

Ana Beatriz Ramos Caniceiro

#### O PAPEL DOS HALOGÉNIOS NO DESENHO DE FÁRMACOS

O caso da ligação de pequenos ligantes à Transtirretina

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal, área de especialização em Química Biológica, orientada pelo Professor Doutor Rui Manuel Pontes Meireles Ferreira de Brito, e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019

### O PAPEL DOS HALOGÉNEOS NO DESENHO DE FÁRMACOS

#### O caso da ligação de pequenos ligantes à Transtirretina

Ana Beatriz Ramos Caniceiro

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal, área de especialização em Química Biológica, orientada pelo Professor Doutor Rui Manuel Pontes Meireles Ferreira de Brito e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019



#### Agradecimentos

O meu projeto de tese finaliza mais uma etapa da minha vida, a vida académica. Deste modo, não posso deixar de agradecer a quem contribuiu para que este fosse concretizado.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao orientador deste projeto, o Professor Doutor Rui M. M. Brito, pela oportunidade de me integrar no seu grupo de Investigação, pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade, apoio e orientação científica prestada ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Ao Pedro Cruz, não há palavras suficientes para agradecer todo o apoio, paciência, disponibilidade e companheirismo. Obrigada por todo o conhecimento que me transmitiu, por me motivar e incentivar todos os dias a trabalhar para a ciência e por estar sempre presente. Estarei eternamente grata.

À Zaida Almeida agradeço tudo o que me ensinou, o apoio, a boa disposição e pelo auxílio, de modo a que me tornasse numa melhor profissional.

Não posso deixar de agradecer, também, ao Jaime Samelo pela disponibilidade em me acompanhar continuamente a ensinar-me o essencial, pela ajuda na análise dos gráficos do CTI e, acima de tudo, pela amizade e companhia.

De igual modo, não posso deixar de agradecer à Ana Mata por tudo o que me ensinou e pela sua amizade e simpatia para comigo.

Agradeço ao restante grupo de Investigação de Química Biológica por me fazer sentir integrada no grupo e por me oferecer sempre ajuda.

Agradeço os meus amigos e colegas que, de alguma maneira, contribuíram para a elaboração deste projeto. À Daniela, Mariana, Océane e Rita que estiveram sempre presentes e sempre me apoiaram aos longos destes últimos cinco anos, um grande obrigado! Às minhas "amigas da Figueira", Bárbara, Débora, Inês e Rita, toda a paciência e apoio que me deram foi essencial para a realização deste projeto, em mente sã.

Ao meu namorado, Duarte, agradeço toda a paciência, principalmente nos momentos menos bons, pelo amor, pela alegria e por nunca me deixares ir abaixo nem desistir dos meus objetivos.

Por último, mas não menos importante, agradeço a toda a minha família, em especial, aos meus pais e ao meu irmão por me acompanharem, apoiarem a todos os níveis e motivarem, de modo a que os meus sonhos fossem realizados.

A todos um enorme Obrigado!

#### Índice

Agrade	ecimentos	. iii		
Índicev				
Índice de Figuras vii				
Índice de Tabelasix				
Resum	Resumoxi			
Abstractxiii				
Lista d	e Abreviaturas e Símbolos	xv		
CAPÍT	ULO 1 - INRODUÇÃO	1		
1.1.	Halogéneos	3		
1.1.1.	Papel do flúor na Indústria Farmacêutica	4		
1.1.2.	Interações intermoleculares que envolvem o flúor	7		
1.2.	Transtirretina	10		
1.2.1.	Abordagens Terapêuticas	15		
1.3.	Objetivo	22		
CAPÍT	ULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	23		
2.1	Materiais	25		
2.2	Métodos	26		
2.2.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	26		
2.2.2	Espectroscopia de absorção UV-Visível	29		
2.2.3	Calorimetria de Titulação Isotérmica	31		
2.2.4	UCSF Chimera	32		
2.3	Procedimentos Experimentais	33		
2.3.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	33		
2.3.3	Calorimetria de Titulação Isotérmica	34		
CAPÍT	ULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	37		
3.1	Atribuição dos espetros de RMN e análise do estado de pureza dos compostos	39		
3.2	Interação dos ligantes com a wt-TTR, utilizando <sup>19</sup> F-RMN	45		
3.3	Interação dos ligantes com a wt-TTR, utilizando CTI	57		
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO				
CAPÍTULO 5 - BIBLIOGRAFIA				
CAPÍTULO 6 - ANEXOS75				

#### Índice de Figuras

Figura 1.1.2 - Fármacos aprovados em 2018 pela FDA e respetiva divisão de acordo com a sua estrutura química.       4         Figura 1.1.3 - As diferentes estruturas químicas dos fármacos fluorados comercializados.       5         Figura 1.1.4 - Imagem illustrativa das ligações de hidrogénio entre o átomo de flúor do ligante UDP-4-deoxy-4-fluoro-α-D-galactose e as cadeias laterais da serina-142 e tirosina-173 do recetor oxedorredutase UDP-galactose-4'-epimerase dependente do Dinucleótido de nicotinamida e adenina.       9         Figura 1.2.1 - Representação da estrutura tridimensional de um monómero da TTR, com identificação das cadeias-β a vermelho, da hélice-α a azul claro e das sete voltas ( <i>loops</i> ) a azul escuro.       11         Figura 1.2.2 - Representação dos países europeus afetados com patologias amilóides associadas à TTR e das mutações pontuais observadas em cada país.       14         Figura 1.2.4 - Mecanismos de agregação da TTR e diferentes estratégias terapêuticas.       15         Figura 1.2.6 - Representação dos quatro modos de ligação do diflunisal nos locais de ligação da TTR.       18         Figura 1.2.6 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flufenâmico nos locais de ligação da TTR.       20         Figura 1.2.6 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flueâmimo nos locais de ligação da TTR.       21         Figura 1.2.6 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flueâmimo nos locais de ligação da TTR.       20         Figura 1.2.7 - Estrutura molecular do composto ácido flueñamico.       21         Figura 1.2.8 - Representação dos dois modos d	Figura 1.1.1 – Esquematização de superfícies de potencial eletrostático de moléculas PhX
Figura 1.1.3 - As diferentes estruturas químicas dos fármacos fluorados comercializados.       5         Figura 1.1.4 - Imagem ilustrativa das ligações de hidrogénio entre o átomo de flúor do ligante UDP-4-deoxy-4-fluoro-α-D-galactose e as cadeias laterais da serina-142 e tirosina-173 do recetor oxedorredutase UDP-galactose-4'-epimerase dependente do Dinucleótido de nicotinamida e adenina.       9         Figura 1.2.1 - Representação da estrutura tridimensional de um monómero da TTR, com identificação das cadeias-β a vermelho, da hélice-α a azul claro e das sete voltas ( <i>loops</i> ) a azul escuro.       11         Figura 1.2.2 - Representação esquemática das estruturas tridimensional e de um local de ligação da TTR.       12         Figura 1.2.3 - Representação dos países europeus afetados com patologias amilóides associadas à TTR e das mutações pontuais observadas em cada país.       14         Figura 1.2.4 - Mecanismos de agregação da TTR e diferentes estratégias terapêuticas.       15         Figura 1.2.5 - Estrutura molecular do composto diflunisal.       17         Figura 1.2.6 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flufenâmico nos locais de ligação da TTR.       20         Figura 1.2.9 - Estrutura molecular do composto ÁG10.       21         Figura 1.2.1 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flufenâmico nos locais de ligação da TTR.       20         Figura 1.2.2 - Estrutura molecular do composto ÁG10.       21         Figura 1.2.1 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flufenâmico nos locais de ligação da TTR.       20	Figura 1.1.2 - Fármacos aprovados em 2018 pela FDA e respetiva divisão de acordo com a sua estrutura química4
Figura 1.1.4 - Imagem ilustrativa das ligações de hidrogénio entre o átomo de flúor do         ligante UDP-4-deoxy-4-fluoro-α-D-galactose e as cadeias laterais da serina-142 e         tirosina-173 do recetor oxedorredutase UDP-galactose-4'-epimerase dependente do         Dinucleótido de nicotinamida e adenina.       9         Figura 1.2.1 - Representação da estrutura tridimensional de um monómero da TTR, com       11         Figura 1.2.2 - Representação esquemática das estruturas tridimensional e de um local       12         feigura 1.2.3 - Representação dos países europeus afetados com patologias amilóides       14         Figura 1.2.4 - Mecanismos de agregação da TTR e diferentes estratégias terapêuticas.       15         Figura 1.2.5 - Estrutura molecular do composto diflunisal.       17         Figura 1.2.6 - Representação dos quatro modos de ligação do diflunisal nos locais de       18         Figura 1.2.7 - Estrutura molecular do composto ácido flufenâmico.       19         Figura 1.2.8 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flufenâmico nos       20         Figura 1.2.9 - Estrutura molecular do composto ácido flufenâmico.       19         Figura 1.2.9 - Estrutura molecular do composto AG10.       21         Figura 1.2.9 - Estrutura molecular do composto AG10.       21         Figura 1.2.9 - Estrutura molecular do composto AG10.       21         Figura 1.2.9 - Representação des quatro modos de ligação do ácido flufenâmico cos       <	Figura 1.1.3 - As diferentes estruturas químicas dos fármacos fluorados comercializados.
Figura 1.2.2 - Representação esquemática das estruturas tridimensional e de um local         de ligação da TTR.       12         Figura 1.2.3 - Representação dos países europeus afetados com patologias amilóides       14         sassociadas à TTR e das mutações pontuais observadas em cada país.       14         Figura 1.2.4 - Mecanismos de agregação da TTR e diferentes estratégias terapêuticas.       15         Figura 1.2.5 - Estrutura molecular do composto diflunisal.       17         Figura 1.2.6 - Representação dos quatro modos de ligação do diflunisal nos locais de       18         ligação da TTR.       18         Figura 1.2.8 - Estrutura molecular do composto ácido flufenâmico.       19         Figura 1.2.7 - Estrutura molecular do composto ácido flufenâmico.       19         Figura 1.2.8 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flufenâmico nos       20         locais de ligação da TTR.       20         Figura 1.2.9 - Estrutura molecular do composto AG10.       21         Figura 1.2.10 - Representação dos dois modos de ligação do AG10 nos locais de ligação da TTR.       21         Figura 2.2.1 - Representação esquemática de três regimes de troca química, em função do desvio químico.       27         Figura 2.2.3 - Representação de quatro tipos de transições eletrónicas em espectroscopia de absorção no UV-visível.       30         Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 erespetiva atribuição.       39 <td><b>Figura 1.1.4</b> - Imagem ilustrativa das ligações de hidrogénio entre o átomo de flúor do ligante UDP-4-deoxy-4-fluoro-<math>\alpha</math>-D-galactose e as cadeias laterais da serina-142 e tirosina-173 do recetor oxedorredutase UDP-galactose-4'-epimerase dependente do Dinucleótido de nicotinamida e adenina</td>	<b>Figura 1.1.4</b> - Imagem ilustrativa das ligações de hidrogénio entre o átomo de flúor do ligante UDP-4-deoxy-4-fluoro- $\alpha$ -D-galactose e as cadeias laterais da serina-142 e tirosina-173 do recetor oxedorredutase UDP-galactose-4'-epimerase dependente do Dinucleótido de nicotinamida e adenina
Figura 1.2.5 - Estrutura molecular do composto diflunisal.       17         Figura 1.2.6 - Representação dos quatro modos de ligação do diflunisal nos locais de ligação da TTR.       18         Figura 1.2.7 - Estrutura molecular do composto ácido flufenâmico.       19         Figura 1.2.8 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flufenâmico nos locais de ligação da TTR.       20         Figura 1.2.9 - Estrutura molecular do composto AG10.       21         Figura 1.2.10 - Representação dos dois modos de ligação do AG10 nos locais de ligação da TTR.       21         Figura 2.2.1 - Representação esquemática de três regimes de troca química, em função do desvio químico.       27         Figura 2.2.2 - Tempo de relaxação em função do tempo de correlação.       29         Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição.       30         Figura 3.1.2 - Espetro de <sup>19</sup> F-RMN do composto AG10.       40         Figura 3.1.3 - Espetro de <sup>19</sup> F-RMN do composto AG10.       40	<ul> <li>Figura 1.2.2 - Representação esquemática das estruturas tridimensional e de um local de ligação da TTR.</li> <li>12</li> <li>Figura 1.2.3 - Representação dos países europeus afetados com patologias amilóides associadas à TTR e das mutações pontuais observadas em cada país.</li> <li>14</li> <li>Figura 1.2.4 - Mecanismos de agregação da TTR e diferentes estratégias terapêuticas</li> </ul>
Figura 1.2.6 - Representação dos quatro modos de ligação do diflunisal nos locais de         ligação da TTR.       18         Figura 1.2.7 - Estrutura molecular do composto ácido flufenâmico.       19         Figura 1.2.8 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flufenâmico nos       20         locais de ligação da TTR.       20         Figura 1.2.9 - Estrutura molecular do composto AG10.       21         Figura 1.2.10 - Representação dos dois modos de ligação do AG10 nos locais de ligação da TTR.       21         Figura 2.2.1 - Representação esquemática de três regimes de troca química, em função do desvio químico.       27         Figura 2.2.2 - Tempo de relaxação em função do tempo de correlação.       29         Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição.       30         Figura 3.1.2 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10.       40         Figura 3.1.3 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41	Figura 1.2.5 - Estrutura molecular do composto diflunisal
Figura 1.2.7 - Estrutura molecular do composto ácido flufenâmico.       19         Figura 1.2.8 - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flufenâmico nos locais de ligação da TTR.       20         Figura 1.2.9 - Estrutura molecular do composto AG10.       21         Figura 1.2.10 - Representação dos dois modos de ligação do AG10 nos locais de ligação da TTR.       21         Figura 2.2.1 - Representação esquemática de três regimes de troca química, em função do desvio químico.       27         Figura 2.2.2 - Tempo de relaxação em função do tempo de correlação.       29         Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição.       30         Figura 3.1.2 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10.       40         Figura 3.1.3 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10.       40         Figura 3.1.4 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41	<b>Figura 1.2.6 -</b> Representação dos quatro modos de ligação do diflunisal nos locais de ligação da TTR
locais de ligação da TTR.       20         Figura 1.2.9 – Estrutura molecular do composto AG10.       21         Figura 1.2.10 - Representação dos dois modos de ligação do AG10 nos locais de ligação da TTR.       21         Figura 2.2.1 - Representação esquemática de três regimes de troca química, em função do desvio químico.       27         Figura 2.2.2 - Tempo de relaxação em função do tempo de correlação.       29         Figura 2.2.3 – Representação de quatro tipos de transições eletrónicas em espectroscopia de absorção no UV-visível.       30         Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição.       39         Figura 3.1.2 - Espetro de <sup>19</sup> F-RMN do composto AG10.       40         Figura 3.1.3 - Espetro de <sup>14</sup> H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41	Figura 1.2.7 - Estrutura molecular do composto ácido flufenâmico
Figura 1.2.9 – Estrutura molecular do composto AG10.       21         Figura 1.2.10 - Representação dos dois modos de ligação do AG10 nos locais de ligação da TTR.       21         Figura 2.2.1 - Representação esquemática de três regimes de troca química, em função do desvio químico.       27         Figura 2.2.2 - Tempo de relaxação em função do tempo de correlação.       29         Figura 2.2.3 – Representação de quatro tipos de transições eletrónicas em espectroscopia de absorção no UV-visível.       30         Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição.       39         Figura 3.1.2 - Espetro de <sup>19</sup> F-RMN do composto AG10.       40         Figura 3.1.3 - Espetro de <sup>14</sup> H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41	locais de ligação da TTR20
Figura 1.2.10 - Representação dos dois modos de ligação do AG10 nos locais de ligação da TTR.       21         Figura 2.2.1 - Representação esquemática de três regimes de troca química, em função do desvio químico.       27         Figura 2.2.2 - Tempo de relaxação em função do tempo de correlação.       29         Figura 2.2.3 - Representação de quatro tipos de transições eletrónicas em espectroscopia de absorção no UV-visível.       30         Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição.       39         Figura 3.1.2 - Espetro de <sup>19</sup> F-RMN do composto AG10.       40         Figura 3.1.3 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41	Figura 1.2.9 – Estrutura molecular do composto AG10
Figura 2.2.1 - Representação esquemática de três regimes de troca química, em função do desvio químico.       27         Figura 2.2.2 - Tempo de relaxação em função do tempo de correlação.       29         Figura 2.2.3 - Representação de quatro tipos de transições eletrónicas em espectroscopia de absorção no UV-visível.       30         Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição.       39         Figura 3.1.2 - Espetro de <sup>19</sup> F-RMN do composto AG10.       40         Figura 3.1.3 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41         Figura 3.1.4 - Espetro de <sup>19</sup> F PMNI do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41	Figura 1.2.10 - Representação dos dois modos de ligação do AG10 nos locais de ligação da TTR
Figura 2.2.2 - Tempo de relaxação em função do tempo de correlação.       29         Figura 2.2.3 - Representação de quatro tipos de transições eletrónicas em espectroscopia de absorção no UV-visível.       30         Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição.       39         Figura 3.1.2 - Espetro de <sup>19</sup> F-RMN do composto AG10.       40         Figura 3.1.3 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41         Figura 3.1.4 - Espetro de <sup>19</sup> F RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41	Figura 2.2.1 - Representação esquemática de três regimes de troca química, em função do desvio químico
Figura 2.2.3 – Representação de quatro tipos de transições eletrónicas em espectroscopia de absorção no UV-visível.       30         Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição.       39         Figura 3.1.2 - Espetro de <sup>19</sup> F-RMN do composto AG10.       40         Figura 3.1.3 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41         Figura 3.1.4 - Espetro de <sup>19</sup> F RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais.       41	Figura 2.2.2 - Tempo de relaxação em função do tempo de correlação
Figura 3.1.1 - Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição	Figura 2.2.3 – Representação de quatro tipos de transições eletrónicas emespectroscopia de absorção no UV-visível
<b>Figura 3.1.3 -</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais40	<b>Figura 3.1.1 -</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição
	<b>Figura 3.1.3 -</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais40

Figura 3.1.5 - Espetro de <sup>1</sup>H-RMN do composto ácido flufenâmico e respetiva atribuição.. Figura 3.2.1 – Sobreposição dos espetros de <sup>19</sup>F-RMN do composto AG10, da experiência de titulação com a proteína wt-TTR, para as várias estequiometrias Figura 3.2.2 - Representação das ligações de hidrogénio entre o AG10 e os resíduos de Figura 3.2.3 - Sobreposição dos espetros de <sup>19</sup>F-RMN do composto diflunisal da experiência de titulação com a proteína wt-TTR, para as várias estequiometrias Figura 3.2.4 - Representação das interações mais importantes entre o diflunisal e os resíduos de um dos locais de ligação da wt-TTR......51 Figura 3.2.5 - Representação dos espetros de <sup>19</sup>F-RMN do composto ácido flufenâmico, resultantes da experiência de titulação com a proteína wt-TTR......52 Figura 3.2.6 - Representação das interações mais importantes entre o ácido flufenâmico e os resíduos de aminoácidos de um dos locais de ligação da wt-TTR......55 Figura 3.3.1 - Titulação calorimétrica da wt-TTR (5 µM) com diflunisal (100 µM), obtida Figura 3.3.2 - Titulação calorimétrica de wt-TTR (5 µM) com ácido flufenâmico (100 µM), Figura 6.I.1- Regressão linear da absorbância corrigida do composto, a 252 nm, em Figura 6.II.1 - Regressão linear da absorbância corrigida do composto, a 289 nm, em Figura 6.II.2 - Regressão linear da absorbância corrigida do composto, a 289 nm, em Figura 6.III.2 – Espetros DEPT 90 e DEPT 135 (A), COSY (B), HSQC (C) e HMBC (D) do Figura 6.IV.2 - Espetros DEPT 90 e DEPT 135 (A), COSY (B), HSQC (C) e HMBC (D) do 

#### Índice de Tabelas

Tabela 3.1.1 – Valores dos desvios químicos (ppm) e constantes de acoplamento para
AG10, obtidos nas experiências de <sup>1</sup> H-RMN e <sup>19</sup> F-RMN40
Tabela 3.1.2 - Valores dos desvios químicos (ppm) e constantes de acoplamento de
diflunisal para <sup>1</sup> H-RMN, <sup>13</sup> C-RMN e <sup>19</sup> F-RMN, baseados nas experiências realizadas e
indicadas no Capítulo 2, secção 2.3.142
Tabela 3.1.3 - Valores dos desvios químicos (ppm) e constantes de acoplamento do ácido
flufenâmico para <sup>1</sup> H-RMN, <sup>13</sup> C-RMN e <sup>19</sup> F-RMN, baseados nas experiências realizadas e
indicadas no Capítulo 2, secção 2.3.144
<b>Tabela 3.2.1 -</b> Valores de desvios químicos ( $\delta$ ), em ppm, dos vários espetros adquiridos
na experiência de titulação do AG10 com a wt-TTR. Estes valores foram obtidos a partir
da análise feita no programa MestReNova47
Tabela 3.2.2 - Valores dos desvios químicos (ppm) dos sinais observados nos vários
espetros, adquiridos na experiência de titulação de <i>wt</i> -TTR com diflunisal. Estes valores
foram obtidos a partir da análise feita no programa MestReNova
Tabela 3.2.3 - Valores dos desvios químicos (ppm) dos sinais visíveis representados nos
vários espetros, adquiridos na experiência de titulação de wt-TTR com ácido flufenâmico,
e da diferença de desvios químicos entre o sinal 2 e o sinal 1 para cada razão
estequiométrica53
Tabela 3.3.1 – Parâmetros termodinâmicos para a ligação de diflunisal aos dois locais de
ligação da <i>wt</i> -TTR, obtidos a partir da experiência de CTI59
Tabela 3.3.2 - Parâmetros termodinâmicos para a ligação de ácido flufenâmico aos dois
locais de ligação da <i>wt</i> -TTR, obtidos a partir da experiência de CTI61
Tabela 6.I.1- Valores da absorbância retirados dos espetros do diflunisal obtidos por
espectroscopia de absorção no UV-visível, para a respetiva concentração da amostra,
aos 252 nm e aos 600 nm77
Tabela 6.II.1- Valores da absorbância retirados dos espetros do ácido flufenâmico obtidos
por espectroscopia de absorção no UV-visível, para a respetiva concentração da amostra,
aos 289 nm e aos 600 nm
Tabela 6.II.2-         Valores da absorbância retirados dos espetros do ácido flufenâmico obtidos
por espectroscopia de absorção no UV-visível, para a respetiva concentração da amostra,
aos 289 nm e aos 600 nm

#### Resumo

O enrolamento/desenrolamento anormal de proteínas seguido pela sua agregação está, geralmente, associado ao desenvolvimento de doenças. É o caso da proteína humana transtirretina (TTR), uma proteína homotetramérica encontrada no plasma, fluido cefalorraquidiano e no humor vítreo e aquoso do olho, responsável pelo transporte de tiroxina e retinol, quando em associação com a proteína transportadora de retinol. A TTR é conhecida por sofrer alterações conformacionais e formar agregados solúveis e fibras amiloides altamente estáveis e insolúveis, que se acumulam extracelularmente nos tecidos, causando vários tipos de amiloidoses, tais como a TTR com polineuropatia, TTR amiloidose hereditária amiloidose hereditária com cardiomiopatia e TTR amiloidose relacionada com a idade. Atualmente, existem várias abordagens terapêuticas para algumas das amiloidoses de TTR (ATTR), sendo, contudo, a sua eficácia limitada. A necessidade de encontrar novos fármacos para doenças amiloides envolvendo a TTR, levou à descoberta de diversos compostos, alguns deles fluorados, tais como AG10, diflunisal e ácido flufenâmico.

Neste trabalho apresentamos um estudo sobre as interações e afinidade entre cada um dos três compostos fluorados mencionados acima e os dois locais de ligação na wt-TTR, usando <sup>19</sup>F-RMN e Calorimetria de titulação isotérmica (CTI). O uso de <sup>19</sup>F-RMN em estudos de interação fármaco-proteína envolvendo flúor tem recebido grande atenção, uma vez que a largura de linha e o desvio químico em <sup>19</sup>F-RMN é altamente sensível a mudanças de regime de troca e ambiente químico, que geralmente acompanham o processo de ligação de um pequeno ligante a uma proteína. As experiências de titulação de TTR com AG10 e diflunisal seguidas por <sup>19</sup>F-RMN mostraram regimes de troca rápida a intermédia na escala de tempo do RMN e com cada espetro possuindo apenas um sinal correspondente ao único átomo de flúor presente na molécula, sem alterações significativas dos desvios químicos em consequência da ligação. Além disto, os dois compostos mostram interagir com a proteína, devido ao aumento da largura da linha a meia altura, mas as interações não envolvem diretamente o flúor, porque não são observadas diferenças significativas dos desvios químicos. Por outro lado, as experiências de titulação com o ácido flufenâmico, seguidas por <sup>19</sup>F-RMN, mostram dois regimes de troca química diferentes: um sinal em troca rápida e o outro em troca lenta. O aumento da largura da linha a meia altura nos dois sinais, comparando com o sinal do composto na forma livre, leva-nos a ponderar que os sinais observáveis nos espetros da titulação correspondem a duas conformações diferentes do ácido flufenâmico quando interage com a wt-TTR, sendo que numa delas há uma interação direta com o flúor, dada a alteração significativa de desvio químico em relação à forma livre. Tendo em conta que Resumo

existe cooperatividade negativa na ligação do ácido flufenâmico à *wt*-TTR, reportada na literatura e confirmada neste trabalho por CTI, tendo em conta ainda os regimes de troca química, os desvios químicos e as larguras a meia altura observados para os dois sinais no espetro <sup>19</sup>F-RMN, podemos concluir que estamos a observar a interação do composto em cada um dos dois locais de ligação existentes na TTR. O primeiro sinal a ser observado durante a titulação, em regime de troca química lenta, corresponde à conformação adquirida pelo composto no primeiro local de ligação, devido à grande largura do sinal, ao deslocamento do desvio químico para campo baixo (devido à interação direta com o flúor) e à alta afinidade desse local de ligação. O segundo sinal a surgir na titulação, em regime de troca química rápido, corresponde à conformação adquirida pelo composto local de ligação, sendo que este sinal não é tão largo como o primeiro, não há alteração significativa do desvio químico em relação à forma livre e a afinidade de ligação para este local de ligação é menor.

**PALAVRAS-CHAVE**: Flúor, <sup>19</sup>F-RMN, Transtirretina, AG10, Diflunisal, Ácido Flufenâmico, Calorimetria de Titulação Isotérmica.

#### Abstract

Abnormal protein folding/unfolding followed by protein aggregation is often associated to disease development. That is the case of human Transthyretin (TTR), a homotetrameric protein found in plasma, cerebrospinal fluid and the humour of the eye, responsible for thyroxine and retinol transport, in association with the retinol-binding protein. TTR is known to undergo conformational changes and form soluble aggregates and insoluble highly stable amyloid fibrils that accumulate extracellularly in the tissues, causing several types of amyloidosis, such as hereditary TTR amyloidosis with polyneuropathy (hATTR-PN), hereditary TTR amyloidosis with cardiomyopathy (hATTR-CM) and age-related TTR amyloidosis (ATTRwt). Currently there are several therapeutic solutions for some of the TTR amyloidoses, but their efficacy is still limited. The need to find new medicines for the treatment of TTR amyloid diseases (ATTR) led to the discovery of several fluorinated compounds, among them AG10, diflunisal and flufenamic acid.

Here we present a study on the interactions and affinities between each of the three fluorinated compounds mentioned above and the two binding sites for the endogenous ligand (thyroxine) in wild-type TTR (wt-TTR), using titration experiments followed by <sup>19</sup>F-NMR and Isothermal titration calorimetry (ITC). The use of <sup>19</sup>F-NMR in studies of interactions of fluorinated ligands with proteins has received great attention due to the high sensitivity of <sup>19</sup>F-NMR line width and chemical shift to modifications in exchange regime and chemical environment accompanying ligand binding to a protein. The titration experiments followed by <sup>19</sup>F-NMR with diflunisal and AG10 show these ligands are in intermediate to fast exchange regime on the NMR time scale, with each spectrum having only one peak with increased line width but without significant chemical shift perturbation when compared with the free form. These observations show these two compounds do interact with the protein, but these interactions seem to not directly involve the fluorine because no significant differences in chemical shifts are observed. On the other hand, <sup>19</sup>F-NMR titration experiments with flufenamic acid show two different exchange regimes with one peak in fast exchange and other in slow exchange. The larger line width of the two peaks, compared to the free compound, indicates that two different conformations of flufenamic acid are detected, one of which having direct fluorine interactions, due to the large chemical shift difference observed, and the other not involving direct fluorine interactions. Knowing there is negative cooperativity in flufenamic acid binding by wt-TTR, previously reported in the literature and confirmed by ITC in this work, and taking in consideration the exchange regimes, the chemical shift changes and the line widths observed for the two signals in the <sup>19</sup>F-NMR spectra, it is safe to conclude that binding to each one of the TTR binding sites is being observed. The first visible signal in the tritation,

in slow exchange, corresponds to the ligand conformation in the first binding site, in accordance with the large signal line width, the downfield chemical shift change (due to direct interaction involving fluorine) and the high affinity of this binding site (measured by ITC). The second signal to appear in the titration, in fast exchange, corresponds to the ligand conformation in the second binding site, with a much narrower line width than the first signal and no significant chemical shift change from the free form, in agreement with the lower affinity of the ligand for this binding site.

**KEYWORDS**: Fluorine, <sup>19</sup>F-NMR, Transthyretin, AG10, Diflunisal, Flufenamic acid, Isothermal titration calorimetry.

#### Lista de Abreviaturas e Símbolos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
ASOs	Antisense oligonucleotides
ATTR	Amiloidoses de TTR
ATTRwt	TTR amiloidose relacionada à idade
CF <sub>3</sub>	Grupo trifluormetilo
CIF	Monofluoreto de cloro
COSY	Correlation spectroscopy
<sup>13</sup> C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
СТІ	Calorimetria de Titulação Isotérmica
DEPT	Distortionless Enhanncement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
$D_2O$	Água deuterada
$F_2O_2$	Difluoreto de dioxigénio
<sup>19</sup> F-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de flúor-19
FDA	The Food and Drug Administration
hATTR-CM	TTR amiloidose hereditária com cardiomiopatia
hATTR-PN	TTR amiloidose hereditária com polineuropatia
HBP	Cavidades de ligação de halogénio, do inglês <i>Halogen Binding Pockets</i>
<sup>1</sup> H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de protão
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single-quantum correlation spectroscopy
Hz	Hertz
IDOX	4'-desoxi-4'-iododoxorubicina
К	Kelvin

K <sub>d</sub>	Constante de dissociação
K <sub>ex</sub>	Constante de velocidade de troca
LYS-15	Aminoácido lisina número 15
NaCl	Cloreto de Sódio
PDB	Protein Data Bank
pKa	Constante de acidez
qRMN	Ressonância Magnética Nuclear quantitativo
RBP	Proteína transportadora de retinol, do inglês "retinol-binding protein"
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SER-117	Aminoácido serina número 117
siRNAs	Small interfering RNAs
T <sub>1</sub>	Tempo de relaxação longitudinal
T <sub>2</sub>	Tempo de relaxação transversal
Τ4	Tiroxina
THR-119	Aminoácido treonina número 119
TTR	Transtirretina
UV	Ultravioleta
Val122Ile	Mutação da transtirretina caracterizada pela substituição da valina pela isoleucina na posição 122
Val30Met	Mutação da transtirretina caracterizada pela substituição da valina pela metionina na posição 30
<i>wt</i> -TTR	Proteína Transtirretina na forma nativa
δ	Desvio químico
Δδ	Diferença de desvio químico
τ <sub>c</sub>	Tempo de correlação da molécula
λ	Comprimento de onda
3	Coeficiente de extinção molar
ΔH	Variação da entalpia
ΔS	Variação da entropia

ΔG Energia livre de Gibbs

n Estequiometria de ligação

# CAPÍTULO

## INTRODUÇÃO

#### 1.1. Halogéneos

Os elementos que compõem o grupo 17 da tabela periódica são designados por halogéneos, sendo eles o flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br), iodo (I) e astatina (At). Os halogéneos têm sete eletrões de valência e, por isso, precisam apenas de mais um eletrão para formar um octeto. Esta característica explica a elevada reatividade dos halogéneos, especialmente do flúor, que é o elemento mais reativo.

Os halogéneos desempenham um papel importante em interações não covalentes como aceitadores de ligações em ligações de hidrogénio (R-X···H) ou como ácidos de Lewis em ligações de halogéneo (R-X···Y).<sup>1</sup> Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada, uma ligação de halogénio ocorre quando há evidências de uma interação entre uma região eletrofílica associada a um átomo de halogénio de uma molécula e uma região nucleofílica de outra molécula, ou da mesma.<sup>2</sup> Uma ligação de halogénio com região eletrofílica, R é um grupo covalentemente ligado a X e Y é o aceitador da ligação de halogénios com uma região nucleofílica. Esta ligação é permitida, porque os halogéneos têm uma distribuição de eletrões anisotrópica nos seus lados equatoriais, resultando numa região externa positiva ao longo da ligação covalente, designada por  $\sigma$ -hole.<sup>3</sup> Halogéneos de maior tamanho tendem a formar  $\sigma$ -hole mais positivos, resultando em interações mais fortes (Figura 1.1.1).



**Figura 1.1.1** – Esquematização de superfícies de potencial eletrostático de moléculas PhX. A cor azul indica potencial eletrostático positivo e a vermelho negativo. Imagem adaptada do trabalho de Mahmoud A. A. Ibrahim.<sup>1</sup>

Dentro dos halogéneos, o flúor é o foco da atenção neste trabalho. O flúor apenas forma  $\sigma$ -hole em circunstâncias muito especiais. Este facto deve-se à elevada eletronegatividade do flúor. Os restantes halogéneos não são tão eletronegativos e, por isso, a carga negativa global é mais pequena e os  $\sigma$ -hole são mais positivos.<sup>4</sup> Assim sendo, não se considera que o flúor se envolva em ligações de halogénio, mas continua a ser um aceitador fraco de ligações de hidrogénio.

#### 1.1.1. Papel do flúor na Indústria Farmacêutica

Até à data de 1955, quando foi aprovado pela *The Food and Drug Administration* (FDA) o primeiro fármaco com flúor na sua composição, nunca se tinham desenvolvido fármacos com átomos de flúor. Em 2010, cerca de 20% de todos os fármacos comercializados eram biomoléculas com flúor na sua composição. Atualmente, calcula-se que a tendência está a aumentar em direção aos 30%.<sup>5</sup> Segundo a FDA, em 2018 foram aprovados 59 novos fármacos, dos quais 18 contém átomos de flúor, perfazendo um total de 28% (Figura 1.1.2). A FDA considerou o flúor como átomo do ano de 2018, por 3 em cada 10 fármacos aprovados neste ano conterem flúor e por existir um total de 49 átomos de flúor nos 18 fármacos fluorados aprovados em 2018.<sup>6</sup>





Os fármacos fluorados apresentam os seus átomos de flúor em diversas posições, revelando um universo de ambientes químicos diferentes. Contudo, analisando com mais detalhe, verifica-se que existem grupos mais frequentes, tais como, os fluoroaril, fluoroalquilo simples e grupos trifluormetilos aromáticos, que representam cerca de 80% dos fármacos fluorados (Figura 1.1.3).<sup>7</sup>



**Figura 1.1.3** - As diferentes estruturas químicas dos fármacos fluorados comercializados. Adaptada do trabalho de Steve Swallow<sup>7</sup>.

O flúor é o primeiro elemento do grupo dos elementos halogenados, na tabela periódica. Tem um total de nove eletrões, um tamanho pequeno, com raio de Van der Waals igual a 1.47 Å e massa atómica igual a 18.998 u, aproximadamente. O flúor é considerado o elemento mais eletronegativo e o mais reativo.<sup>8</sup> É 100% abundante na natureza, tem número quântico de spin igual a ½ e é altamente sensível na Ressonância Magnética Nuclear (RMN).<sup>9</sup> No entanto, os pares de eletrões livres são fortemente atraídos pelo núcleo, resultando numa baixa polaridade e, por isso, não são capazes de induzir campos elétricos. Estas características do flúor contribuem para a sua extensa investigação na descoberta de novos fármacos.<sup>10</sup>

A inclusão ou substituição de um átomo ou grupo molecular por um grupo fluorado (ex.: -F, -CF<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>) numa molécula pode alterar a forma como esta interage com o alvo terapêutico ou até mesmo começar a interagir com um novo alvo terapêutico. Ou seja, inclusão de átomos de flúor numa molécula pode alterar as suas propriedades químicas e, consequentemente, a sua atividade biológica. As principais propriedades alteradas são as propriedades físico-químicas, tais como, a força das ligações, potencial eletrostático, dipolo, constate de acidez (pK<sub>a</sub>), alterações conformacionais e lipofilicidade, e as propriedades farmacocinéticas, como a distribuição do fármaco pelos tecidos e sua libertação e a via e taxa de metabolização. Estas alterações podem provocar consequências ao nível da farmacodinâmica e toxicologia do fármaco.<sup>11</sup>

O flúor é o elemento com menor raio atómico depois do hidrogénio. Assim, o reduzido tamanho do átomo de flúor permite o seu uso na substituição do átomo de hidrogénio em ligações C-H. Quando um átomo de hidrogénio é substituído por um átomo de flúor, os efeitos estéreos induzidos são fracos, uma vez que o raio de Van der Waals

Capítulo 1

do átomo de flúor (1.47 Å) encontra-se entre o do hidrogénio (1.2 Å) e o do oxigénio (1.57 Å). Por outro lado, os volumes estéreos dos grupos fluorados - $CF_2$  e - $CF_3$  são muito maiores do que os grupos metileno e metil, respetivamente.<sup>10</sup> A indução do impedimento estéreo pela presença de átomos de flúor pode destabilizar a estrutura molecular. Devido à diferença dos tamanhos e das propriedades eletrónicas entre os átomos de hidrogénio e de flúor, os grupos fluorados podem induzir modificações nos momentos dipolares, na conformação da molécula e, consequentemente, na estabilidade e reatividade química da mesma. O flúor forma uma ligação forte com o carbono (C-F), sendo considerada das mais fortes na química orgânica, com uma energia de ligação igual a 116 kcal/mol. Comparativamente com a ligação entre o hidrogénio e o carbono (C-H), que tem uma energia de ligação igual a 99 kcal/mol, a ligação flúor-carbono apresenta um aumento na estabilidade oxidativa e térmica. Dada a forte eletronegatividade do átomo de flúor, a diferença de eletronegatividades entre o flúor e o carbono cria um extenso momento dipolar nesta ligação, que favorece as interações dipolo-dipolo entre o fármaco e o local de ligação do recetor. Esta complementaridade dos campos elétricos entre o fármaco e o local de ligação é um fator importante para a afinidade, especialmente porque as biomoléculas têm muitas unidades polares nos locais de ligação.<sup>10,11</sup> No entanto, a baixa polarizabilidade dos eletrões do flúor e, consequentemente, a incapacidade de induzirem campos elétricos, também se aplica aos eletrões ligação entre o flúor e o carbono. Assim sendo, a presença de átomos de flúor reduz a capacidade da molécula em responder a campos elétricos.10

Parâmetros como a lipofilicidade, pK<sub>a</sub>, solubilidade e tamanho molecular também são afetados pela presença de grupos fluorados em moléculas. Estes, por sua vez, influenciam a distribuição e absorção do fármaco. A lipofilicidade é determinada pelo cálculo do valor do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (log P<sub>octanol</sub>), que representa a capacidade da molécula em atravessar a membrana lipídica. Quanto maior for este valor, mais lipofílica será a molécula. Nos anéis aromáticos, quando se substitui um hidrogénio por um flúor ou um grupo fluoroalquilo, o valor do log P<sub>octanol</sub> aumenta, isto é, há um ligeiro aumento da lipofilicidade da molécula, aumentando a difusão passiva do fármaco através das membranas, sendo que o grupo -CF<sub>3</sub> é o mais lipofílico de todos os substituintes. A introdução de átomos de flúor também pode ser usada para modular a ionização de uma molécula (pK<sub>a</sub>), com o efeito de modificar as propriedades de absorção de uma molécula. Assim, por meio de substituintes fluorados, é possível diminuir o grau de basicidade do composto, o que facilita o processo de absorção do fármaco no organismo, especialmente aqueles que são administrados por via oral, aumentando a biodisponibilidade do mesmo.<sup>10</sup>

6

Introdução

A inclusão de átomos de flúor numa molécula pode ser usada para alterar as vias e/ou as taxas de metabolismo de uma molécula. Em regra geral, uma biomolécula fluorada terá menor taxa de metabolismo oxidativo. A redução da taxa de metabolismo é justificada pela ligação formada entre os átomo de flúor e carbono, após a substituição fluorada, ser mais forte, comparativamente com a força da ligação entre os átomos de hidrogénio e carbono e, consequentemente, ser mais resistente ao ataque químico direto do citocromo P450.<sup>11,12</sup> Os grupos fluoroalquilo (-CHF<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub> e -C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>) mostram-se pouco suscetíveis à oxidação. Assim sendo, a substituição de grupo alquilo pelo grupo fluoroalquilo torna-se mais vantajosa, a fim de evitar o metabolismo oxidativo. Deste modo, é possível prolongar o tempo de meia-vida do fármaco e a sua biodisponibilidade.<sup>10</sup>

São estas características únicas do átomo de flúor que o tornam num elemento especial na área da Química Medicinal. O seu uso no desenho e desenvolvimento de novos fármacos tem vindo a crescer. Sucintamente, a fluoração de compostos permite modelar as suas propriedades físico-químicas, bem como alterar os processos de absorção, distribuição, metabolismo e interação com o recetor. Ainda pode ser usado ou não para aumentar a afinidade dos compostos aos recetores, quando a introdução de átomos de flúor em compostos altera a conformação dos compostos ou os átomos de flúor participam em interações específicas com um dos resíduos dos locais de ligação.

#### 1.1.2. Interações intermoleculares que envolvem o flúor

Os efeitos de um fármaco resultam da sua ligação a recetores específicos. Os recetores são proteínas celulares e localizam-se na membrana celular, no citosol ou no núcleo. Estão envolvidos na sinalização celular entre e dentro das células, para que o recetor, quando ativado, possa regular os processos bioquímicos celulares. Os fármacos ligam-se a locais específicos dos recetores, os quais se designam por locais de ligação.<sup>13</sup>

A ligação entre um fármaco e um recetor depende do fármaco em possuir uma parte da sua estrutura complementar ao local de ligação do recetor. De modo a compreender os mecanismos de ação do fármaco, é importante compreender as interações envolvidas no complexo fármaco-recetor. A interação entre o fármaco e o recetor leva à estabilização de uma conformação do recetor, resultando numa mudança quando à atividade biológica do mesmo. A ligação do fármaco ao recetor tanto pode inibir a ação do recetor, como pode estimular o recetor a dar respostas fisiológicas características da ação do fármaco.<sup>13,14</sup>

As ligações formadas entre o fármaco e o recetor são interações fracas e não covalentes. Consequentemente, os efeitos produzidos são reversíveis. Portanto, o fármaco fica inativo a partir do momento que a sua concentração no fluido extracelular começa a diminuir, normalmente devido ao metabolismo.<sup>13</sup>

No que diz respeito a fármacos fluorados, o átomo de flúor pode participar diretamente em interações intramoleculares e intermoleculares. O facto de o átomo de flúor possuir a propriedade dupla em atuar como aceitador de ligações de hidrogénio e atuar como fração hidrofóbica, resulta em diferentes tipos de interações.<sup>15</sup> As principais interações que envolvem o flúor são as interações dipolo-dipolo, as interações por ligação de hidrogénio e as interações hidrofóbicas.

As interações dipolo-dipolo são forças atrativas entre moléculas polares, ou seja, entre moléculas que possuem momento de dipolo. Quanto maior for o momento de dipolo, maior será a força.<sup>16</sup>

As ligações de hidrogénio são um tipo de interação dipolo-dipolo, nas quais há interação entre um átomo de hidrogénio e um ou mais átomos eletronegativos, que neste caso será o átomo de flúor. Por ser altamente eletronegativo e de tamanho pequeno, o par de eletrões não-ligantes do átomo de flúor atrai o hidrogénio, pobre em eletrões, formando uma ligação de hidrogénio. Cálculos teóricos da força de ligação de hidrogénio F-H (entre 2 e 3.2 kcal/mol) mostram que ela é duas vezes mais fraca que a força de ligação de hidrogénio O-H (entre 5 e 10 kcal/mol).<sup>17</sup> Em regra geral, a distância da ligação de hidrogénio entre os átomos de flúor e hidrogénio deve ser menor ou igual à soma dos raios de Van der Waals de cada um dos átomos, isto é, deve ser menor ou igual a 2,67 Å.<sup>18</sup> Na literatura, existe alguma controvérsia sobre o átomo de flúor atuar ou não como aceitador de ligações de hidrogénio.<sup>19,20</sup> No entanto, evidências experimentais e computacionais sobre o envolvimento direto do átomo de flúor em ligações de hidrogénio intermoleculares já foram relatadas por vários autores.<sup>17,21</sup> Em estudos feitos por Claudio Dalvit, Anna Vulpetti e restante equipa<sup>15,22,23</sup>, expõem que o átomo de flúor consegue formar ligações de hidrogénio intermoleculares só com dadores fortes de ligações de hidrogénio ou na presença de uma elevada concentração de dadores de ligações de hidrogénio e na ausência de aceitadores competitivos de ligações de hidrogénio. Portanto, nestes casos, as ligações de hidrogénio que envolvem diretamente o átomo de flúor podem contribuir para a energia global de ligação de um ligante ao recetor. Para além disto, mostraram, por experiências de RMN e por cálculos computacionais, que o átomo de flúor do grupo -CH<sub>2</sub>F é um aceitador de ligações de hidrogénio mais forte que os átomos de flúor dos grupos -CHF<sub>2</sub> e -CF<sub>3</sub>. As ligações de hidrogénio do tipo C-F···H-X (sendo X = O ou N) são relevantes em sistemas químicos e biológicos.<sup>7</sup> Um exemplo de uma ligação de hidrogénio que envolve o flúor diretamente é o caso entre a oxirredutase

UDP-galactose-4'-epimerase dependente do dinucleótido de nicotinamida e adenina da *Trypanosoma brucei* e o ligante UDP-4-deoxy-4-fluoro- $\alpha$ -D-galactose, no qual o átomo de flúor do UDP-4-desoxy-4-fluoro- $\alpha$ -D-galactose forma ligações de hidrogénio com o grupo hidroxilo da tirosina-173 e da serina-142 (Figura 1.1.4).<sup>24</sup>



**Figura 1.1.4 -** Imagem ilustrativa das ligações de hidrogénio entre o átomo de flúor do ligante UDP-4-deoxy-4-fluoro-α-D-galactose e as cadeias laterais da serina-142 e tirosina-173 do recetor oxirredutase UDP-galactose-4'-epimerase dependente do dinucleótido de nicotinamida e adenina. O átomo de flúor está representado a verde e as distâncias inter-atómicas para estas interações estão indicadas na imagem. Imagem adaptada de *Protein Data Bank sum* (código PDB: 2cnb).

As interações hidrofóbicas são interações intermoleculares fracas, que resultam da interação entre dois grupos ou cadeias apolares. Estas cadeias ou grupos apolares, presentes tanto nos fármacos como nos recetores, encontram-se rodeadas por moléculas de água orientadas e, portanto, estas moléculas de água encontram-se num estado de energia mais elevado. Quando as cadeias ou grupos apolares se aproximam, as moléculas de água desordenam-se, na tentativa de se associarem umas com as outras. Este aumento de entropia estabiliza o complexo proteína-ligante, sendo que esta estabilização é conhecida por interação hidrofóbica.<sup>13</sup> Devido à existência de um grande número de grupos apolares tanto nos fármacos como nos recetores, as interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento do ligante pelo recetor.

Atualmente, há estudos que descrevem outras interações que envolvem diretamente o flúor, tais como, interação orbital<sup>25</sup>, interação *Closed-shell*<sup>26</sup>, interação multipolar ortogonal<sup>27</sup>, interação de coordenação<sup>28</sup> e interação com halogéneos<sup>29</sup>.

#### 1.2. Transtirretina

A transtirretina (TTR) é uma das proteínas responsável pela formação e deposição de amilóide *in vivo*. Em 1956, Schultze e a restante equipa isolaram, pela primeira vez, a TTR do plasma humano. Inicialmente, a sua designação era pré-albumina, por se movimentar mais rápido que a albumina no plasma e no fluido cefalorraquidiano, após uma eletroforese a pH 8.6.<sup>30</sup> Em 1968, Woeber e Ingbar identificaram a TTR como proteína transportadora de tiroxina (T4)<sup>31</sup> e Kanai e Goodman identificaram a TTR como proteína transportadora de retinol (RBP, do inglês "*retinol-binding protein*").<sup>32</sup> Devido às suas funções biológicas, o nome da proteína foi alterado para transtirretina.<sup>30</sup> A TTR é predominantemente encontrada no plasma, no fluido cefalorraquidiano e no humor vítreo e aquoso do olho e é sintetizada no fígado, no plexo coroide do cérebro e no olho, respetivamente.<sup>33</sup> Atualmente, cerca de 360 estruturas da TTR estão disponíveis na plataforma *Protein Data Bank* (PDB), sendo que 204 delas são complexos TTR-ligante.

Em 1971, Colin Blake e a sua equipa de trabalho determinaram a estrutura tridimensional da TTR.<sup>34</sup> Sob condições fisiológicas, a TTR humana é uma proteína homotetramérica, composta por quatro subunidades idênticas, cada uma com 127 aminoácidos. O valor da massa molecular para o tetrâmero é 55 kDa e o valor de cada subunidade é cerca de 13.7 kDa.<sup>35,36</sup>

Cada uma das quatro subunidades é também designadas por monómero. Cada monómero tem um arranjo tridimensional maioritariamente em *sandwich*- $\beta$ , que consiste em duas folhas- $\beta$  de quatro cadeias- $\beta$ , denominadas por DAGH e CBEF. O interior de cada monómero é composto, essencialmente, por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, das duas folhas- $\beta$ . Todas as cadeias- $\beta$  interagem de forma antiparalela, com exceção do arranjo entre as cadeias A e G, que são paralelas entre si. De modo a interligar as cadeias- $\beta$ , cada monómero ainda possui uma pequena hélice- $\alpha$  e sete voltas (*loops*) (Figura 1.2.1).<sup>35,37</sup>



**Figura 1.2.1** - Representação da estrutura tridimensional de um monómero da TTR, com identificação das cadeias-β a vermelho, da hélice-α a azul claro e das sete voltas (*loops*) a azul escuro. A imagem foi produzida com programa Chimera, usando a estrutura cristalográfica de TTR na forma nativa (código PDB: 3A4D).

As interações que conectam os monómeros envolvem as cadeias- $\beta$  F e H de um monómero, que se ligam por ligações de hidrogénio e de forma antiparalela às cadeias- $\beta$  F' e H' de outro monómero, respetivamente. Portanto, o dímero da TTR é formado pelas folhas- $\beta$  DAGHH'G'A'D' e CBEFF'E'B'C', sendo que o (') significa cadeia- $\beta$  de outro monómero da TTR.<sup>35</sup>

A estrutura nativa da TTR é formada pela associação de dois dímeros, através de ligações de hidrogénio e contactos hidrofóbicos entre as voltas AB e GH, de cada dímero, e a cadeia- $\beta$  H (Figura 1.2.2).<sup>37</sup> A proteína possui dois locais de ligação, onde se liga o seu ligante natural, que são estruturalmente equivalentes, e localizam-se nas cavidades formadas pela interface entre os dois dímeros.<sup>38</sup> Os monómeros da TTR trocam entre si, através de três eixos *C*<sub>2</sub> perpendiculares, sendo que um deles interceta ao longo dos dois locais de ligação. Cada local de ligação na TTR contém três pares de cavidades de ligação de halogénio (HBP, do inglês *Halogen Binding Pockets*): a cavidade externa 1 (HBP1-HBP1'), a cavidade intermédia (HBP2-HBP2') e a cavidade interna (HBP3-HBP3'). A HBP1 e a sua simetria dupla HBP1' são formadas pelos aminoácidos lisina-15, leucina-17, treonina-106 e valina-121 dos dois monómeros. HBP2-HBP2' compreende os resíduos leucina-17, leucina-110, treonina-109 e leucina-110. HBP3-HBP3' compreende os resíduos serina-117, leucina-110, treonina-119 e alanina-108.<sup>39</sup>



**Figura 1.2.2** - Representação esquemática das estruturas tridimensional e de um local de ligação da TTR. (A) Representação tridimensional da forma nativa da TTR. Cada monómero da TTR está representado numa cor diferente. (B) Representação ilustrativa de um local de ligação da TTR. A vermelho estão representados os aminoácidos de um monómero que compõem o local de ligação e a azul os aminoácidos de outro monómero que compõem o local de ligação. Cada aminoácido tem a respetiva identificação, da mesma cor do monómero a que corresponde. As imagens (A) e (B) foram produzidas com programa Chimera, usando a estrutura cristalográfica de TTR na forma nativa (código PDB: 3A4D).

A principal função biológica realizada pela TTR é o transporte da tiroxina e do retinol (quando em associação com a proteína transportadora de retinol), no plasma, no fluido cefalorraquidiano e no olho.<sup>33</sup>

A tiroxina (T4) é uma hormona da tiroide e desempenha um papel na regulação do metabolismo basal, nas funções cardíaca e digestiva, no controlo muscular, na conservação óssea e no desenvolvimento cerebral.<sup>40</sup> No plasma humano, existem três proteínas responsáveis pelo transporte da T4 por todo o organismo, sendo a TTR uma delas. A TTR permite controlar a entrega da T4 a órgãos alvo, aumentar o seu tempo de meia-vida e evitar os efeitos tóxicos originários da T4 livre.<sup>40</sup> A T4 liga-se aos dois locais de ligação da proteína. No entanto, mostra cooperatividade negativa (K<sub>d1</sub> = 10 nM e K<sub>d2</sub> = 1053 nM), devido ao impedimento estéreo causado pela ocupação do primeiro local de ligação.<sup>41</sup>

O retinol, também conhecido por vitamina A, é essencial para a proteção da córnea dos olhos, para manter a função das células da pele, para prevenir infeções e para o crescimento. O transporte do retinol é feito pela proteína transportadora de retinol

(RBP), sendo que o retinol se liga à RBP numa estequiometria de 1:1.<sup>41</sup> A RBP protege o retinol da oxidação, facilita a sua solubilização e melhora o seu transporte até aos tecidos alvo. No plasma humano, a RBP circula associada à TTR, construindo um complexo proteína-proteína numa estequiometria de TTR:RBP de 1:2. A RBP liga-se à TTR nos mesmos locais de ligação que a T4 (K<sub>d1</sub> = 150 nM e K<sub>d2</sub> = 35000 nM)<sup>42</sup> e esta associação protege a RBP da filtração glomerular e do catabolismo renal.<sup>43</sup>

Em 1854, Rudolf Virshow introduziu, pela primeira vez, o termo amilóide, enquanto analisava depósitos presentes em tecidos de pacientes com certas doenças. Hoje em dia, sabe-se que estes depósitos são formados por uma classe de proteínas, que ao sofrerem alterações na sua conformação, formam fibras amilóides.<sup>44</sup> As doenças amilóides provêm do possível dobramento anormal da proteína ou dificuldade desta em manter-se na sua estrutura tridimensional nativa.<sup>33</sup> Cada doença amilóide envolve a agregação de uma proteína específica e, atualmente, cerca de 50 proteínas humanas foram identificadas com tendência a formar agregados amilóides insolúveis.<sup>45</sup> Uma destas proteínas é a TTR.

A TTR tem vindo a ser relacionada com uma série de amiloidoses (ATTR). Ao longo dos últimos anos, a fim de explicar a agregação e formação de fibras amilóides a partir da TTR, vários estudos têm sido feitos e modelos moleculares têm sido propostos. Neste momento, sabe-se que a base molecular da agregação proteica em fibras amilóides são intermediários proteicos instáveis, isto é, proteínas parcialmente desdobradas. Por vezes, a proteína não é capaz de manter a sua estrutura tridimensional ou falha no processo de enrolamento da proteína, que resulta na formação de agregados solúveis e fibras amiloides altamente estáveis e insolúveis. A agregação pode estar relaciona com mutações na cadeia polipeptídica, interações com iões metálicos, alterações nas condições fisiológicas (por exemplo, pH e temperatura) ou com modificações químicas (oxidação ou proteólise).<sup>46</sup>

A deposição das fibras amiloides estáveis e insolúveis promovem o aparecimento de ATTR. A TTR amiloidose hereditária com polineuropatia (hATTR-PN), usualmente conhecida por Polineuropatia Amiloidótica Familiar, foi a primeira ATTR a ser descoberta, pelo Professor Corino de Andrade, em 1952, quando observou "uma forma peculiar de neuropatia periférica, caracterizada histologicamente por amiloidose generalizada, envolvendo especialmente os nervos periféricos", em pacientes do norte de Portugal.<sup>47</sup> No entanto, foi Costa e colaboradores que identificaram a TTR como o principal componente proteico presente nas fibras amilóides depositadas maioritariamente no sistema nervoso periférico de pacientes portugueses com hATTR-PN.<sup>48</sup>

A hATTR-PN é uma doença rara, hereditária, progressiva e irreversível e estimase que afeta entre 8000 a 10000 pessoas, em todo o mundo.<sup>49</sup> A doença manifesta-se por volta dos 25-30 anos e afeta a sensibilidade aos estímulos e a capacidade motora. A hATTR-PN tem maior incidência em Portugal, Suécia, Japão, mas também em Itália, França, Chipre, Alemanha, Espanha, Países Baixos, Turquia, Bulgária, Brasil e Estados Unidos da América. Portugal, Suécia e Japão são os países com maior prevalência da doença, contribuindo juntos com 43% dos doentes, globalmente.<sup>50</sup>

Para além da hATTR-PN, a TTR está envolvida em mais duas ATTR: TTR amiloidose hereditária com cardiomiopatia (hATTR-CM) e TTR amiloidose relacionada à idade (ATTRwt). A hATTR-CM, usualmente conhecida por Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar, resulta da deposição e acumulação de fibras amiloides, maioritariamente no coração. Esta patologia afeta indivíduos com mais de 50 anos e é mais comum em pacientes com ascendência afro-americana ou afro-caribenhas.<sup>51</sup> A ATTRwt, usualmente conhecida por Amiloidose Senil Sistémica, resulta da deposição patológica de fibras amilóides provenientes da proteína TTR na forma nativa (*wt*-TTR). A sua acumulação acontece, principalmente, no coração, originando insuficiência cardíaca. A ATTRwt afeta aproximadamente 25% da população acima dos 80 anos.<sup>52</sup>



**Figura 1.2.3 -** Representação dos países europeus afetados com patologias amilóides associadas à TTR e das mutações pontuais observadas em cada país. Imagem adaptada do trabalho de Yesim Parman<sup>53</sup> e restante equipa, com dados remetentes a março de 2014.

Tanto a hATTR-PN como a hATTR-CM são patologias resultantes de variantes da TTR, originárias de mutações no gene que codifica a proteína TTR (Figura 1.2.3). Atualmente, já foram identificadas cerca de 150 mutações da TTR.<sup>54</sup> A forma mais comum de polineuropatia relacionada com a TTR é causada pela mutação Val30Met<sup>55</sup>, caracterizada pela substituição da valina pela metionina na posição 30, e a mutação mais comum associada à hATTR-CM é a Val122IIe<sup>56</sup>, caracterizada pela substituição da valina pela isoleucina na posição 122. A mutação Leu55Pro, na qual a leucina é substituída pela

prolina na posição 55, produz a forma mais agressiva da patologia hATTR-PN, que aparece por volta dos 15 e 20 anos e tem implicações para o coração.<sup>57</sup>

#### 1.2.1. Abordagens Terapêuticas

Atualmente, existem tratamentos que ajudam a diminuir os sintomas e a regredir a progressão da patologia. No caso da TTR, as abordagens terapêuticas podem ser direcionadas de várias formas: através do transplante de fígado, prevenção da associação de intermediários amiloidogénicos, desagregação das fibras amilóides, terapia de modificação genética ou prevenção da formação de intermediários amiloidogénicos (Figura 1.2.4).



**Figura 1.2.4 -** Mecanismo de agregação da TTR e diferentes estratégias terapêuticas. As setas a cinzento correspondem ao mecanismo de agregação da TTR. As caixas a verde correspondem a estratégias terapêuticas para cada passo do mecanismo de agregação representado.

Uma vez que o fígado é a principal fonte de síntese de TTR, o transplante de fígado visa impedir a formação de depósitos de agregados amilóides adicionais, a partir da eliminação da produção de TTR mutada. Em 1990, na Suécia, foi feito o primeiro transplante de fígado num paciente com hATTR-PN.<sup>58</sup> Desde esta data até 31 de dezembro de 2017, foram realizados um total de 2236 transplantes de fígado, de acordo

Capítulo 1

com o *FAP World Transplant Registry*<sup>59</sup>, sendo que foi em Portugal onde se realizaram mais transplantes, um total de 1017. De facto, este tipo de terapia mostra ser vantajosa, por melhorar a capacidade de andar, as funções intestinais, o estado nutricional e o bemeestar em geral dos pacientes. No entanto, a melhoria na qualidade de vida apenas é estável nos primeiros quatro anos após o transplante, pois após este período a deposição de fibras amiloides retoma.<sup>60,61</sup> Para além disto, é um tratamento de custo elevado, há escassez de dadores, é necessário uma terapia imunossupressora a longo prazo póstransplante e há um número significativos de doentes que não podem ser submetidos ao tratamento devido ao estado de progressão da doença.<sup>62</sup>

As fibras amilóides provenientes da TTR, resultam da associação de intermediários amiloidogénicos, que correspondem a monómeros da TTR com estrutura alterada.<sup>63</sup> Daqui surge outra estratégia terapêutica: evitar a associação de intermediários amiloidogénicos, bloqueando os locais de interação entre eles. Contudo, esta estratégia não está muito desenvolvida, uma vez que as interfaces envolvidas na formação das fibras ainda não são completamente compreendidas.

Uma outra estratégia terapêutica é a desagregação das fibras amilóides. Em 1995, Merlini e colaboradores propuseram a interação entre as fibras amilóides e o 4'desoxi-4'-iododoxorubicina (IDOX).<sup>63</sup> Em 1999, Palha e colaboradores mostraram que o IDOX interage com as fibras amilóides provenientes da TTR e, consequentemente, degrada as estruturas fibrilares em materiais solúveis e amorfos.<sup>63</sup> No entanto, apenas alguns pacientes responderam ao tratamento com IDOX, durante os ensaios clínicos.<sup>64</sup>

Uma das mais recentes estratégias terapêuticas é a modificação genética do gene que codifica a TTR. A função da TTR parece ser dispensável para os seres humanos, portanto, não se espera que o silenciamento da expressão do gene que codifica a TTR cause graves consequências a longo prazo. Com esta estratégia acredita-se que não haja progressão da doença, reduzindo os níveis plasmáticos da *wt*-TTR e de TTR mutante. Dois tipos de terapias de silenciamento de genes foram avaliadas durante ensaios clínicos em fase 3: *antisense oligonucleotides* (ASOs) e *small interfering RNAs* (siRNAs).<sup>54</sup> ASOs tem como alvo o gene TTR na região 3' não traduzida, que não contém mutações conhecidas da TTR. Como resultado, ASOs inibe a síntese, no fígado, do ARN mensageiro da TTR mutante e da *wt*-TTR.<sup>65,66</sup> O objetivo dos siRNAs é controlar a expressão genética. Quando os siRNAs estão ligados ao complexo silenciador induzido pelo ARN, eles induzem a clivagem do ARN mensageiro alvo. A sua constituição com nanopartículas lipídicas permite uma entrega mais fácil e segura ao compartimento intracelular dos hepatócitos.<sup>67</sup>

A estratégia terapêutica mais bem-sucedida é a que previne a formação de intermediários amiloidogénicos e é, também, a de maior interesse para este trabalho. O
objetivo desta estratégia é estabilizar a forma tetramérica da TTR, impedindo a sua dissociação. A pesquisa baseia-se na procura de moléculas pequenas, capazes de se ligarem aos dois locais de ligação da TTR e estabilizarem a forma nativa da proteína, tal como o ligante natural da TTR, a tiroxina.<sup>68</sup> No âmbito desta estratégia terapêutica, há um medicamento comercial, o Tafamidis meglumine (marca Vyndaqel), que mostra retardar a progressão da doença.<sup>69</sup> O Tafamidis meglumine foi aprovado em 2011 pela Agência Europeia de Medicamentos com terapia direcionada ao tratamento da hATTR-PN. Este fármaco consegue ligar-se aos dois locais de ligação da tiroxina na TTR e estabiliza o tetrâmero, inibindo a formação de fibras amilóides. O Tafamidis meglumine mostra ter cooperatividade negativa (K<sub>d1</sub> = 3 nM e K<sub>d2</sub> = 278 nM), seletividade e alta afinidade com os locais de ligação das proteínas mutadas Val30Met e Val122IIe, e da *wt*-TTR.<sup>70</sup>

Da classe dos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) também foram testados fármacos como possíveis estabilizadores do tetrâmero TTR, tais como o diflunisal e o ácido flufenâmico. De facto, ambos se ligam aos dois locais de ligação da TTR, impedindo a formação de intermediários amiloidogénicos.<sup>71</sup>

O diflunisal ou ácido 5-(2,4-difluorofenil)2-hidroxi-benzóico (Figura 1.2.5) é um derivado fluorado do ácido salicílico. Este fármaco foi desenvolvido por Ruyle e equipa<sup>72</sup> e foi aprovado pela FDA, como fármaco não esteroide com propriedades analgésica, antiinflamatória e antipirética, tendo sido introduzido no mercado com o nome de marca Dolobid<sup>73</sup>. As indicações do diflunisal são para o tratamento sintomático de dor ligeira a moderada, provocado por inflamação, osteoartrite ou artrite reumatoide.<sup>73</sup> Berk e a sua equipa conduziram um estudo aleatório, duplamente cego, com placebo e diflunisal em pacientes com hATTR-PN (com e sem a mutação Val30Met), durante 2 anos. Conseguiram demonstrar o efeito clínico do diflunisal na progressão da hATTR-PN e a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.<sup>74</sup>



**Figura 1.2.5** - Estrutura molecular do composto diflunisal. Imagem produzida no programa ChemDraw Ultra 12.0.

Capítulo 1

O diflunisal liga-se aos dois locais de ligação da wt-TTR (código PDB: 3D2T) com cooperatividade negativa ( $K_{d1} = 75$  nM e  $K_{d2} = 1100$  nM). O diflunisal tem dois modos de ligação aos locais de ligação da TTR: o modo de ligação forward, onde o substituinte aniónico do anel hidrofílico se encontra na cavidade externa do local de ligação (HBP1-HBP1') e o anel hidrofóbico se encontra na cavidade interna (HBP3-HBP3'), e o modo de ligação reverse, onde o anel hidrofóbico se encontra na cavidade externa do local de ligação. Devido ao eixo  $C_2$  ao longo dos locais de ligação, um segundo modo de ligação relacionado à simetria está presente para ambas as conformações. Portanto, para cada local de ligação, o diflunisal liga-se através de quatro conformações, com igual percentagem de ocupação: as conformações forward e reverse e cada uma com respetivo modo de ligação simetricamente equivalente, forward' e reverse' respetivamente (Figura 1.2.6). O modo de ligação forward aumenta as interações hidrofóbicas e as de van der Waals entre o diflunisal e a cavidade interna do local de ligação da TTR, por ser uma cavidade hidrofóbica. Por outro lado, no modo de ligação reverse aumentam as interações eletrostáticas entre o grupo carboxílico do diflunisal e o oxigénio da cadeia lateral da treonina-119 e o da cadeia principal da alanina-108, na cavidade interna do local de ligação da TTR.75



**Figura 1.2.6** - Representação dos quatro modos de ligação do diflunisal nos locais de ligação da tiroxina na TTR. (A) Representação do modo de ligação *forward* e *forward*'. (B) Representação do modo de ligação *reverse* e *reverse*'. As estruturas moleculares do diflunisal estão representadas a cinzento, com os grupos carboxílicos a vermelho e os átomos de flúor a verde. Os aminoácidos que compreendem os locais de ligação estão representados e devidamente identificados. As imagens (A) e (B) foram produzidas com o programa Chimera, a partir da estrutura cristalográfica do complexo *wt*-TTR-diflunisal (código PDB: 3D2T).

O ácido flufenâmico ou ácido 2-[3-(trifluormetil)anilino]benzoico (Figura 1.2.7) é um derivado do ácido antranílico com propriedades analgésica, anti-inflamatória e

antipirética.<sup>76</sup> Este fármaco foi sintetizado pela primeira vez por Gunter Metz<sup>77</sup>, contudo ele ainda não foi aprovado pela FDA. As ações anti-inflamatórias do ácido flufenâmico ocorrem, principalmente, através da redução da síntese de prostaglandinas, pela inibição das enzimas ciclo-oxigenases.



**Figura 1.2.7 -** Estrutura molecular do composto ácido flufenâmico. A imagem foi produzida no programa ChemDraw Ultra 12.0.

Comparativamente com o diflunisal, o ácido flufenâmico tem maior afinidade de ligação e mostra ser mais seletivo para a *wt*-TTR.<sup>71</sup> O ácido Flufenânico liga-se aos dois locais de ligação equivalentes da *wt*-TTR (código PDB: 1BM7) com cooperatividade negativa (K<sub>d1</sub> = 30 nM e K<sub>d2</sub> = 255 nM).<sup>78</sup> Para cada local de ligação da TTR, o ácido flufenânico tem quatro conformações de ligação diferentes, com aproximadamente a mesma taxa de ocupação: a conformação *cis*, a conformação *trans* e os respetivos modos de ligação simetricamente equivalentes, *cis'* e *trans'* respetivamente (Figura 1.2.8). Nas quatro conformações do ácido flufenâmico, o substituinte -CF<sub>3</sub> ocupa a cavidade interna do local de ligação (HBP3-HBP3'). Os dois anéis aromáticos do fármaco encontram-se numa conformação de baixa energia na cavidade intermédia do local de ligação (HBP2-HBP2'). Por fim, o grupo carboxílico ocupa a cavidade externa do local de ligação (HBP1-HBP1'), interagindo com as cadeias laterais dos resíduos de lisina-15.<sup>78</sup>



**Figura 1.2.8** - Representação dos quatro modos de ligação do ácido flufenâmico nos locais de ligação da tiroxina na TTR. (A) Representação do modo de ligação *cis* e *cis*'. (B) Representação do modo de ligação *trans* e *trans*'. As estruturas moleculares do ácido flufenâmico estão representadas a cinzento, com os grupos carboxílicos a vermelho e os átomos de flúor a verde. Os aminoácidos que compreendem os locais de ligação estão representados e devidamente identificados. As imagens (A) e (B) foram produzidas com o programa Chimera, a partir da estrutura cristalográfica do complexo *wt*-TTR-ácido flufenâmico (código PDB: 1BM7).

Assim como todos os AINEs, o diflunisal e o ácido flufenâmico têm efeito adversos, como lesões na mucosa gástrica, disfunção renal e insuficiência cardíaca congestiva, o que pode comprometer o tratamento com estes fármacos.<sup>79</sup>

O AG10 ou ácido 3-(3-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)propoxy)-4-fluorobenzoico é uma molécula pequena, em investigação, derivada de um composto de partida, que foi considerado um dos melhores *hits* da experiência de *high-throughput screening*, com fim a encontrar novos estabilizadores do tetrâmero TTR (Figura 1.2.9). O AG10 é um estabilizador altamente potente e seletivo para a *wt*-TTR e para a Val122IIe. Para além disto, o AG10 previne a dissociação da Val122IIe plasmático de pacientes com hATTR-CM e protege de forma eficaz os cardiomiócitos humanos da toxicidade amilóide.<sup>80</sup> Atualmente, o AG10 está na fase III dos ensaios clínicos e os ensaios da fase II, envolvendo pacientes com sintomas de hATTR-CM, demonstraram que o AG10 é bem tolerado e aumenta a TTR no plasma, de forma dose-dependente.<sup>81</sup>



**Figura 1.2.9 –** Estrutura molecular do composto AG10. A imagem foi produzida no programa ChemDraw Ultra 12.0.

Comparando o AG10 com o diflunisal e o ácido Flufenânico, o AG10 mostra maior afinidade com a *wt*-TTR, pelo que as constantes de dissociação são K<sub>d1</sub> = 4.8 nM e K<sub>d2</sub> = 314 nM.<sup>80</sup> O AG10 liga-se aos dois locais de ligação da TTR (código PDB: 4HIQ) com cooperatividade negativa e através de apenas duas conformações: a conformação normal e a sua respetiva conformação simetricamente equivalente. Nesta conformação, o pirazol encontra-se na cavidade interna do local de ligação da TTR (HBP3-HBP3') e o anel aromático com o flúor e o grupo carboxílico encontra-se na cavidade externa do local de ligação (HBP1-HBP1') (Figura 1.2.10).<sup>80</sup>



**Figura 1.2.10** - Representação dos dois modos de ligação do AG10 nos locais de ligação da tiroxina na variante Val122IIe-TTR. As estruturas moleculares do AG10 estão representadas a cinzento, com os grupos carboxílicos e o oxigénio a vermelho e os átomos de flúor a verde. Os aminoácidos que compreendem os locais de ligação estão representados e devidamente identificados. A imagem foi produzida com o programa Chimera, usando a estrutura cristalográfica do complexo Val122IIe-TTR-AG10 (código PDB: 4HIQ)

#### 1.3. Objetivo

O flúor tem propriedades que o tornam num elemento muito interessante para a Química Medicinal. A fluoração de compostos permite modular as propriedades físicoquímicas, as propriedades farmacocinéticas e até mesmo a as interações e a afinidade aos recetores. Deste modo, escolheram-se três compostos fluorados, tendo diferentes rácios de flúor: AG10, diflunisal e ácido flufenâmico. São três compostos conhecidos por se ligarem aos dois locais de ligação da tiroxina na proteína TTR e desta forma estabilizarem a forma nativa tetramérica da proteína. O objetivo deste trabalho é o estudo das interações destes compostos nos locais de ligação da *wt*-TTR e o envolvimento do flúor, presente nos diversos compostos, nas interações feitas no complexo. Para tal, utilizou-se uma das vastas aplicações na Ressonância Magnética Nuclear: ensaios de titulação usando o RMN de flúor (<sup>19</sup>F-RMN). Para completar e ajudar a interpretar os resultados obtidos nas experiências de <sup>19</sup>F-RMN, foi utilizada uma técnica experimental, a Calorimetria de Titulação Isotérmica (CTI) e uma técnica computacional, a modelação molecular usando o programa UCSF Chimera.

# capítulo 2

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1 Materiais

A TTR foi expressa e purificada pelo grupo de investigação de Química Biológica do Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

Os compostos usados são de origem comercial, com exceção do AG10. O diflunisal foi adquirido à Acros Organics e o ácido flufenâmico foi adquirido à Sigma Aldrich.

O AG10 foi sintetizado e fornecido pelo grupo de investigação de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

#### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, mais conhecida por Espectroscopia RMN, é uma das mais poderosas e vantajosas ferramentas para elucidar a estrutura, as interações e a dinâmica das moléculas.

A Ressonância Magnética Nuclear é uma ferramenta versátil para a análise de interações proteína-ligante. As experiências de RMN podem fornecer informações sobre os complexos proteína-ligante, incluindo detalhes estereoquímicos, velocidades de alteração conformacional e identificação de interações entre os ligantes e a proteína a nível atómico.<sup>82</sup>

Uma vez que os fármacos fluorados são cada vez mais comuns na indústria farmacêutica, a espectroscopia RMN de flúor<sup>83–86</sup>, também referida como <sup>19</sup>F-RMN, é uma ferramenta poderosa, com várias aplicações na investigação farmacêutica, tais como: elucidação da estrutura de moléculas pequenas, averiguação do estado de pureza dos compostos, triagem de pequenas moléculas contra um alvo biológico e estudo de interações alvo-fármaco.<sup>9</sup> O núcleo de flúor tem propriedades que o tornam muito atrativo em estudos por RMN de ligação de ligantes a proteínas, tais como: o flúor possui apenas um isótopo natural, <sup>19</sup>F, o número quântico de spin é igual a 1/2, é 100% abundante na natureza e tem sensibilidade geral igual a 83% da sensibilidade do <sup>1</sup>H.<sup>82,87</sup> O <sup>19</sup>F-RMN também é caracterizado por uma gama extremamente ampla de desvios químicos, começando nos -448 ppm do CIF até aos +865 ppm do F<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>87</sup> A alteração de desvio químico é altamente sensível a mudanças na estrutura molecular e a interações moleculares envolvendo a molécula fluorada.<sup>82</sup>

Uma vez que o desvio químico do <sup>19</sup>F-RMN é altamente sensível a mudanças do ambiente químico, o uso da espectroscopia <sup>19</sup>F-RMN em estudos de interações liganteproteína tem recebido grande atenção. Estes estudos normalmente são feitos por ensaios de titulação usando o RMN. A obtenção dos sinais de RMN dos ligantes livres, geralmente de baixo peso molecular, é essencial antes de obter os sinais de RMN dos ligantes a interagir com o recetor. Quando uma experiência de titulação de <sup>19</sup>F-RMN é realizada, onde o ligante é titulado para uma solução com a proteína, obtém-se diferentes espetros de <sup>19</sup>F-RMN. Comparando com o espetro do ligante livre, podemos observar alterações dos desvios químicos dos sinais do flúor, que se devem a alterações no ambiente químico do átomo de flúor, e alterações na largura a meia altura do sinal, que se devem à contribuição do fenómeno de troca química entre estados livre e ligado. Se estas alterações forem observáveis, significa que o ligante interage com a proteína e que o flúor pode estar envolvido na interação entre o ligante e a proteína. Os parâmetros que podem ser medidos e que são influenciados pela ligação do ligante ao recetor são os desvios químicos, integrais dos sinais, tempo de relaxação transversal (T<sub>2</sub>), Efeito Nuclear de Overhauser, coeficientes de difusão molecular (usando sequências de impulsos de RMN apropriados) e, possivelmente, constantes de acoplamento de spin, se as larguras de linha forem estreitas o suficiente para os resolver.<sup>87</sup> No entanto, os dois parâmetros que são medidos com maior frequência são os desvios químicos e a largura a meia altura do sinal RMN.

O fenómeno de troca química é resultado da transferência do núcleo em observação entre estados com ambientes químicos distintos. Em RMN, podem ser definidos diferentes regimes de troca em função de diferentes parâmetros RMN. O parâmetro RMN mais comummente considerado é o desvio químico. Neste caso, é normal definir três regimes característicos de troca química: troca rápida, troca lenta e troca intermédia (Figura 2.2.1). Os parâmetros que caracterizam o regime de troca química de uma interação proteína-ligante são a constante de velocidade de troca, k<sub>ex</sub>, e a diferença de desvio químico entre os estados livre e ligado do ligante,  $\Delta \delta$ .<sup>88</sup>



**Figura 2.2.1 -** Representação esquemática de três regimes de troca química, em função do desvio químico. F indica os sinais do composto na forma livre e B os sinais do composto na forma ligada ao recetor. Imagem adaptada do trabalho de Hazime Saitô.<sup>89</sup>

Se a interação estiver em regime de troca rápida, o  $k_{ex}$  é muito maior que  $\Delta \delta$  e o sinal de RMN aparecerá a um desvio químico que é a média ponderada pela respetiva população dos desvios químicos dos estados livre e ligado do ligante. Se a interação estiver no regime de troca intermédia, o  $k_{ex}$  é comparável em magnitude a  $\Delta \delta$  e o sinal de RMN torna-se muito mais largo, apresentando uma contribuição significativa da velocidade de troca química para a largura de linha a meia altura. Se a interação estiver em regime de troca lenta, o  $k_{ex}$  é muito menor que  $\Delta \delta$  e são observados dois sinais com diferentes desvios químicos correspondentes aos estados livre e ligado do ligante.<sup>88</sup> Estas alterações nos desvios químicos dos sinais, após a ligação do ligante à proteína, podem ocorrer como resultado de efeitos eletrostáticos, por indução de campos elétricos ou efeitos de anisotropia magnética por grupos carboxílicos ou anéis aromáticos.<sup>87</sup>

Quando um ligante interage com uma proteína, ambas as estruturas sofrem alterações. Estas alterações estruturais refletem-se numa variedade de parâmetros físicos ou observáveis do RMN, incluindo o parâmetro de relaxação transversal (T<sub>2</sub>). Também existe a relaxação longitudinal, T<sub>1</sub>, que resulta da estabilização do valor de equilíbrio da magnetização nuclear ao longo do eixo do campo magnético, eixo z. O T<sub>1</sub> é responsável pela perda da intensidade do sinal. A relaxação transversal, T<sub>2</sub>, resulta do decaimento da magnetização dos spins nucleares ao longo do plano xy, ou seja, perpendicularmente ao campo magnético aplicado. A relaxação T<sub>2</sub> não afeta o total de magnetização ao longo do eixo z e é responsável pela largura do sinal de RMN a meia altura,  $\Delta v_{1/2}$ , segundo a expressão (2.1):<sup>90,91</sup>

$$\Delta v_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2}$$
(2.1)

Ou seja, quanto maior for o T<sub>2</sub> de uma molécula, mais estreitos serão os sinais de RMN dela. Em regra geral, moléculas com maior peso molecular apresentam uma maior largura de sinal a meia altura e as moléculas de menor peso molecular apresentam sinais mais estreitos.<sup>92</sup> O peso molecular, M<sub>w</sub>, está relacionado com o tempo de correlação da molécula,  $\tau_c$ , que é o tempo necessário para que a molécula gire, em solução, cerca de um radiano.<sup>90,91</sup> Esta relação é demonstrada pela seguinte expressão (2.2):<sup>93</sup>

$$\tau_{\rm c} = 10^{-12} \, \times {\rm M}_{\rm W} \tag{2.2}$$

Uma vez que, o tempo de relaxação transversal de uma molécula depende do seu tempo de correlação, também existe uma correlação (2.3) entre estas duas variáveis:<sup>91</sup>

$$\frac{1}{T^2} = \left(\frac{w_d}{2\pi}\right)^2 \tau_c \tag{2.3}$$

Onde,  $w_d$  é a frequência de Larmor na presença de um campo dipolar magnético aleatório.<sup>91</sup> Desta expressão retira-se que o tempo de correlação de uma molécula é inversamente proporcional ao T<sub>2</sub>, isto é, quanto maior o  $\tau_c$ , mais rápido será o decaimento da relaxação do sinal de RMN (Figura 2.2.2).



**Figura 2.2.2 -** Tempo de relaxação em função do tempo de correlação. Há medida que o tempo de correlação aumenta, o tempo de relaxação transversal diminui. Imagem adaptada do trabalho de Hans J. Reich.<sup>94</sup>

Assim sendo, moléculas com pesos moleculares maiores, como é o caso das proteínas, terão  $\tau_c$  maiores, T<sub>2</sub> menores e, por isso, apresentarão sinais de RMN mais largos. Portanto, quando um ligante, que é uma molécula de baixo peso molecular, interage com uma proteína, adquire algumas das suas propriedades, tais como diminuição do T<sub>2</sub> e, consequentemente, um aumento da largura do seu sinal a meia altura.

#### 2.2.2 Espectroscopia de Absorção no UV-Visível

A espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-visível) é uma das ferramentas mais usadas para análises quantitativas e qualitativas. O uso do espectrofotómetro para determinar a extensão da absorção de luz a diferentes comprimentos na gama do ultravioleta ou visível de uma dada solução, é comummente conhecido espectrofotometria.<sup>95</sup> A espectrofotometria no UV-visível é usada,

normalmente, para determinar a concentração e o coeficiente de extinção molar de proteínas e fármacos em solução.

A espectroscopia de absorção no UV-visível baseia-se no facto de os compostos absorverem radiação de luz, num comprimento de onda específico. Quando certos grupos químicos de uma molécula são expostos à radiação UV-visível, uma fração da energia da luz é absorvida pela molécula e os seus eletrões são promovidos do estado fundamental para o estado excitado (Figura 2.2.3). O espectrofotómetro regista a diferença entre a intensidade da luz inicial e da luz emergente após atravessar a solução em análise, resultando num espetro de absorvância (A) em função do comprimento de onda ( $\lambda$ ). O grupo funcional da molécula responsável pela absorção de luz designa-se por cromóforo. O comprimento de onda no qual o cromóforo absorve luz depende da diferença de energia entre o estado fundamental e os estados excitados.<sup>96</sup>



**Figura 2.2.3 –** Representação de quatro tipos de transições eletrónicas em espectroscopia de absorção no UV-visível. A azul claro está representada a transição  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ , a vermelho a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ , a azul escuro a transição  $n \rightarrow \pi^*$  e a verde a transição  $n \rightarrow \sigma^*$ .

A absorvância (A) de uma amostra está relacionada com a Transmitância (T), de acordo com a equação 2.4. A transmitância é a razão entre as intensidades da luz transmitida (I) e incidente (I<sub>0</sub>), definida como I/I<sub>0</sub>.

$$A = -log(T) = -log(\frac{I}{I_0})$$
(2.4)

A absorvância também está relacionada com a concentração do cromóforo, de acordo com a *Lei de Beer-Lambert*. A *Lei de Beer-Lambert* correlaciona o coeficiente de extinção molar (em M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>),  $\varepsilon$ , a concentração molar do cromóforo (em M), *c*, e a largura da cuvete (em cm), *I* (equação 2.5).

$$A = \varepsilon c l \tag{2.5}$$

Para determinar a concentração molar de uma molécula em solução, é necessário conhecer o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) dessa molécula, ao comprimento de onda de observação, e determinar experimentalmente a absorvância da solução a esse comprimento de onda. Para determinar o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de uma molécula, é necessário registar a absorvância de diferentes soluções de concentração conhecida dessa molécula, sendo o  $\epsilon$  determinado a partir do declive da reta absorvância *versus* concentração.

Tanto as ligações peptídicas como os aminoácidos fenilalanina, triptofano e tirosina são os principais cromóforos de uma proteína, daí as proteínas absorverem luz na região ultravioleta do espetro. As ligações peptídicas absorvem na região de UV distante, abaixo dos 230 nm, devido às transições eletrónicas  $n \rightarrow \pi^* e \pi \rightarrow \pi^*$ , e os aminoácidos aromáticos absorvem na região UV próxima, entre os 250 e os 290 nm, devido à transição eletrónica  $\pi \rightarrow \pi^*$  do sistema eletrónico deslocalizado que constitui as suas cadeias laterais.<sup>96</sup>

#### 2.2.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (CTI) é um método universal para medir parâmetros termodinâmicos de interações moleculares. Baseia-se na deteção da libertação ou absorção de calor que acompanha um processo de interação molecular, a temperatura e pressão constantes. O CTI é a única ferramenta analítica, que, numa experiência apenas, fornece um perfil termodinâmico completo de uma interação molecular, isto é, consegue fornecer a contante de dissociação (K<sub>d</sub>), a variação da entalpia ( $\Delta$ H), a variação da entropia ( $\Delta$ S) e a estequiometria de ligação (n).<sup>97</sup> A partir destes valores é possível determinar a energia livre de Gibbs ( $\Delta$ G) para o processo.

Um calorímetro CTI consiste em duas células, a célula da amostra e a célula da referência, revestidas por uma capa adiabática, e uma seringa de precisão, que injeta solução na célula da amostra. Ambas as células são constantemente monitorizadas pelo instrumento para manter o equilíbrio térmico e a célula da referência serve como referência de temperatura para as medições. A experiência é realizada titulando a solução da seringa para a solução da célula da amostra. A interação entre as moléculas e consequente troca de calor na célula da amostra resultará numa diferença de temperaturas entre a célula da amostra e a célula da referência. A energia necessária para o instrumento repor o equilíbrio térmico entre as células corresponde ao calor trocado.<sup>98</sup>

As interações bioquímicas mais comuns estudadas em experiências de CTI são as interações proteína-proteína, proteína-ligante, proteína-ácido desoxirribonucleico (ADN), proteína-peptídeo, proteína-lípido, enzima-inibidor, hidrato de carbono-proteína e ácido nucleico-proteína. Em qualquer dos casos, é essencial que as soluções de titulante e titulado estejam nas mesmas condições experimentais. Normalmente, é usado um tampão de pH onde a proteína foi dialisada.

#### 2.2.4 UCSF Chimera

O programa Chimera é um programa computacional, que permite a visualização interativa e análise de estruturas moleculares e dados relacionados, tais como mapas de densidade de carga, montagens supramoleculares, alinhamento de sequências, resultados de *docking*, trajetórias de dinâmica molecular e conjuntos conformacionais.<sup>99</sup>

O programa aceita ficheiros em formato PDB (*Protein Data Bank*), que são constituídos pelas coordenadas cartesianas (x,y,z) dos átomos que constituem uma estrutura molecular.

O uso do Chimera neste trabalho permitiu fazer alguns estudos simples de modelação molecular, por exemplo, determinar distâncias entre os átomos de flúor dos ligantes e diferentes átomos de resíduos de aminoácidos nos locais de ligação da TTR, com os quais interagiam, bem como visualizar as estruturas moleculares e as conformações adquiridas pelos ligantes.

A versão do programa utilizado foi a versão 1.13.1.

#### 2.3 Procedimentos Experimentais

#### 2.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Todas as experiências de RMN foram realizadas no espectrómetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III, que opera à frequência de protão de 400 Hz.

De modo a atribuir espetros aos compostos diflunisal, ácido flufenâmico e AG10 e verificar os seus estados de pureza, fez-se várias experiências de RMN, tais como: Ressonância Magnética Nuclear de protão (<sup>1</sup>H-RMN), Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 (<sup>13</sup>C-RMN), *Distortionless Enhanncement by Polarization Transfer* (DEPT) 135, DEPT 90, *Correlation spectroscopy* (COSY), *Heteronuclear Single-quantum correlation spectroscopy* (HSQC), *Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy* (HMBC) e RMN de flúor-19 (<sup>19</sup>F-RMN).

As amostras dos compostos foram preparadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>), à concentração de 72,88 mM de diflunisal, 66,88 mM de ácido flufenâmico e 17,93 mM de AG10. Estas amostras foram as soluções-mãe usadas nas várias experiências de RMN e CTI, as quais foram quantificadas por análises quantitativas de RMN (qRMN). O qRMN é um método de quantificação direta de amostras, sendo que a relação fundamental é a intensidade do sinal no espectro de RMN ser diretamente proporcional ao número de núcleos responsáveis por aquela ressonância específica.<sup>100</sup> Para que esta quantificação seja real, é necessário garantir a relaxação total de todos os protões da molécula. Por este motivo são usados parâmetros de aquisição específicos para o qRMN: o tempo de relaxação longitudinal, que tem de ser muito longo, e o tempo do impulso deve corresponder a um impulso de 90º, a fim de garantir que a magnetização total retoma completamente à posição de equilíbrio antes da próxima sequência de impulsos.<sup>100</sup>

Nas experiências de titulação da *wt*-TTR com os compostos em estudo, seguidas por <sup>19</sup>F-RMN, foram preparadas três soluções de *wt*-TTR de 50  $\mu$ M, em solução tampão 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, pH = 7.2 e 5% (v/v) de água deuterada (D<sub>2</sub>O). A cada uma destas soluções foram adicionados volumes de diflunisal, ácido flufenâmico e AG10, respetivamente, de modo a que as razões estequiométricas finais de *wt*-TTR:ligante fossem de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 e, eventualmente, 1:6, e a percentagem

final de DMSO- $d_6$  não ultrapassasse os 5%. As amostras de proteína foram quantificadas por espectroscopia de absorção no UV-visível através do espectrofotómetro Spectronic Unicam UV500. A absorbância foi lida ao comprimento de onda 280 nm, usando o coeficiente de extinção molar 77600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.<sup>101</sup>

Os espetros de RMN das várias experiências foram processados e analisados no programa MestReNova v6.0.2-5475.

#### 2.3.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica

Todas as titulações foram feitas no MicroCal<sup>™</sup> VP-ITC. Foram realizadas duas titulações diferentes: uma titulação referente ao calor de diluição onde o ligante é titulado contra o tampão e uma titulação onde o ligante é titulado contra a *wt*-TTR. O calor de diluição é posteriormente subtraído ao calor da titulação proteína-ligante.

Na titulação proteína-ligante, as amostras de diflunisal e ácido flufenâmico foram inseridas na seringa, perfazendo um volume total de 600  $\mu$ L, e a amostra de *wt*-TTR foi colocada na célula da amostra, compreendendo um volume total de 1436  $\mu$ L de *wt*-TTR à temperatura de 25°C. A velocidade de agitação das titulações foi de 502 rpm, a potência da referência foi de 10  $\mu$ cal/seg, o volume das injeções foi de 10  $\mu$ L, sendo que a primeira injeção foi apenas de 4  $\mu$ L, e o tempo entre cada injeção foi de 350 segundos, num total de 29 injeções.

Na titulação ligante-tampão, as amostras de diflunisal e ácido flufenâmico foram inseridas na seringa e a amostra de tampão foi colocada na célula da amostra, perfazendo um volume total de 600 µL e 1436 µL, respetivamente, à temperatura de 25°C. As condições experimentais desta titulação foram iguais às condições da titulação proteína-ligante, exceto o tempo entre cada injeção, que foi de 450 segundos.

A concentração das amostras dos ligantes deve ser, por norma, vinte vezes mais concentrada que a amostra de *wt*-TTR. Assim sendo, as amostras de *wt*-TTR na forma nativa foram preparadas em concentrações de 5 µM e as amostras de diflunisal e de ácido flufenâmico foram preparadas em concentrações de 100 µM, todas elas em solução tampão 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM NaCl, pH 7.2, com 2% de DMSO. As concentrações das soluções de *wt*-TTR, diflunisal e ácido flufenâmico foram determinadas por espectroscopia de absorção no UV-visível.

Os coeficientes de extinção molar de ambos os compostos foram determinados por espectroscopia de absorção no UV-visível. Para os dois compostos foram preparadas quatro soluções de 25, 50, 75 e 100 µM, em solução tampão 20 mM de fosfato de sódio,

150 mM NaCl, pH 7.2, com 2% de DMSO, a partir de soluções-mãe quantificadas por RMN. As quatro soluções foram submetidas à espectroscopia de absorção no UV-visível, na qual se obtiveram quatro espetros de absorção com um máximo de absorção comum a um comprimento de onda específico. O declive da regressão linear da absorvância do composto, no comprimento de onda específico, em função da concentração da amostra corresponde ao valor do coeficiente de extinção molar do composto. Assim sendo, a leitura de absorvância do diflunisal foi feita a 252 nm utilizando o coeficiente de extinção molar de 13348 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Capítulo 6, Anexo I) e a leitura da absorvância do ácido flufenâmico foi feita a 289 nm utilizando o coeficiente de extinção molar de 13973,5 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Capítulo 6, Anexo II).

Os termogramas obtidos foram integrados usando o programa de análise de dados Origin 7.0 modificado pela MicroCal, para trabalhar, exclusivamente, com ensaios de CTI. Este programa permite fazer um ajuste de mínimos quadrados não-lineares aos dados já processados, para modelos com múltiplos locais de ligação, que por sua vez permite que sejam calculados os valores das constantes de dissociação, estequiometria, variação de entalpia e entropia dos compostos para os dois locais de ligação na *wt*-TTR.

As constantes de associação para cada local de ligação são dadas pelas equações 2.6 e 2.7:<sup>102</sup>

$$K_1 = \left(\frac{f_1}{(1 - f_1)[X]}\right)$$
(2.6)

$$K_2 = \left(\frac{f_2}{(1-f_2)[X]}\right)$$
(2.7)

onde [X] é a concentração de ligante na forma livre e  $f_1$  e  $f_2$  são as frações dos locais ocupados pelo ligante. Portanto, a concentração total de ligante ( $X_7$ ) é dada pela equação 2.8:<sup>102</sup>

$$X_T = [X] + M_T (n_1 f_1 + n_2 f_2)$$
(2.8)

onde  $M_T$ é a concentração total de proteína e *n* é o número de locais de ligação.

A quantidade de calor, Q, após cada injeção, *i*, para o volume da célula da amostra,  $V_0$ , é dada pela equação 2.9:<sup>102</sup>

$$Q = M_T V_0 (n_1 f_1 \Delta H_1 + n_2 f_2 \Delta H_2)$$
(2.9)

Segundo a equação 2.9, o valor de Q pode ser determinado para qualquer valor de n,  $K \in \Delta H$  no fim de cada injeção. No entanto, o valor de Q aplica-se apenas à solução contida no volume  $V_0$ . Para o processo de ajuste interessa-nos a comparação entre a

diferença de calor, desde a conclusão da injeção *i-1* até a conclusão da injeção *i.* Assim sendo, é necessário fazer uma correção após o fim de cada injeção, tendo em conta o volume de injeção, surgindo a equação 2.10:<sup>102</sup>

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left(\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2}\right) - Q(i-1)$$
(2.10)

O processo de ajuste de dados experimentais envolve as suposições iniciais de *n*, *K* e  $\Delta H$ , o cálculo de  $\Delta Q(i)$  para cada injeção e comparação com o calor obtido para a injeção experimental correspondente, melhoria dos valores iniciais de *n*, *K* e  $\Delta H$  pelo método de Marquardt<sup>103</sup> e interação do procedimento descrito até que nenhuma melhoria significativa no ajuste ocorra com a iteração contínua.<sup>102</sup>

# capítulo ${\bf 3}$

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 3.1 Atribuição dos espetros de RMN e análise do estado de pureza dos compostos

A fim de atribuir os vários espetros de RMN e de determinar o estado de pureza dos respetivos compostos, são apresentados os espetros de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>19</sup>F-RMN para cada um dos compostos em análise. As soluções para a realização destas experiências foram preparadas em DMSO- $d_6$ , com exceção do AG10 que foi preparado em solução tampão de 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, com 5% (v/v) de água deuterada (D<sub>2</sub>O) e pH 7.2.

Os espetros <sup>1</sup>H-RMN e <sup>19</sup>F-RMN de AG10 estão representados nas Figuras 3.1.1 e 3.1.2, respetivamente. Uma vez que este composto já está caracterizado na literatura<sup>80</sup>, a atribuição dos sinais aos respetivos hidrogénios da molécula foi feita com base nessa caracterização. Para facilitar a atribuição dos sinais do espetro, os átomos da estrutura química do AG10 foram numerados e os sinais do espetro <sup>1</sup>H-RMN correspondentes ao AG10 foram identificados com os números dos átomos a que correspondem.



**Figura 3.1.1 -** Espetro de <sup>1</sup>H-RMN do composto AG10 e respetiva atribuição. A estrutura química do AG10 está representada do lado esquerdo, com a numeração dos átomos e respetiva atribuição dos sinais no espectro <sup>1</sup>H-RMN. O espetro de <sup>1</sup>H-RMN do AG10 (17.93 mM) foi adquirido aos 298 K (Kelvin), em D<sub>2</sub>O e a 400.13 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III.

O AG10 apresenta apenas um átomo de flúor na posição orto do anel aromático. Assim sendo, o seu espetro de <sup>19</sup>F-RMN apresenta apenas um sinal, com desvio químico igual a -131.94 ppm (Figura 3.1.2).



**Figura 3.1.2 -** Espetro de <sup>19</sup>F-RMN do composto AG10. A numeração do sinal foi atribuída de acordo com a numeração dos átomos do AG10, representada na Figura 3.1.1. O espetro de <sup>19</sup>F-RMN do AG10 (17.93 mM) foi adquirido aos 298 K, em D<sub>2</sub>O a 376.47 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III e com desacoplamento em protão.

Na Tabela 3.1.1 estão representados os desvios químicos dos sinais dos espetros de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>19</sup>F-RMN e a respetiva identificação com o número do átomo do AG10 a que correspondem, de forma a simplificar a compreensão e atribuição dos espetros. Para os protões não equivalentes, é apresentada a constante de acoplamento, em Hertz (Hz). Os acoplamentos spin-spin entre protões vizinhos, que dão origem às constantes de acoplamento, permitem confirmar atribuição dos sinais aos átomos do AG10.

Nº átomo	δ ( <sup>1</sup> H) ppm	δ ( <sup>19</sup> F) ppm	Constante de acoplamento (Hz)
2	7.39		J <sub>HH</sub> = 2.01, 4.60, 8.59
3	7.12		J <sub>HH</sub> = 8.64, 11.31
6	7.47		J <sub>HH</sub> = 8.41
10		-131.94	
12	4.02		$J_{HH} = 6.40,  6.40$
13	1.90		
14	2.50		J <sub>HH</sub> = 7.47, 7.47
20, 21	2.04		

**Tabela 3.1.1** – Valores dos desvios químicos (ppm) e constantes de acoplamento para AG10, obtidos nas experiências de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>19</sup>F-RMN.

No caso do diflunisal, obtido comercialmente, a atribuição dos espetros RMN e a verificação do seu estado de pureza foi possível realizando um conjunto diversificado de experiências, para além da <sup>1</sup>H-RMN e <sup>19</sup>F-RMN, tais como <sup>13</sup>C-RMN, DEPT 90, DEPT 135, COSY, HSQC e HMBC (Capítulo 6, Anexo III).

Conjugando toda a informação recolhida das experiências de RMN realizadas, foi possível fazer a atribuição fidedigna dos sinais do espetro <sup>1</sup>H-RMN aos respetivos átomos de hidrogénio do diflunisal. Esta atribuição é mostrada na Figura 3.1.3 e sumariada, juntamente com as constantes de acoplamento, na Tabela 3.1.2.



**Figura 3.1.3 -** Espetro de <sup>1</sup>H-RMN do composto diflunisal e atribuição dos sinais. Os sinais estão identificados com os números dos respetivos hidrogénios, conforme indicado na estrutura do diflunisal, do lado esquerdo. O espetro de <sup>1</sup>H-RMN do diflunisal (72.88 mM) foi adquirido aos 298 K, em DMSO-*d*<sub>6</sub> e a 400.13 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III.

O diflunisal possui dois átomos de flúor, em posições não equivalentes de um dos anéis aromáticos, apresentando, por isso, diferentes desvios químicos. Assim sendo, o espetro de <sup>19</sup>F-RMN será constituído por dois sinais, cada um correspondente a um flúor (Figura 3.1.4), um a -110.97 ppm e outro a -114.32 ppm. Contudo, não é possível distinguir o átomo de flúor a que corresponde cada sinal, por não haver informação suficiente. Desta forma, na Figura 3.1.4 não foram atribuídos os números 15 e 16 aos dois sinais apresentados.



**Figura 3.1.4 -** Espetro de <sup>19</sup>F-RMN do composto diflunisal. O espetro de <sup>19</sup>F-RMN do diflunisal (72.88 mM) foi adquirido aos 298 K, em DMSO-*d*<sub>6</sub>, a 376.47 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III e com desacoplamento em protão.

Na Tabela 3.1.2 são apresentados os desvios químicos dos sinais dos espetros de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN e <sup>19</sup>F-RMN e a respetiva atribuição ao átomo correspondente em diflunisal. Também são apresentadas as constantes de acoplamento dos protões não equivalentes e dos átomos de flúor, confirmando a atribuição dos sinais e o impacto dos átomos de flúor na multiplicidade dos sinais do espetro de <sup>1</sup>H-RMN.

**Tabela 3.1.2** - Valores dos desvios químicos (ppm) e constantes de acoplamento de diflunisal para <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN e <sup>19</sup>F-RMN, baseados nas experiências realizadas e indicadas no Capítulo 2, secção 2.3.1.

Nº átomo	δ (1H) ppm	δ ( <sup>13</sup> C) ppm	δ ( <sup>19</sup> F) ppm	Constante de acoplamento (Hz)
1		114.37		
2		131.25		
3	6.94	126.26		J <sub>HH</sub> = 8.62
4	7.51	136.70		J <sub>HH</sub> = 8.66
5		118.65		
6	7.77	161.43		
7		172.57		
9		124.50		
10		161.22		
11	7.05	105.30		
12		163.74		
13	6.99	113.05		$J_{HH} = 2.47,  8.60,  8.48$
14	7.36	132.30		$J_{HH} = 8.80, 15.54$
15, 16			-110.97, -114.32	J <sub>FF</sub> = 7.31

Tal como para diflunisal, para o ácido flufenâmico também foram realizadas as mesmas experiências, a fim de atribuir os espetros de RMN do composto (Capítulo 6, Anexo IV), permitindo atribuir os sinais do espetro <sup>1</sup>H-RMN aos respetivos hidrogénios do ácido flufenâmico (Figura 3.1.5).



**Figura 3.1.5 -** Espetro de <sup>1</sup>H-RMN do composto ácido flufenâmico e respetiva atribuição. Os sinais estão identificados com os números dos respetivos hidrogénios, que estão numerados na estrutura do ácido flufenâmico, do lado esquerdo. O espetro de <sup>1</sup>H-RMN do ácido flufenâmico (66.88 mM) foi adquirido aos 298 K, em DMSO-*d*<sub>6</sub> e a 400.13 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III.

O ácido flufenâmico integra um grupo -CF<sub>3</sub> num dos anéis aromáticos, sendo, portanto, os três átomos de flúor quimicamente equivalentes. Por este motivo, no espetro <sup>19</sup>F-RMN observa-se apenas um sinal, correspondente aos três átomos de flúor (Figura 3.1.6), a -61.55 ppm.



**Figura 3.1.6** - Espetro de <sup>19</sup>F-RMN do composto ácido flufenâmico. A numeração do sinal foi atribuída de acordo com a numeração dos átomos do ácido flufenâmico, representada na Figura 3.1.5. O espetro de <sup>19</sup>F-RMN do ácido flufenâmico (66.88 mM) foi adquirido aos 298 K, em DMSO*d*<sub>6</sub>, a 376.47 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III e com desacoplamento em protão.

Na Tabela 3.1.3 estão compilados os desvios químicos dos sinais correspondentes aos átomos do ácido flufenâmico dos espetros de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN e <sup>19</sup>F-RMN e as constantes de acoplamento entre protões não equivalentes.

**Tabela 3.1.3** - Valores dos desvios químicos (ppm) e constantes de acoplamento do ácido flufenâmico para <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN e <sup>19</sup>F-RMN, baseados nas experiências realizadas e indicadas no Capítulo 2, secção 2.3.1.

Nº átomo	δ ( <sup>1</sup> H) ppm	δ ( <sup>13</sup> C) ppm	δ ( <sup>19</sup> F) ppm	Constante de acoplamento (Hz)
1		115.12		
2		146.43		
3	7.17	115.84		J <sub>HH</sub> = 8.11
4	7.35	135.41		
5	6.82	120.19		J <sub>HH</sub> = 7.54, 7.54
6	7.86	133.04		J <sub>нн</sub> = 1.53, 7.97
8		142.75		
9	7.37	124.66		
10		131.29		
11	7.33	117.03		
12	7.44	131.67		J <sub>HH</sub> = 7.87, 7.87
13	7.23	119.81		J <sub>HH</sub> = 7.57
14		170.97		
17		126.28		
18, 19, 20			-61.55	

#### 3.2 Interação de ligantes com a *wt*-TTR, utilizando <sup>19</sup>F-RMN

Os ligantes AG10, diflunisal e ácido flufenâmico são três compostos com afinidade para os dois locais de ligação da tiroxina na proteína TTR. O estudo da forma como eles interagem com os locais de ligação da proteína, torna-se importante no sentido de perceber as forças envolvidas na interação e as conformações preferenciais dos compostos no local de ligação.

As experiências de titulação seguidas por <sup>19</sup>F-RMN foram executadas para os três compostos. São feitas adições sucessivas de composto a uma amostra com proteína transtirretina na forma nativa, de modo a gerar soluções com diferentes relações estequiométricas. Sempre que se adiciona composto à proteína é adquirido um espetro <sup>19</sup>F-RMN.

As experiências de titulação visam averiguar se existem interações significativas envolvendo diretamente o flúor, entre os compostos e os locais de ligação da proteína, através das diferenças nos desvios químicos e na variação da largura a meia altura dos sinais de flúor dos compostos na presença de proteína.

Da experiência de titulação com o AG10, resultaram seis espetros de <sup>19</sup>F-RMN, cada um para uma razão estequiométrica (Figura 3.2.1). Na Figura 3.2.1 também está representado o espetro de AG10 na forma livre, para comparação.



**Figura 3.2.1 –** Sobreposição dos espetros de <sup>19</sup>F-RMN do composto AG10, da experiência de titulação com a proteína *wt*-TTR, para as várias estequiometrias utilizadas. O espetro a vermelho corresponde ao AG10 na forma livre. Todos os espetros de <sup>19</sup>F-RMN da experiência de titulação foram adquiridos a 298 K, com 50 µM *wt*-TTR em solução tampão de 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, 5% (v/v) D<sub>2</sub>O, pH 7.2, a 376.47 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III.

Observando a sobreposição dos espetros <sup>19</sup>F-RMN da experiência de titulação com a proteína *wt*-TTR, representada na Figura 3.2.1, o AG10 parece interagir em regime de troca química intermédia a rápida, isto é, a velocidade de troca é maior que a diferença de desvios químicos entre o estado ligado e o estado livre do AG10. Comparando os espetros da titulação com o espetro de <sup>19</sup>F-RMN do AG10 na forma livre, verifica-se que não há diferenças muito significativas na variação de desvios químicos dos sinais observados (Tabela 3.2.1). Contudo, observa-se um alargamento dos sinais a meia altura, o que significa que o AG10 interage, de facto, com a proteína. Uma vez que não existe uma diferença muito significativa de desvios químicos entre o sinal do AG10 na forma livre e na forma ligada, podemos concluir que o flúor não participa diretamente em interações específicas e fortes entre AG10 e proteína. Por não existir diferença muito significativa de AG10 nas formas livre e ligada e por os sinais de AG10 na forma ligada serem muito largos, pode estar a acontecer a sobreposição dos sinais de <sup>19</sup>F-RMN de AG10 nas formas livre e ligada nos espetros obtidos da experiência de titulação seguida por <sup>19</sup>F-RMN.

Tabela 3.2.1 - Valores de desvios químicos (δ), em ppm, dos vários espetros adquiridos na experiência de titulação do AG10 com a wt-TTR. Estes valores foram obtidos a partir da análise feita no programa MestReNova.

Espectro RMN	δ ( <sup>19</sup> F) ppm
AG10 livre	-131.94
1:2	-131.92
1:3	-131.91
1:4	-131.91
1:5	-131.92
1:6	-131.93

A cooperatividade na ligação de um ligante a uma proteína com múltiplos locais de ligação é um fenómeno central em sistemas biológicos e é observado quando a ligação de um ligante a um local de ligação altera a afinidade de ligação de uma segunda molécula do mesmo ligante a um outro local de ligação equivalente na proteína.<sup>104</sup> A cooperatividade pode ser positiva, quando a afinidade de ligação para o segundo local de ligação aumenta após a ligação do ligante no primeiro local de ligação, ou pode ser negativa, se a afinidade de ligação diminuir após a ligação do ligante ao primeiro local de ligação.

O AG10 interage com os dois locais de ligação da tiroxina na TTR com cooperatividade negativa, ou seja, interage mais fortemente com o primeiro local de ligação ( $K_{d1}$  = 4.8 nM) do que com o segundo ( $K_{d2}$  = 314 nM).<sup>80</sup> O AG10 pode interagir de formas diferentes em cada local de ligação, daí surgir esta cooperatividade negativa, uma vez que na estrutura cristalográfica da proteína os dois locais de ligação são equivalentes. Além disto, este composto pode interagir a partir de dois modos de ligação simetricamente equivalentes.<sup>80</sup>

Nesta experiência de RMN de flúor não foi possível nem diferenciar as interações em cada um dos dois locais de ligação nem observar uma interação significativa que envolvesse diretamente o flúor, dado que só aparece um sinal em cada espetro e não há alteração muito significativa do desvio químico do sinal. Podemos intuir que as conformações com que o AG10 interage com a wt-TTR não fazem interações específicas que envolvam diretamente o átomo de flúor e que a baixa polaridade do flúor poderá acomodar este átomo em regiões hidrofóbicas do local de ligação da wt-TTR.

A distância da interação entre átomos de resíduos da proteína e do composto está relacionado com alguns parâmetros relativos à interação química. Por exemplo, quanto menor for a distância de interação, maior será a energia desta e, consecutivamente, mais estável será a interação. Assim sendo, conhecer as ligações de hidrogénio e os seus

comprimentos entre os resíduos da proteína e os átomos do composto é uma mais valia para entender a estabilidade das conformações mais favoráveis do composto nos locais de ligação da proteína.

A partir da estrutura tridimensional de um complexo proteína-ligante e usando o programa Chimera é possível identificar as ligações de hidrogénio e os contactos de Van der Waals entre átomos de proteína e ligante, bem como determinar o valor das distâncias inter-atómicas. Este tipo de estudo foi realizado usando a estrutura cristalográfica do complexo entre AG10 e a variante Val122IIe da TTR (código PDB: 4HIQ). Verificou-se que as duas conformações simétricas que o ligante pode assumir no local de ligação formam seis ligações de hidrogénio, com distâncias inferiores a 3 Å, com os aminoácidos serina-117 (SER-117) e lisina-15 (LYS-15), pertencentes a duas das subunidades da proteína (Figura 3.2.2). O uso do Chimera também permitiu mostrar que nenhuma das conformações interage com os locais de ligação da proteína envolvendo o flúor diretamente em ligações específicas, estando de acordo com os resultados obtidos por <sup>19</sup>F-RMN e *wt*-TTR.



**Figura 3.2.2** - Representação das ligações de hidrogénio entre o AG10 e os resíduos de um dos locais de ligação da variante Val122IIe da TTR. As ligações de hidrogénio estão representadas a verde, bem como o valor das distâncias destas ligações (em Angstrom). O nome de cada aminoácido está igualmente indicado na imagem. A imagem foi produzida com o programa Chimera, usando a estrutura cristalográfica do complexo Val122IIe-TTR-AG10 (código PDB: 4HIQ).

As conformações e as distâncias das respetivas interações determinadas no Chimera, mostram que ambas as conformações são estáveis nos locais de ligação, sendo um dos fatores que explica a alta afinidade deste composto para a TTR. A titulação de *wt*-TTR com diflunisal, seguida por <sup>19</sup>F-RMN, está representada nos espetros da Figura 3.2.3. O nome de cada espetro corresponde à estequiometria *wt*-TTR:ligante de cada titulação, desde a 1:1 a 1:5, com exceção do primeiro espetro, que corresponde ao espetro <sup>19</sup>F-RMN do diflunisal na forma livre. Os valores dos desvios químicos de cada sinal estão indicados na Tabela 3.2.2.



**Figura 3.2.3** – Sobreposição dos espetros de <sup>19</sup>F-RMN do composto diflunisal da experiência de titulação com a proteína *wt*-TTR, para as várias estequiometrias utilizadas. O espetro a vermelho corresponde ao diflunisal na forma livre. O "Sinal 1" representa os vários sinais do lado direito dos espetros e o "Sinal 2" representa os vários sinais do lado esquerdo dos espetros obtidos. Todos os espetros de <sup>19</sup>F-RMN da experiência de titulação foram adquiridos a 298 K, com 50 µM *wt*-TTR em solução tampão de 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, 5% (v/v) de D<sub>2</sub>O, pH 7.2, a 376.47 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III.

A partir do espetro de estequiometria 1:3 começa a observar-se dois sinais no espetro de <sup>19</sup>F-RMN do diflunisal em solução com a *wt*-TTR, que vão aumentando de intensidade até à estequiometria 1:5. Aparentemente, a largura da linha a meia altura vai diminuindo com o aumento de excesso de ligante (Figura 3.2.3). De forma a distinguir os dois sinais dos espetros, designou-se os sinais do lado direito como "sinal 1" e os do lado esquerdo como "sinal 2". A aparência dos sinais permite afirmar que as interações estão em regime de troca intermédia.

Por um lado, não se observam alterações no desvio químico significativas comparativamente com os sinais do espetro do diflunisal na forma livre, permanecendo nos -114.80 ppm para o sinal 1 e nos -112.30 ppm para o sinal 2 (Tabela 3.2.2). Por outro lado, observa-se um alargamento dos sinais a meia altura. Posto isto, podemos deduzir que o diflunisal, de facto, interage com os locais de ligação da *wt*-TTR, uma vez que há aumento da largura dos sinais a meia altura, contudo os átomos de flúor do composto não participam em nenhuma interação específica e forte, por não haver alteração significativa dos desvios químicos entre os sinais do diflunisal na forma livre e os sinais do mesmo na forma ligada. Podemos até mesmo supor que estamos a observar os sinais do diflunisal na forma ligada e do diflunisal na forma livre sobrepostos. Apesar de os átomos de flúor não participarem diretamente em interações específicas, a baixa polaridade do átomo de flúor pode acomodar este em regiões hidrofóbicas do local de ligação da *wt*-TTR.

Tabela 3.2.2 - Valores dos desvios químicos (ppm) dos sinais observados nos vários espeti	ros,
adquiridos na experiência de titulação de wt-TTR com diflunisal. Estes valores foram obtido	s a
partir da análise feita no programa MestReNova.	

Espectro RMN	Sinal	δ ( <sup>19</sup> F) ppm
Diflunisal livre	1	-114.81
	2	-112.29
1:3	1	-114.80
	2	-112.24
1:4	1	-114.76
	2	-112.24
1:5	1	-114.76
	2	-112.22

Através das experiências de CTI realizadas (Capítulo 3, Secção 3.3), concluímos que o diflunisal também interage com os dois locais de ligação da *wt*-TTR com cooperatividade negativa, com a constante de dissociação no primeiro local de ligação ( $K_{d1} = 35.4 \text{ nM}$ ) mais pequena do que para o segundo local ( $K_{d2} = 1210 \text{ nM}$ ). A diferença de afinidades pode ser reflexo de interações diferentes dos ligantes nos locais de ligação. No entanto, nas experiências de titulação seguidas por RMN de flúor não foi possível distinguir diferentes interações em cada local de ligação da *wt*-TTR.

O diflunisal tem quatro modos de ligação no local de ligação da *wt*-TTR: a *forward* e o seu modo simétrico (*forward*') e a *reverse* e o seu modo simétrico (*reverse*).<sup>75</sup> O eixo de simetria  $C_2$  que existe nos locais de ligação promove a existência de modos de ligação

simétricos e, por isso, o modo *forward* interage com a proteína da mesma forma que o modo *forward*' e o modo *reverse* da mesma forma que o modo *reverse*'.



**Figura 3.2.4** - Representação das interações mais importantes entre o diflunisal e os resíduos de um dos locais de ligação da *wt*-TTR. As ligações de hidrogénio estão representadas a verde e uma interação potencialmente interessante envolvendo o átomo de flúor, a laranja, bem como o valor das distâncias inter-atómicas para estas interações (em Angstrom). A identificação de cada aminoácido está igualmente indicada na imagem. O modo *forward* está representada na imagem (A) e o modo *reverse* na imagem (B). A imagem foi produzida com o programa Chimera, usando a estrutura cristalográfica do complexo *wt*-TTR-diflunisal (código PDB: 3D2T).

Comparando as interações observadas para cada um dos modos de ligação (Figura 3.2.4), verifica-se que o modo *reverse* tem uma potencial interação entre um átomo de flúor e o grupo hidroxilo da cadeia lateral do aminoácido treonina-119 (THR-119), com uma distância inter-atómica inferior a 3 Å. No modo *forward*, as interações com átomos de flúor não são significativas, uma vez que os comprimentos destas interações são muito maiores que 3 Å ou são interações com aminoácidos que não fazem parte do grupo dos "polares não carregados". Os aminoácidos pertencentes a este grupo são compostos por grupos hidroxilo ou grupos amida nas cadeias laterais. Por serem grupos polares, os aminoácidos deste grupo interagem facilmente por ligações de hidrogénio com os ligantes.

Nos espetros <sup>19</sup>F-RMN resultantes da titulação, não se observa nenhum sinal que indique uma interação específica e forte com os átomos de flúor do diflunisal. Posto isto, e dada a informação obtida através do programa Chimera, podemos intuir que o modo de ligação do diflunisal mais provável em solução é o modo *forward*, uma vez que este modo não revela interações significativas fortes envolvendo o átomo de flúor. Caso o modo predominante fosse o *reverse*, o mais provável era observar um sinal a um desvio químico significativamente diferente do desvio químico do sinal do diflunisal na forma livre, devido

à interação entre o átomo de flúor e o resíduo treonina-119. Apesar de na estrutura cristalográfica percentagem de ocupação ser igual para todos os modos de ligação, o modo *forward* parece mais favorável, sendo os átomos de flúor acomodados numa região hidrofóbica da parte mais interna do local de ligação e o grupo carboxílico fazendo ligações de hidrogénio com os dois resíduos de lisina-15 na parte mais externa do local de ligação, conforme se observa em muitas outras estruturas de ligantes com grupos carboxilo em complexo com a TTR, e assim, promovendo a estabilidade do complexo. No entanto, é certo que o diflunisal interage com a TTR, por se observar um aumento da largura da linha a meia altura dos sinais dos átomos de flúor.

Da experiência de titulação de *wt*-TTR com ácido flufenâmico, seguida por <sup>19</sup>F-RMN resultaram os espetros representados da Figura 3.2.5. O primeiro espetro, "19F RMN ácido flufenâmico livre", é o espetro de flúor do composto sem proteína na amostra. De forma a distinguir os dois sinais dos espetros resultantes da experiência de titulação, designou-se o sinal do lado direito como "sinal 1" e o do lado esquerdo como "sinal 2".



**Figura 3.2.5** - Representação dos espetros de <sup>19</sup>F-RMN do composto ácido flufenâmico, resultantes da experiência de titulação com a proteína *wt*-TTR. Cada espetro está identificado com diferentes cores, bem como a razão estequiométrica proteína:ligante da mistura a que pertence. "Sinal 1" e "Sinal 2" representam os desvios químicos de duas conformações/modos de ligação do ligante. Todos os espetros de <sup>19</sup>F-RMN da experiência de titulação foram adquiridos a 298 K, com 50 μM *wt*-TTR em solução tampão de 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, 5% (v/v) de D<sub>2</sub>O, pH 7.2, a 376.47 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III.
Analisando os espetros obtidos através desta experiência para o ácido flufenâmico, o primeiro detalhe realçado é a presença de dois sinais em cada espetro, uma vez que o espetro do ácido flufenâmico na forma livre apresenta apenas um sinal. Para além disto, o sinal 2 encontra-se a um desvio químico significativamente diferente do desvio químico do sinal do composto na forma livre. Ou seja, o sinal do ácido flufenâmico na forma livre encontra-se a um desvio químico igual a -62.33 ppm e os sinais 1 encontram-se num desvio químico idêntico a este, contudo os sinais 2 situam-se num desvio químico perto dos -60.45 ppm (Tabela 3.2.3). Portanto, há um deslocamento do sinal 2 em cerca de 1.90 ppm (Tabela 3.2.3) para campo mais baixo. Outro aspeto a realçar é o aparecimento do sinal 2 em primeiro lugar, logo no espetro da estequiometria 1:2. Por fim, é visível um aumento da largura de linha a meia altura dos sinais na presença da proteína, o que significa que o ácido flufenâmico está a interagir com a *wt*-TTR.

**Tabela 3.2.3** - Valores dos desvios químicos (ppm) dos sinais visíveis representados nos vários espetros, adquiridos na experiência de titulação de *wt*-TTR com ácido flufenâmico, e da diferença de desvios químicos entre o sinal 2 e o sinal 1 para cada razão estequiométrica. Estes valores foram obtidos a partir da análise feita no programa MestReNova.

Espectro RMN	Sinal	δ ( <sup>19</sup> F) ppm	δ (ligado) – δ
			(livre) (ppm)
ácido	1	-62.33	-
Flufenâmico livre			
1:2	2	-60.43	1.90
1:3	1	-62.31	-
	2	-60.45	1.88
1:4	1	-62.30	-
	2	-60.44	1.89
1:5	1	-62.30	-
	2	-60.45	1.88

Por se observar dois sinais com desvios químicos diferentes nos espetros, é possível que existam dois modos de ligação e regimes de troca entre o composto e a *wt*-TTR. No modo de ligação correspondente ao sinal 1 o ácido flufenâmico está em regime de troca rápida e no modo de ligação correspondente ao sinal 2, em regime de troca lenta.

Tal como acontece com o AG10 e o diflunisal, o sinal 1 do ácido flufenâmico poderá estar sobreposto ao sinal do ligante na forma livre, por não se observar diferença significativa nos desvios químicos entre estes sinais. Por outro lado, o mesmo não acontece com o sinal 2, dado que existe um deslocamento do sinal para campo mais baixo de, aproximadamente, 1.90 ppm. Neste caso, o deslocamento do sinal para campo

mais baixo pode ser justificado pela existência de uma interação específica e forte, por exemplo, uma ligação de hidrogénio entre um dos resíduos do local de ligação da *wt*-TTR e o átomo de flúor do ácido flufenâmico.

Os espectros da Figura 3.2.5 mostram claramente que o modo de ligação correspondente ao sinal 2, que está em troca lenta, é o primeiro a ser ocupado, e só depois é que o modo de ligação correspondente ao sinal 1 é então ocupado, estando este em troca rápida. Consequentemente, pressupomos que o sinal 2 reflete uma interação significativa que corresponde a uma das conformações que o ligante adquire quando interage com a proteína. O sinal 1, em regime de troca rápida, reflete uma interação mais fraca que corresponde a outra conformação adquirida pelo composto, uma vez que se observa um desvio químico muito próximo da forma livre e significativamente diferente do modo de ligação anterior.

A *wt*-TTR tem dois locais de ligação ativos e, nas experiências de CTI realizadas (Capítulo 3, Secção 3.3), o ácido flufenâmico mostrou ligar-se a ambos os locais com cooperatividade negativa, com K<sub>d1</sub> igual a 74.1 nM e K<sub>d2</sub> igual a 425 nM. Posto isto, existe a possibilidade de existir diferentes modos de ligação do ligante em cada local de ligação e, consequentemente, diferentes interações, sendo elas mais fortes para o primeiro local de ligação do que para o segundo, devido às diferenças de afinidades.

O facto de o sinal 2 ser o primeiro a aparecer na experiência de titulação seguida por <sup>19</sup>F-RMN, ser mais largo que o sinal 1, se encontrar em regime de troca lenta e estar deslocado para campo baixo em cerca de 1.90 ppm, permite-nos afirmar que o sinal 2 representa uma interação mais forte e específica com participação direta do átomo de flúor. Estas características, juntamente com o facto de o ligante ter maior afinidade para o primeiro local de ligação e, por isso, interagir fortemente com ele, leva-nos a ponderar que este sinal possa corresponder à conformação que o ligante adquire quando interage com o primeiro local de ligação da proteína. Dado que a afinidade para o segundo local de ligação é menor e o sinal 1 reflete uma interação mais fraca, o sinal 1 poderá corresponder à conformação do ligante adquirida no segundo local de ligação, uma vez que no mesmo já não se observa diferença significativa nos desvios químicos e está em regime de troca rápida.

A partir da análise da estrutura tridimensional do complexo entre TTR e ácido flufenâmico, verifica-se que o ligante tem quatro modos de ligação a cada local de ligação da TTR: a conformação *trans* e a respetiva forma simetricamente equivalente e a conformação *cis* e a respetiva forma simetricamente equivalente (Figura 3.2.6).<sup>78</sup>



**Figura 3.2.6** - Representação das interações mais importantes entre o ácido flufenâmico e os resíduos de aminoácidos de um dos locais de ligação da *wt*-TTR. As ligações de hidrogénio estão representadas a verde e as interações potencialmente interessante envolvendo o átomo de flúor, a laranja, bem como o valor das distâncias inter-atómicas para estas interações (em Angstrom). A identificação de cada aminoácido está igualmente indicada na imagem. A conformação *cis* está representada na imagem (A) e a conformação *trans* na imagem (B). A imagem foi produzida com o programa Chimera a partir da estrutura cristalográfica do complexo TTR-flufenâmico (código PDB: 1BM7).

A informação obtida a partir da análise com o programa Chimera indica que, em ambas as conformações, um dos átomos de flúor do grupo -CF<sub>3</sub> interage com o grupo hidroxilo do resíduo serina-117 do local de ligação da *wt*-TTR. A conformação *cis* (Figura 3.2.6.A) interage com a serina-117 de um dos monómeros da TTR, que compõe o local de ligação, tendo esta interação uma distância inter-atómica de 2.84 Å. A conformação *trans* (Figura 3.2.6.B) interage com o mesmo resíduo do outro monómero que compõe o local de ligação, sendo que a interação tem uma distância inter-atómica de 2.90 Å. Ambas as conformações do ligante formam entre o seu grupo carboxílico (-COOH) e o grupo - NH<sub>2</sub> da cadeia lateral do resíduo lisina-15 uma interação eletrostática e potenciais ligações de hidrogénio. Adicionalmente, os átomos de flúor em ambas as conformações do ácido flufenâmico também podem fazer ligações de hidrogénio com o grupo hidroxilo do resíduo serina-117. No entanto, estas conformações não são distinguíveis por <sup>19</sup>F-RMN. Conclui-se que os dois modos de ligação do ácido flufenâmico observados nos espectros de <sup>19</sup>F-RMN em solução aquosa não correspondem às conformações *cis* e *trans* observadas na estrutura cristalográfica (Fig. 3.2.6).

Como já dito anteriormente, o sinal 2 pode é reflexo de uma interação forte e específica que envolve diretamente o(s) átomo(s) de flúor do grupo -CF<sub>3</sub>. Portanto, o sinal

2 pode corresponder à interação no local de ligação entre um flúor e o grupo hidroxilo da serina-117, sendo esta uma ligação de hidrogénio fraca.

Um exemplo semelhante ao da interação entre o ácido flufenâmico e a *wt*-TTR, é o da interação entre o 3-fluoro-4-metilbenzamidina e a tripsina bovina (Figura 3.2.7.A).<sup>105</sup> Após a ligação do composto ao recetor, observa-se no espetro de <sup>19</sup>F-RMN um deslocamento do sinal do 3-fluoro-4-metilbenzamidina para campo mais baixo de, aproximadamente, 2.8 ppm (Figura 3.2.7.B) e a interação está em regime de troca lenta.<sup>84</sup> A equipa sugere que esta grande diferença de desvio químico se deve à possível formação de ligação de hidrogénio entre o flúor e o grupo -OH do resíduo serina-195.



**Figura 3.2.7 -** Interação entre 3-fluoro-4-metilbenzamidina e a tripsina bovina. Na imagem (A) está representada a estrutura das duas conformações do composto no local de ligação, bem como a interação entre o átomo de flúor e o grupo hidroxilo da serina-195 e a sua distância interatómica.<sup>15</sup> Na imagem (B) está representado o espetro de <sup>19</sup>F-RMN do 3-fluoro-4-metilbenzamidina em solução aquosa, na presença da proteína.<sup>84</sup>

## 3.3 Interação de ligantes com a *wt*-TTR, utilizando CTI

As experiências de CTI permitiram determinar alguns parâmetros termodinâmicos das interações entre o diflunisal e o ácido flufenâmico com a *wt*-TTR, tais como as constantes de dissociação ou associação, variação de entalpia, variação de entropia e, consequentemente, a energia livre de Gibbs. Estes parâmetros são essenciais para compreender os determinantes estruturais da afinidade de ligação, bem como a energética da ligação, destes compostos aos locais de ligação da TTR.

Uma vez que resultados de experiências de CTI destes ligantes com TTR já estão reportadas na literatura<sup>75,78</sup>, estas experiências foram importantes para confirmar os valores da literatura e para avaliar a influência de condições experimentais diferentes nos valores obtidos.

A afinidade de um composto a uma proteína é geralmente elevada quando a entalpia e a entropia contribuem favoravelmente. A contribuição entálpica favorável está relacionada com a formação de interações não covalentes, como ligações de hidrogénio, interações de van der Waals e interações eletrostáticas, no local de ligação entre o ligante e a proteína.<sup>106</sup> Quando favorável, o valor da variação de entalpia (ΔH) é negativo. A entropia é a medida de quão uniformemente a energia térmica será distribuída por todo o sistema termodinâmico e está associada a três termos entrópicos: a entropia que o complexo proteína-ligante forma com o solvente, a entropia conformacional relacionada com as alterações na liberdade conformacional da proteína e do ligante após a ligação e a entropia relacionada com a perda dos graus de liberdade de translação e rotação da proteína e do ligante após a formação do complexo.<sup>106</sup>

Uma vez que estamos perante uma proteína com dois locais de ligação, que mostram ter afinidades de ligação diferentes, será interessante discriminar os dois locais de ligação.

Os ligantes testados têm duas constantes de associação (ou de dissociação), porque se ligam aos dois locais de ligação da *wt*-TTR. O diflunisal (Figura 3.3.1) liga-se aos dois locais de ligação com cooperatividade negativa, isto é, o valor da constante de dissociação para o primeiro local de ligação é mais pequena (K<sub>d1</sub> = 35.4 nM) que a constante de dissociação para o segundo local de ligação (K<sub>d2</sub> = 1210 nM), ou seja, o diflunisal liga-se com maior afinidade ao primeiro local de ligação do que ao segundo local de ligação. Comparando com os valores da literatura (K<sub>d1</sub> = 75 nM e K<sub>d2</sub> = 1100 nM)<sup>75</sup>, o K<sub>d1</sub> determinado nesta experiência é mais baixo (maior afinidade) que o da literatura, no entanto, ambas as constantes de dissociação são da mesma ordem de gradeza que as constantes reportadas na literatura.



**Figura 3.3.1 -** Titulação calorimétrica da *wt*-TTR (5 μM) com diflunisal (100 μM), obtida por CTI. As experiências de CTI foram realizadas em 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio, pH 7.2, 2% de DMSO e a 25 °C. O gráfico superior representa as trocas de calor registadas associadas à injeção de diflunisal na célula contendo a solução de proteína *wt*-TTR e o gráfico inferior apresenta a isotérmica de ligação correspondente aos dados do gráfico superior e a melhor curva de ajuste, a vermelho. O calor de diluição da solução de diflunisal foi subtraído aos dados brutos. A curva de ajuste foi obtida através de regressão não linear aos dados experimentais, de acordo com um modelo de dois locais de ligação, usando o programa de análise de dados Origin 7.0.

No caso do diflunisal, para os dois locais de ligação temos a variação de entalpia negativa e variação de entropia positiva (Tabela 3.3.1), o que significa contribuições entálpicas e entrópicas favoráveis para a ligação, envolvendo provavelmente ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas, contribuindo favoravelmente para a estabilidade do complexo, tal como já tinha sido mostrado no Capítulo 3, Secção 3.2.

**Tabela 3.3.1 –** Parâmetros termodinâmicos para a ligação de diflunisal aos dois locais de ligação da *wt*-TTR, obtidos a partir da experiência de CTI (Figura 3.3.1). Os parâmetros termodinâmicos foram obtidos através de regressão não linear aos dados experimentais, de acordo com um modelo de ligação a uma macromolécula com dois locais de ligação de ligantes, usando o programa de análise de dados Origin 7.0.

	1º local de ligação	2º local de ligação
K <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> )	2.90x10 <sup>7</sup>	8.26x10 <sup>5</sup>
K <sub>d</sub> (M)	3.45 x10⁻ <sup>8</sup>	1.21x10 <sup>-6</sup>
ΔH (kJ/mol)	-41.11	-21.99
ΔS (J/mol/deg)	5.15	39.61
ΔG (kJ/mol)	-42.59	-33.77

No entanto, verificam-se diferenças nos valores destes parâmetros termodinâmicos quando comparamos os dois locais de ligação. O segundo local de ligação apresenta uma variação de entalpia menos negativa e uma variação de entropia mais positiva, em comparação com o primeiro local de ligação. A diminuição da contribuição entálpica e o aumento da contribuição entrópica para a ligação estão geralmente associados a modos de ligação menos específicos e com maior liberdade conformacional. A energia livre de Gibbs para o segundo local de ligação é menos negativa, isto é, a afinidade para o ligante é menor neste local. Esta explicação vai de encontro ao facto de existir cooperatividade negativa na ligação do diflunisal aos dois locais de ligação da *wt*-TTR, com a afinidade para o ligante do primeiro local de ligação a ser maior do que no caso do segundo local.

Apesar destas diferenças termodinâmicas e de ligação entre os dois locais de ligação da *wt*-TTR para o diflunisal, distinguíveis por CTI, nas experiências de titulação seguidas por <sup>19</sup>F-RMN não se observou nenhuma diferença significativa nos desvios químicos do flúor. Significa que os átomos de flúor do diflunisal não estão envolvidos em interações específicas e fortes entre o ligante e a proteína, que o CTI permite afirmar que existem.

Tal como o diflunisal, o ácido flufenâmico (Figura 3.3.2) liga-se aos dois locais de ligação da *wt*-TTR com cooperatividade negativa, com K<sub>d1</sub> igual a 74.1 nM e K<sub>d2</sub> igual a 425 nM. Comparando com os valores destas constantes reportados na literatura (K<sub>d1</sub> = 30 nM e K<sub>d2</sub> = 255 nM)<sup>78</sup>, ambas as constantes obtidas nesta experiência tiveram um valor ligeiramente mais elevado que os valores da literatura, contudo continuam na mesma ordem de grandeza.

59



**Figura 3.3.2** - Titulação calorimétrica de *wt*-TTR (5 μM) com ácido flufenâmico (100 μM), obtida por CTI. As experiências de CTI foram realizadas em 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio, pH 7.2, 2% de DMSO e a 25 °C. O gráfico superior representa as trocas de calor associadas à injeção de ácido flufenâmico na célula contendo a solução de proteína *wt*-TTR e o gráfico inferior apresenta a isotérmica de ligação correspondente aos dados do gráfico superior e a melhor curva de ajuste, a vermelho. O calor de diluição da solução de ácido flufenâmico foi subtraído aos dados brutos. A curva de ajuste foi obtida através da regressão não linear aos dados experimentais, de acordo com um modelo de dois locais de ligação, usando o programa de análise de dados Origin 7.0.

No caso do ácido flufenâmico, para os dois locais de ligação temos a variação de entalpia e a variação de entropia negativas (Tabela 3.3.2), o que significa que a interação nos dois locais de ligação é caracterizada por ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas (Capítulo 3, Secção 3.2), mas também é caracterizada contribuições entálpicas favoráveis e contribuições entrópicas desfavoráveis, muito especialmente no caso do segundo local. Tendo em conta que a contribuição entálpica é favorável e apreciável, a contribuição entrópica desfavorável, especialmente no segundo local, poderá esta relacionada com penalidades devidas a perda de liberdade conformacional do ligante ou a perda de entropia de solvatação.

**Tabela 3.3.2 -** Parâmetros termodinâmicos para a ligação de ácido flufenâmico aos dois locais de ligação da *wt*-TTR, obtidos a partir da experiência de CTI (Fig. 3.3.2). Os parâmetros termodinâmicos foram obtidos através de regressão não linear aos dados experimentais, de acordo com um modelo de ligação a uma macromolécula com dois loais de ligação, usando o programa de análise de dados Origin 7.0.

	1º local de ligação	2º local de ligação
K <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> )	1.35x10 <sup>7</sup>	2.35x10 <sup>6</sup>
K <sub>d</sub> (M)	7.41x10⁻ <sup>8</sup>	4.25x10 <sup>-7</sup>
ΔH (kJ/mol)	-41.04	-49.74
ΔS (J/mol/deg)	-1.08	-44.80
∆G (kJ/mol)	-40.70	-36.36

Comparando os parâmetros termodinâmicos dos dois locais de ligação, verificase que no segundo local de ligação temos os valores da variação de entalpia e de entropia mais negativos, apesar de a diferença das entalpias não ser muito significativa. Podemos então afirmar que as interações não covalentes entre o ácido flufenâmico e cada um dos dois locais de ligação serão análogas ou energeticamente equivalentes. No entanto, a diferença de entropia observada para cada um dos dois locais de ligação já é significativa, sendo a variação de entropia associada ao segundo local de ligação muito mais negativa (bastante desfavorável). Esta mais desfavorável contribuição entrópica associada ao segundo local de ligação não é fácil de interpretar, mas poderá estar associada a perda de liberdade conformacional ou a perda de entropia de solvatação.

Na experiência de titulação seguida por <sup>19</sup>F-RMN, um dos sinais observados, o sinal 2, encontra-se a um desvio químico diferente e pensamos que reflete uma conformação adquirida pelo ácido flufenâmico num dos locais de ligação, cuja interação envolve diretamente um dos seus átomos de flúor no grupo -CF<sub>3</sub> (Capítulo 3, Secção 3.2). A análise dos dados fornecidos pela experiência de CTI permite-nos acreditar com mais certeza que esta conformação corresponde à adquirida pelo ligante no primeiro local de ligação, uma vez que a contribuição entálpica significativa indica a existência de interações específicas e fortes entre o ligante e a proteína.

## $\mathsf{CAP}(\mathsf{TULO}^4$

### CONCLUSÃO

O papel do flúor no desenho de novos fármacos tem vindo a assumir uma importância crescente em Química Medicinal, uma vez que a inclusão de átomos de flúor em compostos bioativos permite modular as propriedades físico-químicas desses compostos e, consequentemente, otimizar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

No presente trabalho, usando uma proteína modelo – a transtirretina humana – e um conjunto de ligantes fluorados para esta proteína, e tirando partido das características favoráveis da espectroscopia de RMN de <sup>19</sup>F (<sup>19</sup>F-RMN), levou-se a cabo um estudo de caracterização da participação dos átomos de flúor nas interações entre ligantes e proteína.

A hATTR-PN é uma doença amilóide com opções terapêuticas limitadas. A falta de tratamentos eficazes tem levado à procura de diversos compostos que possam ligar e estabilizar a forma nativa da proteína. A escolha dos compostos AG10, diflunisal e ácido flufenâmico foi feita por serem estabilizadores do tetrâmero da TTR, e poderem ser bons modelos para o estudo da interação de ligantes com a TTR, permitindo obter aprendizagens importantes para o desenho de novos fármacos.

Das experiências de titulação seguidas por <sup>19</sup>F-RMN podemos concluir que apenas no caso do ácido flufenâmico existe uma interação específica forte envolvendo diretamente o flúor, uma vez que é o único caso entre os estudados em que temos presente um novo sinal com uma alteração de desvio químico muito significativa em relação à forma não ligada do composto. No ácido flufenâmico, o grupo -CF<sub>3</sub> encontra-se na posição meta do anel aromático. Portanto, esta posição parece ser interessante num processo de desenho de novos fármacos, por existir uma interação com participação direta do flúor.

No caso do AG10, o flúor está ligado ao anel aromático na posição orto. Este anel também contém um grupo carboxílico e insere-se na cavidade externa do local de ligação. No caso do diflunisal, os dois átomos de flúor encontram-se nas posições orto e para do anel aromático. Podemos concluir que os átomos de flúor do AG10 e do diflunisal encontram-se em posições em que não participam diretamente em interações específicas com grupos funcionais do local ativo da TTR.

Das experiências de CTI concluímos que o AG10 é o composto com maior afinidade de ligação aos dois locais de ligação da *wt*-TTR, seguido do ácido flufenâmico e por último o diflunisal.

Como perspetivas futuras, seria interessante fazer dinâmica molecular tendo em conta a cooperatividade negativa existente na ligação dos compostos aos locais de ligação da *wt*-TTR, de modo a dar informações sobre a ligação destes compostos ao segundo local de ligação.

Capítulo 4

Seria igualmente interessante desenhar novos compostos tendo em conta a presença de um grupo -CF<sub>3</sub> na mesma posição do ácido Flufenâmico e fazer estes mesmos estudos de interação entre ligante e proteína e averiguar se também seria detetável a interação por <sup>19</sup>F-RMN.

Por fim, fazer o mesmo tipo de experiências com mais ligantes fluorados e perceber em que outros grupos fluorados e posições os átomos de flúor também participam diretamente em interações específicas.

## capítulo5

### BIBLIOGRAFIA

- 1. Ibrahim, M. A. A. Molecular mechanical study of halogen bonding in drug discovery. *J. Comput. Chem.* **32**, 2564–2574 (2011).
- 2. Desiraju, G. R. *et al.* Definition of the halogen bond (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.* **85**, 1711–1713 (2013).
- 3. Shinada, N. K., De Brevern, A. G. & Schmidtke, P. Halogens in Protein-Ligand Binding Mechanism: A Structural Perspective. *J. Med. Chem.* (2019).
- 4. Riley, K. E. & Hobza, P. Strength and character of halogen bonds in protein-ligand complexes. *Cryst. Growth Des.* **11**, 4272–4278 (2011).
- 5. Zhou, Y. *et al.* Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II-III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas. *Chem. Rev.* **116**, 422– 518 (2016).
- 6. de la Torre, B. G. & Albericio, F. The pharmaceutical industry in 2018. An analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. *Molecules* (2019).
- 7. Swallow, S. Fluorine in medicinal chemistry. in *Progress in Medicinal Chemistry* 97– 158 (Elsevier, 2015).
- 8. Bentor, Y. Periodic Table: Fluorine. Available at: http://www.chemicalelements.com/elements/f.html. (Accessed: 19th June 2019)
- 9. Lindon, J. C. & Wilson, I. D. 19F NMR spectroscopy: Applications in pharmaceutical studies. *eMagRes* **4**, 189–192 (2015).
- 10. Bégué, J. P. & Bonnet-Delpon, D. General Remarks on Structural, Physical, and Chemical Properties of Fluorinated Compounds. in *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine* 1–21 (John Wiley & Sons, Inc., 2007).
- 11. Park, B. K., Kitteringham, N. R. & O'Neill, P. M. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol.* **41**, 443–470 (2001).
- 12. Haufe, G. & Leroux, F. Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals. (Elsevier, 2018).
- 13. Silverman, R. B. & Holladay, M. W. Receptors. in *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action: Third Edition* 123–163 (Elsevier, 2015).
- 14. Thomas, G. Receptors and messengers. in *Medicinal Chemistry: an introduction* 251–290 (Wiley, 2007).
- 15. Dalvit, C., Invernizzi, C. & Vulpetti, A. Fluorine as a hydrogen-bond acceptor: Experimental evidence and computational calculations. *Chem. - A Eur. J.* **20**, 11058–11068 (2014).
- 16. Chang, R. Forças intermoleculares, líquidos e sólidos. in *Química* 467–519 (AMGH Editora, 2013).
- 17. Howard, J. A. K., Hoy, V. J., O'Hagan, D. & Smith, G. T. How good is fluorine as a hydrogen bond acceptor? *Tetrahedron* **52**, 12613–12622 (1996).
- Banks, R. E., Smart, B. E. & Tatlow, J. C. Characteristics of C-F Systems. in Organofluorine Chemistry: Principles and Commercial Applications (eds. Katritzky, A. R. & Sabongi, G. J.) 57–82 (Springer Science+ Business Media, LLC, 1994). doi:10.1007/978-1-4899-1202-2
- 19. Dunitz, J. D. & Taylor, R. Organic fluorine hardly ever accepts hydrogen bonds. *Chem. A Eur. J.* **3**, 89–98 (1997).
- 20. Evans, T. A. & Seddon, K. R. Hydrogen bonding in DNA A return to the status quo. *Chem. Commun.* 2023–2024 (1997). doi:10.1039/a705239a
- 21. Ouvrard, C., Berthelot, M. & Laurence, C. An enthalpic scale of hydrogen-bond basicity, Part 1: Halogenoalkanes. *J. Phys. Org. Chem.* **14**, 804–810 (2001).
- 22. Dalvit, C. & Vulpetti, A. Fluorine-Protein Interactions and 19F NMR Isotropic Chemical Shifts: An Empirical Correlation with Implications for Drug Design. *ChemMedChem* **6**, 104–114 (2011).
- 23. Dalvit, C. & Vulpetti, A. Weak Intermolecular Hydrogen Bonds with Fluorine: Detection and Implications for Enzymatic/Chemical Reactions, Chemical Properties, and Ligand/Protein Fluorine NMR Screening. *Chem. - A Eur. J.* **22**, 7592–7601 (2016).

- 24. Alphey, M. S. *et al.* Trypanosoma brucei UDP-galactose-4'-epimerase in ternary complex with NAD+ and the substrate analogue UDP-4-deoxy-4-fluoro-α-D-galactose. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 829–834 (2006).
- 25. Iwaoka, M., Komatsu, H., Katsuda, T. & Tomoda, S. Quantitative evaluation of weak nonbonded Se…F interactions and their remarkable nature as orbital interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 1902–1909 (2002).
- 26. Matta, C. F., Castillo, N. & Boyd, R. J. Characterization of a closed-shell fluorinefluorine bonding interaction in aromatic compounds on the basis of the electron density. *J. Phys. Chem. A* **109**, 3669–3681 (2005).
- 27. Olsen, J. A. *et al.* A fluorine scan of thrombin inhibitors to map the fluorophilicity/fluorophobicity of an enzyme active site: Evidence for C-F···C=O interactions. *Angew. Chemie Int. Ed.* **42**, 2507–2511 (2003).
- 28. Plenio, H. The coordination chemistry of fluorine in fluorocarbons. *ChemBioChem* **5**, 650–655 (2004).
- 29. Lu, Y. X., Zou, J. W., Yu, Q. Sen, Jiang, Y. J. & Zhao, W. N. Ab initio investigation of halogen bonding interactions involving fluorine as an electron acceptor. *Chem. Phys. Lett.* **449**, 6–10 (2007).
- 30. De Nayer, P. Historical Overview of analytical methods for the measurement of Transthyretin. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**, 1271–1273 (2002).
- 31. Woeber, K. A. & Ingbar, S. H. The contribution of thyroxine-binding prealbumin to the binding of thyroxine in human serum, as assessed by immunoadsorption. *J. Clin. Invest.* **47**, 1710–1721 (1968).
- 32. Kanai, M., Raz, A. & Goodman, D. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *The Journal of clinical investigation* 2025–2044 (1968).
- Brito, R., Damas, A. & Saraiva, M. Amyloid Formation by Transthyretin: From Protein Stability to Protein Aggregation. *Curr. Med. Chem. Endocr. Metab. Agents* 3, 349–360 (2003).
- 34. Blake, C. C. F. *et al.* An X-ray study of the subunit structure of prealbumin. *J. Mol. Biol.* **61**, 217–224 (1971).
- 35. Blake, C. C. F., Geisow, M. J., Swan, I. D. A., Rerat, C. & Rerat, B. Structure of human plasma prealbumin at 2.5 A resolution. *J. Mol. Biol.* **88**, 1–12 (1974).
- 36. Kanda, Y., Goodman, D. S., Canfield, R. E. & Morgan, F. J. The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J. Biol. Chem.* **249**, 6796–6805 (1974).
- 37. Blake, C. C. F., Geisow, M. J., Oatley, S. J., Rérat, B. & Rérat, C. Structure of prealbumin: Secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J. Mol. Biol.* **121**, 339–356 (1978).
- 38. Wojtczak, A., Cody, V., Luft, J. R. & Pangborn, W. Structures of human transthyretin complexed with thyroxine at 2.0 Å resolution and 3',5'-dinitro-N-acetyl-L-thyronine at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **52**, 758–765 (1996).
- 39. Blake, C. C. F. & Oatley, S. J. Protein-DNA and protein-hormone interactions in prealbumin: A model of the thyroid hormone nuclear receptor? *Nature* **268**, 115–120 (1977).
- 40. Cicatiello, A. G., Di Girolamo, D. & Dentice, M. Metabolic Effects of the Intracellular Regulation of Thyroid Hormone: Old Players, New Concepts. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **9**, (2018).
- 41. Ferguson, R. N. & Edelhoch, H. Negative Cooperativity in the Binding of Thyroxine to Human Serum Prealbumin. *Biochemistry* **14**, 282–289 (1975).
- 42. Monaco, H. L. The transthyretin-retinol-binding protein complex. in *Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure and Biological Functions* (Springer, 2009).
- 43. Raz, A., Shiratori, T. & Goodman, D. S. Studies on the protein-protein and proteinligand interactions involved in retinol transport in plasma. *J. Biol. Chem.* **245**, 1903– 1912 (1970).
- 44. Cohen, A. S. & Connors, L. H. The pathogenesis and biochemistry of amyloidosis.

*J. Pathol.* **151**, 1–10 (1987).

- 45. Varadi, M., De Baets, G., Vranken, W. F., Tompa, P. & Pancsa, R. AmyPro: A database of proteins with validated amyloidogenic regions. *Nucleic Acids Res.* (2018).
- 46. Stefani, M. & Dobson, C. M. Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* **81**, 678–699 (2003).
- 47. Andrade, C. A peculiar form of peripheral neuropathy: Familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* **75**, 408–427 (1952).
- 48. Costa, P. P., Figueira, A. S. & Bravo, F. R. Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 4499–4503 (1978).
- 49. A rare diseaase with a global presence. Recognizing TTR-FAP. (2014). Available at: https://www.recognizingttr-fap.com/epidemiology. (Accessed: 22nd June 2019)
- 50. Schmidt, H. H. *et al.* Estimating the global prevalence of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle and Nerve* **57**, 829–837 (2018).
- 51. Jacobson, D. R. *et al.* Variant-Sequence Transthyretin (Isoleucine 122) in Late-Onset Cardiac Amyloidosis in Black Americans. *N. Engl. J. Med.* **336**, 466–473 (1997).
- Westermark, P., Sletten, K., Johansson, B. & Cornwell, G. G. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 2843–2845 (1990).
- 53. Parman, Y. *et al.* Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Curr. Opin. Neurol.* **29**, S3–S13 (2016).
- 54. Plante-Bordeneuve, V. Transthyretin familial amyloid polyneuropathy: an update. *J. Neurol.* **118**, 82–89 (2018).
- 55. Saraiva, M. J. M., Costa, P. P. & Goodman, D. S. Biochemical marker in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Family studies on the transthyretin (prealbumin)-methionine-30 variant. *J. Clin. Invest.* **76**, 2171–2177 (1985).
- 56. Gorevic, P. D., Prelli, F. C., Wright, J., Pras, M. & Frangione, B. Systemic senile amyloidosis. Identification of a new prealbumin (Transthyretin) variant in cardiac tissue: Immunologic and biochemical similarity to one form of familial amyloidotic polyneuropathy. *J. Clin. Invest.* **83**, 836–843 (1989).
- 57. Jacobson, D. R., McFarlin, D. E., Kane, I. & Buxbaum, J. N. Transthyretin Pro55, a variant associated with early-onset, aggressive, diffuse amyloidosis with cardiac and neurologic involvement. *Hum. Genet.* **89**, 353–356 (1992).
- 58. Holmgren, G. *et al.* Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clin. Genet.* **40**, 242–246 (1991).
- 59. FAPWTR/DLTR. The Familial Amyloidotic Polyneuorpathy World Transplant Registry. The Domino Liver Transplant Registry. Available at: http://www.fapwtr.org/ram1.htm. (Accessed: 23rd June 2019)
- 60. Ohya, Y. *et al.* Manifestations of transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy: Long-term follow-up of Japanese patients after liver transplantation. *Surg. Today* **41**, 1211–1218 (2011).
- 61. Sousa, M. M. *et al.* Deposition and passage of transthyretin through blood-nerve barrier in recipients of familial amyloid polyneuropathy livers. *Lab. Investig.* **84**, 865–873 (2004).
- 62. Simões, C. J. V. *et al.* A novel bis-furan scaffold for transthyretin stabilization and amyloid inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* **121**, 823–840 (2016).
- 63. Damas, A. M. & Saraiva, M. J. Review: TTR amyloidosis Structural features leading to protein aggregation and their implications on therapeutic strategies. *J.*

Struct. Biol. 130, 290–299 (2000).

- 64. Merlini, G. *et al.* Treatment of AL amyloidosis with 4 '-iodo-4 '-deoxydoxorubicin: An update. *Blood* **93**, 1112–1113 (1999).
- 65. Benson, M. D. *et al.* Targeted suppression of an amyloidogenic transthyretin with antisense oligonucleotides. *Muscle and Nerve* **33**, 609–618 (2006).
- 66. Ackermann, E. J. *et al.* Suppressing transthyretin production in mice, monkeys and humans using 2nd-Generation antisense oligonucleotides. *Amyloid* **23**, 148–157 (2016).
- 67. Coelho, T. *et al.* Safety and Efficacy of RNAi Therapy for Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **369**, 819–829 (2013).
- Johnson, S. M., Connelly, S., Fearns, C., Powers, E. T. & Kelly, J. W. The transthyretin amyloidoses: From delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *J. Mol. Biol.* **421**, 185–203 (2012).
- 69. Barroso, F. A. *et al.* Long-term safety and efficacy of tafamidis for the treatment of hereditary transthyretin amyloid polyneuropathy: results up to 6 years. *Amyloid* **24**, 194–204 (2017).
- 70. Bulawa, C. E. *et al.* Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9629–9634 (2012).
- 71. Miller, S. R., Sekijima, Y. & Kelly, J. W. Native state stabilization by NSAIDs inhibits transthyretin amyloidogenesis from the most common familial disease variants. *Lab. Investig.* **84**, 545–552 (2004).
- 72. Plains, S. et al. PHENYL BENZOIC ACID COMPOUNDS. (1973).
- 73. Brogden, R. N., Heel, R. C., Pakes, G. E., Speight, T. M. & Avery, G. S. Diflunisal: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Pain and Musculoskeletal Strains and Sprains and Pain in Osteoarthritis. *Drugs* **19**, 84–106 (1980).
- 74. Berk, J. L. *et al.* Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: A randomized clinical trial. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **310**, 2658–2667 (2013).
- 75. Adamski-Werner, S. L., Palaninathan, S. K., Sacchettini, J. C. & Kelly, J. W. Diflunisal Analogues Stabilize the Native State of Transthyretin. Potent Inhibition of Amyloidogenesis. *J. Med. Chem.* **47**, 355–374 (2004).
- 76. LIPMAN, A. G. MARTINDALE: 'Martindale the Extra Pharmacopoeia' (30th ed), edited by J. E. F. Reynolds. *Int. J. Pharm. Pract.* **2**, 124–124 (1993).
- 77. Metz, G. Method of producing 2-(2-hydroxyethoxy)-ethanol ester of flufenamic acid. 1–6 (1989).
- 78. Peterson, S. A. *et al.* Inhibiting transthyretin conformational changes that lead to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12956–12960 (1998).
- 79. Merck & Co, Inc, Whitehouse Station, N. TABLETS DOLOBID® (DIFLUNISAL). U.S. Food and Drug Administration (2006).
- 80. Penchala, S. C. *et al.* AG10 inhibits amyloidogenesis and cellular toxicity of the familial amyloid cardiomyopathy-associated V122I transthyretin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9992–9997 (2013).
- 81. Judge, D. P. *et al.* Transthyretin Stabilization by AG10 in Symptomatic Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **74**, 285–295 (2019).
- 82. Gerig, J. T. Fluorine nuclear magnetic resonance of fluorinated ligands. *Methods Enzymol.* **177**, 3–23 (1989).
- 83. Krishnamurthy, V. M. *et al.* Thermodynamic parameters for the association of fluorinated benzenesulfonamides with bovine carbonic anhydrase II. *Chem. An Asian J.* **2**, 94–105 (2007).
- 84. Lee, Y., Zeng, H., Ruedisser, S., Gossert, A. D. & Hilty, C. Nuclear magnetic resonance of hyperpolarized fluorine for characterization of protein-ligand interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17448–17451 (2012).
- 85. Scheuring, J. *et al.* (Trifluoromethyl)lumazine Derivatives as 19F NMR Probes for Lumazine protein. *Biochemistry* **33**, 7634–7640 (2005).

- 86. Sigala, P. A. *et al.* Testing geometrical discrimination within an enzyme active site: Constrained hydrogen bonding in the ketosteroid isomerase oxyanion hole. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13696–13708 (2008).
- 87. Lindon, J. C. 19F NMR Spectroscopy☆. in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (Elsevier, 2016).
- Furukawa, A., Konuma, T., Yanaka, S. & Sugase, K. Quantitative analysis of protein-ligand interactions by NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 96, 47– 57 (2016).
- 89. Saitô, H. Dynamic pictures of proteins by NMR. in *Annual Reports on NMR* Spectroscopy 1–66 (Academic Press Inc., 2014).
- 90. Knowles, P. F., Marsh, D. & Rattle, H. W. E. The NMR Spectrum. in *Magnetic Resonance of Biomolecules* 30–78 (Wiley, 1976).
- 91. Grzesiek, S. Notes on relaxation and dynamics. *EMBO Pract. Course NMR* 1–40 (2003).
- 92. Pellecchia, M., Sem, D. S. & Wüthrich, K. NMR in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 211–219 (2002).
- 93. Brevard, C. NMR Parameters. in *Handbook of high resolution multinuclear NMR.* (ed. John Wiley & Sons Inc) 1–20 (Wiley-Interscience and Sons, 1981).
- 94. Hans J. Reich. 8.1 Relaxation in NMR Spectroscopy. Spectroscopy 1–11 (2017).
- 95. Ewing, G. W. & Jordan, J. Instrumental Methods of Chemical Analysis. (Analytical Chemistry, 1985).
- 96. Colón, W. Analysis of protein structure by solution optical spectroscopy. *Methods Enzymol.* **309**, 605–632 (1999).
- 97. Freyer, M. W. & Lewis, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods Cell Biol.* **84**, 79–113 (2008).
- Kabiri, M. & Unsworth, L. D. Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: Peptide self-assembly and protein adsorption case studies. *Biomacromolecules* 15, 3463– 3473 (2014).
- 99. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
- 100. Bharti, S. K. & Roy, R. Quantitative 1H NMR spectroscopy. *TrAC Trends Anal. Chem.* **35**, 5–26 (2012).
- 101. Quintas, A., Saraiva, M. J. M. & Britot, R. M. M. The tetrameric protein transthyretin dissociates to a non-native monomer in solution. A novel model for amyloidogenesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 32943–32949 (1999).
- 102. MicroCal. ITC Data Analysis in Origin®. *Reading* (2004).
- 103. Marquardt, D. W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* (1963).
- 104. Mahadevi, A. S. & Sastry, G. N. Cooperativity in Noncovalent Interactions. *Chem. Rev.* **116**, 2775–2825 (2016).
- Vulpetti, A., Schiering, N. & Dalvit, C. Combined use of computational chemistry, NMR screening, and X-ray crystallography for identification and characterization of fluorophilic protein environments. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 78, 3281– 3291 (2010).
- 106. Du, X. *et al.* Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).

# CAPÍTULO 6

### ANEXOS

#### Anexo I

**Tabela 6.I.1**– Valores da absorvância retirados dos espetros do diflunisal obtidos por espectroscopia de absorção no UV-visível, para a respetiva concentração da amostra, aos 252 nm e aos 600 nm. A Abs<sub>corrigida</sub> corresponde à diferença entre a absorvância aos 252 nm e a absorvância aos 600 nm.

Abs (252 nm)	Abs (600 nm)	Abs <sub>corrigida</sub> (nm)	Concentração (uM)	Concentração (M)
0,494	0,009	0,485	25	0,000025
0,845	-0,004	0,849	50	0,000050
1,16	0,004	1,156	75	0,000075
1,5	0,005	1,495	100	0,000100



**Figura 6.I.1**- Regressão linear da absorvância corrigida do composto, a 252 nm, em função da concentração de cada amostra de diflunisal. Do lado direito é apresentada a equação da regressão linear, cujo declive corresponde ao coeficiente de extinção molar do diflunisal, bem como o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>). Os valores de absorvância foram determinados por espectroscopia de absorção no UV-visível e o gráfico foi produzido no programa Excel.

#### ANEXO II

**Tabela 6.II.1**- Valores da absorvância retirados dos espetros do ácido flufenâmico obtidos por espectroscopia de absorção no UV-visível, para a respetiva concentração da amostra, aos 289 nm e aos 600 nm. A Abs<sub>corrigida</sub> corresponde à diferença entre a absorvância aos 289 nm e a absorvância aos 600 nm.

Abs (289 nm)	Abs (600 nm)	Abs <sub>corrigida</sub> (nm)	Concentração (uM)	Concentração (M)
0,373	0,013	0,36	25	0,000025
0,733	0,026	0,707	50	0,000050
1,018	0,021	0,997	75	0,000075
1,468	0,011	1,457	100	0,000100



**Figura 6.II.1** - Regressão linear da absorvância corrigida do composto, a 289 nm, em função da concentração de cada amostra de ácido flufenâmico. Regressão linear feita em função dos dados apresentados na Tabela 6.II.1. Do lado direito é apresentada a equação da regressão linear, cujo declive corresponde ao coeficiente de extinção molar do ácido flufenâmico, bem como o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>). Os valores de absorvância foram determinados por espectroscopia de absorção no UV-visível e o gráfico foi produzido no programa Excel.

**Tabela 6.II.2**- Valores da absorvância retirados dos espetros do ácido flufenâmico obtidos por espectroscopia de absorção no UV-visível, para a respetiva concentração da amostra, aos 289 nm e aos 600 nm. A Abs<sub>corrigida</sub> corresponde à diferença entre a absorvância aos 289 nm e a absorvância aos 600 nm.

Abs (289 nm)	Abs (600 nm)	Abs <sub>corrigida</sub> (nm)	Concentração (uM)	Concentração (M)
0,429	0,003	0,426	25	0,000025
0,729	-0,002	0,731	50	0,000050
1,081	0,002	1,079	75	0,000075
1,451	0,005	1,446	100	0,000100



**Figura 6.II.2** - Regressão linear da absorvância corrigida do composto, a 289 nm, em função da concentração de cada amostra de ácido flufenâmico. Regressão linear feita em função dos dados apresentados na Tabela 6.II.2. Do lado direito é apresentada a equação da regressão linear, cujo declive corresponde ao coeficiente de extinção molar do ácido flufenâmico, bem como o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>). Os valores de absorvância foram determinados por espectroscopia de absorção UV-visível e o gráfico foi produzido no programa Excel.

#### ANEXO III



**Figura 6.III.1** – Espetro de <sup>13</sup>C-RMN do composto diflunisal. O espetro de <sup>13</sup>C-RMN do diflunisal (72.88 mM) foi adquirido aos 298 K e a 100.62 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III.



**Figura 6.III.2** – Espetros DEPT 90 e DEPT 135 (A), COSY (B), HSQC (C) e HMBC (D) do composto diflunisal. Todos os espetros do diflunisal (72.88 mM) foram adquiridos aos 298 K e no espectrómetro de RMN Bruker Avance III.

#### ANEXO IV



**Figura 6.IV.1** - Espetro de <sup>13</sup>C-RMN do composto ácido flufenâmico. O espetro de <sup>13</sup>C-RMN do ácido flufenâmico (66.88 mM) foi adquirido aos 298 K e a 100.62 MHz no espectrómetro de RMN Bruker Avance III.



**Figura 6.IV.2** - Espetros DEPT 90 e DEPT 135 (A), COSY (B), HSQC (C) e HMBC (D) do composto ácido flufenâmico. Todos os espetros do ácido flufenâmico (66.88 mM) foram adquiridos aos 298 K e no espectrómetro de RMN Bruker Avance III.