

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Candidatos a novos agentes tuberculostáticos: planejamento e síntese
de inibidores da fosfopanteteína adenililtransferase

Marina Candido Primi

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Prof^a Dr^a Elizabeth Igne Ferreira
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Mauricio R. Sant'Anna

SÃO PAULO
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Candidatos a novos agentes tuberculostáticos: planejamento e síntese
de inibidores da fosfopanteteína adenililtransferase

Marina Candido Primi

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Prof^a Dr^a Elizabeth Igne Ferreira
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Mauricio R. Sant'Anna

SÃO PAULO
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

PP952c Primi, Marina Candido
Candidatos a novos agentes tuberculostáticos:
planejamento e síntese de inibidores da
fosfopanteteína adenililtransferase / Marina Candido
Primi. - São Paulo, 2018.
90 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne
Coorientador: Sant'Anna, Carlos Mauricio Rabello

1. química farmacêutica e medicinal. 2.
planejamento de fármacos. 3. tuberculose. 4.
fosfopanteteína adenililtransferase. 5. inibidores
enzimáticos. I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne,
orientador. III. Sant'Anna, Carlos Mauricio
Rabello, coorientador.

Marina Candido Primi

Candidatos a novos agentes tuberculostáticos: planejamento e síntese
de inibidores da fosfopanteteína adenililtransferase

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Profª Drª Elizabeth Igne Ferreira
orientadora/presidente

Prof. Dr. Marcio V. B. Dias
1o. examinador

Prof. Dr. Leoberto C. Tavares
2o. examinador

Prof. Dr. Cristiano Raminelli
3o. examinador

São Paulo, 11 de maio de 2018.

*“Se não escalar as montanhas,
nunca poderá desfrutar das paisagens”*

Pablo Neruda

Dedicatória

Ao meu noivo, Maurício T. Tavares, por seu amor, companheirismo e incentivo em todos os momentos. Compartilhar a vida com você, além de me fazer muito feliz, me faz crescer a cada dia.

Aos meus pais, Rosana Candido Primi e Marcos Primi, por todo amor e dedicação incondicionais. O apoio e carinho de vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Ao meu querido irmão, Caio Candido Primi, por ser mais do que meu irmão, ser um grande amigo.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Elizabeth I. Ferreira, por ser a minha ‘mãe científica’. Seus ensinamentos e amizade foram essenciais ao longo dessa jornada.

Essa conquista também é de vocês.

Agradecimentos

Ao departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar este projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - pelo apoio financeiro. Ao assessor FAPESP *ad hoc*, por acreditar neste trabalho.

Ao meu noivo, Maurício T. Tavares, meu porto seguro e meu grande amor. Os momentos vividos nos últimos anos não teriam o mesmo significado sem você ao meu lado. Passei por muitas experiências, profissionais e pessoais, e você esteve ao meu lado em todas elas. Sua presença foi essencial nos momentos maravilhosos e, mais ainda, nos momentos difíceis. Você me torna uma pessoa mais forte e me faz acreditar que vale a pena continuar lutando, mesmo quando os obstáculos parecem muito grandes. Já vivemos momentos incrivelmente felizes, mas tenho certeza de que a vida ainda nos reserva muitos outros. Te admiro muito, você é uma inspiração para mim. Obrigada por caminhar ao meu lado. Estarei sempre com você.

Aos meus amados pais, Rosana Candido Primi e Marcos Primi, meus alicerces. A educação e os valores que vocês me transmitiram farão sempre parte do que eu sou. Sem todo o esforço e dedicação de vocês eu não teria chegado até aqui. Vocês sempre me apoiaram a ir em busca dos meus objetivos, mesmo que para isso fosse necessário que eu ficasse fisicamente longe de vocês. A distância, em muitos momentos, foi dolorosa, mas o amor enorme que sentimos faz com que nunca estejamos separados, independente dos quilômetros que nos distanciem. Carrego vocês comigo o tempo todo e espero sempre ser capaz de orgulhar vocês.

Ao meu querido irmão, Caio Candido Primi. Você está presente na maior parte das lembranças ao longo de toda a minha vida. Ter você por perto, com certeza, tornou os momentos muito mais divertidos. A nossa amizade só cresce a cada dia e tenho certeza de que ainda compartilharemos muitas histórias. Obrigada pelo companheirismo, paciência e por estar sempre comigo.

À querida Prof^a. Dr^a. Elizabeth Igne Ferreira, que ao longo dos últimos sete anos se tornou muito mais do que uma orientadora, ganhando um lugar especial no meu coração. Ao longo desses anos, a senhora me transferiu incontáveis ensinamentos acadêmicos e científicos, com muita paixão e dedicação, os quais me inspiraram e inspiram todos os dias. Mas, além disso, foram tantos conselhos e carinho, que eu não posso deixar de chamá-la de ‘mãe científica’. Nunca vou me esquecer de todas as oportunidades que a senhora me concedeu e o quanto esteve presente em minha vida, mesmo quando eu estava em Chicago. Agradeço por tudo e espero que ainda estejamos juntas por muito tempo.

Aos meus sogros, Walquiria T. Tavares e Honorato M. Tavares. Obrigada por todos os momentos compartilhados, pelo apoio e por me receberem tão bem na família de vocês. O meu carinho por vocês é enorme.

À minha grande amiga Vicky Forshaid, minha eterna ‘caixinha’. São tantos anos de amizade, tantos momentos, tantas alegrias, tantas dificuldades e tanto amor. Você sempre esteve comigo, para comemorar quando fosse possível e para chorar quando fosse inevitável, sem julgamentos e me dizendo o que eu preciso ouvir. Amiga igual não há, que sorte eu tenho em ter te encontrado e ter você comigo até hoje. Sempre e para sempre.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Mauricio Sant’Anna. Obrigada por ter aceitado me co-orientar, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pelos infinitos conhecimentos transferidos. Serei eternamente grata por suas contribuições para a minha formação e para esse trabalho.

Aos pesquisadores, Dr. Scott G. Franzblau (da *University of Illinois at Chicago*) e Dr^a. Tina Izard (do *The Scripps Research Institute*), por terem me recebido em seus laboratórios e terem investido no meu projeto durante o meu estágio sanduíche. Os conhecimentos adquiridos nesse período foram essenciais para a minha formação como pesquisadora.

Ao pesquisador Dr. Larry L. Klein, por ter sido um orientador incrível durante a minha estadia na *University of Illinois at Chicago*. O seu amor pela síntese é contagiante e me fez descobrir o quanto eu poderia ser feliz passando horas em pé trabalhando na bancada. Nunca vou me esquecer desses momentos e desse sentimento. Obrigada por me dar a honra de

dividir a bancada com você, por me ensinar tanto e por, até hoje, me dar conselhos tão valiosos.

Aos professores que participaram da minha banca de defesa, Prof. Dr. Leoberto C. Tavares, Prof. Dr. Cristiano Raminelli e Prof. Dr. Marcio V. B. Dias. Pelas valiosas contribuições ao trabalho apresentado e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores, que fizeram e fazem parte do bloco 13, Prof^a. Dr^a. Jeanine Giarolla Vargas, Prof. Dr. Roberto Parise Filho, Prof^a. Dr^a. Carlota de O. R. Yagui e Prof. Dr. Gustavo H. G. Trossini, por seus ensinamentos e colaborações.

Ao amigo Natanael D. Segretti, por todos os bons momentos que vivemos juntos, apoio e risadas. Que bom que nos reencontramos no Lapen e construímos uma amizade que levaremos para a vida.

Aos amigos do Lapessb, Gustavo Vasco, Rosania Yang e Alfredo F. Souza. Obrigada pela amizade, pelas discussões produtivas (sobre todos os assuntos possíveis) e pelos melhores 'happy hours'. Sem vocês essa jornada no bloco 13 não teria sido a mesma.

Ao amigo Charles Brito, por todos os momentos que compartilhamos ao longo desses sete anos. Muitas mudanças aconteceram e aqui estamos nós, nos reinventando e nos apoiando sempre.

A todos os colegas que passaram pelo Lapen nos últimos sete anos, Ana Luisa Cadore, Andressa Polidoro, Bruna Araújo, Caroline Gonçalves, Cinthya Sano, Débora Savino, Diego Prieto, Fabrício Vargas, Filipe Pernichelle, Fredson Silva, Gabriel Greco, Guilherme Dutra, Guiulia Kassab, Jenny Midori, João Vitor da Silva, Leonardo Xavier, Lorena Paes, Lucas Henrique, Luis Zaravia, Marco Arribas, Marcos Ferreira, Pone Boniface, Renan Araújo, Renan Silva, Ricardo Serafim, Rodrigo Gonzaga, Soraya Santos, Tacila Pereira, Thomas Waeny e Vanessa Otelo, pelos momentos de amizade e troca de conhecimento.

Aos colegas do bloco 13, Caroline Branco, Camila Felix, Drielli Vital, Elys Cardoso, Fernando Gatti, Gláucio Monteiro, Juliana Magalhães, Mariana Frojuello, Micael Cunha,

Nuno Tavares, Stanley Vasconcelos e Thais Fernandes, pela ótima convivência e pelos momentos de descontração.

Aos colegas de laboratório da *University of Illinois at Chicago* e do *The Scripps Research Institute*, Baojie Wan, Chris Park, Edyta Grzelak, Gauri Shetye, Nina Wolf, Paula Souza, Rangarajan Erumbi, Rui Ma, Valentina Petukhova e Yuehong Wang, que me acolheram tão bem e tanto me ensinaram.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alexandre, David, Elisabete, Inês e Kelma, por serem sempre tão prestativos.

À querida amiga Prof^a Elisabeth Brossi, por ter me inspirado e incentivado a seguir para a pós-graduação. Você, além de professora incrível, é uma pessoa maravilhosa. Obrigada por estar presente até hoje na minha vida, me ouvindo e aconselhando.

Ao amigo Thiago Torrecilha, por estar sempre por perto, mesmo quando estamos distantes, e por todos os momentos compartilhados.

Ao amigo Derek Moraes, por toda a amizade dedicada e pelas nossas longas e deliciosas conversas.

À minha família por opção, Cristina José, Gabriel José, Marco José e Solange José. Obrigada por fazerem parte de toda a minha vida e estarem sempre presentes. Palavras não resumem o carinho e o amor que sinto por vocês.

Aos meus avós, Maria de Lourdes Candido, Cláudio Candido, Clarice Primi e Augusto Primi (i.m). Sou muito grata pela oportunidade de conviver com vocês por tanto tempo. Vocês são incríveis e meu amor por vocês é imenso.

A todos das famílias Candido e Primi, que sempre estiveram torcendo por mim. Amo vocês.

RESUMO

PRIMI, M. C. **Candidatos a novos agentes tuberculostáticos: planejamento e síntese de inibidores da fosfopanteteína adenililtransferase.** 2018. 90p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A tuberculose (TB) é uma das maiores causas de morte por infecção no mundo, sendo que, em 2015, registraram-se 10,4 milhões de novos casos. O agente etiológico da doença, o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), apresenta altos níveis de resistência frente aos quimioterápicos disponíveis para o tratamento da TB. Além disso, a terapia atual da doença explora poucos alvos essenciais ao *Mtb*. Neste sentido, explorar novos alvos, essenciais ao crescimento e sobrevivência da micobactéria é de grande interesse e poderia gerar fármacos mais efetivos, eficazes contra cepas resistentes e a forma latente da TB. Para este fim, o presente trabalho propôs o desenvolvimento de inibidores da enzima fosfopanteteína adenililtransferase (PPAT), a qual possui caráter regulatório na via de biossíntese da Coenzima A (CoA) da micobactéria. Inicialmente, propuseram-se 50 estruturas de potenciais inibidores da PPAT de *M. tuberculosis* (*MtPPAT*), baseando-se na estrutura de seu substrato, a fosfopanteteína, e na estrutura do sítio ativo da enzima. Em seguida, propuseram-se outros 28 ligantes. A fim de se prever as potenciais complementaridades entre os 78 inibidores propostos e o sítio ativo da *MtPPAT*, empregou-se a estratégia de *docking*. Posteriormente, realizaram-se cálculos semi-empíricos, com os complexos dos ligantes que se mostraram mais interessantes nas simulações de *docking*, a fim de se obter informações sobre a entalpia de interação dos ligantes com o sítio ativo da *MtPPAT*. A partir dos resultados obtidos nos estudos computacionais, selecionaram-se os inibidores que se mostraram mais promissores. A síntese destes ligantes e a de seus fragmentos foi realizada. Avaliaram-se a atividade microbiológica *in vitro*, bem como a citotoxicidade dos ligantes sintetizados. Alguns dos compostos sintetizados apresentaram atividade frente às cepas sensíveis e resistentes do *Mtb* na casa de micromolar. Todos os compostos ativos não foram considerados citotóxicos. A fim de validar o planejamento e o alvo dos possíveis inibidores, verificando a atividade inibitória desses frente à enzima *MtPPAT*, realizou-se a produção e purificação da enzima. Por fim, realizaram-se ensaios de inibição enzimática frente à *MtPPAT*, os quais permitiram a identificação dos primeiros inibidores da enzima já descritos, com atividade na casa de micromolar, validando-se o alvo em questão.

Palavras-chaves: química farmacêutica e medicinal, planejamento de fármacos, tuberculose, fosfopanteteína adenililtransferase, inibidores enzimáticos.

ABSTRACT

PRIMI, M. C. **New antituberculosis agents' candidates: design and synthesis of phosphopantetheine adenylyltransferase inhibitors.** 2018. 90p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Tuberculosis is one of the major causes of death by infection worldwide. In 2015, 10.4 thousand new cases of the disease were registered. The tuberculosis' causing agent *Mycobacterium tuberculosis* presents high levels of resistance for the available chemotherapy. Thereof, exploit new *M. tuberculosis* targets is of utmost importance to overcome drug resistant tuberculosis. In this sense, the enzyme phosphopantetheine adenylyltransferase (PPAT) generates scientific interest since it displays a regulatory role in the *M. tuberculosis* coenzyme A (CoA) biosynthesis. Therefore, the purpose of the present study was the development of *M. tuberculosis* PPAT (*Mt*PPAT) inhibitors. Initially, 50 potentially *Mt*PPAT inhibitors were designed based on *Mt*PPAT's substrate and the enzyme's active site. After preliminary results, more 28 compounds were designed. Docking simulations were performed with the 78 compounds synthesized, leading to the prediction of the interaction between the proposed inhibitors and *Mt*PPAT active site. Latelly, semi-empirical calculations were performed with the most promising compounds. These calculations were carried out to obtain information about the enthalpy interactions between compounds and *Mt*PPAT active site. Computational studies led to the selection of the most promising inhibitors. Those compounds and some of their fragments were synthesized, purified, and characterized. The synthesized compounds had their *in vitro* microbiological activity and cytotoxicity evaluated. Some of the synthesized compounds showed activity against the *Mtb* sensitive and resistant strains in micromolar range. Besides that, the active compounds were not considered cytotoxic. To validate the potential inhibitors' design and evaluate their capacity to inhibit *Mt*PPAT, the enzyme was produced and purified. *Mt*PPAT inhibitory assays were performed, leading to the first inhibitors of the enzyme, with activity in micromolar range, validating the target.

Keywords: medicinal chemistry, drug design, tuberculosis, phosphopantetheine adenylyltransferase, enzymatic inhibitors.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 TUBERCULOSE	2
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA	2
1.1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	3
1.1.3 TRANSMISSÃO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	4
1.1.4 QUIMIOTERAPIA	7
1.2 NOVO ALVO POTENCIAL PARA TB	9
1.2.1 A COENZIMA A E A FOSFOPANTETEÍNA ADENILILTRANSFERASE	9
1.3 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	14
1.3.1 MODELAGEM MOLECULAR NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	15
1.3.1.1 <i>Docking</i>	16
1.3.1.2 Cálculos semi-empíricos	17
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	19
2.1 PLANEJAMENTO DO TRABALHO EXPERIMENTAL	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 MATERIAL	23
3.1.1 MODELAGEM MOLECULAR	23
3.1.1.1 Programas computacionais	23
3.1.2 SÍNTESE	23
3.1.2.1 <u>Reagentes, solventes e demais materiais para síntese e análise</u>	23
3.1.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA E DE CITOTOXICIDADE	24
3.1.4 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PPAT E ENSAIOS ENZIMÁTICOS	24
3.2. EQUIPAMENTOS	25
3.3 MÉTODOS	25
3.3.1 PLANEJAMENTO DOS COMPOSTOS	25
3.3.2 MODELAGEM MOLECULAR	30
3.3.2.1 <i>Redocking</i>	30

3.3.2.2 <u>Validação</u>	31
3.3.2.3 <u>Construção tridimensional dos ligantes</u>	33
3.3.2.4 <u>Docking dos ligantes preliminarmente planejados</u>	33
3.3.2.5 <u>Docking do conjunto total de ligantes propostos</u>	33
3.3.2.6 <u>Entalpia de formação de complexo dos ligantes mais promissores</u>	36
3.3.2.7 <u>Cálculos de Coeficiente de Partição</u>	38
3.3.3 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	38
3.3.3.1 <u>Síntese</u>	39
3.3.3.1.1 <u>Síntese dos cinco ligantes selecionados previamente e dos seus respectivos fragmentos</u>	39
A. <u>Síntese dos ligantes 8, 63, 67 e 68, do fragmento 81 e do ligante otimizado 82</u> ...	39
B. <u>Síntese do ligante 66</u>	40
C. <u>Síntese do ligante otimizado 79</u>	41
D. <u>Síntese do fragmento 80</u>	41
E. <u>Síntese dos ligantes otimizados 83 e 84</u>	41
3.3.3.2 <u>Purificação dos compostos sintetizados</u>	42
3.3.3.3 <u>Análise e caracterização dos compostos sintetizados</u>	43
3.3.3.3.1 <u>Cromatografia em camada delgada</u>	43
3.3.3.3.2 <u>Espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN)</u>	43
3.3.3.3.3 <u>Espectrometria de massas</u>	43
3.3.4 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS DE ATIVIDADE	43
3.3.4.1 <u>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por meio do método <i>Microplate Alamar Blue assay (MABA)</i></u>	44
3.3.4.2 <u>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) no estado de latência por meio do método <i>Low Oxygen Recovery Assay (LORA)</i></u>	44
3.3.4.3 <u>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra cepas de <i>Mtb H37Rv</i> monorresistentes</u>	45
3.3.4.4 <u>Espectro de atividade</u>	45
3.3.4.5 <u>Determinação de citotoxicidade (CI₅₀) em células VERO</u>	46
3.3.5 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FOSFOPANTETEÍNA ADENILILTRANSFERASE	46
3.3.5.1 <u>Produção e purificação da fosfopanteteína adenililtransferase de <i>M. tuberculosis</i> (<i>MtPPAT</i>)</u>	47

3.3.5.1.1 Produção.....	47
3.3.5.1.2 Purificação.....	47
3.3.6 ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	48
3.3.6.1 Ensaio de inibição enzimática dos ligantes à fosfopanteteína adenililtransferase de <i>M. tuberculosis</i> (MtPPAT)	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 <u>MODELAGEM MOLECULAR</u>	52
4.1.1 <i>REDOCKING</i>	52
4.1.2 VALIDAÇÃO.....	52
4.1.3 <i>DOCKING</i> DOS LIGANTES PRELIMINARMENTE PLANEJADOS....	55
4.1.4 <i>DOCKING</i> DO CONJUNTO TOTAL DE LIGANTES PROPOSTOS.....	57
4.1.5 ENTALPIA DE INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS DOS LIGANTES MAIS PROMISSORES.....	61
4.1.5.1 <u>Cálculos de entalpia de interação no vácuo</u>	61
4.1.5.2 <u>Cálculos de entalpia de interação com constante dielétrica da água (78,4)</u>	62
4.1.5.3 <u>Cálculos de entalpia de interação com constante dielétrica para cavidade da proteína próxima à fase aquosa (25)</u>	63
4.1.5.4 <u>Comparação dos resultados obtidos para os ligantes com os resultados obtidos para a fosfopanteteína</u>	65
4.1.6 CÁLCULOS DE COEFICIENTE DE PARTIÇÃO.....	66
4.2 <u>SÍNTESE E PURIFICAÇÃO</u>	67
4.2.1 MECANISMOS REACIONAIS.....	67
4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS.....	69
4.2.2.1 <u>Aspectos físicos e rendimentos reacionais</u>	69
4.2.2.2 <u>Análises de RMN e espectrometria de massas</u>	71
4.3 <u>ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS DE ATIVIDADE</u>	74
4.3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) POR MEIO DO MÉTODO <i>MICROPLATE ALAMAR BLUE ASSAY</i> (MABA) E NO ESTADO DE LATÊNCIA POR MEIO DO MÉTODO <i>LOW OXYGEN RECOVERY ASSAY</i> (LORA).....	74
4.3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) CONTRA CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	

MONORRESISTENTES.....	76
4.3.3 ESPECTRO DE ATIVIDADE.....	77
4.3.4 DETERMINAÇÃO DE CITOTOXICIDADE (CI₅₀) EM CÉLULAS VERO	77
4.4 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FOSFOPANTETEÍNA ADENILILTRANSFERASE (PPAT)	78
4.5 ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	78
5 CONCLUSÕES.....	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS.....	I
ANEXO I – ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR....	II
ANEXO II - ESPECTROS DE MASSAS.....	XXV
ANEXO III – FICHA DO ALUNO.....	XLVIII
ANEXO IV – CURRÍCULO LATTES DO ALUNO.....	XLIX

Introdução

Marina Candide Pimi

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose (TB) é a doença infecciosa que atinge o maior número de vítimas no mundo. Existem relatos da doença desde a Grécia e Roma antigas. No Brasil, foi introduzida pelos portugueses e missionários jesuítas a partir do ano de 1500. Por volta de 1990, observou-se uma epidemia de TB no País e, em 1993, a doença foi considerada emergência global de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Em 2016, continuou a ser considerada uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em países de rendas média e baixa. Segundo dados da OMS, estimaram-se por volta de 10,4 milhões de novos casos de TB, em 2015, distribuídos por todo o mundo (*Figura 1*) e 1,8 milhões de mortes causadas pela doença. Estima-se que um terço dos pacientes infectados com TB nunca tenham sido diagnosticados ou tratados (RUFFINO-NETTO, 2002; SOUZA, VASCONCELOS, 2005; RAVIGLIONE et al., 2012; WHO, 2016; PAI et al., 2016; BARKER, 2016; ORGEUR, BROSCH, 2018).

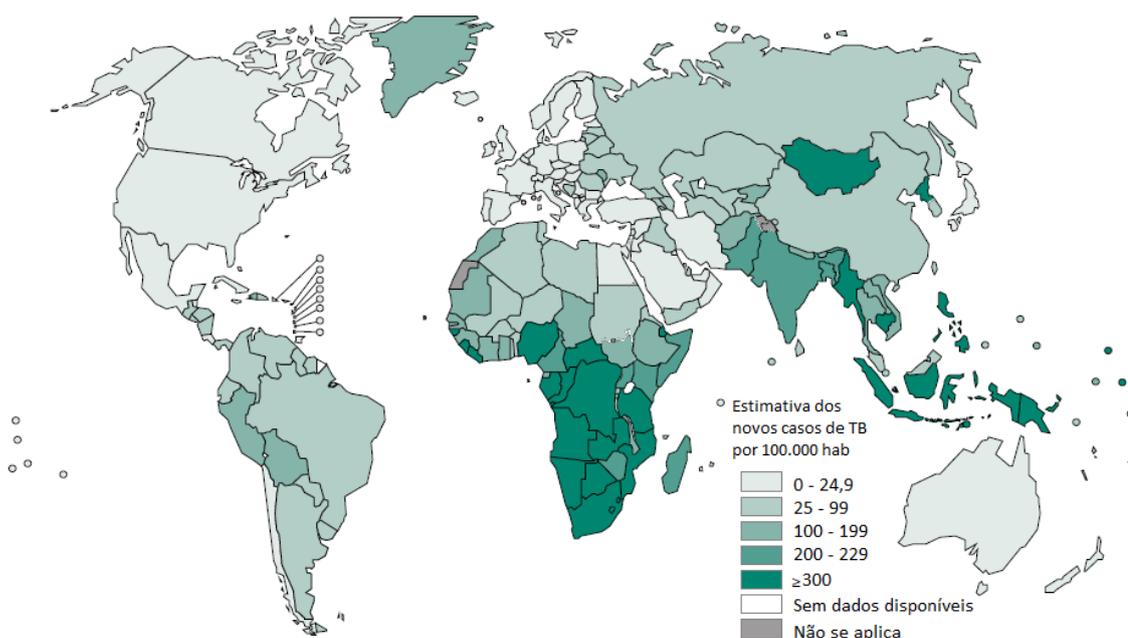


Figura 1: Distribuição global dos novos casos de tuberculose no ano de 2015 (WHO, 2016).

Aproximadamente 50% dos casos de TB mundialmente observados se apresentam distribuídos em cinco países: Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul. Apesar disso, o aumento do número de migrações e de refugiados, por exemplo, para a Europa, tem elevado a disseminação da doença. No Brasil, estima-se que ocorram 70 mil novos casos de TB por ano e 4,5 mil mortes em decorrência da doença (WHO, 2016; PAI et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; HARGREAVES et al., 2016; SOTGIU et al., 2017).

1.1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

A TB tem como agente etiológico micobactéria pertencente ao gênero *Mycobacterium*, o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (Figura 2). A referida micobactéria foi isolada em 1882, pelo cientista alemão Robert Koch. Em sua homenagem, o bacilo da tuberculose ficou conhecido como bacilo de Koch (BK). Esta é uma bactéria gram-positiva, ou seja, apresenta parede celular espessa, impermeável e composta por peptidoglicanos, ácidos micólicos, glicolípídeos e polissacarídeos. Porém, apesar de ser classificado como gram-positivo, devido às características de sua parede celular, na técnica de coloração de Gram o *Mtb* não mantém a coloração violeta, conforme seria esperado. Dessa forma, pode ser classificado como fracamente gram-positivo (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 1980; KANG, SCHLESINGER, 1998; MURRAY et al., 2003; GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012; PAI, 2016).



Figura 2: *Mycobacterium tuberculosis* (FIOCRUZ, 2015).

O *Mtb* se apresenta na forma de bastonete, seu crescimento se dá de forma aeróbia ou anaeróbia facultativa e, a 37 °C e condições ótimas para crescimento, seu tempo de geração é entre 18-24 horas. Possui a capacidade de se manter em estado latente, ou seja, não replicante, apresentando baixa atividade metabólica (KANG, SCHLESINGER, 1998; JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 1980; GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012) e resistência fenotípica a fármacos, independente de mutações genéticas DHEDA, BARRY, MAARTENS, 2016).

1.1.3 TRANSMISSÃO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O *Mtb* é classificado como microrganismo intracelular facultativo, podendo ser fagocitado por macrófagos ao invadir o organismo, uma vez que estas são as primeiras células de defesa do organismo contra a entrada de invasores. Após a invasão e infecção por esta micobactéria, pode ocorrer o desenvolvimento de doença ativa, infecção latente ou combate da infecção pelo sistema imunológico do hospedeiro.

A infecção pelo *Mtb* (*Figura 3*) ocorre através da transmissão do bacilo de um indivíduo que apresenta doença ativa a um indivíduo suscetível. A transmissão se dá quando o indivíduo suscetível entra em contato, por meio de suas vias aéreas, com gotículas de aerossol contendo o microrganismo, geradas através da tosse do indivíduo que apresenta doença ativa. Como a transmissão ocorre através das vias aéreas, os sítios de infecção são os alvéolos pulmonares, nos quais o *Mtb* é fagocitado por macrófagos alveolares. No interior dos macrófagos, o microrganismo se multiplica dentro de fagossomos únicos, que não se fundem aos lisossomos. A fusão dos fagossomos aos lisossomos, e conseqüente formação do fagolisossomo, é detida pelo *Mtb*, que impede a acidificação do fagossomo necessária à fusão. Dessa forma, após a infecção inicial, o processo de defesa do organismo pode ser impedido e alguns bacilos podem se manter viáveis no interior dos macrófagos (KANG, SCHLESINGER, 1998; LIN, FLYNN, 2010; MURRAY et al., 2003; GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012; DHEDA, BARRY, MAARTENS, 2016).

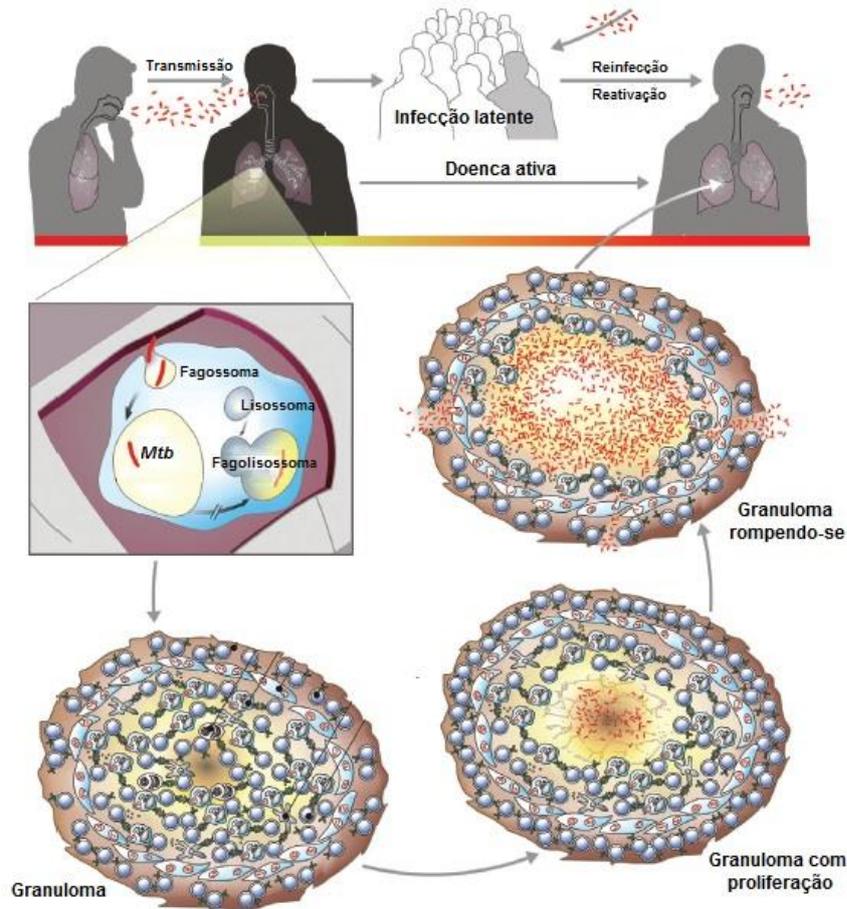


Figura 3: Transmissão e patologia do *M. tuberculosis* (GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012).

Os macrófagos infectados migram para o tecido pulmonar e, junto a monócitos, formam foco inflamatório, gerando-se granulomas, os quais facilitam a contenção da infecção (Figura 3). Nos granulomas, na maioria das vezes, o patógeno é controlado pelo sistema imune, pois se promove um ambiente inóspito para a replicação do bacilo. Quando os patógenos são mantidos nesta etapa do ciclo pelo sistema imune, eles se mantêm no interior dos macrófagos, como forma latente, por diversos anos. A forma latente, principalmente em estágios iniciais da doença, também se apresenta em macrófagos no sítio de infecção. Durante a fase latente, há multiplicação do microrganismo, porém, o indivíduo não apresenta sinais e sintomas clínicos, sendo considerado reservatório do microrganismo (KANG, SCHLESINGER, 1998; MURRAY et al., 2003; LIN, FLYNN, 2010; GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012; DHEDA, BARRY, MAARTENS, 2016).

Em alguns casos, os patógenos não serão mantidos em sua fase latente, havendo o desenvolvimento da forma ativa da doença, também conhecida como TB primária. Os casos de TB primária são mais comuns em crianças, mas também ocorrem em adultos. Menos de

10% dos casos de TB latente progridem à forma ativa da doença, principalmente indivíduos imunodeficientes, e estes casos são conhecidos como TB pós-primária. A TB pós-primária pode ocorrer devido à reinfecção pelo bacilo ou à reativação, que pode se manifestar por depleção em células do sistema imune e neutralização terapêutica do fator de necrose tumoral (TNF), o qual possui atividade pró-inflamatória (JAWETZ, MELNICK, DELBERG, 1980; MURRAY et al., 2003; LIN, FLYNN, 2010; WHO, 2010; ERNST, 2012; O’GARRA et al., 2013; DHEDA, BARRY, MAARTENS, 2016; PAI, 2016; VASAVA et al., 2017).

Durante a forma ativa da doença, inicia-se um processo que progride lentamente. Este processo é caracterizado por focos de inflamação crônica, no qual podem ocorrer lesões nos granulomas, havendo a liberação de bacilos para outras áreas dos pulmões: essa forma da doença é denominada TB pulmonar. Nestes focos, pode ocorrer a ruptura dos macrófagos e granulomas (*Figura 3*), havendo a consequente liberação de grande número de bacilos para outras áreas dos pulmões, o que os torna passíveis de serem veiculados em partículas de aerossol por meio da tosse. Os sintomas clínicos observados neste caso são tosse, perda de peso, suor noturno, febre baixa, dispnéia e dores no peito. O *Mtb* também pode se difundir no organismo do hospedeiro por vias linfática e hematogênica dos brônquios ou do trato gastrointestinal, dando origem à TB extrapulmonar, podendo afetar medula espinhal, fígado e cérebro (MURRAY et al., 2003; JAWETZ, MELNICK, DELBERG, 1980; PAI, 2016; VASAVA et al., 2017).

Atualmente, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o maior fator de risco para que haja a progressão de uma infecção latente para a TB ativa. Em 2010, estimava-se que 13% dos indivíduos infectados pelo *Mtb* também apresentavam o HIV. A co-infecção tuberculose/HIV desarma o sistema imune do paciente, dificultando o controle e o tratamento de ambas as doenças. Além da infecção por HIV, sabe-se que outras doenças, também, são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento da TB na sua forma ativa. Na última década, elevou-se o reconhecimento da importância da associação entre a tuberculose e o diabetes. Estima-se que pacientes que apresentam diabetes tipo 2 possuem de duas a três vezes mais risco de desenvolver a forma ativa da TB (NAING et al., 2013; SARACENI et al., 2015; WHO, 2016; GIRARDI et al., 2017).

1.1.4 QUIMIOTERAPIA

Ante o cenário preocupante da TB, observa-se a necessidade de prevenção e controle da doença, sendo necessárias medidas de saúde pública como vacinação, diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes infectados. O tratamento evitou 49 milhões de mortes no mundo entre os anos 2000 e 2015, porém, ainda existem muitas falhas no diagnóstico e na quimioterapia da doença, bem como, há a subnotificação dos casos. Mundialmente, observa-se diferença de 4,3 milhões entre casos incidentes e casos notificados, sendo que, aproximadamente a metade dos casos subnotificados no mundo ocorre na Índia, Indonésia e Nigéria (BLOMBERG et al., 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002, 2010; WHO, 2016).

O tratamento da TB possui elevada taxa de abandono, devido à sua duração, que pode variar de seis meses a um ano ou mais, e têm se observado altos níveis de resistência das micobactérias aos quimioterápicos disponíveis. Buscando reverter esta situação, a OMS formulou, em 1993, uma estratégia denominada *Directly Observed Treatment, Short-course* (DOTS). Esta estratégia, a qual atingiu a adesão de 180 países, em 2003, se baseia na união do tratamento de curta duração, havendo monitoramento e suporte ao paciente, com medidas políticas, organizacionais e de vigilância. Embora o tratamento de curta duração tenha sido adotado mundialmente desde 1979, no Brasil, a OMS considera que apenas em 1998, por meio do Plano Nacional de Controle da Tuberculose, o País tenha adotado a estratégia DOTS (JAWETZ, MELNICK, DELBERG, 1980; WHO, 2011).

Após a aplicação generalizada da estratégia DOTS, verificou-se que para atingir os níveis desejados de cura, era necessário implantar novas ações. Sendo assim, a OMS lançou, em 2006, a estratégia *Stop TB*. Esta reforça as ações do DOTS e possui novos objetivos a serem atingidos até 2020, entre eles, o acesso universal ao tratamento centrado no paciente e proteção das populações de TB associadas ao HIV e TB multirresistente. Para atingir os objetivos desejados com a terapêutica, a OMS recomenda o tratamento supervisionado, a manutenção do uso contínuo na concentração adequada e a associação de fármacos anti-TB, evitando, assim, resistência aos fármacos (WHO, 2016; LIENHARDT et al., 2012).

O tratamento atualmente utilizado busca a cura do paciente, restaurando sua qualidade de vida e produtividade, a prevenção da morte por TB ativa, a redução da transmissão do bacilo e a prevenção do desenvolvimento de resistência à quimioterapia. Este se baseia na padronização de esquemas terapêuticos diários, por períodos que podem variar de seis meses a um ano ou mais, o que causa alta taxa de abandono. Os esquemas terapêuticos empregam a

terapia combinada, na qual se utilizam dois ou mais fármacos simultaneamente, buscando, além da cura, evitar a resistência das cepas aos quimioterápicos disponíveis (MENDES, FENSTERSEIFER, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002, COHEN, HEDT, PAGANO, 2010; LALLOO, AMBARAM, 2010; WHO, 2016; COX, FORD, 2013; STOFFELS et al., 2013; TIBERI et al., 2017).

O Ministério da Saúde (MS) no Brasil preconizou esquemas a serem utilizados no tratamento da TB no País. O esquema básico se aplica a adultos e adolescentes, em casos novos de TB, recidiva ou retorno após abandono. Os quimioterápicos utilizados no esquema básico são rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (*Figura 4*). Estes são administrados em comprimidos com doses fixas combinadas de 150 mg de rifampicina, 75 mg de isoniazida, 400 mg de pirazinamida e 275 mg de etambutol. Em casos de multirresistência, alterações hepáticas e intolerância utilizam-se outros esquemas nos quais se variam os quimioterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

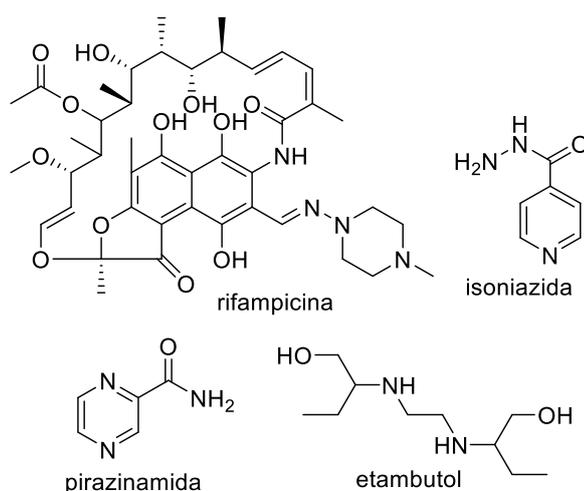


Figura 4: Fármacos pertencentes ao esquema básico do tratamento da tuberculose.

Sabe-se que a monoterapia, o tratamento intermitente e o abandono do tratamento, anteriormente mencionado, facilitam a seleção e a transmissão de cepas de *Mtb* resistentes aos quimioterápicos disponíveis na terapêutica. Tem se observado o crescimento de casos de cepas resistentes em 70% dos países que fazem parte da OMS, o que compromete o sucesso das estratégias preconizadas para o controle da TB. As cepas resistentes são conhecidas como TB multirresistente (MDR-TB), resistentes à isoniazida e rifampicina, e TB extensivamente resistente (XDR-TB), que combina a resistência à isoniazida e rifampicina com a resistência a outros fármacos. As cepas multirresistentes são de difícil tratamento, sendo esse de alto custo, maior duração e toxicidade. Estima-se que, em 2013, apenas 52% dos pacientes infectados

por cepas MDR-TB apresentaram sucesso no tratamento (COHEN, HEDT, PAGANO, 2010; LALLOO, AMBARAM, 2010; WHO, 2016; COX, FORD, 2013; STOFFELS et al., 2013; TIBERI et al., 2017).

Nos últimos anos, observa-se crescente investimento no desenvolvimento de fármacos para TB e, também, elevado interesse na busca por novos alvos. Atualmente, nove candidatos ao tratamento da TB se encontram em fase clínica de triagem. Apesar disso, o progresso observado ainda não é satisfatório. Segundo a OMS, a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas e fármacos para a tuberculose ainda são mundialmente subfinanciados. Estima-se que seriam necessários ao menos 2 bilhões de dólares por ano para esse fim e observa-se que durante os anos de 2004 e 2015 esse valor nunca ultrapassou 0,7 bilhões de dólares. Os quimioterápicos atualmente utilizados exploram poucas funções essenciais do *Mtb*, o que pressupõe a importância em se identificar novos alvos essenciais para o crescimento e sobrevivência da micobactéria no desenvolvimento de novos fármacos, para as formas sensíveis e resistentes da TB. Neste sentido, a inibição de enzimas, metabólitos e processos bioquímicos essenciais para o *Mtb*, como é o caso da biossíntese da coenzima A (CoA), a qual é essencial para o metabolismo da micobactéria, pode ser muito promissora no planejamento de fármacos para a doença (ARORA, BANERJEE, 2012; ZUMLA et al., 2012; PRIMI, SEGRETTI, FERREIRA, 2013; XIONG et al., 2013; WHO, 2016).

1.2 NOVO ALVO POTENCIAL PARA TB

1.2.1 A COENZIMA A E A FOSFOPANTETEÍNA ADENILILTRANSFERASE

A coenzima A (CoA) é um cofator universal requerido para diversos processos metabólicos em organismos eucariotos e procariotos. Suas principais funções são a de transportador do grupo acil e ativador de grupos carbonílicos, conferindo funcionalidade para ácidos graxos, peptídeos não ribossômicos, proteínas transportadoras e poliketídeos (ZHAO et al., 2003; MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004; WUBBEN, MESECAR, 2010; ARORA, BANERJEE, 2012; AMBADY et al., 2012; ROTHMANN et al., 2013; LYONNET et al., 2017).

Podem se citar como processos metabólicos no qual a CoA é necessária, o ciclo do ácido cítrico, que possui papel bioenergético e biossintético, e a síntese de ácidos graxos em bactérias. O ciclo do ácido cítrico possui papel bioenergético e biossintético, sendo

responsável pelo fluxo de carbonos na respiração dos microrganismos. Neste, o piruvato é completamente oxidado a CO₂, levando à produção de uma molécula de NADH e uma unidade de acetil, a qual será acoplada à coenzima A para dar continuidade ao ciclo. Na síntese de ácidos graxos, o derivado acetilado da CoA é utilizado como precursor, como é o caso da biossíntese de palmitato, na qual o acetil-CoA condensa-se com o malonil-CoA para gerar, após algumas etapas adicionais, o ácido graxo (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004; WUBBEN, MESECAR, 2010; ARORA, BANERJEE, 2012; AMBADY et al., 2012; ROTHMANN et al., 2013).

Em bactérias, incluindo o *Mtb*, a CoA é biossintetizada a partir do pantotenato (vitamina B₅) (*Figura 5*), que pode ser proveniente de captação extracelular, da cisteína e da adenosina trifosfato (ATP), ou produzido pela própria bactéria através de 5 passos enzimáticos (*Figura 5*). No primeiro passo ocorre a fosforilação do pantotenato pela pantotenatoquinase (PanK); no segundo passo uma cisteína é adicionada ao 4'-fosfopantotenato pela fosfopantotenoilcisteína-sintase (PPCS); no terceiro passo a 4'-fosfo-*N*-pantotenoilcisteína é descarboxilada pela fosfopantotenoilcisteína-descarboxilase (PPCDC); no quarto passo a fosfopanteteína adenililtransferase (PPAT) adiciona uma adenina proveniente do ATP à 4'-fosfopanteteína e, por fim, no quinto passo a desfosfo-CoA é fosforilada pela desfosfocoenzima A quinase (DPCK), originando a CoA (WUBBEN, MESECAR, 2010; AMBADY et al., 2012; STRAUSS, SIBON, 2016).

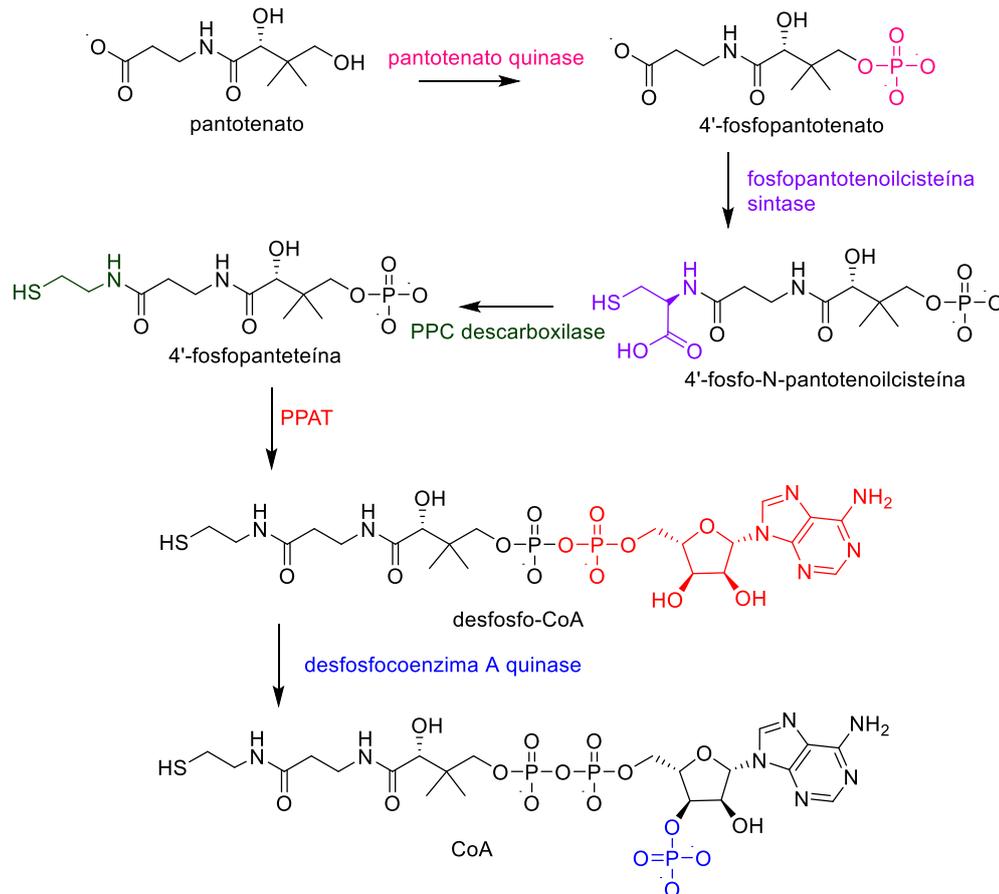


Figura 5: Biossíntese da CoA.

O penúltimo passo na biossíntese da CoA, catalisado pela enzima PPAT, se mostrou um passo limitante desta via. A CoA regula negativamente a PPAT, exercendo um *feedback* negativo nesta. Ou seja, quando a concentração de CoA atinge níveis elevados, esta inibe a PPAT e, conseqüentemente, a sua biossíntese. Dessa forma, a PPAT regula a concentração celular de CoA, sendo de grande importância na biossíntese dessa coenzima (IZARD, 2003; WUBBEN, MESECAR, 2011).

A fosfopanteteína adenililtransferase (PPAT) pertence à superfamília nucleotidiltransferase α/β -fosfodiesterase. Os membros desta superfamília possuem a habilidade de catalisar a transferência do grupo adenilato presente no ATP para diversos substratos. Podem se citar como membros desta superfamília a aminoacil-tRNA sintase de classe I, glicerol-3fosfato citidiltransferase, pantotenato sintase, entre outras enzimas. Estas enzimas são caracterizadas pela conservação de uma sequência Histidina-X-Glicina-Histidina (HXGH) de aminoácidos e pela presença do arranjo de Rossmann. O referido arranjo é uma característica estrutural terciária na qual se observa a presença de seis folhas beta e cinco alfa hélices, estruturas proteicas secundárias, organizadas de forma intercalada (Figura 6) e está

presente, principalmente, em proteínas e enzimas as quais interagem com mononucleotídeos (IZARD, 2003; ZHAO et al., 2003; MORRIS, IZARD, 2004; WUBBEN, MESECAR, 2011).

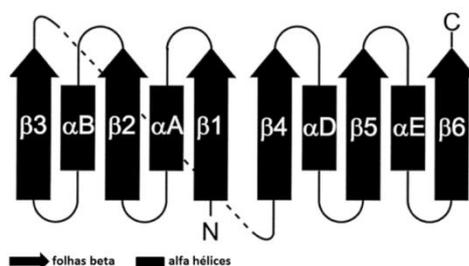


Figura 6: Representação do arranjo de Rossmann (BOTTOMS, SMITH, TANNER, 2002).

Como mencionado anteriormente, a PPAT catalisa a formação do defosfo-CoA (Figura 5), possuindo caráter regulatório na via de biossíntese de CoA, já que é um passo limitante desta. Este processo catalítico foi avaliado por meio de estudos cinéticos, observando-se que o mecanismo de catálise compreende um estado de transição estabilizado pela enzima. Os grupos funcionais da PAAT não possuem envolvimento direto na catálise, mas atuam estabilizando a 4'-fosfopanteteína e o ATP, para que haja o ataque nucleofílico necessário à formação da desfosfo-CoA (Figura 7). Após o referido ataque, há, também, a liberação de pirofosfato (IZARD, 2003; ZHAO et al., 2003; MORRIS, IZARD, 2004; MILLER et al., 2007; WUBBEN, MESECAR, 2011).

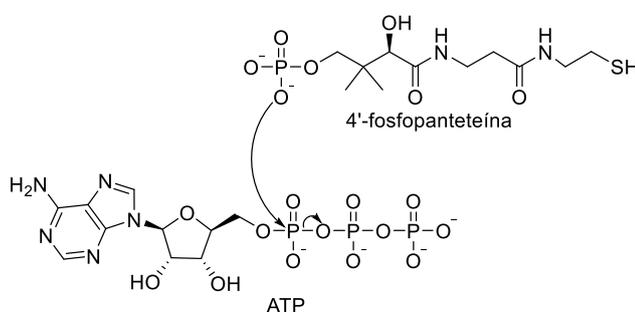


Figura 7: Ataque nucleofílico envolvido na formação do desfosfo-CoA.

A PPAT possui estrutura quaternária hexamérica, em que se verifica a presença de um eixo que a divide em dois trímeros, cada monômero possuindo massa molecular de 17,8 kDa. Estudos afirmam que, no caso da PPAT de *Mtb* (*MtPPAT*), a CoA, inibidor natural da enzima, interage com o sítio catalítico das seis unidades. Acredita-se que a ligação da CoA a um dos monômeros irá gerar pequenas mudanças conformacionais, que resultarão na interação da coenzima com os seis sítios presentes no hexâmero. Por meio de estudos cristalográficos, Wubben e Mesecar (2011) observaram que a interação da CoA com a PPAT ocorre de forma que a porção pantoteína desta interage com o sítio ativo, enquanto sua porção

adenilato não realiza interações de grande importância, situando-se voltada para o canal de solvente presente entre os monômeros (Figura 8) (ZHAO et al., 2003; MILLER et al., 2007).

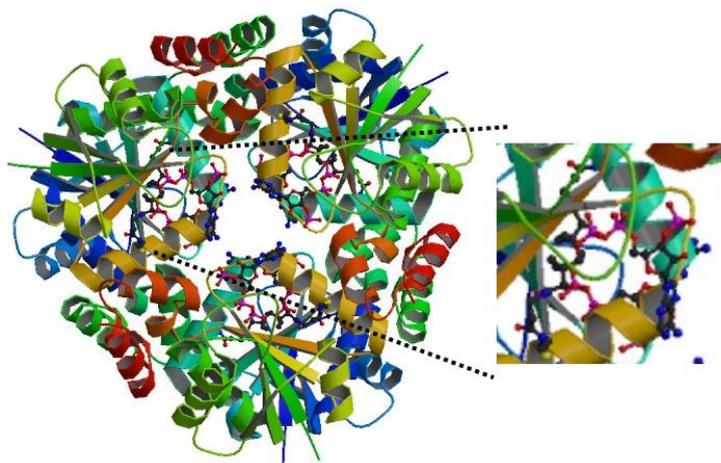


Figura 8: Estrutura cristalográfica do trímero da PPAT de *Mtb* co-cristalizada com a CoA (WUBBEN, MESECAR, 2011).

Conforme citado anteriormente, a biossíntese da CoA é essencial ao *Mtb* e a PPAT possui caráter regulatório nessa via, ou seja, a PAAT é de grande importância metabólica para o *Mtb*. Além disso, alguns outros fatores foram considerados a fim de se selecionar a *MtPPAT* como alvo de interesse para o presente trabalho, como, por exemplo, o caráter de seletividade observado. Este se deve ao fato de que a PPAT presente em mamíferos é uma enzima dimérica, que se complexa com a enzima desfosfo-CoA quinase, sendo assim, esta apresenta características estruturais muito diferentes da PPAT bacteriana, não apresentando homologia significativa. Além disso, a referida enzima possui métodos de produção e purificação descritos na literatura e é considerada um alvo validado para outras bactérias. Vale ressaltar, também, que a PPAT é um alvo ainda não explorado para a TB, o que poderia vencer a questão da resistência observada na quimioterapia atual, e não existem inibidores descritos para a enzima até o momento. Sendo assim, a *MtPPAT* é considerada um alvo potencial para o desenvolvimento de inibidores a fim de se obter atividade contra a TB, trazendo um grande caráter de inovação ao trabalho (ZHAO et al., 2003; MORRIS, IZARD, 2004; MILLER et al., 2007; AMBADY et al., 2012).

1.3 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

Uma das importantes abordagens do planejamento de fármacos é aquela orientada por uma hipótese racional sobre o mecanismo de ação da molécula em estudo, visando à

introdução de novos fármacos na terapêutica. Duas vertentes podem ser utilizadas a fim de se realizar o planejamento racional de fármacos: a baseada na estrutura do alvo (*Structure-based drug design*, SBDD) e a baseada na estrutura do ligante (*Ligand-based drug design*, LBDD). Ambas são empregadas na obtenção de compostos líderes, os quais são, posteriormente, otimizados, buscando-se obter novas entidades moleculares (WERMUTH, 2008; BARREIRO, FRAGA, 2015; FERREIRA, 2012; GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2012).

No SBDD utiliza-se a informação estrutural da biomacromolécula de interesse, explorando-a para o desenvolvimento do ligante. Para realizar essa abordagem a estrutura do alvo é necessária, podendo-se utilizar técnicas experimentais para determiná-las, como cristalografia de raio X ou ressonância magnética nuclear (RMN). Caso a estrutura do alvo não esteja disponível, pode-se inferir a estrutura deste por métodos computacionais, como a modelagem por homologia (ou comparativa). Conhecendo-se a estrutura do alvo, pode-se obter informações diversas, como volume máximo possível do ligante, os sítios de interação, quais as orientações e interações correspondentes presentes entre o ligante e seu alvo. Dessa forma, o SBDD pode revelar informações importantes sobre a relação entre estrutura química e atividade biológica, principalmente na fase de otimização do composto líder, a fim de se atingir a seletividade de um composto para determinado alvo (APAROY, REDDY, REDDANNA, 2012; LOUNNAS et al., 2013; PRAJAPAT, AGARWAL, TALESARA, 2017).

O LBDD baseia-se na estrutura de ligantes conhecidos, os quais possuam atividade biológica determinada, buscando otimizar a ação destes através da obtenção de análogos do protótipo. Esta abordagem é de grande importância, principalmente, quando não se conhece a estrutura do alvo a ser estudado. No LBDD são realizadas modificações moleculares, por meio de similaridades físico-químicas, buscando interação do análogo com o alvo semelhante à do protótipo (SHIM, MACKERELL JR, 2011; GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2012; PRAJAPAT, AGARWAL, TALESARA, 2017).

Diversas estratégias de modificação molecular podem ser utilizadas no planejamento racional de fármacos. Entre as mais promissoras estão o bioisosterismo e a adição de grupos volumosos (BARREIRO, FRAGA, 2015; PATRICK, 2017). O *bioisosterismo* consiste na substituição de determinado átomo ou grupo químico do composto protótipo por átomos ou grupos que apresentem características estereoelétricas e/ou físico-químicas semelhantes. Este permite obter bioísteros clássicos e não clássicos, sendo que os primeiros apresentam átomos ou grupos funcionais que possuem mesma valência ou anéis equivalentes ao

protótipo. Os bioisósteros que não se encaixam na definição anterior são denominados bioisósteros não-clássicos. Incluído nesta classificação como estratégia de bioisosterismo não clássico encontra-se o retroisosterismo, que se baseia na inversão de um determinado grupo funcional presente na estrutura do composto protótipo buscando melhor interação deste com o alvo (LIMA, BARREIRO, 2005; PATRICK, 2017; DEVEREUX, POPELIER, 2010; MEANWELL, 2011).

A estratégia de *adição de grupos volumosos* pode dar ensejo à geração de novas interações do ligante com o alvo ou aprimorar as interações já presentes. Observa-se que quando um composto protótipo não interage com todas as regiões disponíveis do sítio ativo, a adição de um grupo, o qual seja capaz de realizar interações com essas regiões, pode elevar a interação do ligante com seu alvo. Esta modificação molecular é frequentemente utilizada a fim de se explorar novas interações hidrofóbicas em um determinado sítio ativo. Vale ressaltar que, uma possível desvantagem ao se utilizar essa abordagem, seria um efeito desfavorável sobre a hidrossolubilidade (PATRICK, 2017).

1.3.1 MODELAGEM MOLECULAR NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

O planejamento de fármacos envolve diversas abordagens pertencentes à química farmacêutica/medicinal, combinando avanço experimental e métodos computacionais. Inserido neste contexto, está a modelagem molecular. Esta pode ser definida como a investigação de estruturas e propriedades moleculares utilizando a química computacional e técnicas de visualização gráfica (SANT'ANNA, C. M. R., 2002). O planejamento de fármacos auxiliado por computador (*Computer-aided drug design, CADD*) é considerado uma forma eficaz de se reduzir tempo e investimento financeiro no processo de desenvolvimento de fármacos. As estratégias de CADD podem ser aplicadas em diferentes estágios no desenvolvimento de fármacos e se utilizam de métodos teóricos e técnicas computacionais a fim de estudar estruturas moleculares. Entre as referidas estratégias encontram-se o *docking* e os cálculos semi-empíricos (ALONSO, BLIZNYUK, GREARY, 2006; TAFT, DA SILVA, DA SILVA, 2008; XIANG-QUN, 2008; ANDRICOPULO, SALUM, 2009; PRAJAPAT, AGARWAL, TALESARA, 2017).

1.3.1.1 Docking

O *docking* consiste em uma estratégia promissora de *CADD* muito utilizada na identificação de *hits* e otimização de compostos líderes. Nesta estratégia, realiza-se o atracamento de pequenas moléculas em estruturas de alvos macromoleculares, obtendo-se diferentes “poses” (ou seja, diferentes combinações de conformação e orientação) de ligantes em seu sítio de interação e classificando a potencial complementaridade destes ligantes com o sítio de interação. As simulações de *docking* compreendem diversas etapas. Inicialmente, há a aplicação de algoritmos de busca, os quais irão adicionar os ligantes no sítio ativo considerando possíveis graus de liberdade conformacionais e de orientação no espaço destes ligantes, identificando-se possíveis orientações e conformações da estrutura ao interagir com o alvo. Nestes algoritmos inclui-se o algoritmo genético (AG), o qual é um método de otimização e busca baseado nos mecanismos evolutivos que, no caso do *docking*, busca as “poses” mais estáveis na interação entre o ligante e seu alvo. O AG aplicado no programa GOLD otimiza os seguintes parâmetros: ângulos diedros do ligante, geometrias de anéis presentes no ligante, ângulos diedros de grupos hidroxila e amino presentes na proteína e a posição do ligante no sítio de ligação, ocorrendo um mapeamento desta (VERDONK et al., 2003; KITCHEN et al., 2004; ALONSO, BLIZNYUK, GREASY, 2006; YURIEV, RAMSLAND, 2013; BOHNUUD, 2017).

Os algoritmos de busca são complementados por funções de escore ou pontuação durante o *docking*, funções as quais classificam cada conformação/orientação dos ligantes no seu alvo. As funções de escore podem ser agrupadas em três categorias: as baseadas em campo de força, as empíricas e as baseadas em conhecimento. No caso das funções de escore empíricas, como a ChemPLP aplicada pelo programa GOLD, a avaliação do encaixe do ligante considera dados experimentalmente determinados de estruturas de complexos proteína-ligante (KORB, STUTZLE, EXNER, 2009).

As funções de pontuação do *docking* possuem aproximações necessárias para dar rapidez ao método, porém, estas geram uma limitação na qualidade dos valores de pontuação obtidos. Neste sentido, buscam-se métodos mais precisos a fim de se avaliar a energia de interação das poses identificadas pelo *docking*, podendo-se, assim, obter uma resposta mais confiável sobre os sistemas.

1.3.1.2 Cálculos semi-empíricos

Os métodos semi-empíricos podem ser aplicados a fim de se obter resultados mais precisos sobre os sistemas em estudo. São métodos quânticos rápidos, por serem aproximados, o que permite que os cálculos sejam realizados para sistemas relativamente grandes. Os cálculos semi-empíricos se baseiam na química quântica, utilizando-se de aproximações na resolução da equação de Schrödinger (*Equação 1*). Os referidos cálculos descrevem a distribuição dos elétrons em orbitais moleculares para um dado conjunto de núcleos organizados em geometrias definidas e no emprego de parâmetros obtidos a partir de dados experimentais que simplificam a integração desta equação. Estes cálculos são comumente empregados em sistemas contendo grande número de átomos, como um complexo entre ligante e proteína, a fim de se obter informações estruturais quimicamente precisas, já que há a consideração de orbitais moleculares, com um custo computacional razoável (SANT'ANNA, 2009).

$$[\hat{T} + \hat{V}]\Psi(R, r) = E\Psi(R, r)$$

Equação 1: Equação de Schrödinger, onde E é a energia total do sistema, R indica as coordenadas dos núcleos, r indica as coordenadas dos elétrons, ψ é função de onda, T é o operador energia cinética e V é operador energia potencial.

A fim de que ocorra a interação entre determinado ligante e seu sítio ativo, é necessário que esta seja energeticamente favorável. Ou seja, para que a formação do complexo seja favorecida, a energia livre do mesmo deve ser menor do que a das espécies livres. Dessa forma, a constante de equilíbrio envolvida neste processo, conhecida como constante de *binding*, deve ser favorável à formação do complexo entre ligante e macromolécula, o que acarreta liberação de energia. Por meio da variação da energia livre de Gibbs (*Equação 2*) pode se obter a energia associada à formação de um sistema, utilizando-se de informações sobre a entalpia e a entropia deste, o que possibilitaria determinar se a interação entre ligante e sítio ativo seria favorável. Dessa forma, cálculos que permitam o conhecimento da entalpia e da entropia envolvidas em uma determinada interação são de grande interesse (CHAIRES, 2008).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Equação 2: Equação que define a Energia Livre de Gibbs, onde ΔH se refere à variação da entalpia e ΔS se refere à variação da entropia e T é a temperatura absoluta.

Objetivos e justificativa

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A TB é uma das maiores causas de morte por infecção no mundo e foi considerada, em 1993, emergência global de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2010). Apesar do crescente investimento em pesquisas para o desenvolvimento de fármacos para a TB nos últimos anos, a OMS considera que ainda existe subinvestimento para este fim (WHO, 2016). O *Mtb*, agente etiológico da TB, apresenta altos níveis de resistência aos quimioterápicos utilizados na terapêutica, além disso, o tratamento disponível explora poucos alvos essenciais do *Mtb* (ARORA, BANERJEE, 2012; XIONG et al., 2013; TIBERI et al., 2017).

Sendo assim, verifica-se a importância do desenvolvimento de fármacos que explorem novos alvos essenciais ao crescimento e sobrevivência do *Mtb*, podendo ser mais eficazes contra cepas resistentes e a forma latente da doença (ARORA, BANERJEE, 2012; ZUMLA et al., 2012; TIBERI et al., 2017).

Nesse contexto, encontra-se a enzima fosfopanteteína adenililtransferase (PPAT), a qual vem despertando interesse crescente da comunidade científica no desenvolvimento de moléculas bioativas. A enzima apresenta caráter regulatório na via de biossíntese da CoA no *Mtb*, sendo essencial à sua viabilidade. Além de sua importância metabólica, vale ressaltar que esta possui um caráter de seletividade quando comparada à mesma enzima de mamíferos, é um alvo validado para outras bactérias ainda não explorado para a TB, o que poderia vencer a resistência ao tratamento observada, e não existem inibidores descritos para a enzima até o momento isso. Dessa forma, a *MtPPAT* é um alvo potencial para o desenvolvimento de novos tuberculostáticos e apresenta grande caráter de inovação (ZHAO et al., 2003; MORRIS, IZARD, 2004; MILLER et al., 2007; WUBBEN, MESECAR, 2011; AMBADY et al., 2012).

Face ao exposto, o presente trabalho busca o desenvolvimento de inibidores da enzima PPAT de *M. tuberculosis* (*MtPPAT*) para o tratamento da tuberculose. Para esse fim, foram planejados inibidores potenciais da enzima, sendo, em seguida, selecionados os mais promissores por meio de estratégias computacionais. Os inibidores potenciais selecionados foram sintetizados, purificados e caracterizados e, posteriormente, avaliou-se a sua atividade biológica.

2.1 PLANEJAMENTO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Após a realização de estudos preliminares de modelagem molecular com 50 potenciais inibidores da *MtPPAT*, planejados por meio das abordagens de *Structure-Based Drug Design* (SBDD) e *Ligand-Based Drug Design* (LBDD), propuseram-se mais 28 possíveis inibidores da enzima. Posteriormente, realizaram-se simulações de *docking* com os 78 inibidores propostos e o sítio ativo da *MtPPAT*, extraíndo-se os complexos dos ligantes que se mostraram mais interessantes nas simulações de *docking*. Fazendo uso dos complexos citados, realizaram-se cálculos semi-empíricos a fim de se obter informações sobre a entalpia de interação dos ligantes com o sítio ativo da *MtPPAT*.

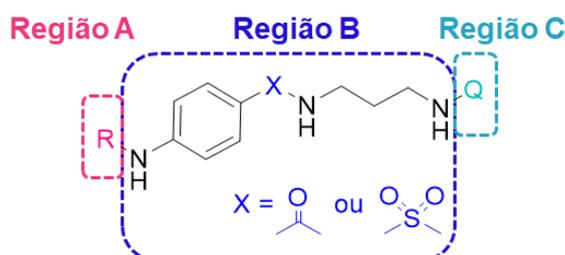


Figura 9: Estrutura geral dos derivados propostos, com semelhança estrutural à fosfopanteteína, substrato da PPAT. Os grupos R e Q estão apresentados nas Tabelas I e II, as quais se encontram dispostas na seção de métodos.

A partir dos resultados obtidos selecionaram-se os inibidores que se mostraram mais promissores e a síntese destes foi realizada. Após as etapas sintéticas, de purificação e caracterização, os inibidores selecionados, bem como fragmentos estruturais destes, tiveram sua atividade microbiológica e citotoxicidade avaliadas. De acordo com os resultados obtidos, novos compostos foram planejados e sintetizados. Os referidos compostos, também, tiveram sua atividade microbiológica e citotoxicidade avaliadas.

Por fim, realizou-se produção e purificação da *MtPPAT*, bem como, ensaios de inibição enzimática. Os referidos ensaios foram realizados a fim de se determinar a atividade inibitória dos ligantes frente à *MtPPAT* e identificar os primeiros inibidores da mesma, validando, dessa forma, a enzima como um alvo para a TB.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 MODELAGEM MOLECULAR

3.1.1.1 Programas computacionais

- Gold 5.2
- Hyperchem 7.51
- LigPlot
- Marvin Beans[®] versão 16.7.25.0
- MOPAC2012
- PyMOL Molecular Graphics System 1.1
- Spartan'14 1.1.4
- Swiss-PdbViewer 4.1
- ViewerLite 5

3.1.2 SÍNTESE

3.1.2.1 Reagentes, solventes e demais materiais para síntese e análise

- 1,3-diaminopropano
- Acetato de etila (AcOEt)
- Acetona
- Acetona deuterada ((CD₃)₂CO),)
- Ácido clorídrico
- Ácido glicólico
- Ácido trifluoracético
- Água destilada
- Boc-His(Tos)-OH
- Cloreto de 2-trifluorometilbenzenossulfonila
- Cloreto de 3-trifluorometilbenzenossulfonila
- Cloreto de 4-clorobenzenossulfonila
- Cloreto de 4-fluorobenzenossulfonila
- Cloreto de 4-nitrobenzoíla
- Cloreto de 4-trifluorometilbenzenossulfonila
- Cloreto de sódio
- Clorofórmio
- Diclorometano
- Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆)
- Etanol (EtOH)
- Formato de amônio
- Hexano

- Hidróxido de sódio
- Metanol
- Metanol deuterado (CD₃OD)
- *N*-boc-1,3-diaminopropano
- Paládio/carbono 10%
- Placa cromatográfica delgada de sílica gel 60 Å, fluorescente f-254
- Sílica gel 60 Å – 230-400 mesh
- Tetraidrofurano
- Trietilamina

3.1.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA E DE CITOTOXICIDADE

- Ácido palmítico
- Albumina de soro bovino
- Ampicilina
- Casitona
- Catalase
- Células VERO - ATCC CRL-1586
- Cepas de *Candida albicans* - ATCC 10231
- Cepas de *Escherichia coli* - ATCC 25922
- Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv - ATCC 27294
- Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv isogênica monoresistente à rifampicina - ATCC 35838
- Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv isogênica monoresistente à isoniazida - ATCC 35822
- Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv recombinantes - pfca-luxabcde
- Cepas de *Staphylococcus aureus*- ATCC 29213
- Isoniazida (INH)
- Linezolida (LIZ)
- Meio de cultura Cellgro RPMI 1640
- Meio de cultura Middlebrook 7H9
- Meio de cultura Mueller-Hinton II (CSLI, 2007)
- Microplacas de 96 poços
- Moxifloxacino (MOX)
- Resazurina
- Rifampicina (RPM)

3.1.4 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PPAT E ENSAIOS ENZIMÁTICOS

- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)
- Ampicilina
- B-Mercaptoetanol
- Cloreto de magnésio
- Desfosfocoenzima A (dpCoA)
- Ditioneitol (DTT)

- *Escherichia coli* cepas BL21(DE3)
- Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)
- Gel de poliacrilamida
- Glicose
- Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)
- Hexoquinase (HK)
- Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG)
- Meio de cultura Luria Bertani (LB)
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada (NADP⁺)
- Pirofosfato (PPi)
- Reagente de Bradford
- Trisaminometano (TRIS)

3.2 EQUIPAMENTOS

- Agitadores Magnéticos
- Anoxomat System Advanced Instruments, modelo Mark II, com jarra anaeróbica
- Biotage Isolera Prime, equipado com leitor ultravioleta (UV)
- Bomba de alto vácuo Edwards, modelo E2M5
- Espectrômetro de Ressonância Magnética nuclear (RMN) BrukerAdvanced, modelo DPX-300 e 400
- Espectrômetro de Massas de alta resolução Shimadzu IT-TOF
- Estufas
- Leitor de microplacas de Luminescência e Fluorescência por Intensidade e Polarização SpectraMax, modelo SpectraMax Plus
- Prensa francesa
- Rotaevaporador Büchi, modelo R-3, acoplado a bomba de vácuo Büchi, modelo V-700
- Sintetizador micro-ondas CEM, modelo Discover SP

3.3 MÉTODOS

3.3.1 PLANEJAMENTO DOS COMPOSTOS

Por meio das abordagens de SBDD e LBDD, planejaram-se 50 potenciais inibidores da PPAT. Para este fim, observaram-se a estrutura da CoA (*Figura 10*), inibidor natural da PPAT, sua disposição no sítio ativo da enzima e as distâncias entre esta e os resíduos presentes no sítio de interação. A fim de se observar a disposição da CoA no sítio ativo e as distâncias entre esta e os resíduos presentes, utilizou-se a estrutura cristalográfica 3PNB, presente no *Protein Data Bank* (PDB), com resolução de 2,11 Å (WUBBEN, MESECAR, 2011). A referida estrutura apresenta um dos trímeros da PPAT de *M. tuberculosis* (MtPPAT), sendo que cada monômero está co-cristalizado com a CoA. A estrutura foi observada no programa ViewerLite 5.0 [Accelrys, Inc.], excluindo-se dois dos monômeros e mantendo-se

apenas o sítio ativo de um deles junto à CoA. Posteriormente, a estrutura mantida foi explorada no programa PyMOL Molecular Graphics System 1.1 [DeLano Scientific, LLC], medindo-se as distâncias entre a coenzima e os resíduos do sítio de interação (*Figura 11*).

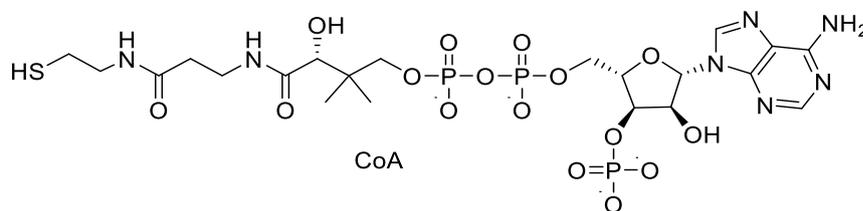


Figura 10: Coenzima A.

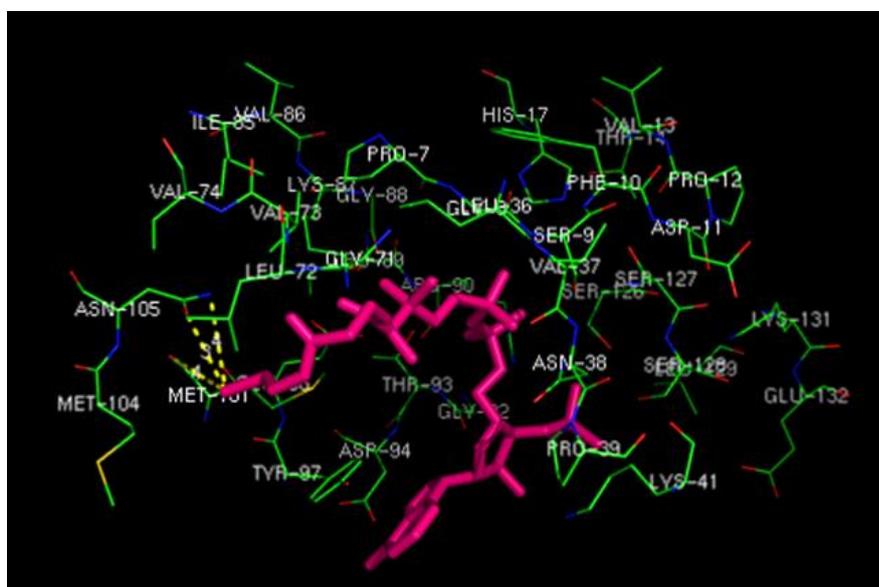


Figura 11: Sítio ativo de um dos monômeros da *MtPPAT* junto à CoA (magenta), representado no programa PyMOL Molecular Graphics System 1.1.

Ao se observar o posicionamento da CoA no sítio ativo, verificou-se que, conforme descrito por Wubben e Mesecar (2011), a porção adenilato desta encontra-se voltada para o canal de solvente, não sendo observadas muitas interações com o sítio ativo a serem exploradas por essa porção. A porção pantotenato da estrutura da coenzima realiza algumas interações já descritas, como com a asparagina (Asn) 105, a valina (Val) 73 e a serina (Ser) 9, e observam-se diversas possíveis interações a serem exploradas.

Face ao exposto, planejaram-se os 50 análogos da CoA, de forma a se manter as interações mais importantes observadas no sítio ativo da *MtPPAT* e explorar novas possíveis interações, mantendo-se a porção pantotenato da CoA (proveniente da fosfopanteteína) retirando-se a porção adenilato. Dessa forma, os análogos propostos apresentam semelhança estrutural à fosfopanteteína (substrato da PPAT) (*Figura 12*) e, por não possuírem o grupo

fosfato envolvido na reação catalítica estabilizada pela PPAT (*Figura 7*), evitam a formação da desfosfo-CoA e, conseqüentemente, da coenzima A (*Figura 5*).

No planejamento dos análogos utilizaram-se as seguintes estratégias de modificação molecular: bioisosterismo não-clássico, retroisosterismo e adição de grupos volumosos. A região central (região B) é comum a todos os análogos e originou uma série (série 1) dividida em duas subséries, a amídica e a sulfonamídica, cada uma delas compreendendo 25 análogos (*Tabelas I e II* considerando-se a combinação dos grupos alquila e cicloalquila nas cadeias laterais (região A e região C) (*Figura 9*) foram efetuadas.

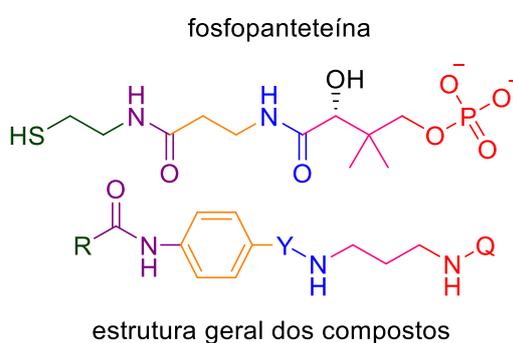


Figura 12: Semelhança estrutural entre os compostos propostos e a fosfopanteteína (substrato da enzima PPAT).

Tabela I: Ligantes pertencentes à série 1 – subsérie amídica

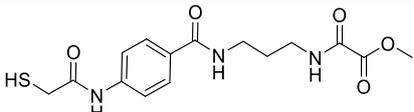
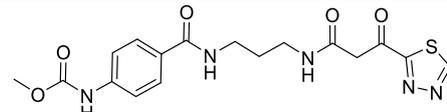
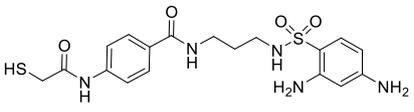
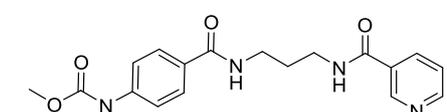
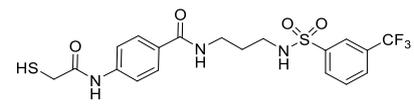
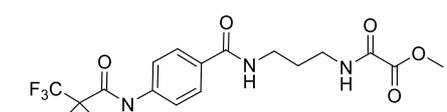
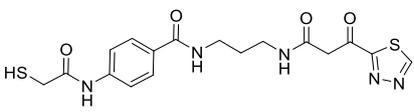
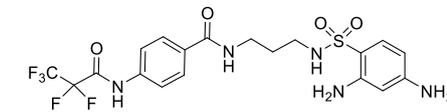
Código do ligante	Estrutura do ligante	Código do ligante	Estrutura do ligante
1		14	
2		15	
3		16	
4		17	

Tabela I: Ligantes pertencentes à série 1 – subsérie amídica (continuação)

Código do ligante	Estrutura do ligante	Código do ligante	Estrutura do ligante
5		18	
6		19	
7		20	
8		21	
9		22	
10		23	
11		24	
12		25	
13			

Tabela II: Ligantes pertencentes à série 1 – subsérie sulfonamídica

Código do ligante	Estrutura do ligante	Código do ligante	Estrutura do ligante
26		39	
27		40	
28		41	
29		42	
30		43	
31		44	
32		45	
33		46	
34		47	

Tabela II: Ligantes pertencentes à série 1 – subsérie sulfonamídica (continuação)

Código do ligante	Estrutura do ligante	Código do ligante	Estrutura do ligante
35		48	
36		49	
37		50	
38			

3.3.2 MODELAGEM MOLECULAR

3.3.2.1 Redocking

A fim de determinar o melhor método para se realizar as simulações de *docking* com os ligantes propostos neste trabalho e a *MtPPAT*, realizaram-se simulações de *redocking*. Para as simulações de *redocking*, utilizaram-se três co-cristais da *MtPPAT* extraídos do PDB: 3NBK (resolução de 1,58 Å, co-cristal com a 4'-fosfopantetecina), 3UC5 (resolução de 1,70 Å, co-cristal com o ATP) e 3RHS (resolução de 1,59 Å, co-cristal com a coenzima A). As três estruturas cristalográficas foram manipuladas no programa Swiss-PDB-Viewer [SIB], a fim de se corrigirem possíveis cadeias laterais total ou parcialmente ausentes na estrutura retirada do PDB.

Nos *redockings* realizados, testaram-se todas as funções de pontuação presentes no programa GOLD 5.2 [CCDC], variando-se o átomo que define o centro do sítio de interação, o raio do sítio de interação (10, 15 e 20 Å) e a velocidade de busca do algoritmo genético. Realizaram-se estes estudos, inicialmente, sem a presença de moléculas de água estruturais e,

posteriormente, efetuaram-se novas simulações, a fim de verificar se a presença de moléculas de água no sítio ativo poderia ser um fator determinante para a reprodução adequada das geometrias de interação observadas experimentalmente.

3.3.2.2 Validação

A fim de validar o método obtido no *redocking* realizaram-se simulações de *docking* com outros inibidores disponíveis na literatura e o cristal 1QJC (1,61 Å) referente à PPAT da *Escherichia coli* (*EcPPAT*). Escolheu-se realizar a validação com a PPAT de *E. coli*, pois não existem inibidores da PPAT de *M. tuberculosis* com atividade descrita na literatura e a *EcPPAT* apresenta 44% de identidade e 77% de similaridade com a *MtPPAT* (TIMOFEEV et al., 2010). A validação foi realizada utilizando-se duas séries, que foram escolhidas por terem sido as únicas, com atividade inibitória conhecida, que se teve acesso na literatura. A primeira série, série A, (*Tabela III*) foi planejada com base na estrutura do substrato da enzima, a 4'-fosfopanteteína (ZHAO et al., 2003), e a segunda série, série B, (*Tabela IV*) foi descoberta por meio de *High Throughput Screening (HTS)* (MILLER et al., 2010). A fim de realizar o *docking* desses ligantes, construíram-se e otimizaram-se as estruturas tridimensionais no programa Spartan'14 [Wavefunction, Inc.], por minimização de energia com o método semi-empírico PM3 (STEWART, 1989a, 1989b).

Posteriormente, realizaram-se as simulações de *docking*, separadamente para cada série. Para estas simulações, utilizaram-se as características selecionadas no *redocking*, ou seja, um raio de 10 Å a partir do centro do sítio de ligação selecionado, a função de pontuação ChemPLP (KORB, STÜTZLE, EXNER, 2009) e a velocidade lenta de busca do algoritmo genético. Modificou-se apenas o átomo selecionado como centro, pois a *EcPPAT* possui um resíduo de tirosina em substituição ao resíduo de Ser 9, observado na PPAT do *Mtb*. Dessa forma, selecionou-se o oxigênio gama do resíduo Tyr 10 como centro. No caso dos ligantes da série 2, também se realizaram as simulações de *docking* de duas formas: dando liberdade às moléculas de água presentes no sítio ativo, ou seja, deixando-as ativas, e retirando-se as moléculas de água.

Após a obtenção das pontuações dos inibidores na interação com o sítio de ligação, compararam-se os resultados dessa simulação com os resultados de atividade inibitória, concentração inibitória média (CI₅₀), experimentais a fim de validar o método empregado.

Tabela III: Série A de inibidores da PPAT da *E. coli* (ZHAO et al., 2003)

Ligante	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	CI ₅₀ (μM) <i>E. coli</i> PPAT
6	i-Pr	D-Ala	L-Fosfo-Ser	Fmoc	0,30
7	i-Pr	D-Ser	L-Glu	Fmoc	0,12
8	i-Pr	D-His	L-Glu	Fmoc	0,006
9	i-Pr	D-His	D-Carboximetil-Cis	Fmoc	0,020
10	i-Pr	D-His	D-Carboximetil-Cis	Fmoc	0,011
11	i-Pr	D-His	L-Glu		0,57
12	i-Pr	D-His	D-Carboximetil-Cis		0,14

Tabela IV: Série B de inibidores da PPAT da *E. coli* (MILLER et al., 2010)

Ligante	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	CI ₅₀ (μM) <i>E. coli</i> PPAT
6	H	H	H	H	253
7	CH ₃	H	H	H	244
8	Cl	H	H	H	17
9	F	H	H	H	103
10	Br	H	H	H	6,2
11	I	H	H	H	5,1
12	SCH ₃	H	H	H	13
13	SOCH ₃	H	H	H	166
14	SO ₂ CH ₃	H	H	H	92
15	SCH(CH ₃) ₂	H	H	H	14
16	N(CH ₃) ₂	H	H	H	49
18	Cl	H	CH ₃	H	160
19	H	CH ₃	H	H	15
20	H	CF ₃	H	H	54
21	H	NH ₂	H	H	121
22	H	Br	H	H	124
23	H	Cl	H	H	49
24	H	Cl	H	CH ₃	106

3.3.2.3 Construção tridimensional dos ligantes

Os cinquenta análogos propostos preliminarmente neste trabalho tiveram suas estruturas construídas no programa Hyperchem 7.51 [Hypercube, Inc.]. Estas foram desenhadas e otimizadas por mecânica molecular, utilizando-se o campo de força MM+ (ALLINGER, 1977). A fim de se otimizar os modelos construídos, realizou-se a minimização de energia destes utilizando o método semi-empírico PM3, no programa Spartan'14.

3.3.2.4 Docking dos ligantes preliminarmente planejados

Realizaram-se simulações de *docking* em triplicata, utilizando-se o método selecionado no *redocking*, com os 50 potenciais inibidores preliminarmente planejados neste trabalho. Foram usados o oxigênio gama do resíduo de Ser9 como centro do sítio de interação, com um raio de 10 Å; a função de pontuação ChemPLP e a velocidade lenta de busca do algoritmo genético. O cristal da *MtPPAT* extraído do PDB selecionado para a simulação de *docking* foi o 3NBK, uma vez que este foi o que apresentou os melhores resultados durante as simulações de *redocking* e, também, por ter a melhor resolução. Após terem sido realizadas as referidas simulações, selecionaram-se os dez ligantes de maior afinidade em cada simulação e, posteriormente, identificaram-se os ligantes que apareceram entre os dez melhores em ao menos duas simulações. Por fim, observou-se o modo como estes interagem no sítio de ligação e os resíduos da *MtPPAT* com os quais realizavam interações do tipo ligação de hidrogênio.

3.3.2.5 Docking do conjunto total de ligantes propostos

Após as simulações de *docking* realizadas com os 50 ligantes propostos preliminarmente neste estudo (*Tabelas I e II*), determinaram-se as características que possivelmente estariam favorecendo a afinidade dos potenciais inibidores ao sítio de ligação da *MtPPAT*. Com isso, propuseram-se novos 28 inibidores, divididos em duas séries (série 2 e série 3), neste trabalho (*Tabelas V e VI*).

Tabela V: Ligantes pertencentes à série 2

Código do ligante	Estrutura do ligante	Código do ligante	Estrutura do ligante
51		56	
52		57	
53		58	
54		59	
55		60	

Tabela VI: Ligantes pertencentes à série 3

Código do ligante	Estrutura do ligante	Código do ligante	Estrutura do ligante
61		70	
62		71	
63		72	
64		73	
65		74	
66		75	
67		76	
68		77	
69		78	

Posteriormente, realizaram-se simulações de *docking* em quintuplicata, utilizando-se o método selecionado no *redocking*, com os 78 potenciais inibidores planejados neste trabalho, com as mesmas condições descritas no item 3.3.2.4.. O referido método emprega a seleção do oxigênio gama do resíduo de Ser 9, presente no sítio de ligação, como centro; um raio de 10 Å a partir desse ponto; a função de pontuação ChemPLP e a velocidade lenta de busca do algoritmo genético. O cristal da *MtPPAT* extraído do PDB selecionado para a simulação de *docking* foi o 3NBK, já que este foi o que apresentou os melhores resultados durante as simulações de *redocking*. Após terem sido realizadas as referidas simulações, selecionaram-se os dez ligantes de maior afinidade em cada simulação, observando-se a maneira como interagiam no sítio de ligação e os resíduos da *MtPPAT* com os quais realizavam interações do tipo ligação de hidrogênio. Em seguida, os sete ligantes que apareceram entre os dez melhores em todas as cinco simulações de *docking* foram considerados os mais promissores, sendo estes selecionados para a síntese.

3.3.2.6 Entalpia de formação de complexo dos ligantes mais promissores

A fim de obter informações mais precisas sobre as interações entre os ligantes e o sítio ativo da *MtPPAT*, realizaram-se cálculos semi-empíricos no programa MOPAC2012. Calculou-se a entalpia de formação envolvida nas interações entre os sete ligantes selecionados como promissores, nas simulações de *docking*, e o sítio ativo da *MtPPAT*. Esta é calculada de acordo com a fórmula geral apresentada na *Equação 3*, na qual somam-se as energias eletrônica, de repulsão entre núcleos, energia necessária para retirar os elétrons da camada de valência e energia necessária para a atomização de todo o sistema.

$$\Delta H_f = E_{elect} + E_{nuc} - E_{isol} + E_{atom}$$

Equação 3: Fórmula geral utilizada para o cálculo de entalpia de formação, na qual, *E_{elect}* = energia eletrônica, *E_{nuc}* = energia de repulsão entre núcleos, *E_{isol}* = energia necessária para retirar os elétrons da camada de valência e *E_{atom}* = energia necessária para a atomização de todo o sistema.

Para estes cálculos isolaram-se os complexos dos sete ligantes selecionados nas simulações de *docking* com a *MtPPAT* e estes foram tratados, a fim de se manter apenas a região do sítio ativo da enzima passível de realizar interações com os ligantes e reduzir o

gasto computacional. Esta etapa foi realizada no programa Swiss-PdbViewer 4.1, utilizando-se um raio de 10 Å, a partir do ligante, para o corte dos complexos, sendo mantidos 75 resíduos de aminoácidos no sítio ativo, os quais encontram-se nomeados no item ANEXO I, e 47 moléculas de água.

Após esta etapa, isolaram-se os ligantes e sítios ativos de todos os complexos a fim de se obter a entalpia de formação dos ligantes isolados, do sítio ativo isolado e dos complexos. A partir destas informações, utilizando a fórmula observada na *Equação 4*, é possível se obter a entalpia de interação entre os ligantes e o sítio ativo da enzima.

$$\Delta H_{\text{interação}} = \Delta H_{\text{formação}}(\text{complexo}) - (\Delta H_{\text{formação}}(\text{enzima}) + \Delta H_{\text{formação}}(\text{ligante}))$$

Equação 4: Equação geral utilizada para calcular a entalpia de interação ($\Delta H_{\text{interação}}$) entre os ligantes e o sítio ativo da enzima.

Realizaram-se cálculos das entalpias de formação tanto no vácuo, quanto em meios dielétricos que simulam o interior de proteínas próximo ao solvente (constante dielétrica (ϵ) igual a 25) (LI et al., 2013) e o interior da fase aquosa ($\epsilon = 78,4$). Além disso, os cálculos foram realizados com os átomos fixos, dando-se liberdade apenas para os hidrogênios; com o ligante livre; com o ligante e as moléculas de água livres; e com o ligante, as moléculas de água e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos livres.

Os dados de entalpia foram combinados com uma previsão da principal perda entrópica associada à interação entre os ligantes e a proteína, a partir do número de ligações rotacionáveis ‘congeladas’, presentes em cada ligante. As ligações rotacionáveis ‘congeladas’ são ligações que ficaram restritas por interações com a cavidade da enzima. Segundo estudo de Wang e colaboradores (1994), por meio de dados experimentais, sugere-se multiplicar cada ligação rotacionável por 0,5 kcal/mol a fim de se ajustar a restrição citada. Dessa forma, obtém-se um termo, o qual pode ser denominado penalidade energética referente às ligações congeladas. A diferença entre o termo citado e a entalpia de interação, previamente calculada, resultará na energia aproximada de interação dos ligantes com o sítio ativo da *MtPPAT*. A energia de interação obtida é considerada aproximada por ter sido realizada uma correção entrópica ao se considerar o termo de penalidade energética referente às ligações congeladas no cálculo de energia de interação.

Todos os cálculos anteriormente citados também foram realizados para a fosfopanteteína, ligante natural da PPAT. Estes cálculos foram realizados buscando comparar

as energias de interação envolvidas nas interações dos ligantes propostos neste trabalho com a *MtPPAT* e a energia de interação envolvida na interação da fosfopanteteína com a *MtPPAT*. Esta comparação pode fornecer uma ideia sobre a possibilidade de os ligantes propostos deslocarem a fosfopanteteína do sítio ativo da enzima a fim de inibi-la.

3.3.2.7 Cálculos de Coeficiente de Partição

A fim de correlacionar os resultados de atividade microbiológica dos compostos com sua possível habilidade em permear a parede celular bacteriana, realizaram-se cálculos dos valores de Coeficiente de Partição (CLogP) para os ligantes selecionados e seus fragmentos. O ClogP foi calculado no programa Marvin Beans[®] versão 16.7.25.0 (ChemAxon Ltd., Budapeste, Hungria). Para a determinação da referida propriedade utilizaram-se métodos de Viswanadhan e colaboradores (1989), Klopman e colaboradores (1984) e a base de dados PHYSPROP (*PHYSPROP database*), todos utilizados em igualdade de pesos estatísticos para as determinações.

3.3.3 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Esta etapa do presente trabalho foi realizada em parte na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sendo, também, realizada durante estágio BEPE no The Institute for Tuberculosis Research – University of Illinois at Chicago, sob supervisão do Dr. Larry L. Klein.

Finalizados os estudos de modelagem molecular, selecionaram-se 5 ligantes a serem sintetizados, os ligantes 8, 63, 66, 67 e 68 (*Figura 13*). Após a síntese dos referidos compostos e avaliação da atividade microbiológica desses, resultados os quais serão apresentados *a posteriori*, também foram sintetizados fragmentos dos compostos citados (80 e 81) e ligantes otimizados (79, 82, 83 e 84) (*Figura 13*).

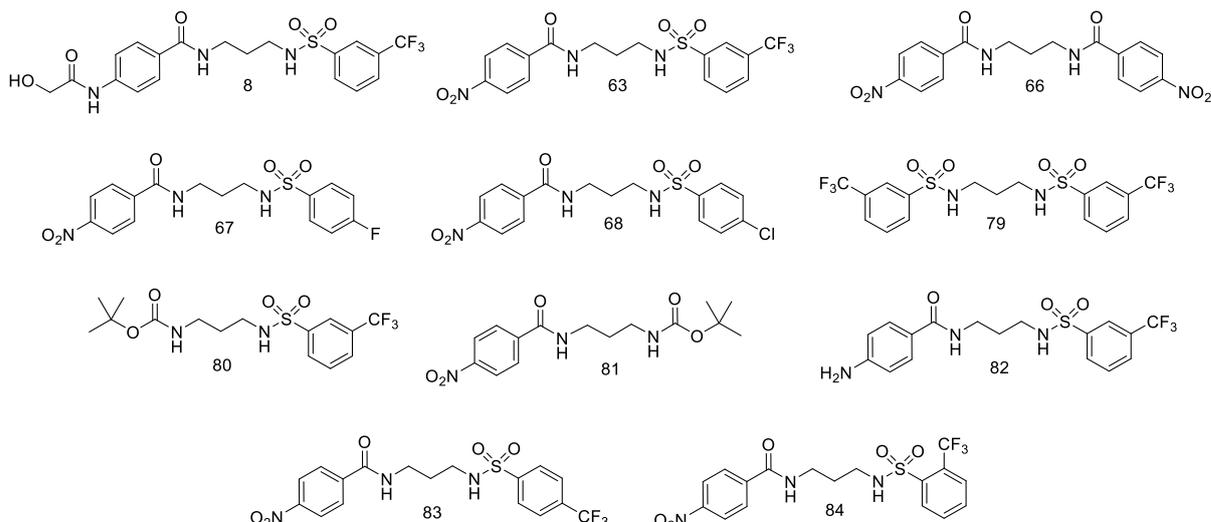


Figura 13: Estruturas dos compostos sintetizados no presente trabalho. Sintetizaram-se os ligantes 8, 63, 66, 67 e 68, selecionados após os resultados semi-empíricos, bem como seus fragmentos 80 e 81. Sintetizaram-se, também, ligantes 79, 82, 83 e 84, otimizados após avaliação dos resultados de atividade microbiológica.

3.3.3.1 Síntese

3.3.3.1.1 Síntese dos cinco ligantes selecionados previamente e dos seus respectivos fragmentos

A. Síntese dos ligantes 8, 63, 67 e 68, do fragmento 81 e do ligante otimizado 82

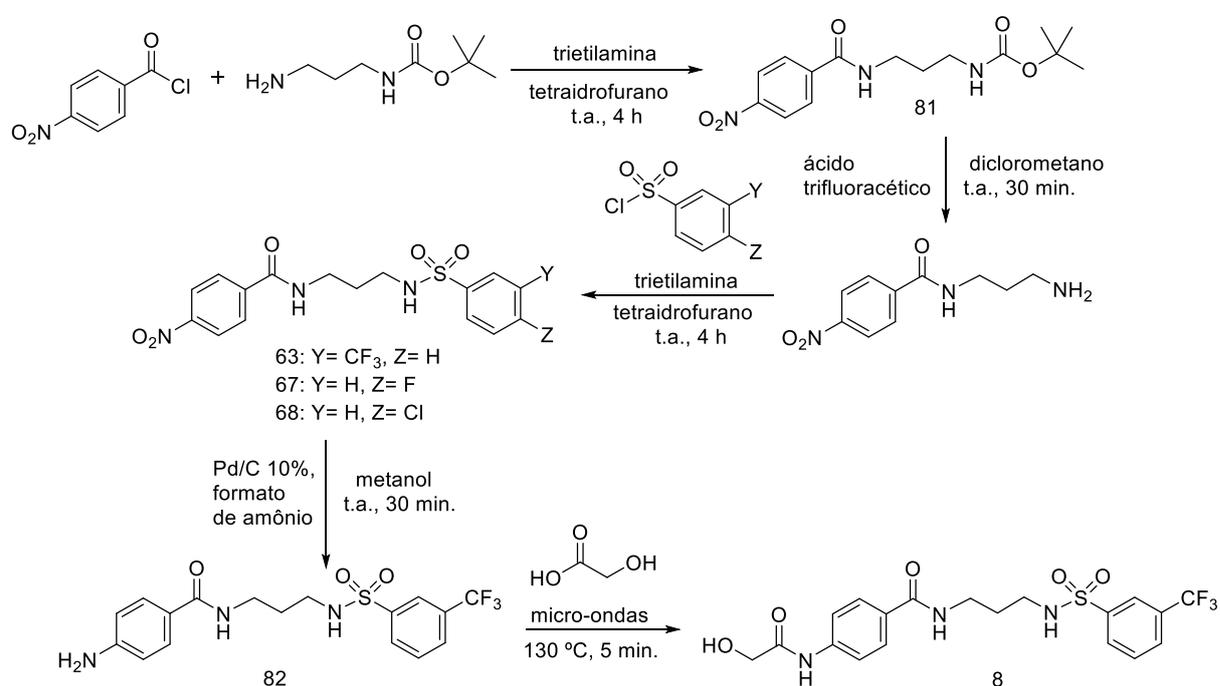
A fim de se sintetizar os compostos selecionados, primeiramente, segundo metodologia adaptada de Schotten-Baumann (SCHOTTEN, 1884; BAUMANN, 1886) (*Esquema 1*), utilizou-se o cloreto de 4-nitrobenzoíla (3 mmol) junto ao *N*-Boc-1,3-diaminopropano (3,15 mmol), ou seja, em 5% de excesso, a fim de obter o fragmento 81. Manteve-se a reação sob agitação por 4 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, removeu-se o grupo *tert*-butiloxicarbonil (Boc) (*Esquema 1*), a fim de liberar o grupo amino para a próxima etapa sintética. Realizou-se desproteção ácida, utilizando-se ácido trifluoracético e diclorometano, na proporção 1:2 (WUTS, GREENE, 2007), mantendo-se a agitação por trinta minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, utilizaram-se cloretos de sulfonila (cloreto de 3-trifluorometilbenzenossulfonila para o ligante 63; cloreto de 4-fluorobenzenossulfonil para o ligante 67 e o cloreto de 4-clorobenzenossulfonila para o ligante 68), 1 eq., trietilamina como base, e tetraidrofurano (THF) como solvente, a fim de sintetizar os ligantes 63, 67 e 68

(*Esquema 1*). A reação foi mantida sob agitação por 4 horas em temperatura ambiente. (SCHOTTEN, 1884; BAUMANN, 1886).

Posteriormente, realizou-se a redução do grupo nitro presente no ligante 63 (*Esquema 1*) (RAM, EHRENKAUFER, 1988), a fim de se obter o composto 82. Para este fim, utilizaram-se paládio/carbono 10% (0,05 eq.), formato de amônio (10 eq.) e metanol como solvente. Manteve-se a reação sob agitação por 30 minutos, em temperatura ambiente.

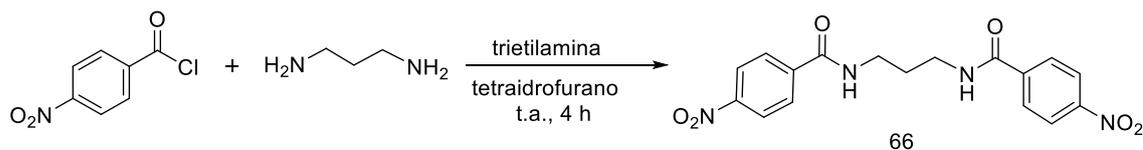
Por fim, buscando-se obter o ligante 8, realizou-se esterificação em micro-ondas na ausência de solvente (*Esquema 1*) (LOUPY, 2004), utilizando-se ácido glicólico (2 eq.), em 130 °C, por 5 minutos.



Esquema 1: Esquema geral de síntese do fragmento 81, dos ligantes 8, 63, 67 e 68 e do ligante otimizado 82.

B. Síntese do ligante 66

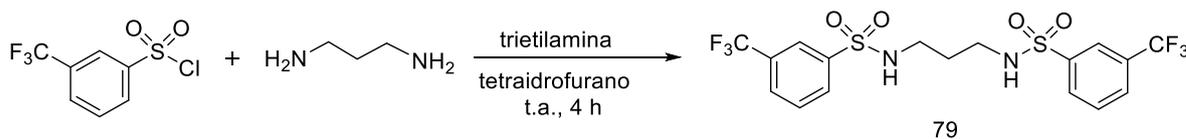
A fim de se sintetizar o ligante 66, segundo metodologia adaptada de Schotten-Baumann (SCHOTTEN, 1884; BAUMANN, 1886) (*Esquema 2*), utilizou-se o cloreto de 4-nitrobenzoíla (2 mmol) e 1,3-diaminopropano (1 mmol). Utilizou-se tetraidrofurano como solvente e trietilamina como base e a reação foi mantida sob agitação por 4 horas, em temperatura ambiente.



Esquema 2: Esquema geral de síntese do ligante 66.

C. Síntese do ligante otimizado 79

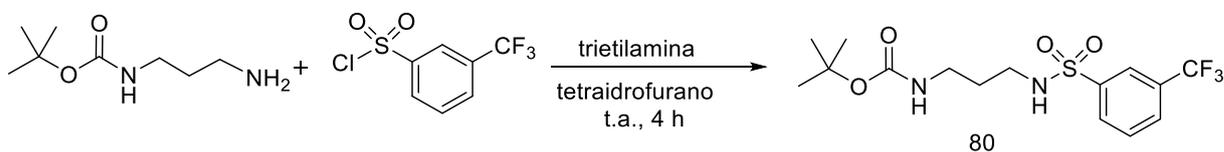
A fim de se sintetizar o ligante otimizado 79, segundo metodologia adaptada de Schotten-Baumann (SCHOTTEN, 1884; BAUMANN, 1886) (*Esquema 3*), utilizou-se o cloreto de 3-trifluorometilbenzenossulfonila (2 mmol) e 1,3-diaminopropano (1 mmol). Utilizou-se tetraidrofurano como solvente e trietilamina como base e a reação foi mantida reação sob agitação por 4 horas em temperatura ambiente.



Esquema 3: Esquema geral de síntese do ligante 79.

D. Síntese do fragmento 80

A fim de se sintetizar o fragmento 80, segundo metodologia adaptada de Schotten-Baumann (SCHOTTEN, 1884; BAUMANN, 1886) (*Esquema 4*), utilizou-se o cloreto de 3-trifluorometilbenzenossulfonila (2 mmol) e *N*-Boc-1,3-diaminopropano (1 mmol). Utilizou-se tetraidrofurano como solvente e trietilamina como base, a reação foi mantida reação sob agitação por 4 horas, em temperatura ambiente.



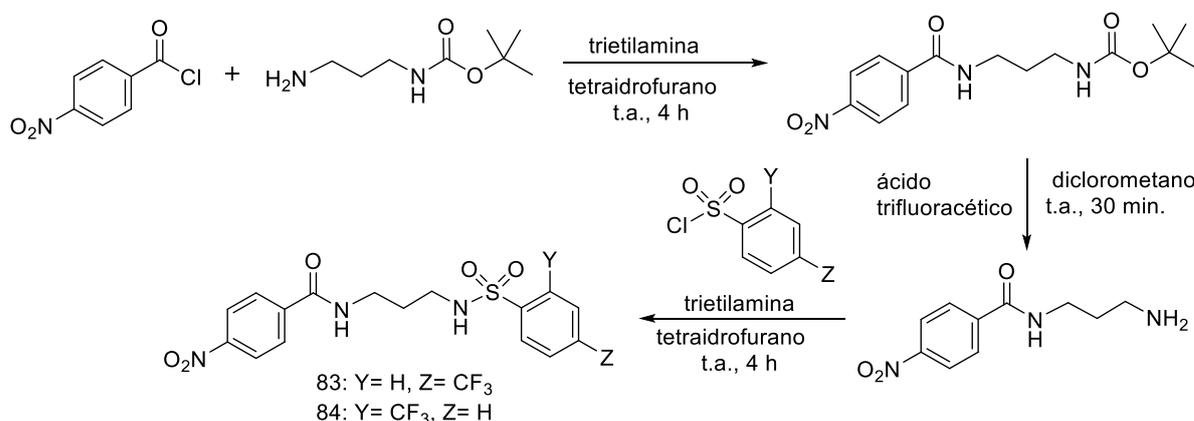
Esquema 4: Esquema geral de síntese do fragmento 80.

E. Síntese dos ligantes otimizados 83 e 84

A fim de se sintetizar os ligantes 83 e 84, os quais foram planejados após os resultados de atividade microbiológica, utilizou-se metodologia adaptada de Schotten-Baumann

(SCHOTTEN, 1884; BAUMANN, 1886) (*Esquema 5*), empregando-se o cloreto de 4-nitrobenzoíla (3 mmol) junto ao *N*-Boc-1,3-diaminopropano (3,15 mmol), ou seja, em 5% de excesso. Manteve-se a reação sob agitação por 4 horas em temperatura ambiente. Em seguida, removeu-se o grupo *tert*-butiloxicarbonil (Boc) (*Esquema 5*), a fim de liberar o grupo amino para a próxima etapa sintética. Realizou-se desproteção ácida, utilizando-se ácido trifluoracético e diclorometano, na proporção 1:2 (WUTS, GREENE, 2007), mantendo-se a agitação por trinta minutos, em temperatura ambiente.

Em seguida, utilizaram-se o cloreto de 4-trifluorometilbenzenossulfonila, para o ligante 83, e o cloreto de 2-trifluorometilbenzenossulfonila, para o ligante 84, 1 eq., trietilamina como base, e tetraidrofurano (THF) (*Esquema 5*). A reação foi mantida sob agitação por 4 horas, em temperatura ambiente. (SCHOTTEN, 1884; BAUMANN, 1886).



Esquema 5: Esquema geral de síntese dos ligantes 83 e 84.

3.3.3.2 Purificação dos compostos sintetizados

A purificação dos compostos foi realizada, primeiramente, por extrações líquido-líquido, utilizando clorofórmio, diclorometano ou acetato de etila como fase orgânica. Como fases aquosas utilizaram-se soluções de HCl 5%, solução saturada de NaHCO₃ e solução salina. Após as extrações, a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido por rotaevaporação. Em seguida, procedeu-se à purificação em coluna cromatográfica, utilizando-se o sistema de purificação Biotage Isolera Prime, equipado com leitor de luz ultravioleta (UV), utilizando colunas de sílica SNAP-10g, SNAP-25g e colunas C18, de fase reversa. Em casos nos quais a separação dos produtos por coluna foi de difícil realização, se utilizou cromatografia em camada delgada preparativa.

3.3.3.3 Análise e caracterização dos compostos sintetizados

3.3.3.3.1 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi usada para o acompanhamento da reação. A revelação das cromatofolhas de alumínio ocorreu por luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm), vanilina ou ninidrina, de acordo com as características de cada composto. Os eluentes utilizados foram, clorofórmio:metanol, diclorometano:metanol e acetato de etila:hexano em diferentes proporções.

3.3.3.3.2 Espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN ^1H e ^{13}C (todas dispostas na sessão de anexos) foram realizadas nas frequências 300 e 400 MHz, no caso das análises de RMN ^1H , e 75 e 100 MHz, no caso das RMN ^{13}C . A multiplicidade dos sinais espectrais foi descrita como: s, singlete; sl, singlete largo; d, dublete; t, tripleto; q, quarteto; quint, quinteto; m, multipeto.

3.3.3.3.3 Espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas em espectrômetro Shimadzu IT-TOF, utilizando-se as seguintes condições, coluna ACE 3AQ (50 \times 2.1 mmd), fase móvel 8 – 100% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ contendo 0,1% de ácido fórmico e fluxo de 0,5 mL/min por 4 minutos.

3.3.4 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS DE ATIVIDADE

Esta etapa do presente trabalho foi realizada durante estágio BEPE no The Institute for Tuberculosis Research – University of Illinois at Chicago, sendo supervisionada pelo Dr. Scott Gary Franzblau.

3.3.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por meio do método *Microplate Alamar Blue assay* (MABA)

Define-se como concentração inibitória mínima (CIM) a concentração de composto ativo necessária para inibir o crescimento bacteriano em 90%. Os valores de CIM dos compostos avaliados contra cepas sensíveis de *Mtb* H37Rv (ATCC 27294), foram determinados por meio do método *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA) (COLLINS, FRANZBLAU, 1997). Utilizaram-se o meio de cultura 7H12 (meio de cultura Middlebrook 7H9 contendo 1 mg/mL de casitona, 5,6 g/mL de ácido palmítico, 5 mg/mL de albumina de soro bovino e 4 g/mL de catalase), e Alamar Blue (sal de resazurina) como revelador.

Primeiramente, adicionaram-se os compostos ao meio de cultura na concentração de 200 µM, em microplacas de 96 poços, passando por 8 diluições seriadas. Dessa forma, a atividade inibitória dos compostos foi avaliada em 8 concentrações diferentes. Posteriormente, adicionou-se a suspensão celular da micobactéria, a qual foi descongelada e sonicada por 4 segundos, sendo diluída, a fim de se obter concentração entre 5×10^5 e 2×10^6 Unidades Formadoras de Colônia (CFU)/mL. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 8 dias, e, após o período de incubação, adicionou-se o revelador, mantendo-se a incubação por mais 24 horas para que fosse realizada a leitura do resultado.

O valor de CIM foi definido como a menor concentração de composto capaz de causar redução de 90% na fluorescência, quando comparada aos controles, sendo que os ensaios foram realizados em triplicatas. Como controles, utilizaram-se os fármacos padrão rifampicina (RPM), isoniazida (INH), linezolida (LIZ), moxifloxacino (MOX) e, como controle positivo, culturas não tratadas.

3.3.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) no estado de latência por meio do método *Low Oxygen Recovery Assay* (LORA)

Para a determinação dos valores de CIM, dos compostos, em estado de latência, utilizou-se o meio de cultura Middlebrook 7H12, já descrito anteriormente, e cepas de *Mtb* H37Rv recombinantes (pFCA-luxABCDE).

Primeiramente, adicionaram-se os compostos ao meio de cultura na concentração de 200 µM, em microplacas opacas de 96 poços, passando por 8 diluições seriadas. Dessa forma, a atividade inibitória dos compostos foi avaliada em 8 concentrações diferentes.

Posteriormente, adicionou-se a suspensão de micobactéria, a qual foi descongelada e sonicada por 4 segundos, sendo diluída, a fim de se obter concentração entre 5×10^5 e 2×10^6 Unidades Formadoras de Colônia (CFU)/mL. As microplacas foram mantidas em condições anaeróbicas (hipóxia - concentração de oxigênio menor do que 0,16%), utilizando-se uma jarra anaeróbica e o equipamento Anoxomat, o qual realiza dois ciclos de evacuação e preenchimento com mistura de 10% H₂, 5% CO₂ e N₂ balanceado. Utilizou-se uma faixa indicadora no interior da jarra anaeróbica, a fim de se visualizar a ausência de oxigênio durante o período de incubação. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 10 dias, sendo transferidas para um ambiente com condições de normoxia, 5% CO₂ e 95% de umidade, por 28 h. Após 28 horas de recuperação aeróbica, determinou-se a luminescência presente (CHO et al., 2007).

Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração de composto capaz de causar uma redução de 90% na luminescência, quando comparada aos controles. Como controles, utilizaram-se os fármacos padrão rifampicina (RPM), isoniazida (INH), linezolida (LIZ), metronidazol (MET) e, como controle positivo, culturas não tratadas.

3.3.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra cepas de *Mtb* H37Rv monorresistentes

Os valores de CIM contra cepas de *M. tuberculosis* monoresistentes foram determinados em cepas isogênicas H37Rv monorresistentes à rifampicina (ATCC 35838) e isoniazida (ATCC 35822), por meio do método *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA) citado anteriormente (COLLINS, FRANZBLAU, 1997). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.4.4 Espectro de atividade

A fim de verificar a seletividade para cepas de *M. tuberculosis*, dos compostos que se mostraram ativos nos métodos MABA e LORA, estes foram avaliados frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Adicionaram-se os compostos ao meio de cultura na concentração de 200 uM, em microplacas de 96 poços, passando por 8 diluições seriadas. Dessa forma, a atividade inibitória dos compostos foi avaliada em 8 concentrações diferentes. Posteriormente,

adicionaram-se as suspensões dos microorganismos referidos. Para as cepas de *E. coli* e *S. aureus* realizou-se incubação de 16 horas em meio de cultura Mueller-Hinton II (CSLI, 2007) e para *C. albicans* realizou-se incubação de 48 horas em meio Cellgro RPMI 1640 (CARBALLEIRA et al., 2006).

Os valores de CIM dos compostos foram determinados por meio de avaliação da densidade ótica a 570 nm, sendo definidos como a menor concentração de composto capaz de causar uma redução de 90% na fluorescência, quando comparada aos controles não tratados. Os fármacos padrão utilizados para os ensaios com *E. coli* e *S. aureus* foram ampicilina e gentamicina e para os ensaios com *C. albicans*, cetoconazol e ampicilina.

3.3.4.5 Determinação de citotoxicidade (CI₅₀) em células VERO

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada utilizando-se células VERO (ATCC CRL-1586). Prepararam-se duas diluições seriadas dos compostos e depois de 72 h de exposição celular, verificou-se a viabilidade por meio da proliferação celular (FALZARI et al., 2005). As células VERO foram cultivadas em 10% de soro fetal bovino e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ e, posteriormente, diluídas com tampão fosfato até atingir a concentração de 10⁶ células/mL. Utilizaram-se microplacas de 96 poços e a incubação foi mantida por 72 h a 37 °C. Ao final, removeu-se o meio e a camada celular foi lavada, sendo, em seguida, diluída com solução Promega. As placas foram incubadas por 3 h e a absorbância em 490 nm foi determinada. A CI₅₀ foi definido como a menor concentração capaz de reduzir a fluorescência em 50%, quando comparada ao controle positivo. Incluiu-se rifampicina (RMP) como controle.

3.3.5 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FOSFOPANTETEÍNA ADENILILTRANSFERASE

Esta etapa do presente trabalho foi realizada durante estágio de curta duração no The Scripps Research Institute – Flórida, sendo supervisionada pela Dr. Tina Izard.

Realizou-se a produção e purificação da *MtPPAT* a fim de se efetuarem os ensaios de inibição enzimática dos ligantes propostos nesse trabalho.

3.3.5.1 Produção e purificação da fosfopanteteína adenililtransferase de *M. tuberculosis* (MtPPAT)

3.3.5.1.1 Produção

Primeiramente, subclonou-se no vetor de expressão pET3a (Novagen) os pares de bases 483 da fase de leitura aberta (483 base pair from open reading frame (483 bp ORF)), ou seja, região da sequência de DNA utilizada na tradução. A MtPPAT foi superexpressa em cepas BL21(DE3) de *E. coli* (GEERLOF, LEWENDON, SHAW, 1999), utilizando-se seis garrafas contendo 250 mL de meio Luria Bertani (LB) adicionado de 100 uL de ampicilina, na concentração de 100 mg/mL. Mantiveram-se as garrafas em agitação por 12 horas a 37 °C e 250 rotações por minuto.

Os conteúdos das garrafas foram adicionados a 850 mL de meio LB, adicionando-se mais 1 mL de ampicilina, na concentração de 100 mg/mL, em seis frascos separados. Manteve-se a proliferação celular em 37 °C, 250 rotações por minuto até que a densidade óptica do conteúdo das garrafas fosse entre 0,6 e 0,8 em 600 nm. Induziu-se o crescimento celular com 1 mL de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) 1,5 M, mantendo-se as células por 6 horas em 37 °C e agitação de 250 rotações por minuto.

Após as 6 horas de indução, centrifugaram-se as células a 4 °C e 5.000 rotações por minuto, durante 15 minutos. Em seguida, os pellets foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL, adicionando-se fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e trisaminometano (TRIS) (pH 7,6). Adicionou-se volume de TRIS necessário para obtenção 50 mL de volume final. As células foram ressuspensas, homogeneizando-se a solução. A solução foi mantida em gelo e utilizou-se uma prensa francesa a fim de realizar a lise celular. Após a lise das células, a solução obtida foi centrifugada a 35.000 rotações por minuto por 30 minutos a 4 °C.

3.3.5.1.2 Purificação

A fim de purificar a solução obtida e isolar a MtPPAT, realizaram-se três procedimentos (GEERLOF, LEWENDON, SHAW, 1999). Inicialmente, adicionou-se o sobrenadante obtido na etapa anterior de centrifugação à coluna de troca iônica HiLoad Q-Sepharose. Utilizaram-se dois tampões como fase móvel, sendo o tampão A uma solução de

10 mM TRIS (pH 8,0) e 0,1 M EDTA (pH 7,6), e o tampão B uma solução de 10 mM TRIS (pH 8,0) e 0,1 M EDTA (pH 7,6) e 1 M cloreto de sódio (NaCl). A coluna foi equilibrada com dois volumes de água. Em seguida, utilizou-se o seguinte gradiente: 192 mL de 0-20% do tampão B, seguidos de 480 mL de 20-40% do tampão B e, por fim, 96 mL de 40-100% do tampão B. A enzima eluiu em aproximadamente 32-36% do tampão B, verificando-se sua identidade por meio de gel de poliacrilamida. As frações corretas foram isoladas e dialisadas por 12 h em tampão contendo 10 mM TRIS (pH 8,0), 10 mM MgCl₂ e 1 mM β-mercaptoetanol (β-ME).

Em seguida, realizou-se coluna Red Sepharose, uma coluna de afinidade por nucleotídeos. Esta foi equilibrada com 50 mL de água e 50 mL de tampão contendo 10 mM TRIS (pH 8,0), 10 mM MgCl₂ e 1 mM β-mercaptoetanol. A solução contendo a enzima foi adicionada à coluna, coletando-se o material obtido. Em seguida, lavou-se a coluna com o mesmo tampão utilizado para equilibrá-la, coletando-se, também, essa fração. Ambas as frações foram analisadas com relação à possível presença de enzima utilizando-se o Reagente de Bradford. Lavou-se a coluna até não se observar mais a presença de enzima nas frações coletadas. As frações contendo a enzima foram concentradas a um volume de 5 mL a fim de se realizar a próxima etapa.

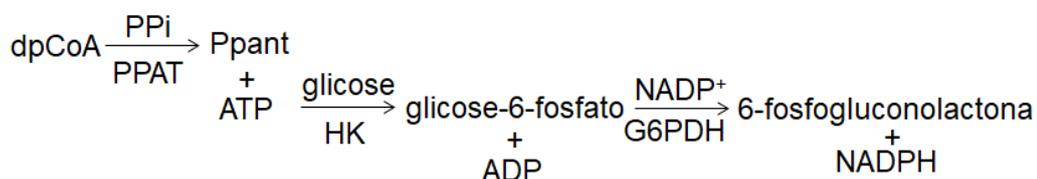
Por fim, adicionou-se o volume obtido na etapa anterior à coluna por exclusão de tamanho Superdex 200, sendo esta uma coluna de filtração em gel, a fim de passar pela última etapa de purificação. Realizou-se cromatografia em coluna isocrática, com 400 mL de tampão contendo 20 mM TRIS, 0,5 M EDTA, 200 mM NaCl e 1 mM β-ME. A enzima eluiu entre, aproximadamente, 190 a 200 mL de volume do tampão utilizado. Após realização da coluna, verificou-se a pureza da enzima obtida por meio de gel de poliacrilamida. As frações contendo a enzima pura foram dialisadas por 12 horas em tampão contendo 20 mM TRIS, 0,5 mM ditioneitol (DTT) e 150 mM NaCl. Em seguida, a solução obtida foi concentrada, congelada com nitrogênio líquido, e armazenada a -80 °C.

3.3.6 ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Esta etapa do trabalho foi iniciada no The Institute for Tuberculosis Research – University of Illinois at Chicago, sendo supervisionada pelo Dr. Scott Gary Franzblau, e finalizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.3.6.1 Ensaio de inibição enzimática dos ligantes frente à fosfopanteteína adenililtransferase de *M. tuberculosis* (MtPPAT)

Realizaram-se ensaios de inibição enzimática frente à enzima fosfopanteteína adenililtransferase de *M. tuberculosis* (MtPPAT) para todos os compostos sintetizados no trabalho. O teste de inibição realizado foi um ensaio reverso, que utiliza duas enzimas acopladas, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e hexoquinase (HK), para permitir a detecção de inibição da MtPPAT pelos ligantes (SHAW, LEWENDON, 2004). A atividade reversa da enzima PPAT (*Esquema 6*) constitui em clivagem da desfosfocoenzima A (dpCoA), dependente de pirofosfato (PPi), que produz trifosfato de adenosina (ATP) e fosfopanteteína (Ppant). Neste ensaio (*Esquema 6*), a HK utiliza ATP, produzido pela reação reversa da PPAT, e glicose a fim de gerar glicose-6- fosfato. Após este passo, a G6PDH utiliza a glicose-6-fosfato e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada (NADP⁺), para produzir 6-fosfogluconolactona e libera a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), que é detectada em um comprimento de onda de 340 nm.



Esquema 6: Etapas envolvidas no ensaio reverso de inibição enzimática da fosfopanteteína adenililtransferase (PPAT). dpCoA - desfosfocoenzima A, PPi – pirofosfato, Ppant – fosfopanteteína, HK – hexoquinase, ATP - trifosfato de adenosina, ADP - difosfato de adenosina, NADP⁺ - dinucleotídeo fosfato oxidada, G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase, dinucleotídeo fosfato reduzida - NADPH.

O volume final da reação foi de 1 mL de tampão TRIS 50 mM (pH 8,0), contendo pirofosfato tetrassódico 2 mM (PPi), ditioneitol 1 mM (DTT), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) 1 mM, cloreto de magnésio 2 mM (MgCl₂), glicose 5 mM, 4 unidades de hexoquinase e 1 unidade de glicose-6-fosfato desidrogenase. As reações foram monitoradas seguindo o aumento da absorbância a 340 nm a 25 °C. As concentrações para dpCoA e PPAT foram de 50 μM e 100 nM, respectivamente. Os compostos foram diluídos em DMSO, em uma concentração de 3% do volume total, sendo que a mesma concentração de DMSO foi empregada em ambos os controles, positivo (ausência de inibidor) e negativo

(ausência de enzima).

A determinação da concentração dos compostos que produz 50% de *inibição* da atividade enzimática (CI_{50}), quando comparada ao controle positivo (ausência de inibidor), foi realizada em triplicata. A fim de se calcular a CI_{50} , primeiramente, calculou-se a porcentagem de inibição dos compostos frente à enzima em diversas concentrações utilizando-se a porção linear da curva de atividade enzimática. Comparou-se, por meio da equação da reta, a inclinação desta na presença dos inibidores com aquela do controle positivo (ausência de inibidor), a fim de determinar a porcentagem de inibição dos compostos em cada concentração. Posteriormente, determinou-se uma nova equação da reta baseada nas porcentagens de inibição obtidas para as diferentes concentrações, o que permitiu a determinação da CI_{50} .

Resultados e discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MODELAGEM MOLECULAR

4.1.1 *REDOCKING*

Os estudos de *redocking* foram realizados, inicialmente, sem a presença de moléculas de água estruturais. Os valores de RMSD observados entre as poses da 4'-fosfopanteteína resultantes do *redocking*, na ausência das moléculas de água, e as estruturas co-cristalizadas se mostraram-se inadequados (maiores do que 2,0).

Posteriormente, ao se realizar novos estudos de *redocking* com as estruturas retiradas do PDB contendo moléculas de água estruturais, obtiveram-se alguns bons resultados. Sendo assim, observou-se que a presença de moléculas de água no sítio ativo é determinante para a boa reprodução das geometrias de interação observadas experimentalmente. Após as simulações de *redocking*, selecionou-se a metodologia que apresentou o menor RMSD entre a pose da 4'-fosfopanteteína resultante do *docking* e a estrutura do cristal retirada do PDB. O menor RMSD, 0,6816 Å, foi obtido utilizando-se a estrutura com código 3NBK, selecionando-se o oxigênio gama do resíduo Ser 9 presente no sítio de ligação como centro e um raio de 10 Å a partir desse ponto, a função de pontuação ChemPLP e velocidade lenta de busca do algoritmo genético.

4.1.2 *VALIDAÇÃO*

Após as simulações de *docking* para a série A (*Tabela III*), observaram-se as pontuações dos sete ligantes (KORB,STÜTZLE,EXNER, 2009) nas três simulações a fim de se selecionar a melhor pontuação para cada ligante, classificando-os, em seguida, em uma escala de afinidade relativa. Selecionaram-se as melhores pontuações de cada ligante (*Tabelas VII e VIII*), ou seja, a pose na qual o ligante apresentou maior afinidade entre as três simulações realizadas. Estas pontuações foram comparadas com as CI_{50} obtidas experimentalmente por Timofeev e colaboradores (2010), a fim de verificar se os valores de afinidade apresentavam correlação com os valores de atividade inibitória.

Tabela VII: Seleção das melhores pontuações para cada ligante da série A.

Ligante	Pontuação 1 ^a simulação <i>docking</i>	Pontuação 2 ^a simulação <i>docking</i>	Pontuação 3 ^a simulação <i>docking</i>	Melhor pontuação
6	58,94	56,76	59,90	59,90
7	60,21	61,38	60,65	61,38
8	58,40	64,31	67,83	67,83
9	61,88	62,59	65,33	65,33
10	67,03	64,00	59,72	67,03
11	56,04	54,61	52,61	56,04
12	63,75	62,88	65,18	65,18

Tabela VIII: Classificação dos inibidores de acordo com sua afinidade e comparação com sua atividade inibitória experimental

Ligante	Pontuação	CI ₅₀ (µM) <i>E. coli</i> PPAT (TIMOFEEV et al., 2010)
8	67,83	0,006
10	67,03	0,011
9	65,33	0,020
12	65,18	0,14
7	61,38	0,12
6	59,90	0,30
11	56,04	0,57

De acordo com a afinidade obteve-se, da maior para a menor afinidade, a seguinte classificação: 8, 10, 9, 12, 7, 6, 11 (*Tabela VIII*). Os resultados experimentais mostraram, do mais ativo para o menos ativo, a seguinte classificação: 8, 10, 9, 7, 12, 6, 11. Apenas os ligantes 7 e 12 apresentaram pontuações invertidas com relação à CI₅₀, porém seus valores são muito semelhantes, o que justificaria a inversão de pontuação. Dessa forma, os resultados do *docking* se apresentam altamente correlacionados com os resultados experimentais de atividade dos inibidores da série A. Sendo assim, é possível afirmar que o método utilizado para as simulações de *docking* deste trabalho prevê adequadamente a ordem da atividade de inibidores para o sítio de interação estudado na PPAT da *E. coli*. Considerando-se que a PPAT da *E. coli* e do *Mtb* são homólogas, é bem provável que o método empregado seja válido para a PPAT do *Mtb* utilizada neste trabalho.

Após as simulações de *docking* para a série B (*Tabela IV*), observaram-se as pontuações dos 19 ligantes (KORB,STÜTZLE,EXNER, 2009) nas três simulações a fim de selecionar a melhor pontuação para cada ligante, classificando-os, em seguida, em escala de afinidade. Selecionaram-se as melhores pontuações de cada ligante (*Tabelas IX e X*), ou seja, a pose na qual o ligante apresentou maior afinidade entre as 3 simulações realizadas. Estas pontuações foram comparadas com a CI₅₀ obtido experimentalmente por Zhao e

colaboradores (2003), a fim de verificar se os valores de afinidade correspondiam aos valores de atividade inibitória.

Tabela IX: Seleção das melhores pontuações para cada ligante da série B

Ligante	Pontuação - 1 ^a simulação <i>docking</i>	Pontuação - 2 ^a simulação <i>docking</i>	Pontuação - 3 ^a simulação <i>docking</i>	Melhor pontuação
6	28,18	30,16	29,73	30,16
7	30,39	29,63	29,75	30,39
8	28,77	29,05	30,98	30,98
9	33,14	28,14	26,82	33,14
10	28,63	28,19	29,25	29,25
11	26,52	25,20	28,82	28,82
12	30,66	30,59	31,66	31,66
13	30,97	30,50	29,44	30,97
14	28,05	28,33	27,96	28,33
15	34,51	34,17	34,69	34,69
16	30,01	29,79	30,38	30,38
17	31,71	31,93	29,81	31,93
18	32,47	31,50	32,56	32,56
19	29,74	30,98	27,87	30,98
20	31,95	28,45	32,00	32,00
21	28,54	25,84	29,54	29,54
22	29,17	28,27	28,12	29,17
23	28,66	29,18	28,22	29,18
24	31,02	31,65	32,67	32,67

Tabela X: Classificação dos inibidores de acordo com sua afinidade e comparação com sua atividade inibitória experimental

Ligante	Pontuação	CI ₅₀ (μM) <i>E. coli</i> PPAT (ZHAO et al., 2003)
15	34,69	14
9	33,14	103
24	32,67	106
18	32,56	160
20	32,00	54
17	31,93	> 150
12	31,66	13
8	30,98	17
19	30,98	15
13	30,97	166
7	30,39	244
16	30,38	49
6	30,16	253
21	29,54	121
10	29,25	6,2
23	29,18	49
22	29,17	124
11	28,82	5,1
14	28,33	92

È possível observar, por meio dos resultados obtidos, que as simulações de *docking* realizadas não reproduziram adequadamente os resultados experimentais de atividade dos inibidores da série B. Nas simulações de *docking* realizadas, tanto na presença de moléculas de água quanto na ausência, não se obtiveram resultados adequados. Porém, verificou-se que os inibidores da série B se comportam de modo diferente no sítio da enzima, não interagindo no mesmo local que a 4'-fosfopanteteína e os ligantes da série A. O que pode ser a razão de o método aplicado não ter gerado resultados de acordo com a atividade inibitória experimental. Este resultado sugere que o sítio da enzima não se encontra na conformação adequada para interagir com as estruturas desta série, que são mais rígidas do que as da série anterior. Possivelmente, as estruturas da série B induzem uma conformação no sítio bem diferente daquela encontrada na estrutura cristalográfica usada para o estudo de *docking*, 1QJC, induzida pela molécula flexível de fosfopanteteína co-cristalizada.

Dessa forma, o método utilizado foi validado e considerado adequado para ligantes que apresentam maior flexibilidade, que é o caso dos ligantes apresentados na série A e, também, é o caso das moléculas propostas no presente trabalho.

4.1.3 DOCKING DOS LIGANTES PRELIMINARMENTE PLANEJADOS

Após as simulações de *docking* para os 50 ligantes preliminarmente planejados neste trabalho, observaram-se os inibidores que apresentaram as dez melhores pontuações em cada uma das simulações da triplicata (*Tabela XI*).

Tabela XI: Ligantes com as dez melhores pontuações em cada simulação de *docking* da triplicata

1ª simulação (ligante/pontuação)	2ª simulação (ligante/pontuação)	3ª simulação (ligante/pontuação)
7/59,25	10/58,30	23/62,55
8/58,62	8/58,07	8/58,47
9/57,74	9/57,32	9/58,34
50/55,75	6/54,74	6/56,68
10/55,69	49/54,44	22/56,34
17/54,04	12/54,38	50/55,76
31/53,07	24/53,03	7/54,50
25/52,84	34/51,60	19/54,06
2/52,73	18/51,28	15/53,78
49/52,57	17/51,22	33/53,53

Observou-se que 75% dos inibidores apresentados na *Tabela XI* pertencem à série amídica. Selecionaram-se os ligantes que apareceram ao menos duas vezes nas simulações, ou seja, os ligantes 6, 7, 8, 9, 10, 17, 49, 50. Com estes ligantes realizaram-se as próximas análises.

Verificou-se que 5 inibidores (6, 7, 8, 9, 10), dos 8 selecionados (62,5%), possuem como substituinte R uma hidroxila. O inibidor 17 possui como substituinte R o grupo 4,1,1,1,2,2- pentafluorpropila, que, apesar de conter átomos de flúor, possui uma cadeia curta. Dessa forma, pode-se inferir que, possivelmente, grupos de grande volume nesta região podem ser desfavoráveis para a interação dos inibidores com o sítio. Além disso, os resultados demonstram que existe a possibilidade de ambos os átomos, flúor e oxigênio, estarem atuando como aceptores de ligação de hidrogênio, o que também poderia ser importante para a melhor interação entre os inibidores citados e o sítio ativo. Com relação ao outro substituinte das estruturas, Q, verifica-se que todos os possíveis grupos substituintes apareceram entre as melhores pontuações.

Com relação às ligações de hidrogênio observadas no programa GOLD, verificou-se que os inibidores 6, 7, 8, 9 e 10 realizam interações de hidrogênio com os resíduos Ser 9 (hidroxila da região R dos ligantes) e com e Val 73 (oxigênio carbonílico presente no grupo amida central dos ligantes). Estes resíduos também se mostram importantes na interação da fosfopanteteína e da CoA com o sítio ativo (*Figura 14*).

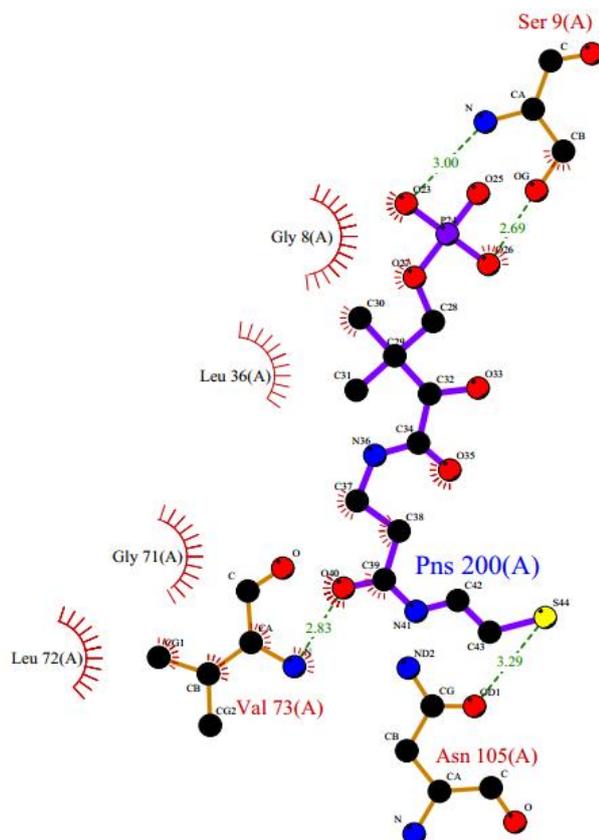


Figura 14: Mapa de interações entre a fosfopanteteína e o sítio ativo da PPAT realizado no programa LigPlot (WUBBEN, MESECAR, 2010).

Observa-se que os inibidores da série sulfonamídica não interagem com os resíduos Ser 9 e Val 73, conforme observado para os ligantes da série amídica de melhores pontuações. Estas interações mostram-se essenciais para a interação da fosfopanteteína e da CoA com o sítio ativo. Tal fato pode estar relacionado com a predominância da série amídica entre as melhores pontuações nos *dockings* realizados.

De acordo com os resultados obtidos nestas simulações de *docking*, planejaram-se novos ligantes, os quais apresentam tamanho reduzido. Esta característica foi considerada promissora nas simulações anteriormente descritas e, além disso, traria representaria facilidade sintética, uma vez que a síntese dos ligantes de tamanho reduzido envolveria menor número de etapas.

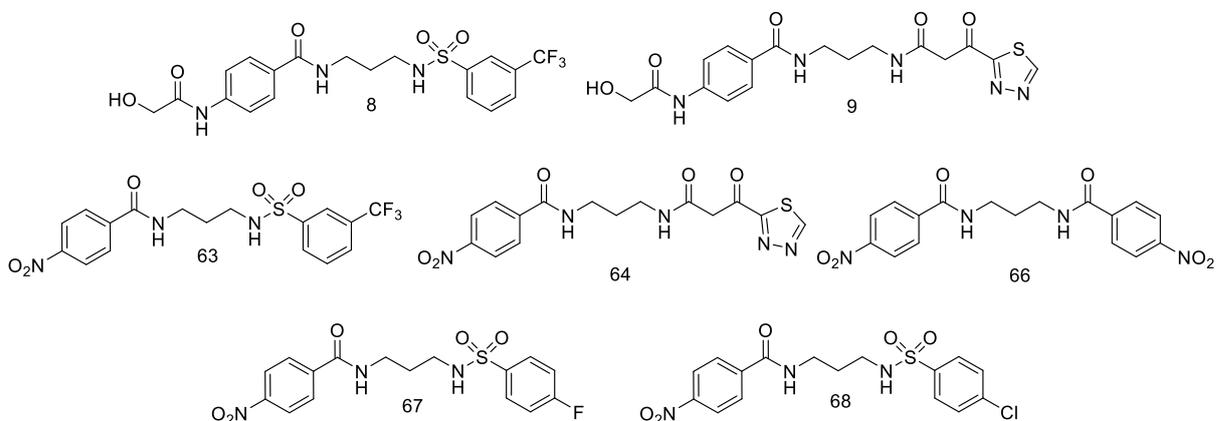
4.1.4 DOCKING DO CONJUNTO TOTAL DE LIGANTES PROPOSTOS

Após a realização das simulações de *docking* (quintuplicata) para os 78 ligantes propostos neste trabalho, selecionaram-se os dez ligantes de maior pontuação nas cinco simulações (*Tabela XII*).

Tabela XII: Ligantes com as 10 melhores pontuações em cada simulação de *docking* da quintuplicata

1ª simulação (ligante/ pontuação)	2ª simulação (ligante/ pontuação)	3ª simulação (ligante/ pontuação)	4ª simulação (ligante/ pontuação)	5ª simulação (ligante/ pontuação)
64/64,24	63/60,23	66/64,72	66/63,39	63/63,79
63/63,95	67/59,35	63/63,22	7/59,81	66/61,86
66/63,95	65/59,29	67/60,19	10/59,69	64/61,33
67/61,65	66/58,92	9/58,81	8/59,21	8/59,82
19/60,34	4/58,71	8/58,62	63/58,53	14/59,63
8/59,19	64/58,70	64/57,02	67/58,23	67/59,48
9/57,54	8/58,45	10/56,77	65/58,15	9/59,10
68/56,13	68/58,08	65/56,71	64/57,31	29/58,87
62/55,57	6/55,43	25/56,69	68/56,70	69/56,61
6/55,04	9/54,73	68/55,36	9/55,71	68/56,37

Entre os dez ligantes de maior pontuação das cinco simulações, selecionaram-se os ligantes que apareciam concomitantemente nas cinco simulações. Verificou-se que sete ligantes estavam entre os dez de maior pontuação em todas as simulações e, dessa forma, estes foram selecionados (*Figura 15*).

Figura 15: Estruturas dos ligantes selecionados por meio da simulação de *docking*.

Observaram-se as pontuações dos sete ligantes nas cinco simulações a fim de se selecionar a melhor pontuação para cada ligante, classificando-os, em seguida, em uma escala de afinidade prevista (*Tabela XIII*).

Tabela XIII: Pontuação dos ligantes de maior afinidade prevista selecionados

Ligante	Pontuação 1 ^a simulação <i>docking</i>	Pontuação 2 ^a simulação <i>docking</i>	Pontuação 3 ^a simulação <i>docking</i>	Pontuação 4 ^a simulação <i>docking</i>	Pontuação 5 ^a simulação <i>docking</i>	Melhor pontuação
8	59,19	58,45	58,62	59,21	59,82	59,82
9	57,54	54,73	58,81	55,71	59,10	59,10
63	63,95	60,23	63,22	58,53	63,79	63,95
64	64,24	58,70	57,02	57,31	61,33	64,24
66	63,95	58,92	64,72	63,39	61,86	64,72
67	61,65	59,35	60,19	58,23	59,48	61,65
68	56,13	58,08	55,36	56,70	56,37	58,08

Selecionaram-se as poses com as melhores pontuações de cada ligante, ou seja, a pose na qual o ligante apresentou melhor interação entre as cinco simulações realizadas, e verificou-se se a geometria dessas poses era similar à apresentada pela fosfopanteteína. Observou-se que todos os inibidores selecionados apresentaram geometria semelhante à da fosfopanteteína (Figura 16). A fosfopanteteína, que é o ligante natural da PPAT, possui semelhança estrutural com os ligantes planejados neste estudo e encontra-se co-cristalizada com a enzima no cristal utilizado para as simulações de *docking*.

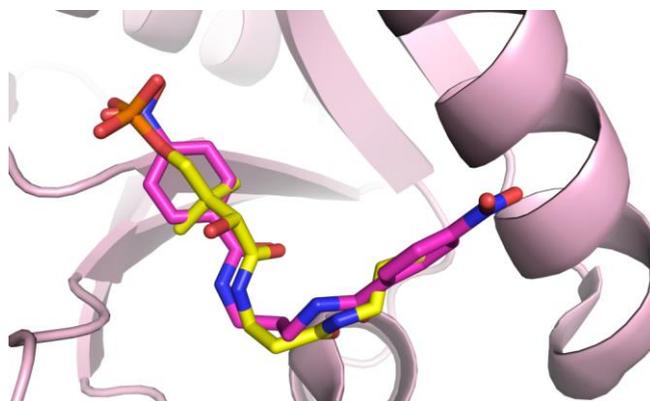


Figura 16: Semelhança entre as poses obtidas para os ligantes, por exemplo o ligante 66 (rosa), após as simulações de *docking* realizadas, e a geometria da fosfopanteteína (amarelo) co-cristalizada com a enzima utilizada neste estudo. Imagem gerada no programa PyMOL Molecular Graphics System 1.1.

Observando-se que todas as poses selecionadas possuíam geometria semelhante à geometria da fosfopanteteína na estrutura cristalográfica, classificaram-se os ligantes de acordo com a pontuação alcançada: 66, 64, 63, 67, 8, 9, 68.

Verificou-se que todas as moléculas selecionadas possuem como função central a função amida. As moléculas de maior volume planejadas não estão entre as de maior pontuação, podendo se inferir que o volume molecular pode realmente ser fator limitante para

uma interação adequada. Por outro lado, as moléculas menores (série 2), também não estão entre as de maior pontuação, o que ocorre devido ao menor número de pontos de interação disponíveis nas moléculas da série 2. Dessa forma, o tamanho da molécula também parece ser crucial para ocorram as interações necessárias, entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo, para que a afinidade seja adequada.

Com relação às interações realizadas entre os inibidores e a PPAT, observou-se que, de forma geral, estes realizam interações com resíduos de aminoácidos explorados pela fosfopanteteína, ligante natural, no sítio ativo e alguns ligantes, possivelmente, realizam interações com resíduos não explorados pela fosfopanteteína. Isto pode ser observado na Tabela XIV, Figuras 14 e 17.

Tabela XIV: Resíduos de aminoácidos com os quais os ligantes propostos possivelmente realizam interações

Ligante	Resíduos com os quais possivelmente realizam interação
8	Ser 9, Leu 36
9	Ser 9, Leu 36, Leu 72, Val 73, Tyr 97
63	Ser 9, Leu 72, Val 73
64	Ser 9, Leu 36, Tyr 97, Met 101, Asn 105
66	Ser 9, Val 73, Met 101
67	Ser 9, Leu 72, Val 73, Met 101
68	Ser 9, Leu 36
fosfopanteteína	Gly 8, Ser 9, Leu 36, Gly 71, Leu 72, Val 73, Asn 105

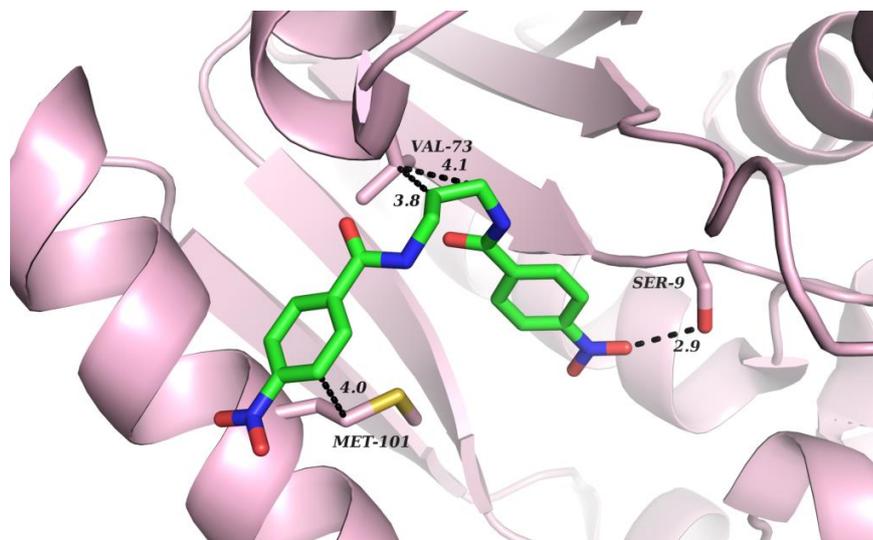


Figura 17: Possíveis interações realizadas pelo ligante 66, mais promissor segundo as simulações de *docking*, com o sítio ativo da PPAT. Imagem gerada no programa PyMOL Molecular Graphics System 1.1.

4.1.5 ENTALPIA DE INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS DOS LIGANTES MAIS PROMISSORES

Para que a formação de um complexo seja favorecida, como ocorre durante a interação de um ligante com seu alvo, a energia livre do complexo deve ser menor do que a dos ligantes e do sítio de interação livres. Dessa forma, verificar a variação da energia livre de um sistema permite a obtenção da energia associada à formação do mesmo. Informações sobre a entalpia e a entropia do sistema possibilitariam que se determine se a interação entre ligante e sítio ativo seria passível de ocorrer. Dessa forma, cálculos semi-empíricos os quais permitam o conhecimento da entalpia envolvida em uma determinada interação são de grande interesse.

Nas *Tabelas XV a XXVI* encontram-se os resultados obtidos para os cálculos de entalpia de formação realizados, nas diferentes condições utilizadas.

4.1.5.1 Cálculos de entalpia de interação no vácuo

Tabela XV: Cálculos de entalpia de formação com sistema fixo

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	-35,46	+8	-27,46
9	+4,84	+7	+11,84
63	-86,35	+6,5	-79,85
64	-90,87	+5,5	-85,37
66	-84,96	+5	-79,96
67	-63,27	+5	-58,27
68	-83,91	+5	-78,91

Tabela XVI: Cálculos de entalpia de formação com ligante livre

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	-117,76	+8	-109,76
9	-97,84	+7	-90,84
63	-111,87	+6,5	-105,37
64	-116,47	+5,5	-110,97
66	-101,86	+5	-96,86
67	-93,55	+5	-88,55
68	-107,87	+5	-102,87

Tabela XVII: Cálculos de entalpia de formação com sistema fixo com ligante livre e águas livres

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	-108,45	+8	-108,45
9	-124,28	+7	-117,28
63	-103,11	+6,5	-96,61
64	-96,06	+5,5	-90,56
66	-89,77	+5	-84,77
67	-82,18	+5	-77,18
68	-101,65	+5	-96,65

Tabela XVIII: Cálculos de entalpia de formação com ligante livre, águas livres e cadeias laterais livres

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	+32,96	+8	+40,96
9	+74,96	+7	+81,96
63	-25,60	+6,5	-19,10
64	-23,75	+5,5	-18,25
66	-27,20	+5	-22,20
67	-8,54	+5	-3,54
68	-31,77	+5	-26,77

4.1.5.2 Cálculos de entalpia de interação com constante dielétrica da água (78,4)

Tabela XIX: Cálculos de entalpia de formação com sistema fixo

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	-130,40	+8	-122,40
9	-132,73	+7	-125,73
63	-93,99	+6,5	-87,49
64	-131,71	+5,5	-126,21
66	-83,59	+5	-78,59
67	-83,54	+5	-78,54
68	-100,64	+5	-95,64

Tabela XX: Cálculos de entalpia de formação com ligante livre

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	-63,34	+8	-55,34
9	-44,08	+7	-37,08
63	-77,47	+6,5	-70,97
64	-54,95	+5,5	-49,45
66	-56,86	+5	-51,86
67	-45,70	+5	-40,70
68	-68,77	+5	-63,77

Tabela XXI: Cálculos de entalpia de formação ligante livre e águas livres

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	-70,52	+8	-62,52
9	-60,79	+7	-53,79
63	-55,62	+6,5	-49,12
64	-53,87	+5,5	-48,37
66	-51,25	+5	-46,25
67	-51,74	+5	-46,74
68	-75,91	+5	-70,91

Tabela XXII: Cálculos de entalpia de formação com ligante livre, águas livres e cadeias laterais livres

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	+28,93	+8	+36,93
9	+72,24	+7	+79,24
63	-30,19	+6,5	-23,69
64	-19,31	+5,5	-13,81
66	-43,77	+5	-38,77
67	-5,72	+5	-0,72
68	-44,22	+5	-39,22

4.1.5.3 Cálculos de entalpia de interação com constante dielétrica para cavidade da proteína próxima à fase aquosa (25)

Tabela XXIII: Cálculos de entalpia de formação com sistema fixo

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	-85,45	+8	-77,45
9	-61,14	+7	-54,14
63	-50,37	+6,5	-43,87
64	-39,74	+5,5	-34,24
66	-50,48	+5	-45,48
67	-50,67	+5	-45,67
68	-68,56	+5	-63,56

Tabela XXIV: Cálculos de entalpia de formação com ligante livre

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	-68,09	+8	-60,09
9	-49,26	+7	-42,26
63	-61,93	+6,5	-55,43
64	-57,85	+5,5	-52,35
66	-60,33	+5	-55,33
67	-44,63	+5	-39,63
68	-69,84	+5	-64,84

Tabela XXV: Cálculos de entalpia de formação com ligante livre e águas livres

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	-107,33	+8	-99,33
9	-111,33	+7	-104,33
63	-79,29	+6,5	-72,79
64	-71,42	+5,5	-65,92
66	-87,45	+5	-82,45
67	-121,27	+5	-116,27
68	-118,76	+5	-113,76

Tabela XXVI: Cálculos de entalpia de formação com ligante livre, águas livres e cadeias laterais livres

ligante	entalpia de interação (kcal/mol)	termo referente às ligações congeladas (kcal/mol)	energia aproximada de interação (kcal/mol)
8	-92,03	+8	-84,03
9	-87,62	+7	-80,62
63	-62,11	+6,5	-55,61
64	-67,21	+5,5	-61,71
66	-67,81	+5	-62,81
67	-94,60	+5	-89,60
68	-75,56	+5	-70,56

Observa-se, de maneira geral, que os ligantes apresentaram valores negativos de energia de interação, ou seja, o sistema libera energia ao ocorrer a interação, que, então, seria favorecida.

Verificou-se que os melhores resultados foram os obtidos para o vácuo, o que normalmente ocorre, devido à ausência de interações do ligante neste ambiente; sendo assim, os valores no vácuo são utilizados apenas a fim de comparação relativa entre os ligantes. Dessa forma, considerando-se os sistemas que simulam ambientes próximos à realidade, os melhores resultados foram observados ao se utilizar o EPS 25, o qual simula a constante dielétrica de sítios externalizados ao ambiente protéico, ou seja, em contato com a água. O sítio estudado se encontra no canal de solvente da fosfopanteteína adenililtransferase, estando em contato com a água. Dessa forma, esperava-se que o EPS 25 simularia bem este ambiente, o que foi corroborado pelos resultados obtidos.

Com relação à liberdade concedida ao sistema, verificou-se que os melhores resultados obtidos para o EPS 25, que foi a constante dielétrica mais adequada ao estudo, foram obtidos ao se dar liberdade para o ligante e para a água e, também, ao se dar liberdade para o ligante, a água e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Dessa forma, ao se utilizar sistemas mais próximos ao que encontramos no organismo, os resultados de entalpia para os ligantes

propostos são favorecidos, o que demonstra que estes, possivelmente, teriam uma interação favorecida com o sítio ativo da PPAT do *Mtb*.

4.1.5.4 Comparação dos resultados obtidos para os ligantes com os resultados obtidos para a fosfopanteteína

Os resultados apresentados nas *Tabelas XXVII a XXIX* buscam a comparação dos melhores resultados obtidos, que seriam os sistemas nos quais se forneceu maior grau de liberdade, com os resultados obtidos para a fosfopanteteína nos mesmos sistemas.

Tabela XXVII: Cálculos entalpia de interação no vácuo

ligante	energia aproximada de interação no vácuo com ligante e moléculas de águas livres (kcal/mol)	energia relativa no vácuo com ligante e moléculas de águas livres (kcal/mol)	energia aproximada de interação no vácuo com ligante, moléculas de água e cadeias laterais livres (kcal/mol)	energia relativa no vácuo com ligante, moléculas de água e cadeias laterais livres (kcal/mol)
8	-108,45	+17,45	+40,96	-0,01
9	-117,285	+8,62	+81,96	+40,99
63	-96,61	+29,29	-19,10	-60,07
64	-90,56	+35,34	-18,25	-59,22
66	-84,77	+41,13	-22,20	-63,17
67	-77,18	+48,72	-3,54	-44,51
68	-96,65	+29,25	-26,77	-67,74
fosfopanteteína	-125,90	-	+40,97	-

Tabela XXVIII: Cálculos entalpia de interação com constante dielétrica da água (78,4)

ligante	energia aproximada de interação com constante dielétrica da água, ligante e moléculas de águas livres (kcal/mol)	energia relativa com constante dielétrica da água, ligante e moléculas de águas livres (kcal/mol)	energia aproximada de interação com constante dielétrica da água, ligante, moléculas de água e cadeias laterais livres (kcal/mol)	energia relativa com constante dielétrica da água, ligante, moléculas de água e cadeias laterais livres (kcal/mol)
8	-62,52	+7,38	+36,93	+106,83
9	-53,79	+16,11	+79,24	+149,14
63	-49,12	+20,78	-23,69	+46,21
64	-48,37	+21,53	-13,81	+56,09
66	-46,25	+23,65	-38,77	+31,13
67	-46,74	+23,16	-0,72	+69,18
68	-70,91	-1,01	-39,22	+30,68
fosfopanteteína	-69,90	-	-69,90	-

Tabela XXIX: Cálculos entalpia de interação com constante dielétrica para cavidade da proteína próxima à fase aquosa (25)

ligante	energia aproximada de interação com constante dielétrica 25, ligante e moléculas de águas livres (kcal/mol)	energia relativa com constante dielétrica 25, ligante e moléculas de águas livres (kcal/mol)	energia aproximada de interação com constante dielétrica 25, ligante, moléculas de água e cadeias laterais livres (kcal/mol)	energia relativa com constante dielétrica 25, ligante, moléculas de água e cadeias laterais livres (kcal/mol)
8	-99,33	-24,63	-84,03	-9,33
9	-104,33	-29,63	-80,62	-5,92
63	-72,80	+1,9	-55,61	+19,09
64	-65,92	+8,78	-61,71	+12,99
66	-82,45	-7,75	-62,81	+11,89
67	-116,27	-41,57	-89,60	-14,9
68	-113,76	-39,06	-70,56	+4,14
fosfopanteteína	-74,70	-	-74,70	-

Observando os resultados das *Tabelas XXVII a XXIX*, constata-se que os ligantes, em sua maioria, apresentaram energias de interação interessantes, quando comparados à fosfopanteteína, ligante natural, no sistema que melhor simula o sítio estudado, ou seja, o sistema com EPS 25 (*Tabela XXIX*). Os valores são considerados interessantes por serem mais negativos do que o observado para a fosfopanteteína, ou seja, pode haver maior liberação de energia na interação dos ligantes com o sítio ativo do que na interação do substrato com o mesmo. Neste sentido, existe a possibilidade de a interação dos ligantes com o sítio ativo ser mais favorável energeticamente do que a interação do substrato com o sítio ativo, o que acarretaria no deslocamento da fosfopanteteína do sítio ativo e na inibição da atividade enzimática pelos ligantes propostos.

A análise detalhada dos cálculos semi-empíricos realizados previamente, permitiu a observação de que o anel tiadiazol, presente nos compostos 9 e 64, estava sendo repelido pelo resíduo Glutamina 100 do sítio ativo da PPAT. Dessa forma, a interação destes compostos com o sítio ativo da PPAT foi considerada desfavorável e, sendo assim, selecionaram-se os compostos 8, 63, 66, 67 e 68 (*Figura 14*) a fim de serem sintetizados e avaliados quanto à sua atividade biológica.

4.1.6 CÁLCULOS DE COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

A lipofilicidade pode ser expressa numericamente pelo valor calculado do coeficiente de partição *n*-octanol/água (ClogP). Dessa forma, na *Tabela XXX* podem se verificar os valores de ClogP dos compostos sintetizados. Os referidos valores foram calculados com o

intuito de se relacionar o coeficiente de partição dos ligantes e fragmentos com suas respectivas atividades.

Tabela XXX: Coeficiente de partição calculado (CLogP) dos compostos sintetizados.

Ligante	Coeficiente de partição calculado (CLogP)
8	1,04
63	2,56
66	1,74
67	1,82
68	2,28
79	3,25
80	2,44
81	1,86
82	1,79
83	2,56
84	2,56

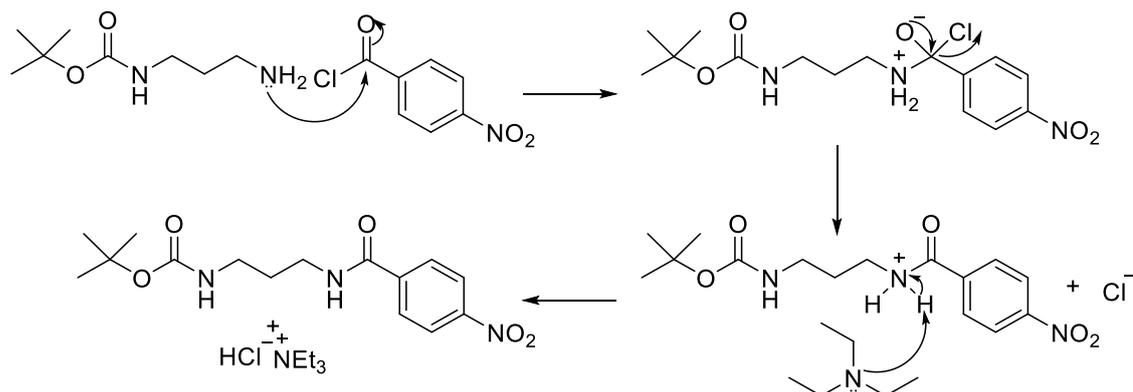
Ao verificarmos o balanço hidro-lipofílico dos compostos, pode se observar que estes apresentam um caráter lipofílico, já que todos os valores de CLogP são positivos, se encontrando entre 1,04 (para o composto 8) e 3,25 (para o composto 79).

4.2 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

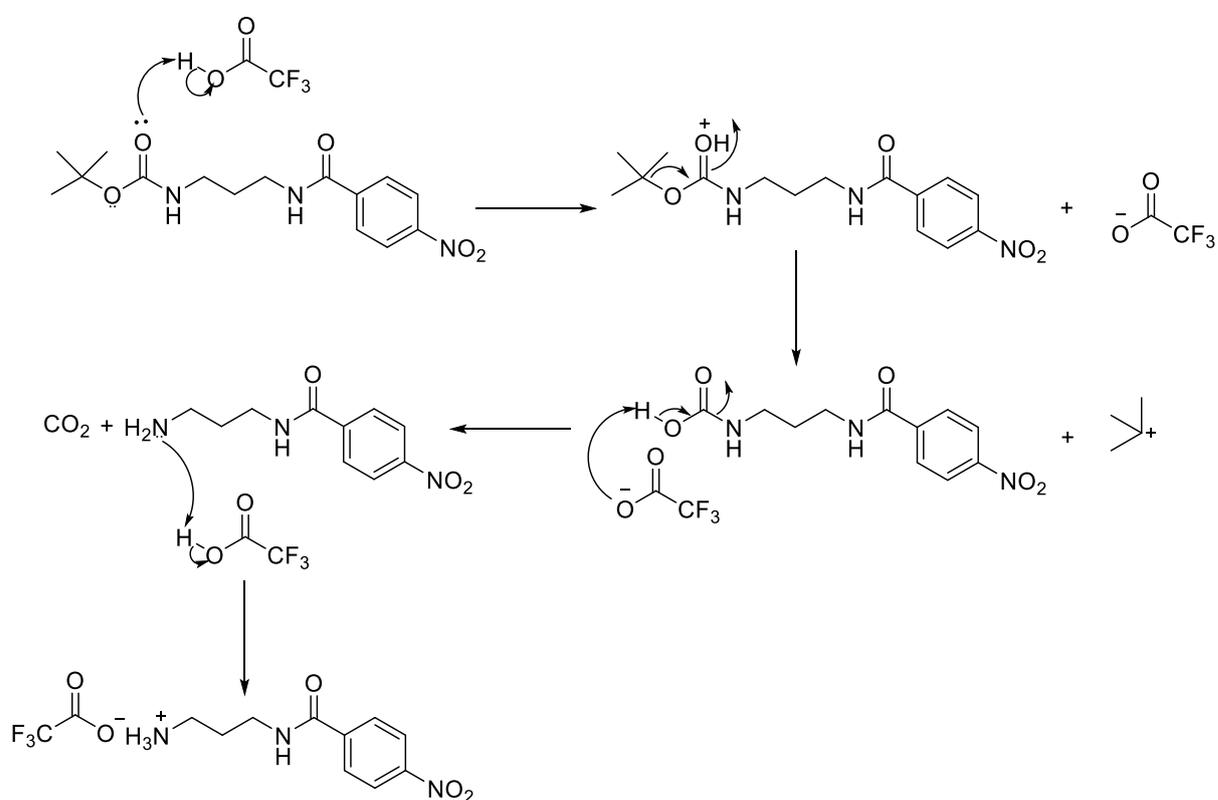
Sintetizaram-se onze compostos no presente trabalho, sendo cinco compostos selecionados de acordo com os resultados dos cálculos de modelagem molecular previamente realizados (8, 63, 66, 67, 68), dois fragmentos dos compostos previamente selecionados (80 e 81) e quatro compostos otimizados de acordo com os resultados de atividade biológica obtidos (79, 82, 83 e 84) (*Figura 13*).

4.2.1 MECANISMOS REACIONAIS

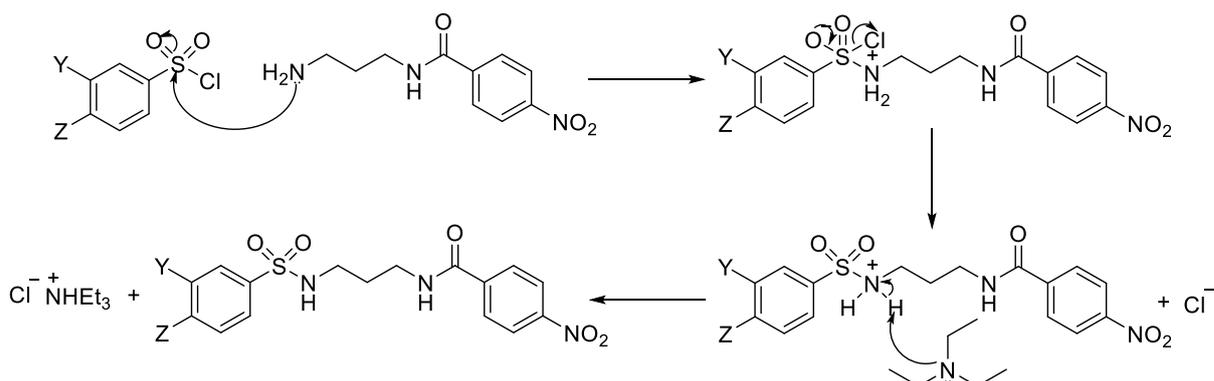
Pode se observar os mecanismos reacionais envolvidos na formação dos compostos sintetizados no presente trabalho nos *Esquemas 5 a 8*.



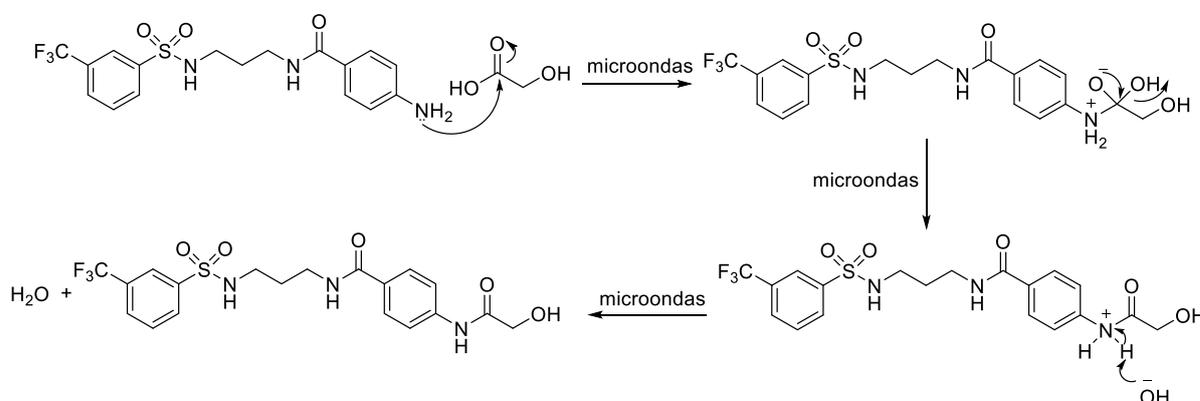
Esquema 5: Mecanismo reacional envolvido na formação do ligante 66. O mesmo mecanismo reacional se aplica à formação do fragmento 81 e de intermediários sintéticos na formação dos compostos 63, 67, 68, 82, 83 e 84.



Esquema 6: Mecanismo reacional envolvido na formação de intermediários sintéticos na formação dos compostos 63, 67, 68, 82, 83 e 84.



Esquema 7: Mecanismo reacional envolvido na formação do fragmento 80 e dos ligantes 63, 67, 68, 79, 82, 83 e 84.



Esquema 8: Mecanismo reacional envolvido na formação do ligante 8.

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS

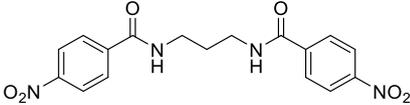
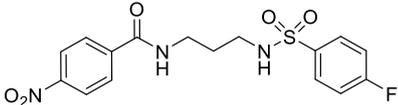
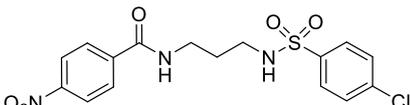
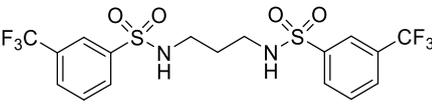
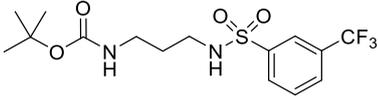
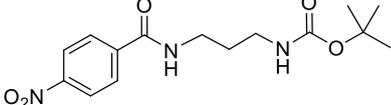
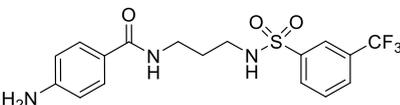
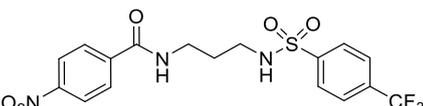
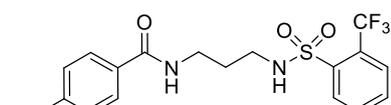
4.2.2.1 Aspectos físicos e rendimentos reacionais

A formação dos compostos sintetizados ocorreu de maneira adequada, sendo que, os dados de rendimentos reacionais e aspecto físico estão dispostos na *Tabela XXXI*.

Tabela XXXI: Rendimentos e aspecto físico dos compostos obtidos

Ligante ou fragmento	Estrutura	Aspecto físico	Rendimento (%)
8		Sólido branco	47
63		Sólido amarelo	96

Tabela XXXI: Rendimentos e aspecto físico dos compostos obtidos (continuação)

Ligante ou fragmento	Estrutura	Aspecto físico	Rendimento (%)
66		Sólido branco	92
67		Sólido amarelo claro	86
68		Sólido amarelo claro	89
79		Sólido branco	95
80		Sólido branco	86
81		Sólido branco	87
82		Sólido branco	80
83		Sólido amarelo claro	85
84		Sólido branco	90

Conforme indicado, com exceção do ligante 8, os compostos foram obtidos com rendimentos satisfatórios (47-96%).

A redução no rendimento observada para o composto 8 pode ser justificada devido ao maior número de etapas sintéticas realizadas, quando comparadas ao demais ligantes, e ao método empregado para sua purificação.

A purificação da maioria dos compostos não apresentou dificuldades. Apenas o ligante 8 e o composto controle passaram por adaptações no método de purificação, sendo que, no caso do composto controle, utilizou-se coluna de fase reversa (C18) para a purificação.

Para purificar o ligante 8, realizou-se cromatografia em camada delgada preparativa ao invés de extração líquido/líquido e coluna cromatográfica, conforme realizado para os demais ligantes propostos neste trabalho, devido à difícil solubilidade do composto em solventes orgânicos comumente utilizados para extração líquido/líquido e coluna cromatográfica. Vale mencionar que o ligante 8 é o que possui menor CLogP (*Tabela XXX*) entre os ligantes sintetizados.

4.2.2.2 Análises de RMN e espectrometria de massas

A fim de caracterizar os compostos sintetizados procedeu-se às análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C) e espectrometria de massas de alta resolução (ESI) (*Tabela XXXII*). Os espectros de massas e RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados no item ANEXOS.

Tabela XXXII: Caracterização dos compostos sintetizados

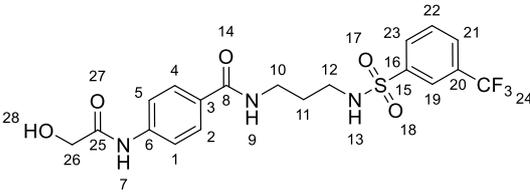
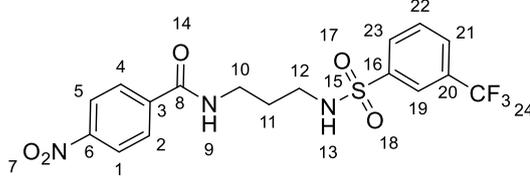
Compostos	
<p>8</p> 	<p>^1H NMR (400 MHz; DMSO-d_6) δ: 9,86 (1 H, s, 7-NH), 8,30 (1 H, t, $J = 4,8$ Hz, 9-NH), 8,10-8,03 (3 H, m, 19,21,23-ArH), 7,88-7,83 (2 H, m, 1,5-ArH), 7,78-7,72 (4 H, m, 13-NH e 2,4,22-ArH), 4,01 (1 H, s, 28-OH), 3,22 (2 H, quart, $J = 5,6$ Hz, 10-CH_2), 2,81 (2 H, quart, $J = 5,6$ Hz, 12-CH_2), 1,63 (2 H, quint, $J = 5,6$ Hz, 11-CH_2); ^{13}C NMR (100 MHz; DMSO-d_6) δ: 171,74 (C25), 166,22 (C8), 142,10 (C6), 141,49 (C16), 131,38 (C20), 131,05 (C23), 130,52 (C3), 130,19 (C22), 129,61 (C21), 128,51 (C24), 128,30 (C1,5), 123,45 (C19), 119,14 (C2,4), 62,40 (C26), 41,06 (C10), 37,12 (C12), 29,84 (C11); ESI calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 460,1149; encontrado: 460,1201.</p>
<p>63</p> 	<p>^1H NMR (300 MHz; CD_3OD) δ: 8,28 (2 H, d, $J = 8,70$ Hz, 1,5-ArH), 8,11 (2 H, d, $J = 6,45$ Hz, 2,4-ArH), 7,97 (2 H, d, $J = 8,01$ Hz, 19,21-ArH), 7,92 (1 H, d, $J = 8,01$ Hz, 23-ArH), 7,77 (1 H, t, $J = 8,4$ Hz, 22-ArH), 3,44 (2 H, t, $J = 6,0$ Hz, 10-CH_2), 2,99 (2 H, t, $J = 6,0$ Hz, 12-CH_2), 1,82 (2 H, quint, $J = 6,0$ Hz, 11-CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz; CD_3OD) δ: 168,25 (C8), 151,04 (C6), 143,30 (C3), 141,33 (C16), 132,81 (C20), 132,37 (C23), 131,56 (C22), 130,24 (C21), 129,63 (C2,4), 126,70 (C24), 124,62 (C1,5), 123,09 (19), 41,76 (C10), 38,48 (C12), 30,51 (C11); ESI calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 432,0836; encontrado 432,0841.</p>

Tabela XXXII: Caracterização dos compostos sintetizados (continuação)

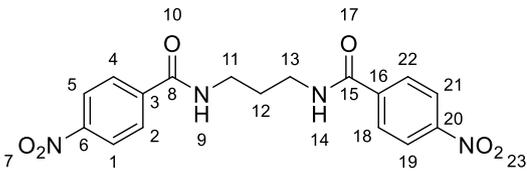
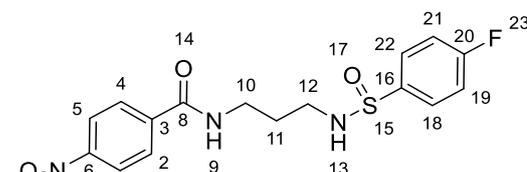
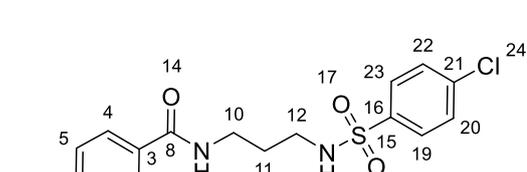
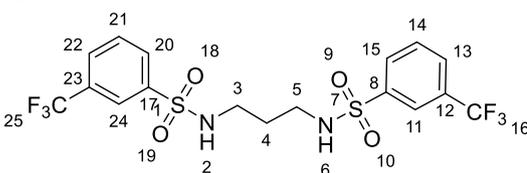
Compostos	
<p>66</p> 	<p>$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; DMSO-d_6) δ: 8,82 (2 H, t, $J = 6,0$ Hz, 9,14-NH), 8,31 (4 H, d, $J = 9,0$ Hz, 1,5,19,21-ArH), 8,07 (4 H, d, $J = 9,0$ Hz, 2,4,18,22-ArH), 3,38 (4 H, quart, $J = 6,0$ Hz, 11,13-CH_2), 1,85 (2 H, quint, $J = 6,0$ Hz, 12-CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz; DMSO-d_6) δ: 164,58 (C8,15), 148,93 (C6,20), 140,19 (C3,16), 128,60 (C2,4,18,22), 123,45 (C1,5,19,21), 37,36 (C11, 13), 28,76 (C12); ESI calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6$: $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 373,1143; encontrado: 373,1126.</p>
<p>67</p> 	<p>$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; CD_3OD) δ: 8,52 (2 H, d, $J = 9,0$ Hz, 1,5-ArH), 8,20 (2 H, d, $J = 9,0$ Hz, 2,4-ArH), 8,11 (2 H, quart, $J = 9,0$ Hz, 18,22-ArH), 7,50 (2 H, t, $J = 9,0$ Hz, 19,21-ArH), 3,65 (2 H, t, $J = 6,0$ Hz, 10-CH_2), 3,17 (2 H, t, $J = 6,0$ Hz, 12-CH_2), 2,01 (2 H, quint, $J = 6,0$ Hz, 11-CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz; CD_3OD) δ: 168,25 (C8), 151,08 (C20), 141,36 (C6), 138,05 (C3), 130,87 (C16), 129,63 (C2,4), 124,62 (C18,22), 117,37 (C1,5), 117,07 (C19,21), 41,68 (C12), 38,48 (C10) 30,41 (C11); ESI calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_5\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 382,0867; encontrado: 382,0860.</p>
<p>68</p> 	<p>$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ: 8,31 (2 H, d, $J = 9,0$ Hz, 1,5-ArH), 8,21 (1 H, <i>sl</i>, 9-NH), 8,10 (2 H, d, $J = 12$ Hz, 19,23-ArH), 7,88 (2 H, quart, $J = 12,0$ Hz, 20,22-ArH), 7,61 (2 H, d, $J = 9,0$ Hz, 2,4-ArH), 6,80 (1 H, <i>sl</i>, 13-NH), 3,50 (2 H, quart, $J = 6,0$ Hz, 10-CH_2), 1,83 (2 H, quint, $J = 6,0$ Hz, 11-CH_2), 0,89 (2 H, <i>sa</i>, 12-CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ: 165,34 (C8), 149,56 (C6), 140,34 (16), 139,74 (C3), 137,88 (C21), 129,21 (C2,4), 128,69 (C20,22), 128,51 (C19,23), 123,42 (C1,5), 40,48 (C10,12), 36,88 (C11); ESI calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 398,0572; encontrado: 398,0569.</p>
<p>79</p> 	<p>$^1\text{H NMR}$ (400 MHz; CDCl_3) δ: 8,04-8,08 (6 H, m, 2,6-NH e 11,14,21,24-ArH), 7,85 (4 H, dd, $J = 8,4; 5,7$ Hz, 13,15,20,22-ArH), 2,77 (4 H, quart, $J = 6,9$ Hz, 3,5-CH_2), 1,85 (2 H, quint, $J = 6,9$ Hz, 4-CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz; DMSO-d_6) δ: 142,08 (C8,17), 131,36 (C12,23), 131,00 (C15,20), 130,53 (C14,21), 130,21 (C13,22), 129,66 (C16,25) 123,41 (C11,24) 40,50 (C3,5), 29,86 (C4); ESI calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 491,0528; encontrado: 491,0531.</p>

Tabela XXXII: Caracterização dos compostos sintetizados (continuação)

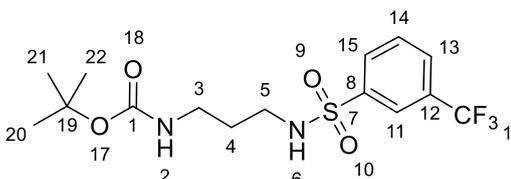
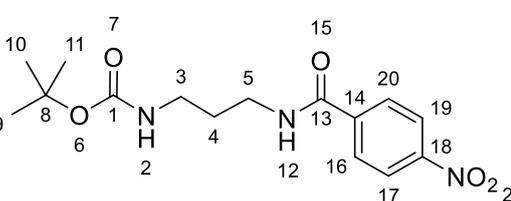
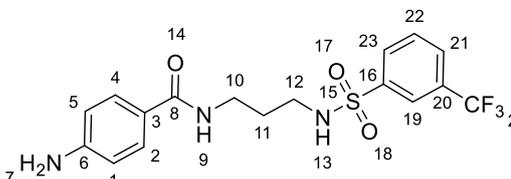
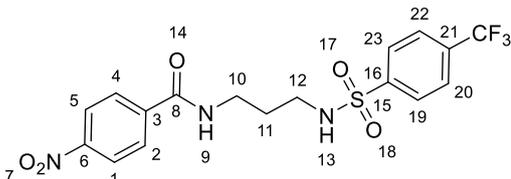
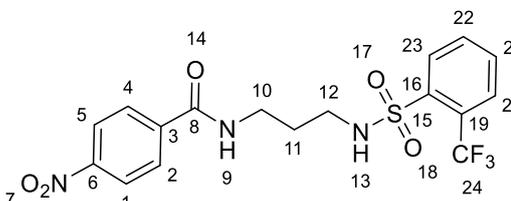
Compostos	
<p>80</p> 	<p>$^1\text{H NMR}$ (400 MHz; CDCl_3) δ: 8,08-8,16 (2 H, m, 11,13-ArH), 7,83 (1 H, da,15-ArH), 2,77 (1 H, da, 14-Ar), 6,01 (1 H, s, 6-NH), 4,67 (1 H, s, 2-NH), 3,23 (2 H, ta, 5-CH_2), 3,04 (2 H, ta, 3-CH_2), 1,61-1,67 (3 H, m, 4-CH_2), 1,39 (9 H, s, 20,21,22-CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz; CDCl_3) δ: 156,15 (C1), 142,08 (C12), 131,36 (C8), 131,00 (C15), 130,53 (C14), 130,21 (C13), 129,66 (C16), 123,41 (C11), 77,97 (C19), 38,17 (C5), 37,72 (C3), 29,85 (C4), 28,72 (C20,21,22); ESI calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$: $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 347,1577; encontrado: 347,1578.</p>
<p>81</p> 	<p>$^1\text{H NMR}$ (400 MHz; CDCl_3) δ: 8,75 (1 H, t, $J = 5,1$; 12-NH), 8,31 (2 H, d, $J = 8,7$; 17,19-ArH), 8,5 (2 H, d, $J = 8,7$ Hz, 16,20-Ar), 6,79 (1 H, sl, 2-NH), 3,29 (2 H, quarta, 5-CH_2), 2,99 (2 H, quarta, 3-CH_2), 1,66 (2 H, quint, $J = 6,9$; 4-CH_2), 1,38 (9 H, s, 9,10,11-CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz; DMSO-d_6) δ: 164,98 (C13), 156,15 (C1), 149,41 (C18), 140,57 (C14), 129,11 (C16,20), 123,98 (C17,19), 77,97 (C8), 38,17 (C5), 37,72 (C3), 29,85 (C4), 28,72 (C9,10,11); ESI calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5$: $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 324,1554; encontrado: 324,1559.</p>
<p>82</p> 	<p>$^1\text{H NMR}$ (400 MHz; DMSO-d_6) δ: 8,03-8,10 (3 H, m, 9-NH e 19,21-ArH), 7,94 (1 H, ta, 13-NH), 7,86-7,83 (2 H, m, 22,23-ArH), 7,50 (2 H, d, $J = 8,0$; 2,4-ArH), 6,51 (2 H, d, $J = 8,0$; 5,1-ArH), 5,57 (2 H, s, 7-NH_2), 3,17 (2 H, quarta, 10-CH_2), 2,79 (2 H, quarta, 12-CH_2), 1,60 (2 H, quinta, 11-CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz; DMSO-d_6) δ: 177,82 (C8), 166,80 (C6), 152,01 (C16), 142,11 (C20,23), 131,36 (C22), 131,05 (C21), 129,66 (C3), 129,08 (C2,4), 123,41 (C24), 121,60 (C19), 112,95 (C1,5), 41,10 (C10), 36,88 (C12), 30,04 (C11); ESI calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 402,1094; encontrado: 402,1090.</p>
<p>83</p> 	<p>$^1\text{H NMR}$ (400 MHz; DMSO-d_6) δ: 8,75 (1 H, t, $J = 6,5$; 9-NH), 8,31 (2 H, d, $J = 9,2$; 1,5-ArH), 8,03-7,96 (6 H, m, 2,4,19,20,22,23-ArH), 7,92 (1 H, t, $J = 6,5$; 13-NH), 3,27 (2 H, quart, $J = 6,8$; 10-CH_2), 2,85 (2 H, quart, $J = 6,8$; 12-CH_2), 1,68 (2 H, quint, $J = 6,8$; 11-CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz; DMSO-d_6) δ: 165,05 (C8), 149,42 (C6), 144,79 (C16), 140,53 (C3), 129,10 (C2,4), 127,93 (C19,23), 126,98 (C20,22), 126,95 (C21), 124,09 (C1,5), 123,97 (C24), 40,99 (C10), 37,44 (C12), 29,53 (C11); ESI calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 432,0836; encontrado: 432,0840.</p>

Tabela XXXII: Caracterização dos compostos sintetizados (continuação)

Compostos	¹ H NMR (400 MHz; DMSO-d ₆) δ: 8,77 (1 H, t, <i>J</i> = 6,4; 9-NH), 8,31 (2 H, d, <i>J</i> = 8,8; 1,5-ArH), 8,08-7,97 (5 H, m, 13-NH e 2,4,20,23-ArH), 7,90-7,81 (2 H, m, 21,22-ArH), 3,27 (2 H, quart, <i>J</i> = 6,8; 10-CH ₂), 2,96 (2 H, quart, <i>J</i> = 6,8; 12-CH ₂), 1,72 (2 H, quint, <i>J</i> = 6,8; 11-CH ₂); ¹³ C NMR (100 MHz; DMSO-d ₆) δ: 165,08 (C8), 149,44 (C6), 142,46 (C3), 140,56 (C16), 139,96 (C21), 133,80 (C23), 133,28 (C19), 130,38 (C22), 129,12 (C2,4), 128,95 (C20), 123,99 (C1,5), 123,51 (C24), 41,18 (C10), 37,44 (C12), 29,82 (C11); ESI calculado para C ₁₇ H ₁₇ F ₃ N ₃ O ₅ S: [M+H] ⁺ , <i>m/z</i> 432,0836; encontrado: 432,0839.
84 	

Nota: *s* = singlete, *sl* = singlete largo, *d* = dublete, *da* = dublete aparente, *dd* = duplo dublete, *t* = triplesse, *ta* = triplesse aparente, *quart* = quarteto, *quarta* = quarteto aparente, *quint* = quinteto, *quinta* = quinteto aparente, *m* = multiplete

4.3 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS DE ATIVIDADE

4.3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) POR MEIO DO MÉTODO *MICROPLATE ALAMAR BLUE ASSAY* (MABA) E NO ESTADO DE LATÊNCIA POR MEIO DO MÉTODO *LOW OXYGEN RECOVERY ASSAY* (LORA)

Os resultados de CIM obtidos por meio dos métodos MABA e LORA, para os compostos sintetizados neste trabalho, podem ser observados na *Tabela XXXIII*. Com os resultados obtidos para o método MABA é possível verificar a atividade inibitória dos compostos frente às cepas H37Rv de *M. tuberculosis*, cepas essas sensíveis aos quimioterápicos disponíveis para o tratamento da tuberculose. No caso dos resultados obtidos para o método LORA, observa-se a atividade dos compostos, também, frente às cepas sensíveis de *M. tuberculosis*, porém, nesse caso, as cepas se encontram em estado de latência, ou seja, não replicantes.

Tabela XXXIII: Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra *M. tuberculosis* por meio dos métodos *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA) e *Low Oxygen Recovery Assay* (LORA)

Compostos	CIM MABA (μM)	CIM LORA (μM)
8	> 600	> 200
63	56	> 200
66	> 600	> 200
67	383	> 200
68	> 600	> 200
79	540	> 200
80	284	> 200
81	> 600	> 200
82	302	> 200
83	44	> 200
84	108	> 200
Rifampicina	0,04	0,10
Isoniazida	0,41	298,39
Linezolida	1,07	7,05
Metronidazol	-	285,69
Moxifloxacino	0,20	-

Verifica-se que sete compostos apresentaram atividade na casa de micromolar contra as cepas sensíveis de *M. tuberculosis* no método MABA, estando essas atividades compreendidas entre 44 e 540 micromolar. Vale ressaltar que, primeiramente, foram avaliadas as atividades dos compostos 8, 63, 66, 67, 68, 79, 80, 81 e 82. Após esta primeira etapa de ensaios de atividade frente às cepas de *Mtb*, identificou-se o composto 63 como mais ativo, apresentando CIM de 56 μM . Sendo assim, buscando otimizar a atividade do referido composto, realizou-se a estratégia de modificação da posição de grupos substituintes (PATRICK, 2013), deslocando-se o grupo trifluormetil presente na posição *meta* no ligante 63 para as posições *para* e *orto* nos ligantes 83 e 84, respectivamente. Após a síntese dos dois novos compostos planejados, avaliaram-se a atividade de ambos, verificando-se ambos os compostos se mostraram ativos e que o composto 83 apresentou CIM de 44 μM . Sendo assim, foi possível otimizar a atividade do composto 63 frente às cepas sensíveis de *Mtb*, já que se obteve uma atividade aprimorada para o composto 83. Em seguida, avaliou-se a atividade dos novos compostos.

O presente trabalho, além de buscar a atividade contra as cepas de *M. tuberculosis*, o planejamento utilizado enfoca o desenvolvimento dos primeiros inibidores da enzima *MtPPAT*. Dessa forma, os resultados observados foram considerados promissores, já que ao se identificar os primeiros inibidores do alvo citado, esses poderiam ser otimizados a fim de se aprimorar a atividade, tanto frente à enzima quanto frente às cepas de *M. tuberculosis*.

Ao se correlacionar os resultados de atividade, do ensaio realizado com o método MABA, com os resultados de cálculo de coeficiente de partição (CLogP) obtidos (*Tabela XXX*), observa-se que, de forma geral, os compostos que apresentaram maior atividade possuem CLogP por volta de 2. Tal observação está de acordo com a exigência da parede de *M. tuberculosis*, que é de natureza lipofílica. Sabe-se, também, que compostos os quais apresentam valores de LogP acima de 3 podem ficar retidos na parede celular do *M. tuberculosis*. Dessa forma, poderia se esperar que o ligante 79 não apresentaria uma atividade promissora, já que apresentou CLogP de 3,25.

4.3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) CONTRA CEPAS DE *M. tuberculosis* H37Rv MONORRESISTENTES

Os ensaios de atividade contra cepas isogênicas monorresistentes H37Rv de *M. tuberculosis* foram realizados para os compostos que apresentaram atividade inibitória frente às cepas sensíveis de *M. tuberculosis* para. Alguns dos compostos mostraram-se ativos contra ambas as cepas avaliadas, cepas ATCC monorresistentes à rifampicina e à isoniazida (*Tabela XXXIV*), estando essas atividades entre 49 e 196 μM . Sendo que, os compostos 63 e 83, os mais ativos frente às cepas sensíveis, continuaram sendo os compostos mais ativos frente às cepas monorresistentes. Vale ressaltar, que este resultado é de grande interesse, já que o presente trabalho, também, busca vencer a questão da resistência do *M. tuberculosis* frente aos quimioterápicos disponíveis atualmente para o tratamento da tuberculose.

Tabela XXXIV: Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra cepas de *M. tuberculosis* H37Rv monorresistentes

Compostos	CIM - cepas monorresistentes à rifampicina (μM)	CIM - cepas monorresistentes à isoniazida (μM)
63	96	93
67	188	99
79	> 200	> 200
80	196	182
82	> 200	> 200
83	> 200	49
84	99	98
Rifampicina	> 1	0,01
Isoniazida	0,35	> 5
Linezolida	0,45	0,94
Moxifloxacino	0,12	0,23

4.3.3 ESPECTRO DE ATIVIDADE

Realizaram-se os referidos ensaios de inibição em cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* a fim de se observar o espectro de ação dos compostos frente à bactérias gram-negativas (*E. coli*), gram-positivas (*S. aureus*) e fungos (*C. albicans*), buscando caracterizar o perfil de atividade em relação a diferentes microorganismos.

Os antimicrobianos estão associados a determinado espectro de atividade, que identifica o número de diferentes espécies de microorganismos que são sensíveis ao composto. Os antimicrobianos de amplo espectro são aqueles ativos contra muitas espécies de microorganismos, enquanto de baixo espectro são ativos em poucas espécies. Uma vez que os compostos sintetizados neste estudo não mostraram atividade contra os três microorganismos testados, os resultados indicam que os compostos apresentam baixo espectro de ação.

4.3.4 DETERMINAÇÃO DE CITOTOXICIDADE (CI₅₀) EM CÉLULAS VERO

Realizaram-se ensaios de citotoxicidade em células VERO a fim de se verificar o potencial citotóxico dos compostos que apresentaram atividade inibitória frente às cepas de *M. tuberculosis*. Os resultados de CI₅₀ em células VERO, sadias, podem ser observados na Tabela XXXV. Verifica-se que, de forma geral, os compostos não apresentaram citotoxicidade maior que rifampicina.

Tabela XXXV: Resultados de citotoxicidade (CI₅₀) em células VERO dos compostos que se mostraram ativos nas cepas de *M. tuberculosis*

Compostos	CI ₅₀ VERO (µM)
63	84,6
67	197,3
79	> 200
80	> 200
82	> 200
83	> 200
84	130,0
Rifampicina	101,5

4.4 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FOSFOPANTETEÍNA ADENILILTRANSFERASE (PPAT)

A obtenção da enzima *Mt*PPAT é de grande importância para o presente trabalho, pois o planejamento dos compostos baseou-se nesse alvo, qual mostrou-se novo e promissor para o tratamento da TB. Dessa forma, a obtenção de inibidores da *Mt*PPAT é de grande relevância.

A enzima *Mt*PPAT foi produzida e purificada de acordo com os métodos reportados, não sendo observadas dificuldades na aplicação dos métodos referidos. A purificação da *Mt*PPAT demanda grande número de etapas, já que esta é uma enzima nativa, ou seja, não possui, por exemplo, calda de histidina. Dessa forma, a purificação da enzima se torna muito mais complexa, sendo necessário utilizar diversas colunas a fim de obtê-la com pureza adequada.

É possível verificar no gel de poliacrilamida realizado que, após o último passo de purificação, as enzimas isoladas encontram-se puras (*Figura 18*). Além disso, as massas moleculares das enzimas isoladas estão de acordo com o esperado, uma vez que a massa da *Mt*PPAT é de 19.304 Da.



Figura 18: Gel de poliacrilamida realizado após a purificação da enzima *Mt*PPAT. kDa – kilodalton.

4.5 ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Realizaram-se ensaios de inibição enzimática frente à enzima fosfopanteteína adenililtransferase de *M. tuberculosis* (*Mt*PPAT) para todos os compostos sintetizados no trabalho. As concentrações de desfosfoenzima A (dpCoA) (50 μ M) e *Mt*PPAT (100 nM) proporcionaram bom perfil de atividade no controle positivo. Tal perfil confirma, também, que a enzima desejada foi obtida.

Conforme foi citado anteriormente, a fim de se calcular a CI_{50} dos compostos frente à enzima *MtPPAT*, calculou-se a porcentagem de inibição dos compostos frente à enzima utilizando-se a inclinação da porção linear da curva de atividade enzimática na presença dos compostos, observada na equação da reta, com aquela do controle positivo (ausência de inibidor). Em seguida, determinou-se uma nova equação da reta baseada nas porcentagens de inibição obtidas para as diferentes concentrações, o que permitiu a determinação da CI_{50} . Todas as equações utilizadas no cálculo da porcentagem de inibição apresentaram coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,99, demonstrando a confiabilidade dos resultados obtidos. Os referidos resultados podem ser observados na *Tabela XXXVI*.

Tabela XXXVI: Resultados de inibição enzimática frente à *MtPPAT* para os compostos sintetizados no trabalho*

Compostos	CI_{50} (μ M) <i>MtPPAT</i>
8	> 300
63	96,56 \pm 0,39
66	> 300
67	894,51 \pm 0,49
68	> 300
79	> 300
80	212,48 \pm 0,55
81	> 300
82	290,96 \pm 2,01
83	92,45 \pm 0,97
84	149,09 \pm 1,42

*Determinação em triplicata

Verificou-se que, dos 11 compostos sintetizados, 6 se apresentaram ativos frente à *MtPPAT*, inibindo-a. Sendo que, conforme pode ser observado, por exemplo, para o composto 83 na *Figura 19*, todos os compostos apresentaram um perfil de dose dependência na inibição da *MtPPAT*, ou seja, ao se elevar a concentração do composto eleva-se a sua capacidade de inibição.

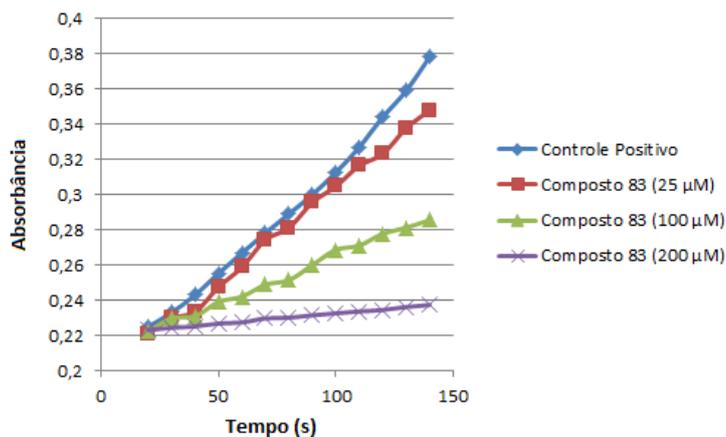


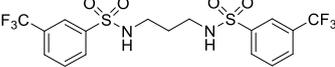
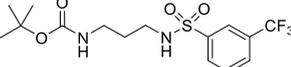
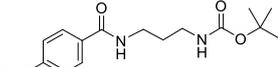
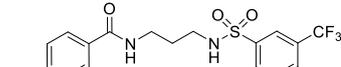
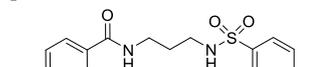
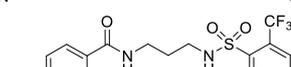
Figura 19: Perfil de atividade da enzima MtPPAT na presença do composto 83 e na ausência de inibidores (controle positivo).

Verifica-se que os compostos 63 e 83, mais ativos frente às cepas sensíveis de *Mtb*, também se mostraram mais ativos frente à MtPPAT (Tabela XXXVII). De forma geral, os compostos que se mostraram ativos no ensaio de atividade frente às cepas sensíveis (H37Rv) de *M. tuberculosis* (*Mtb*) (compostos: 63, 67, 79, 80, 82, 83 e 84) também inibiram a enzima. Apenas o composto 79, o qual apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 540,36 µM frente às cepas sensíveis de *Mtb*, sendo o composto de menor atividade da série, não inibiu a MtPPAT nas concentrações avaliadas. Todos os compostos que não se mostraram ativos frente às cepas sensíveis de *Mtb* também não foram capazes de inibir a enzima nas concentrações avaliadas.

Tabela XXXVII: Comparação dos resultados de inibição enzimática frente à MtPPAT e de atividade frente às cepas sensíveis de *Mtb* para os compostos sintetizados no trabalho

Compostos	CI ₅₀ MtPPAT (µM)	CIM Mtb (H37Rv) (µM)
8	> 300	> 600
63	96,56 ± 0,39	56
66	> 300	> 600
67	894,51 ± 0,49	383
68	> 300	> 600

Tabela XXXVII: Comparação dos resultados de inibição enzimática frente à MtPPAT e de atividade frente às cepas sensíveis de Mtb para os compostos sintetizados no trabalho

Compostos	CI ₅₀ MtPPAT (μM)	CIM Mtb (H37Rv) (μM)
79 	> 300	540
80 	212,48 ± 0,55	284
81 	> 300	> 600
82 	290,96 ± 2,01	302
83 	92,45 ± 0,97	44
84 	149,09 ± 1,42	108

Uma breve avaliação de Relação Estrutura Atividade (REA) dos compostos nos permite observar que todos os compostos mais ativos, tanto frente à MtPPAT quanto frente às cepas de *Mtb*, apresentam substituintes elétron retiradores nos anéis amídicos e sulfonamídicos. Estes substituintes possuem caráter lipofílico e polar. Dessa forma, as referidas características parecem ser relevantes para a atividade biológica e podem ser o ponto de partida para o planejamento de compostos com atividade otimizada.

Por fim, pode se concluir que 6 dos compostos obtidos no trabalho atuam inibindo a enzima MtPPAT, além de serem ativos frente às cepas de *Mtb*. Dessa forma, estes são os primeiros inibidores já descritos para a PPAT de *M. tuberculosis*, o que valida a enzima como alvo para a TB.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Os estudos de modelagem molecular permitiram a seleção dos compostos potencialmente ativos, demonstrando que esses possivelmente interagiriam com o receptor de forma semelhante ao substrato da enzima e que essa interação seria energeticamente favorável, já que poderiam deslocar o substrato da enzima do sítio ativo, inibindo-a.

Os compostos selecionados, bem como fragmentos desses, foram sintetizados, purificados e caracterizados com sucesso. Valendo ressaltar, que são compostos inéditos e de fácil viabilidade sintética.

Observa-se que os ensaios microbiológicos demonstraram que sete dos compostos sintetizados apresentaram atividade, na faixa de micromolar, contra cepas sensíveis de *M. tuberculosis*. Além disso, verificou-se que alguns dos compostos avaliados contra cepas monorresistentes, apresentaram atividade contra as cepas ATCC monorresistentes à rifampicina e à isoniazida, o que pode ser considerado relevante, já que um dos objetivos do presente trabalho seria vencer a questão da resistência verificada para a terapia atual da TB.

Também, verificou-se que os compostos ativos contra cepas sensíveis de *M. tuberculosis* não apresentaram atividade frente às cepas ATCC de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, o que demonstra que os referidos compostos não apresentam amplo espectro de ação. Com relação aos ensaios de citotoxicidade em células sadias (VERO) realizados para os compostos que se demonstraram ativos contra *M. tuberculosis*, verificou-se que estes, de forma geral, não apresentam citotoxicidade relevante.

A enzima fosfotransferase adenililtransferase (PPAT) de *M. tuberculosis* foi obtida adequadamente, o que possibilitou a realização dos ensaios de inibição enzimática. Os ensaios de inibição enzimática frente à *MtPPAT* demonstraram que os compostos mais ativos frente às cepas sensíveis de *Mtb* também se mostraram mais ativos frente à *MtPPAT*. De forma geral, todos os compostos que se mostraram ativos no ensaio de atividade frente às cepas sensíveis de *Mtb* também inibiram a enzima. Além disso, verificou-se que os compostos apresentaram perfil de dose dependência na inibição da *MtPPAT*.

Dessa forma, o presente trabalho apresenta os primeiros inibidores já descritos para a PPAT de *M. tuberculosis*, validando enzima como alvo para a TB.

Referências bibliográficas

Marina Candido Pimi

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLINGER, N.L. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 99, p. 8127-8134, 1977.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev.*, v. 26, p. 531-568, 2006.
- AMBADY, A.; AWASTHY, D.; YADAV, R.; BASUTHKAR, S.; SESHADRI, K.; SHARMA, U. Evaluation of CoA biosynthesis proteins of *Mycobacterium tuberculosis* as potential drug targets. *Tuberculosis*, v. 92, p. 521-528, 2012.
- ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B. Fragment-based QSAR: perspectives in drug design. *Mol. Divers.*, v. 13, p. 277-285, 2009.
- APAROY, P.; REDDY, K. K.; REDDANNA, P. Structure and ligand based drug design strategies in the development of novel 5-LOX inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, v. 19, p. 3763-3778, 2012.
- ARORA, N.; BANERJEE, A. K. Targeting tuberculosis: a glimpse of promising drug targets. *Mini Rev. Med. Chem.*, v. 12, p. 187-201, 2012.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed, 3 ed., 2015. 608p.
- BAUMANN, E. Ueber eine einfache methode der darstellung von benzoësäureäthern. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, v.19, p.3218-3222, 1886.
- BLOMBERG, B.; SPINACI, S.; FOURIE, B.; LAING, R. The rationale for recommending fixed-dose combination tablets for treatment of tuberculosis. *Bull. World Health Org.*, v. 79, p. 61-79, 2001.
- BOHNUUD, T.; BOHNUUD, A.; LUO, L.; WODAK, S. J.; BONVIN, A. M. J. J.; WENG, Z.; VAJDA, S.; SCHUELER-FURMAN, O.; KOZAKOV, D. A benchmark testing ground for integrating homology modeling and protein docking. *Proteins*, v. 85, p. 10-16, 2017.
- CARBALLEIRA, N. M.; SANABRIA, D.; CRUZ, C.; PARANG, K.; WAN, B.;FRANZBLAU, S. G. 2,6-hexadecadiynoic acid and 2,6-nonadecadiynoic acid: novel synthesized acetylenic fatty acids as potent antifungal agents. *Lipids*, v. 41, p. 507-511, 2006.
- CHAN, L. C.; COX, B. G. Kinetics of amide formation through carbodiimide/*N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) couplings. *J. Org. Chem.*, v. 72, p; 8863-8869, 2007.
- CHO, S. H.; WARIT, S.; WAN, B.; HWANG, C. H.; PAULI, G. F.; FRANZBLAU, S. G. Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, p. 1380-1385, 2007.
- CHOI-SLEDESKI, Y.M.; WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: WERMUTH, C.G.; ALDOUS, D.; RABOISSON, P.; ROGNAN, D. (Eds.) *The practice of medicinal chemistry. 4 ed.*, New York: Academic Press, 2015. p.657-696.
- CSLI - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Pennsylvania, USA, 2007.
- COLLINS, L.; FRANZBLAU, S. 1997. Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 4, p. 1004-1009, 1997.
- DEVEREUX, M.; POPELIER, P. L. A. *In silico* techniques for the identification of

- bioisosteric replacements for drug design. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 10, p. 657-668, 2010.
- DHEDA, K.; BARRY, C. E.; MAARTENS, G. Tuberculosis. *Lancet.*, v. 387, p. 1211-1226, 2016.
- ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 12, p. 581-591, 2012.
- FALZARI, K.; ZHU, Z.; PAN, D., LIU, H., HONGMANEE, P., FRANZBLAU, S. G. *In vitro* and *in vivo* activities of macrolide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, p. 1447-1454, 2005.
- FERREIRA, E. I. Planejamento de fármacos na área de doença de Chagas: avanços e desafios. *Rev. Virtual Quim.*, v. 4, p. 225-246, 2012.
- FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz, In: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=5181&sid=9>, 2015.
- GEERLOF, A.; LEWENDON, A.; SHAW, W. V. Purification and characterization of phosphopantetheine adenylyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 27105-27111, 1999.
- GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 36, p. 514-532, 2012.
- GIRARDI, E.; SCHEPISI, M. S.; GOLETTI, D.; BATESB, M.; MWABA, P.; YEBOAH-MANU, D.; NTOUMIE, F.; PALMIERI, F.; MAEURER, M.; ZUMLAB, A.; IPPOLITO, G. The global dynamics of diabetes and tuberculosis: the impact of migration and policy implications. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 56, p. 45-53, 2017.
- GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Structure- and ligand-based drug design approaches for neglected tropical diseases. *Pure Appl. Chem.*, v. 84, p. 1857-1866, 2012.
- HAN, S. Y.; KIM, Y. A. Recent development of peptide coupling reagents. *Tetrahedron*, v. 60, p. 2447-2467, 2004.
- HARGREAVES, S.; LÖNNROTH, K.; NELLUMS, L. B.; OLARU, I. D.; NATHAVITHARANA, R. R.; NORREDAM, M. FRIEDLAND, J. S. Multidrug-resistant tuberculosis and migration to Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 23, p. 141-146, 2016.
- IZARD, T. A novel adenylate binding site confers phosphopantetheine adenylyltransferase interactions with coenzyme A. *J. Bacteriol.*, v. 185, p. 4074-4080, 2003.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 13 ed., 1980. 561p.
- KANG, B. K.; SCHLESINGER, L. S. Characterization of mannose receptor dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 2769-2777, 1998.
- KITCHEN, D. B.; CORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v. 3, p. 935-949, 2004.
- KLOPMAN, G. Artificial intelligence approach to structure-activity studies. Computer automated structure evaluation of biological activity of organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 106, p. 7315-7321, 1984.
- KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 49, p. 84-96, 2009.
- LI, L.; LI, C.; ZHANG, Z.; ALEXOV, E. On the dielectric “constant” of proteins: smooth dielectric function for macromolecular modeling and its implementation in DelPhi. *J. Chem. Theory Comput.*, v. 9, p. 2126-2136, 2013.
- LIENHARDT, C.; GLAZIOU, P.; UPLEKAR, M.; LÖNNROTH, K.; GETAHUN, H.; RAVIGLIONE, M. Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. *Nat.*

- Rev. Microbiol.*, v. 10, p. 407-416, 2012.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.*, v. 12, p. 23-49, 2005.
- LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *J. Immunol.*, v. 185, p. 15-22, 2010.
- LOUNNAS, V.; RITSCHER, T.; KELDER, J.; MCGUIRE, R.; BYWATER, R. P.; FOLOPPE, N. Current progress in structure-based rational drug design marks a new mindset in drug discovery. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, v. 5, p. 1-14, 2013.
- LOUPY, A. Solvent-free microwave organic synthesis as an efficient procedure for green chemistry. *C. R. Chimie*, v. 7, p. 103-112, 2004.
- LYONNET, B.; DIACOVICH, L.; GAGO, G.; SPINA, L.; BARDOU, F.; LEMASSU, A.; QUÉMARD, A.; GRAMAJO, H. Functional reconstitution of the *Mycobacterium tuberculosis* long-chain acyl-CoA carboxylase from multiple acyl-CoA subunits. *FEBS J.*, v. 284, p. 1110-1125, 2017.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 10 ed., 2004. 608p.
- MEANWELL, N.A. Synopsis of recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J. Med. Chem.*, v. 54, p. 2529-2591, 2011.
- MENDES, A. M.; FENSTERSEIFER, L. M. Tuberculose: porque os pacientes abandonam o tratamento? *Bol. Pneumol. Sanit.*, v. 12, p. 25-36, 2004.
- MILLER, J. R.; OHREN, J.; SARVER, R. W.; MUELLER, W. T.; DE DREU, P.; CASE, H.; THANABAL, V. Phosphopantetheine adenylyltransferase from *Escherichia coli*: investigation of the kinetic mechanism and role in regulation of coenzyme A biosynthesis. *J. Bacteriol.*, v. 189, p. 8196-8205, 2007.
- MILLER, J. R.; THANABAL, V.; MELNICK, M. M.; LALL, M.; DONOVAN, C.; SARVER, R. W.; LEE, D. Y.; OHREN, J.; EMERSON, D. The use of biochemical and biophysical tools for triage of high-throughput screening hits – a case study with *Escherichia coli* Phosphopantetheine adenylyltransferase. *Chem. Biol. Drug Des.*, v. 75, p. 444-454, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica*, Brasília, 2002. 102p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil*, Brasília, 2010. 186p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. In: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/03/taxa-mortalidade-tuberculose-1999-2015-OUT-2016.pdf>, 2016.
- MORRIS, V. K.; IZARD, T. Substrate-induced asymmetry and channel closure revealed by the apoenzyme structure of *Mycobacterium tuberculosis* phosphopantetheine adenylyltransferase. *Protein Sci.*, v. 13, p. 2547-2552, 2004.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology Press., 8 ed., 2003. 1212 p.
- NAING, C.; MAK, J. W.; MAUNG, M.; WONG, S. F.; KASSIM, A. I. B. Meta-analysis: the association between HIV infection and extrapulmonary tuberculosis. *Lung*, v. 191, p. 27-34, 2013.
- O'GARRA, A.; REDFORD, P. S.; MCNAB, F. W.; BLOOM, C. I.; WILKINSON, R. J.; BERRY, M. P. R. The immune response in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 31, p. 475-527, 2013.
- ORGEUR, M.; BROSCHE, R. Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis*

- complex. *Curr. Opin. Microbiol.* 18, 41:68-75, 2018
- PAI, M.; BEHR, M. A.; DOWDY, D.; DHEDA, K.; DIVANGAHI, M.; BOEHME, C. C.; GINSBERG, A.; SWAMINATHAN, S.; SPIGELMAN, M.; GETAHUN, H.; MENZIES, D.; RAVIGLIONE, M. Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.*, v. 2, p. 1-23, 2016.
- PATRICK, G. L. *An introduction to medicinal chemistry*. 6.ed. New York: Oxford University Press, 2017. 9124p.
- PRAJAPAT, P.; AGARWAL, S.; TALESARA, G. L. Significance of computer aided drug design and 3D QSAR in modern drug discovery. *J. Med. Org. Chem.*, v. 1, p. 1-2, 2017.
- PRIMI, M. C.; SEGRETTO, N. D.; FERREIRA, E. I. Medicinal chemistry of new compounds to treat tuberculosis. *Curr. Clin. Pharmacol.*, 29/12/2013 (on line).
- RAM, S.; EHRENKAUFER, R. E. Ammonium formate in organic synthesis: a versatile agent in catalytic hydrogen transfer reductions. *Synthesis*, v. 2, p. 91-95, 1988.
- RAVIGLIONE, M.; MARAIS, B.; FLOYD, M.; LONNROTH, K.; GETAHUN, H.; MIGLIORI, G. B.; HARRIES, A. D.; NUNN, P.; LIENHARDT, C.; GRAHAM, S.; CHAKAYA, J.; WEYER, K.; COLE, S.; KAUFMANN, S. H. E.; ZUMLA, A. Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments. *Lancet*, v. 379, p. 1902-1913, 2012.
- ROTHMANN, M.; KANG, M.; VILLA, R.; NTAI, I.; CLAIR, J. J.; KELLEHER, N. L.; CHAPMAN, E.; BURKART, M. D. Metabolic perturbation of an essential pathway: evaluation of a glycine precursor of coenzyme A. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 135, p. 5962-5965, 2013.
- RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 35, p. 51-58, 2002.
- SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da iupac para 1997). *Quím. Nova*, v. 25, p. 505-512, 2002.
- SARACENI, V.; COHN, S.; CAVALCANTE, S. C.; PACHECO, A. G. F.; MOULTON, L.H.; CHAISSON, R. E.; DUROVN, B.; GOLUB, J. E. Prevalent tuberculosis (TB) at HIV diagnosis in Rio de Janeiro, Brazil: the TB/HIV in Rio (THRio) cohort. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, v. 67, p. 98-101, 2015.
- SCHOTTEN, C. Ueber die oxydation des piperidins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, v.17, p. 2544-2547, 1884.
- SHAW, W. V.; LEWENDON, A. L., inventors. Phanterix Ltd. *Production and use of antimicrobial agents*. US patente 6.696.268, 2004.
- SHIM, J.; MACKERELL JR, A. D. Computational ligand-based rational design: role of conformational sampling and force fields in model development. *MedChemComm.*, v. 2, p. 356-370, 2011.
- SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Quim. Nova*, v. 28, p. 678-682, 2005.
- STEWART, J. J. P. J. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *Comput.Chem.*, v. 10, p. 209-220, 1989a.
- STEWART, J. J. P. J. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. *Comput.Chem.*, v. 10, p. 221-264, 1989b.
- STOFFELS, K.; ALLIX-BE'GUEC, C.; GROENEN, G.; WANLIN, M.; BERKVEN, D.; MATHYS, V.; SUPPLY, P.; FAUVILLE-DUFAUX, M. From multidrug- to extensively drug-resistant tuberculosis: upward trends as seen from a 15-year nationwide study. *PLoS One*, v. 8, p. 1-9, 2013.
- STRAUSS, O. C. M.; SIBON, E. Coenzyme A: to make it or uptake it? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 17, p. 605-606, 2016.
- KORB, O.; STUTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-

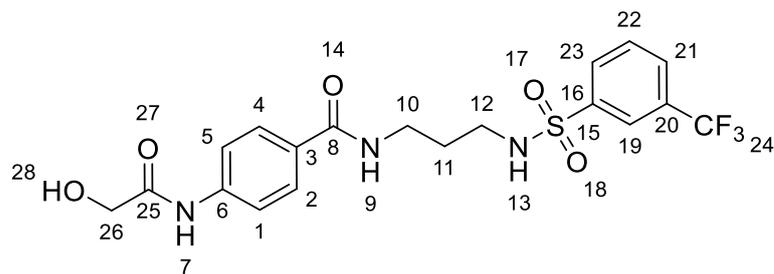
- ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* v. 49, p. 84-96, 2009.
- TAFT, C. A.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. Current topics in computer-aided drug design. *J. Pharm. Sci.*, v. 97, p. 1089-1098, 2008.
- TIBERI, S.; BUCHANAN, R.; CAMINERO, J. A.; CENTIS, R.; ARBEX, M. A.; SALAZAR, M.; POTTER, J.; MIGLIORI, G. B. The challenge of the new tuberculosis drugs. *Tuberculosis*, v. 46, p. e41-e51, 2017.
- TIMOFEEV, V. I.; SMIRNOVA, E. A.; CHUPOV, L. A.; ESIPOV, R. S.; KURANOVA, I. P. Preparation of the crystal complex of phosphopantetheineadenyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* with coenzyme A and investigation of its three-dimensional structure at 2.1 Å resolution. *Crystallogr. Rep.*, v. 55, p.1109-1118, 2010.
- VASAVA, M. S.; BHOI, M. N.; RATHWA, S. K.; BORAD, M. A.; NAIR, S. G.; PATEL, H. D. Drug development against tuberculosis: past, present and future. *Indian J. Tuberc.*, v. 64, p. 252-275, 2017.
- VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, v. 52, p. 609-623, 2003.
- VISWANADHAN, V.N.; GHOSE, A.K.; REVANKAR, G.R.; ROBINS, R.K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 29, p. 163-172, 1989.
- WANG, S.; CMILNE, G. W. A.; NICKLAUS, M. C.; MARQUEZ, V. E.; LEE, J.; BLUMBERGT, P. M. Protein kinase C. Modeling of the binding site and prediction of binding constants. *J. Med. Chem.*, v. 37, p. 1326-1338, 1994.
- WHO, World Health Organization. In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138748/pdf/TOC.pdf>, 2010.
- WHO, World Health Organization, In: http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TB_GlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf, 2011.
- WHO, World Health Organization. In: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_executive_summary.pdf, 2016.
- WUBBEN, T. J.; MESECAR, A. D. Kinetic, thermodynamic, and structural insight into the mechanism of phosphopantetheineadenyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.*, v. 404, p. 202-219, 2010.
- WUBBEN, T.; MESECAR, A. D. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* phosphopantetheineadenyltransferase in complex with the feedback inhibitor CoA reveals only one active-site conformation. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, v. 67, p. 541-545, 2011.
- WUTS, P. G. M., GREENE, T. W. *Greene's protective groups in organic synthesis*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, 2007.
- XIANG-QUN, X. Molecular modeling and *in silico* drug design. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. *Foye's principles of medicinal chemistry*. Baltimore:Lippincott Williams & Wilkins, 6 ed., 2008. p. 54-84.
- XIONG, X.; XU, Z.; YANG, Z.; LIU, Y.; WANG, D.; DONG, M.; PARKER, E. J.; ZHU, W. Key targets and relevant inhibitors for the drug discovery of tuberculosis. *Curr. Drug Targets*, v. 14, p. 679-699, 2013.
- YURIEV, E.; RAMSLAND, P. A. Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *J. Mol. Recognit.*, v. 26, p. 215-239, 2013.
- ZHAO, L.; ALLANSON, N. M.; THOMSON, S. P.; MACLEAN, J; K. F.; BARKER, J. J.; PRIMROSE, W. U.; TYLER, P. D.; LEWENDON, A. Inhibitors of

phosphopantetheinadenylyltransferase. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 38, p. 345-349, 2003.
ZUMLA, A.; HAFNER, R.; LIENHARDT, C.; HOELSCHER, M.; NUNN, A. Advancing the development of tuberculosis therapy. *Nat. Rev. DrugDiscov.*, v. 11, p. 171-172, 2012.

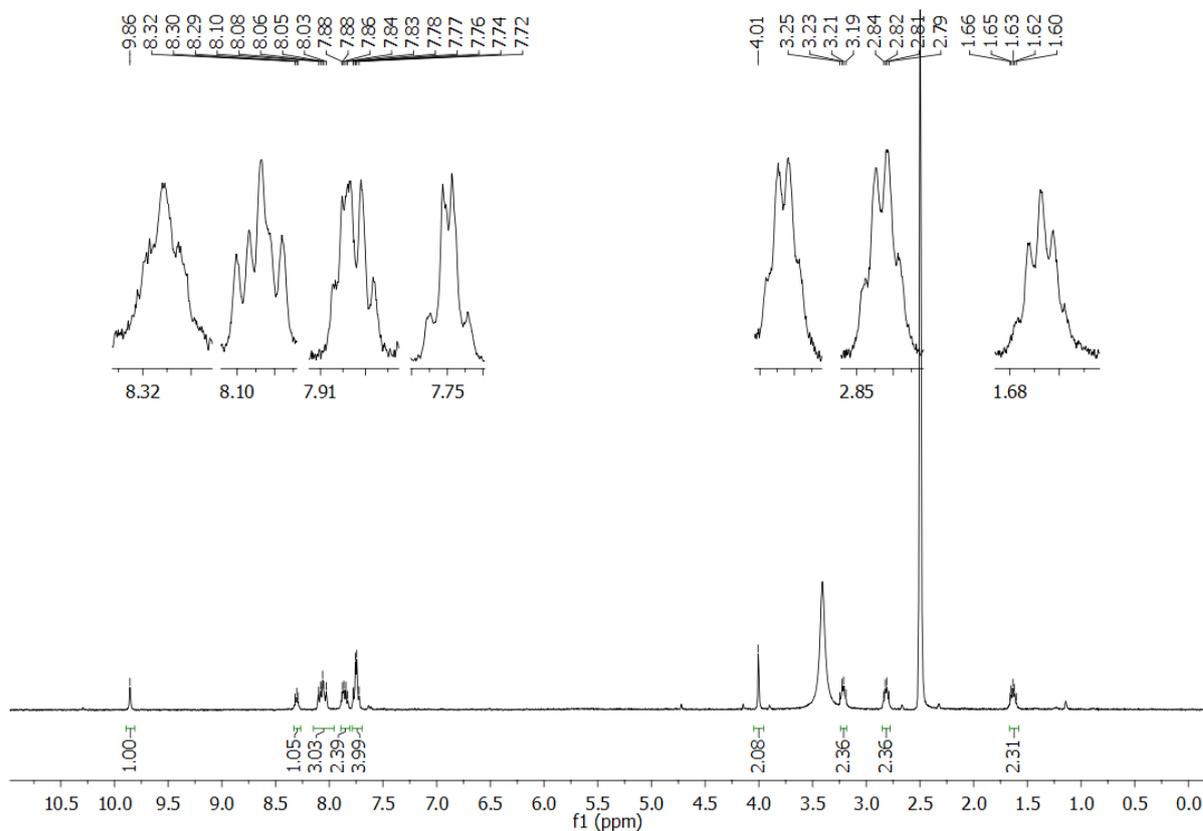
Anexos

Marina Candido Primi

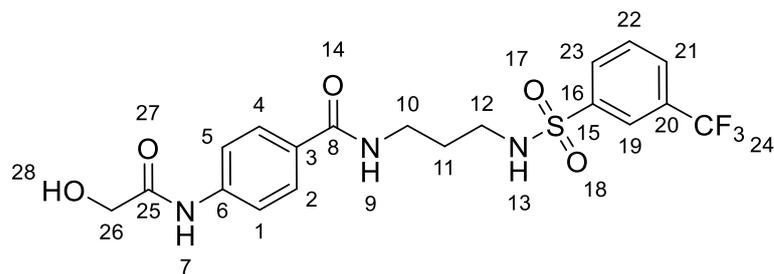
ANEXO I - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR

Espectro de RMN ^1H do composto **8**RMN ^1H ((CD_3) $_2\text{SO}$) 400 MHz, δ

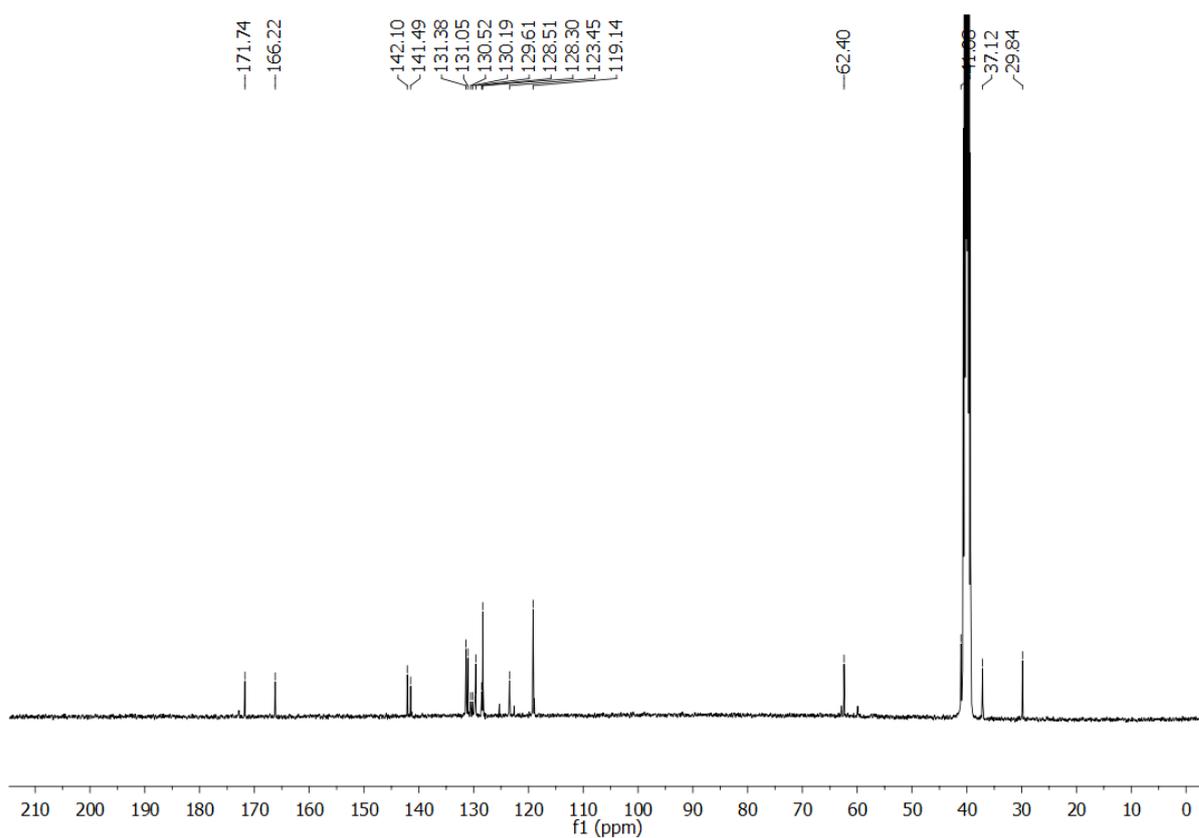
δ : 9,86 (1 H, *s*, 7-NH), 8,30 (1 H, *t*, $J = 4,8$ Hz, 9-NH), 8,10-8,03 (3 H, *m*, 19,21,23-ArH), 7,88-7,83 (2 H, *m*, 1,5-ArH), 7,78-7,72 (4 H, *m*, 13-NH e 2,4,22-ArH), 4,01 (1 H, *s*, 26-CH), 3,22 (2 H, *quart*, $J = 5,6$ Hz, 10- CH_2), 2,81 (2 H, *quart*, $J = 5,6$ Hz, 12- CH_2), 1,63 (2 H, *quint*, $J = 5,6$ Hz, 11- CH_2)

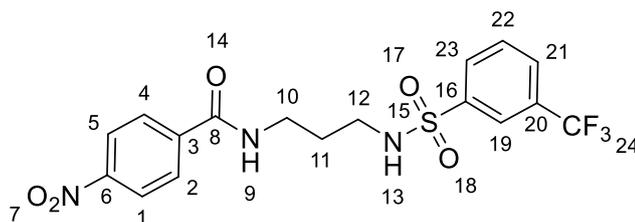
**Nota:**

s = singleto; *t* = tripleto; *quart* = quarteto; *quint* = quinteto; *m* = multipletto

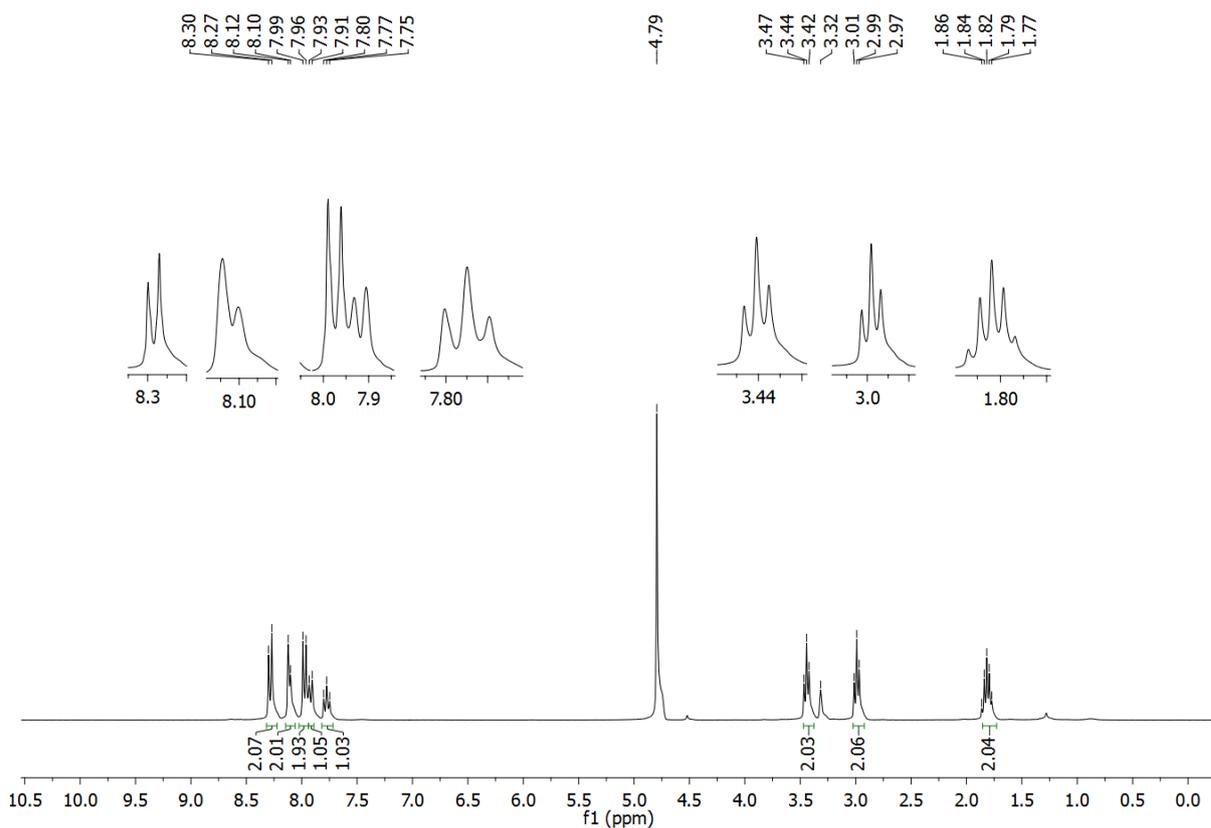
Espectro de RMN ^{13}C do composto 8RMN ^{13}C ((CD_3) $_2\text{SO}$) 100 MHz, δ

δ : 171,74 (C25), 166,22 (C8), 142,10 (C6), 141,49 (C16), 131,38 (C20),
 131,05 (C23), 130,52 (C3), 130,19 (C22), 129,61 (C21), 128,51 (C24),
 128,30 (C1,5), 123,45 (C19), 119,14 (C2,4), 62,40 (C26), 41,06 (C10),
 37,12 (C12), 29,84 (C11)

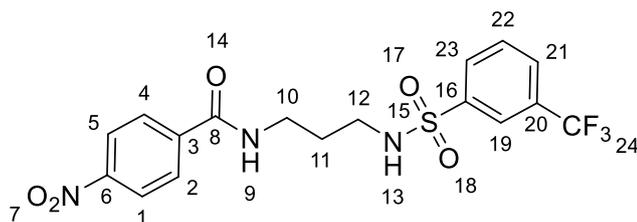


Espectro de RMN ^1H do composto 63RMN ^1H (CD $_3$ OD) 300 MHz, δ

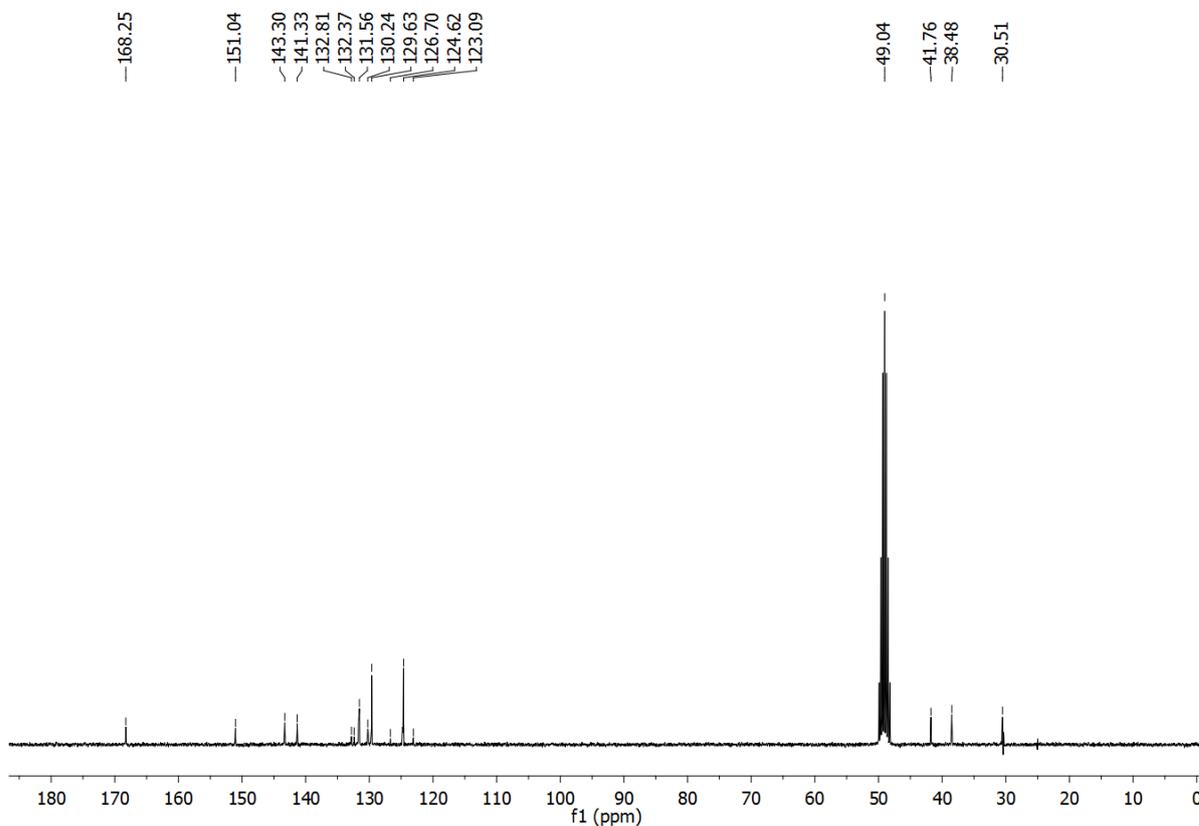
δ : 8,28 (2 H, *d*, $J = 8,70$ Hz, 1,5-ArH), 8,11 (2 H, *d*, $J = 6,45$ Hz, 2,4-ArH),
 7,97 (2 H, *d*, $J = 8,01$ Hz, 19,21-ArH), 7,92 (1 H, *d*, $J = 8,01$ Hz, 23-ArH),
 7,77 (1 H, *t*, $J = 8,4$ Hz, 22-ArH), 3,44 (2 H, *t*, $J = 6,0$ Hz, 10-CH $_2$), 2,99 (2
 H, *t*, $J = 6,0$ Hz, 12-CH $_2$), 1,82 (2 H, *quint*, $J = 6,0$ Hz, 11-CH $_2$)

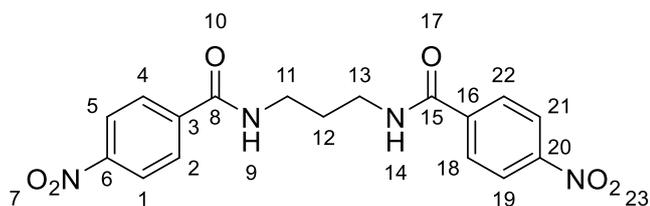
**Nota:**

d = dubleto; *t* = tripleto; *quint* = quinteto

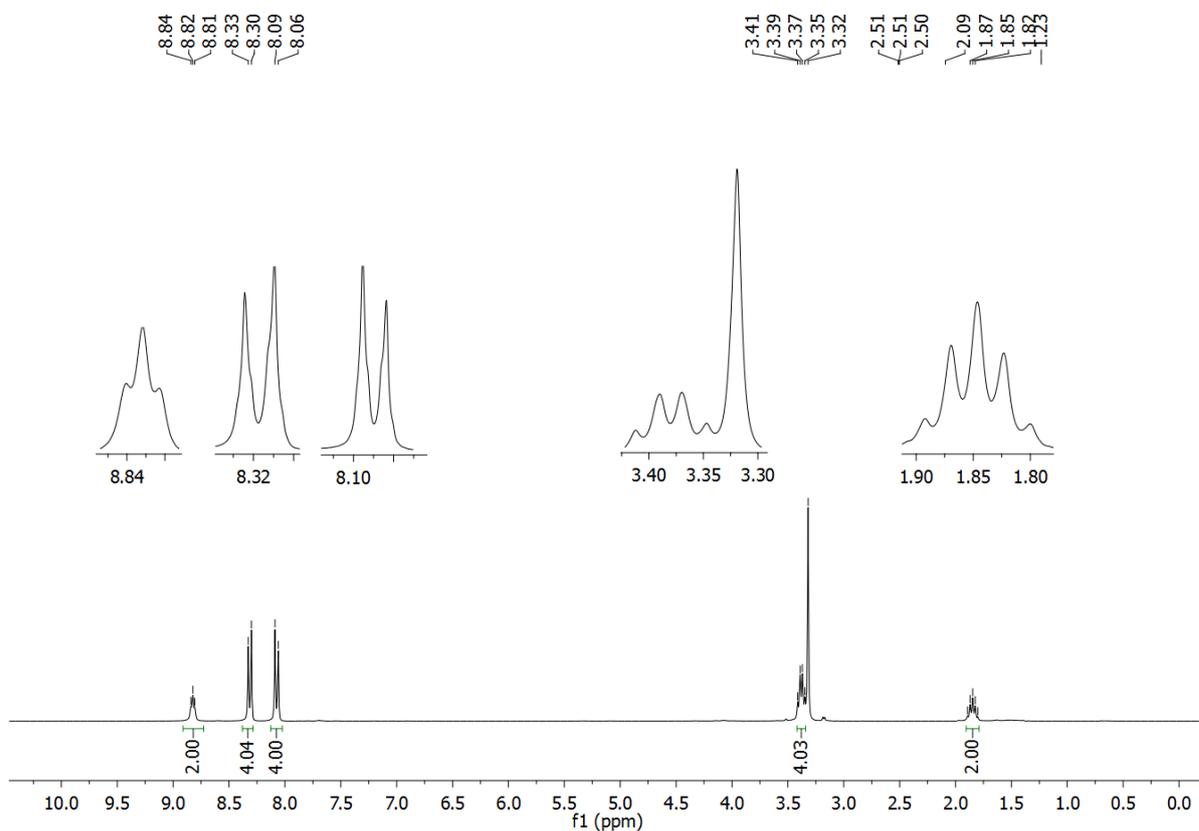
Espectro de RMN ^{13}C do composto 63RMN ^{13}C (CD_3OD) 75 MHz, δ

δ : 168,25 (C8), 151,04 (C6), 143,30 (C3), 141,33 (C16), 132,81 (C20),
132,37 (C23), 131,56 (C22), 130,24 (C21), 129,63 (C2,4), 126,70 (C24),
124,62 (C1,5), 123,09 (19), 41,76 (C10), 38,48 (C12), 30,51 (C11)

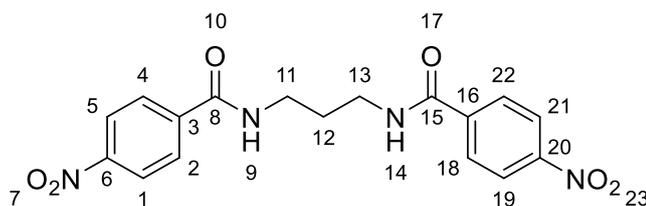


Espectro de RMN ^1H do composto 66RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 300 MHz, δ

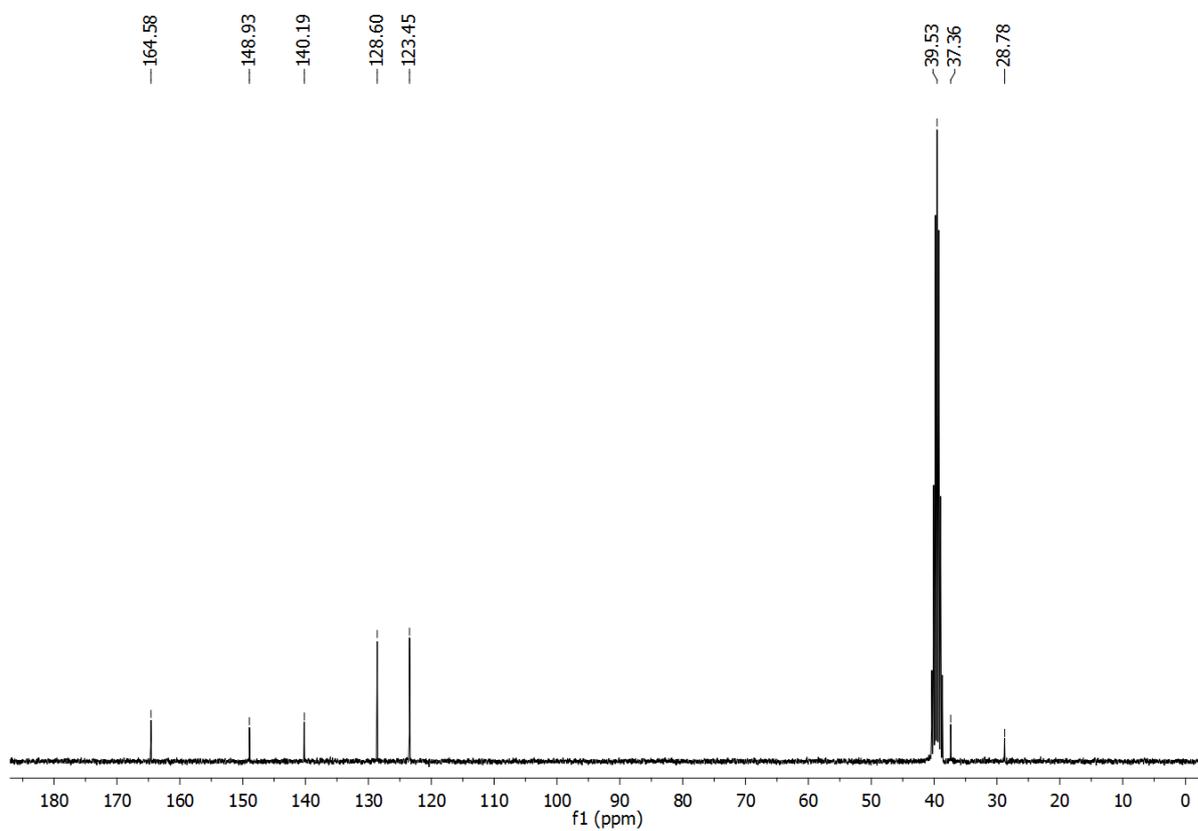
δ : 8,82 (2 H, *t*, $J = 6,0$ Hz, 9,14-NH), 8,31 (4 H, *d*, $J = 9,0$ Hz, 1,5,19,21-ArH), 8,07 (4 H, *d*, $J = 9,0$ Hz, 2,4,18,22-ArH), 3,38 (4 H, *quart*, $J = 6,0$ Hz, 11,13-CH₂), 1,85 (2 H, *quint*, $J = 6,0$ Hz, 12-CH₂)

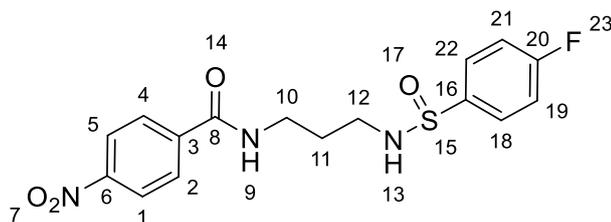
**Nota:**

d = dubleto; *t* = tripleto; *quart* = quarteto; *quint* = quinteto

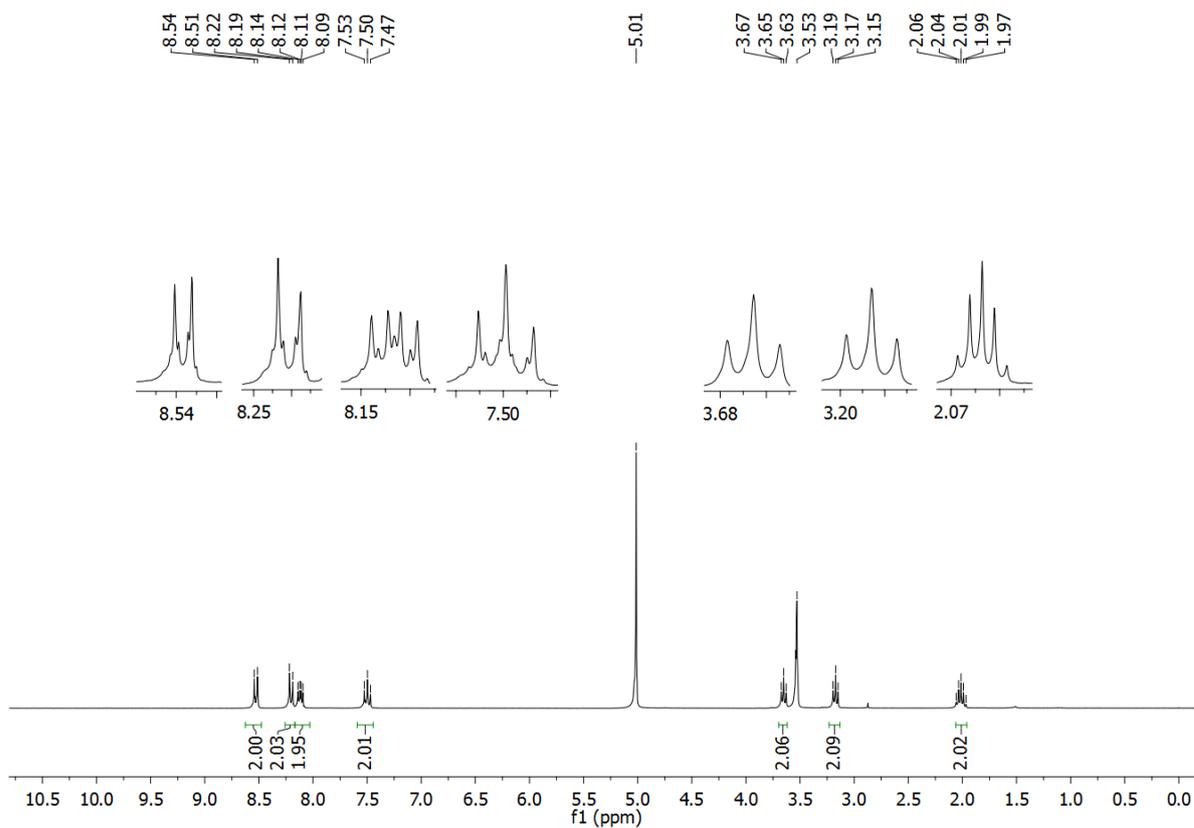
Espectro de RMN ^{13}C do composto 66RMN ^{13}C ((CD $_3$) $_2$ SO) 75 MHz, δ

δ : 164,58 (C8,15), 148,93 (C6,20), 140,19 (C3,16), 128,60 (C2,4,18,22),
123,45 (C1,5,19,21), 37,36 (C11, 13), 28,76 (C12)



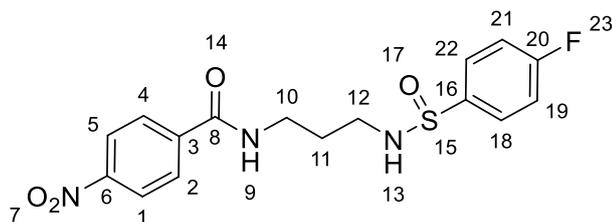
Espectro de RMN ^1H do composto 67RMN ^1H (CD_3OD) 300 MHz, δ

δ : 8,52 (2 H, *d*, $J = 9,0$ Hz, 1,5-ArH), 8,20 (2 H, *d*, $J = 9,0$ Hz, 2,4-ArH), 8,11 (2 H, *quart*, $J = 9,0$ Hz, 18,22-ArH), 7,50 (2 H, *t*, $J = 9,0$ Hz, 19,21-ArH), 3,65 (2 H, *t*, $J = 6,0$ Hz, 10- CH_2), 3,17 (2 H, *t*, $J = 6,0$ Hz, 12- CH_2), 2,01 (2 H, *quint*, $J = 6,0$ Hz, 11- CH_2)

**Nota:**

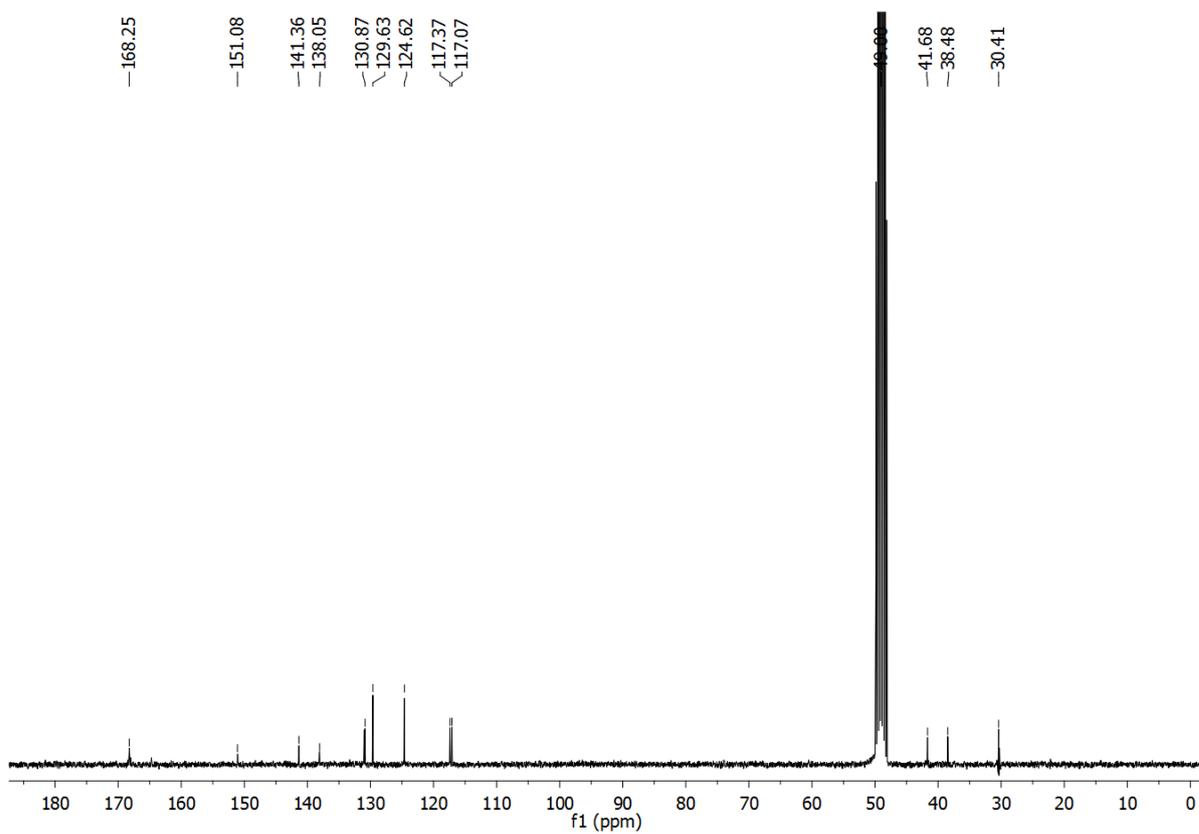
d = dubleto; *t* = tripleto; *quart* = quarteto; *quint* = quinteto

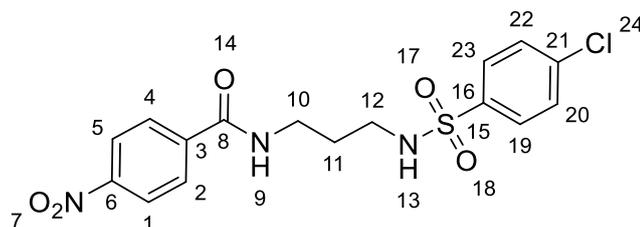
Espectro de RMN ^{13}C do composto 67



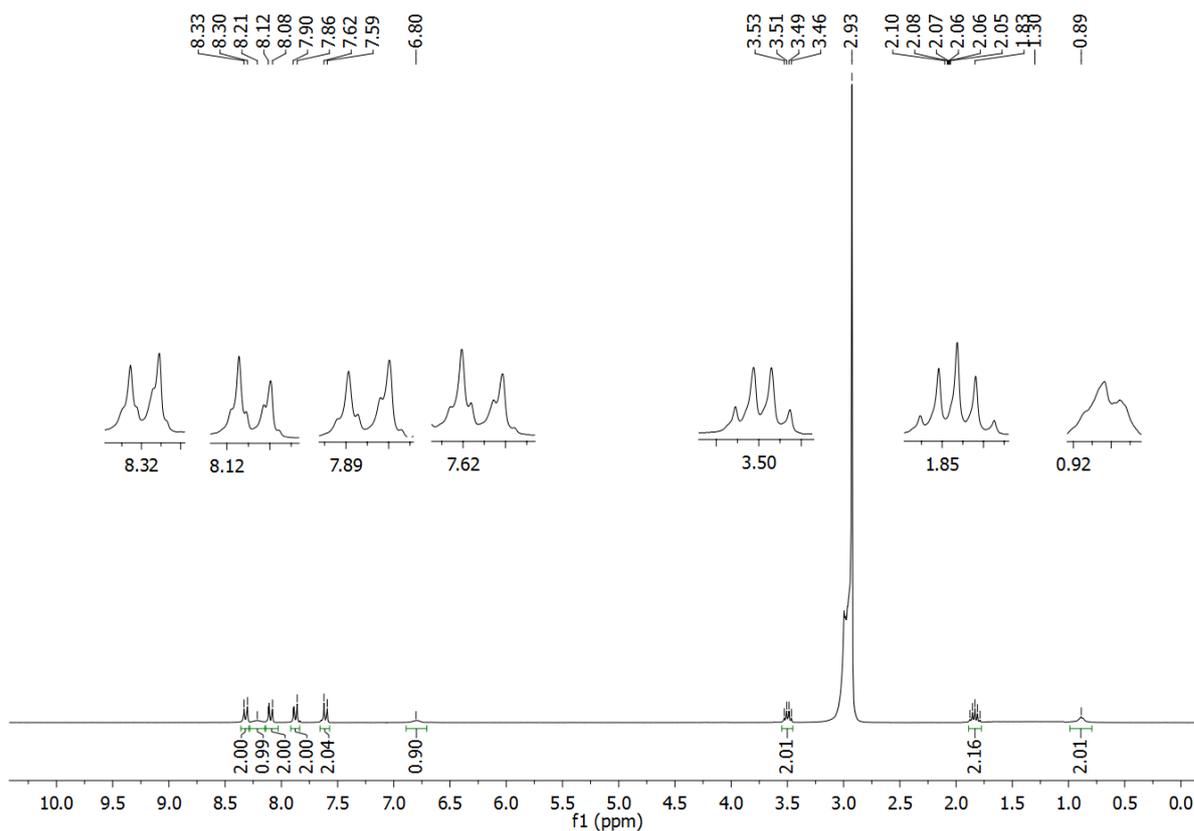
RMN ^{13}C (CD_3OD) 75 MHz, δ

δ : 168,25 (C8), 151,08 (C20), 141,36 (C6), 138,05 (C3), 130,87 (C16),
129,63 (C2,4), 124,62 (C18,22), 117,37 (C1,5), 117,07 (C19,21), 41,68
(C12), 38,48 (C10) 30,41 (C11)

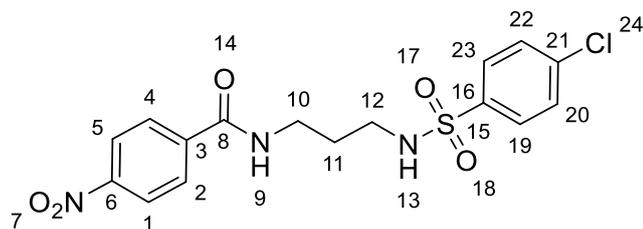


Espectro de RMN ^1H do composto 68RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 300 MHz, δ

δ : 8,31 (2 H, *d*, $J = 9,0$ Hz, 1,5-ArH), 8,21 (1 H, *sl*, 9-NH), 8,10 (2 H, *d*, $J = 12$ Hz, 19,23-ArH), 7,88 (2 H, *quart*, $J = 12,0$ Hz, 20,22-ArH), 7,61 (2 H, *d*, $J = 9,0$ Hz, 2,4-ArH), 6,80 (1 H, *sl*, 13-NH), 3,50 (2 H, *quart*, $J = 6,0$ Hz, 10-CH₂), 1,83 (2 H, *quint*, $J = 6,0$ Hz, 11-CH₂), 0,89 (2 H, *sa*, 12-CH₂)

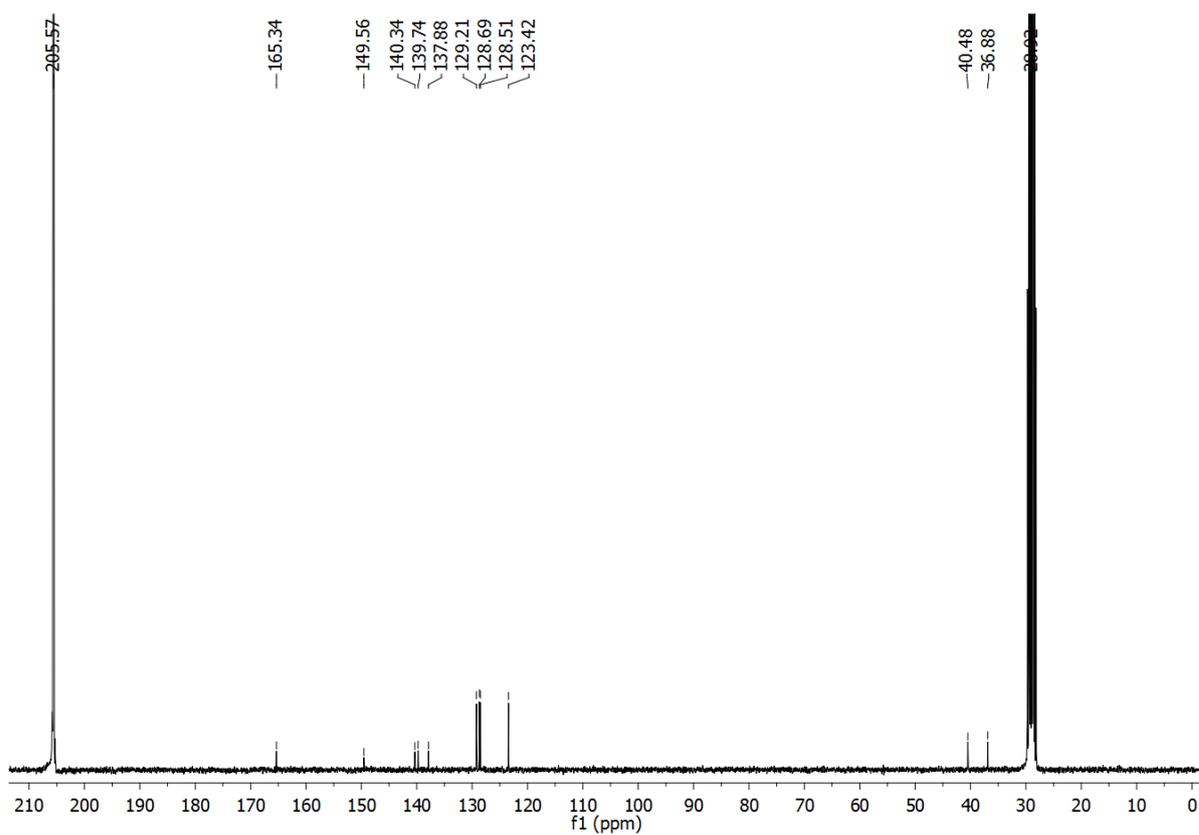
**Nota:**

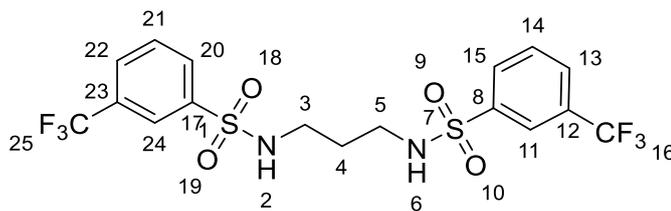
sl = singlet largo; *d* = dubleto; *quart* = quarteto; *quint* = quinteto

Espectro de RMN ^{13}C do composto 68

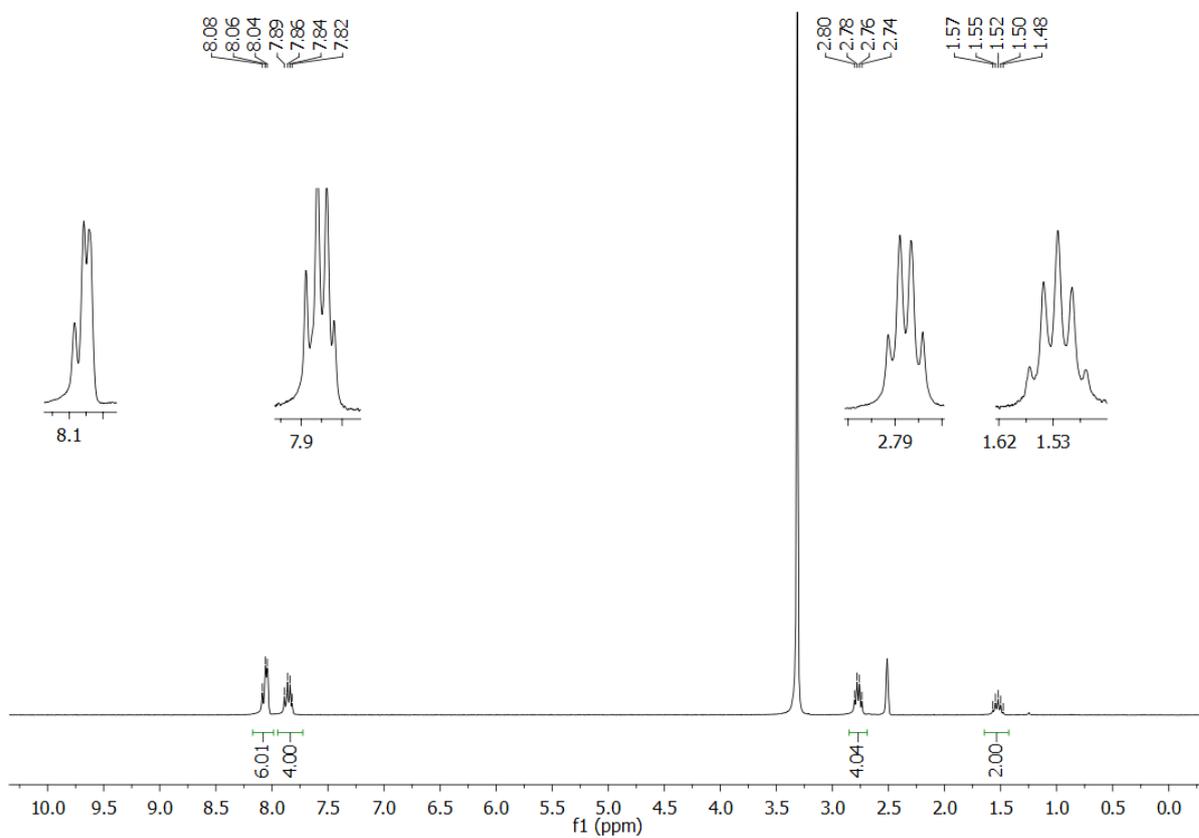
 RMN ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 75 MHz, δ

δ : 165,34 (C8), 149,56 (C6), 140,34 (16), 139,74 (C3), 137,88 (C21),
 129,21 (C2,4), 128,69 (C20,22), 128,51 (C19,23), 123,42 (C1,5), 40,48
 (C10,12), 36,88 (C11)

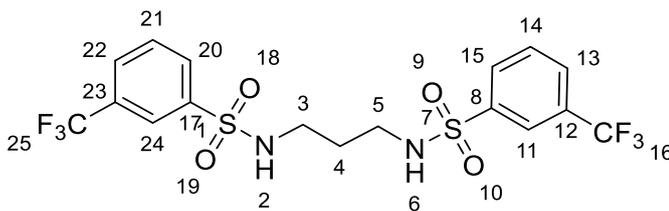


Espectro de RMN ^1H do composto 79RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 300 MHz, δ

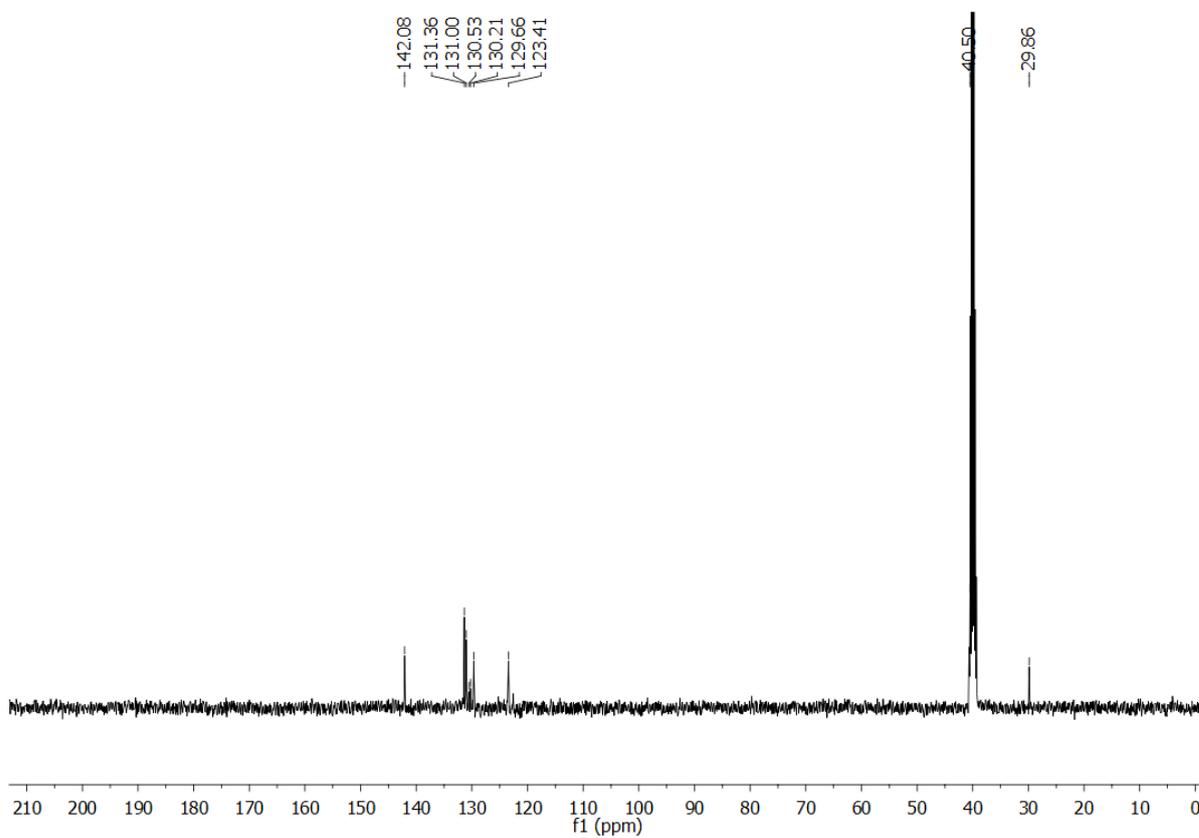
δ : 8,04-8,08 (6 H, *m*, 2,6-NH e 11,14,21,24-ArH), 7,85 (4 H, *dd*, $J = 8,4; 5,7$ Hz, 13,15,20,22-ArH), 2,77 (4 H, *quart*, $J = 6,9$ Hz, 3,5- CH_2), 1,85 (2 H, *quint*, $J = 6,9$ Hz, 4- CH_2)

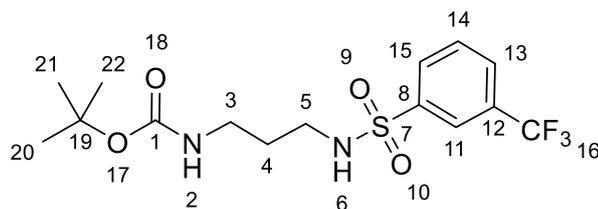
**Nota:**

dd = duplo dubleto; *quart* = quarteto; *quint* = quinteto; *m* = multipeto

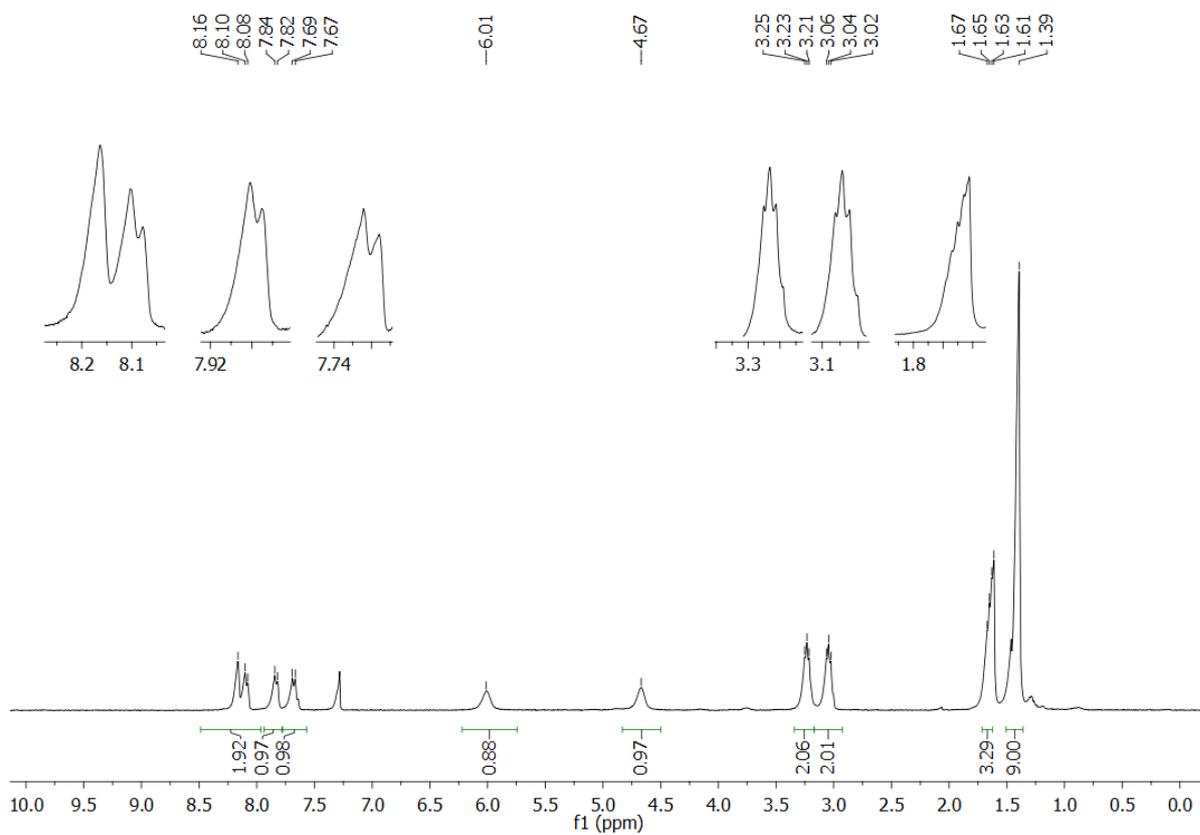
Espectro de RMN ^{13}C do composto 79RMN ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 100 MHz, δ

δ : 142,08 (C8,17), 131,36 (C12,23), 131,00 (C15,20), 130,53 (C14,21),
130,21 (C13,22), 129,66 (C16,25) 123,41 (C11,24) 40,50 (C3,5), 29,86
(C4)

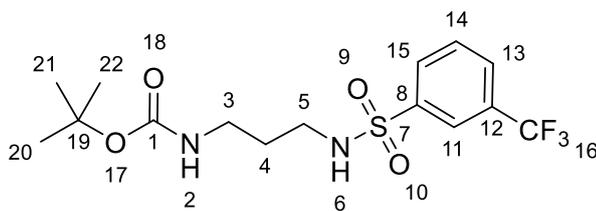


Espectro de RMN ^1H do composto 80RMN ^1H (CDCl_3) 300 MHz, δ

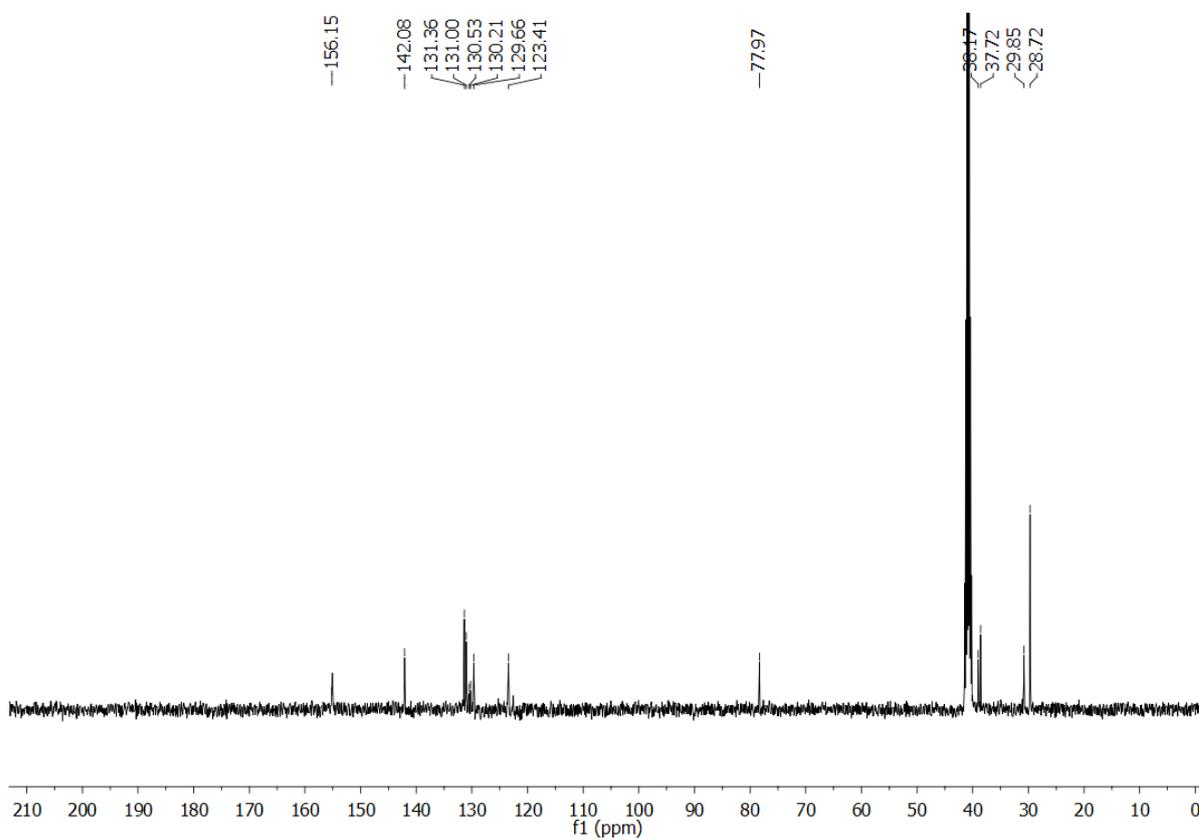
δ : 8,08-8,16 (2 H, *m*, 11,13-ArH), 7,83 (1 H, *da*, 15-ArH), 2,77 (1 H, *da*, 14-Ar), 6,01 (1 H, *s*, 6-NH), 4,67 (1 H, *s*, 2-NH), 3,23 (2 H, *ta*, 5- CH_2), 3,04 (2 H, *ta*, 3- CH_2), 1,61-1,67 (3 H, *m*, 4- CH_2), 1,39 (9 H, *s*, 20,21,22- CH_3)

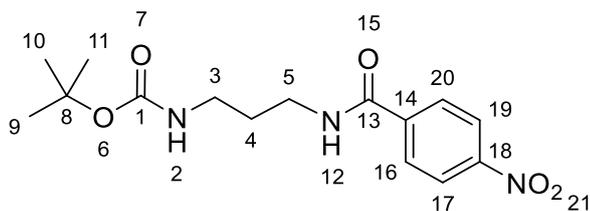
**Nota:**

s = singleto, *da* = dubleto aparente, *ta* = tripleto aparente, *m* = multipleto

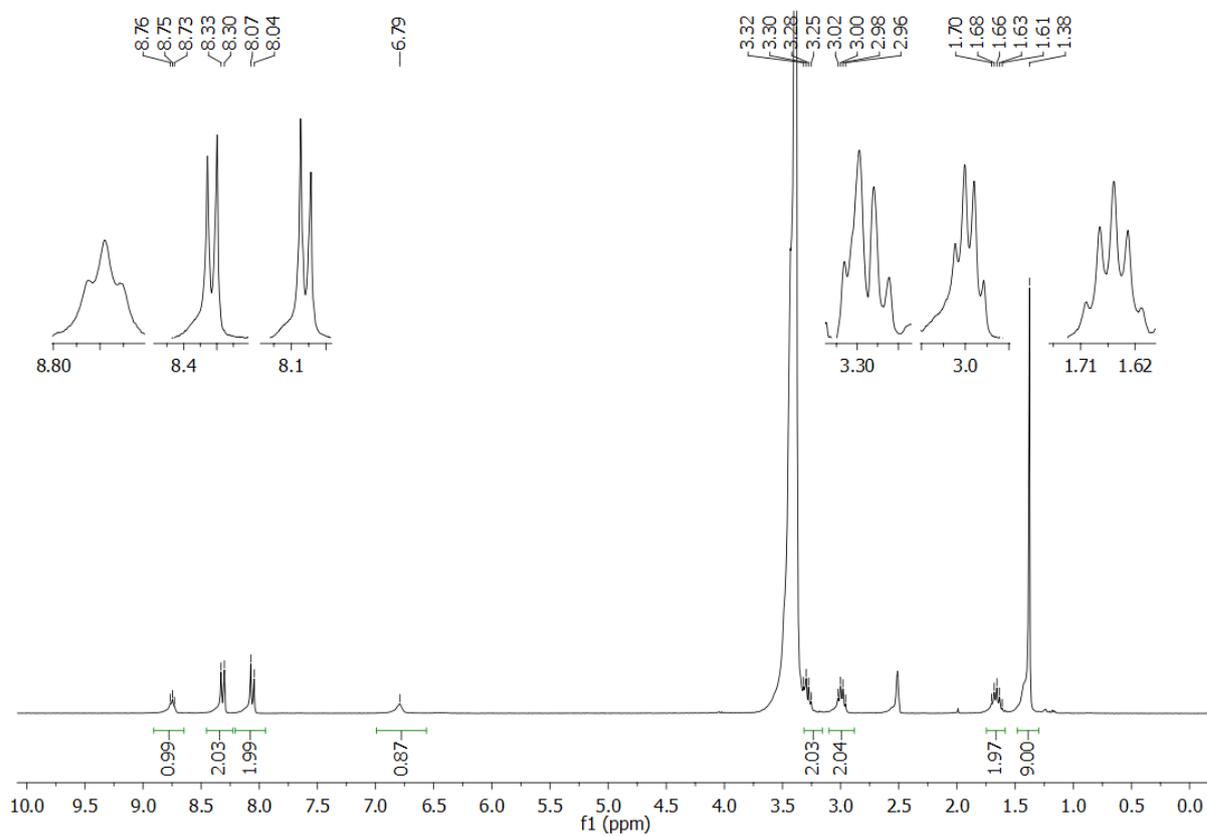
Espectro de RMN ^{13}C do composto **80**RMN ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 100 MHz, δ

δ : 156,15 (C1), 142,08 (C12), 131,36 (C8), 131,00 (C15), 130,53 (C14),
130,21 (C13), 129,66 (C16), 123,41 (C11), 77,97 (C19), 38,17 (C5), 37,72
(C3), 29,85 (C4), 28,72 (C20,21,22)

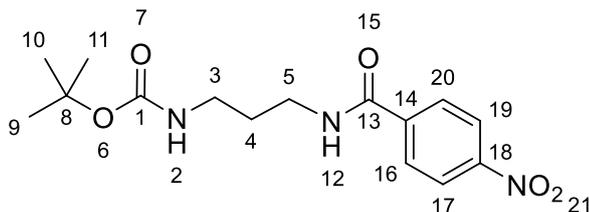


Espectro de RMN ^1H do composto 81RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 300 MHz, δ

δ : 8,75 (1 H, *t*, $J = 5,1$; 12-NH), 8,31 (2 H, *d*, $J = 8,7$; 17,19-ArH), 8,5 (2 H, *d*, $J = 8,7$ Hz, 16,20-Ar), 6,79 (1 H, *sl*, 2-NH), 3,29 (2 H, *quarta*, 5- CH_2), 2,99 (2 H, *quarta*, 3- CH_2), 1,66 (2 H, *quint*, $J = 6,9$; 4- CH_2), 1,38 (9 H, *s*, 9,10,11- CH_3)

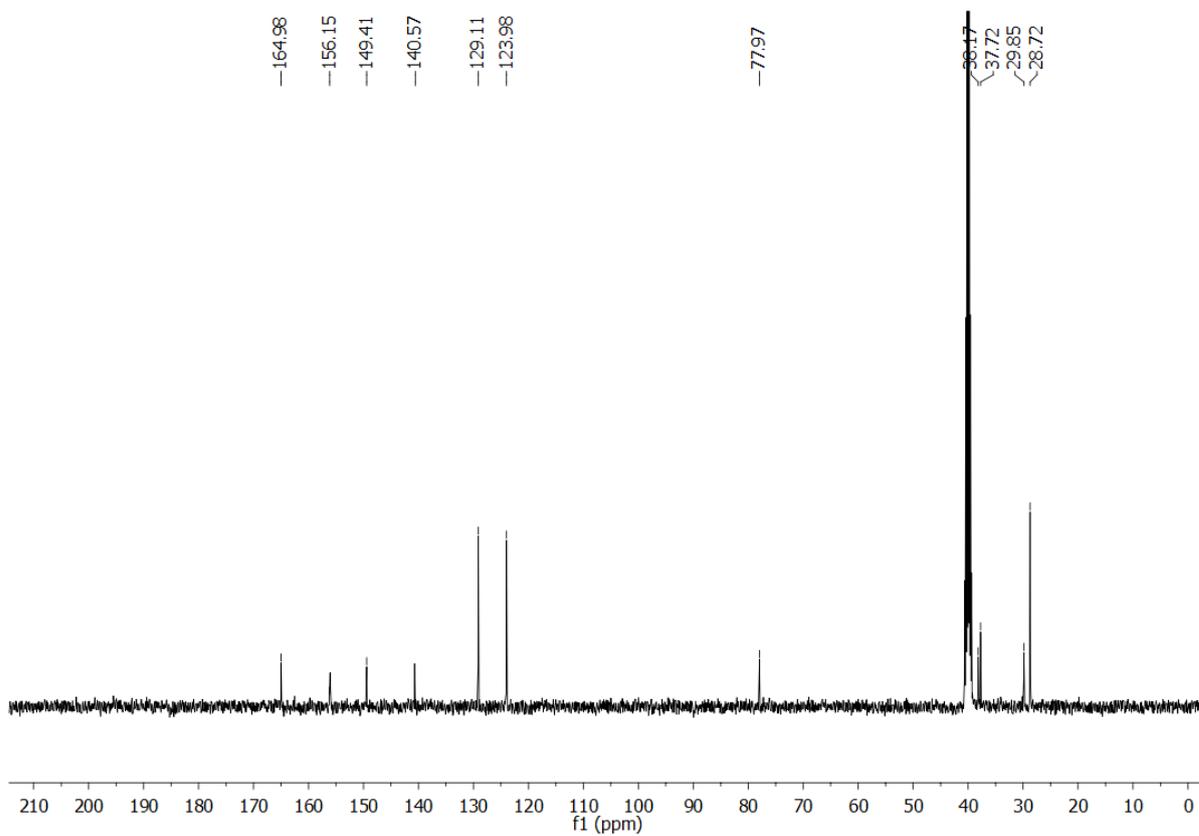
**Nota:**

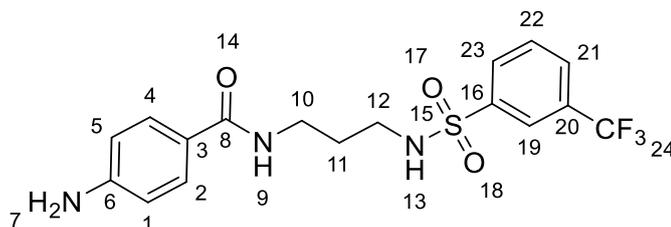
s = singleto, *sl* = singleto largo, *d* = dubleto, *t* = tripleto, *quarta* = quarteto aparente, *quint* = quinteto

Espectro de RMN ^{13}C do composto 81

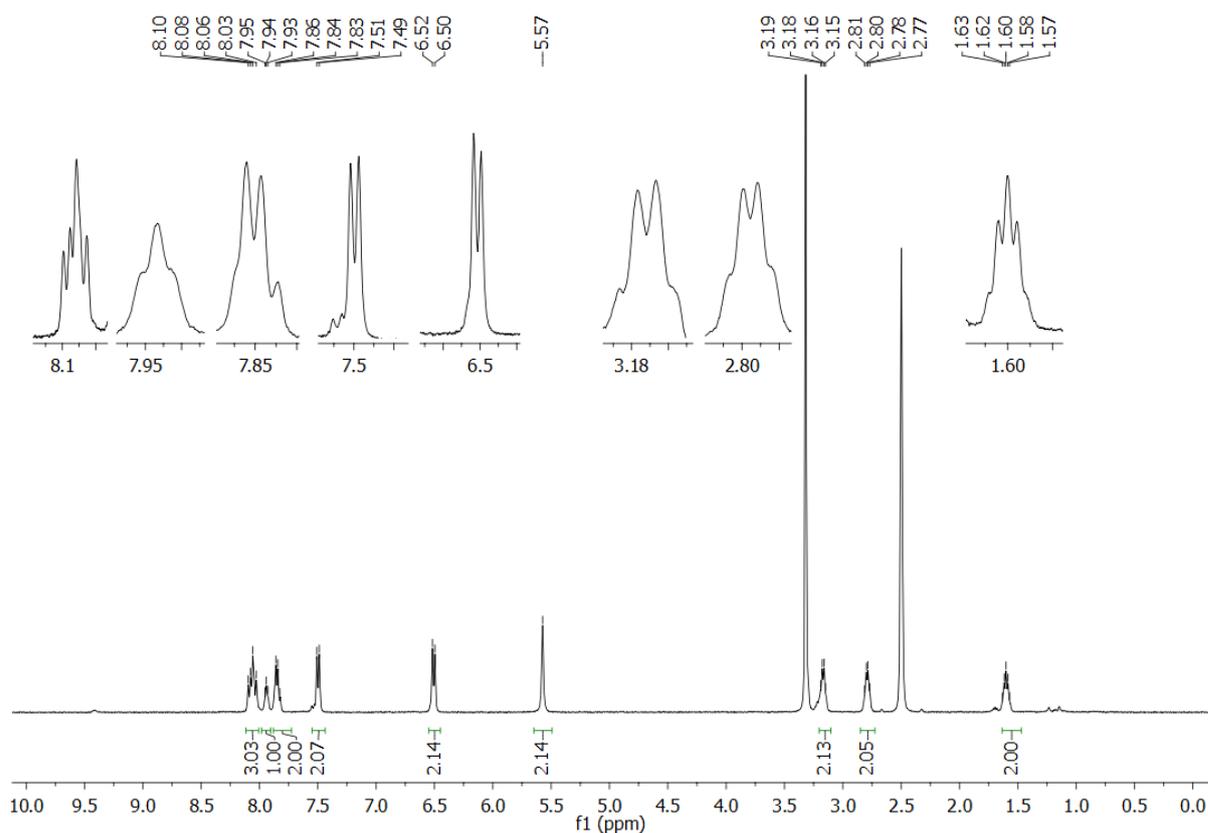
 RMN ^{13}C ((CD $_3$) $_2$ SO) 100 MHz, δ

δ : 164,98 (C13), 156,15 (C1), 149,41 (C18), 140,57 (C14), 129,11 (C16,20), 123,98 (C17,19), 77,97 (C8), 38,17 (C5), 37,72 (C3), 29,85 (C4), 28,72 (C9,10,11)

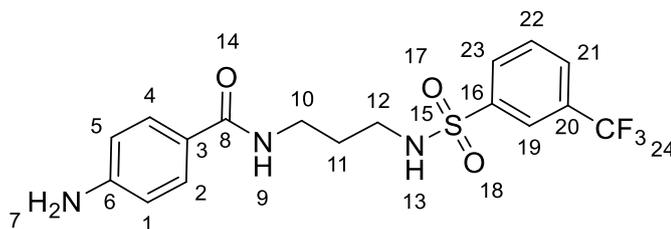


Espectro de RMN ^1H do composto 82RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 400 MHz, δ

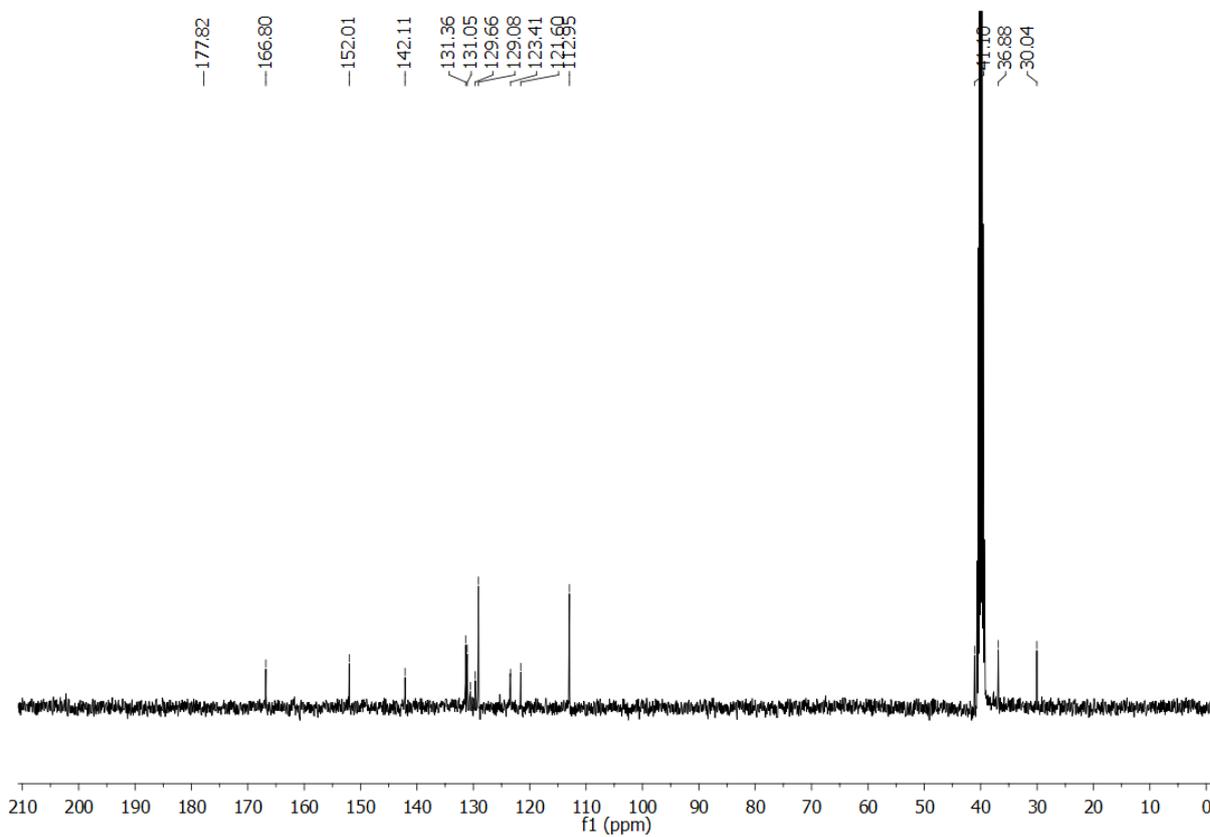
δ : 8,03-8,10 (3 H, *m*, 9-NH e 19,21-ArH), 7,94 (1 H, *ta*, 13-NH), 7,86-7,83 (2 H, *m*, 22,23-ArH), 7,50 (2 H, *d*, $J = 8,0$; 2,4-ArH), 6,51 (2 H, *d*, $J = 8,0$; 5,1-ArH), 5,57 (2 H, *s*, 7-NH $_2$), 3,17 (2 H, *quarta*, 10-CH $_2$), 2,79 (2 H, *quarta*, 12-CH $_2$), 1,60 (2 H, *quinta*, 11-CH $_2$)

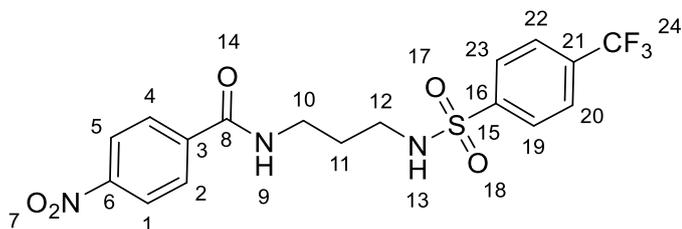
**Nota:**

s = singleto, *d* = dubleto, *ta* = tripleto aparente, *quarta* = quarteto aparente, *quinta* = quinteto aparente, *m* = multipleteo

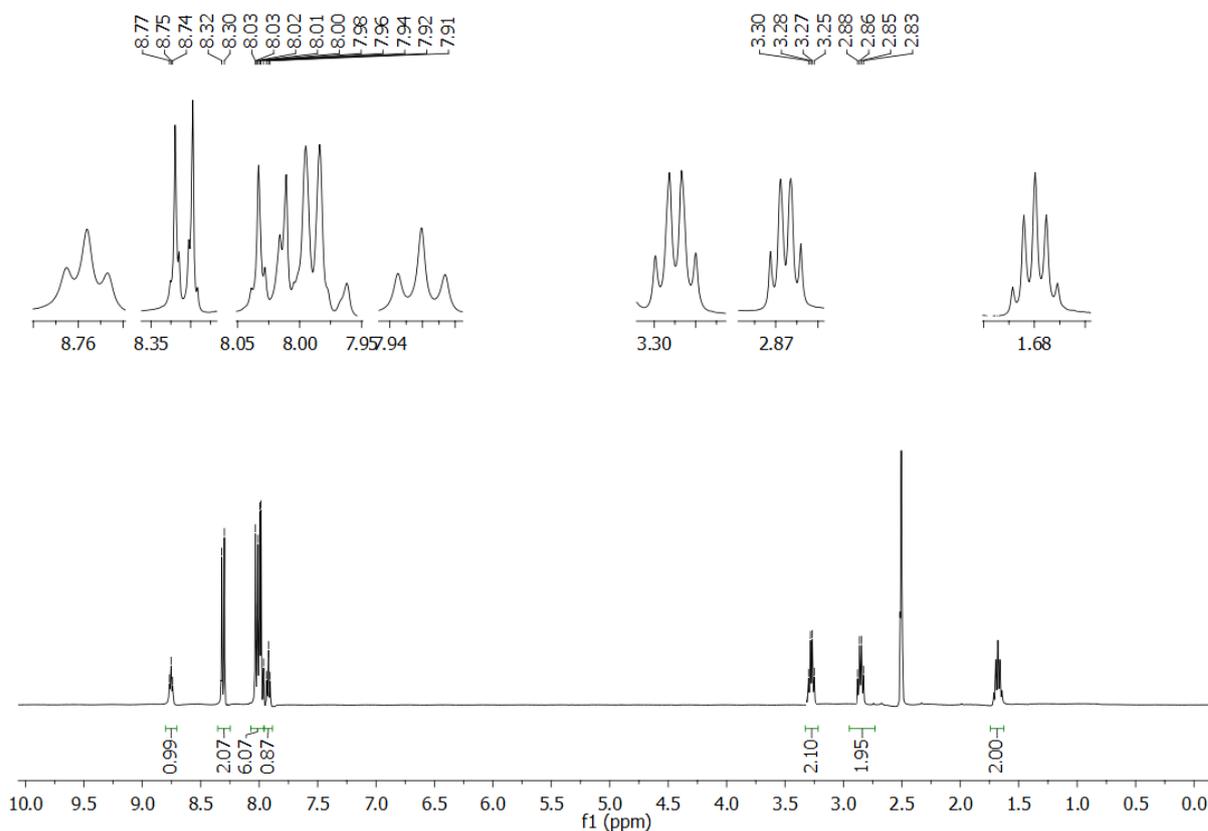
Espectro de RMN ^{13}C do composto 82RMN ^{13}C ((CD_3) $_2\text{SO}$) 100 MHz, δ

δ : 177,82 (C8), 166,80 (C6), 152,01 (C16), 142,11 (C20,23), 131,36 (C22),
131,05 (C21), 129,66 (C3), 129,08 (C2,4), 123,41 (C24), 121,60 (C19),
112,95 (C1,5), 41,10 (C10), 36,88 (C12), 30,04 (C11)

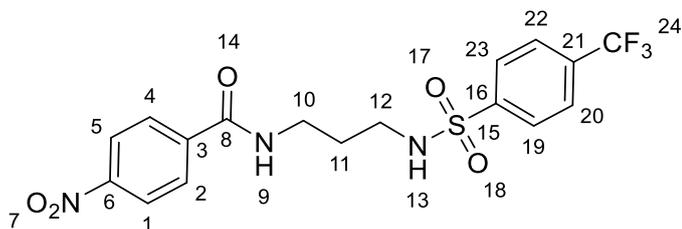


Espectro de RMN ^1H do composto 83RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 400 MHz, δ

δ : 8,75 (1 H, *t*, $J = 6,5$; 9-NH), 8,31 (2 H, *d*, $J = 9,2; 1,5$ -ArH), 8,03-7,96 (6 H, *m*, 2,4,19,20,22,23-ArH), 7,92 (1 H, *t*, $J = 6,5$; 13-NH), 3,27 (2 H, *quart*, $J = 6,8$; 10- CH_2), 2,85 (2 H, *quart*, $J = 6,8$; 12- CH_2), 1,68 (2 H, *quint*, $J = 6,8$; 11- CH_2)

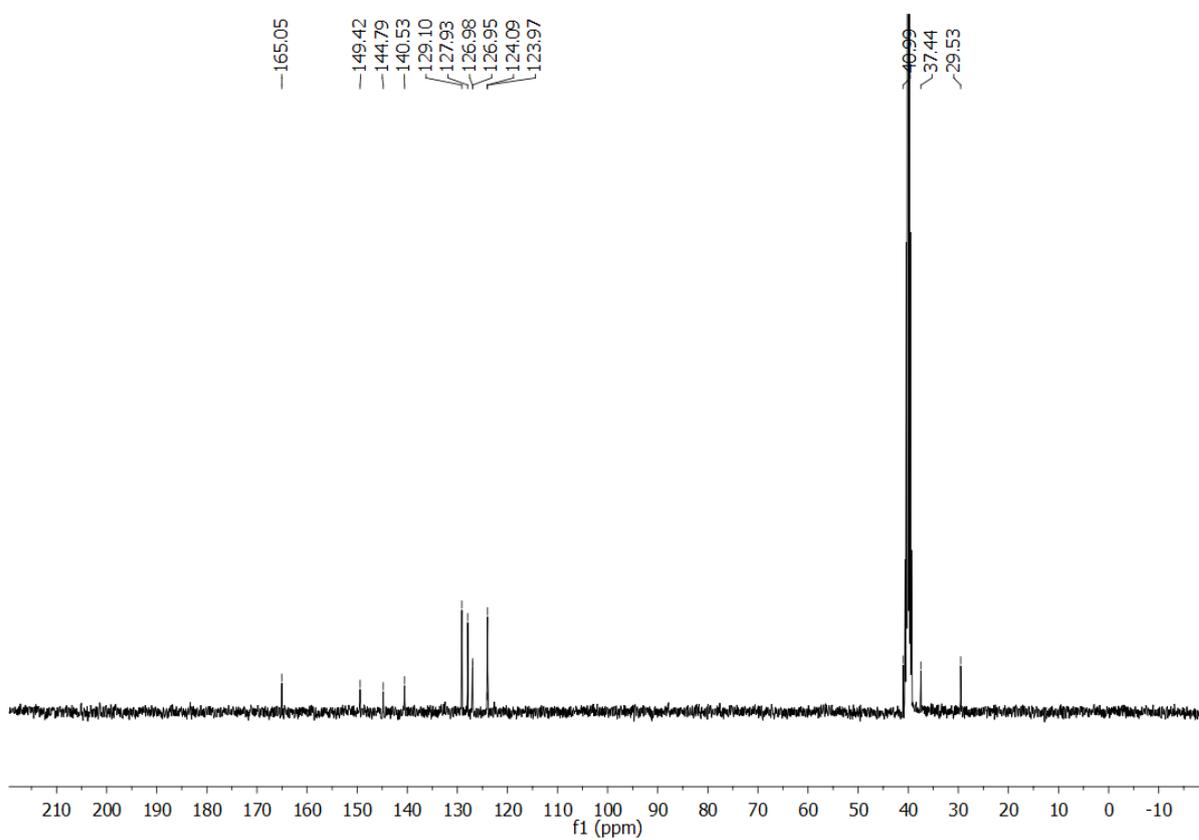
**Nota:**

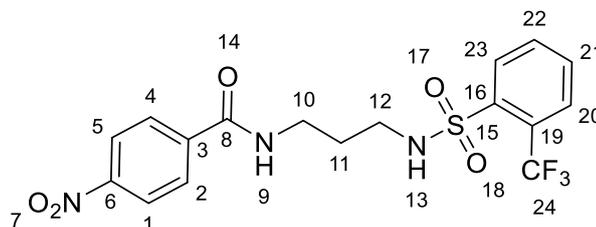
d = dubleto, *t* = tripleto, *quart* = quarteto, *quint* = quinteto, *m* = multipleto

Espectro de RMN ^{13}C do composto 83

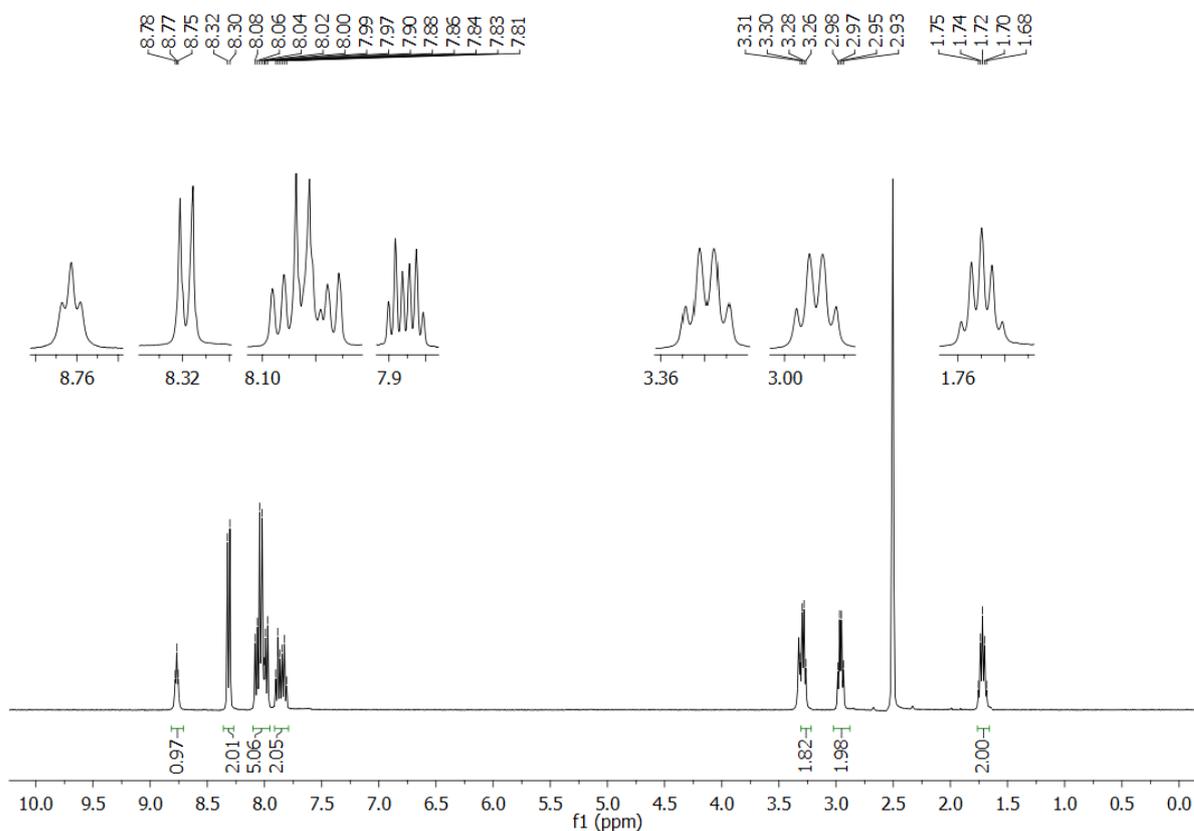
 RMN ^{13}C ((CD_3) $_2\text{SO}$) 100 MHz, δ

δ : 165,05 (C8), 149,42 (C6), 144,79 (C16), 140,53 (C3), 129,10 (C2,4),
 127,93 (C19,23), 126,98 (C20,22), 126,95 (C21), 124,09 (C1,5), 123,97
 (C24), 40,99 (C10), 37,44 (C12), 29,53 (C11)

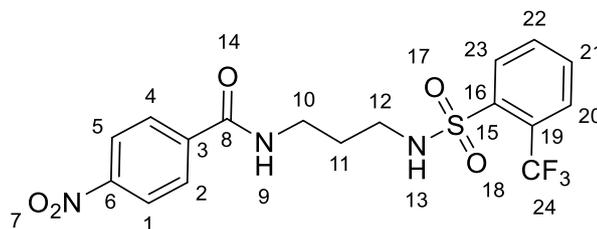


Espectro de RMN ^1H do composto 84RMN ^1H ((CD $_3$) $_2$ SO) 400 MHz, δ

δ : 8,77 (1 H, *t*, $J = 6,4$; 9-NH), 8,31 (2 H, *d*, $J = 8,8$; 1,5-ArH), 8,08-7,97 (5 H, *m*, 13-NH e 2,4,20,23-ArH), 7,90-7,81 (2 H, *m*, 21,22-ArH), 3,27 (2 H, *quart*, $J = 6,8$; 10-CH $_2$), 2,96 (2 H, *quart*, $J = 6,8$; 12-CH $_2$), 1,72 (2 H, *quint*, $J = 6,8$; 11-CH $_2$)

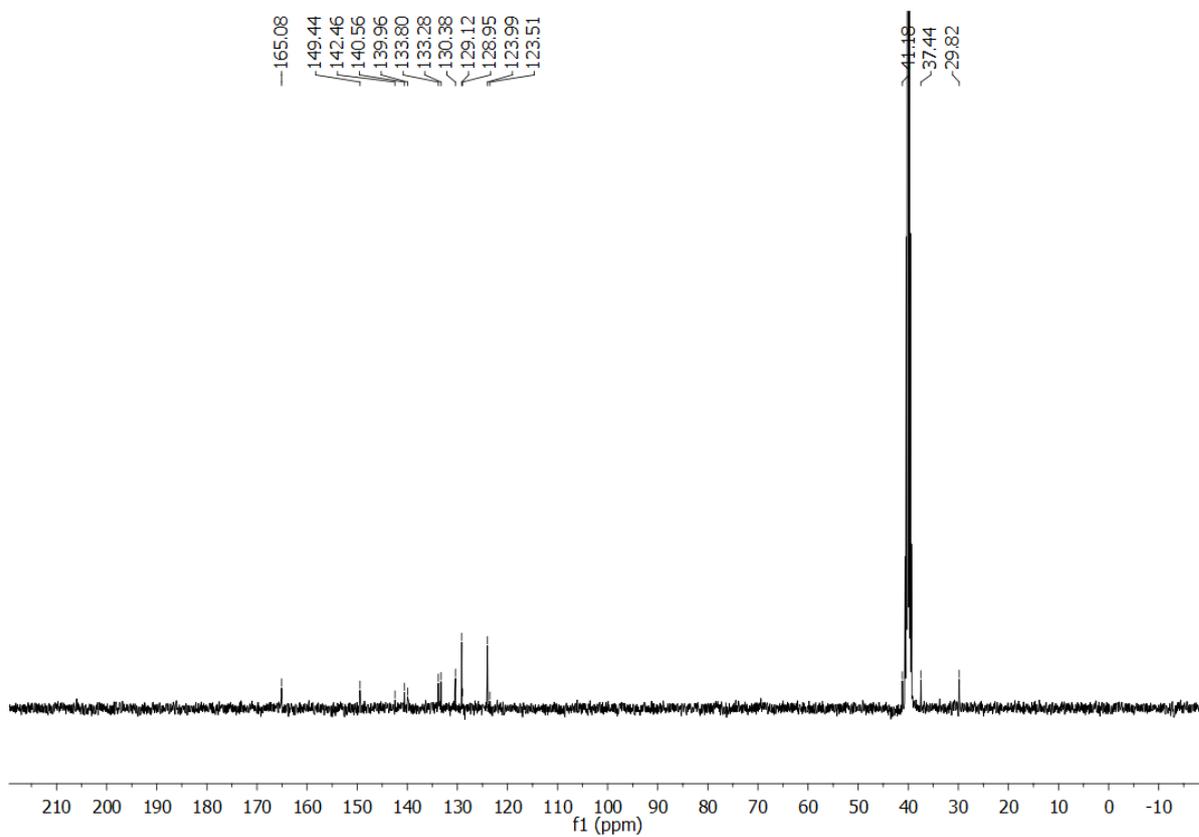
**Nota:**

d = dubleto, *t* = tripleto, *quart* = quarteto, *quint* = quinteto, *m* = multipeto

Espectro de RMN ^{13}C do composto 84

 RMN ^{13}C ((CD_3) $_2\text{SO}$) 100 MHz, δ

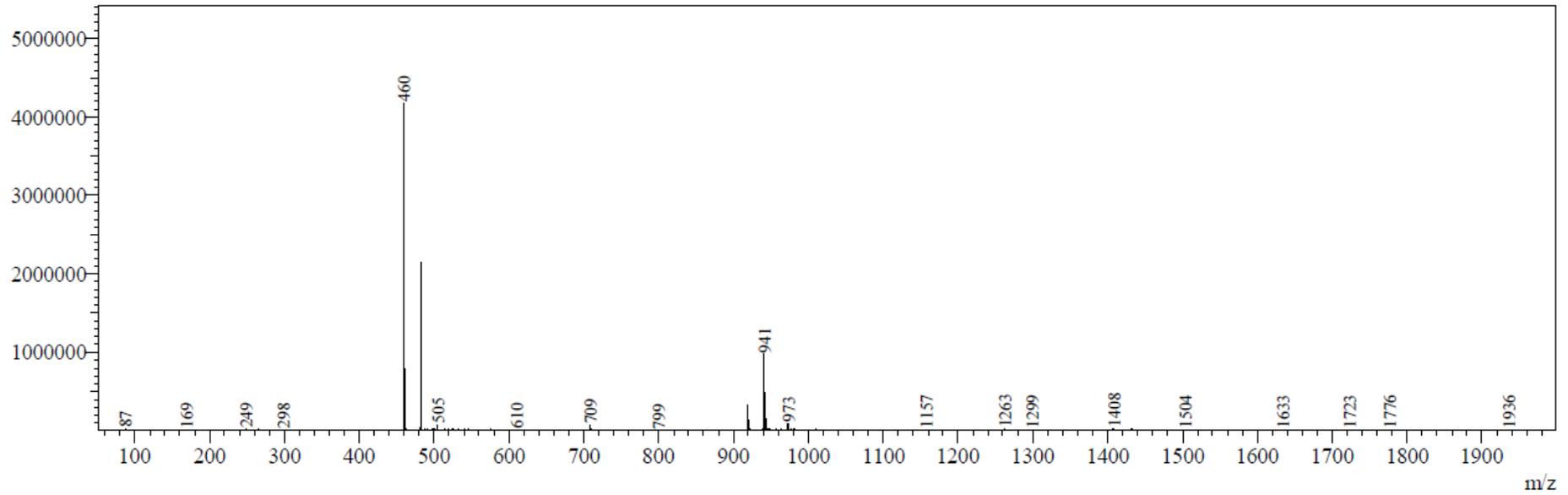
δ : 165,08 (C8), 149,44 (C6), 142,46 (C3), 140,56 (C16), 139,96 (C21),
 133,80 (C23), 133,28 (C19), 130,38 (C22), 129,12 (C2,4), 128,95 (C20),
 123,99 (C1,5), 123,51 (C24), 41,18 (C10), 37,44 (C12), 29,82 (C11)



ANEXO II - ESPECTROS DE MASSAS

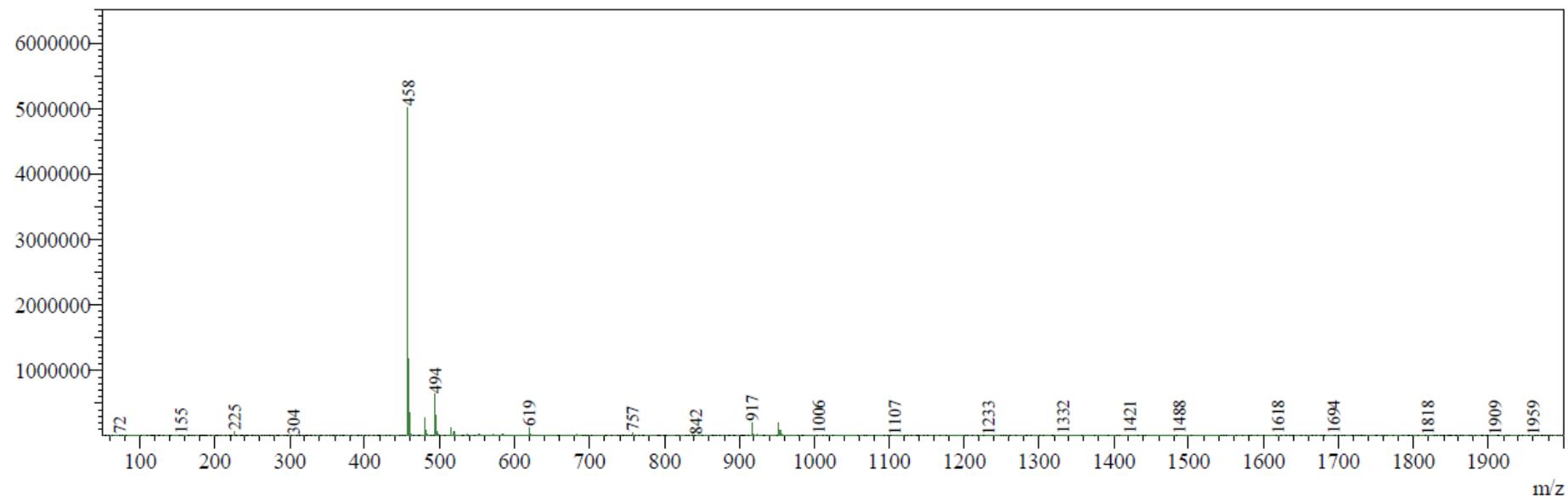
Espectro de massas do composto 8 - Positivo

R. Time: 6.600(Scan#: 1981)
MassPeaks: 1336 BasePeak: 460(4178865)
R. Time: 6.600(Scan#: 1981)
MassPeaks: 1336 BasePeak: 460(4178865)
Spectrum Mode: Averaged 6.593-6.607(1979-1983)
BG Mode: Calc Polarity: Positive Segment 1 - Event 1



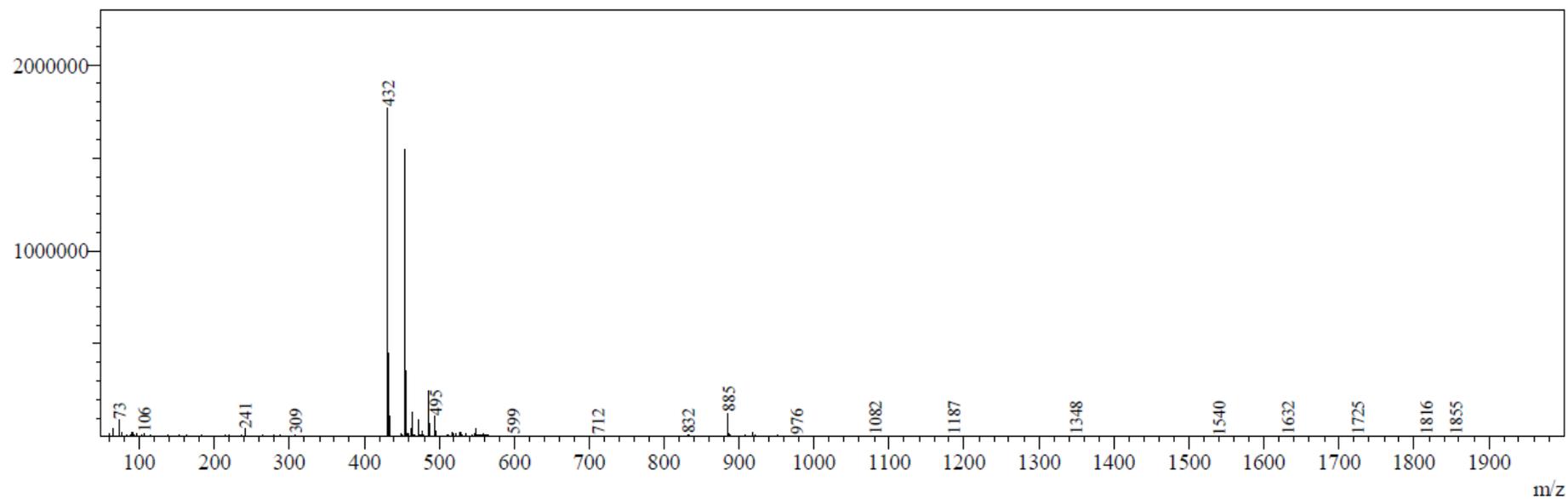
Espectro de massas do composto 8 – Negativo

R. Time: 6.602(Scan#:1982)
MassPeaks:1272 BasePeak:458(5019028)
Spectrum Mode:Averaged 6.596-6.609(1980-1984)
BG Mode:Calc Polarity:Negative Segment 1 - Event 2



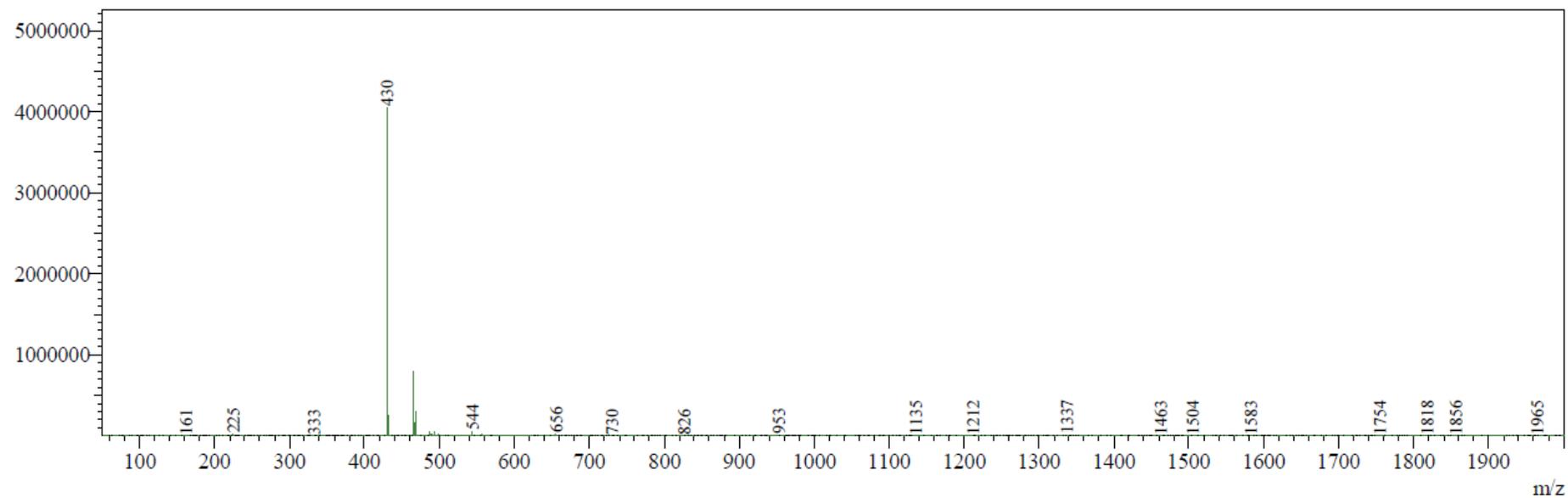
Espectro de massas do composto 63 – Positivo

R. Time: 7.540 (Scan#: 2263)
Mass Peaks: 1159 Base Peak: 432 (1771160)
Spectrum Mode: Averaged 7.533-7.547 (2261-2265)
BG Mode: Calc Polarity: Positive Segment 1 - Event 1



Espectro de massas do composto 63 – Negativo

R. Time: 7.542(Scan#:2264)
MassPeaks:987 BasePeak:430(4053947)
Spectrum Mode:Averaged 7.536-7.549(2262-2266)
BG Mode:Calc Polarity:Negative Segment 1 - Event 2



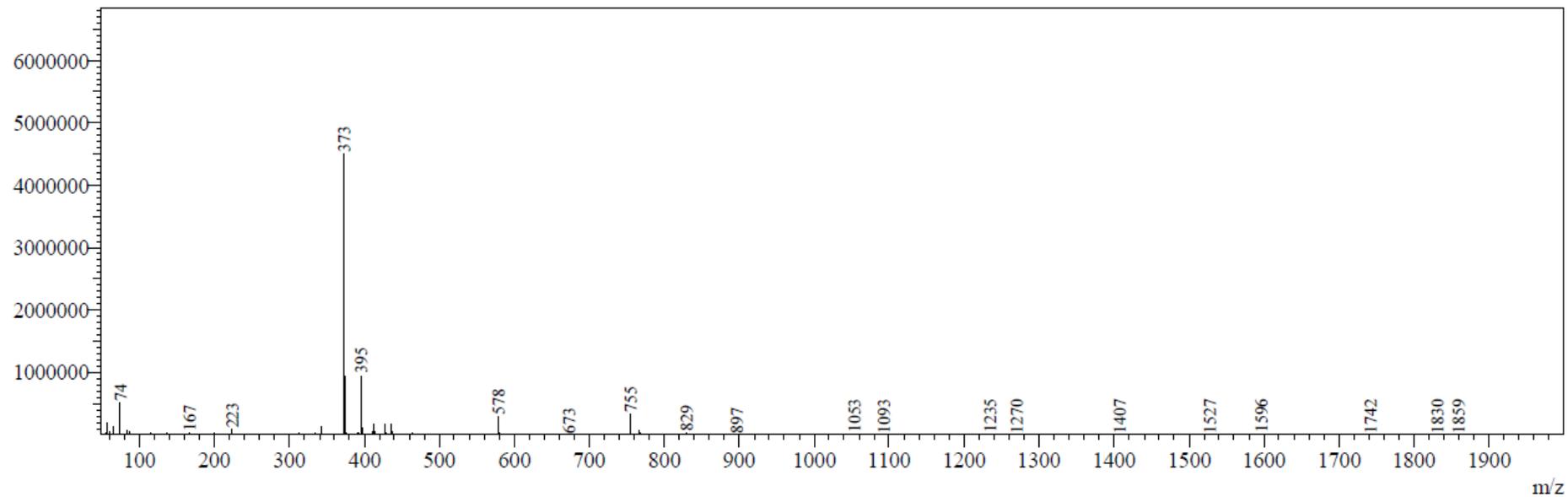
Espectro de massas do composto 66 – Positivo

R.Time:7.053(Scan#:2117)

MassPeaks:1423 BasePeak:373(5279993)

Spectrum Mode:Single 7.053(2117)

BG Mode:None Polarity:Positive Segment 1 - Event 1



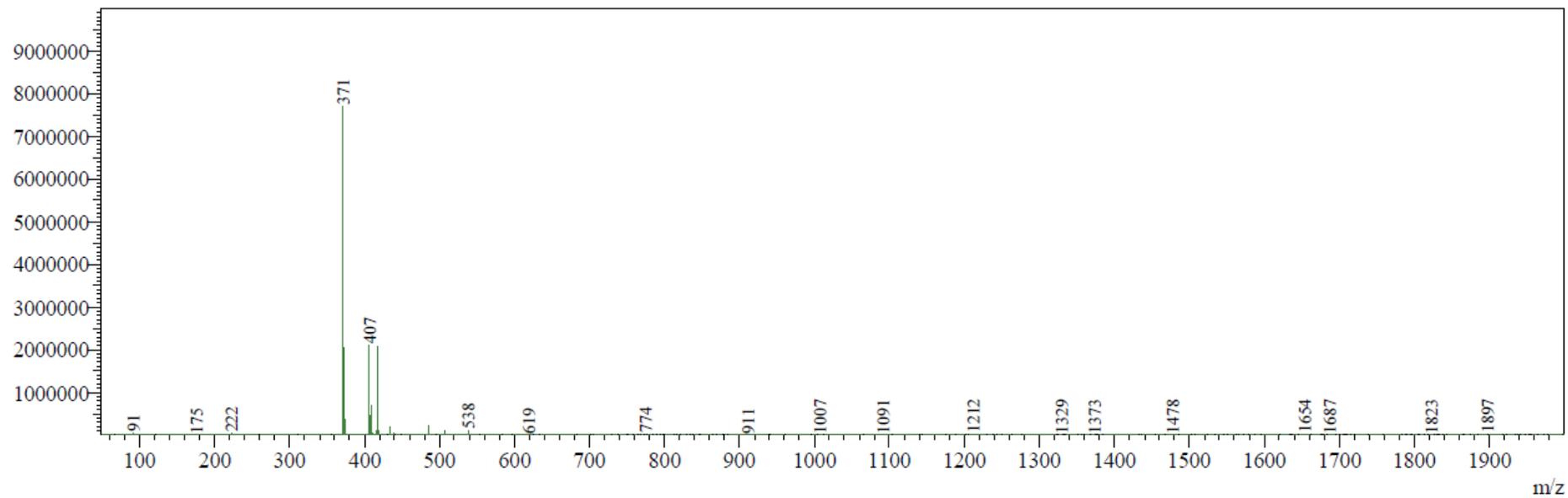
Espectro de massas do composto 66 – Negativo

R.Time:7.056(Scan#:2118)

MassPeaks:1573 BasePeak:371(7709067)

Spectrum Mode:Single 7.056(2118)

BG Mode:None Polarity:Negative Segment 1 - Event 2



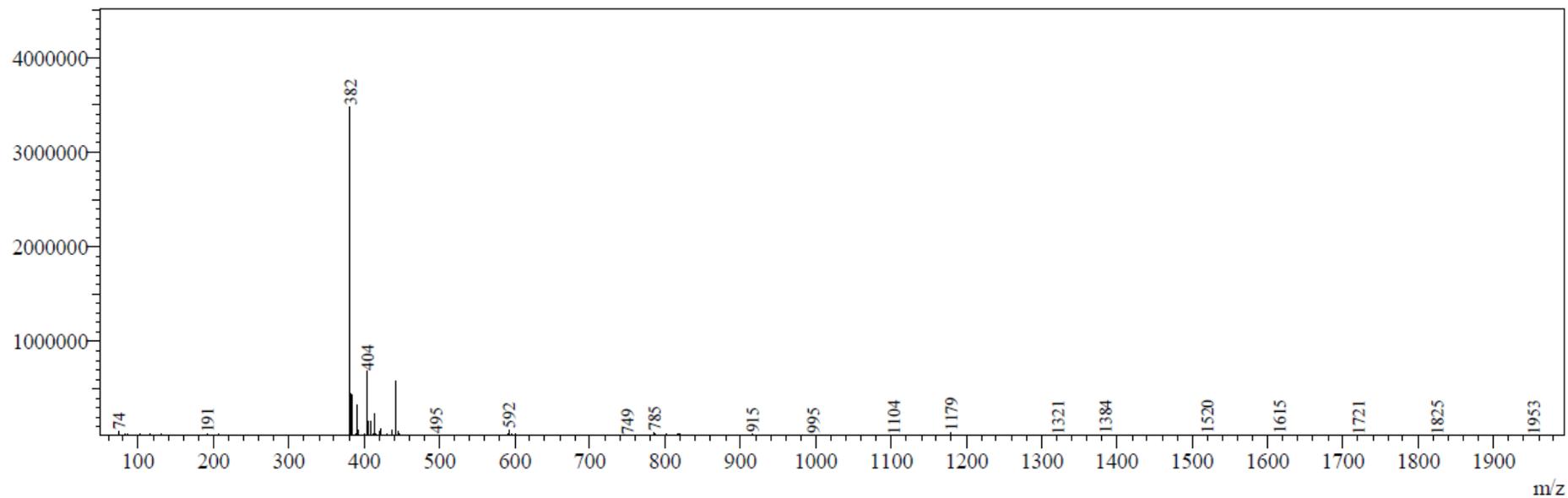
Espectro de massas do composto 67 – Positivo

R. Time: 6.953 (Scan#: 2087)

Mass Peaks: 1148 Base Peak: 382 (3483461)

Spectrum Mode: Averaged 6.947-6.960 (2085-2089)

BG Mode: Calc Polarity: Positive Segment 1 - Event 1



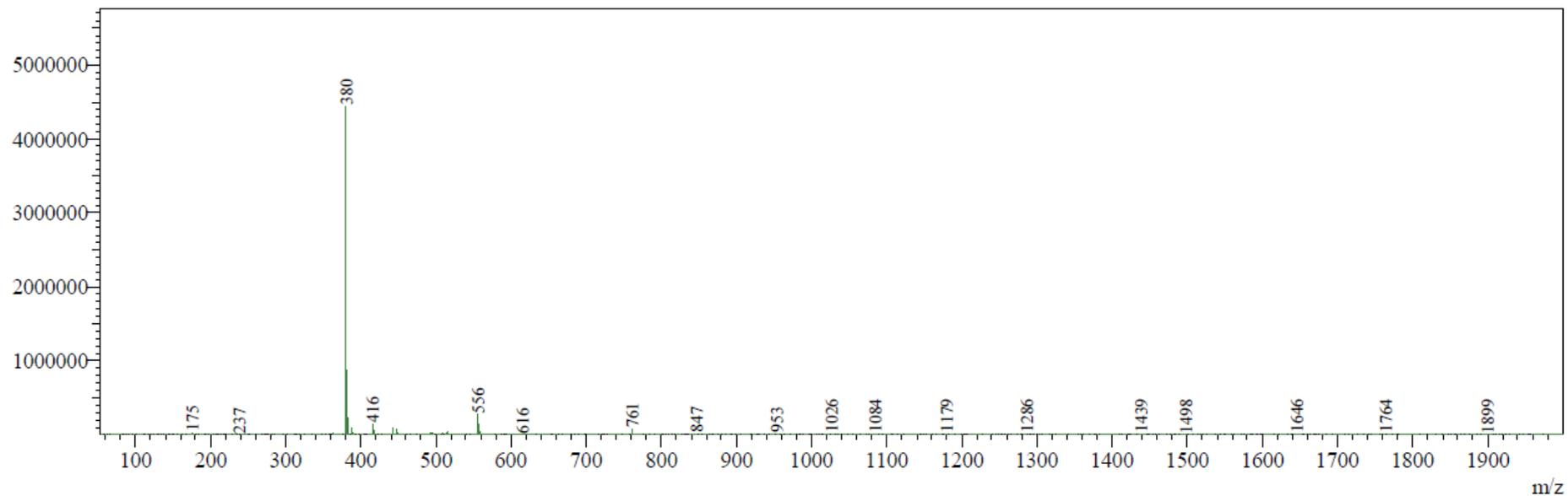
Espectro de massas do composto 67 – Negativo

R. Time: 6.956(Scan#:2088)

MassPeaks: 1193 BasePeak: 380(4444322)

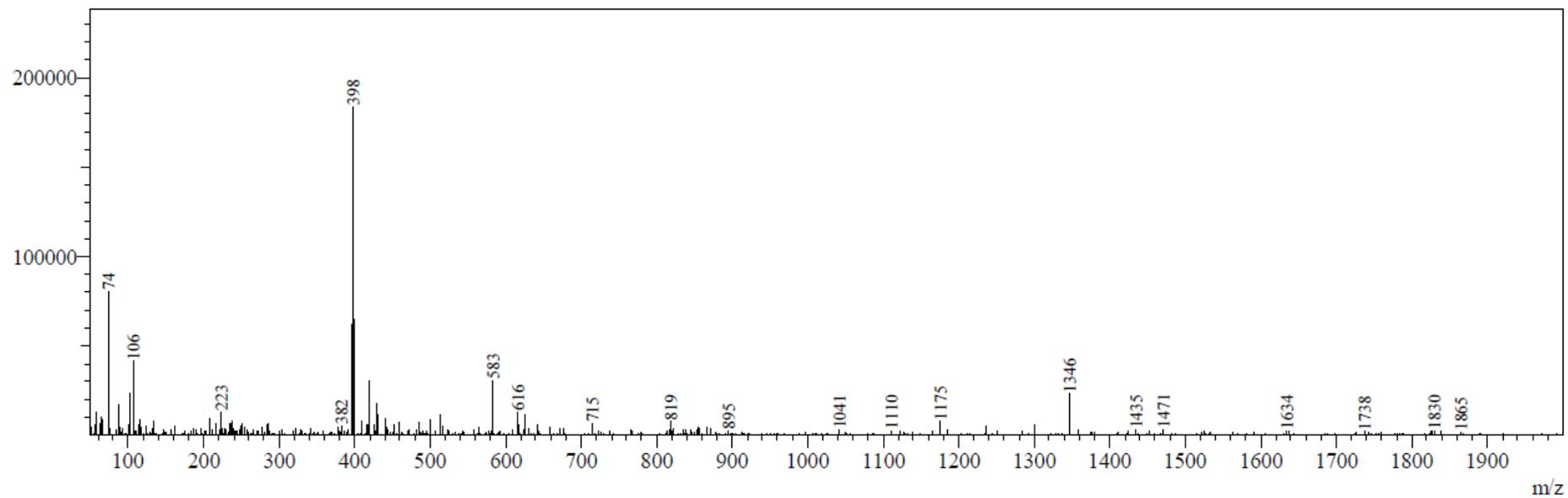
Spectrum Mode: Averaged 6.949-6.962(2086-2090)

BG Mode: Calc Polarity: Negative Segment 1 - Event 2



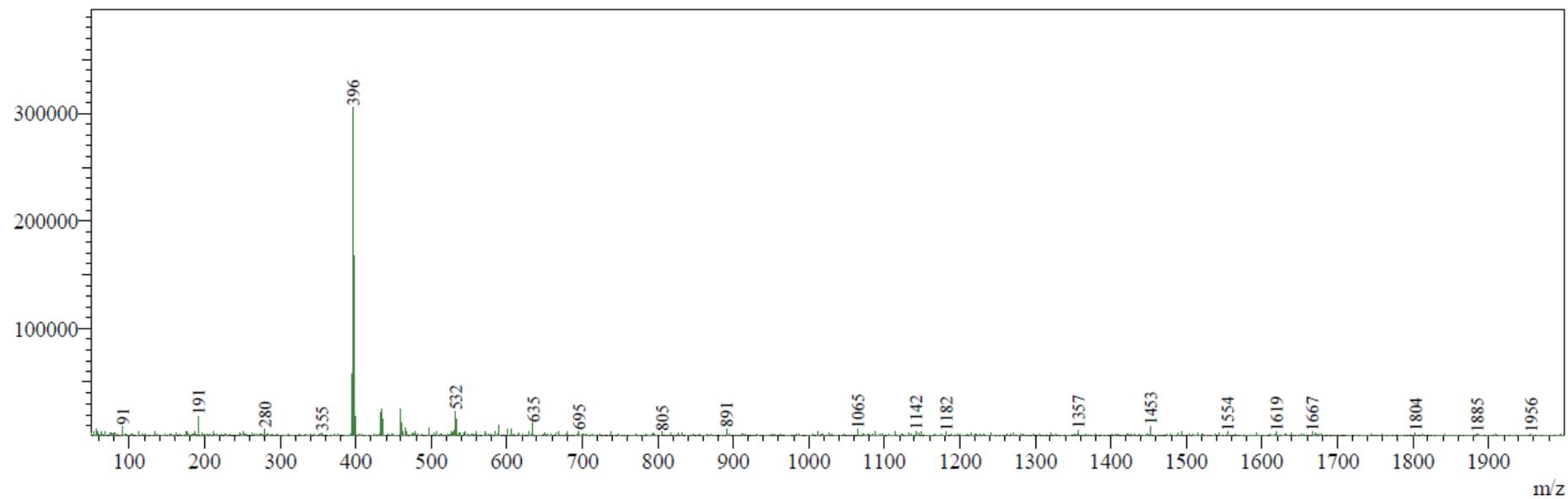
Espectro de massas do composto 68 – Positivo

R. Time: 7.433 (Scan#: 2231)
Mass Peaks: 1030 Base Peak: 398 (183895)
Spectrum Mode: Averaged 7.427-7.440 (2229-2233)
BG Mode: Calc Polarity: Positive Segment 1 - Event 1



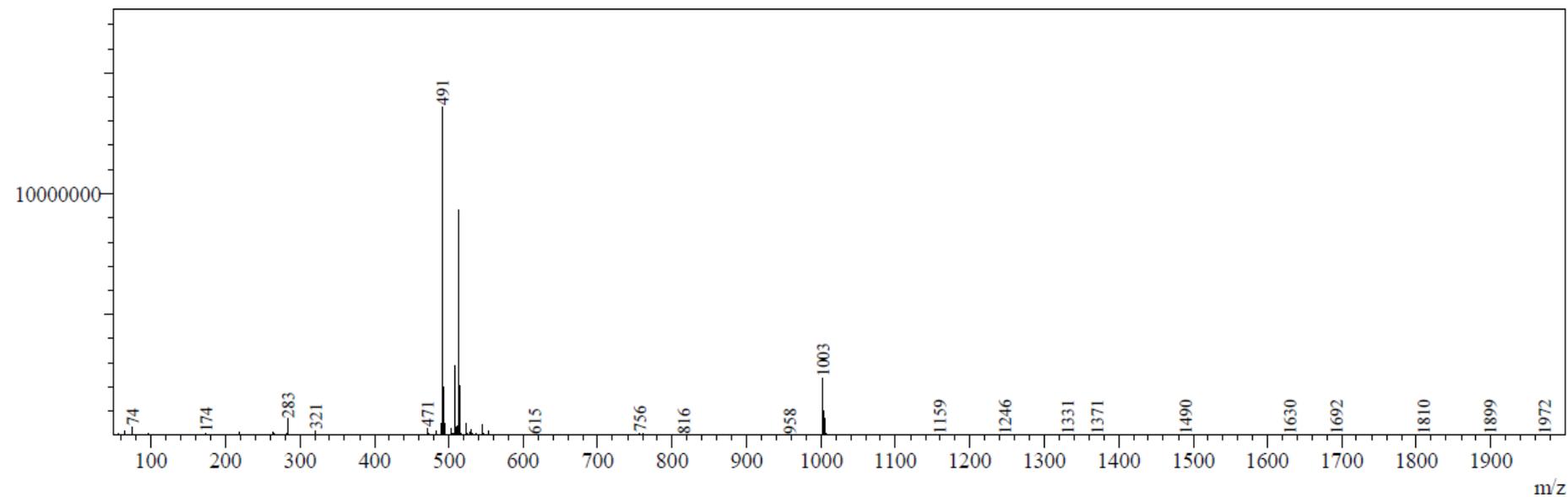
Espectro de massas do composto 68 – Negativo

R. Time: 7.436 (Scan#: 2232)
Mass Peaks: 1063 Base Peak: 396 (306003)
Spectrum Mode: Averaged 7.429-7.442 (2230-2234)
BG Mode: Calc Polarity: Negative Segment 1 - Event 2



Espectro de massas do composto 79 – Positivo

R.Time:7.887(Scan#:2367)
MassPeaks:1676 BasePeak:491(13600283)
Spectrum Mode:Single 7.887(2367)
BG Mode:None Polarity:Positive Segment 1 - Event 1



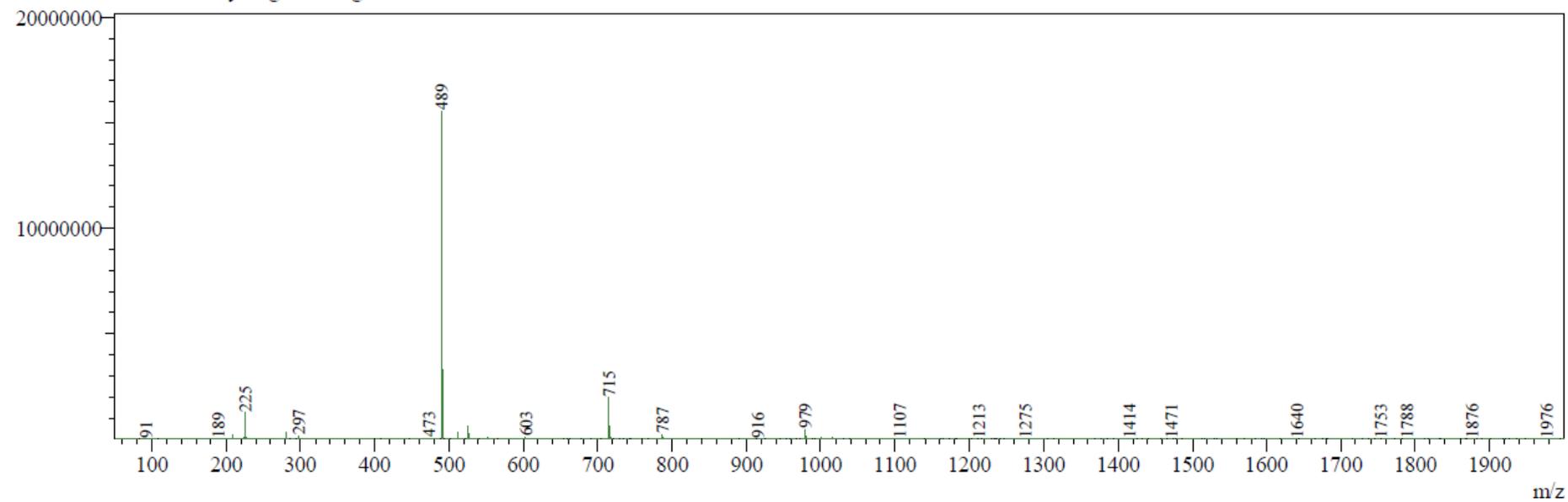
Espectro de massas do composto 79 – Negativo

R. Time: 7.889 (Scan#: 2368)

Mass Peaks: 1696 Base Peak: 489 (15557173)

Spectrum Mode: Single 7.889 (2368)

BG Mode: None Polarity: Negative Segment 1 - Event 2



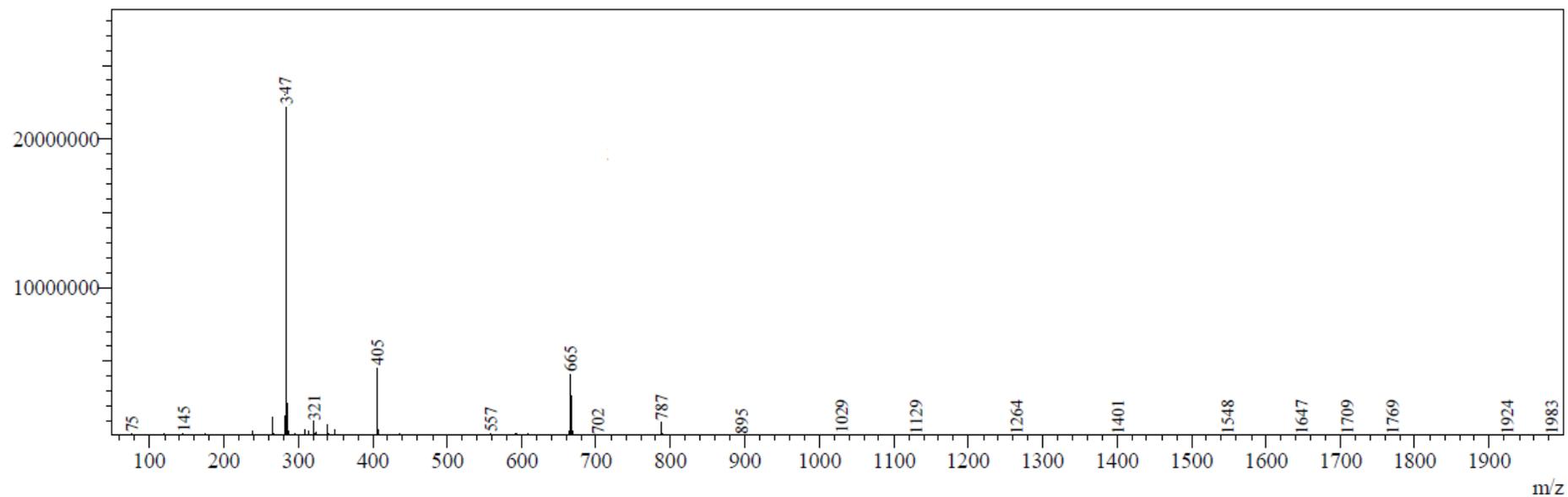
Espectro de massas do composto 80 – Positivo

R.Time:7.720(Scan#:2317)

MassPeaks:1579 BasePeak:347(22186368)

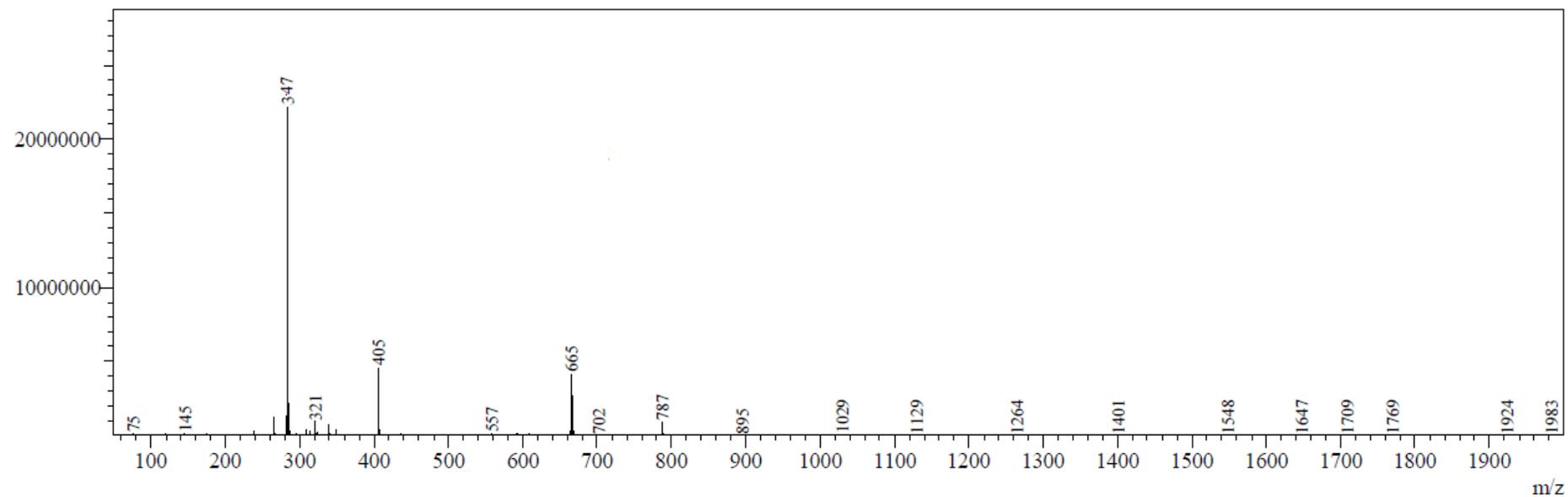
Spectrum Mode:Single 7.720(2317)

BG Mode:None Polarity:Positive Segment 1 - Event 1



Espectro de massas do composto 80 – Negativo

R.Time:7.720(Scan#:2317)
MassPeaks:1579 BasePeak:347(22186368)
Spectrum Mode:Single 7.720(2317)
BG Mode:None Polarity:Positive Segment 1 - Event 1



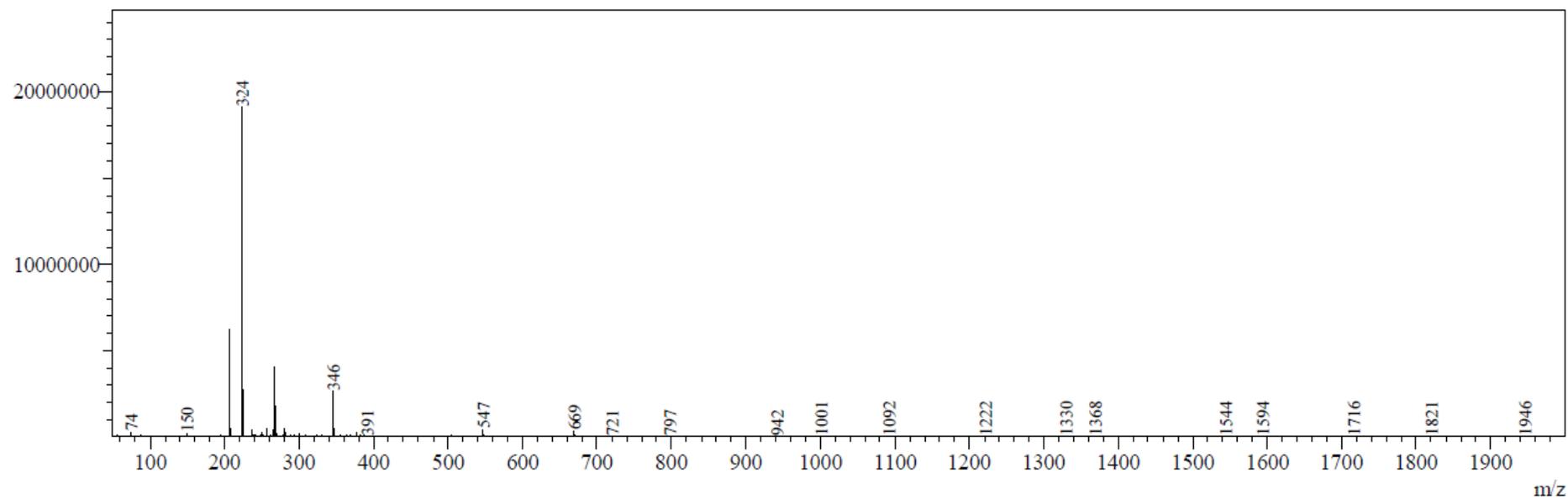
Espectro de massas do composto 81 – Positivo

R.Time:7.260(Scan#:2179)

MassPeaks:1756 BasePeak:324(19066428)

Spectrum Mode:Single 7.260(2179)

BG Mode:None Polarity:Positive Segment 1 - Event 1



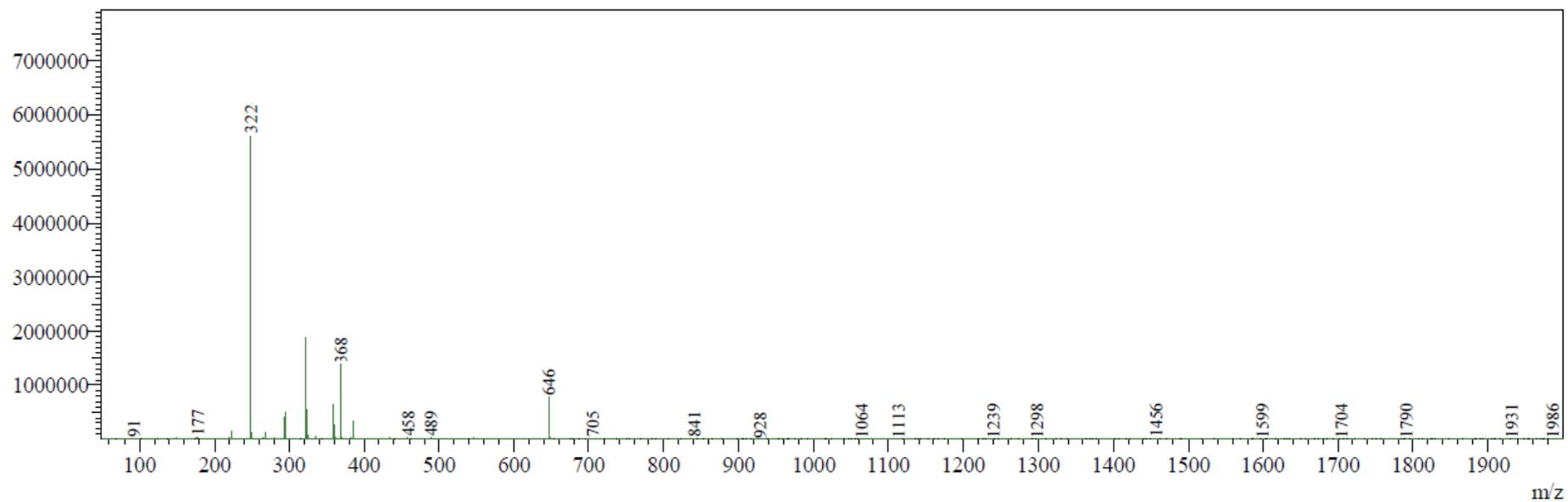
Espectro de massas do composto 81 – Negativo

R.Time:7.262(Scan#:2180)

MassPeaks:1625 BasePeak:322(6124047)

Spectrum Mode:Single 7.262(2180)

BG Mode:None Polarity:Negative Segment 1 - Event 2



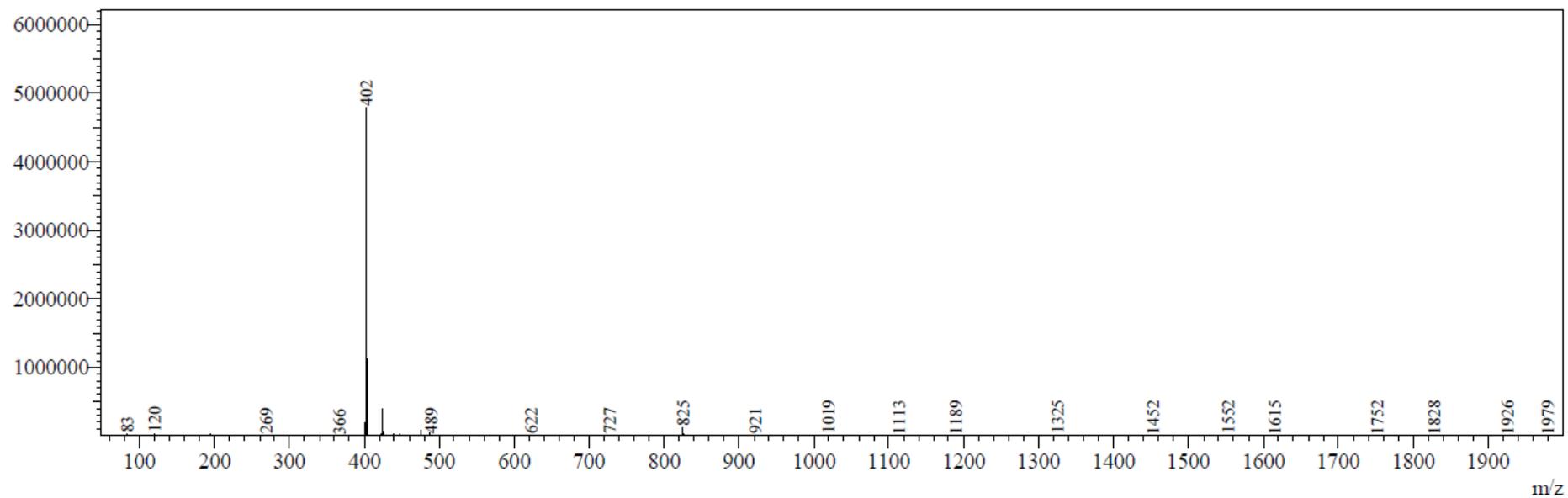
Espectro de massas do composto 82 – Positivo

R. Time: 6.520 (Scan#: 1957)

Mass Peaks: 1187 Base Peak: 402 (4795393)

Spectrum Mode: Averaged 6.513-6.527 (1955-1959)

BG Mode: Calc Polarity: Positive Segment 1 - Event 1



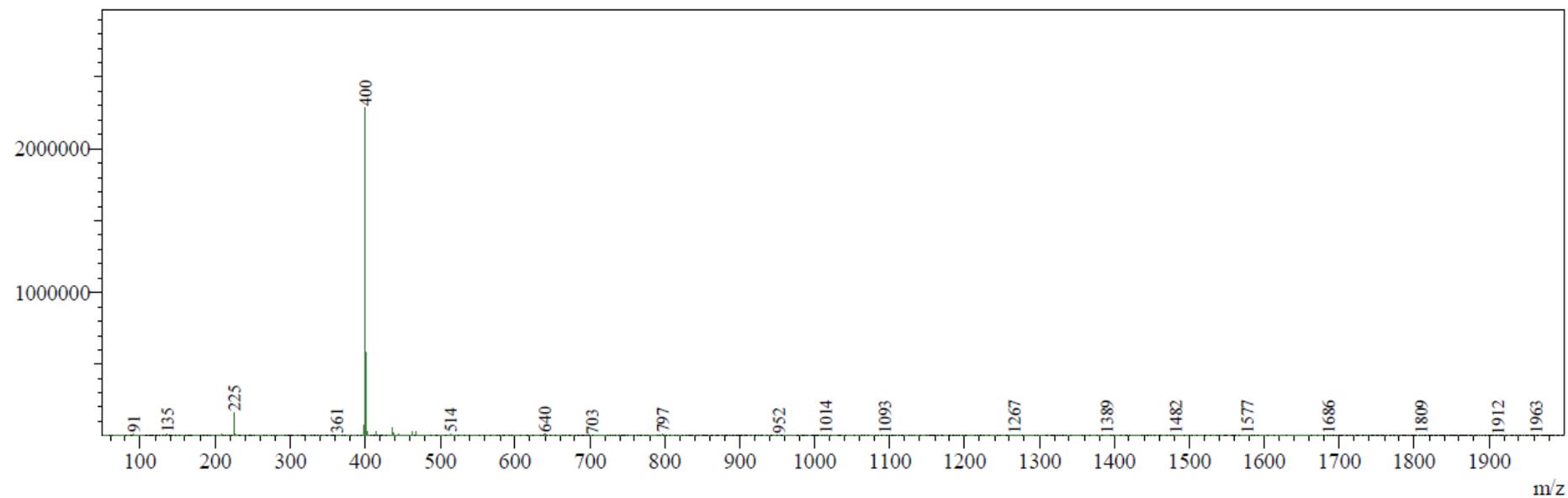
Espectro de massas do composto 82 – Negativo

R.Time:6.522(Scan#:1958)

MassPeaks:935 BasePeak:400(2289928)

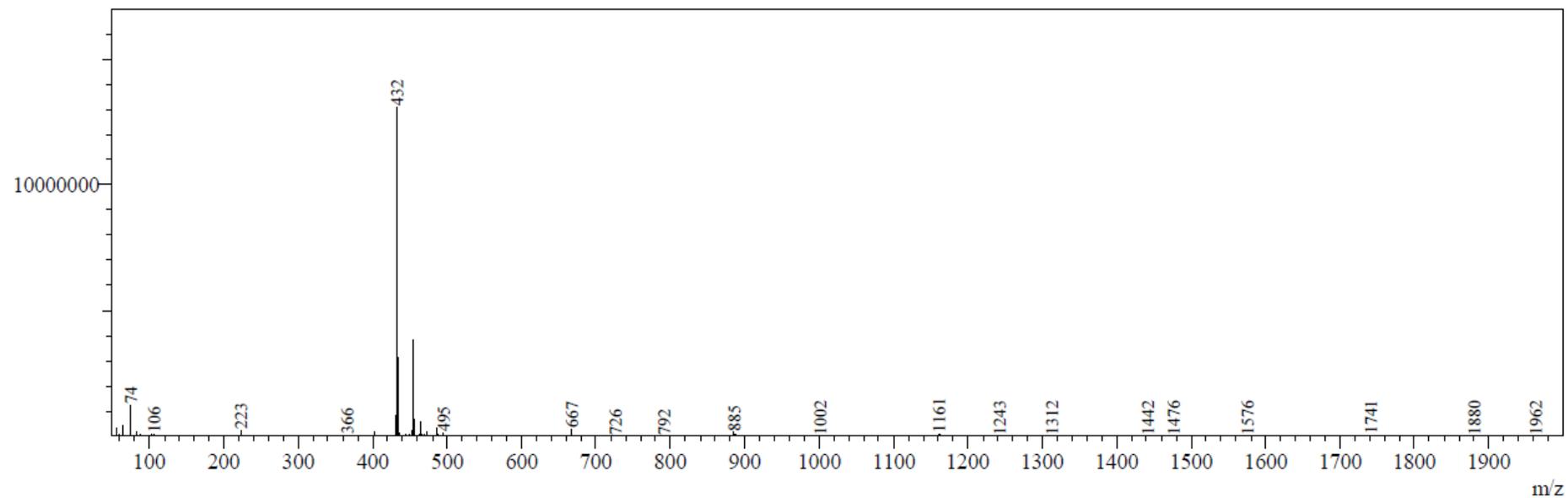
Spectrum Mode:Averaged 6.516-6.529(1956-1960)

BG Mode:Calc Polarity:Negative Segment 1 - Event 2



Espectro de massas do composto 83 – Positivo

R. Time: 7.620 (Scan#: 2287)
Mass Peaks: 1561 Base Peak: 432 (13088426)
Spectrum Mode: Single 7.620 (2287)
BG Mode: None Polarity: Positive Segment 1 - Event 1



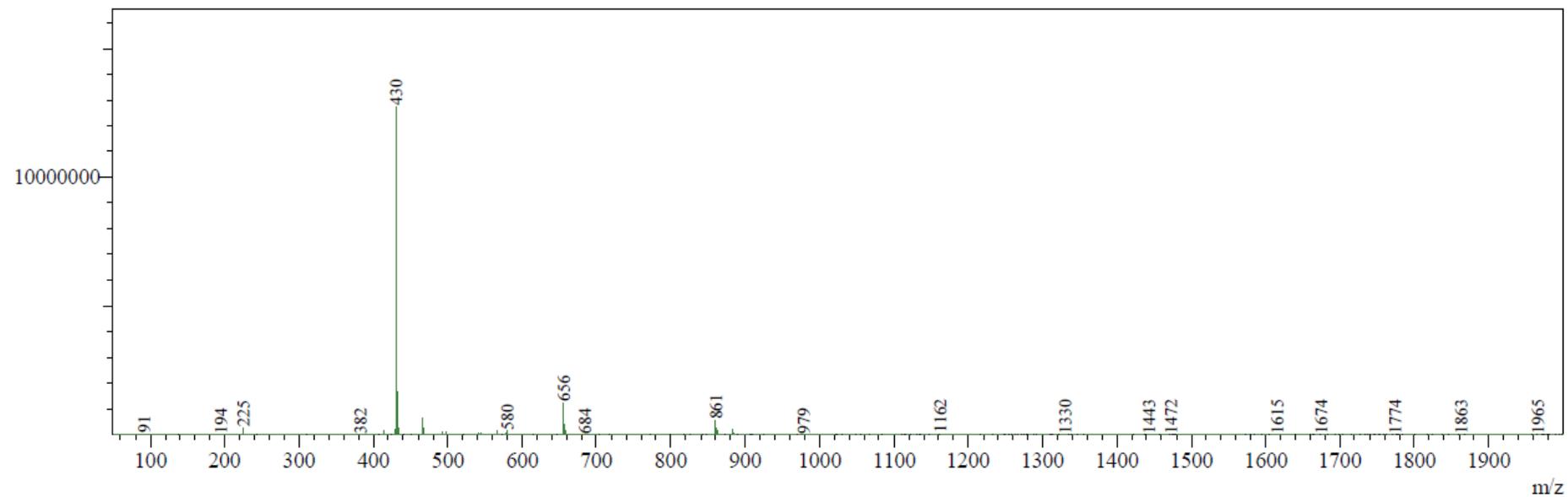
Espectro de massas do composto 83 – Negativo

R. Time: 7.622(Scan#: 2288)

MassPeaks: 1657 BasePeak: 430(12746052)

Spectrum Mode: Single 7.622(2288)

BG Mode: None Polarity: Negative Segment 1 - Event 2



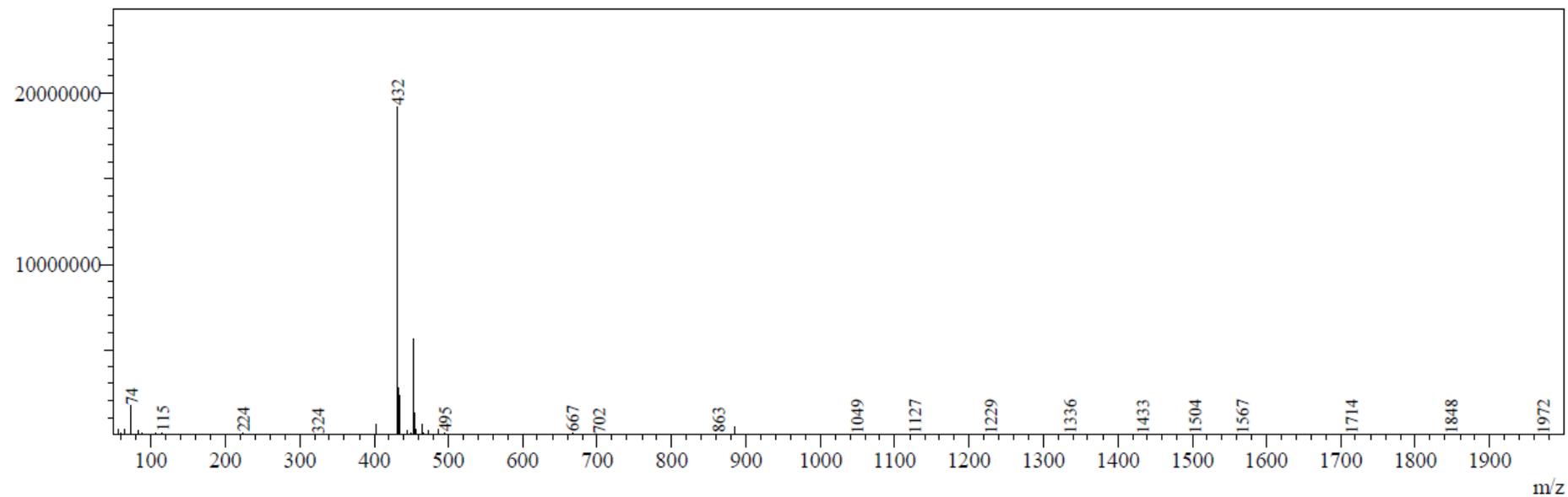
Espectro de massas do composto 84 – Positivo

R.Time:7.227(Scan#:2169)

MassPeaks:1403 BasePeak:432(19232294)

Spectrum Mode:Single 7.227(2169)

BG Mode:None Polarity:Positive Segment 1 - Event 1



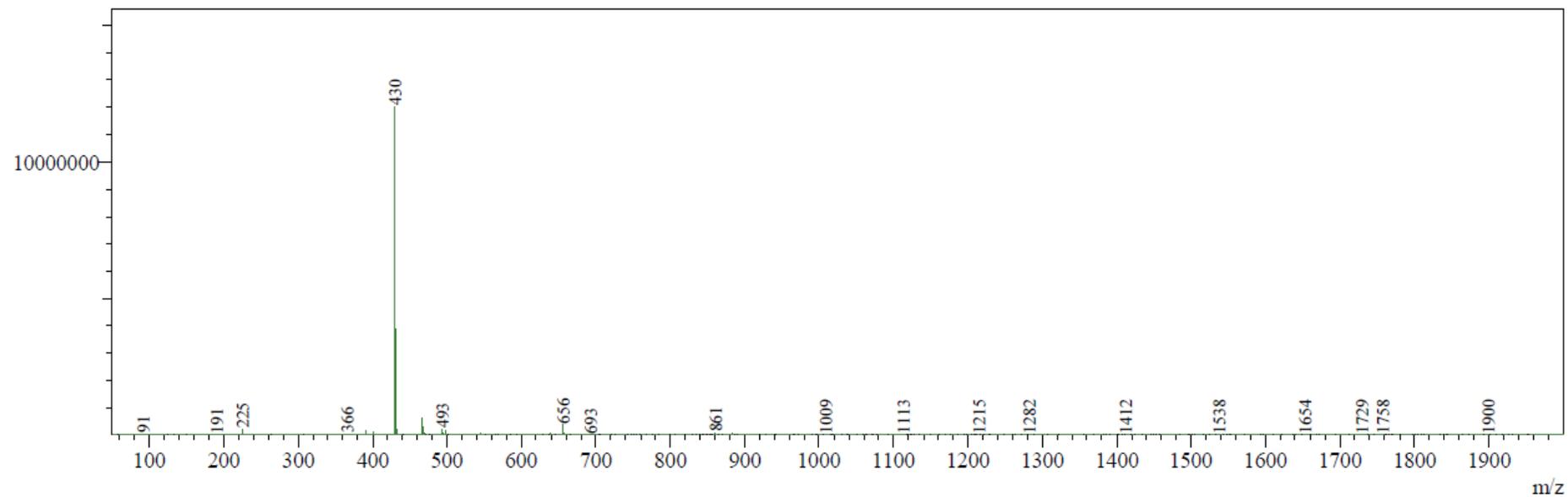
Espectro de massas do composto 84 – Negativo

R. Time: 7.229 (Scan#: 2170)

Mass Peaks: 1548 Base Peak: 430 (12038885)

Spectrum Mode: Single 7.229 (2170)

BG Mode: None Polarity: Negative Segment 1 - Event 2



ANEXO III - FICHA DO ALUNO

ANEXO IV – CURRÍCULO LATTES DO ALUNO