Síntese dos compostos triazólicos alquilados.	82
Esquema 14: Síntese dos compostos triazólicos LnC	89
Esquema 15: Síntese dos compostos triazólicos LnD	90

Índice de Figuras

Figura 1: Distribuição mundial dos casos da doença de Chagas (2006-2010) (Adaptado de World Health Organization, 2013)	19
Figura 2: Estrutura genérica dos compostos heterocíclicos com atividade anti T. cruzi, estudados por Andrini e colaboradores.	20
Figura 3: Piper nigrum (pimenta do reino) e seus frutos secos, respectivamente.	20
Figura 4: Estruturas da piperina e estrutura genérica de seus derivados heterocíclicos.	21
Figura 5: Foto de Carlos Chagas o cientista que elucidou a doença de Chagas (Fiocruz).	22
Figura 6: Formas do T. cruzi encontrada no vetor Triatoma infestans e nos hospedeiros vertebrados - epimastigota, amastigota e tripomastigota.	23
Figura 7: Ciclo de transmissão do T. cruzi (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz (Ministério da Educação - Portal do Professor).	24
Figura 8: Sinais de infecção da doença de Chagas: sinal de Romaña à esquerda e Chagoma à direita (KINOSHITA-YANAGA, 2009).	25
Figura 9: Estrutura do nifurtimox, referente ao Lampit® (Bayer) e estrutura do benzonidazol, referente ao Radanil® (Roche)	27
Figura 10: Estrutura do núcleo do esterol, do ergosterol - biossintetizado por fungos e protozoários, e do colesterol- biossintetizado por mamíferos; em destaque, as diferenças entre as estruturas.	28
Figura 11: Exemplos de inibidores da síntese de ergosterol: inibidores da esterol 14 α -demetilase: cetoconazol (6) (WHO - World Health Organization, 1991), fluconazol (7) (DIAS, 1995) e o itraconazol (8) (BRENER, et al., 1979) ; inibidor da farnesil transferase: tipifarnib (9) (BRENER, 1968)	30
Figura 12: Etapas da reação de desmetilação do lanosterol no C14 catalisada pela CYP51 (WATERMAN, et al., 2005).	31
Figura 13: Representação do grupo heme ligado ao sítio ativo da CYP51 de T. cruzi (código no PDB: 46HO) interagindo com um resíduo de cisteína e com uma molécula de água, na ausência de um substrato. A enzima está na representação cartoon na cor verde, o grupo heme está representado na forma de bastões (C na cor magenta) e o resíduo de cisteína está representado na forma de bastões (C na cor ciano).	32
Figura 14: Compostos imidazólicos (10) e (11) com atividade anti-T. cruzi (VILLATA, et al., 2013).	33

Figura 15: Composto (12), com atividade contra <i>T. cruzi</i> (URBINA, et al., 2003).	33
Figura 16: Representação da formação de um complexo octaédrico, através da coordenação do Fe^{II} com os nitrogênios do anel do grupo heme, o enxofre da cisteína e um inibidor proposto.	34
Figura 17: Estrutura cristalográfica da enzima 14 α -desmetilase do <i>T. cruzi</i> (PDB: 4H6O) representada na forma cartoon na cor verde; Na região central da enzima, encontra-se o grupo heme representado por bastões na cor verde e o inibidor co-cristalizado, representado por bastões na cor azul.	47
Figura 18: A) Ligantes da Série A sobrepostos no sítio ativo da CYP51, interagindo com o ferro do grupo heme; B) Ligantes da Série B sobrepostos no sítio ativo da CYP51, interagindo com o ferro do grupo heme. A enzima está na representação de cartoon na cor verde, o grupo heme está representado na forma de bastões com carbonos na cor magenta e os ligantes estão representados na forma de bastões com carbonos na cor ciano.	52
Figura 19: Representação por superfície de caráter hidrofóbico existente no sítio ativo da CYP51, composta principalmente pelos resíduos de aminoácidos de tirosinas e fenilalaninas destacados em bastões com carbonos na cor roxa. Os ligantes da série B (representados por bastões com carbonos na cor ciano) estão na posição gerada pela docagem, próximo ao grupo heme (bastões com carbonos na cor magenta). Os grupos planejados para que sejam modificados nas posições R1 e R2 da estrutura genérica, encontram-se esquematizados em destaque.	60
Figura 20: Representação por superfície da cavidade de caráter hidrofóbico existente no sítio ativo da CYP51 (representada na forma de cartoon na cor verde), os resíduos principais dessa cavidade estão destacados em bastões com carbonos na cor violeta. Os ligantes da série L (representados por bastões com carbonos na cor ciano) estão na posição gerada pela docagem, próximos ao grupo heme (bastões com carbonos na cor magenta).	63
Figura 21: Melhores soluções geradas pela docagem molecular com os compostos da série L (representados em bastões com carbonos na cor ciano) interagindo com o grupo heme (representado por bastões com carbonos na cor magenta) da CYP51 de <i>T. cruzi</i> (representada por cartoon na cor verde).	64
Figura 22: Estrutura da hidrazida.	72
Figura 23: Estrutura do L3A.	76
Figura 24: Estrutura do triazol L1A.	79
Figura 25: Estrutura do derivado L3B.	84

Figura 26: Estrutura do triazol L1B.

87

Índice de Tabelas

Tabela 1: Estrutura dos compostos estudados por Andrine e colaboradores e seus respectivos valores de EC ₅₀ .	48
Tabela 2: Estrutura das 1,2,4-triazolo-3-tionas estudadas por Franklim e colaboradores e seus respectivos valores de CI ₅₀ .	49
Tabela 3: Valores de energia de solvatação (em kcal/mol) determinados utilizando o programa Spartan'14.	50
Tabela 4: Valores de RMSD (Å) para as 4 funções de pontuação testadas na redocagem e valores da média de RMSD para cada função de pontuação.	51
Tabela 5: Valores das pontuações da docagem (em duplicata) da Série A, com a respectiva distância (Å) entre o N heterocíclico e o Fe do grupo heme. (Continua)	53
Tabela 6: Valores das pontuações da docagem (em triplicata) com a respectiva distância (Å) entre o N triazólico da Série B e o Fe do grupo Heme.	54
Tabela 7: Valores de ΔH_{int} (kcal/mol) calculados pelo método PM6 (MOPAC2016), considerando diferentes constantes dielétricas, para os compostos da Série A.	55
Tabela 8: Valores de ΔH_{int} (kcal/mol, método PM6 do MOPAC2016) considerando diferentes constantes dielétricas, para os compostos da Série B.	56
Tabela 9: ΔH_{int} (kcal/mol, método PM6, MOPAC2016), ΔG_{solv} (kcal/mol, método SM5.4, Spartan'14), ΔE_{tor} (função ChemPLP, GOLD 5.4), log EC ₅₀ experimental (ANDRINE, et al., 2003), log EC ₅₀ calculado (Equação 7). (Continua)	57
Tabela 10: ΔH_{int} (kcal/mol, método PM6 do MOPAC2016), ΔG_{solv} (kcal/mol, método SM5.4 do Spartan'14), ΔE_{tor} (função ChemPLP do GOLD5.4), log CE ₅₀ calculado pela Equação 7 e valores de log CI _{50 exp} *	59
Tabela 11: Estrutura dos compostos planejados a partir da série B. (Continua)	61
Tabela 12: Valores das pontuações da docagem (em duplicata) com a respectiva distância entre o N triazólico da Série L e o Fe do grupo Heme e a média das pontuações.	65
Tabela 13: Valores calculados de ΔH_{int} , $\epsilon = 4$, ΔG_{Solv} , ΔE_{Tors} e logEC ₅₀ ^{Calc} determinados pela equação 7, para a série L.	66
Tabela 14: Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para a hidrazida.	72
Tabela 15: Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o triazol L3A (B6).	77
Tabela 16: Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o triazol L1A.	80
Tabela 17: Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o triazol L3B.	85

Tabela 18: Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o triazol L1B.	88
Tabela 19: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e ΔH_{int} para os compostos da Série A, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.	99
Tabela 20: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e ΔH_{int} para os compostos da Série A, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.	100
Tabela 21: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e ΔH_{int} para os compostos da Série A, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.	101
Tabela 22: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e $\Delta H_{int}(\epsilon=1)$ para os compostos da Série B, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.	102
Tabela 23: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e $\Delta H_{int}(\epsilon=4)$ para os compostos da Série B, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.	102
Tabela 24: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e $\Delta H_{int}(\epsilon=78,4)$ para os compostos da Série B, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.	103

LISTA DE ABREVIATURAS

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

RF	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio médio quadrático (do inglês, <i>root mean square deviation</i>).
SIB	Inibidores da biossíntese de esteróis (do inglês, <i>Steroids Biosynthesis Inhibitors</i>)
STO	Orbitais do tipo Slater (do inglês, <i>Slater type orbitals</i>).
T.A.	Temperatura Ambiente.
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
UV	Ultravioleta.
W	Watt
Å	ångströms.
ΔE_{tor}	Energia torsional.
ΔG_{solv}	Energia de solvatação.
ΔH_{int}	Entalpia de interação.
μL	Microlitro
μM	Micromolar.
3D	Tridimensional.

SUMÁRIO

1.	Introdução	19
2.	Revisão de Literatura	22
2.1.	A Doença de Chagas	22
2.1.1	Agente etiológico: Trypanosoma cruzi	22
2.1.2	Transmissão	23
2.1.3	Ciclo do parasito	23
2.1.4	Manifestações clínicas	24
2.1.5	Prevenção	25
2.1.6	Tratamento	26
2.2.	Alvo Quimioterápico para Novos Fármacos: Inibição da Biossíntese de Esteróis	27
2.2.1	Biossíntese de esteróis	27
2.2.2	Esterol 14 α -desmetilase (CYP51)	30
2.2.3	Compostos azólicos na inibição da biossíntese de esteróis	32
2.3.	Modelagem Molecular	34
2.3.1	Método semi-empírico	35
2.3.2	Docagem molecular	36
3.	Justificativa	38
4.	Objetivos	39
5.	Metodologia	40
5.1.	Modelagem Molecular	40
5.1.1	Estrutura cristalográfica da enzima	40
5.1.2	Construção dos ligantes	40
5.1.3	Redocagem e docagem	40
5.1.4	Cálculo de entalpia de interação CYP51-inibidor	41
5.1.5	Modelo teórico para a predição de atividade inibitória da CYP51	42

5.2.	Síntese de Derivados da Piperina Planejados	44
5.2.1	Reagentes e solventes	44
5.2.2	Equipamentos	44
5.2.3	Metodologia geral para a síntese dos triazóis	44
6.	Resultados e Discussão	47
6.1.	Construção de um Modelo Teórico	47
6.1.1	Estrutura cristalográfica da enzima	47
6.1.2	Ligantes	47
6.1.3	Redocagem e docagem molecular	51
6.1.4	Cálculo de entalpia de interação CYP51-inibidor	54
6.1.5	Modelo teórico para a predição de atividade inibitória da CYP51	57
6.2.	Planejamento de Derivados da Piperina	59
6.2.1	Docagem molecular	62
6.2.2	Parâmetros teóricos e atividade calculada	65
6.3.	Síntese de Compostos Planejados	67
6.3.1	Preparação do cloreto do ácido (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienóico	69
6.3.2	Preparação da (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dieno-hidrazida	70
6.3.3	Preparação dos intermediários 2-[(2E,4E)-5-(1,3benzodioxol -5-il)penta-2,4-dienoil]-N-alquil/aryl-hidrazinocarbotioamida	73
6.3.4	Preparação dos derivados triazólicos (2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona)	74
6.3.5	Derivados triazólicos alquilados	82
6.3.6	Síntese dos derivados oxidados L3C	89
6.3.7	Síntese do derivado oxidado L3D	90
7.	Conclusões	91
8.	Referências Bibliográficas	92
9.	Anexo	99

1 Introdução

O *Trypanosoma cruzi* é o parasito causador da tripanossomíase americana, conhecida popularmente como doença de Chagas. A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada originalmente incidente em países pouco desenvolvidos econômica e socialmente, tendo maior número de casos na América do Sul, América Central e no México, mas que se encontra atualmente também em países desenvolvidos (GASCON, *et al.*, 2010).



Figura 1: Distribuição mundial dos casos da doença de Chagas (2006-2010) (Adaptado de World Health Organization, 2013)

Um grande problema associado às doenças negligenciadas é o pouco interesse que as indústrias farmacêuticas apresentam para investir na pesquisa e no desenvolvimento de fármacos para o tratamento dessas doenças. Isso pode ser atribuído ao fato destas doenças atingirem a parcela mais pobre da população, que não tem condições de pagar por medicamentos caros; sendo assim, as empresas não vislumbram grande lucratividade com a comercialização de medicamentos para tais doenças.

A doença de Chagas faz parte dessa realidade, pois atualmente existem apenas poucos fármacos utilizados para o tratamento da doença. Entretanto, tais medicamentos apresentam efeitos colaterais severos (COURA, *et al.*, 2002) (MAYA, *et al.*, 2007).

Um alvo que vem sendo explorado na busca por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas é a enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51) (ALCAZAR-FUOLI, *et al.*, 2008), da família citocromo P450. Essa enzima é fundamental para a sobrevivência do *T. cruzi*, pois participa da etapa de desmetilação para a biossíntese de esteróis, que são componentes das membranas celulares de diversos organismos vivos, inclusive o *T. cruzi*. Dessa maneira, uma vez que se consiga inibir a atividade desta enzima, a produção de esterol será interrompida e a estrutura celular do parasito será comprometida, acarretando em sua morte (PODUST, *et al.*, 2001).

Uma estratégia utilizada para a inibição da CYP51 é a utilização de compostos que tenham capacidade de se complexar, geralmente através de um anel heterocíclico, com o átomo de ferro presente no grupo Heme da enzima (PODUST, *et al.*, 2001).

Os inibidores da biossíntese de esteróis (do inglês, sterol biosynthesis inhibitors - SBI) constituem o maior e o mais importante grupo de compostos já desenvolvidos para o controle de doenças fúngicas em plantas e animais, exibindo, frequentemente, altíssima potência antifúngica;

incluem compostos químicos estruturalmente muito diversificados, dentre eles os triazóis, imidazóis, pirimidinas, morfina, piperazinas, entre outros (BRENDT, K. J., 1995). Os SBI são separados em classes de acordo com o alvo enzimático que eles apresentam e, entre elas, a classe dos inibidores da desmetilação de esteróis (do inglês, sterol demethylation inhibitors - DMI), que inibem a CYP51, é a que tem apresentado maior destaque. Estes resultados estimularam estudos de compostos heterocíclicos, incluindo triazóis, imidazóis, piridinas e pirimidinas, como possíveis inibidores da CYP51 do *T. cruzi* (PODUST, *et al.*, 2001).

Tendo em vista o potencial inibitório dos DMI's, Andrini e colaboradores desenvolveram um estudo com uma série de compostos que apresentam anéis heterocíclicos ligado a um anel lipofílico, sintetizados com diferentes espaçadores entre esses grupos, conforme apresentado na Figura 2.

Esses compostos tiveram as suas atividades determinadas por ensaios *in vitro* com meio de cultura contendo formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Demonstraram ser bons inibidores do processo de infecção por *T. cruzi*, sendo inclusive obtida uma estrutura cristalográfica da enzima CYP51 co-cristalizada com um dos inibidores que apresentou melhor atividade, corroborando a proposta de que, de fato, o mecanismo de atuação dos compostos seria pela inibição da CYP51 de *T. cruzi* (ANDRINE, *et al.*, 2003).

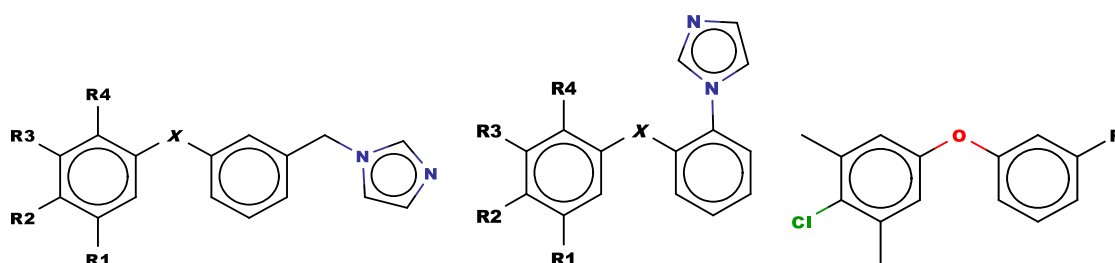


Figura 2: Estrutura genérica dos compostos heterocíclicos com atividade anti *T. cruzi*, estudados por Andrini e colaboradores.

Outra linha de pesquisa desenvolvida também com objetivo avaliar a atividade de novos compostos contra *T. cruzi*, realizada pelo grupo coordenado pelo Prof. Marco Edilson F. Lima, da UFRRJ, utilizou a piperina extraída e isolada de frutos secos da *Piper nigrum*, conhecida popularmente como pimenta do reino (Figura 3), para sintetizar derivados através da incorporação de núcleos 1,2,4-triazolas-3-tionas em sua estrutura (Figura 4). O planejamento desses derivados foi baseado na provável capacidade de coordenação de um dos heteroátomos triazólicos com o Fe do grupo Heme da CYP51 de *T. cruzi*, levando a uma inibição da biossíntese de ergosterol, além da atividade já descrita na literatura da piperina e de seus derivados (FRANKLIM, *et al.*, 2013).



Figura 3: Piper nigrum (pimenta do reino) e seus frutos secos, respectivamente.

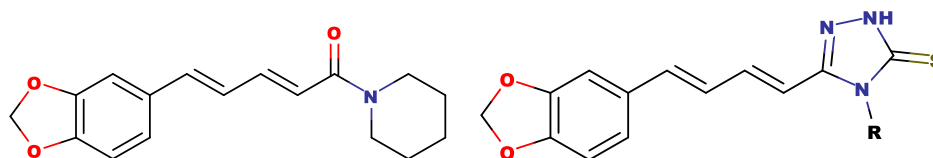


Figura 4: Estruturas da piperina e estrutura genérica de seus derivados heterocíclicos.

Esses compostos tiveram sua atividade determinada por ensaios *in vitro* e alguns apresentaram uma boa inibição, com valores de CI_{50} entre 44,20 e 13,22 μM , contra formas epimastigotas de *T. cruzi* e, desse modo, podem ser considerados compostos bioativos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (FRANKLIM, *et al.*, 2013).

No presente trabalho foi utilizada uma série de imidazóis de atividade conhecida, estudados por Andriani e colaboradores, para se construir um modelo teórico para a previsão da inibição da CYP51 de *T. cruzi*, por modelagem molecular. Este modelo foi empregado para avaliar o efeito de mudanças estruturais na série original, objetivando a obtenção de compostos mais ativos na inibição da enzima. Os compostos planejados de perfil mais promissor foram selecionados e sintetizados neste trabalho.

2 Revisão de Literatura

1.1. A Doença de Chagas

A doença de Chagas foi descoberta pelo médico e cientista brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (Figura 5) em 1909, enquanto era pesquisador assistente do Instituto Oswaldo Cruz. Ele identificou o agente etiológico, o vetor, o hospedeiro, as manifestações clínicas e a epidemiologia da doença, tornando notável às autoridades da época a importância médica e social da doença (CHAGAS, 1909).



Figura 5: Foto de Carlos Chagas o cientista que elucidou a doença de Chagas (Fiocruz).

A doença é característica do continente americano, motivo pelo qual é denominada tripanossomíase americana, atingindo México, parte da América Central e toda América do Sul de maneira endêmica. Contudo, o processo migratório, o turismo, o uso de drogas e outros meios de transmissão, contribuíram para a disseminação da doença em países de regiões não endêmicas (GASCON, *et al.*, 2010). Existem entre 6 e 7 milhões de infectados pelo mundo nas regiões endêmicas principalmente e com a globalização, milhões de indivíduos correm risco de contaminação (WHO-World Health Organization).

Até os dias de hoje, não há perspectiva de criação de uma vacina para a doença de Chagas e o tratamento contra a doença ainda é pouco efetivo (COURA, *et al.*, 2002). Sendo assim, pesquisas para o desenvolvimento de quimioterápicos são recorrentes e de extrema importância para seu controle.

1.1.1 Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado que pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (LEVINE, *et al.*, 1980). A ordem Kinetoplastida é caracterizada pela presença do cinetoplasto, que se trata de uma região especializada que contém o DNA mitocondrial (TELLERIA, *et al.*, 2006). O *T. cruzi* se desenvolve em insetos hematófagos da família *Reduviidae*, em pequenos mamíferos de vida silvestre e em humanos, nos quais causa a doença de Chagas.

O *T. cruzi* pode se apresentar sob as formas amastigota, epimastigota, tripomastigota e promastigota (raramente nesta forma) (Figura 6). As amastigotas são formas de replicação intracelular presentes na fase crônica da doença, que têm por característica não possuir organelas de locomoção, apresentar pouco citoplasma, núcleo grande e se multiplicar por

divisão binária (LOZANO, 2011). As formas epimastigotas são encontradas no tubo digestivo do vetor, não são infectantes para os vertebrados, têm forma fusiforme e apresentam o cinetoplasto junto ao núcleo, possuindo flagelo, membrana ondulante e se multiplicam por divisão binária simples no vetor (NEVES, *et al.*, 2005). As formas tripomastigotas são fusiformes e alongadas com flagelo de grande mobilidade próximo ao cinetoplasto, ocorrendo na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados e no tubo digestivo do vetor (TYLER, *et al.*, 2001).

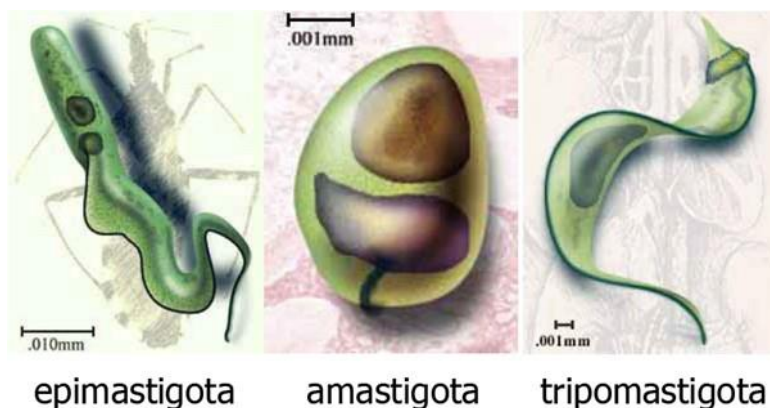


Figura 6: Formas do *T. cruzi* encontrada no vetor *Triatoma infestans* e nos hospedeiros vertebrados - epimastigota, amastigota e tripomastigota.

1.1.2 Transmissão

A principal forma de transmissão do *T. cruzi* para o ser humano e outros animais, se dá pelo inseto hematófago *Triatoma infestans* (Triatominae), popularmente conhecido como barbeiro, que pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Quando o inseto pica o indivíduo para se alimentar de seu sangue, usualmente no período da noite, ele libera imediatamente tripomastigotas do *T. cruzi* através das fezes, que penetram no hospedeiro humano quando o mesmo coça o ferimento deixado pela picada, como consequência do prurido intenso que a picada causa; os tripomastigotas podem penetrar o hospedeiro através das mucosas, caindo assim na corrente sanguínea (ANDREOLLO, *et al.*, 2009).

Outras formas de transmissão incluem a transfusão de sangue, transmissão vertical e contaminação oral por ingestão de alimentos contaminados. Já mecanismos secundários de infecção ocorrem por acidentes laboratoriais, transplante de órgãos e mesmo por vetores que não os triatomíneos (ROQUE, *et al.*, 2008).

1.1.3 Ciclo do parasito

Na Figura 7, é possível observar um esquema simplificado das principais etapas do ciclo do *T. cruzi*, que se divide em dois estágios, um ocorre no triatomíneo e o outro no hospedeiro vertebrado.

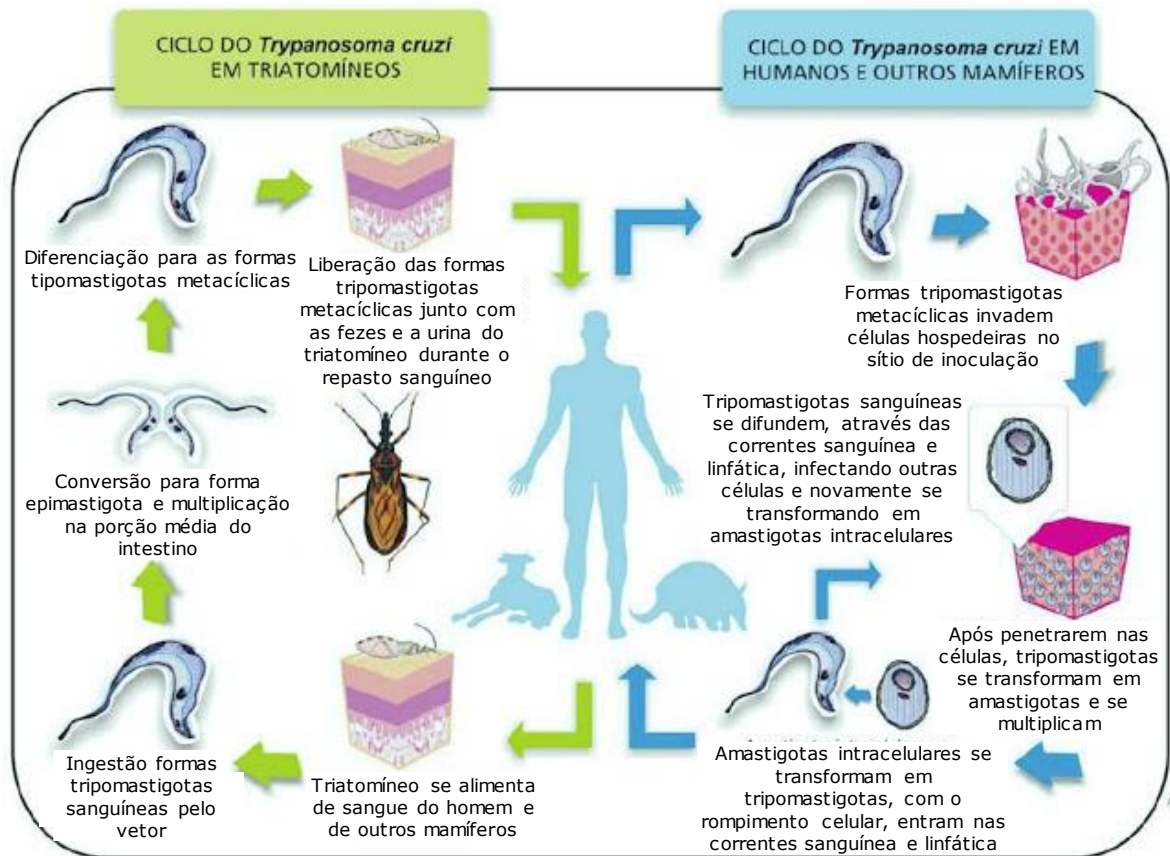


Figura 7: Ciclo de transmissão do *T. cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz (Ministério da Educação - Portal do Professor).

No vetor, o ciclo do parasito inicia-se durante a alimentação do barbeiro; assim, as formas tripomastigotas, que estão presentes na corrente circulatória de hospedeiros mamíferos, são ingeridas pelo vetor. No intestino médio do triatomíneo, as formas tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas, as quais se multiplicam por divisão binária simples e migram para o intestino posterior, onde novamente se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas que são liberadas juntamente com as fezes (DAROCHA, *et al.*, 2002).

Já no hospedeiro vertebrado, o ciclo tem início quando as formas tripomastigotas metacíclicas entram em contato com mucosas ou lesões na pele. Estas formas invadem os primeiros tipos celulares que encontram, podendo ser células epiteliais, macrófagos, fibroblastos, entre outras, onde se converte na forma amastigota; ocorre proliferação intracelular por sucessivas divisões binárias e liberação de novas formas tripomastigotas, assim como formas intermediárias e amastigotas, em menor proporção (ANDRADE, *et al.*, 2011).

1.1.4 Manifestações clínicas

Existem dois estágios clínicos associados à doença de Chagas, que são o estágio agudo e o estágio crônico. O período de tempo entre o término da fase aguda e os primeiros sintomas da fase crônica é denominado período de latência ou indeterminado (KASHIWABARA, *et al.*, 2013).

A fase patológica aguda se inicia de 4 a 12 dias após a infecção e dura em média de 6 a 8 semanas (KASHIWABARA, *et al.*, 2013). É comum o aparecimento de sinais de porta de entrada da infecção, como sinal de Romaña e o Chagoma de inoculação, ambos apresentados na **Figura 8**. O sinal de Romaña corresponde a um edema indolor na pálpebra inferior e superior de um dos olhos, que apresenta uma coloração eritematoso-violácea, congestão conjuntival e linfonodomegalia satélite. Já o Chagoma de inoculação consiste em um pequeno nódulo eritematoso que pode surgir em qualquer região do corpo em que o parasito possa ter picado.



Figura 8: Sinais de infecção da doença de Chagas: sinal de Romaña à esquerda e Chagoma à direita (KINOSHITA-YANAGA, 2009).

A fase aguda é caracterizada por ter poucos sintomas ou ser assintomática, mas quando se manifesta, apresenta um quadro febril, miocardite, alterações eletrocardiográficas, linfonodomegalia generalizada, hepatoesplenomegalia, manifestações neurológicas características de meningo-encefalite e manifestações cardíacas (COLOSIO, *et al.*, 2007) (SANTOS, 2011). A fase aguda sintomática ocorre principalmente em crianças, na primeira década de vida, podendo levar à morte devido a complicações decorrentes de insuficiência cardíaca e processos inflamatórios que envolvem o cérebro (BOAINAIN, *et al.*, 1979) (DIAS, 1993).

À medida que os níveis de parasitemia e as lesões inflamatórias da fase aguda diminuem de intensidade, uma miocardite focal se instala durante a fase indeterminada da doença, que é caracterizada por inexistência de manifestações clínicas (sinais e/ou sintomas da doença) significantes, eletrocardiogramas não apresentam alterações significativas, o coração, esôfago e cólon são radiologicamente normais e sorologia reagente, normalmente, diagnosticado em bancos de sangue (COLOSIO, *et al.*, 2007) (SANTOS, 2011).

Após o período de latência que pode durar vários anos, a fase crônica se manifesta podendo apresentar sintomas mais graves como a inflamação dos diversos tecidos infectados, além de complicações no sistema cardiovascular e digestivo, causados por mudanças anatômicas no miocárdio e no tubo digestivo. Nesta fase, observa-se reativação intensa do processo inflamatório (FRANÇA, *et al.*, 2014). A forma crônica cardíaca da doença é a mais relevante pela elevada morbimortalidade causada pelos diversos danos ocorridos no sistema de condução e pela falência cardíaca nos casos graves da Doença de Chagas (LUNARDELLI, *et al.*, 2007).

1.1.5 Prevenção

Tendo em vista que ainda não existe uma vacina contra a doença de Chagas, as medidas preventivas contra a doença são de extrema importância. As medidas de prevenção da doença estão diretamente relacionadas aos meios de transmissão do parasito,

principalmente pelo vetor triatomíneo. Sendo assim, elas se relacionam com as condições de vida do indivíduo, neste caso deve-se levar em consideração sua habitação, já que moradias inadequadas acabam alojando o inseto vetor; a transmissão via oral; a contaminação congênita; os possíveis acidentes, e a doação de sangue (NEVES, *et al.*, 2005).

Desse modo, a maior prevenção consiste em se proteger contra o vetor barbeiro e por isso, recomenda-se que as casas sejam feitas preferencialmente de alvenaria a fim de que o barbeiro não se aloje nas frestas e reentrâncias comuns em casas de pau-a-pique, sapê, madeira, barro, etc., que são materiais utilizados em residências mais rústicas, principalmente na zona rural. Além disso, o contato com o barbeiro pode ser evitado utilizando mosquiteiros, telas ou inseticidas, no período da noite principalmente, quando o barbeiro costuma se alimentar. Resumidamente, a prevenção da transmissão vetorial da doença consiste basicamente em eliminar ou reduzir o contato do homem com o vetor, sendo a retirada de triatomíneos no âmbito domiciliar um meio lógico de prevenção (SILVEIRA, *et al.*, 2011).

A transmissão por via oral tem um caráter mais aleatório e por isso o controle é mais difícil, entretanto, em áreas com presença de triatomíneos, medidas de higiene e seleção de alimentos adequada se tornaram imprescindíveis. E em caso de mães lactentes contaminadas é aconselhável a suspensão da amamentação caso essas estejam em fase aguda da doença (DIAS, *et al.*, 2011).

A prevenção para contaminação por transfusão sanguínea é feita com o controle do doador de sangue por meio da adoção de medidas profiláticas com o doador e durante a doação, com testes sorológicos, e triagem clínica dos doadores (MORAES-SOUZA, *et al.*, 2011).

1.1.6 Tratamento

Os únicos fármacos usados no tratamento da doença de Chagas são o nifurtimox (Lampit®, desenvolvido pela Bayer), que é um derivado do nitrofurano, e o benzonidazol (Rochagan®, Radanil®, desenvolvido pela Roche), que é derivado do nitroimidazol (Figura 9). Em geral, os dois fármacos apresentam resultados bons na fase aguda da doença, principalmente em crianças, com até 80% de eficácia, enquanto na fase crônica os resultados clínicos encontrados não são satisfatórios (10 a 20% de pacientes curados de acordo com diferentes análises); além disso, o tratamento permite adiar a progressão da doença durante a fase crônica, diminuindo, assim, a necessidade de recursos médicos durante essa fase da doença (COURA, *et al.*, 2002).

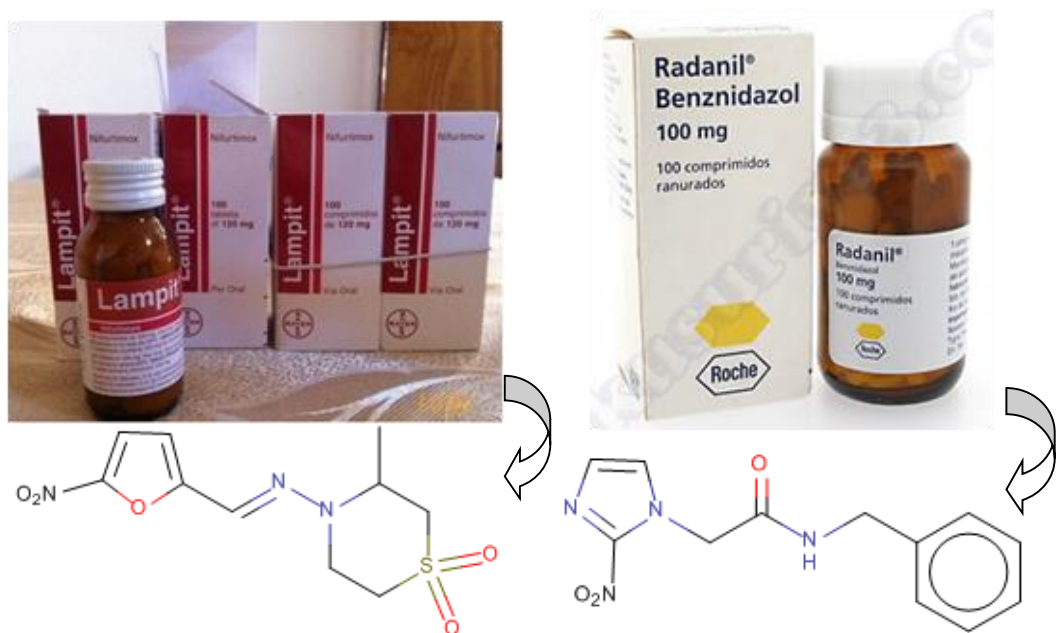


Figura 9: Estrutura do nifurtimox, referente ao Lampit® (Bayer) e estrutura do benznidazol, referente ao Radanil® (Roche)

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

Entretanto, ambos os fármacos apresentam alguns aspectos negativos como dosagem alta e por um longo período, efeitos colaterais graves e finalmente, como já dito, os fármacos não são tão eficazes na fase crônica da doença.

Dentre os efeitos colaterais causados pelo tratamento, pode-se ressaltar anorexia, dor abdominal, náusea, vômitos, cefaléia, febre, depressão do sistema nervoso central ou sintomas psicóticos, dermatites e parestesia (COURA, *et al.*, 2002) (MAYA, *et al.*, 2007).

O nifurtimox, em especial, teve sua comercialização suspensa no Brasil, na Argentina, no Chile e no Uruguai na década de 80 devido à existência de cepas resistentes, além de apresentar alta toxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade, mesmo em dosagens baixas; sendo assim, atualmente somente o benznidazol é utilizado para o tratamento da doença de Chagas.

1.2. Alvo Quimioterápico para Novos Fármacos: Inibição da Biossíntese de Esteróis

1.2.1 Biossíntese de esteróis

Os esteróis são biomoléculas derivadas de isoprenos, presentes na membrana da maioria das células eucarióticas. Eles apresentam um núcleo esteróide com quatro anéis de carbono fusionados, sendo que três deles possuem seis átomos de carbono e um possui cinco átomos de carbono (Figura 10) (LEHNINGER, *et al.*, 2011).

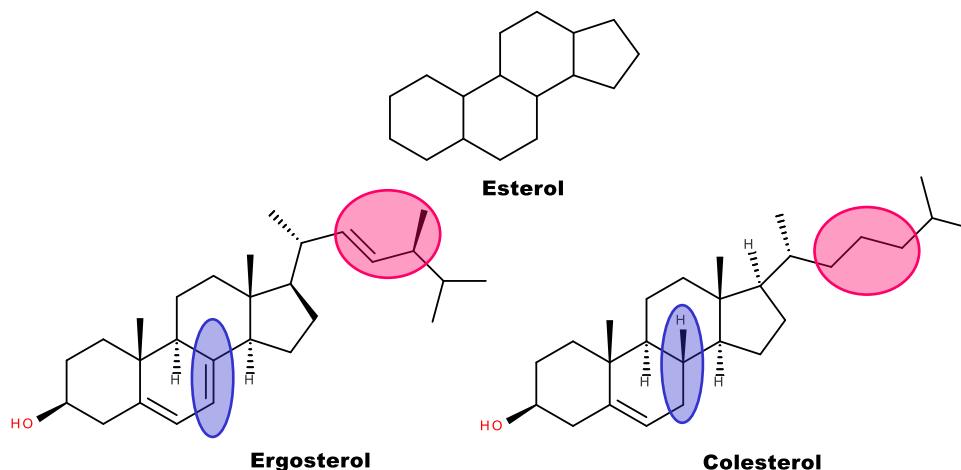
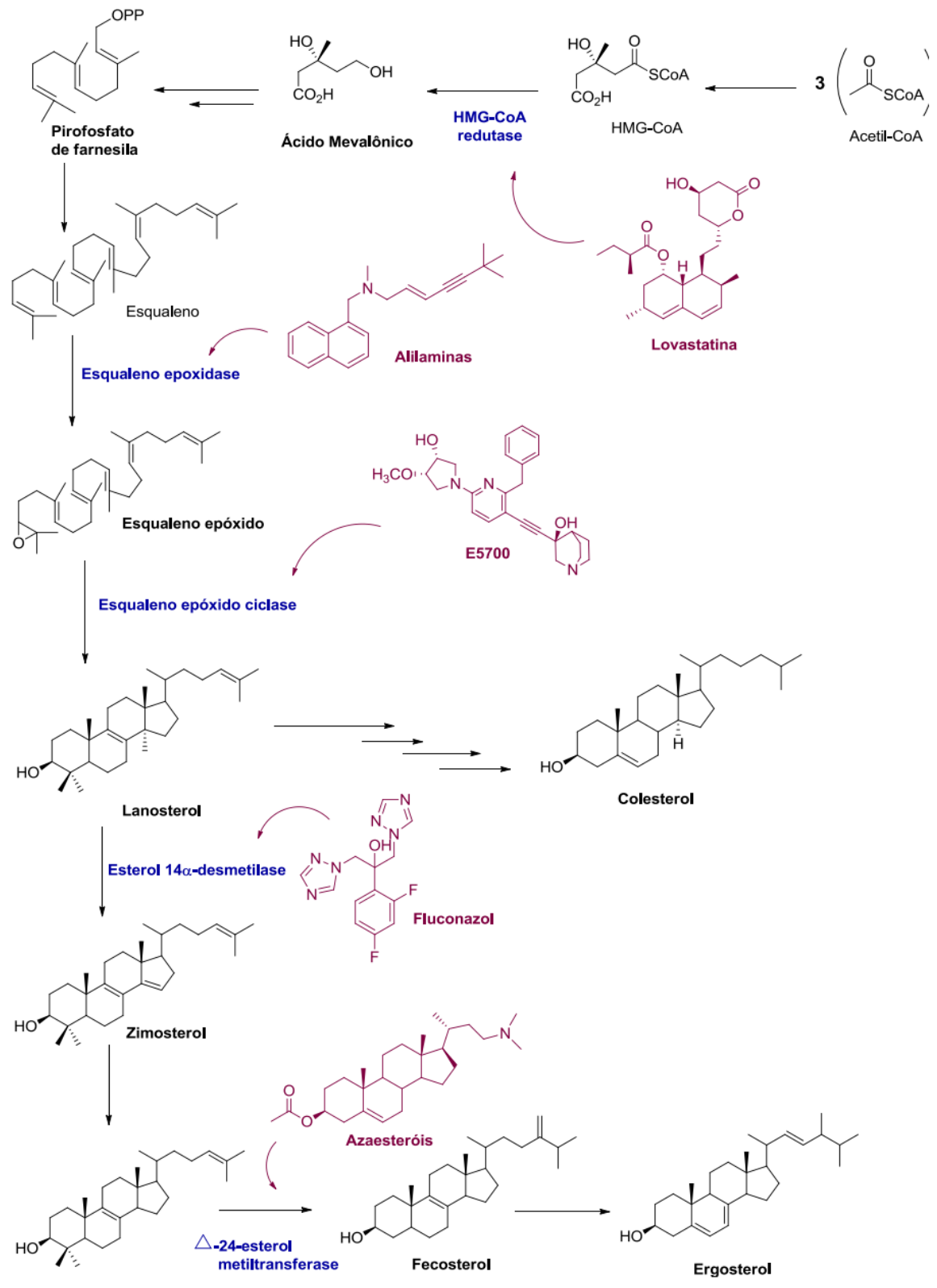


Figura 10: Estrutura do núcleo do esterol, do ergosterol - biossintetizado por fungos e protozoários, e do colesterol- biossintetizado por mamíferos; em destaque, as diferenças entre as estruturas.

Nos mamíferos, o produto final da biossíntese de esterol é o colesterol, enquanto que em fungos e protozoários, são produzidos 24-alkil-esteróis, como o ergosterol, que é responsável pela manutenção da estrutura e função da membrana plasmática (GOLAN, 2009). Os esteróis são fundamentais para a o crescimento, desenvolvimento e proliferação em todas as fases do ciclo de vida da maioria dos fungos e do protozoário *T. cruzi*.

Tendo em vista a grande importância do ergosterol para a sobrevivência do *T. cruzi*, um importante alvo para o desenvolvimento de quimioterápicos contra a doença de Chagas consiste em enzimas que participam das etapas da rota biossintética do ergosterol, já que, uma vez que se iniba efetivamente uma dessas enzimas, a produção de ergosterol fica comprometida, bem como a integridade da membrana plasmática das células do parasito. A biossíntese de esteróis é um processo que ocorre em várias etapas mediante a ação de diferentes enzimas, que transformam a acetilcoenzima A em colesterol ou ergosterol, como é o caso do *T. cruzi*. No Esquema 1, podemos observar as principais etapas da biossíntese do ergosterol, as enzimas envolvidas nessas etapas, além de alguns exemplos de inibidores de algumas etapas dessa via (FRANÇA, *et al.*, 2014).



Esquema 1: Via da biossíntese do ergosterol. Em azul estão as enzimas e em roxo os seus inibidores respectivos. (FRANÇA, *et al.*, 2014)

As enzimas dessa rota biossintética, que foram mais bem elucidadas até a atualidade, são a esterol 14 α -desmetilase, lanosterolsintase, esqualenoepoxidase, esqualenosintase, Δ -24 (25) esterol metiltransferase, farnesilpirofosfatosintase e a farnesiltransferase. Dentre os inibidores mais representativos da síntese de ergosterol têm-se os derivados azólicos inibidores da esterol 14 α -demetilase, cetoconazol (WHO - World Health Organization, 1991), fluconazol (DIAS, 1995) e itraconazol (BRENER, *et al.*, 1979), além do inibidor da farnesiltransferase, tipifarnib (BRENER, 1968) (Figura 11).

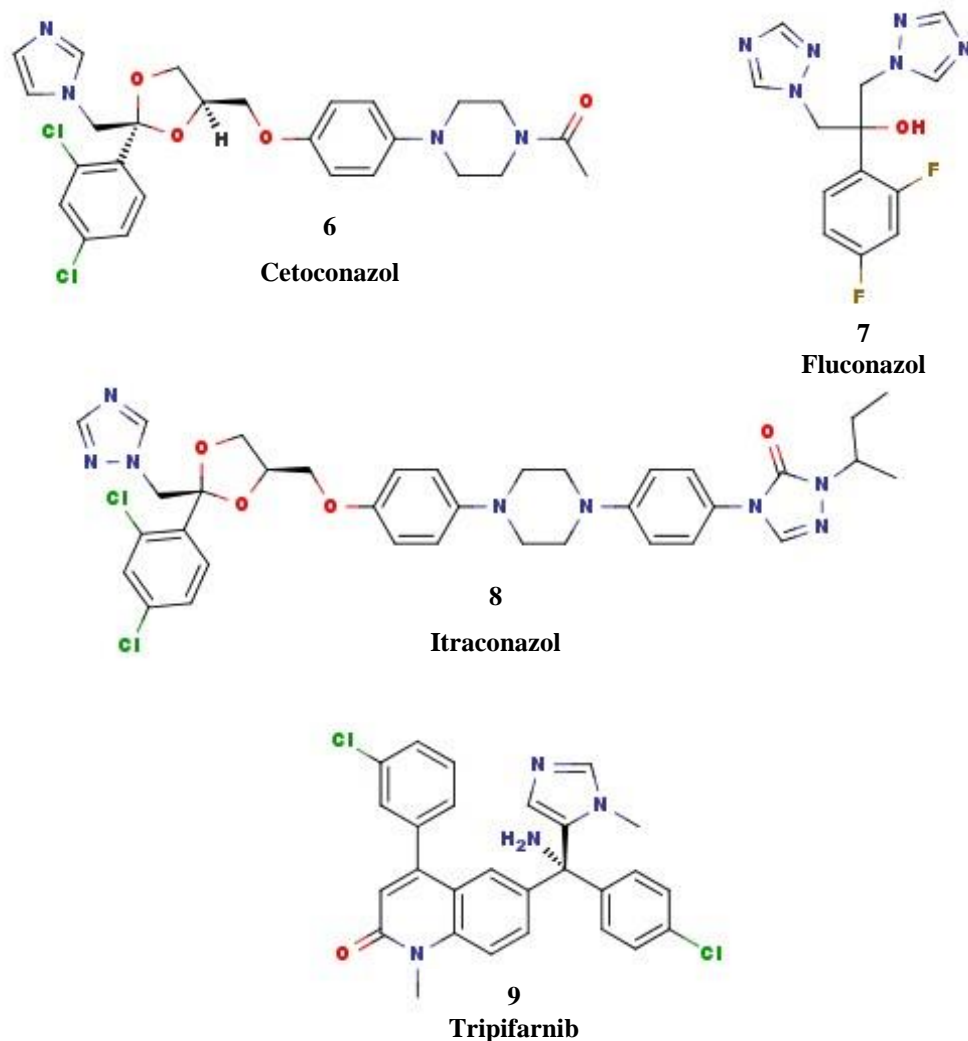


Figura 11: Exemplos de inibidores da síntese de ergosterol: inibidores da esterol 14 α -demetilase: cetoconazol (**6**) (WHO - World Health Organization, 1991), fluconazol (**7**) (DIAS, 1995) e o itraconazol (**8**) (BRENER, *et al.*, 1979) ; inibidor da farnesil transferase: tipifarnib (**9**) (BRENER, 1968)

1.2.2 Esterol 14 α -desmetilase (CYP51)

A enzima esterol 14 α -desmetilase, ou CYP51, pertence à superfamília do citocromo P450 e é responsável pela desmetilação oxidativa de esteróis intermediários através de um grupo Heme (JOHNSON, *et al.*, 2007).

Na via biossintética do ergosterol, após a formação de lanosterol, a CYP51 catalisa uma reação limitante de remoção oxidativa do grupo 14 α -metil para produzir intermediários insaturados, formando o zimosterol (YOSHIDA, 2000).

A reação ocorre em três etapas: primeiramente, o grupo 14-metila do substrato é convertido em 14-hidroxi-metila, em seguida é transformado em 14-carboxialdeído e finalmente, forma-se o 14-formila, quando há a eliminação de ácido fórmico com uma concomitante formação de uma ligação dupla entre as posições 14 e 15 do substrato (Figura 12) (SHAYADEHI, 1996).

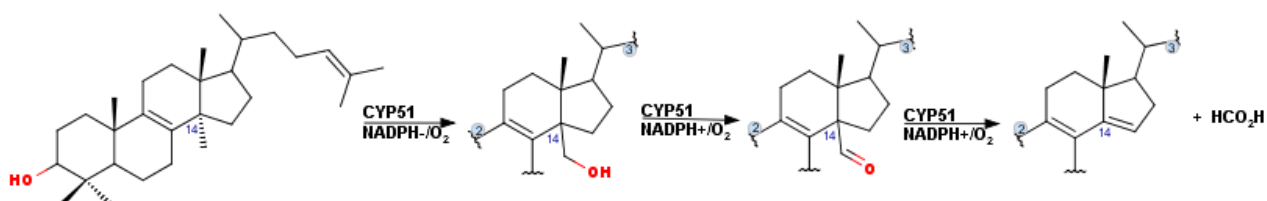


Figura 12: Etapas da reação de desmetilação do lanosterol no C14 catalisada pela CYP51 (WATERMAN, *et al.*, 2005).

Uma condição fundamental para que o processo de desmetilação ocorra, é o posicionamento do substrato próximo ao complexo ferro-porfirínico IX (heme) presente na CYP51, pois ele auxilia nas reações do tipo redox que ocorrem durante a desmetilação (Figura 13) (GENGERICH, 1990). O grupo heme encontra-se ligado à CYP51 através de uma ligação coordenativa entre o íon ferro (II), com o enxofre de um resíduo de cisteína e com uma molécula de água, que é substituída pelo substrato quando ocorre a desmetilação (PODUST, *et al.*, 2004).

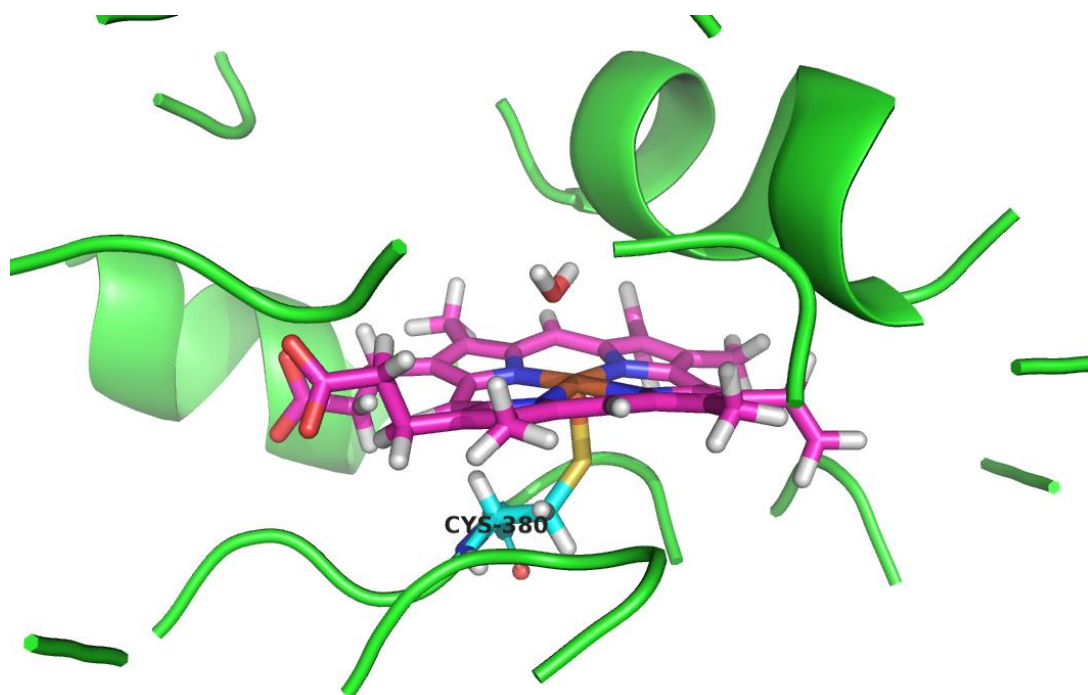


Figura 13: Representação do grupo heme ligado ao sítio ativo da CYP51 de *T. cruzi* (código no PDB: 46HO) interagindo com um resíduo de cisteína e com uma molécula de água, na ausência de um substrato. A enzima está na representação *cartoon* na cor verde, o grupo heme está representado na forma de bastões (C na cor magenta) e o resíduo de cisteína está representado na forma de bastões (C na cor ciano).

1.2.3 Compostos azólicos na inibição da biossíntese de esteróis

Vários compostos que atuam inibindo diferentes etapas da biossíntese do ergosterol foram estudados no tratamento experimental da doença de Chagas, como estatinas, bifosfonatos, inibidores da esqualeno sintase, alilaminas, inibidores da oxidoesqualenociclase, azóis e azasteróis (FRANÇA, *et al.*, 2014).

Os DMI azólicos, que atuam interrompendo a atividade da esterol 14 α -desmetilase (ALCAZAR-FUOLI, *et al.*, 2008), são ativos por via oral e apresentam um amplo espectro de atividade antifúngica e baixa toxicidade. A partir destas características, muitos triazóis, imidazóis, piridinas e pirimidinas têm sido estudados como inibidores da CYP51 de *T. cruzi* (PODUST, *et al.*, 2001).

Testes indicam alta atividade dos DMI contra o *T. cruzi*, sendo que alguns inclusive são ativos na fase crônica da doença. A importância desses inibidores em estudos da ação anti-*T. cruzi* pode ser confirmada por esta classe ser a única que alcançou triagens clínicas avançadas como candidatos a fármacos (GASCON, *et al.*, 2010).

Villata e colaboradores, por exemplo, indicaram em seu estudo que o composto (10) (Figura 14) apresenta boa atividade tanto na fase aguda quanto na crônica, em testes feitos em ratos infectados por *T. cruzi*, possuindo propriedades farmacocinéticas promissoras, com uma boa biodisponibilidade por via oral, além de ter baixa toxicidade e um custo reduzido (VILLATA, *et al.*, 2013). Além disso, em estudo de Soeito e colaboradores, tanto o (10) quanto o seu derivado (11) se mostraram ativos contra as formas amastigota e tripomastigota de *T. cruzi* em testes *in vitro* e *in vivo* para cepas resistentes ao benznidazol (SOEIRO, *et al.*, 2013).

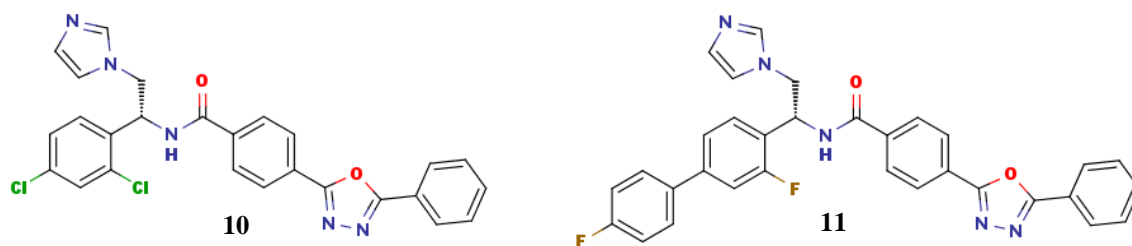


Figura 14: Compostos imidazólicos (**10**) e (**11**) com atividade anti-*T. cruzi* (VILLATA, *et al.*, 2013).

Um outro composto, triazólico foi estudado por Urbina e colaboradores com testes *in vitro* e *in vivo*, o composto (**12**) (fig. 15), que apresentou boa atividade contra epimastigotas (concentração inibitória mínima - CIM=0,3-1,0 μ M) e amastigotas (CIM=1,0 μ M) do *T. cruzi*, além de apresentar um tempo de meia-vida longo e ausência de efeitos secundários tóxicos. Ainda neste estudo, foi avaliada a administração prolongada do composto em camundongos em ambas as fases da doença e se observou a sobrevivência e cura das cobaias em 80-100% dos casos (URBINA, *et al.*, 2003).

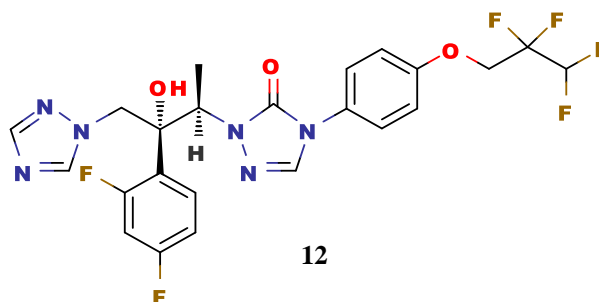


Figura 15: Composto (**12**), com atividade contra *T. cruzi* (URBINA, *et al.*, 2003).

O mecanismo de inibição da enzima da CYP51 consiste em promover a interação do grupo heme com compostos que tenham a capacidade de se complexar com o ferro, como os DMI, caracterizados pela presença de um anel heterocíclico. Tais compostos ligam-se à CYP51 e impedem que o substrato se ligue ao sítio ativo da enzima, interrompendo assim sua conversão catalítica e, por fim, a produção de esteróis (Figura 16).

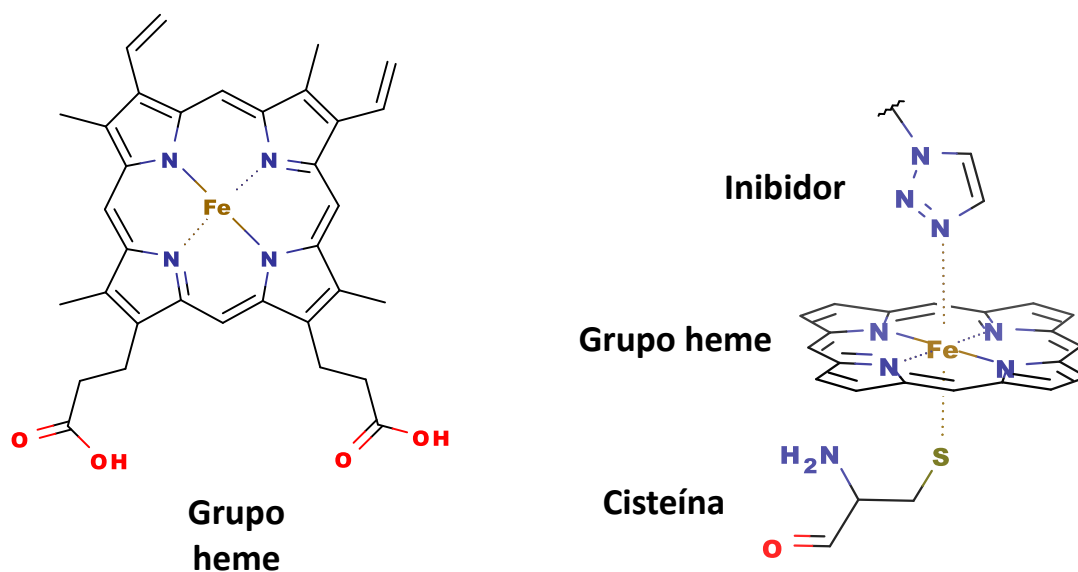


Figura 16: Representação da formação de um complexo octaédrico, através da coordenação do Fe^{II} com os nitrogênios do anel do grupo heme, o enxofre da cisteína e um inibidor proposto.

1.3. Modelagem Molecular

A modelagem molecular utiliza métodos matemáticos para o cálculo de propriedades moleculares com a finalidade de compreensão e previsão do comportamento de sistemas moleculares, utilizando para tal computadores e programas na aplicação de tais métodos (SANT'ANNA, 2002). A sua utilização pode ter como finalidade, por exemplo, o planejamento de novos compostos (SANT'ANNA, 2002), sendo que vários tipos de cálculos são realizados no sistema molecular em questão, dependendo do tipo de estudo que foi proposto.

A modelagem molecular pode contribuir em todos os estágios do planejamento de compostos candidatos a ensaios farmacológicos e testes clínicos, desde a descoberta de um protótipo até sua otimização, em termos de afinidade, especificidade, toxicidade e biodisponibilidade (OPERA, 2005).

Ela é uma ferramenta que pode ser usada para auxiliar o planejamento racional de substâncias bioativas, através do entendimento da interação de uma substância bioativa (ligante) com o seu biorreceptor, geralmente uma proteína (SANT'ANNA, 2009). Além disso, a modelagem permite indicar teoricamente, dentre vários ligantes, quais terão maior atividade sobre determinado biorreceptor (SCOTTI, *et al.*, 2007). Assim, nas pesquisas de compostos bioativos, testes *in vitro* e *in vivo* podem ser feitos apenas com aqueles que possuam melhor atividade prevista, garantindo assim uma economia de tempo e recursos.

Cabe ressaltar que a modelagem molecular por si só, não irá fornecer o composto bioativo de interesse mediante apenas ao uso do computador. Na realidade, o trabalho de desenvolvimento de novas moléculas envolve, necessariamente, o trabalho de uma equipe multidisciplinar, em que os métodos computacionais serão empregados de modo sistemático para facilitar e otimizar todo o processo de desenvolvimento de compostos bioativos, tendo em vista a grande complexidade de todo esse processo (SANT'ANNA, 2009).

Podemos dividir os métodos de modelagem molecular em dois grupos genéricos: os métodos clássicos, que abrangem a mecânica molecular e a dinâmica molecular; e os

métodos quânticos, que incluem os métodos *ab-initio*, DFT e semi-empírico. Na escolha do método mais adequado, deve-se levar em consideração quais propriedades que serão avaliadas, a precisão desejada e a capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos (SANT'ANNA, 2009).

Estes métodos usam algoritmos que efetuam a minimização da energia a partir de uma geometria inicial do sistema molecular, os quais são bastante eficientes no caso de estruturas isoladas. O problema é bem mais difícil no caso de sistemas que envolvem duas ou mais moléculas interagindo, como é o caso de complexos ligante/proteína. Para estes casos, um procedimento que tem sido amplamente usado é a docagem molecular. Discutiremos os métodos usados neste projeto a seguir.

1.3.1 Método semi-empírico

Dentro do formalismo de Hartree-Fock, os métodos semi-empíricos utilizam algumas aproximações na resolução e também introduzem parâmetros empíricos com finalidade de evitar o cálculo de algumas integrais da equação proposta por E. Schrödinger. Esse artifício foi pensado principalmente para que o tempo de cálculo e a demanda da capacidade computacional fossem reduzidos e permitissem cálculos quânticos de sistemas constituídos por muitos átomos, como é o caso dos sistemas de interesse em estudos de compostos bioativos, permitindo a obtenção de propriedades termodinâmicas, cinéticas, cálculos de superfície de energia potencial, etc. (SANT'ANNA, 2009) (MORGON, *et al.*, 2007).

Nos métodos semi-empíricos, é feito o tratamento apenas dos elétrons de valência, sendo que os elétrons do cerne não são considerados explicitamente, pois contribuem menos no comportamento das moléculas. Existem vários métodos semi-empíricos, cada qual com tratamentos distintos para melhorar a precisão dos cálculos e reduzir as limitações impostas pelas suas aproximações (ALCÁCER, 2007).

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

Como exemplo de métodos semi-empíricos, podemos citar o MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*) (DEWAR, *et al.*, 1977), AM1 (Austin Model 1) (DEWAR, 1985), PM3 (Parametric Method 3) (STEWART, 1989), MNDO/d (Modified Neglect of Diatomic Overlap, incluindo orbitais d) (THIEL, *et al.*, 1992a), PM6 (Parametric Method 6) (STEWART, 2007) e PM7 (Parametric Method 7) (STEWART, 2013).

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

Os métodos PM6 e PM7, em especial, podem ser usados para sistemas que apresentem metais de transição (STEWART, 2013), o que é um avanço quando comparados aos demais métodos, já que os metais de transição ofereciam alguns obstáculos, como por exemplo, a pouca quantidade de dados de referência, a maioria deles são compostos de

camada aberta, além de ser mais difícil a resolução de equações do método autoconsistente para esses metais (MORGON, *et al.*, 2007).

1.3.2 Docagem molecular

A técnica de atracamento ou ancoramento molecular ou ainda docagem (*docking*) permite prever e explicar o modo de interação entre um ligante e uma proteína quando o sítio de interação é conhecido (JONES, *et al.*, 1997). Existem alguns programas de docagem que usam uma série de algoritmos para solucionar o problema do atracamento de ligantes na proteína, onde se considera, em geral, o ligante como flexível e a proteína como rígida (VERDONK, *et al.*, 2003).

Muitos programas empregam técnicas de inteligência artificial, como os algoritmos genéticos (AG), que são bem eficientes na resolução de problemas com grande número de variáveis (LINDEN, 2006). O AG otimiza as soluções encontradas em um processo contínuo, sendo considerado um dos melhores algoritmos de otimização estocástica, encontrando soluções próximas às encontradas, por exemplo, na cristalografia de raios-X (DA COSTA, *et al.*, 1999) (MORRIS, 1998).

Para a criação de um AG são necessárias 5 etapas: a codificação das variáveis, a criação da população inicial, a avaliação da resposta (aptidão), o cruzamento (*crossover*) e a mutação. Inicialmente, são geradas possíveis soluções, que descrevem como o ligante interage com a proteína, definidas por valores que descrevem suas translação, orientação e conformação na proteína. Com essas soluções geradas, tem-se a população inicial, que será mais diversificada se houver um número grande de soluções (REEVES, 1995). A pontuação de aptidão é calculada a partir de funções específicas aplicadas às soluções, para que seja possível ranqueá-las. Algumas soluções, selecionadas ao acaso, passarão por mutações (alterações aleatórias) ou cruzamentos (permutas das informações entre indivíduos da população inicial). Por fim, as soluções da nova população são classificadas por sua pontuação de aptidão e, se houver soluções melhores do que as da população original, essas soluções serão substituídas. (DA COSTA, *et al.*, 1999) (JONES, *et al.*, 1997).

As funções de pontuação ou funções de escore (*scoring functions*) mensuram a aptidão dos ligantes nas soluções encontradas para que seja possível classificar as conformações e orientações do ligante no biorreceptor, chamado de *poses* ou posicionamentos. Existem funções de escore baseadas em campo de força (*force-field-based scoring functions*), empíricas (*empirical scoring functions*) e baseadas em conhecimentos (*knowledge-based scoring*) (MORGON, *et al.*, 2007).

As funções de pontuação baseadas em campo de força quantificam a soma de duas energias, a de interação entre o receptor e o ligante, que surge das interações não-ligadas envolvidas no reconhecimento molecular, e a energia interna do ligante. Nesse tipo de função, as interações ligante/proteína são descritas utilizando termos de energia eletrostática e de van der Waals semelhantes aos usados na mecânica molecular (KITCHEN, *et al.*, 2004).

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

Por último, as funções de escore baseadas em conhecimentos foram feitas para reproduzir estruturas experimentais ao invés de energias de interação. Os complexos ligante/proteína são modelados usando potenciais de interação atômica relativamente

simples. Entretanto, sua derivação é baseada na informação codificada implicitamente em conjuntos limitados de complexos ligante/proteína.

Existem dois fatores que dificultam a descrição das interações entre o bioligante e a proteína, que podem ser incluídos no modelo, mas que representam um custo computacional adicional que deverá ser considerado na análise da relação custo/benefício do modelo disponível que será adotado:

1. A flexibilidade das estruturas da molécula do bioligante e da proteína, pois estes sofrem mudanças conformacionais durante a interação;
2. As moléculas de água que cercam tanto o bioligante como o sítio de interação da proteína e que devem ser deslocadas quando as duas moléculas vão interagir (SANT'ANNA, 2009).

Um bom programa de docagem deve ter a habilidade de reproduzir o modo de interação de ligantes identificado experimentalmente, geralmente por cristalografia de raios-X. Para testar isso, o ligante é removido da estrutura cristalográfica do complexo ligante-proteína, e novamente inserido no sítio ativo utilizando-se o programa de docagem (procedimento chamado redocagem). Faz-se então uma comparação entre os modos de ligação experimental e de docagem, determinando-se a raiz do desvio médio quadrático (RMSD, do inglês *root mean square deviation*), sendo que a predição do modo de interação é considerada bem-sucedida quando o RMSD está abaixo de um valor, usualmente de 2,0 Å (VERDONK, *et al.*, 2003).

3 Justificativa

A inexistência de vacinas que impeçam a infecção pelo *T. cruzi* e a subsequente manifestação da doença de Chagas, bem como falta de medicamentos que combatam os graves sintomas da doença tanto na fase aguda quanto na fase crônica, além do pouco interesse de grandes indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento dos mesmos, são fatores que tornam imprescindível a pesquisa por novos fármacos para esta doença, tendo em vista o número de casos dessa enfermidade.

A pesquisa aplicada tanto para a elucidação de mecanismos de inibição contra o parasito, quanto para a descoberta de novos compostos bioativos, é de grande relevância para a descoberta de novos fármacos para o tratamento da doença.

4 Objetivos

Com a finalidade de se obter novos compostos triazólicos inibidores da CYP51 de *T. cruzi*, usando técnicas de modelagem molecular, este trabalho buscou:

- estudar o sítio ativo da CYP51 do *T. cruzi* e o mecanismo de ação de compostos com atividade conhecida contra a enzima;
- Identificar e calcular os parâmetros teóricos que se associem com o processo de inibição da enzima para que seja possível determinar um modelo teórico adequado que permita correlacionar tais parâmetros com a atividade inibitória experimental;
- Correlacionar os parâmetros teóricos calculados com a atividade inibitória experimental de compostos heterocíclicos com o intuito de se propor um modelo teórico de predição de atividade de novos inibidores;
- utilizar o modelo construído para avaliar a atividade teórica de uma série de compostos triazólicos derivados da piperina sintetizados pelo grupo de química medicinal da UFRRJ, coordenado pelo Dr. Marco Edilson Freire de Lima, e propor modificações estruturais nessa série, visando melhorar a atividade desses novos derivados, frente a CYP51;
- selecionar e sintetizar os compostos mais promissores.

5 Metodologia

1.4. Modelagem Molecular

1.4.1 Estrutura cristalográfica da enzima

Para o estudo de interação dos compostos bioativos (compostos imidazólicos) com a enzima CYP51 de *T. cruzi*, foi necessário, primeiramente, a obtenção de uma estrutura cristalográfica da enzima; para tal, fez-se uma busca no banco de dados de domínio público, *Protein Data Bank* (PDB, <http://www.rcsb.org/>).

1.4.2 Construção dos ligantes

Ambas as séries de ligantes, os imidazóis estudados por Andrine e colaboradores e as 1,2,4-triazolo-3-tionas derivadas da piperina sintetizados por Franklim e colaboradores, foram construídos e tiveram suas energias minimizadas utilizando o método quântico de aproximação semi-empírica PM3 (STEWART, 1989) do programa Spartan'14 (Wavefunction, Inc.).

1.4.3 Redocagem e docagem

A redocagem e a docagem foram feitas utilizando o programa GOLD 5.2 (CCDC). Durante a docagem são geradas diversas geometrias (poses) para cada sistema ligante-proteína por meio de um algoritmo genético, que recebem uma classificação de acordo com o score (ou pontuação) de aptidão, um número adimensional que, quanto maior for, melhor será a interação proteína-ligante prevista. As pontuações dependem da função de pontuação usada, que, na versão atual do programa, são 4: *ASP* (MOOIJ, *et al.*, 2005.), *ChemScore* (ELDRIDGE, *et al.*, 1997) (ELDRIDGE, *et al.*, 1998), *GoldScore* (JONES, *et al.*, 1997) e *ChemPLP* (KORB, *et al.*, 2009), que é a atual função padrão do programa.

Utilizamos o procedimento de redocagem para avaliar qual a função de pontuação do programa GOLD 5.2 (CCDC) seria a mais adequada para ser utilizada na docagem molecular. Para tal, utilizamos quatro estruturas de CYP51, depositadas no PDB com os seguintes códigos: 1E9X (PODUST, *et al.*, 2011), 4H6O (BISWAS, *et al.*, 2013), 3TIK (BUCKNER, *et al.*, 2012) e 2WUZ (CHEN, *et al.*, 2010). Cada uma dessas estruturas pertence a uma espécie diferente e apresenta um ligante diferente complexado com o ferro do grupo heme da enzima.

Para fazer o redocagem, é necessário escolher um átomo (ou um ponto no espaço) para ser adotado como centro da cavidade do sítio de interação. A partir desse átomo, define-se um raio máximo com o qual o ligante pode interagir com a proteína; o átomo escolhido foi o ferro complexado com o grupo heme da CYP51 e adotamos um valor de 20 Å como raio de interação dos ligantes com a proteína.

A docagem foi feita usando a função selecionada na redocagem, *ChemPLP*, em duplicata para ambas as séries. O átomo central adotado na docagem também foi o ferro do grupo heme e o raio máximo de interação usado foi de 15 Å.

As poses de cada ligante foram selecionadas, tendo como critério a pontuação na docagem e também um critério geométrico, a distância entre o nitrogênio imidazólico e o

ferro do grupo heme, já que a complexação do heme com o composto heterocíclico foi a estratégia adotada para promover a inibição da CYP51.

A partir da melhor pose de cada composto imidazólico nos complexos enzima/ligante, foram selecionados com o programa SwissPDB Viewer4.1.0 (GUEX, *et al.*, 1997) o ligante, o grupo heme e todos os aminoácidos com ao menos um átomo localizado dentro de uma distância de 6 Å do grupo heme. O recorte foi feito para diminuir o tamanho da estrutura com a qual seriam feitos os cálculos quânticos seguintes, incluindo apenas a parte da estrutura que interage diretamente com o ligante. Esse procedimento contribui, sobretudo, para a diminuição no tempo de duração dos cálculos quânticos seguintes.

1.4.4 Cálculo de entalpia de interação CYP51-inibidor

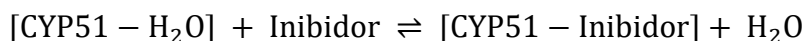
Os cálculos realizados para otimização e determinação da entalpia de interação dos complexos CYP51-ligante, foram feitos com o método semi-empírico PM6 do programa MOPAC 2016 [Stewart Computational Chemistry], que contém parâmetros para 70 elementos da tabela periódica, incluindo metais de transição, como o Fe presente na CYP51 (STEWART, 2007).

Primeiramente, otimizou-se apenas os hidrogênios da estrutura, com o uso das palavras-chave “NOOPT” e “OPT-H”. Em seguida, a otimização foi para todos os átomos da estrutura, inclusive do ligante, excetuando-se as ligações peptídicas que foram fixadas no espaço.

Os cálculos foram feitos com os átomos no “vácuo” e também em dois meios distintos, a água e o interior de proteínas, buscando-se mimetizar o ambiente ao redor do conjunto de átomos selecionados. Para isso, foi usada a aproximação do contínuo, através das palavras-chaves referentes à constante dielétrica desses dois meios, que são respectivamente EPS=78.4 e EPS=4.

A entalpia de interação foi calculada de acordo com a reação representada a seguir (*Esquema 2*). Nessa reação, considera-se um processo em que o átomo de ferro presente no grupo heme da enzima CYP51 esteja complexado com um resíduo de cisteína e também com uma molécula de água, que foi incluída na estrutura para a realização do cálculo (PODUST, *et al.*, 2001). Dessa maneira, considera-se que os inibidores irão interagir com a enzima na região do sítio ativo, próximo ao átomo de ferro, deslocando assim a molécula de água. Ao final da reação, haveria um complexo da enzima com o ligante e a liberação de uma molécula de água. Então, cada sistema foi calculado separadamente, e ao final, o ΔH de interação (ΔH_{int}) foi calculado de acordo com Equação 1, com as entalpias de formação de cada sistema.

Esquema 2



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

Equação 1

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

1.4.5 Modelo teórico para a predição de atividade inibitória da CYP51

No modelo desenvolvido, utilizamos dados de CI_{50} experimental de compostos imidazólicos e dados teóricos calculados para criar uma função empírica que permita a determinação da atividade teórica de compostos de atividade desconhecida, para a inibição da CYP51, de maneira similar às propostas desenvolvidas por Wang e colaboradores no estudo de inibidores da proteína cinase C (WANG, *et al.*, 1994), posteriormente adaptadas por Oliveira e colaboradores no estudo de inibidores da fosfodiesterase 4 (OLIVEIRA, 2006) e por Rocha na predição da atividade de inibidores da esterol 14 α -desmetilase (CYP51) (ROCHA JR., 2009).

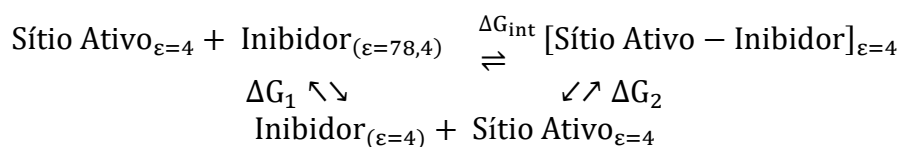
Considerando que a interação de um biorreceptor (uma enzima, por exemplo) com um ligante, em sistemas biológicos com número de partículas, temperatura e pressão constantes, a espontaneidade da interação para que haja a formação de um complexo biorreceptor-ligante é determinada pela energia de Gibbs de interação (ΔG_{int}) (BROOIJMANS, *et al.*, 2003), de maneira que, quanto mais negativo for o valor de ΔG_{int} , mais favorável será a formação do complexo. Vale ressaltar que o ΔG_{int} é constituído por termos entálpicos e entrópicos, conforme se observa na equação 2.

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

Equação 2

Na equação acima, ΔH_{int} é a entalpia de interação, T é a temperatura absoluta do sistema e ΔS_{int} é a entropia de interação.

Além disso, na interação dos inibidores com a CYP51, em especial, podemos dividir o processo em duas etapas, de modo que na primeira etapa, ocorre o transporte do inibidor da fase aquosa (com $\epsilon=78,4$) para o interior da CYP51 (com $\epsilon=4$); na segunda etapa, ocorre de fato a interação do inibidor com o sítio ativo da CYP51, conforme representado no **Esquema 3**.



Esquema 3

De acordo com o **Esquema 3**, é possível escrever ΔG_{int} da seguinte forma:

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

Equação 3

Por outro lado, o valor de ΔG_{int} pode ser correlacionado a medidas experimentais de afinidade, como o CE_{50} , CI_{50} ou a constante de inibição (K_i), mantendo uma correlação matemática com ΔG_{int} conforme a equação 4:

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

Equação 4

Substituindo a Equação 3 na Equação 4, temos:

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

Equação 5

Os dados de CE_{50} usados nesse modelo se encontram na Tabela 1 e foram obtidos da literatura de uma série de imidazóis com atividade contra CYP51 de *T. cruzi* (ANDRINE, *et al.*, 2003).

Os valores do termo ΔG_1 podem ser aproximados como a energia livre necessária para o transporte do inibidor da fase aquosa para a fase lipídica (interior da enzima). A facilidade com que essa transferência ocorre pode ser relacionada pela hidrofobicidade do inibidor, que por sua vez, é uma função da solubilidade do mesmo em fase aquosa. Dessa maneira, a solubilidade dos ligantes foi determinada pela energia de solvatação (ΔG_{solv}) dos compostos usados para a construção do modelo, através do método SM5.4 (CRAMER, *et al.*, 1992) do programa Spartan'14 (Wavefunction, Inc.).

Wang e colaboradores propuseram que haveria uma dependência quadrática entre o ΔG_1 e o logaritmo da medida da atividade, pois, como a enzima analisada por eles era de membrana, valores extremos de solubilidade prejudicariam a atividade, de maneira que valores muito negativos para esse termo poderiam fazer com que o inibidor interagisse muito bem com a membrana ao invés de interagir com a enzima, enquanto que valores muito positivos indicariam que a passagem do inibidor do meio aquoso para o interior da membrana não seria favorecida (WANG, *et al.*, 1994).

Por fim, o termo ΔG_2 é composto por dois outros termos, um entálpico, ΔH_2 , e outro entrópico, $-T\Delta S_2$; Os valores de ΔH_2 incluídos para a construção do modelo foram determinados de acordo com o item 1.4.4 descrito na Metodologia e o $-T\Delta S_2$ é associado à variações na entropia dos inibidores causadas pela interação com a cavidade do sítio ativo da CYP51. Esta variação de entropia se deve ao fato de que num sistema, tanto o biorreceptor quanto o ligante, encontram-se solvatados e podem apresentar altas entropias rotacional, translacional e conformacional devido à liberdade de movimento, mas, após a complexação, suas entropias diminuem (BROOIJMANS, *et al.*, 2003).

Assumindo que as perdas translacionais e rotacionais são semelhantes para ligantes semelhantes, diferenças na perda de liberdade conformacional seriam as principais responsáveis pela variação de entropia; para incluir termos entrópicos dos ligantes na construção do modelo foram utilizados valores de energia torsional ($\Delta E_{\text{tor.}}$) fornecidos pelo programa GOLD 5.2 após a docagem molecular com a função *ChemPLP*.

Finalmente, é possível reescrever a Equação 5 da maneira que segue:

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

Equação 6

Os coeficientes c_1 - c_5 podem ser determinados por um ajuste da equação aos valores experimentais do $\log CE_{50}$ através de uma análise por regressão linear múltipla.

1.5. Síntese de Derivados da Piperina Planejados

1.5.1 Reagentes e solventes

Foram usados acetato de etila, acetona, clorofórmio, diclorometano, etanol, éter etílico, metanol, solução de ácido clorídrico concentrado (37%) e hidróxido de sódio adquiridos pela empresa Vetec; cloreto de oxalila, hidrato de hidrazina, isotiocianatos de cicloexila e de fenetila, iodeto de metila, periodato de sódio e peroximonossulfato de potássio - Oxone® ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Todos os solventes e reagentes apresentavam grau de pureza adequado (entre 98 e 99,9%), não necessitando assim de tratamento prévio.

1.5.2 Equipamentos

Foram usados os seguintes equipamentos:

- Reator de microondas - Modelo Discover - *CEM Inc*;
- Evaporador rotatório - Fisaton - Modelo 802;
- Placas de aquecimento e agitação - Corning e IKA;
- Câmara de revelação CCDA - da marca Entela, modelo 58 Handheld, equipada com lâmpada UV com comprimento de onda de 254 e 365 nm;
- Os espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker, modelo Ultrashield Plus (400 MHz), no Departamento de Química da UFRRJ. Os deslocamentos químicos estão referenciados em parte por milhão (ppm) com relação ao padrão interno Met_4Si . Solventes usados na solubilização das amostras: clorofórmio (CDCl_3) e dimetil-sulfóxido ($\text{DMSO}-D_6$). Os espectros foram interpretados utilizando o programa ACD ^1D NMR Manager.
- Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos no cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas GCMS-QP2010 Plus da Shimadzu (PPGQ-UFRRJ). Condições de análise: Coluna: vf-5MS (30 m x 0,25 x 0,25 mm); Temperatura: 200°C/1' - 10°C - 290°C/40 min; Injetor: 270°C;

1.5.3 Metodologia geral para a síntese dos triazóis

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

A reação foi feita em um balão de fundo redondo de 250 mL de capacidade, equipado com barra de agitação magnética, septo de borracha e mantido sob atmosfera inerte. Foram adicionados 1,20 g (5,499 mmol) do ácido piperínico, seguido da adição de aproximadamente 3,631 mL (42,342 mmol) de cloreto de oxalila. Esta solução foi submetida à agitação em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. Após este tempo, constatou-

se a finalização da reação por cromatografia em camada delgada analítica – CCDA (indiretamente, acompanhando a formação do éster metílico, através da reação de uma pequena alíquota com metanol). Concluída a reação, o excesso de $(\text{COCl})_2$ foi removido em evaporador rotatório, restando apenas o cloreto de acila, na forma de um sólido, de coloração alaranjada, que foi então utilizado na etapa posterior, sem tratamento prévio, devido à sua instabilidade em atmosfera úmida (FRANKLIM, *et al.*, 2013).

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

A reação de preparação da acilhidrazida foi realizada imediatamente após a reação de obtenção do cloreto de acila, evitando assim a hidrólise deste intermediário. O sólido formado após a evaporação do excesso de cloreto de oxalila foi dissolvido em 12 mL de diclorometano seco. Esta solução, mantida sob atmosfera inerte e em banho de gelo, foi adicionada, gota a gota, sobre uma solução contendo 2,5 mL de hidrato de hidrazina em 16 mL de CH_2Cl_2 seco, mantida num balão de 125 mL, equipado com barra de agitação magnética e septo de borracha, mantido sob atmosfera de nitrogênio seco. Após o término da adição, o meio reacional foi deixado por cerca de 10 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Por análise por CCDA verificou-se o término da reação. O solvente foi removido no evaporador rotatório e após adição de água destilada o produto foi filtrado sob pressão reduzida (FRANKLIM, *et al.*, 2013).

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

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

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

Ao produto da reação anterior, foi adicionado $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ 10% (1 equivalente em relação ao substrato). A mistura foi submetida à irradiação de microondas mantida sob refluxo por 30min (100W e 101°C). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. A solução foi acidificada, após o resfriamento com ácido clorídrico em banho de gelo gerando a formação do precipitado. A mistura reacional foi filtrada e lavada com água gelada e após isso todos os derivados foram purificados pelo método de recristalização utilizando-se etanol.

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

Em um balão de 25 mL, equipado com agitador magnético, foi preparada uma solução de 100 mg do triazol em 5 mL de etanol, sobre a qual, foi adicionada uma solução 33,6 mg de KOH dissolvidos em 2 mL de etanol. A mistura reacional foi submetida à irradiação de micro-ondas por 5 minutos, acoplada à um condensador de redlúxo. Em seguida, foi adicionado 1 equivalente do respectivo iodeto de metila e a mistura foi submetida novamente à irradiação em micro-ondas, por 1 h (adaptado de Naveena e colaboradores (NAVEENA, *et al.*, 2010)).

O acompanhamento da reação foi feito por CCDA e ao final da reação, o solvente foi removido por evaporador rotatório sob pressão reduzida. Fez-se uma suspensão do sólido formado com KOH_(aq) 5% e fez-se uma extração com acetato de etila por três vezes. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório com pressão reduzida.

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

Em um tubo de ensaio pequeno contendo uma barra de agitação magnética, foram adicionados uma solução de 63,3 mg do triazol em 3 mL de metanol e uma solução de 4 equivalentes de NaIO₄ em relação ao triazol, em 1 mL de água destilada. A reação foi feita com banho de gelo e agitação em placa de agitação por 12h. O acompanhamento foi feito por CCDA. Ao final da reação, foi feita uma extração com acetato de etila por três vezes e o solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório com pressão reduzida. (LEONARD, *et al.*, 1962)

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

Primeiramente, foi preparado uma solução com 20 mg do triazol com 2 mL de metanol em um tubo de ensaio pequeno contendo uma barra de agitação magnética, em banho de gelo. Foi adicionada uma solução de três equivalentes de Oxone[®] (peroximonopersulfato de potássio) com 2 mL de água destilada e a reação foi mantida sob agitação com banho de gelo por 2h. Foi feito um acompanhamento da reação por CCDA e ao final da reação, fez-se uma extração com clorofórmio por três vezes e por fim, o solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida (TROST, *et al.*, 1981).

6 Resultados e Discussão

1.6. Construção de um Modelo Teórico

1.6.1 Estrutura cristalográfica da enzima

Obtivemos a estrutura cristalográfica da esteroil 14 α -desmetilase de *T. cruzi* de código 4H6O no PDB, que se apresentava complexada com um inibidor NEU321 1-(3-(4-cloro-3,5-dimetilfenoxi) benzil)-1H-imidazol. A estrutura foi obtida por difração de raios-x, apresentando uma resolução de 2,8Å. (ANDRINE, *et al.*, 2003)

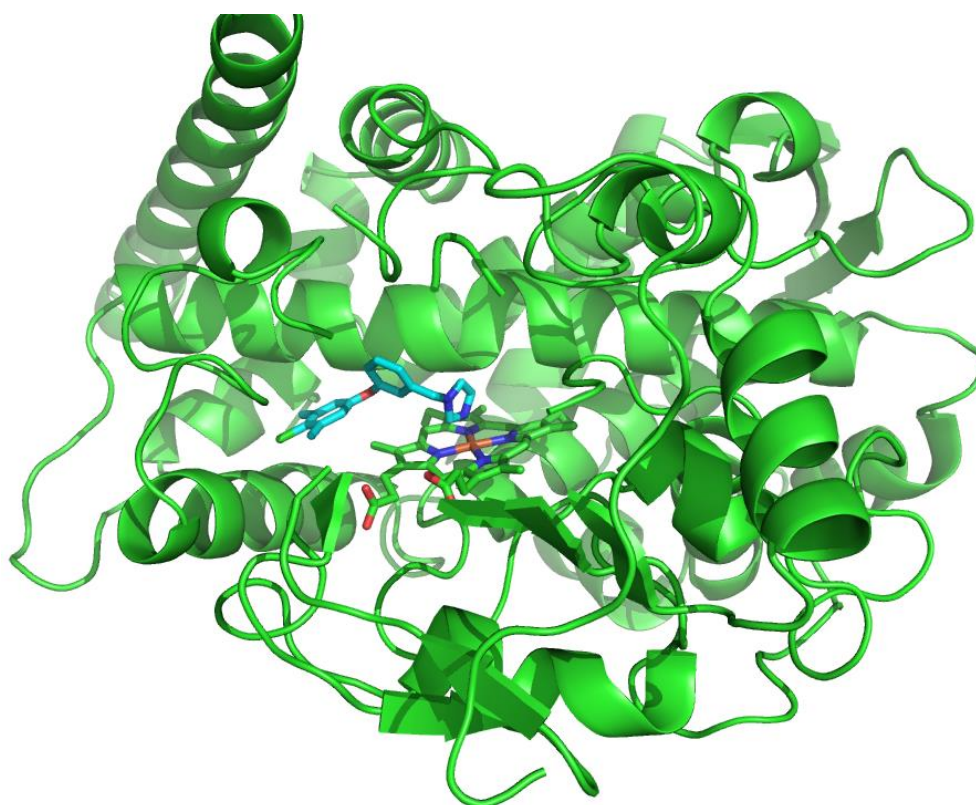
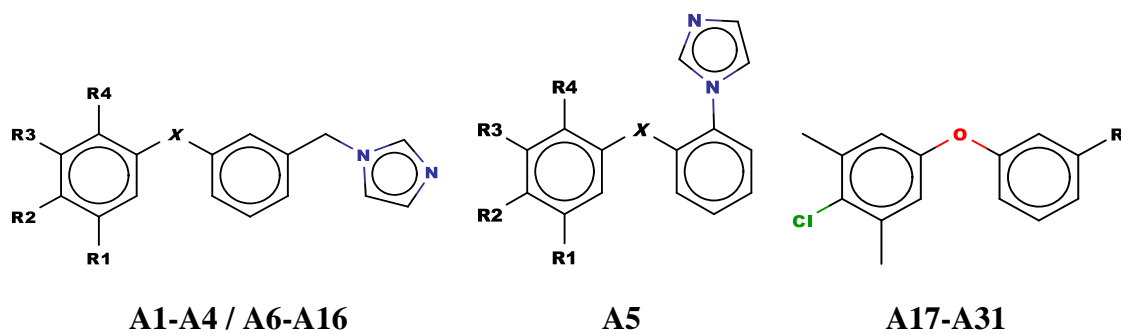


Figura 17: Estrutura cristalográfica da enzima 14 α -desmetilase do *T. cruzi* (PDB: 4H6O) representada na forma *cartoon* na cor verde; Na região central da enzima, encontra-se o grupo heme representado por bastões na cor verde e o inibidor co-cristalizado, representado por bastões na cor azul.

1.6.2 Ligantes

Tanto a **Série A** (Tabela 1) quanto a **Série B** (Tabela 2) têm dados de atividade contra *T. cruzi* relatados na literatura, conforme apresentado nas tabelas abaixo. Deve ser destacada a variabilidade das atividades medidas no trabalho de Andrine e colaboradores, com valores de EC_{50} variando em 4 ordens de magnitude, o que é adequado para a construção de um modelo de previsão. A série B, no entanto, é bastante limitada quanto a este aspecto.

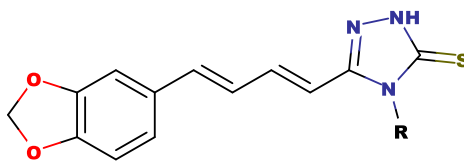
Tabela 1: Estrutura dos compostos estudados por Andrine e colaboradores e seus respectivos valores de EC₅₀.



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

* (ANDRINE, *et al.*, 2003)

Tabela 2: Estrutura das 1,2,4-triazolo-3-tionas estudadas por Franklim e colaboradores e seus respectivos valores de CI_{50} .



Composto	Série B	
	R	CI_{50} (μM)*
B1	Metil	44,20
B2	Etil	50,16
B3	Isopropil	26,98
B4	<i>n</i> -Butil	13,22
B5	<i>n</i> -Hexil	15,38
B6	Ciclohexil	18,30
B7	Fenil	38,96
B8	Benzil	39,39
B9	3,4,5-Trimetoxifenil	35,30
B10	<i>terc</i> -Butil	50,75
B11	4-(Metiltio)fenil	40,75
B12	3-Metoxifenil	48,02
B13	4-(Trifluormetil)fenil	18,46

* (FRANKLIM, *et al.*, 2013)

O programa Spartan'14 (Wavefunction, Inc.) foi utilizado para a construção e minimização de energia da série de imidazóis estudados por Andrine e colaboradores e da série das 1,2,4-triazolo-3-tionas derivadas da piperina (FRANKLIM, *et al.*, 2013) com o método PM3 (STEWART, 1989) disponível no programa. Através dele, também foi possível a determinação de ΔG_{solv} dos ligantes pelo método SM5.8 (CRAMER, *et al.*, 1992) (Tabela 3).

Tabela 3: Valores de energia de solvatação (em kcal/mol) determinados utilizando o programa Spartan'14.

Composto	ΔG_{solv} (kcal/mol)	Composto	ΔG_{solv} (kcal/mol)
A1	-8,70	A17	-7,68
A2	-8,80	A18	-10,10
A3	-8,73	A19	-5,82
A4	-9,00	A20	-53,81
A5	-15,62	A21	-10,62
A6	-13,29	A22	-6,22
A7	-12,32	A23	-52,86
A8	-9,26	A24	-11,52
A9	-10,53	A25	-5,79
A10	-8,23	A26	-7,59
A11	-9,70	A27	-6,56
A12	-9,85	A28	-8,46
A13	-9,43	A29	-9,51
A14	-9,70	A30	-6,69
A15	-10,28	A31	-7,19
A16	-10,10		
B1	-19,90	B8	-19,35
B2	-19,36	B9	-19,93
B3	-17,89	B10	-17,18
B4	-18,69	B11	-21,47
B5	-18,34	B12	-21,63
B6	-17,39	B13	-19,51
B7	-20,08		

Os compostos A20 e A23 apresentam em sua estrutura um grupo amino terciário que apresenta um caráter básico considerável e, considerando um meio aquoso de pH neutro, provavelmente haveria uma protonação do átomo de nitrogênio desse grupo amino. Por isso, na construção desses compostos, essa protonação foi levada em conta.

1.6.3 Redocagem e docagem molecular

Quando a redocagem é feita, o programa GOLD 5.2 fornece algumas soluções, cada qual com o ligante original da estrutura 3D da enzima em uma posição diferente e o esperado é que essas soluções fiquem o mais próximo possível da posição original do ligante; uma maneira utilizada para analisar a eficiência de uma função de pontuação em gerar boas soluções na redocagem é utilizar o valor de RMSD.

Os valores de RMSD obtidos com a redocagem dos ligantes co-cristalizados feita com as estruturas cristalográficas da CYP51 com os códigos 1E9X (PODUST, *et al.*, 2011), 4H6O (BISWAS, *et al.*, 2013), 3TIK (BUCKNER, *et al.*, 2012), 2WUZ (CHEN, *et al.*, 2010), 1H5Z (PODUST, *et al.*, 2004) estão na Tabela 4. Todas as funções tiveram desempenhos bons, mas as funções *ChemPLP* e *ChemScore* foram as que apresentaram os melhores resultados médios (valores baixos de RMSD indicam que a função gerou uma solução semelhante à posição original do ligante).

Tabela 4: Valores de RMSD (Å) para as 4 funções de pontuação testadas na redocagem e valores da média de RMSD para cada função de pontuação.

CYP51	Valores de RMSD (Å)			
	<i>ChemPLP</i>	<i>GoldScore</i>	<i>ChemScore</i>	<i>ASP</i>
1E9X	0,28	0,55	0,58	0,59
1H5Z	0,28	0,57	0,37	0,60
2WUZ	1,11	0,92	0,95	1,65
3TIK	0,49	0,63	0,40	0,54
4H6O	0,71	0,73	0,54	0,55
Média de RMSD	0,57	0,68	0,57	0,78

Inicialmente, a docagem foi feita com a função *ChemScore*. Entretanto, as soluções não apresentaram em geral *poses* em que houvesse uma interação entre o ferro do grupo heme e o anel heterocíclico dos ligantes, interação considerada fundamental para que haja uma inibição da atividade da enzima. Dessa maneira, a docagem foi refeita com a função *ChemPLP*.

As *poses* obtidas utilizando a função *ChemPLP* apresentaram uma boa interação com o átomo de ferro e com aminoácidos do sítio ativo, além de se localizarem na mesma região do sítio, como pode ser visto na Figura 18.

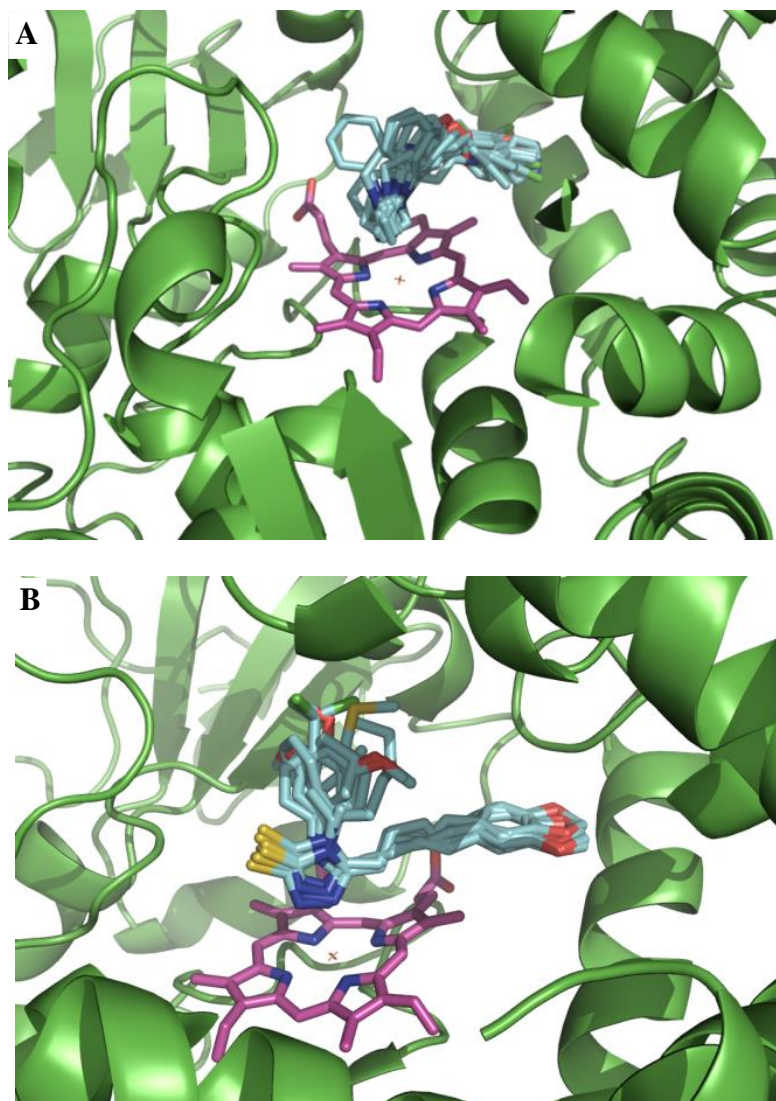


Figura 18: A) Ligantes da Série A sobrepostos no sítio ativo da CYP51, interagindo com o ferro do grupo heme; B) Ligantes da Série B sobrepostos no sítio ativo da CYP51, interagindo com o ferro do grupo heme. A enzima está na representação de *cartoon* na cor verde, o grupo heme está representado na forma de bastões com carbonos na cor magenta e os ligantes estão representados na forma de bastões com carbonos na cor ciano.

Seguindo a metodologia estabelecida, a docagem foi feita em duplicata e as pontuações atribuídas às soluções, foram utilizadas como critério de escolha das melhores *poses*, juntamente com o critério de distância entre o nitrogênio do anel heterocíclico e o ferro do grupo heme da enzima. Dessa maneira, na Tabela 5 observamos os valores das pontuações geradas pela docagem feita em duplicata com os ligantes da **Série A**, a média das pontuações e as distâncias (em Å). Para a **Série B**, a docagem foi feita em triplicata pois na primeira docagem feita, os ligantes **B6**, **B7** e **B12**, não apresentaram nenhuma solução em que o anel triazólico estivesse interagindo com o ferro do grupo heme, então, mais dois procedimentos de docagem foram feitos. Observa-se na Tabela 6, então, as pontuações da triplicata da docagem, a média das pontuações e as distâncias entre o N triazólico e o Fe do grupo heme.

Tabela 5: Valores das pontuações da docagem (em duplicata) da Série A, com a respectiva distância (Å) entre o N heterocíclico e o Fe do grupo heme. (Continua)

Composto	Pont. 1	Distância (Å)	Pont. 2	Distância (Å)	Média das Pontuações
A1	85,68	2,50	86,79	2,61	86,23
A2	82,08	2,53	84,66	2,50	83,37
A3	76,79	2,48	78,92	2,54	77,86
A4	74,84	2,53	78,64	2,50	76,74
A5	61,71	2,58	62,65	2,64	62,18
A6	80,85	2,54	66,41	2,64	73,63
A7	74,97	2,58	78,92	2,47	76,94
A8	87,79	2,54	87,71	2,54	87,75
A9	82,60	2,61	-	-	82,60
A10	80,69	2,51	83,63	2,61	82,16
A11	79,09	2,53	83,38	2,61	81,24
A12	78,49	2,49	77,52	2,51	78,01
A13	65,53	2,46	73,79	2,64	69,66
A14	74,97	2,50	67,87	2,38	71,42
A15	82,27	2,58	83,06	2,61	82,66
A16	75,20	2,46	74,07	2,61	74,63
A17	93,27	2,36	94,23	2,36	93,75
A18	87,19	2,54	84,17	2,57	85,68
A19	87,74	2,61	81,75	3,70	84,74
A20	69,88	2,58	75,52	2,73	72,70
A21	66,95	4,14	66,13	4,40	66,54
A22	64,88	2,73	78,61	3,16	71,74
A23	62,17	3,98	68,13	3,29	65,15
A24	92,07	2,28	73,92	1,92	82,99
A25	76,08	3,27	83,18	3,37	79,63
A26	69,47	3,14	71,24	3,23	70,36
A27	82,18	4,24	93,27	2,70	87,73
A28	59,50	4,19	52,71	4,04	56,10
A29	80,38	2,51	73,83	2,64	77,10
A30	65,95	4,35	77,77	2,54	71,86
A31	83,52	2,47	72,73	4,18	78,13

Tabela 6: Valores das pontuações da docagem (em triplicata) com a respectiva distância (Å) entre o N triazólico da Série B e o Fe do grupo Heme.

Composto	Pont. 1	Distância	Pont. 2	Distância	Pont. 3	Distância	Média das Pontuações
B1	71,13	2,64	64,71	3,20	70,50	2,67	68,78
B2	66,60	3,28	68,57	2,70	58,62	5,01	64,59
B3	64,62	2,80	62,28	4,15	62,49	4,74	63,13
B4	74,55	2,86	76,32	2,70	69,74	3,26	73,54
B5	84,32	2,70	86,14	2,74	80,99	2,77	83,82
B6	*	*	76,40	3,02	82,31	3,36	79,36
B7	*	*	79,44	3,09	81,99	2,70	80,71
B8	82,45	2,64	80,62	2,70	83,04	2,70	82,04
B9	89,99	2,67	88,47	2,53	87,74	2,67	88,74
B10	65,22	2,74	58,39	4,95	73,08	2,61	65,56
B11	85,95	2,74	82,08	2,70	78,32	2,67	82,12
B12	*	*	80,15	2,64	78,98	2,74	79,56
B13	77,85	2,54	75,03	2,61	71,86	3,45	74,91

*Não houve solução em que o N triazólico estivesse interagindo com o Fe do grupo Heme.

Foi feita a correlação dos dados de atividade experimental com os valores médios de pontuação da docagem. Os valores de CE_{50} da **Série A** apresentam um coeficiente de correlação (r) igual a 0,35 com os valores de pontuação da docagem e os valores de CI_{50} da **Série B** apresentaram um coeficiente de correlação igual a -0,23. Isso indica que as pontuações de docagem apresentam fraca correlação com os dados de atividade experimental, o que pode ser explicado pelas limitações na representação da interação inibidor-enzima nas funções de escore usadas para a docagem.

1.6.4 Cálculo de entalpia de interação CYP51-inibidor

O método PM6 do programa MOPAC2016 foi utilizado para calcular os valores de $\Delta H_{(E-I)}$, $\Delta H_{(I)}$, $\Delta H_{(H_2O)}$, $\Delta H_{(E-H_2O)}$, que podem ser encontrados nas tabelas Tabela 19, Tabela 20 e

Tabela 21 no Anexo E. Por intermédio da Equação 1 descrita no item 1.4.4 da Metodologia, foi determinada o valor de ΔH_{int} referente à interação dos inibidores com o sítio ativo da CYP51.

Foram exploradas nos cálculos, três condições de constante dielétrica para os sistemas, $\epsilon=1$ (vácuo), $\epsilon=4$ (interior de proteínas) e $\epsilon=78,4$ (meio aquoso).

Para a **Série A**, os valores de ΔH_{int} ($\epsilon=4$) apresentaram coeficiente de correlação linear com os valores de EC_{50} razoável, igual a 0,69, mas os valores calculados com $\epsilon=78,4$

e $\epsilon=1$ apresentaram coeficientes de correlação linear mais baixos, iguais a 0,01 e 0,24, respectivamente (Tabela 7). Dessa maneira, a condição que melhor reproduz as condições experimentais é a que considera a constante dielétrica mais próxima a do interior de proteínas ($\epsilon=4$), pois fornece valores de ΔH_{int} com coeficiente de correlação moderado com os valores de CI_{50} . O resultado sugere também que ΔH_{int} é o fator mais importante na determinação das atividades desta série.

Tabela 7: Valores de ΔH_{int} (kcal/mol) calculados pelo método PM6 (MOPAC2016), considerando diferentes constantes dielétricas, para os compostos da Série A.

Composto	$\Delta H_{\text{int}}^{\epsilon=1}$	$\Delta H_{\text{int}}^{\epsilon=4}$	$\Delta H_{\text{int}}^{\epsilon=78,4}$
A1	-0,32	-32,23	-17,62
A2	-11,05	-38,32	-25,40
A3	-4,05	-42,53	5,96
A4	-74,75	-16,42	7,49
A5	-110,45	-56,06	-11,15
A6	-56,92	-12,67	-11,87
A7	-70,95	-27,57	-10,75
A8	-66,94	-23,19	-32,72
A9	-182,10	-8,78	-13,72
A10	27,37	-50,72	399,63
A11	-116,74	-21,57	-29,74
A12	11,95	-32,69	-27,47
A13	-6,43	-24,03	398,70
A14	-81,53	-35,50	-10,69
A15	-56,76	-59,80	4,33
A16	-83,05	-23,06	61,25
A17	-20,06	-26,94	394,23
A18	-51,42	-31,67	-18,83
A19	61,35	-26,43	51,54
A20	-33,43	26,12	48,96
A21	8,33	34,10	60,49
A22	84,80	0,00	14,25
A23	-29,79	35,36	43,14
A24	26,38	-8,92	55,63
A25	25,87	-4,44	56,55

Tabela 7: Continuação

Composto	$\Delta H_{\text{int}}^{\varepsilon=1}$	$\Delta H_{\text{int}}^{\varepsilon=4}$	$\Delta H_{\text{int}}^{\varepsilon=78,4}$
A26	-122,30	35,73	42,03
A27	-50,69	14,78	93,49
A28	10,46	42,69	40,40
A29	-32,75	-45,51	19,68
A30	-40,28	3,90	51,87
A31	-132,02	-23,44	3,70

Para a **Série B**, os coeficientes de correlação dos dados de atividade (CI_{50}) com os valores calculados de ΔH_{int} , considerando $\varepsilon=1$, $\varepsilon=4$ e $\varepsilon=78,4$ (Tabela 8), foram respectivamente: $r=0,19$, $r=0,01$ e $r=0,07$, indicando que os dados não se correlacionam, o que sugere que outros fatores além de ΔH_{int} desempenham papel importante na determinação do CI_{50} desta série, como termos entrópicos.

Tabela 8: Valores de ΔH_{int} (kcal/mol, método PM6 do MOPAC2016) considerando diferentes constantes dielétricas, para os compostos da Série B.

Composto	$\Delta H_{\text{int}}^{\varepsilon=1}$	$\Delta H_{\text{int}}^{\varepsilon=4}$	$\Delta H_{\text{int}}^{\varepsilon=78,4}$
B1	-0,06	-8,73	29,03
B2	43,18	57,36	51,33
B3	55,06	40,59	52,39
B4	35,43	23,70	25,21
B5	52,58	20,15	40,08
B6	52,96	33,98	48,41
B7	53,78	17,95	20,97
B8	-10,01	21,55	38,86
B9	-12,62	57,42	49,81
B10	51,03	26,56	51,68
B11	44,61	31,43	12,03
B12	45,58	12,95	41,72
B13	40,41	18,63	36,86

Mesmo havendo uma correlação razoável para os compostos da série A entre os dados de atividade e de ΔH_{int} , o uso dos termos adicionais descritos na Equação 6 foi avaliado na busca de uma melhor função de previsão de atividade, no modelo construído que será discutido no próximo item.

1.6.5 Modelo teórico para a predição de atividade inibitória da CYP51

O modelo criado foi baseado nos valores experimentais de EC_{50} da **série A** determinados por Andrine e colaboradores (ANDRINE, *et al.*, 2003), além de valores teóricos de ΔH_{int} , ΔG_{solv} e ΔE_{tor} , de acordo com a Equação 6 discutida no item 1.4.5 da Metodologia. Os dados utilizados para a construção do modelo podem ser encontrados na Tabela 9.

Tabela 9: ΔH_{int} (kcal/mol, método PM6, MOPAC2016), ΔG_{solv} (kcal/mol, método SM5.4, Spartan'14), ΔE_{tor} (função ChemPLP, GOLD 5.4), $\log EC_{50}$ experimental (ANDRINE, *et al.*, 2003), $\log EC_{50}$ calculado (Equação 7). (Continua)

Composto	$\Delta H_{\text{int}}^{\text{c=4}}$	ΔG_{solv}	ΔE_{tor}	$\log EC_{50 \text{ exp}}$	$\log EC_{50 \text{ calc.}}$	$\Delta \log EC_{50}$
A1*	-32,23	-8,70	0,94	1,36	2,77	-1,41
A2*	-38,32	-8,80	0,75	0,40	2,63	-2,23
A3*	-42,53	-8,73	0,69	0,71	2,57	-1,86
A4*	-16,42	-9,00	1,11	2,65	2,98	-0,33
A5	-56,06	-15,62	1,47	2,66	1,07	1,59
A6	-12,67	-13,29	0,58	1,86	2,13	-0,27
A7	-27,57	-12,32	0,76	2,22	2,08	0,14
A8	-23,19	-9,26	0,42	1,90	2,76	-0,86
A9	-8,78	-10,53	0,11	2,45	2,71	-0,26
A10	-50,72	-8,23	0,66	2,52	2,55	-0,03
A11	-21,57	-9,70	0,95	2,52	2,73	-0,21
A12	-32,69	-9,85	1,02	2,81	2,51	0,3
A13	-24,03	-9,43	0,71	2,85	2,73	0,12
A14	-35,50	-9,70	0,75	3,21	2,48	0,73
A15	-59,80	-10,28	0,49	1,62	1,93	-0,31
A16	-23,06	-10,10	0,66	2,72	2,60	0,12
A17	-26,94	-7,68	0,70	3,04	3,08	-0,04
A18	-31,67	-10,10	0,57	3,04	2,44	0,6
A19	-26,43	-5,82	1,24	3,45	3,59	-0,14
A20	26,12	-53,81	1,46	3,57	3,73	-0,16
A21	34,10	-10,62	0,44	3,57	3,43	0,14
A22	0,00	-6,22	0,92	3,73	3,91	-0,18
A23	35,36	-52,86	0,41	3,79	3,60	0,19
A24*	-8,92	-11,52	0,30	4,05	2,51	1,54

Tabela 9: Continuação

Composto	$\Delta H_{\text{Int}}^{\text{e=4}}$	ΔG_{solv}	$\Delta E_{\text{tor.}}$	$\log EC_{50 \text{ exp}}$	$\log EC_{50 \text{ calc.}}$	$\Delta \log EC_{50}$
A25	-4,44	-5,79	0,60	4,03	3,92	0,11
A26	35,73	-7,59	0,13	3,99	4,12	-0,13
A27	14,78	-6,56	0,79	4,13	4,06	0,07
A28	42,69	-8,46	0,22	4,15	4,04	0,11
A29*	-45,51	-9,51	0,53	3,53	2,34	1,19
A30	3,90	-6,69	0,70	4,09	3,84	0,25
A31	-23,44	-7,19	0,66	3,34	3,73	-0,39

Foi feita uma regressão linear múltipla com os dados da tabela acima utilizando o programa Origin 6.0, com a qual foi possível obter uma função que apresentou coeficiente de correlação múltipla igual a 0,83.

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

Equação 7

Utilizando a Equação 7 na predição da atividade dos compostos da série A, usados para a construção da mesma, foi possível reproduzir de maneira satisfatória os valores de atividades experimentais ($r=0,84$, $SD=0,45$), excetuando os compostos eliminados na construção da função. Os compostos A1-A4, eliminados do modelo, têm como espaçador um átomo de O e um número variável de grupos metileno (4 a 6), o que confere grande flexibilidade a estas estruturas. Uma explicação para esses compostos não se adequarem bem ao modelo é que essa flexibilidade pode ter feito o procedimento de docagem selecionar uma solução que não corresponde à *pose* bioativa destes compostos. As soluções selecionadas na docagem foram as usadas para o estudo de determinação da entalpia de interação, usada na construção do modelo. Quanto ao composto A24, não foi possível propor uma razão para a sua inadequação ao modelo.

A Equação 7 foi usada ainda para prever a atividade teórica (como $\log EC_{50}$) dos compostos da série B. Foi possível observar que os compostos apresentam também uma boa atividade prevista como inibidores da CYP51 de *T. cruzi*, assim como o esperado face aos valores experimentais de $\log CI_{50}$ que os mesmos apresentam (**Tabela 10**). Os valores de atividades calculada e experimental neste caso não puderam ser relacionados diretamente devido às diferenças entre ambas as medidas, tendo em vista que o valor de atividade teórica retornado pela Equação 7 trata-se de $\log CE_{50}$, enquanto que os dados experimentais se referem à $\log CI_{50}$.

Tabela 10: ΔH_{int} (kcal/mol, método PM6 do MOPAC2016), ΔG_{solv} (kcal/mol, método SM5.4 do Spartan'14), ΔE_{tor} (função *ChemPLP* do GOLD5.4), $\log CE_{50}$ calculado pela Equação 7 e valores de $\log CI_{50 \text{ exp}}$ *

Composto	$\Delta H_{\text{int}}^{\epsilon=4}$	ΔG_{solv}	ΔE_{tor}	$\log CE_{50 \text{ calc.}}$	$\log CI_{50 \text{ exp}}$
B1	-8,73	-19,90	0,49	1,21	1,65
B2	57,36	-19,36	0,93	2,42	1,70
B3	40,59	-17,894	1,51	2,36	1,43
B4	23,70	-18,69	1,23	1,95	1,12
B5	20,15	-18,34	1,08	1,93	1,19
B6	33,98	-17,39	1,64	2,33	1,26
B7	17,95	-20,08	1,88	1,74	1,59
B8	21,55	-19,35	0,55	1,79	1,60
B9	57,42	-19,93	2,78	2,48	1,55
B10	26,56	-17,18	0,71	2,17	1,71
B11	31,43	-21,47	2,26	1,84	1,61
B12	12,95	-21,63	2,10	1,50	1,68
B13	18,63	-19,51	1,63	1,80	1,27

* (FRANKLIM, *et al.*, 2013)

1.7. Planejamento de Derivados da Piperina

Os resultados do estudo por modelagem molecular da série B foram utilizados para auxiliar no planejamento de novos compostos ativos como inibidores da CYP51 de *T. cruzi*.

A docagem feita com a série B permitiu a identificação de dois aspectos que poderiam ser explorados favoravelmente com as modificações estruturais desses compostos, para que a interação com a CYP51 pudesse ser ainda mais efetiva. Primeiramente, observou-se a existência de uma região no sítio ativo de caráter hidrofóbico contendo resíduos de tirosina (Tyr-76 e Tyr-89) e fenilalanina (Phe-83 e Phe-248); Dessa maneira, a inserção de grupos hidrofóbicos nos compostos planejados na posição R1 da estrutura genérica, poderia acarretar numa estabilização do complexo formado (enzima/inibidor) através da interação desses grupos com essa cavidade hidrofóbica do sítio ativo, conforme pode ser observado na Figura 19.

Em segundo lugar, foi identificado, próximo ao enxofre do grupo 1,2,4-triazolo-3-tiona de alguns derivados, um resíduo de treonina (Thr-253), que poderia ser explorado para uma formação de interação, como por exemplo uma ligação de hidrogênio, entre o grupo hidroxila da treonina e o inibidor. Assim, o segundo aspecto explorado no planejamento desses novos compostos foi a adição dos grupos sulfóxido e sulfona ao anel triazólico Figura 19.

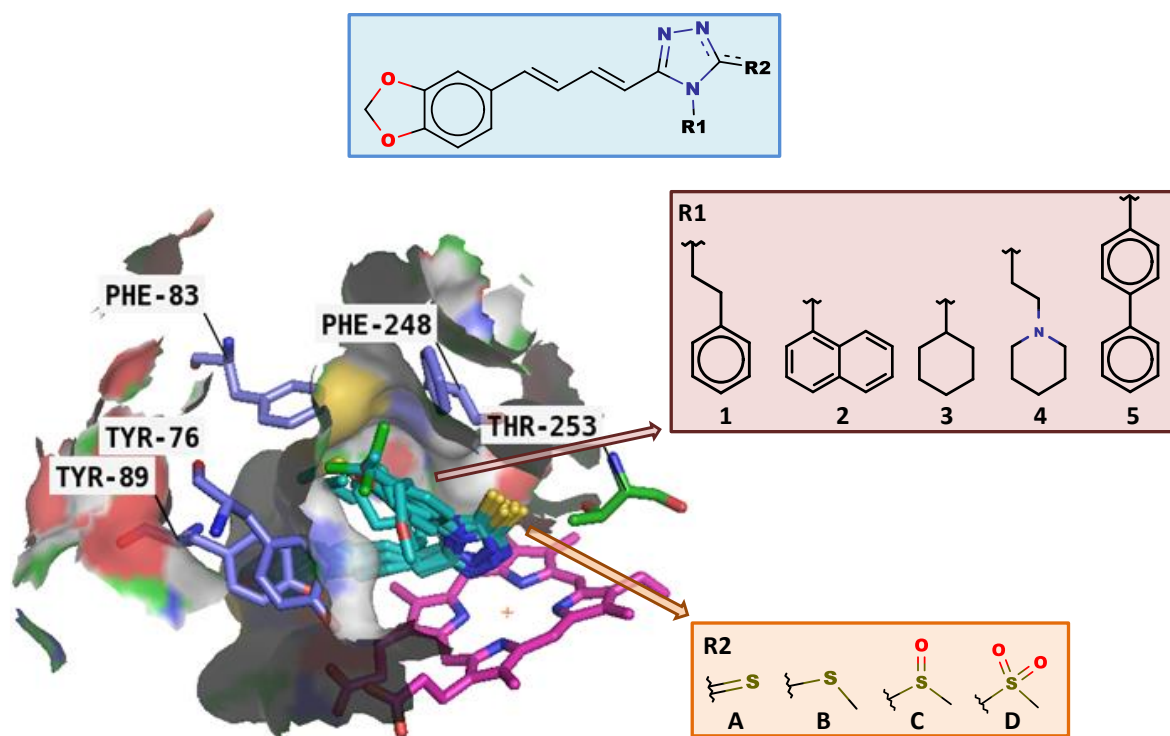
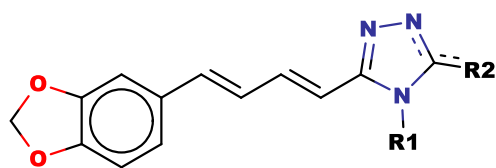


Figura 19: Representação por superfície de caráter hidrofóbico existente no sítio ativo da CYP51, composta principalmente pelos resíduos de aminoácidos de tirosinas e fenilalaninas destacados em bastões com carbonos na cor roxa. Os ligantes da série B (representados por bastões com carbonos na cor ciano) estão na posição gerada pela docagem, próximo ao grupo heme (bastões com carbonos na cor magenta). Os grupos planejados para que sejam modificados nas posições R1 e R2 da estrutura genérica, encontram-se esquematizados em destaque.









Dessa maneira, foram propostos vinte compostos análogos à série B com modificações estruturais nas posições R1 e R2, conforme a Tabela 11, para que sua atividade teórica frente a CYP51 fosse determinada pelo modelo teórico construído.

Tabela 11: Estrutura dos compostos planejados a partir da série B. (Continua)



Composto	R1	R2	Composto	R1	R2
L1A			L1B		
L1C			L1D		
L2A			L2B		
L2C			L2D		
L3A			L3B		
L3C			L3D		
L4A			L4B		
L4C			L4D		

Tabela 11: Continuação.

Composto	R1	R2	Composto	R1	R2
L5A			L5B		
L5C			L5D		

O composto B6 (com um novo código L3A) foi incluído nessa série de compostos planejados, com a finalidade de possibilitar uma comparação dos novos resultados de modelagem molecular dos compostos planejados baseados nesse composto em questão (L3B, L3C e L3D).

1.7.1 Docagem molecular

A docagem molecular com a **série L** foi feita utilizando a mesma estrutura cristalográfica 4H6O (código PDB), utilizada na docagem feito com as duas séries estudadas anteriormente. Os compostos desta série foram construídos de acordo com o mesmo procedimento usado para as séries anteriores. Na docagem, feita em duplicata, foi utilizada a mesma função de pontuação *ChemPLP*, tendo o ferro do grupo heme como átomo central para a docagem, mas com um diferencial quanto ao raio de interação, pois os melhores resultados de docagem foram obtidos com o uso de um raio de 10 Å.

Como mencionado anteriormente, próximo ao grupo heme, encontra-se um resíduo de treonina que poderia interagir com os compostos planejados. Para melhor avaliar essa possibilidade, durante a docagem, este resíduo foi deixado com uma rotação livre para que a posição do mesmo pudesse variar durante a docagem (Figura 20).

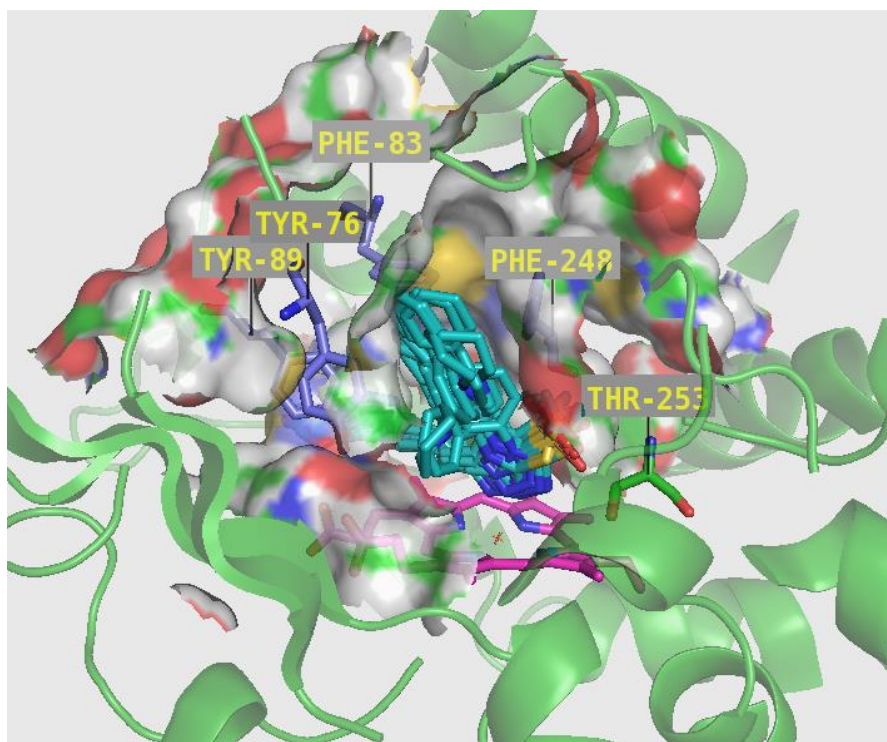


Figura 20: Representação por superfície da cavidade de caráter hidrofóbico existente no sítio ativo da CYP51 (representada na forma de *cartoon* na cor verde), os resíduos principais dessa cavidade estão destacados em bastões com carbonos na cor violeta. Os ligantes da **série L** (representados por bastões com carbonos na cor ciano) estão na posição gerada pela docagem, próximos ao grupo heme (bastões com carbonos na cor magenta).

Observamos que todos os ligantes ficaram localizados na mesma região do sítio ativo, próximo ao grupo heme (Figura 21); além de apresentarem uma distância pequena em relação ao átomo de ferro do grupo heme e os nitrogênios dos anéis triazólicos, indicando haver uma interação entre ambos (Tabela 12).

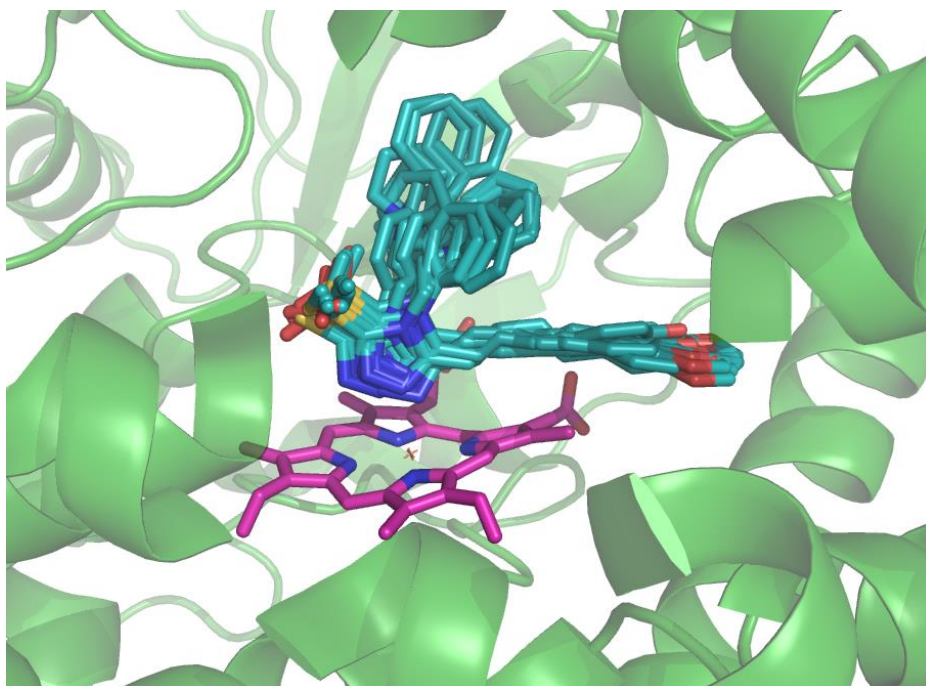


Figura 21: Melhores soluções geradas pela docagem molecular com os compostos da série L (representados em bastões com carbonos na cor ciano) interagindo com o grupo heme (representado por bastões com carbonos na cor magenta) da CYP51 de *T. cruzi* (representada por *cartoon* na cor verde).

Os valores de pontuação da docagem podem ser vistos na Tabela 12, bem como a média das pontuações e a distância de interação entre o átomo de Fe do grupo heme e o N triazólico, que também foi utilizado como critério para seleção das melhores poses.

A docagem feita com os compostos da série L apresentou valores de pontuação maiores do que os da série B, indicando que as modificações estruturais propostas promoveram melhores resultados de interação dos compostos planejados com o sítio ativo.

Tabela 12: Valores das pontuações da docagem (em duplicata) com a respectiva distância entre o N triazólico da Série L e o Fe do grupo Heme e a média das pontuações.

Composto	Pont. 1	Distância (Å)	Pont. 2	Distância (Å)	Média das Pontuações
L1A	92,36	2,61	91,22	2,54	91,79
L1B	95,24	2,61	97,32	2,61	96,28
L1C	90,76	2,67	91,96	2,61	91,36
L1D	88,44	2,61	85,80	2,64	87,12
L2A	90,61	2,61	94,60	2,67	92,61
L2B	85,27	2,19	96,89	2,53	91,08
L2C	90,96	2,93	89,30	2,61	90,13
L2D	87,47	2,61	86,34	2,83	86,91
L3A	85,23	2,61	77,64	2,74	81,44
L3B	86,44	2,67	87,70	2,76	87,07
L3C	80,14	3,33	81,46	2,74	80,80
L3D	83,08	2,83	82,45	2,80	82,77
L4A	90,16	2,57	91,88	2,58	91,02
L4B	88,78	2,31	92,33	2,64	90,55
L4C	87,31	2,64	87,06	2,67	87,19
L4D	84,66	2,67	87,63	2,83	86,14
L5A	80,69	2,61	79,96	2,58	80,33
L5B	87,71	2,25	87,54	2,18	87,63
L5C	81,21	2,57	82,24	2,61	81,72
L5D	75,56	2,57	77,01	2,59	76,29

1.7.2 Parâmetros teóricos e atividade calculada

O método semi-empírico PM6 do programa MOPAC2016 foi utilizado para calcular a entalpia de interação dos compostos da série L com a CYP51. Os cálculos foram feitos considerando a constante dielétrica do interior de proteínas ($\epsilon=4$), porque esta foi a condição adotada para a construção do modelo teórico (Tabela 13). As energias de solvatação dos compostos da série L foram determinadas pelo método SM5.4 do programa Spartan'14, para a inclusão no modelo construído (Tabela 13). O parâmetro de perda entrópica causada pela formação do complexo enzima-ligante (ΔE_{Tors}) foi determinado pelo programa GOLD 5.2 com a função *ChemPLP* durante a docagem molecular (Tabela 13).

Os três parâmetros foram aplicados na Equação 7, com a finalidade de se determinar a atividade teórica dos compostos da série L (Tabela 13).

Tabela 13: Valores calculados de $\Delta H_{Int.}^{\varepsilon=4}$, ΔG_{Solv} , ΔE_{Tors} e $\log EC_{50}^{Calc}$ determinados pela equação 7, para a série L.

Composto	$\Delta H_{Int.}^{\varepsilon=4}$ (kcal/mol)	ΔG_{Solv} (kcal/mol)	ΔE_{Tors}	$\log EC_{50}^{Calc*}$
L1A	34,95	-19,73	1,19	2,01
L1B	-6,64	-15,08	0,99	1,95
L1C	22,47	-18,81	2,02	1,98
L1D	7,72	-24,24	2,72	1,24
L2A	28,37	-21,09	1,49	1,77
L2B	9,89	-15,16	2,54	2,33
L2C	39,97	-22,01	2,74	1,97
L2D	11,54	-24,59	2,90	1,29
L3A	21,21	-18,50	0,84	1,91
L3B	23,69	-13,26	0,84	2,77
L3C	18,55	-17,82	1,85	2,03
L3D	-20,69	-20,26	2,13	1,08
L4A	35,74	-58,09	0,82	4,90
L4B	28,07	-67,31	0,93	7,68
L4C	21,06	-62,01	1,76	5,85
L4D	99,34	-67,38	2,51	9,02
L5A	24,43	-20,33	2,29	1,85
L5B	-10,42	-14,99	2,25	2,00
L5C	19,57	-20,69	3,29	1,80
L5D	10,42	-24,33	3,58	1,34

*calculado a partir da Equação 6

Os resultados calculados de $\log EC_{50}$ indicam que os compostos da série L possuem uma boa atividade prevista contra a CYP51, incluindo um composto, **L3D**, mais ativo (teoricamente) do que todos da série B, que serviu de ponto de partida para a esta nova série planejada. Entretanto os compostos **L4A**, **L4B**, **L4C** e **L4D** apresentaram valores teóricos de atividade menos promissores, indicando que possivelmente, a presença de um grupo etil piperidíneo na posição R1 (Tabela 11) não favoreça a interação dos mesmos com a enzima.

Outra explicação possível para esse resultado desfavorável para esses quatro compostos seria o fato que as estruturas foram consideradas protonadas durante os cálculos, para que pudessem reproduzir mais fielmente uma situação de interação real, pois tais estruturas de caráter básico, provavelmente se encontrariam protonadas. E sendo assim, o

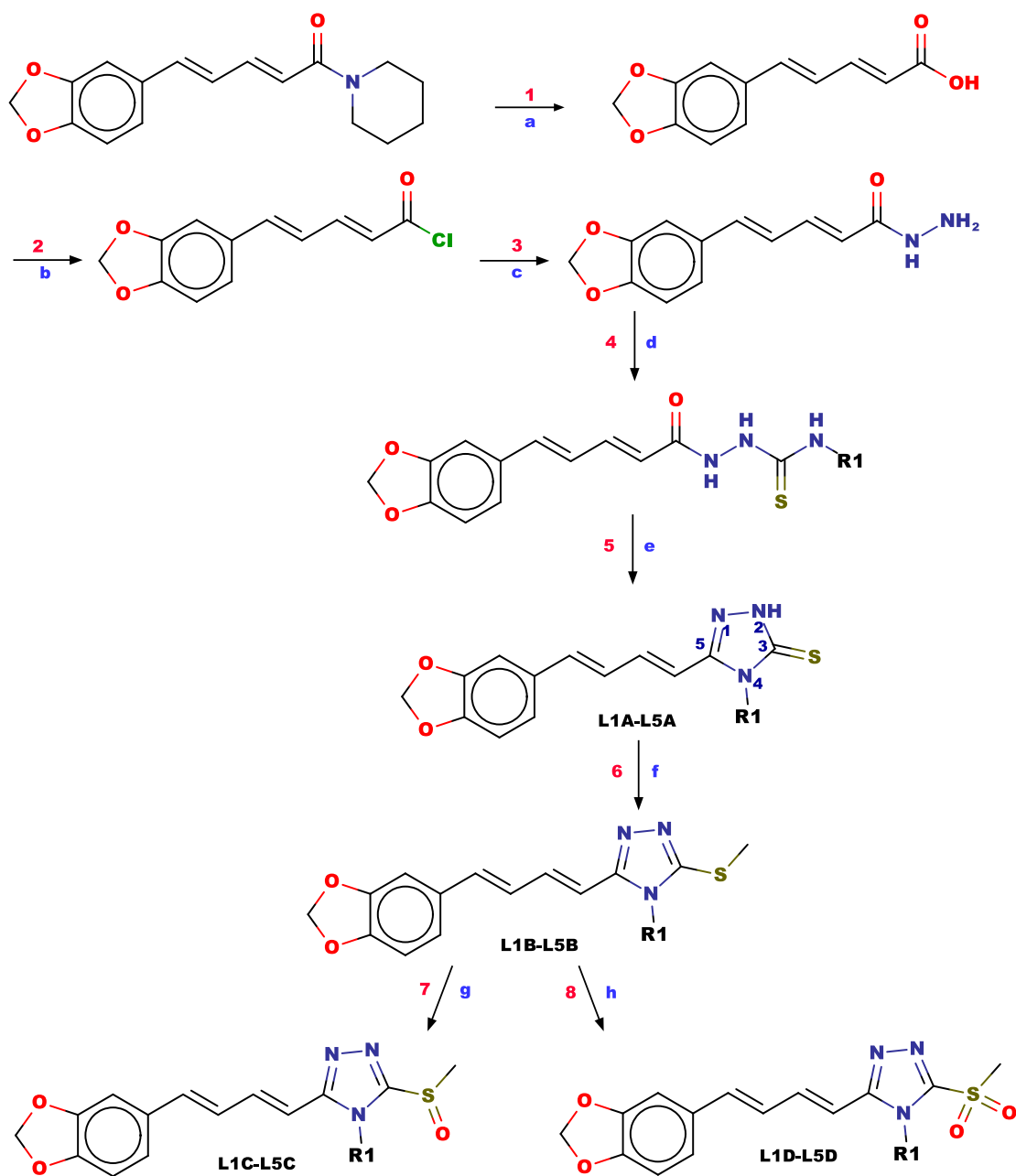
modelo construído, pode não ser tão preciso para prever atividade de estruturas protonadas, uma vez que sua construção se baseou em estruturas neutras, predominantemente.

Considerando que os melhores valores de atividade teórica encontrados nesse estudo, foram os referentes aos compostos **L3D** e **L1D**, os compostos **L3A (B6)** -**L3D** e **L1A-L1D** foram selecionados para serem sintetizados.

1.8. Síntese de Compostos Planejados

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

Como pode ser observado no Esquema 4, a preparação dos derivados triazólicos parte da amida natural extraída previamente da pimenta do reino (que pode ser adquirida comercialmente), esta amida passa em seguida por um total de cinco reações para a formação dos triazóis. A primeira etapa promove a conversão da piperina em ácido piperínico através de uma reação de hidrólise; A segunda transforma o ácido piperínico em um cloreto de ácido, para a subsequente formação da hidrazida, por uma reação de substituição nucleofílica acíclica na terceira etapa. Na etapa quatro há uma reação com isotiocianatos variados de acordo com o grupamento de interesse a ser adicionado ao nitrogênio 4 do anel triazólico que é formado com uma reação de ciclização do mesmo (formando os derivados **L1A**, **L2A**, **L3A**, **L4A** ou **L5A**, na etapa 5 seguinte (FRANKLIM, *et al.*, 2013).



1-8: Etapas da rota sintética.

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

b: (COCl)₂, T. A.

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

e: NaOH_(aq) 10%, refluxo
(M.O.), 30min.

c: NH₂NH₂.H₂O/CH₂Cl₂ seco
T. A., 75%.

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

g: 1) Metanol;
2) NaIO₄/H₂O; 0°C, 12h.

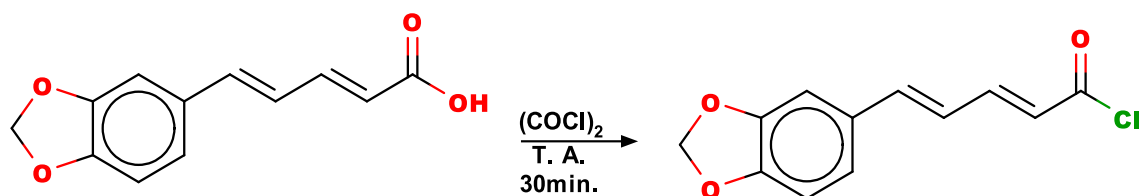
h: 1) Metanol;
2) KHSO₄/H₂O; T.A., 4h.

Esquema 4: Esquema da síntese dos derivados triazólicos planejados a partir da piperina.

A partir do triazol formado, os derivados **L1B, L2B, L3B, L4B** ou **L5B** são formados por intermédio de uma reação de alquilação, na etapa 6. Em seguida, os produtos alquilados, podem passar pela etapa 7, com uma reação de oxidação para a formação dos derivados **L1C, L2C, L3C, L4C** ou **L5C** utilizando periodato de sódio, que é um oxidante mais brando para a formação do grupo sulfóxido; ou são tratados conforme a etapa 8 para a formação dos derivados **L1D, L2D, L3D, L4D** ou **L5D**, com outra metodologia de oxidação mais energética, utilizando hidrogenossulfato de potássio (Oxone®) para promover a formação do grupo sulfona.

Tendo em vista que o ácido piperínico foi previamente preparado e cedido pelo professor Dr. Marco Edilson Freire de Lima, não se fez necessário a realização das etapas 1 e 2 da rota sintética apresentada no Esquema 4.

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



Esquema 5: Síntese do cloreto de ácido.

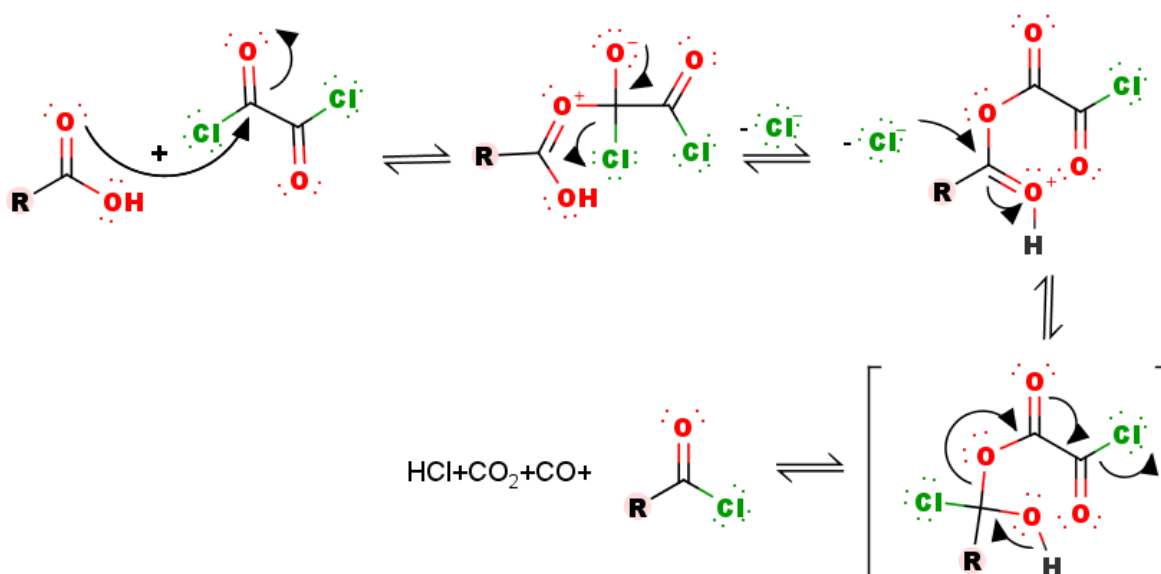
A formação do cloreto de ácido a partir do ácido piperínico tem por finalidade, a ativação da carbonila do mesmo, para a formação da hidrazida na etapa 3, de Substituição Nucleofílica Acílica ($S_{N_{Ac}}$) seguinte. Seguindo a metodologia de Franklím e colaboradores, nesta etapa, foi adotado o uso de cloreto de oxalila que oferece a vantagem de formar subprodutos gasosos (HCl, CO e CO_2) que não contaminam o produto desejado nesse tipo de reação, (MARCH, 1985) além de permitir que a reação seja feita em temperatura ambiente.

A alta reatividade do produto formado à umidade torna necessária a utilização de atmosfera inerte durante todo o procedimento, sendo assim, foi utilizado gás nitrogênio durante a reação. Como a reação não necessita de aquecimento, o procedimento foi feito em temperatura ambiente, apenas com agitação por meio de uma barra de agitação magnética.

Além disso, a reatividade do cloreto de ácido implica que a confirmação da reação (por CCDA) seja feita de maneira indireta, através da reação de uma alíquota do produto com metanol, a fim de se obter o éster metílico correspondente. Do contrário, o produto reagiria com a umidade do ambiente, voltando ao ácido de partida, inviabilizando assim, a confirmação da formação do cloreto de ácido de interesse.

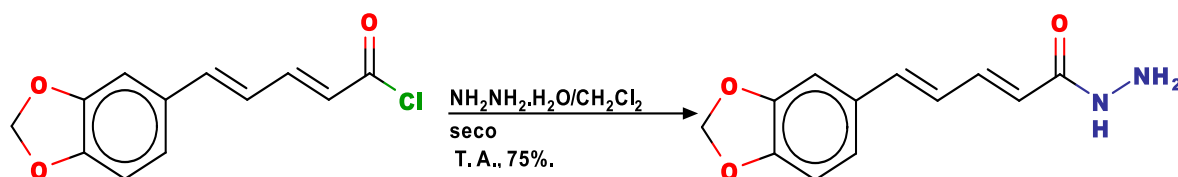
O cloreto de ácido obtido, não pôde ser quantificado, purificado, nem devidamente caracterizado por causa da sua alta reatividade, já mencionada. Portanto, o produto foi imediatamente utilizado na etapa de $S_{N_{Ac}}$ seguinte (et. 3), para a formação da hidrazida.

No Esquema 6, podemos observar uma proposta mecanística para a reação de formação de cloretos de acila utilizando para tal cloreto de oxalila a partir de uma estrutura genérica de ácido carboxílico.



Esquema 6: Proposta do mecanismo genérico de formação de cloretos de acila em presença de cloreto de oxalila (Adaptado de MARCH, 1985).

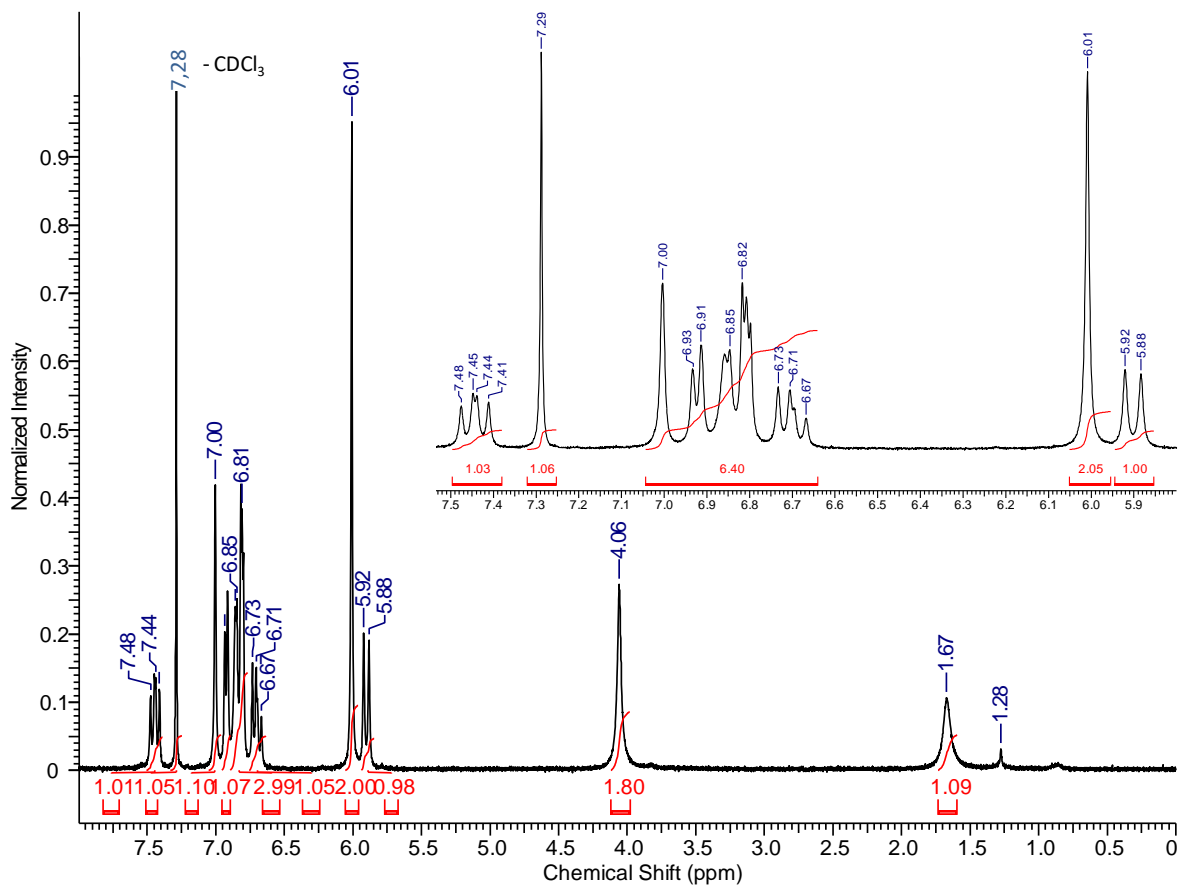
1.8.2 Preparação da (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dieno-hidrazida



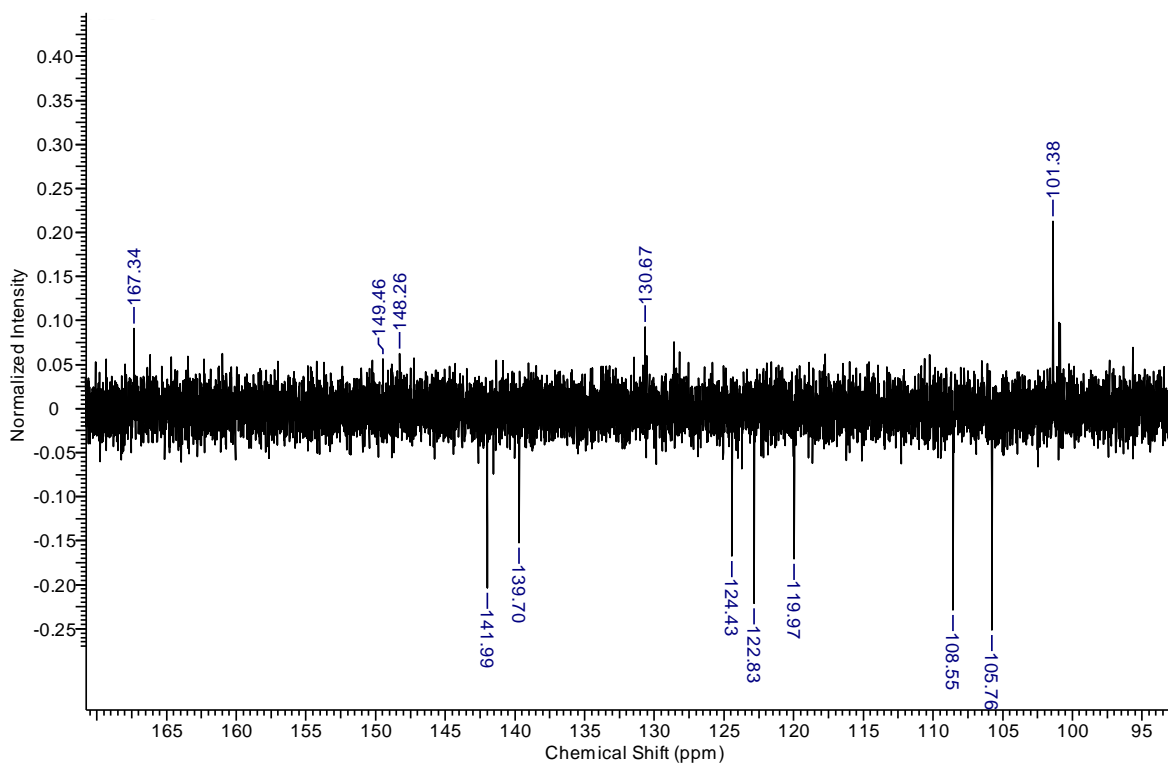
Esquema 7: Síntese da hidrazida.

Conforme descrito no trabalho de Franklim e colaboradores, para a obtenção da hidrazida desejada, com a metodologia proposta, é necessário que se faça a adição de cloreto de acila sobre a solução da hidrazina monohidratada, nesta ordem, para evitar a formação de subprodutos (possivelmente diacilidrazina e oxadiazol) de difícil separação (FRANKLIM, *et al.*, 2013). Mantendo-se um excesso de hidrazina, evita-se que a reação de S_NAc ocorra nos dois nitrogênios da mesma e forme-se os subprodutos indesejados.

A reação apresentou um rendimento de 89% e a hidrazida formada foi caracterizada por RMN ¹H (Espectro 1) e RMN ¹³C (Espectro 2), de acordo com as atribuições propostas que se encontram na Tabela 16.



Espectro 1: RMN ^1H da hidrazida (400 MHz) feito em CDCl_3 .



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

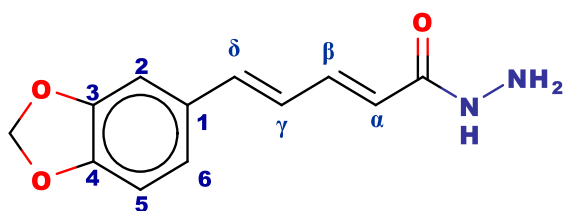


Figura 22: Estrutura da hidrazida.

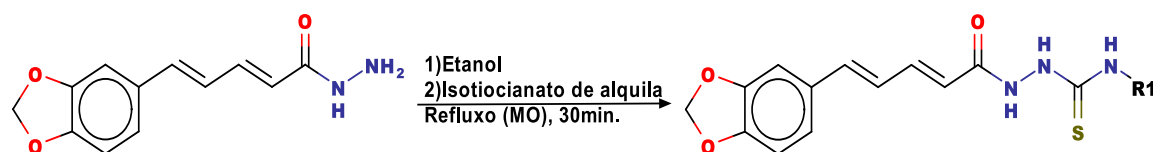
Tabela 14: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a hidrazida.

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	130,67 (C)
2	7,0 (s, 1H)	105,76 (CH)
3	-	149,46 (C)
4	-	148,26 (C)
5	6,86 (d, 1H)	108,55 (CH)
6	6,92 (d, 1H)	122,83 (CH)
α	5,80 (d, 1H)	119,97 (CH)
β	7,44 (dd, 1H)	141,99 (CH)
γ	6,81 (m, 1H)	124,43 (CH)
δ	6,71 (m, 1H)	139,70 (CH)
C=O	-	167,34 (C)
NH	1,67 (s, 1H)	-
NH ₂	4,06 (s, 2H)	-
OCH ₂ O	6,01 (s, 2H)	101,38 (CH ₂)

No espectro de RMN de ^1H observou-se um simpleto em δ 6,01 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, um dubleto δ 5,80 ppm referente ao hidrogênio α da cadeia olefínica, além de um grupo de sinais entre δ 6,81 e δ 7,44 ppm, referentes aos hidrogênios aromáticos e olefínicos da cadeia lateral, que são sinais bem característicos que confirmam a obtenção da hidrazida. Observou-se um simpleto em δ 4,06 ppm referente aos dois hidrogênios do grupamento NH₂ e um simpleto em δ 1,67 ppm referente ao grupamento NH (Tabela 14).

No espectro de RMN ^{13}C notou-se um sinal em δ 167,34 ppm, referente ao carbono da carbonila da hidrazida, em δ 101,38 ppm referente ao carbono do anel metilenodioxílico, qua também são sinais bem característicos do composto em questão, além dos demais sinais que podem ser observados na Tabela 14.

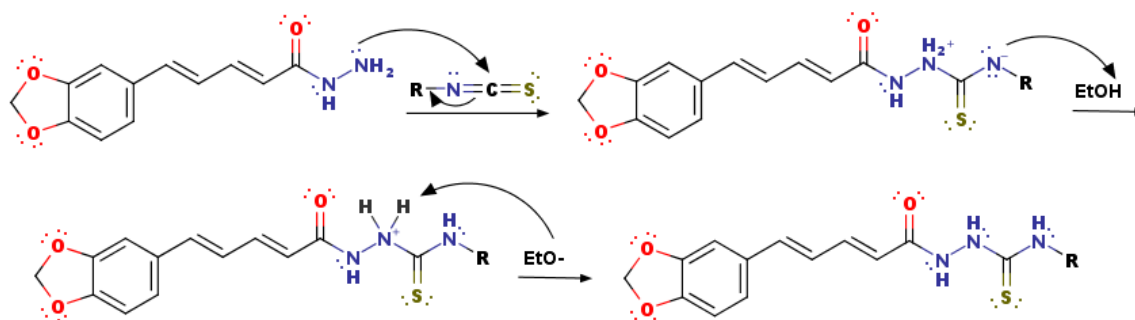
1.8.3 Preparação dos intermediários 2-[(2E,4E)-5-(1,3benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-alquil/aril-hidrazinocarbotioamida



Esquema 8: Síntese dos intermediários para a formação dos triazóis planejados.

Metodologias clássicas para a síntese de núcleos triazólicos propõem a conversão da hidrazida em um intermediário hidrazinocarbotioamida para a formação do mesmo, envolvendo geralmente, a utilização de isotiocianatos em condição de refluxo (cansiz, 2012 mavrova, 2009, khan, 2010). No trabalho desenvolvido por Franklim e colaboradores, foi proposta uma adaptação nas metodologias clássicas, com a utilização de irradiação de micro-ondas com sistema aberto e refluxo em substituição ao aquecimento convencional. Tal proposta, foi adotada no presente trabalho, em que utilizamos os isotiocianatos de alquila, de acordo com cada derivado desejado, em etanol, com condição de refluxo, e irradiação de micro-ondas que possibilita um tempo bem menor de reação (30min.), visto que nas metodologias clássicas, a reação pode durar algumas horas (cansiz, 2012 mavrova, 2009, khan, 2010).

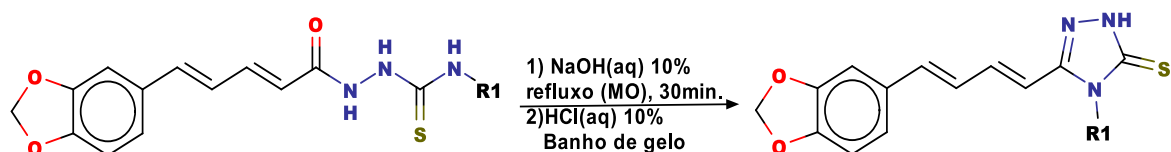
A proposta mecanística para a reação de formação das hidrazinocarbotioamidas encontra-se no Esquema 9.



Esquema 9: Mecanismo proposto para a obtenção dos intermediários carbotioamidas.

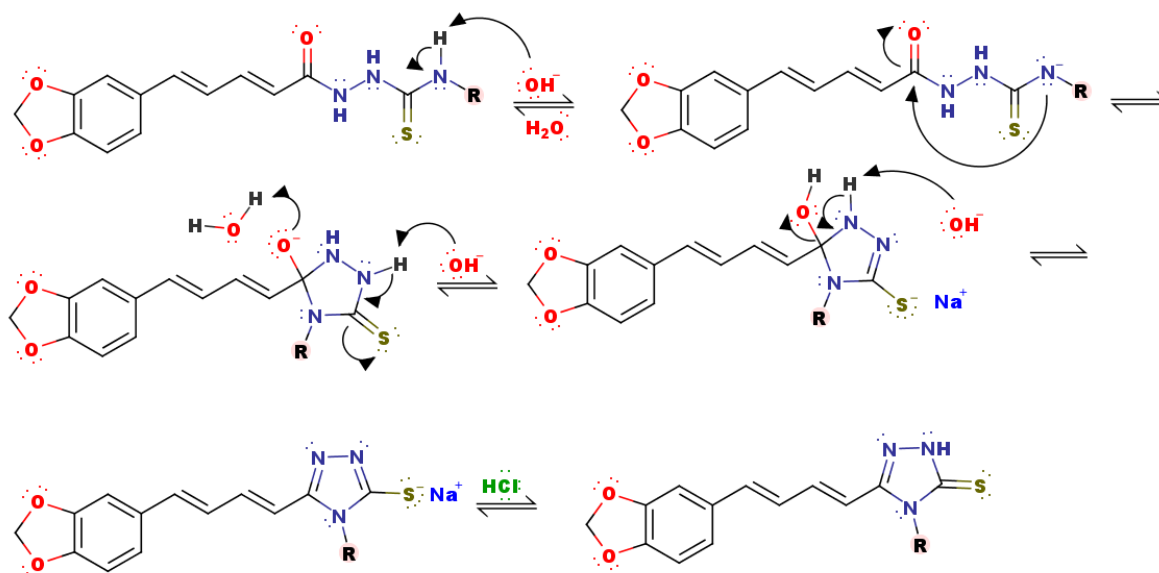
Tanto o intermediário do composto **L3A**, quanto o do composto **L1A** apresentaram coloração amarelo e forma de sólido amorfo, eles foram imediatamente utilizados na etapa seguinte de ciclização do anel triazólico, para a formação dos compostos **L3A** e **L1A**, respectivamente.

1.8.4 Preparação dos derivados triazólicos (2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona)



Esquema 10: Síntese dos compostos triazólicos.

Para a preparação dos derivados triazólicos, utilizou-se como base, uma metodologia descrita anteriormente em que se utiliza uma solução aquosa de NaOH (cansiz, 2012, mavrova, 2009 e khan, 2010) com uma adaptação ao uso de irradiação de micro-ondas (100W e 100°C) em condições de refluxo (sistema aberto) (FRANKLIM, *et al.*, 2013). O mecanismo proposto para a reação de ciclização que permite formar os derivados triazólicos pode ser observado no Esquema 11.

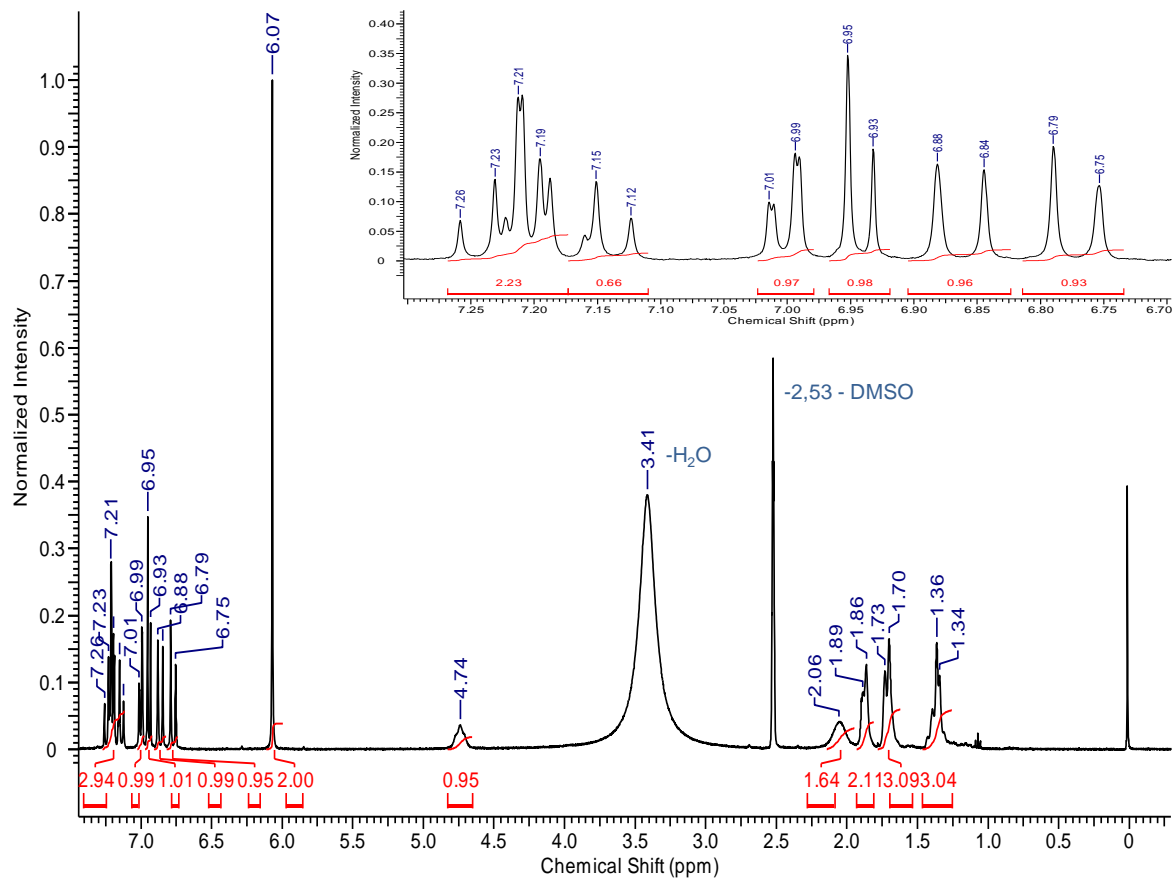


Esquema 11: Mecanismo proposto para a obtenção dos derivados triazólicos.

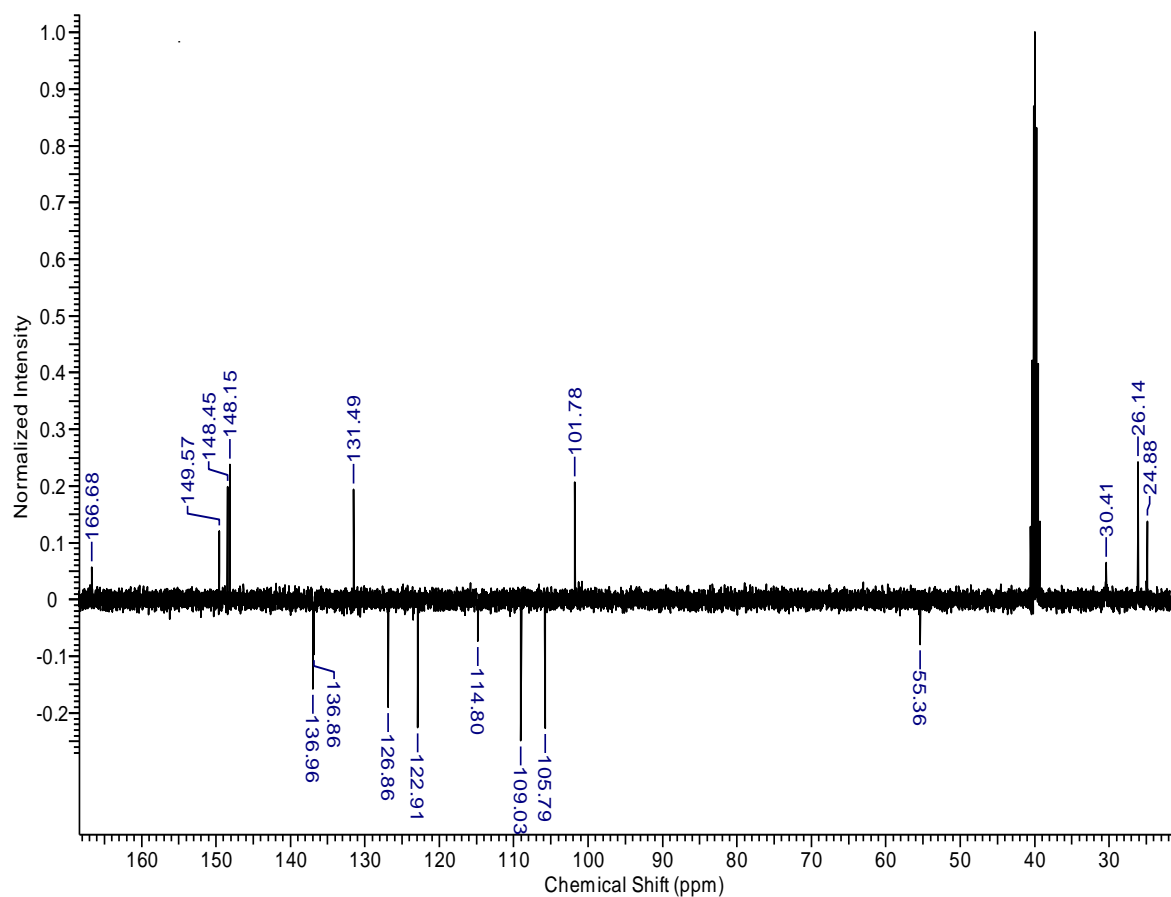
I. L3A (B6)

Após a reação de formação do derivado **L3A**, foi feita uma recristalização utilizando etanol para aumentar a pureza do composto, que apresentou forma de um sólido amarelo claro e um rendimento de 89%.

A caracterização do derivado foi feita por RMN de ^{13}C (Espectro 4), de ^1H Espectro 3 e espectrometria de massas. As atribuições propostas podem ser observadas na Tabela 15.



Espectro 3: RMN ¹H do L3A (400 MHz) feito em DMSO-D₆.



Espectro 4: RMN ^{13}C do L3A - DEPTQ (100 MHz) feito em $\text{DMSO-}D_6$.

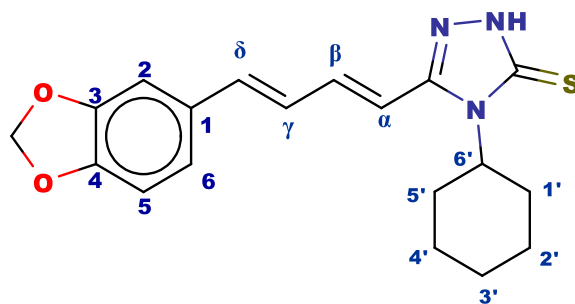


Figura 23: Estrutura do L3A.

Tabela 15: Deslocamentos químicos de RMN ¹H e RMN ¹³C para o triazol L3A (B6).

Posição	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)
1	-	131,49 (C)
2	7,21 (s, 1H)	105,79 (CH)
3	-	148,15 (C)
4	-	148,45 (C)
5	6,94 (d, 1H)	109,3 (CH)
6	7,01 (d, 1H)	121,91 (CH)
1'	1,30-2,15 (m, 2H)	55,36 (CH)
2'	1,30-2,15 (m, 2H)	30,41 (CH ₂)
3'	1,30-2,15 (m, 2H)	26,14 (CH ₂)
4'	1,30-2,15 (m, 2H)	24,87 (CH ₂)
5'	1,30-2,15 (m, 2H)	26,14 (CH ₂)
6'	4,74 (m, 1H)	30,41 (CH ₂)
α	6,77 (d, 1H)	114,80 (CH)
β	7,21 (dd, 1H)	136,96 (CH)
γ	7,00 (dd, 1H)	126,86 (CH)
δ	6,86 (d, 1H)	136,86 (CH)
C=S	-	166,68 (C)
C=N	-	149,57 (C)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,78 (CH ₂)

No espectro de RMN de ¹H observou-se simpleto em δ 6,07 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, os sinais entre δ 6,77 e δ 7,21 ppm referentes a cadeia olefínica e os sinais entre δ 6,94 ppm e δ 7,21 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos. Além destes, nota-se também sinais entre δ 1,30 ppm e δ 2,15 ppm correspondentes aos hidrogênios do grupo cicloexila, característico do composto L3A (6B). Entretanto, não foi observado sinal referente ao hidrogênio do NH do anel triazólico, o que pode ser um indício de que houve troca de hidrogênio com o solvente.

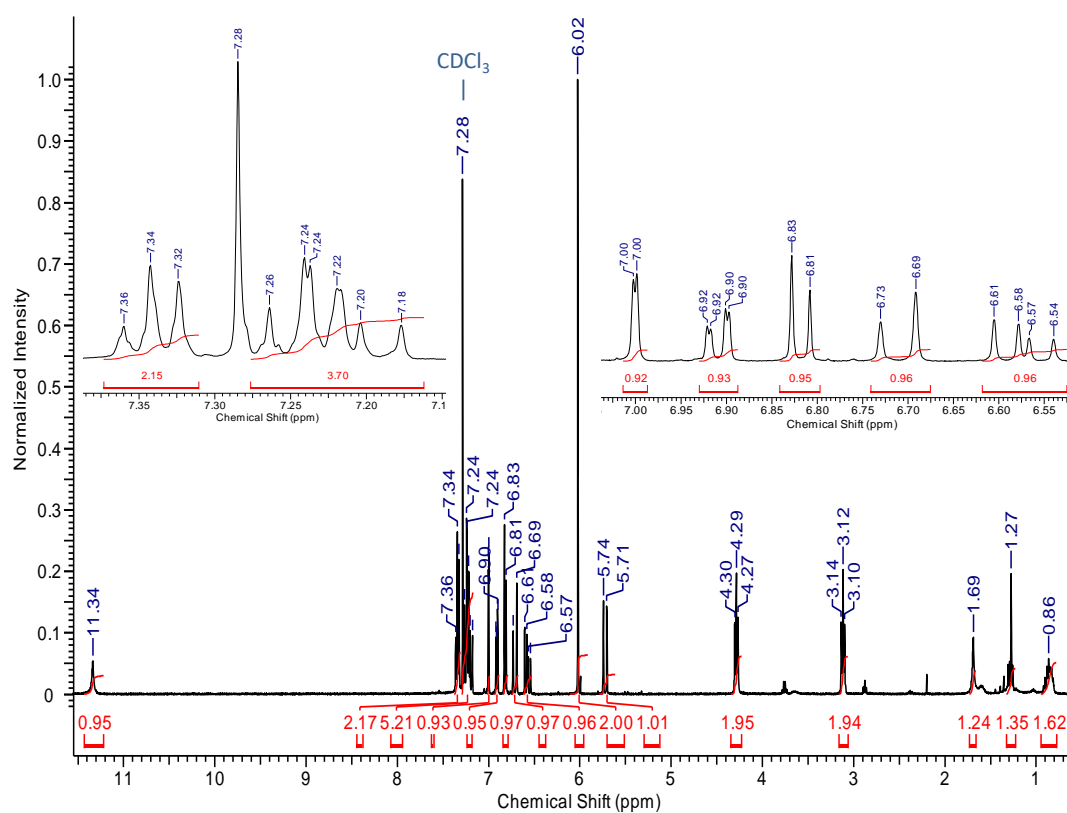
No espectro de RMN ¹³C notou-se um sinal em δ 166,68 ppm, referente ao carbono ligado ao enxofre, outro em em δ 149,57 ppm referente ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos no anel triazólico, além do sinal em δ 101,78 ppm referente ao carbono do anel metilenodioxílico. Observou-se também sinais entre δ 24,87 ppm e δ 30,41 ppm referentes aos CH₂ e o sinal em δ 55,36 ppm referente ao CH, todos do grupo cicloexila. Além dos demais sinais do anel aromático e da cadeia olefínica, conforme a Tabela 15 que corroboram para caracterização da estrutura em questão.

II. L1A

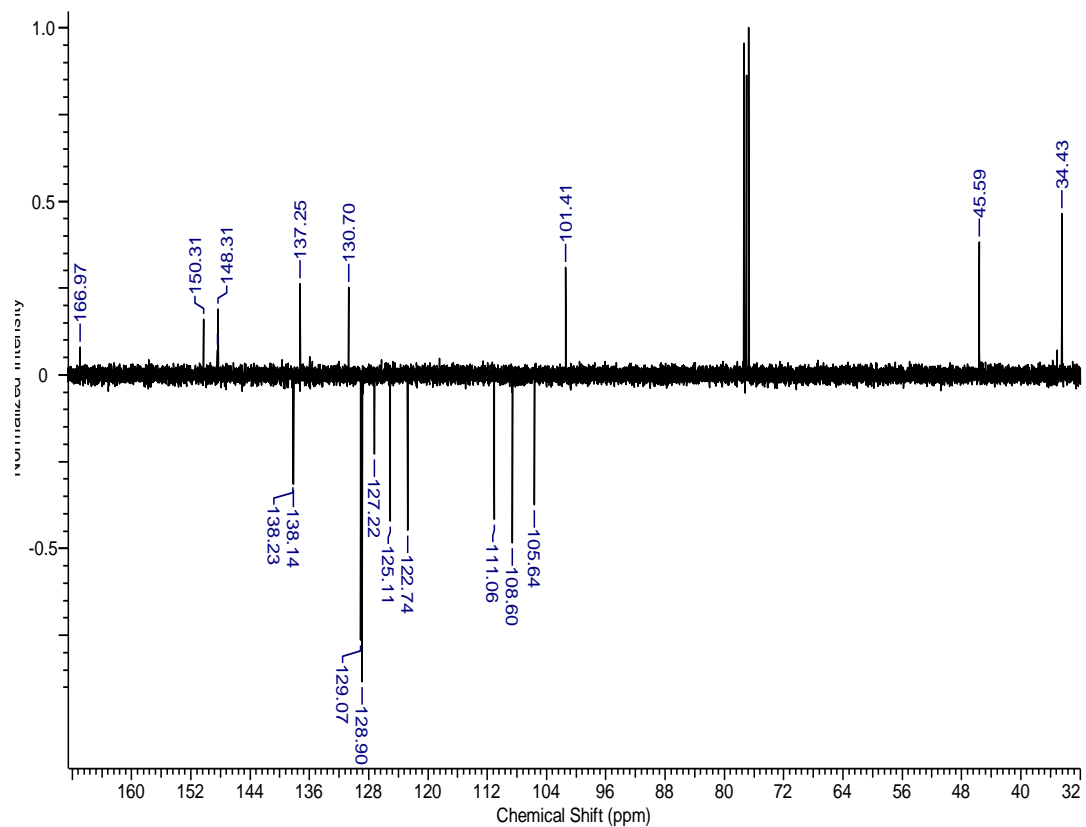
Na reação de formação do derivado **L1A**, após a adição de ácido clorídrico aquoso, observou-se a formação de um produto viscoso amorfo, diferentemente do ocorrido na reação de formação do **L3A**. Foi feita então, uma extração com acetato de etila (por três vezes), fase orgânica foi filtrada em sulfato de sódio anidro (para a remoção de água residual) e após a remoção do solvente, observou-se a formação de um sólido amorfo amarelo escuro.

Posteriormente, foi feita uma recristalização utilizando etanol para aumentar a pureza do composto, que apresentou forma de um sólido com formato de agulhas, amarelo escuro e um rendimento de 95%.

A caracterização do derivado foi feita por RMN de ^1H (Espectro 5), de ^{13}C (Espectro 6) e espectrometria de massas (Espectro 7). As atribuições propostas podem ser observadas na Tabela 16.



Espectro 5: RMN ^1H do **L1A** (400 MHz) feito em CDCl_3 .



Espectro 6: RMN ^{13}C do L1A (100 MHz) feito em CDCl_3 .

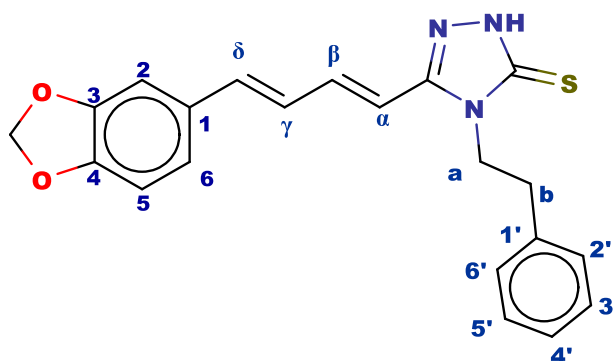


Figura 24: Estrutura do triazol L1A.

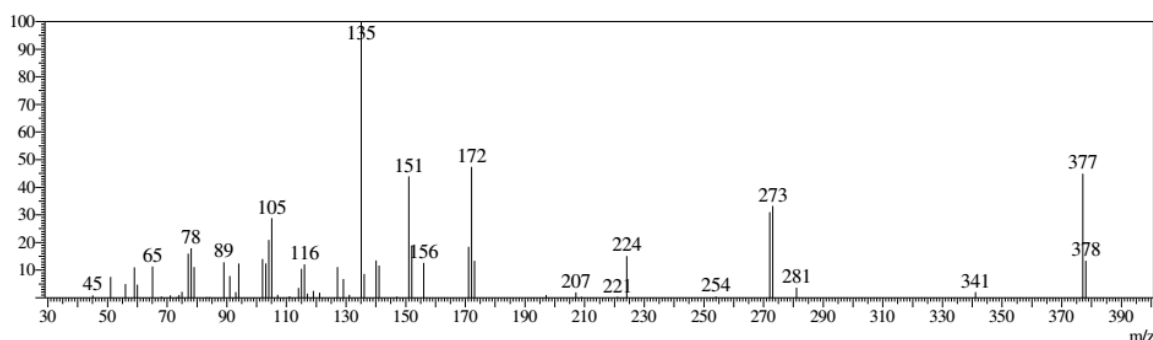
Tabela 16: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o triazol **L1A**.

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	130,69 (C)
2	7,00 (s, 1H)	105,53 (CH)
3	-	148,30 (C)
4	-	148,39 (C)
5	6,82 (d, 1H)	108,59 (CH)
6	6,91 (dd, 1H)	122,73 (CH)
1'	-	137,24 (C)
2'	7,18-7,26 (m, 1H)	127,21 (CH)
3'	7,34 (t, 1H)	129,07 (CH)
4'	7,18-7,26 (m, 1H)	128,90 (CH)
5'	7,34 (t, 1H)	129,07 (CH)
6'	7,18-7,26 (m, 1H)	127,21 (CH)
a	4,29 (t, 2H)	45,59 (CH ₂)
b	3,12 (t, 2H)	34,43 (CH ₂)
α	5,72 (d, 1H)	111,05 (CH)
β	7,18-7,26 (m, 1H)	138,22 (CH)
γ	6,80 (m, 1H)	125,10 (CH)
δ	6,71 (d, 1H)	138,14 (CH)
C=S	-	166,97 (C)
C=N	-	150,30 (C)
NH	11,34 (s, 1H)	-
OCH ₂ O	6,02 (s, 2H)	101,40 (CH ₂)

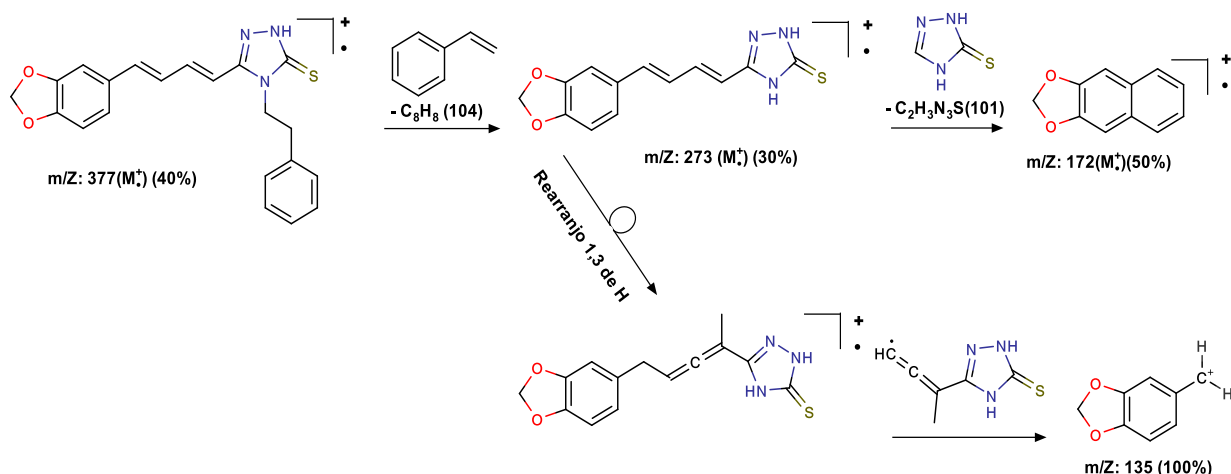
No espectro de RMN de ^1H observou-se um simpleto em δ 6,02 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, os sinais entre δ 5,72 e δ 7,26 ppm referentes a cadeia olefínica e os sinais entre δ 6,82 ppm e δ 7,00 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos. Além destes, nota-se também sinais entre δ 7,18 ppm e δ 7,34 ppm correspondentes aos hidrogênios do anel aromático referente ao grupo R1 ligado ao anel triazólico, característico do composto L1A. Observou-se ainda referente ao hidrogênio do NH do anel triazólico em δ 11,34 ppm.

No espectro de RMN ^{13}C notou-se um sinal em δ 166,97 ppm, referente ao carbono ligado ao enxofre, outro em δ 150,30 ppm referente ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos no anel triazólico, além do sinal em δ 101,78 ppm referente ao carbono do anel metilenodioxílico. Observou-se também sinais entre δ 127,21 ppm e δ 129,07 ppm referentes

aos CH e um sinal em δ 137,24 do carbono quaternário do anel aromático do grupo R1 ligado ao anel triazólico. Além dos sinais do anel aromático e da cadeia olefínica, conforme a Tabela 15 que corroboram para caracterização da estrutura em questão.



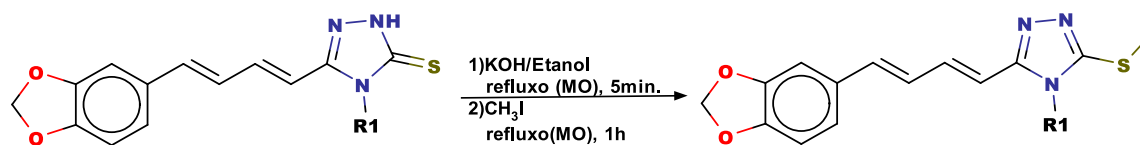
Espectro 7: Espectro de massas do derivado **L1A**.



Esquema 12: Proposta de fragmentação para o composto **L1A**. $m/z = 377$ (40%), 273(30%), 172(50%) e 135(100%).

No espectro de massas do derivado L1A (Espectro 7), encontram-se fragmentos como o íon molecular $m/z = 377$ (M^+ , 40%), o pico base $m/z = 135$ (100%), além dos $m/z = 273$ (30%) e 172 (50%), correspondendo às fragmentações propostas conforme o Esquema 12. Os demais derivados apresentaram espectros de massa que seguem o padrão de fragmentação observado no espectro supracitado.

1.8.5 Derivados triazólicos alquilados

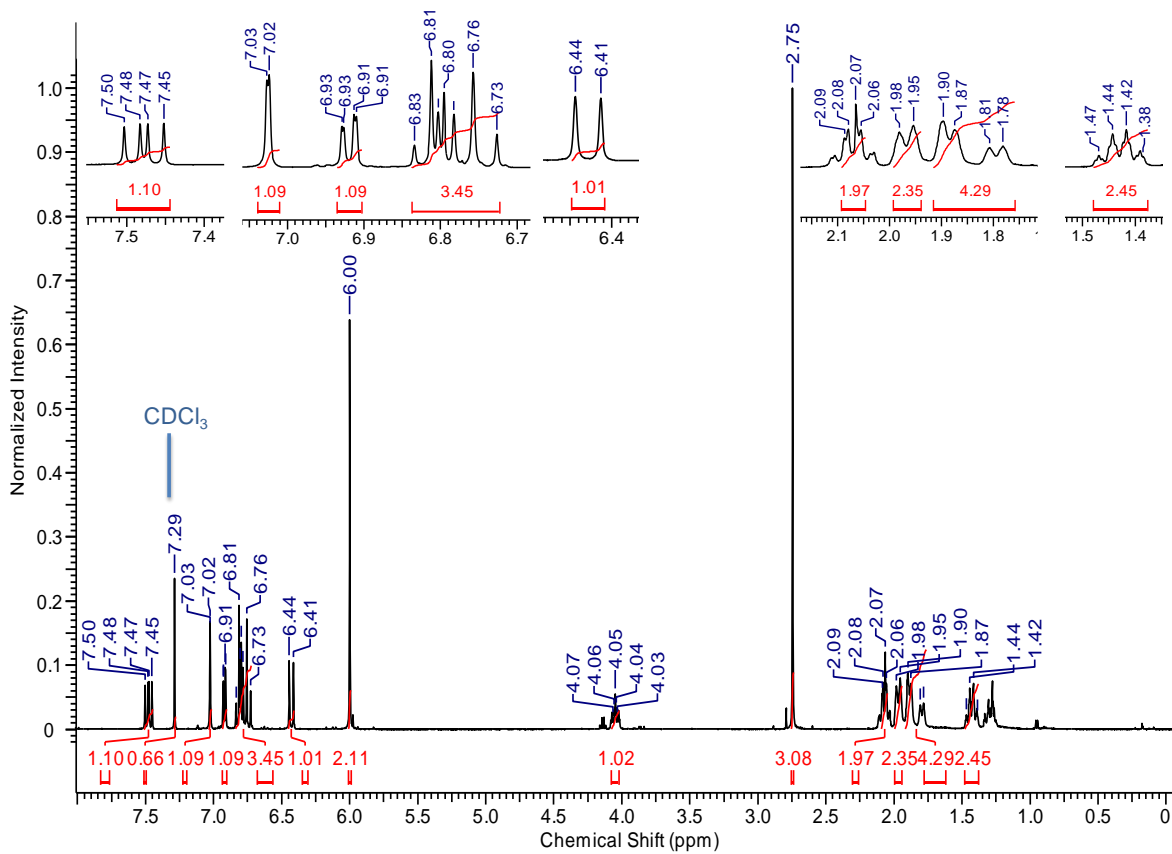


Esquema 13: Síntese dos compostos triazólicos alquilados.

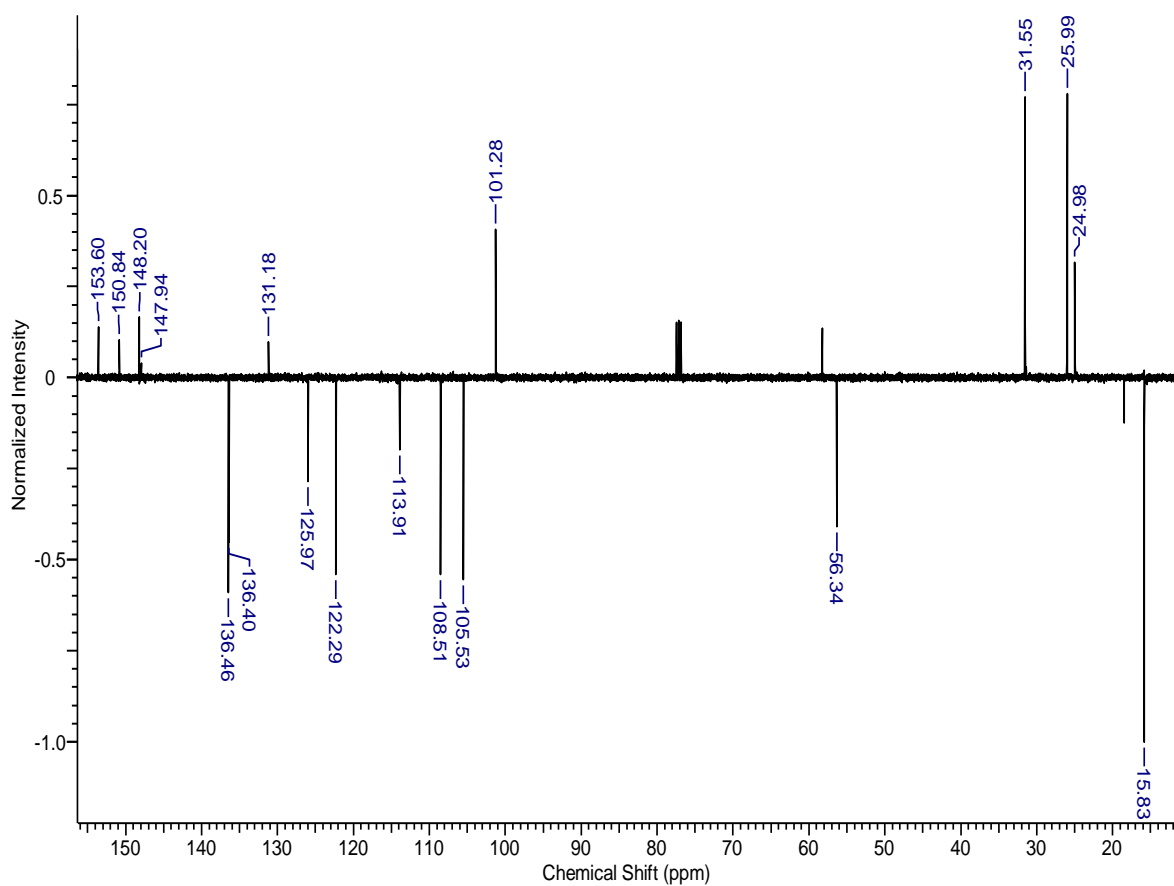
Os derivados alquilados foram preparados utilizando para tal, uma metodologia proposta por Naveena e colaboradores (NAVEENA, *et al.*, 2010), em que se utiliza uma solução etanólica de KOH e um aleto de alquila, neste caso, um iodeto de metila. Foi feita uma adaptação da metodologia original, com a utilização de irradiação de micro-ondas com a finalidade de diminuir o tempo de reação para 2 horas, sendo que originalmente eram necessárias aproximadamente 10 horas para a formação do produto desejado.

I. L3B

O derivado **L3B** foi obtido com um rendimento de 73% na forma de um sólido amarelo amorfo. Sua caracterização foi feita por RMN de ¹³C (Espectro **8**), de ¹H (Espectro **9**) e espectrometria de massas. As atribuições propostas podem ser observadas na Tabela 17.



Espectro 8: RMN ^1H do L3B (500 MHz) feito em CDCl_3 .



Espectro 9: RMN ^{13}C do **L3B** - DEPTQ (100 MHz) feito em CDCl_3 .

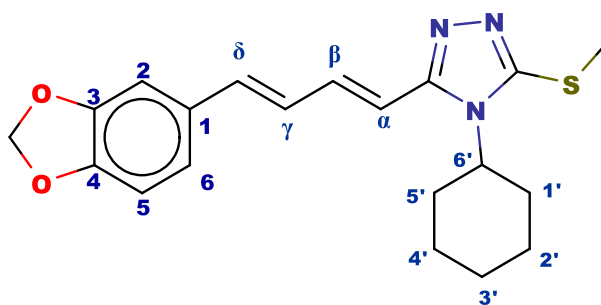


Figura 25: Estrutura do derivado **L3B**.

Tabela 17: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o triazol **L3B**.

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	-	131,18 (C)
2	7,03 (s, 1H)	105,53 (CH)
3	-	148,20 (C)
4	-	147,94 (C)
5	6,80 (d, 1H)	108,51 (CH)
6	6,92 (d, 1H)	122,29 (CH)
1'	4,74 (s, 1H)	31,55 (CH_2)
2'	1,38-2,09 (m, 2H)	25,99 (CH_2)
3'	1,38-2,09 (m, 2H)	24,98 (CH_2)
4'	1,38-2,09 (m, 2H)	25,99 (CH_2)
5'	1,38-2,09 (m, 2H)	31,55 (CH_2)
6'	1,38-2,09 (m, 2H)	53,34 (CH)
α	6,42 (d, 1H)	113,91 (CH)
β	7,48 (dd, 1H)	136,46 (CH)
γ	6,81 (dd, 1H)	125,97 (CH)
δ	6,76 (d, 1H)	136,40 (CH)
C-S	-	163,60 (C)
C=N	-	150,84 (C)
OCH_2O	6,00 (s, 2H)	101,28 (CH_2)
S- CH_3	2,75 (s, 3H)	15,83 (CH_3)

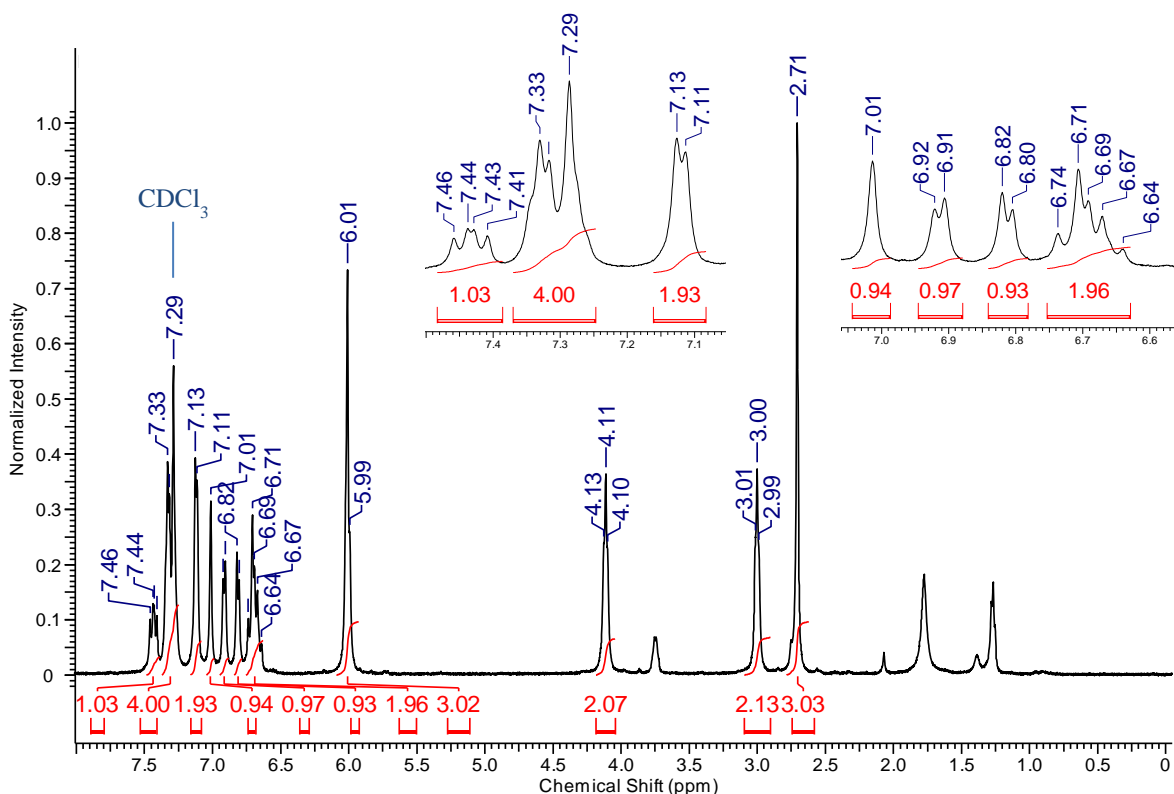
No espectro de RMN de ^1H pôde ser confirmada a reação de alquilação, com a presença de um simpleto em 2,75 ppm, com uma integração para três hidrogênios, referente à metila que foi adicionada ao enxofre do anel triazólico. Além disso, observou-se um os demais sinais referentes a estrutura do derivado, como por exemplo, o simpleto em δ 6,00 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, os sinais entre δ 6,42 e δ 7,48 ppm referentes a cadeia olefínica e os sinais entre δ 6,80 ppm e δ 7,03 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos. Além destes, nota-se também sinais entre δ 1,38 ppm e δ 2,09 ppm, além do sinal em 4,74 ppm, correspondentes aos hidrogênios do grupo cicloexila, característico do composto **L3B**.

No espectro de RMN ^{13}C observou-se o aparecimento de um sinal em 15,83 ppm referente ao carbono da metila adicionada pela reação de alquilação, confirmando o sucesso da mesma. Notou-se os demais sinais do composto, como por exemplo em δ 163,60 ppm, referente ao carbono ligado ao enxofre, outro em em δ 150,28 ppm referente ao carbono

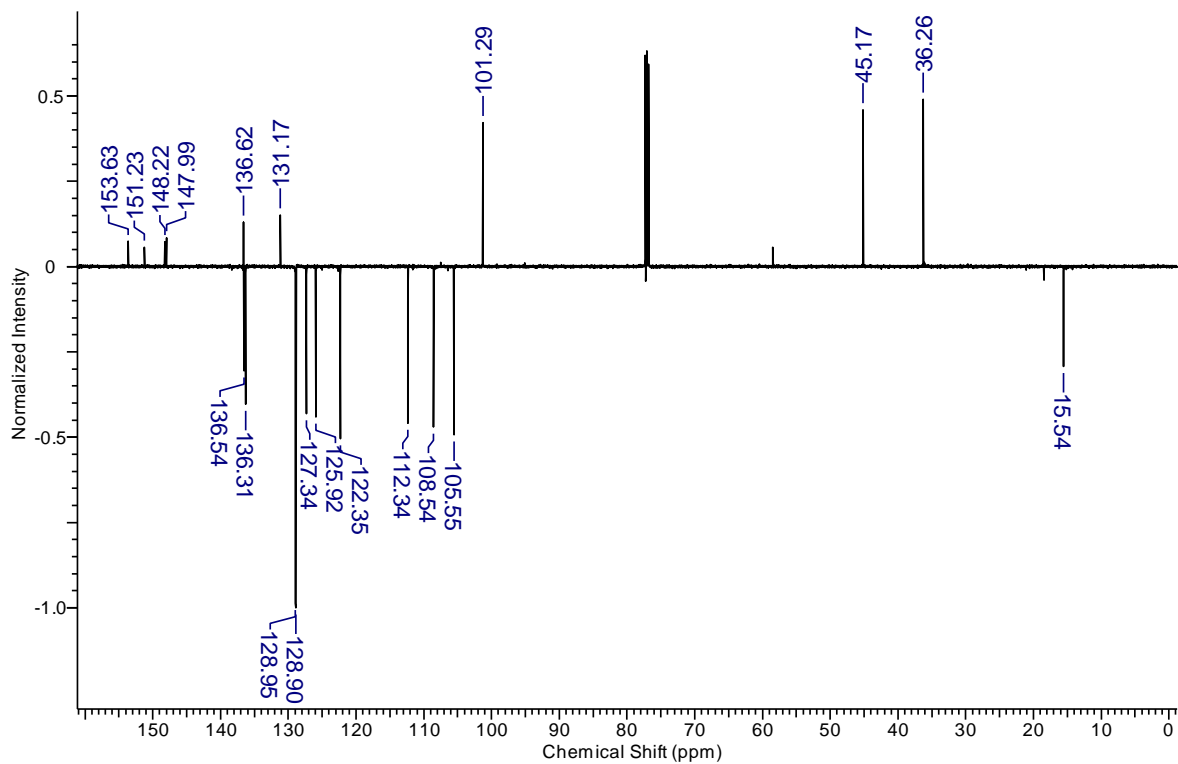
ligado ao nitrogênio, ambos no anel triazólico, além do sinal em δ 101,78 ppm referente ao carbono do anel metilenodioxilíco. Observou-se também sinais entre δ 24,98 ppm e δ 31,55 ppm referentes aos CH_2 e o sinal em δ 55,34 ppm referente ao CH , todos do grupo cicloexila. Além dos demais sinais do anel aromático e da cadeia olefínica, conforme a Tabela 15 que corroboram para caracterização da estrutura em questão.

II. L1B

O derivado **L3B** foi obtido com um rendimento de 69,5% na forma de um sólido amarelo amorfo, entretanto, na primeira tentativa de reação, o produto obtido se mostrou sensível às condições ambientes, sofrendo assim uma degradação e por isso, o derivado precisou ser armazenado em refrigerador, com condições de atmosfera inerte (N_2) e protegido da luz. Sua caracterização foi feita por RMN de ^{13}C (Espectro 11), de ^1H (Espectro 10) e espectrometria de massas. As atribuições propostas podem ser observadas na Tabela 18.



Espectro 10: RMN ^1H do **L1B** (500 MHz) feito em CDCl_3 .



Espectro 11: RMN ^{13}C do **L1B** (100 MHz) feito em CDCl_3 .

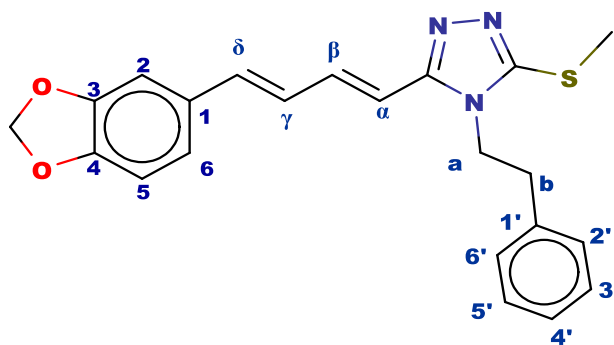


Figura 26: Estrutura do triazol **L1B**.

Tabela 18: Deslocamentos químicos de RMN ¹H e RMN ¹³C para o triazol **L1B**.

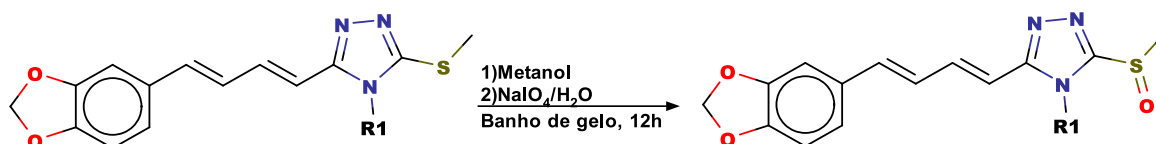
Posição	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)
1	-	131,17 (C)
2	7,01 (s, 1H)	105,55 (CH)
3	-	148,22 (C)
4	-	147,99 (C)
5	6,82 (d, 1H)	108,54 (CH)
6	6,92 (d, 1H)	122,35 (CH)
1'	-	136,62 (C)
2'	7,13 (d, 1H)	127,36 (CH)
3'	7,25-7,35 (m, 1H)	128,95 (CH)
4'	7,25-7,35 (m, 1H)	128,90 (CH)
5'	7,25-7,35 (m, 1H)	128,95 (CH)
6'	7,13 (d, 1H)	127,36 (CH)
a	4,11 (t, 2H)	45,17 (CH ₂)
b	3,00 (t, 2H)	36,26 (CH ₂)
α	5,99 (d, 1H)	112,34 (CH)
β	7,44 (m, 1H)	136,54 (CH)
γ	6,64-6,74 (m, 1H)	125,92 (CH)
δ	6,64-6,74 (m, 1H)	136,31 (CH)
C-S	-	153,63 (C)
C=N	-	151,23 (C)
OCH ₂ O	6,01 (s, 2H)	101,29 (CH ₂)
S-CH ₃	2,71 (s,3H)	15,54 (CH ₃)

A reação de alquilação pôde ser confirmada no espectro de RMN de ¹H observando-se o aparecimento de um simpleto em δ 2,71 ppm, referente aos hidrogênios da metila adicionada ao átomo de enxofre. Além disso, o espectro apresenta os demais sinais característicos do derivado, como o simpleto em δ 6,01 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, os sinais entre δ 5,99 e δ 7,44 ppm referentes a cadeia olefínica e os sinais entre δ 6,82 ppm e δ 7,01 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos. Além destes, nota-se também sinais entre δ 7,13 ppm e δ 7,35 ppm correspondentes aos hidrogênios do anel aromático referente ao grupo ligado ao anel triazólico, característico do composto **L1B**.

Já no espectro de RMN ¹³C notou-se o aparecimento de um sinal em δ 15,54 ppm referente ao carbono da metila, confirmando assim a ocorrência da alquilação. Observou-se também um sinal em δ 153,63 ppm, referente ao carbono ligado ao enxofre, outro em em δ 151,23 ppm referente ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos no anel triazólico, além do

sinal em δ 101,29 ppm referente ao carbono do anel metilenodioxilíco. Observou-se também sinais entre δ 127,36 ppm e δ 128,95 ppm referentes aos CH's e um sinal em δ 136,62 ppm do carbono quaternário, todos referentes ao anel aromático do grupo ligado ao anel triazólico. Além dos sinais do anel aromático e da cadeia olefínica, conforme a Tabela 15 que corroboram para caracterização da estrutura em questão.

1.8.6 Síntese dos derivados oxidados L3C



Esquema 14: Síntese dos compostos triazólicos LnC

A reação foi mantida por 1h e ao final desse tempo, foi feito um acompanhamento por CCDA com uma alíquota da reação e outra do triazol **L3B**, ambas diluídas em etanol, usando como eluente hexano/acetato 60%. Observou-se na reação, uma mancha com mesmo RF do **L3B** e outra mancha de menor RF, que foi atribuída ao produto esperado. Dessa maneira, foram adicionados mais 6 mL de metanol e 2 mL água destilada, a fim de homogeneizar melhor o meio reacional, que foi transferido para um tubo de ensaio maior, para que a reação fosse mantida sob agitação, mas em temperatura ambiente.

O acompanhamento por CCDA foi feito diariamente e, no 9º dia de reação, observou-se o total consumo de reagentes de partida, então a reação foi interrompida, fez-se uma extração com acetato de etila, por três vezes e o solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

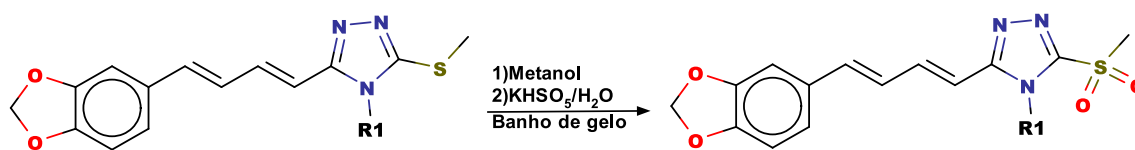
Houve formação de um sólido amorfo amarelo escuro.

- **L3C** formado (impuro): 40,40 mg

Uma análise de RMN de ¹H e ¹³C foi feita, entretanto, os espectros apresentaram muitos sinais de impureza que podem ser atribuídos à formação de subprodutos de oxidação. Essa proposta foi feita tendo como base o grande tempo de reação e a dificuldade de manter a reação em banho de gelo por vários dias, isso poderia causar uma oxidação mais vigorosa que pode ter promovido a formação de subprodutos de oxidação.

Dessa maneira, atualmente estão sendo feitos ajustes nas condições reacionais, tais como a quantidade dos reagentes usados e um controle melhor da temperatura de reação, desse procedimento adotado, a fim de que se obtenha o produto desejado sem a formação de subprodutos.

1.8.7 Síntese do derivado oxidado L3D



Esquema 15: Síntese dos compostos triazólicos LnD

A reação foi mantida por 2h em agitação e banho de gelo. Ao final desse tempo, foi feito um acompanhamento por CCDA, com alíquotas da reação, do **L3C** e do **L3B** usado como reagente para essa reação, todas elas foram diluídas em metanol, usando hexano/acetato 60% como eluente. Observou-se que ainda havia uma mancha referente ao L3B e por isso, a reação foi mantida por mais 1h. A CCDA foi refeita e como não houve alteração em sua aparência, adicionou-se 1 equivalente de KHSO₅, 1 mL de água destilada e 1 mL de metanol em banho de gelo. A reação foi mantida por mais dois dias em temperatura ambiente. Ao final do segundo dia, a CCDA indicou que todo o reagente de partida havia sido consumido, pois não havia mais a mancha referente ao **L3B**, além de apresentar uma mancha com RF menor do que o L3B de referência e menor também que o **L3C**.

O produto formado foi extraído com clorofórmio por três vezes e por fim, o solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

Houve a formação de um produto amorfo de coloração amarronzada.

- **L3D** formado: 4,60 mg

Em virtude da quantidade de produto obtido ter sido pouca, não pôde ser feita uma recristalização do mesmo e a sua caracterização ficou comprometida.

Os espectros de RMN de ¹³C e ¹H apresentaram muitas impurezas, tornando difícil a caracterização do produto.

Dessa maneira, ajustes na metodologia estão sendo feitos, a fim de que sejam definidas as melhores condições para a obtenção do produto desejado.

7 Conclusões

Neste trabalho, buscou-se utilizar técnicas de modelagem molecular, para avaliar o perfil inibitório da CYP51 de *T. cruzi* por duas séries de compostos de atividade descrita na literatura e desenvolver um modelo teórico para a predição da atividade desses compostos, vislumbrando o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

A construção do modelo teórico para a predição de atividade foi baseada na proposta de Wang e colaboradores (1994), na qual utilizou-se uma equação resultante da avaliação de fatores entálpicos e entrópicos oriundos do processo de interação dos inibidores com a enzima para o desenvolvimento de um modelo que predissesse a energia livre de interação.

O modelo foi construído através da regressão linear múltipla de três termos independentes calculados teoricamente: a entalpia de interação (ΔH_{int}), a energia torsional (ΔE_{Tor}) e a energia livre de Gibbs referente ao transporte do inibidor do meio aquoso para a proteína (ΔG_{Solv}); e dados experimentais de atividade dos compostos da série descrita por Andrine e colaboradores (2003), sendo que a equação obtida apresentou bom coeficiente de correlação ($r^2=0,84$).

O modelo foi utilizado para prever os valores de atividade teóricos da outra série de triazóis derivados da piperina, sintetizados pelo grupo de síntese da UFRRJ (FRANKLIM, *et al.*, 2013), que se mostraram inibidores promissores da CYP51 de *T. cruzi*.

Os resultados obtidos auxiliaram na proposta de modificações estruturais nessa série de triazóis, a fim de melhorar a atividade contra a CYP51, dando origem a uma nova série de compostos triazólicos planejados que tiveram sua atividade teórica predita pelo modelo construído.

Os compostos planejados com atividades teóricas mais promissoras foram sintetizados, apresentando bons rendimentos (entre 73 e 95%), e caracterizados por métodos de espectrometria de massas e RMN de 1H e ^{13}C . Entretanto, as metodologias de oxidação estão atualmente sendo ajustadas e otimizadas para que seja possível obter os compostos L1C, L1D, L3C e L3D com um rendimento adequado e sem a formação de subprodutos indesejados.

Este trabalho tem como perspectiva, a determinação da pureza dos compostos sintetizados, para que posteriormente, a atividade experimental dos mesmos seja determinada, e então, seja possível se fazer uma comparação com os dados de atividade teórica e experimental, além de avaliar se as mudanças estruturais planejadas, de fato possibilitaram a melhora na atividade pretendida.

8 Referências Bibliográficas

Disponível em: <<https://www.docelima.com.br/site/desintoxicante/simplesmente-saude/2052-pimenta-faz-mal.html>>. Acesso em: Março 2016.

Disponível em: <<http://www.fragrantica.com/notes/Pepper-158.html>>. Acesso em: Março 2016.

ADAPTADO de World Health Organization. **World Health Organization**, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf?ua=1>. Acesso em: Janeiro 2016.

ALCÁCER, L. **Introdução à química quântica computacional**. Rio de Janeiro: IST Press, Lisboa, 2007. 305 p.

ALCAZAR-FUOLI, L. et al. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. **Steroids**, 73, 2008. 339-347.

ANDRADE, S. G. et al. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus. **Inst Oswaldo Cruz**, 8, 2011. 948-956.

ANDREOLLO, N. A. et al. Os 100 Anos da Doença de Chagas no Brasil. **ABCD, Arq Bras Cir Cavar**, 4, 2009. 185-191.

ANDRINE, G. et al. Antitrypanosomal Lead Discovery: Identification of a Ligand-Efficient Inhibitor of *Trypanosoma cruzi* CYP51 and Parasite Growth. **J. Med. Chem**, 56, 2003. 2556-2567.

BISWAS, M. et al. Conformational Barrier of CheY3 and Inability of CheY4 to Bind FliM Control the Flagellar Motor Action in *Vibrio cholerae*. **Plos One**, 8, 2013. e73923-e73923.

BOAINAIN, E. et al. **Arq. Bras. Cardiol.**, n. 32, 1979. 395.

BRENDT, K. J. Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: Como manejá-la? **GCPF(Bruxelas)**, 1, 1995. 44-46.

BRENER, Z. **Terapêutica experimental da doença de Chagas**. Belo Horizonte: Cançado, J. R., ed.; Imprensa Oficial de Minas Gerais, 1968. 510 p.

BRENER, Z. et al. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. 362 p.

BROOIJMANS, N. et al. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual Reviews of Biophysical and Biomolecular Structures**, 32, 2003. 335-373.

BUCKNER, F. S. et al. Pharmacological characterization, structural studies, and in vivo activities of anti-Chagas disease lead compounds derived from tipifarnib. **Antimicrob Agents Chemother**, 56, 2012. 4914-4921.

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

CHEN, C. K. et al. Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. **Plos. Negl. Trop. Dis.**, 4, 2010. E651.

COLOSIO, R. C. et al. Conhecimentos e atitudes sobre a doença de Chagas entre profissionais de saúde –, Paraná, 6, n. 2, 2007. 355-363.

COURA, J. R. et al. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 97, n. 1, 2002. 3-24.

CRAMER, C. J. et al. PM3-SM3: A General Parameterization for Including aqueous Solvation Effects in the PM3 Molecular Orbital Model. **Comp. Chem.**, 9, 1992. 1089-1097.

DA COSTA, P. A. et al. Genetic algorithm in chemistry. **Quim. Nova**, 22, 1999. 405-411.

DAROCHA, W. D. et al. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Parasitol Res**, 88, n. 4, 2002. 292-300.

DE PAULA, V. F. et al. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. **Pest. Manage. Sci.**, 56, n. 2, 2000. 168-174.

DEWAR, M. J. S. E. A. Development and use of quantum mechanical molecular model.76.AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **J. Am. Chem. Soc.**, 107, 1985. 3902-3909.

DEWAR, M. J. S. et al. Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters. **J. Am. Chem. Soc.**, 99, 1977. 4899-4907.

DIAS, J. C. **Cad. Saúde Pub. Minist. Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, 201, 1993.

DIAS, J. C. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitol. Today**, 3, 1995. 336.

DIAS, J. C. P. et al. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**, 41, n. 2, 2008. 193-196.

DIAS, J. C. P. et al. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44, n. 3, 2011. 375-379.

ELDRIDGE, M. D. et al. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Compu-Aided Mol. Des.**, 11, 1997. 425-445.

ELDRIDGE, M. D. et al. Flexible docking using Tabu search and an empirical estimate of binding affinity. **Proteins**, 33, 1998. 367-382.

FERREIRA, W. S. **Utilização da piperina como protótipo na síntese de novos antichagásicos da classe das 1,3,4- tiadiazólio-2- fenilaminidas.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro, p. 197p. 2006.

FERREIRA, W. S. et al. Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, 4, 2012. 208-224.

FIOCRUZ. **Site da Fiocruz.** Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=151&sid=76>>. Acesso em: Fevereiro 2016.

FRANÇA, R. R. F. et al. Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 α -desmedilase Contra *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Virt. de Quím.**, 6, n. 5, 2014. 1483-1516.

FRANKLIM, T. N. et al. Design, Synthesis and Trypanocidal Evaluation of Novel 1,2,4-Triazoles-3-thiones Derived from Natural Piperine. **Molecules**, 18, Maio 2013. 6367-6382.

GASCON, J. et al. Chagas disease in Spain, The United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, 115, 2010. 22.

GENGERICH, F. P. Reactions and significance of cytochrome P450 enzymes. **J. Biol. Chem.**, 266, n. 16, 1990. 10019-10022.

GOLAN, D. E. **Princípios da Farmacologia. A Base Fisicopatológica da Farmacoterapia.** 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 580 p.

GUEX, N. et al. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, 1997. 2714-2723.

JOHNSON, D. S. et al. **The Art of Drug Synthesis.** New Jersey: John Wiley and Sons, Inc, 2007. 71-77 p.

JONES, G. et al. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. **J. Mol. Biol.**, 267, 1997. 727-748.

KASHIWABARA, Y. B. et al. Doença de Chagas - Revisão de Literatura. **Braz. J. Surg. Clin. Res.**, 4, n. 3, 2013. 49-52.

KINOSHITA-YANAGA, A. T. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. **Rev. Inst. Med. trop.**, São Paulo, 51, n. 5, 2009. 295-298.

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

KORB, O. et al. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein-Ligand Docking with Plants. **J.Chem.Inf.Model**, 49, 2009. 84-96.

LEHNINGER, A. et al. **Princípios da Bioquímica de Lehninger**. 5ª. ed. São Paulo: Artmed, 2011.

LEONARD, N. J. et al. Periodate oxidation of sulfides to sulfoxides. Scope of the reactions. **J. Org. Chem**, 27, 1962. 282-284.

LEVINE, N. D. et al. A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozool.**, 27, n. 1, 1980. 37-58.

LINDEN, R. **Algoritmos Genéticos**: Uma importante ferramenta da inteligência computacional. Rio de Janeiro: Editora Brasport, 2006. 428 p.

LOZANO, V. F. Avaliação da atividade antiparasitária e efeito sinérgico de compostos cumarínicos comparados ao benzonidazol em duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação. Universidade Bandeirantes de São Paulo.**, São Paulo, 2011.

LUNARDELLI, A. et al. Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue, 39, n. 2, 2007. 139-141.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry-Reactions**: Mecanism and Structure. 3ª. ed. [S.l.]: John Willey& Sons, 1985. 388, 437, 435, 1095, 1099, 110 e 1101 p.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 146, 2007. 601-620.

MEDIFOCO. **MediFoco**. Disponível em: <<http://medifoco.com.br>>. Acesso em: Fevereiro 2016.

MINISTÉRIO da Educação - Portal do Professor. **Site do MEC**. Disponível em: <<http://portaldoprofessor.mec.gov.br/fichaTecnicaAula.html?aula=58597>>. Acesso em: Fevereiro 2016.

MOOJJI, W. T. et al. General and Targeted Statistical Potentials for Protein-Ligand Interactions. **Proteins: Struct. Func. Bioinf.**, 61, 2005. 272-287.

MORAES-SOUZA, H. et al. O controle da transmissão transfusional. **Rev. História sobre a Doença de Chagas no Brasil**, 44, supl II, 2011. 64-67.

MORGON, N. H. et al. **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. 1. ed. [S.l.]: São Paulo: Editora e Livraria da Física, 2007. 539 p.

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

NAVEENA, C. S. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some disubstituted 1,3,4-oxadiazoles carrying 2-(aryloxymethyl)phenyl moiety. **Eur. J. Med. Chem**, 45, 2010. 4708-4719.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 85-108 p.

OLIVEIRA, F. G. E. A. Molecular docking study and development of an empirical binding free energy model for phosphodiesterase 4 inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, 14, 2006. 6001-6011.

OPERA, T. I. Chemoinformatics in drug discovery. **Weinheim: Wiley-VCH**, 2005. 493.

PODUST, L. M. et al. Crystal Structure Of Cytochrome P450 14- α Sterol Demethylase (CYP51) From Mycobacterium Tuberculosis In Complex With Azole Inhibitors. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 98, 2001. 3068.

PODUST, L. M. et al. Estriol bound and ligand-free structures of sterol 14 α -demethylase. **Structure**, 12, 2004. 1937-1945.

PODUST, L. M. et al. Crystal structure of cytochrome P450 14 α – sterol demethylase (CYP51) from Mycobacterium tuberculosis in complex with azole inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 98, 2011. 3068.

REEVES, C. R. **Modern Heuristic Techniques for Combinatorial Problems**. London: Mc Graw-Hill, 1995.

ROCHA JR., J. G. **Desenvolvimento de um modelo empírico de predição de atividade de inibidores da esterol 14 α -desmetilase (CYP51) utilizando o método semi-empírico PM6**. UFRRJ. [S.l.]. 2009.

ROQUE, A. L. et al. Trypanosoma cruzi transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. **Am J Trop Med Hyg**, 79, n. 5, 2008. 742-749.

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

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Quim. Nova**, 25, n. 3, 2002. 505-512.

SANTOS, C. A. T. Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em doadores de sangue: revisão sistemática da literatura e estudo de prevalência no hemocentro de Goiás, Goiânia, 2011.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, 43, 2007.

SHAYADEHI, A. Z. The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombination sterol 14 α -desmethylase of *Candida albicans* (other name are: lanosterol 14 α -desmethylase, P-45014DM, and CYP51). **J. Biol. Chem.**, 271, n. 21, 1996. 12445-12450.

SILVEIRA, A. C. et al. O controle da transmissão vetorial Rev. História sobre a Doença de Chagas no Brasil, 44, supl. II, 2011. 52-63.

SOEIRO, M. N. C. et al. In vitro and in vivo studies of the antiparasitic activity of sterol alpha- demethylase (CYP51) inhibitor VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2013. 4151.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. **J. Comp. Chem.**, 10, 1989. p. 209.

STEWART, J. J. P. **MOPAC 2000.00 Manual**. Tokyo, Japan: Fujitsu Limited, 1999.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and applications to 70 elements. **J. Mol. Model.**, 13, 2007. 1173-1213.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **J. Mol. Model.**, 19, n. 1, 2013. 1-32.

TELLERIA, J. et al. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Exp. Parasitol.**, 114, 2006. 279–288.

THIEL, W. et al. Extension of the MNDO formalism to d-orbitals - Integral approximations and preliminary numerical results. **Theor. Chim. Acta**, 81, 1992a. 391-404.

TROST, B. M. et al. Chemoselective oxidation of sulfides to sulfones with potassium hydrogen persulfate. **Tetrahedron Letters**, 22, 1981. 1287-1290.

TYLER, K. M. et al. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, 31, 2001. 472-481.

URBINA, J. A. et al. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the longacting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 39, 2003.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, 52, 2003. 609-623.

VILLATA, F. et al. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. **Journal of Infectious Diseases**, 504, 2013.

WANG, S. et al. Protein kinase C. Modeling of the binding site and prediction of binding constants. **J. Med. Chem.**, 37, n. 25, 1994. 4422.

WATERMAN, M. R. et al. Sterol 14 α -desmethylase, an abundant an essential mixed-function oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 338, 2005. 418-422.

WHO - World Health Organization. **Tech. Rep. Ser.**, 881, n. 1, 1991.

WHO-WORLD Health Organization. Disponivel em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 20 Janeiro 2017.

YOSHIDA, Y. E. A. Sterol 14 α -desmethylase p450 (CYP51) provides breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 273, n. 3, 2000. 799-804.

9 Anexo

Tabela 19: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e ΔH_{Int} para os compostos da Série A, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.

Composto	ΔH_{E-I}	ΔH_I	ΔH_{E-H_2O}	ΔH_{H_2O}	ΔH_{Int}
A1	-5719,03	-32,21	-5740,81	-54,31	-0,32
A2	-5724,36	-26,80			-11,05
A3	-5713,02	-22,46			-4,05
A4	-5767,78	-6,52			-74,75
A5	-5754,93	42,02			-110,45
A6	-5673,31	70,12			-56,92
A7	-5715,30	42,16			-70,95
A8	-5733,14	20,31			-66,94
A9	-5794,92	73,69			-182,10
A10	-5630,60	28,54			27,37
A11	-5763,37	39,88			-116,74
A12	-5633,17	41,38			11,95
A13	-5650,73	42,20			-6,43
A14	-5717,57	50,47			-81,53
A15	-5707,65	35,62			-56,76
A16	-5742,05	27,51			-83,05
A17	-5660,65	45,92			-20,06
A18	-5699,58	38,35			-51,42
A19	-5596,12	29,03			61,35
A20	-5630,88	89,06			-33,43
A21	-5640,87	37,30			8,33
A22	-5554,74	46,97			84,80
A23	-5583,90	132,39			-29,79
A24	-5621,51	38,62			26,38
A25	-5632,86	27,77			25,87
A26	-5759,10	49,70			-122,30
A27	-5690,79	46,41			-50,69
A28	-5685,28	-9,23			10,46
A29	-5736,66	-17,40			-32,75
A30	-5695,87	30,91			-40,28
A31	-5794,20	24,32			-132,02

*Cálculos feitos no vácuo

Tabela 20: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e ΔH_{Int} para os compostos da Série A, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.

Composto	ΔH_{E-I}	ΔH_I	ΔH_{E-H_2O}	ΔH_{H_2O}	ΔH_{Int}
A1	-6268,91	-40,03	-6255,55	-58,89	-32,23
A2	-6271,36	-36,39			-38,32
A3	-6271,94	-32,75			-42,53
A4	-6229,28	-16,21			-16,42
A5	-6220,75	31,97			-56,06
A6	-6153,91	55,42			-12,67
A7	-6193,22	31,01			-27,57
A8	-6209,14	10,71			-23,19
A9	-6141,49	63,95			-8,78
A10	-6227,74	19,63			-50,72
A11	-6187,52	30,70			-21,57
A12	-6196,90	32,45			-32,69
A13	-6187,54	33,14			-24,03
A14	-6190,28	41,88			-35,50
A15	-6231,11	25,34			-59,80
A16	-6202,57	17,15			-23,06
A17	-6187,14	36,46			-26,94
A18	-6199,95	28,38			-31,67
A19	-6201,72	21,37			-26,43
A20	-6121,75	48,79			26,12
A21	-6134,95	27,61			34,10
A22	-6157,49	39,18			0,00
A23	-6067,92	93,38			35,36
A24	-6179,29	26,29			-8,92
A25	-6180,55	20,55			-4,44
A26	-6119,70	41,24			35,73
A27	-6142,58	39,30			14,78
A28	-6172,22	-18,25			42,69
A29	-6270,06	-27,89			-45,51
A30	-6168,77	24,00			3,90
A31	-6205,22	14,88			-23,44

*Cálculos feitos considerando $\epsilon=4$

Tabela 21: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e ΔH_{Int} para os compostos da Série A, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.

Composto	ΔH_{E-I}	ΔH_I	ΔH_{E-H_2O}	ΔH_{H_2O}	ΔH_{Int}
A1	-6595,96	-48,33	-6591,31	-61,31	-17,62
A2	-6585,67	-30,27			-25,40
A3	-6562,75	-38,70			5,96
A4	-6544,85	-22,34			7,49
A5	-6515,91	25,24			-11,15
A6	-6495,73	46,15			-11,87
A7	-6516,13	24,62			-10,75
A8	-6557,27	5,45			-32,72
A9	-6485,27	58,45			-13,72
A10	-6116,06	14,32			399,63
A11	-6534,27	25,48			-29,74
A12	-6530,17	27,30			-27,47
A13	-6103,40	27,91			398,70
A14	-6503,82	36,88			-10,69
A15	-6506,33	19,34			4,33
A16	-6457,58	11,17			61,25
A17	-6104,87	30,91			394,23
A18	-6526,10	22,74			-18,83
A19	-6460,26	18,20			51,54
A20	-6451,75	29,29			48,96
A21	-6447,67	21,85			60,49
A22	-6480,54	35,21			14,25
A23	-6413,48	73,38			43,14
A24	-6455,64	18,73			55,63
A25	-6456,57	16,88			56,55
A26	-6451,46	36,52			42,03
A27	-6401,77	34,74			93,49
A28	-6513,11	-23,50			40,40
A29	-6544,38	-34,05			19,68
A30	-6459,68	18,45			51,87
A31	-6516,91	9,40			3,70

*Cálculos feitos considerando $\epsilon=78,4$

Tabela 22: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e $\Delta H_{int}(\epsilon=1)$ para os compostos da Série B, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.

Composto	ΔH_{E-I}	ΔH_I	ΔH_{E-H_2O}	ΔH_{H_2O}	ΔH_{Int}
B1	-3410,18	35,24	-3499,67	-54,31	-0,06
B2	-3374,61	27,57			43,18
B3	-3370,24	20,07			55,06
B4	-3391,83	18,10			35,43
B5	-3383,99	8,79			52,58
B6	-3379,96	12,44			52,96
B7	-3325,72	65,86			53,78
B8	-3393,74	61,63			-10,01
B9	-3503,24	-45,26			-12,62
B10	-3379,88	14,45			51,03
B11	-3335,26	65,49			44,61
B12	-3375,53	24,25			45,58
B13	-3361,63	43,33			40,41

Tabela 23: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e $\Delta H_{int}(\epsilon=4)$ para os compostos da Série B, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.

Composto	ΔH_{E-I}	ΔH_I	ΔH_{E-H_2O}	ΔH_{H_2O}	ΔH_{Int}
B1	-3710,70	20,25	-3781,11	-58,89	-8,73
B2	-3652,13	12,73			57,36
B3	-3674,26	7,36			40,59
B4	-3694,65	3,87			23,70
B5	-3709,05	-6,98			20,15
B6	-3689,62	-1,39			33,98
B7	-3652,72	51,55			17,95
B8	-3654,68	45,99			21,55
B9	-3726,44	-61,64			57,42
B10	-3696,17	-0,51			26,56
B11	-3641,75	49,04			31,43
B12	-3701,24	8,03			12,95
B13	-3675,25	28,34			18,63

Tabela 24: Valores de $\Delta H(E-I)$, $\Delta H(H_2O)$, $\Delta H(E-H_2O)$ e $\Delta H_{int}(\epsilon=78,4)$ para os compostos da Série B, calculados com o método PM6 do programa MOPAC2016 em kcal/mol.

Composto	ΔH_{E-I}	ΔH_I	ΔH_{E-H_2O}	ΔH_{H_2O}	ΔH_{Int}
B1	-3863,08	10,86	-3964,28	-61,31	29,03
B2	-3847,97	3,67			51,33
B3	-3851,58	-0,99			52,39
B4	-3882,83	-5,06			25,21
B5	-3878,63	-15,73			40,08
B6	-3864,56	-9,99			48,41
B7	-3838,98	43,02			20,97
B8	-3827,45	36,67			38,86
B9	-3925,59	-72,43			49,81
B10	-3860,35	-9,06			51,68
B11	-3851,53	39,42			12,03
B12	-3860,41	0,84			41,72
B13	-3847,08	19,04			36,86