

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

ANGÉLICA ROCHA JOAQUIM

**OBTENÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE CISTEÍNO-PROTEASES POR
SIMPLIFICAÇÃO MOLECULAR**

Porto Alegre, Novembro de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

ANGÉLICA ROCHA JOAQUIM

**OBTENÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE CISTEÍNO-PROTEASES POR
SIMPLIFICAÇÃO MOLECULAR**

Orientador: Prof^o. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Porto Alegre, Novembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e por guiar meus passos até aqui.

À minha mãe, Ângela, pelo amor incondicional, por todos os seus cuidados que tornaram esses anos de Faculdade menos dolorosos. Por ser minha melhor amiga e estar ao meu lado sempre.

Ao meu pai, Vilmar, por estar sempre presente, me ajudando em todos os momentos, dando apoio, amor e incentivo durante essa caminhada.

Ao meu companheiro, Elias, que acompanha meus sonhos desde antes da Faculdade, pelos momentos divididos, pelo carinho e apoio de sempre.

Aos meus avós, Maria, Assis, Pedro e Natalina, pela experiência de vida e pelo carinho.

Aos meus padrinhos, Sílvia e Valdomiro, por serem minha segunda família e por me ajudarem sempre que preciso. À minha pequena afilhada, Élen, por ser um refúgio quando eu precisava descansar.

Aos meus primos, tios, tias, demais familiares e amigos, pelos momentos felizes.

Ao meu orientador, professor Saulo, que, além de passar seus conhecimentos com paciência e dedicação, ensina valores éticos necessários para minha vida profissional.

Aos colegas do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal. Em especial, à Débora e Isadora, pela amizade e companheirismo durante os experimentos. À equipe da professora Rafaela Salgado Ferreira (UFMG) e ao professor Francisco Paulo dos Santos pelas contribuições.

À professora Amélia, minha primeira orientadora, e à Rafaela, que me inseriu no mundo da pesquisa, na Iniciação Científica, quando trabalhei no Laboratório de Farmacognosia.

Aos professores Tércio, George, Tiana e Sílvia Spalding, que também contribuíram para meu crescimento, me acompanhando durante as monitorias que participei.

Às professoras Cássia e Valquíria, minhas supervisoras de Estágio Curricular, que estiveram sempre dispostas a ajudar. Agradeço também aos meus colegas de estágio e supervisores locais, que muito contribuíram para meu crescimento profissional.

RESUMO

A doença de Chagas e a tripanossomíase africana são um problema para a saúde pública, uma vez que os medicamentos disponíveis para o tratamento apresentam problemas quanto à eficácia e toxicidade. A classe das cisteíno-proteases é um alvo terapêutico promissor para o desenvolvimento de novos fármacos anti-tripanosomatídeos. A cruzaína e a rodesaína são as principais cisteíno-proteases do *T. cruzi* e *T. brucei*, respectivamente, e apresentam homologia. Colaboradores deste trabalho realizaram um estudo de *High Throughput Screening* com uma biblioteca de quase 200 mil substâncias. Através deste estudo, identificou-se um bom protótipo de inibidor dessas enzimas. Porém, a obtenção dos quatro estereoisômeros deste protótipo é extremamente complexa. No presente trabalho propõe-se a síntese de análogos mais simples deste protótipo, além da avaliação de sua atividade. A síntese destes análogos foi planejada a partir do ácido 2-furoico e cloridrato do éster metílico da L ou D-valina formando o composto **3** (*S* ou *R*). Após a formação da ligação amídica, o éster metílico do composto **3** foi hidrolisado em meio básico fornecendo o composto **4** (*S* ou *R*) que, posteriormente, foi acoplado a diferentes aminas fornecendo oito substâncias inéditas. Comparando-se as atividades dos análogos sintetizados, foi possível estabelecer uma provável relação estrutura-atividade. Além disso, a substância **8R** apresentou atividade relevante. Uma vez que este derivado é bem mais simples que o protótipo e que pode ser sintetizado em apenas três etapas, conclui-se que foi possível identificar um novo protótipo por simplificação molecular e este poderá ser modificado posteriormente para a obtenção de um novo candidato a fármaco.

Palavras-chave: cisteíno-proteases, *Tripanosoma cruzi*, *Tripanosoma brucei*, inibidores não covalentes.

ABSTRACT

The Chagas disease and the african trypanosomiasis are a problem of public health, since available medicine for the treatment presents issues regarding efficacy and toxicity. The cysteine proteases class is a promising therapeutic target for the development of new antitrypanosomal drugs. Cruzain and rhodesain are the major cysteine proteases from *T. cruzi* and *T. brucei*, respectively, and present homology. Collaborators of this work carried out an *High Throughput Screening* study with a library of almost 200 thousand compounds. Through this study, it was identified a good inhibitor of such enzymes. However, obtaining the four stereoisomers of this is extremely complex. In the present work it is proposed the synthesis of simpler analogues of this lead compound, in addition to the evaluation of its activity. The synthesis of these analogues was planned from 2-furoic acid and L or D-valine methyl ester hydrochloride, forming the compound **3** (*S* or *R*). After the formation of the amide bond, the methyl ester of the compound **3** was hydrolyzed in basic conditions, forming the compound **4** (*S* or *R*) that was, posteriorly, attached to different amines, providing eight novel compounds. By comparing the activities of the analogues synthesized, it became possible to establish a likely structure-activity relationship. Furthermore, the substance **8R** showed relevant activity. Since this derivative is considerably simpler than the lead compound and it can be synthesized in only three steps, it is concluded that it was possible to identify a new lead compound by molecular simplification, which can be further modified to obtain a new candidate for pharmaceutical drug.

Keywords: cysteine proteases, *Tripanosoma cruzi*, *Tripanosoma brucei*, non-covalent inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

1.1	Fármacos disponíveis para tratamento da doença de Chagas e tripanossomíase africana.....	14
1.2	Alinhamento das estruturas cristalográficas das enzimas.....	15
1.3	Exemplos de inibidores covalentes da cruzaina.....	16
1.4	Estrutura do composto difurânico peptídeo-mimético.....	17
3.1	Esquema geral de síntese de análogos do composto 1.....	19
4.1	Síntese do composto 3.....	20
4.2	Desprotonação do cloridrato do éster metílico da L ou D-valina.....	20
4.3	Proposta de mecanismo para a formação do composto 3.....	21
4.4	Obtenção do composto 4.....	22
4.5	Proposta de mecanismo para a formação do composto 4.....	22
4.6	Obtenção dos compostos 5 ao 8.....	24
A.1	Espectro no infravermelho de 3S.....	37
A.2	Espectro de RMN de ¹H de 3S (400 MHz, DMSO-d6).....	38
A.3	Espectro de RMN de ¹³C de 3S (100 MHz, DMSO-d6).....	39
A.4	Espectro no infravermelho de 4S.....	40
A.5	Espectro de RMN de ¹H de 4S (400 MHz, DMSO-d6).....	41
A.6	Espectro de RMN de ¹³C de 4S (100 MHz, DMSO-d6).....	42
A.7	Espectro no infravermelho de 8R.....	43
A.8	Espectro de RMN de ¹H de 8R (400 MHz, DMSO-d6).....	44
A.9	Espectro de RMN de ¹³C de 8R (100 MHz, DMSO-d6).....	45

LISTA DE TABELAS

4.1	Porcentagem de inibição dos compostos para cada enzima.....	25
5.1	Sistemas de cromatografia em coluna de sílica para purificação dos compostos.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Asn182	Asparagina 182
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCS	Cromatografia em Coluna de Sílica
CCSF	Cromatografia em Coluna de Sílica Flash
ClogP	Logaritmo do coeficiente de partição <i>n</i> -octanol/água calculado
Cys25	Cisteína 25
D	Dextrogiro
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
DIPEA	<i>N,N</i> - Diisopropiletilamina
DMAP	4- Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDC	Cloridrato de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> '-etilcarbodiimida
F.F.	Faixa de fusão
His162	Histidina 162
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgG	Imunoglobulina G
IV	Infravermelho

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (Conclusão)

K _i	Constante de inibição
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
L	Levogiro
M. M.	Massa molar
m	Multiplete
NA	Não avaliado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	Protein Data Bank
pg.	Página
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
td	Triplete duplo
THF	Tetraidrofurano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivos gerais	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 PLANO DE SÍNTESE	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Síntese dos análogos de 1	20
4.2 Avaliação biológica das substâncias 5-8.....	24
5 PARTE EXPERIMENTAL	27
5.1 Materiais e métodos gerais	27
5.2 Obtenção dos compostos 3 – 8	27
5.2.1 Éster metílico de <i>N</i> -(2-furanilcarbonil)-valina (3)	27
5.2.2 <i>N</i> -(2-furanilcarbonil)-valina (4)	28
5.2.3 Obtenção dos compostos 5 ao 8	29
5.2.3.1 <i>N</i> -[(<i>R</i>)-2-metil-1-[2-(benzotiazolil(amino)carbonil)propil]-2- furanocarboxamida	30
6 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
APÊNDICE A - Espectros no IV e de ressonância magnética nuclear	37

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas, que acometem principalmente regiões economicamente menos favorecidas, continuam sendo um grave problema de saúde pública. Há falta de interesse das principais empresas farmacêuticas no desenvolvimento de novos fármacos para tratar estas doenças, visto que o retorno financeiro seria pequeno (Wilkinson e Kelly, 2009).

A Doença de Chagas, descoberta e descrita pelo médico e pesquisador Carlos Chagas em 1909, é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das dezessete doenças tropicais mais negligenciadas. Seu agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, um parasita tripanossomatídeo que, através de um vetor triatomíneo, pode infectar seres humanos e cerca de 150 espécies de animais (como cães, gatos, porcos, tatus, por exemplo). Já foram identificadas mais de 130 espécies de triatomíneos, porém, poucas são capazes de ser bons vetores. *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as principais espécies de triatomíneos que transmitem o parasita ao homem, sendo o primeiro o mais importante (Jr et al., 2010).

Trypanosoma cruzi é prevalente nos países da América Latina (Pereira et al., 2015), porém, devido à imigração de indivíduos latinoamericanos infectados, já existem casos de doença de Chagas na América do Norte, Europa, Japão e Austrália. A estimativa é de 14 milhões de imigrantes chagásicos, o que viabiliza a sua transmissão (Westphalen et al., 2012). Estimativas recentes são de que, aproximadamente, 18 milhões de pessoas estão infectadas, sendo que na América Latina, são registradas cerca de 21.000 mortes por ano (Pereira et al., 2015). No Brasil são estimados cerca de três milhões de pessoas infectadas, onde a região Norte é a mais afetada (Silva et al., 2010).

A infecção por *Trypanosoma cruzi* pode ocorrer por diversas formas. As mais comuns são: transmissão vetorial através da picada de triatomíneos - via clássica, que corresponde a 80% das formas de infecção (Costa et al., 2013) - , transfusão de sangue contaminado, ou transmissão congênita. Outras formas de infecção, menos comuns são: ingestão de alimentos contaminados com fezes de triatomíneos ou bebidas (como por exemplo, suco da cana e açaí, que foram triturados com os insetos vetores), a transmissão durante o transplante de órgãos, ingestão de leite materno contaminado,

acidentes laboratoriais, entre outras. A transmissão vetorial, no Brasil e em outros países da América Latina, já foi reduzida. Isso se deve aos avanços da vigilância epidemiológica, além de estratégias para identificação da presença do vetor (Costa et al., 2013). Normalmente o controle do vetor se dá pela aplicação de inseticidas nas moradias ou através dos programas de melhoria das mesmas, com a construção de casas de alvenaria para a população suscetível (Andreollo e Malafaia, 2009).

O ciclo biológico do *T. cruzi* possui algumas formas evolutivas, tanto no hospedeiro vertebrado, quando no invertebrado. Os triatomíneos (vetores, invertebrados) tornam-se infectados pelo repasto sanguíneo em humanos ou animais que contém tripomastigotas circulantes, que, no trato digestório do invertebrado, diferenciam-se na forma de tripomastigota metacíclico. Esta forma, após outro repasto sanguíneo, é eliminada nas fezes do inseto e penetra no local da picada. No hospedeiro vertebrado os tripomastigotas chegam às células e diferenciam-se em amastigotas, as formas intracelulares que, por sua vez, diferenciam-se em tripomastigotas e são liberados na corrente sanguínea (De Carli e Tasca, 2014). Existem alguns estudos realizados para discutir a patogenia da doença. Porém, a única teoria firmemente consolidada é de que o *T. cruzi* penetra na célula do hospedeiro, se multiplica na forma amastigota, gerando pseudocistos que se rompem dando origem a uma reação inflamatória, culminando com a liberação de novas formas tripomastigotas circulantes no organismo e repetindo o ciclo (Coura e Castro, 2012). Outra hipótese descrita é a da autoimunidade, que surge do fato de que os parasitas encontram-se menos frequentes na fase crônica da doença, o que sugere que a mesma poderia ser o resultado de uma reação autoimune causada por autoanticorpos ou células T auto-reativas, derivadas de mimetismo molecular entre os epítomos antigênicos do parasita e do hospedeiro (Gironès e Fresno, 2003).

A clínica da doença de Chagas envolve duas fases: aguda e crônica. A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática, sendo os principais sintomas o sinal de Romaña (edema nas pálpebras de um dos olhos), o Chagoma de inoculação, febre, astenia, cefaleia, linfonomegalia, hepatoesplenomegalia, e até mesmo manifestações neurológicas ou cardíacas. Estes sintomas iniciam de oito a dez dias após a entrada do *T. cruzi* na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (Costa et al., 2013). A fase crônica se subdivide em crônica assintomática (latente ou indeterminada) em que não existem achados clínicos e laboratoriais significantes, mas com sorologia reagente, e crônica sintomática, na qual os indivíduos, após anos assintomáticos (fase latente),

apresentam complicações no sistema cardiovascular e digestivo, sendo a forma cardíaca a mais importante pela elevada taxa de morbimortalidade (Costa et al., 2013; Coura e Pereira, 2011).

Outra doença negligenciada, causada também por um tripanossomatídeo, é a doença do sono ou tripanossomíase africana. Endêmica na África, seu agente etiológico é o *Trypanosoma brucei*, que parasita o hospedeiro através de um único vetor: um inseto do gênero *Glossina* sp., popularmente conhecido como mosca tsétsé (Malvy e Chappuis, 2011). Segundo a OMS, o número de pessoas infectadas chega a 500.000 (Stich et al., 2002).

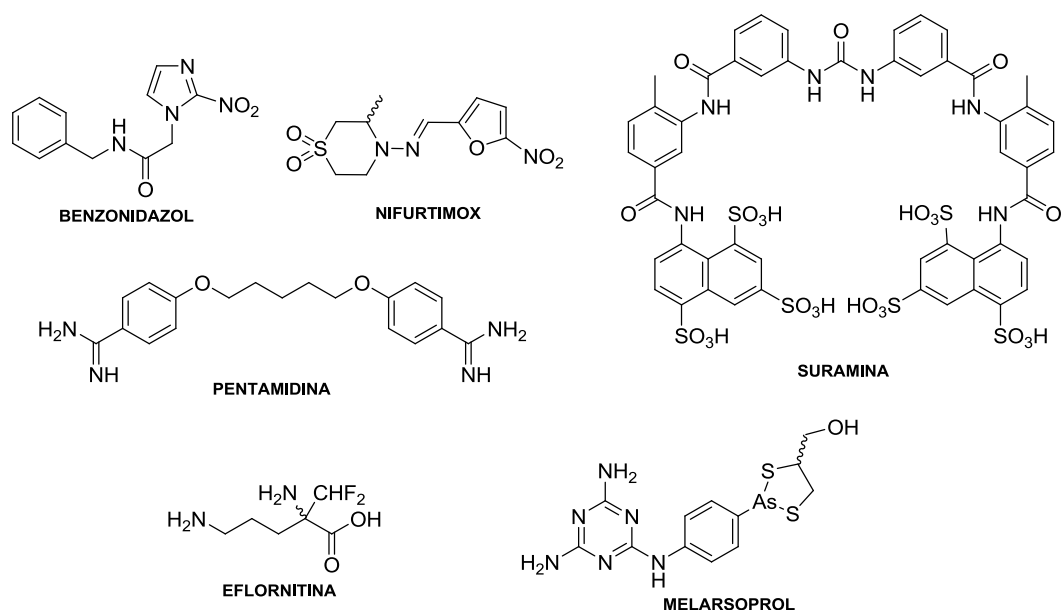
Duas são as subespécies responsáveis pela doença: *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*. O *T. b. gambiense* tem os humanos como principal reservatório, apesar dessa espécie também ser encontrada em animais. Já o *T. b. rhodesiense* é encontrado majoritariamente em animais selvagens. Os parasitas são ingeridos pelo vetor através do repasto sanguíneo em um animal infectado e multiplicam-se no trato digestório do inseto, passando pelos estágios tripomastigotas, epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. Este ciclo ocorre em, aproximadamente, três semanas. Em um posterior repasto sanguíneo, são inoculados tripomastigotas metacíclicos, que se multiplicam no sangue e tecidos extracelulares do hospedeiro (De Carli e Tasca, 2014).

A tripanossomíase africana evolui em duas fases. Na primeira, o parasita restringe-se ao sangue e ao sistema linfático. Esta fase geralmente caracteriza-se por febre crônica, cefaleia, prurido, lesões na pele, edema na face, podendo ocorrer também hepato ou esplenomegalia. Na segunda fase o parasita atinge o sistema nervoso central. Os sinais clínicos são neurológicos e endócrinos, com uma diversidade de sintomas e quadros clínicos. Ocorre uma desregulação do ritmo circadiano (ciclo dormir-acordar) além da fragmentação do sono. Os sintomas incluem confusão, tremor, movimentos anormais e distúrbios da fala, problemas psiquiátricos, e endócrinos (distúrbios da tireoide e função adrenocortical) (Malvy e Chappuis, 2011). Se não for tratada, a doença pode levar à morte. (Stich et al., 2002).

A farmacoterapia da doença de Chagas é deficiente (Clayton, 2010). Os fármacos disponíveis foram descobertos na década de 70 e apresentam elevada toxicidade (efeitos adversos como anorexia, excitação nervosa, náuseas, insônia, depressão, convulsões, vertigem e desequilíbrio, entre outros) além de baixa eficácia na fase

crônica da doença. São eles: benzonidazol (Rochagan®, Roche) e nifurtimox (Lampit®, Bayer) (Coura e Castro, 2002; Dias et al., 2009), sendo que o nifurtimox foi retirado do mercado, devido a sua elevada toxicidade, deixando o benzonidazol como a única alternativa terapêutica (**Figura 1.1**). Além disso, a resistência é um problema relevante. O caso da doença do sono africana é semelhante. Os fármacos disponíveis para o tratamento são a suramina (Germanin®, Bayer) e pentamidina (NebuPent®, Abraxis), utilizados na fase aguda, e eflornitina (Ornidyl®, Sanofi-Aventis) e melarsoprol (Arsobal®, SanofiAventis) para a fase crônica da doença (**Figura 1.1**), fármacos que também apresentam graves problemas de eficácia, toxicidade e resistência (Wilkinson e Kelly, 2009). Logo, é urgente o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento dessas enfermidades.

Figura 1.1 - Fármacos disponíveis para tratamento da doença de Chagas e tripanossomíase africana



A classe das cisteíno-proteases é alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos anti-tripanosomatídeos. Essas enzimas são importantes para a manutenção de algumas funções vitais dos parasitos, como, por exemplo, a nutrição e infecção de células. Pesquisas realizadas nas últimas décadas demonstram que o desenvolvimento de inibidores de cisteíno-proteases é uma alternativa promissora (Steverding, et al. 2006).

A enzima cruzaina é a principal cisteíno-protease de *T. cruzi*, expressa em todo o ciclo de vida do parasito (Sajid, et al., 2011). A elucidação da sua estrutura cristalográfica revelou que a cruzaina é constituída por 215 resíduos de aminoácidos que formam dois domínios e, entre eles, encontra-se a tríade catalítica composta pelos aminoácidos Cys25, His162 e Asn182 (Eakin et al., 1995). Esta elucidação também estimulou o desenvolvimento de algumas classes de inibidores (Bryant et al., 2009; Brak et al., 2010; Mott et al., 2010). Entre os primeiros inibidores descritos, destaca-se a vinilssulfona K777 (**Figura 1.3**, pg. 16), que foi muito importante na validação da cruzaina como alvo molecular para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas, já que se mostrou eficaz contra diversas culturas celulares de parasitas (Harth et al., 1993) e modelos animais da doença (Barr et al., 2005). Outras enzimas da mesma classe também foram estudadas. A principal cisteíno-protease de *T. brucei* é a enzima rodesaina (**Figura 1.2**), enzima que tem uma importante homologia com a cruzaina em termos de estrutura primária (cerca de 70%), e apresenta seu sítio ativo composto basicamente pelos mesmos resíduos de aminoácidos da cruzaina, dispostos com relação espacial muito semelhante. Como consequência, geralmente os inibidores de cruzaina podem ser capazes de inibir a rodesaina (Bryant et al., 2009; Mott et al., 2010).

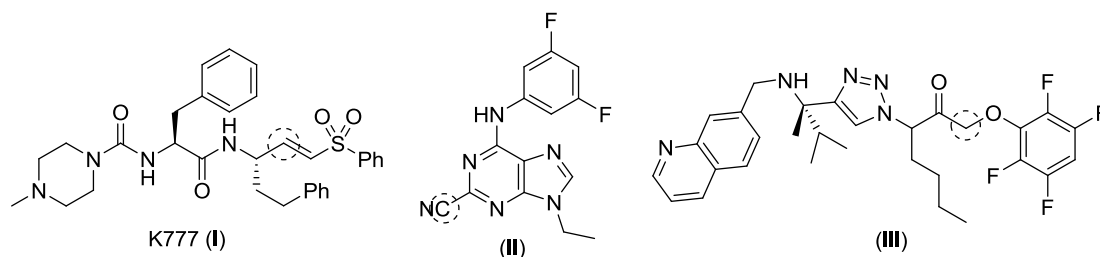
Figura 1.2 – Alinhamento das estruturas cristalográficas de cruzaina (verde; PDB 3KKU) e rodesaina (magenta; PDB 2P7U).



Já foram identificados alguns inibidores dessas enzimas (Bryant et al., 2009; Brak et al., 2010). Entre eles, destacam-se as classes: vinilsulfonas, fluorometilcetonas, triazóis, pirimidinas, tiossemicarbonas, chalconas e benzimidazóis (Leite, 2013). Engel e colaboradores realizaram um estudo em modelo animal tratando ratos infectados com *T.*

cruzi com derivados de fluormetil-cetona. Ao final dos experimentos, cinco dos seis ratos apresentaram hemocultura negativa. (Engel et al., 1998). A grande maioria de inibidores são covalentes (**Figura 1.3**) que contém centros eletrofílicos que reagem com o enxofre do resíduo de Cys25, o que não é favorável por interagirem com biomoléculas que contém centros nucleofílicos (um exemplo é o DNA), causando toxicidade inesperada. Apesar desta possibilidade, poucos são os estudos de toxicidade disponíveis para os inibidores covalentes destas enzimas. Um estudo demonstrou que a classe das arilnitrilas, inibidoras covalentes de rodesaína, apresentou toxicidade relevante para mioblastos murinos (células normais), na faixa de micromolar (Ehmke et al., 2012). É preferível, na prática, a identificação de inibidores não covalentes, evitando-se assim, a inibição de alvos indesejados (Bachovchin e Cravatt, 2012).

Figura 1.3 – Exemplos de inibidores covalentes da cruzaina. O carbono eletrofílico foi assinalado.

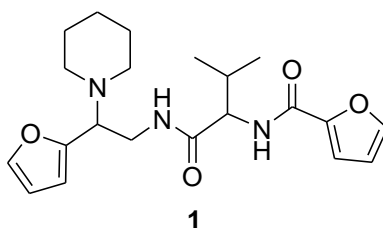


No processo de desenvolvimento de fármacos, após a escolha de um alvo adequado, deve-se identificar um protótipo. Antigamente esse processo era realizado através de triagens experimentais em pequena escala (Overington et al., 2006). Atualmente é possível realizar triagens em larga escala, processo conhecido como HTS (*High Throughput Screening*) (Mayr e Bojanic, 2009). Com uma biblioteca de quase 200 mil substâncias, foi realizado um estudo de HTS por colaboradores desse trabalho (Ferreira et al., 2010). Através deste estudo, identificou-se um bom protótipo de inibidor das enzimas em questão: o composto difurânico peptídeo-mimético **1** (**Figura 1.4**, pg. 17). O perfil farmacocinético e farmacodinâmico dos candidatos a fármacos deve ser levado em consideração na identificação de um bom protótipo. Quanto ao perfil farmacocinético, é interessante a seleção de substâncias que tenham um bom potencial de absorção por via oral, já que essa via proporciona melhor adesão do paciente por ser

de fácil administração. Lipinski e colaboradores realizaram um estudo que demonstrou que os fármacos bem absorvidos por via oral, geralmente, apresentam massa molar inferior a 500 g/mol, $\log P < 5$ e não mais que cinco grupos doadores e dez grupos aceptores de ligação de hidrogênio (Lipinsky, 2004). É preferível que a substância escolhida como protótipo não apresente valores próximos desse limite, já que durante o processo de otimização da atividade biológica esses valores podem aumentar para as substâncias derivadas (Oprea et al., 2001). Quanto ao perfil farmacodinâmico, são preferíveis substâncias que apresentam maior potência, geralmente com valores de inibição entre 1-30 micromolar ou inferiores (Keseru e Makara, 2006).

Figura 1.4 - Estrutura do composto difurânico

peptídeo-mimético. M.M = 387 g/mol; $K_i = 6 \mu\text{M}$; ClogP = 2,93



O composto difurânico peptídeo-mimético **1** foi obtido como uma mistura de quatro estereoisômeros, sendo importante a obtenção de cada um destes na forma pura, a fim de identificar o mais potente. No entanto, a rota sintética para obtenção dos quatro estereoisômeros deste protótipo é extremamente complexa. Portanto, neste trabalho propõe-se a síntese de análogos mais simples do composto difurânico peptídeo-mimético **1**, utilizando aminas comerciais, gerando compostos com apenas um centro quiral e, portanto, apenas dois estereoisômeros possíveis, facilitando a obtenção de uma quimioteca com boa diversidade estrutural para a identificação de um novo candidato a fármaco.

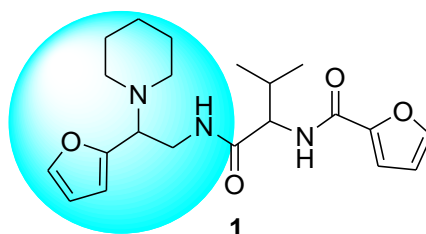
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Sintetizar análogos de **1** e avaliar a atividade inibitória dos mesmos frente às enzimas cruzafina e rodesafina.

2.2 Objetivos específicos

A) Sintetizar análogos de **1** por simplificação molecular através da variação do resíduo de amina.

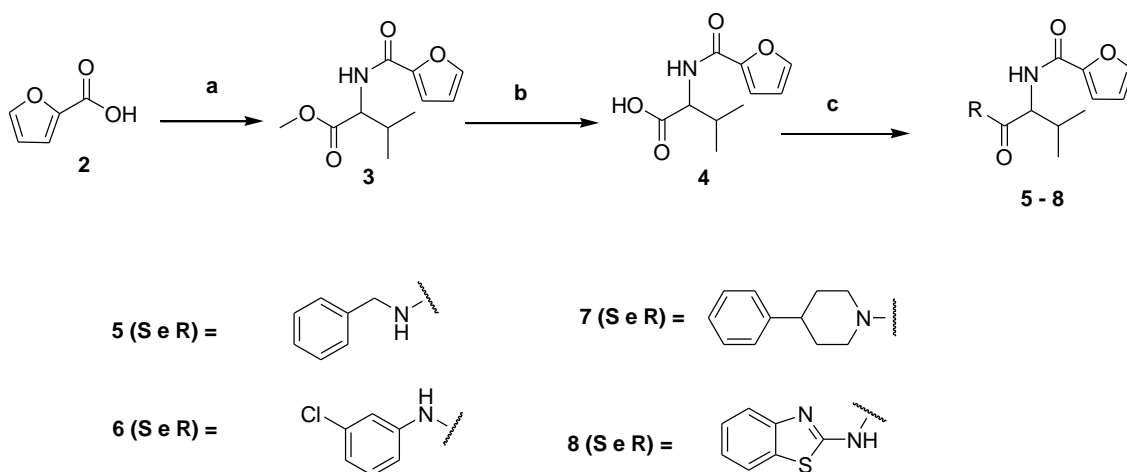


B) Avaliar a atividade inibitória dos análogos contra cruzafina e rodesafina através do método fluorimétrico, em parceria com a equipe da professora Rafaela Salgado Ferreira (ICB-UFMG).

3 PLANO DE SÍNTESE

A síntese dos análogos do composto **1** foi planejada a partir do ácido 2-furoico **2** e cloridrato do éster metílico da L ou D-valina, conforme mostra a **Figura 3.1**.

Figura 3.1 – Esquema geral de síntese de análogos do composto **1**.



Reagentes, condições e rendimentos: a) cloridrato do éster metílico da L ou D-valina, EDC, DMAP, DIPEA, THF anidro, 60 °C, 2 h, 76%; b) KOH, H₂O, THF, t. a., overnight, 98%; c) Amina apropriada, EDC, DMAP, THF anidro, overnight, 32, 27, 24, 32, 39, 28, 45 e 59% respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese dos análogos de 1

Inicialmente, a síntese do composto **3** foi planejada a partir do cloridrato do éster metílico da L ou D-valina (**Figura 4.1**), que foi desprotonado pela base DIPEA conforme ilustrado na **Figura 4.2**. Os ésteres metílicos dos aminoácidos, geralmente, são disponíveis na forma de cloridrato, pois contém um nitrogênio nucleofílico que pode atacar o éster caso não esteja protonado, por isso foi necessária a adição de DIPEA.

Figura 4.1 – Síntese do composto 3.

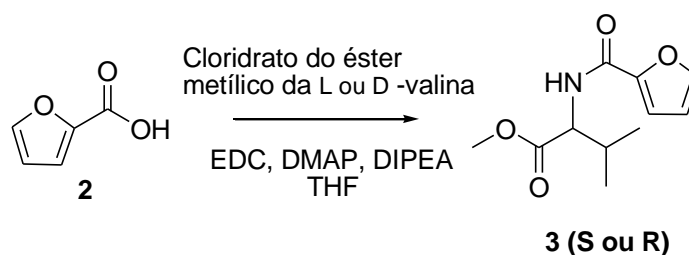
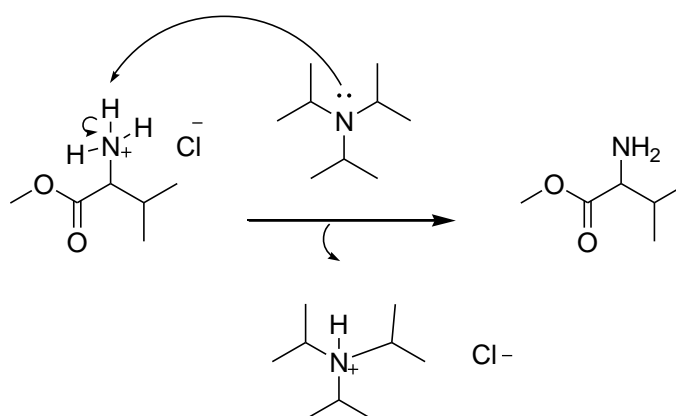


Figura 4.2 – Desprotonação do cloridrato

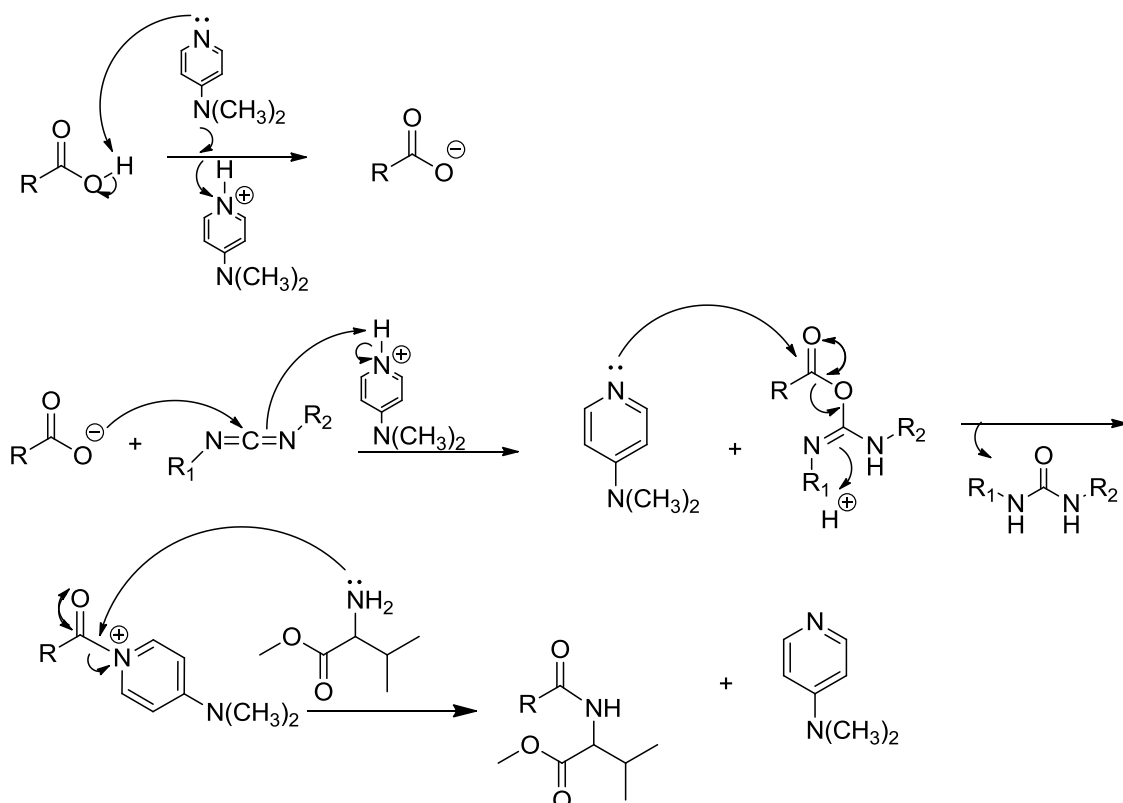
do éster metílico da L ou D-valina pelo DIPEA.



A reação do éster metílico da L ou D-valina com o ácido 2-furoico **2**, utilizando EDC e DMAP (Andrade et al., 2012), forneceu **3** com rendimento médio de 79%. O

mecanismo associado a esta transformação está representado na **Figura 4.3**. No espectro no Infravermelho (IV) de **3** (**Figura A.1**, p. 37) foram observadas bandas de estiramento de C=O de éster em 1732 cm^{-1} , C=O de amida em 1650 cm^{-1} e N-H em 3344 cm^{-1} .

Figura 4.3 – Proposta de mecanismo para a formação do composto **3**.



Após a formação da ligação amídica, o éster metílico do composto **3** foi hidrolisado em meio básico. Para tal, este foi tratado com KOH em água destilada e THF (Chambers et al., 2005). O mecanismo associado a esta transformação está descrito na **Figura 4.5**, p. 22. O composto **4** foi obtido com rendimento bruto médio de 98%.

Figura 4.4 – Obtenção do composto 4.

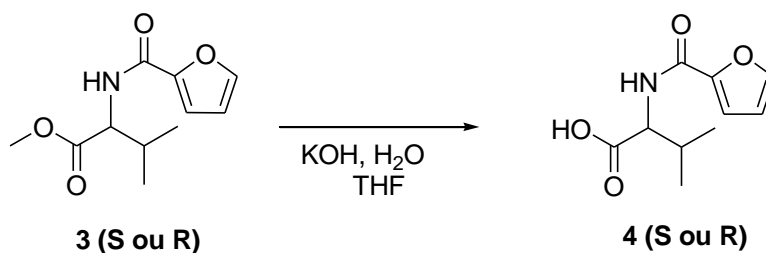
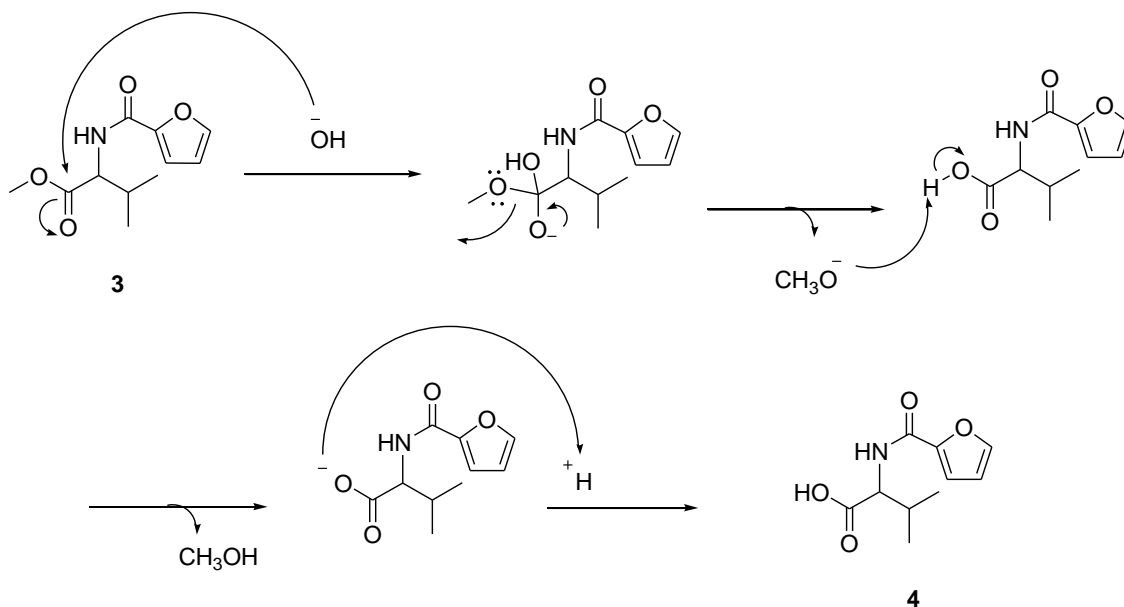


Figura 4.5 – Proposta de mecanismo para a formação do composto 4.



O composto **4** foi utilizado na etapa seguinte sem purificação. No espectro no IV de **4** (**Figura A.4**, p. 40) foram observadas bandas de estiramento de C=O de ácido carboxílico em 1722 cm^{-1} e O-H de ácido carboxílico (banda com centro de gravidade próximo a 3000 cm^{-1}). Os compostos **3S** e **4S** apresentam espectros de RMN de ^1H e ^{13}C semelhantes, sendo possível verificar a eficiência de reação de hidrólise, uma vez que os espectros diferem em relação à presença de H-8 ($3,65\text{ ppm}$) e C-8 do éster ($51,74\text{ ppm}$), respectivamente (**Figuras A.2**, p.38 e **A.3**, p. 39).

Finalmente, os compostos **4S** ou **4R** foram acoplados a benzilamina, 3-cloroanilina, 4-fenilpiperidina ou 2-aminobenzotiazol utilizando EDC, DMAP em THF (Andrade et al., 2012) levando à formação dos compostos **5S**, **5R**, **6S**, **6R**, **7S**, **7R**, **8S**, **8R**, com

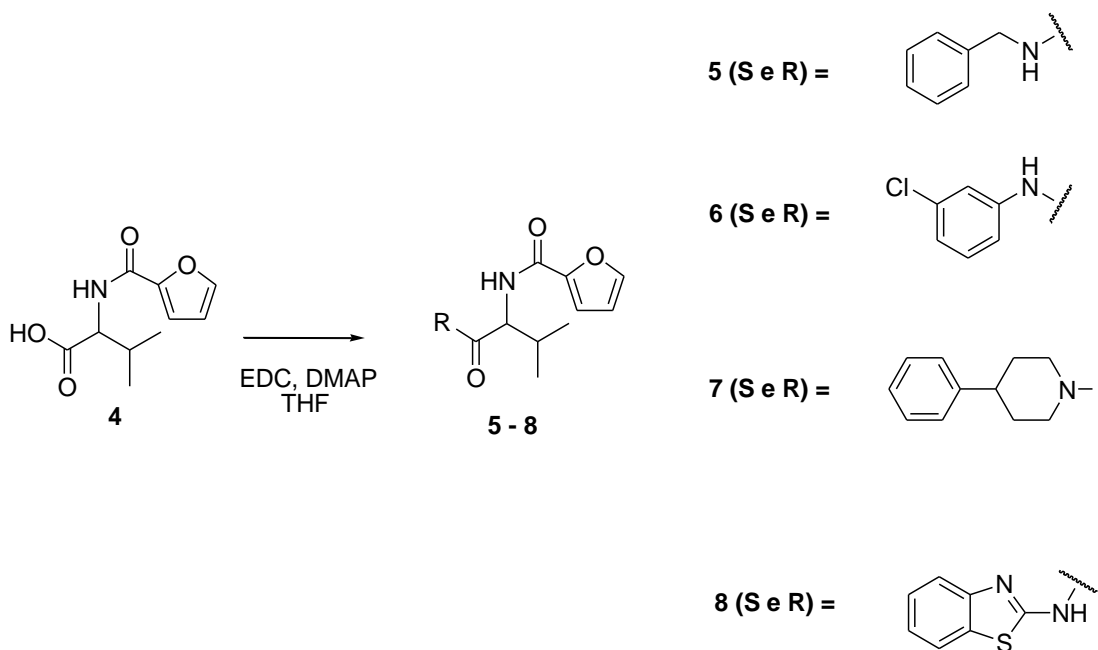
rendimento de 32, 27, 24, 32, 39, 28, 45 e 59% respectivamente. Estes compostos foram purificados em coluna de sílica (CCS) ou coluna de sílica flash (CCSF) obtendo-se alto grau de pureza.

A substância de maior atividade, **8R**, foi caracterizada. No espectro no IV de **8R** (**Figura A. 7**, p. 43) foram observadas bandas de estiramento de N-H em 3196 cm^{-1} e C=O de amida em 1691 e 1633 cm^{-1} .

De uma maneira geral, nos espectros de RMN de ^1H das substâncias **3S** (**Figura A.2**, p. 38), **4S** (**Figura A.5**, p. 41) e **8R** (**Figura A.8**, p. 44), os sinais relativos ao H-N são detectados como duplete em torno de 8,25 ppm. H-3, H-2, H-1 são detectados como dupletos duplos em torno de 6,00 a 8,00 ppm. Os sinais de H-5 são detectados em torno de 4,25 ppm. No caso dos compostos **3S** e **8R**, H-5 foi detectado como triplete (acoplamento com H-N e H-6); no caso do composto **4S**, H-5 foi detectado como um duplete duplo, pois a constante de acoplamento $J_{5, \text{H-N}}$ foi levemente diferente de $J_{5, 6}$, já que se trata de um acoplamento com um heteroátomo. Já os sinais relativos ao H-6 são detectados como um multiplete em 2,20 ppm, aproximadamente. H-7 e H-7' são detectados como dois dupletos ou um multiplete em 1,00 ppm, aproximadamente.

Nos espectros de RMN de ^{13}C das substâncias **3S** (**Figura A.3**, p. 39), **4S** (**Figura A.6**, p. 42) e **8R** (**Figura A.9**, p. 45), observam-se sinais relativos às carbonilas (~ 171 e 158 ppm), C-4 (~ 147 ppm), C-1 (~ 145 ppm), C-3 (~ 114 ppm), C-2 (~ 112 ppm), C-5 (~ 58 ppm), C-6 (~ 30 ppm) e C-7 (~ 19 ppm). Os sinais referentes aos carbonos e hidrogênios do resíduo de amina, dependem da natureza da amina e foram atribuídos adequadamente conforme observado na parte experimental deste trabalho.

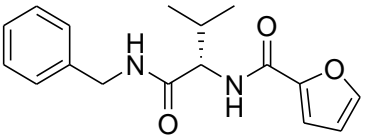
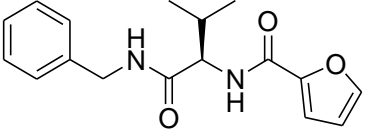
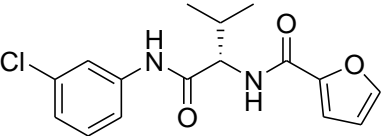
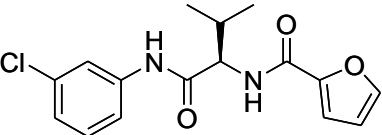
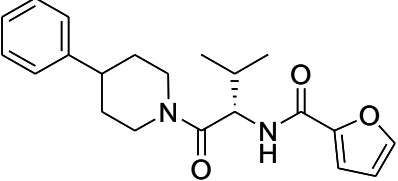
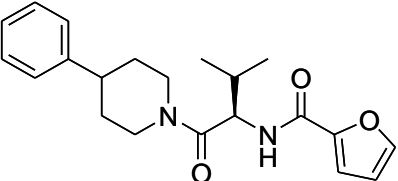
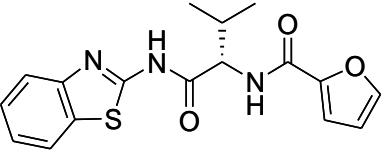
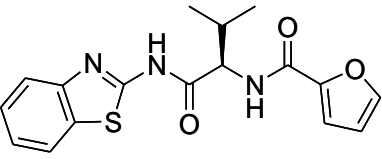
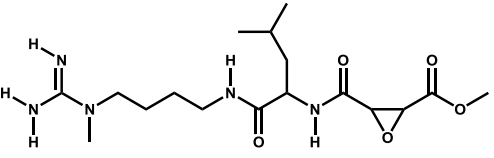
Figura 4.6 – Obtenção dos compostos 5 ao 8



4.2 Avaliação biológica das substâncias 5-8

Este experimento foi realizado no Departamento de Bioquímica da UFMG em parceria com a Profa. Rafaela Salgado Ferreira. A **Tabela 4.1** (p.25) apresenta a porcentagem de inibição de cada substância frente às enzimas alvo. O inibidor E64 foi utilizado como controle positivo a uma concentração de 100 nM. Os valores correspondem à média de seis medidas, a partir de dois experimentos independentes, cada um em triplicata. Os compostos **7S** e **7R** não foram testados porque não foram solúveis em DMSO.

Tabela 4.1 – Porcentagem de inibição dos compostos para cada enzima. NA = Não avaliado.

Composto	Estrutura	% Inibição de Cruzaína 100µM	% Inibição de Rodesaína 100µM
5S		7,5 ± 0,5	39 ± 3,0
5R		16,4 ± 3,1	52,3 ± 1,3
6S		15,3 ± 0,8	35,9 ± 0,9
6R		12,5 ± 0,34	29,3 ± 1,5
7S		NA	NA
7R		NA	NA
8S		28,3 ± 2,0	46,0 ± 1,0
8R		32,3 ± 1,1	59,9 ± 1,3
E64		100,0 ± 0,0	98,6 ± 0,6

Em relação às substâncias **5** e **8**, o isômero **R** foi melhor inibidor da cruzaina e da rodesaina que o isômero **S**, já para **6**, observa-se uma relação inversa. Comparando-se **5R** com **6R**, observa-se que a homologação da cadeia leva a um aumento da atividade sugerindo que o anel benzênico poderia estar posicionado adequadamente para interação com um bolso hidrofóbico em **5R**. Já **8R**, foi o composto mais potente desta série. Esta substância possui um sistema bicíclico fundido (benzotiazol). Isto indica que a introdução de um grupo volumoso nesta porção pode ser importante, provavelmente, porque o bolso hidrofóbico acomoda bem grupos volumosos. Esta substância de baixo peso molecular obtida em apenas três etapas foi capaz de inibir a rodesaina, em aproximadamente 60% a 100 μ m e, portanto, pode ser um bom protótipo para posteriores modificações.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Materiais e métodos gerais

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada de sílica (CCD) com 0,25 mm de espessura (Silicycle).

As purificações por cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/70-230 mesh Fluka).

As purificações por cromatografia em coluna de sílica flash (CCSF) foram realizadas com sílica gel 60 (0,040-0,063 mm/230-400 mesh Merck).

Os solventes para a realização da CCS e CCSF foram destilados e utilizados imediatamente.

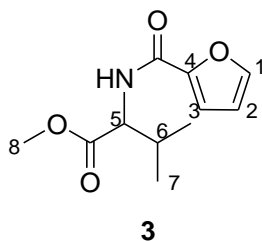
As faixas de fusão foram determinadas em aparelho Fisatom modelo 431 e não foram corrigidas (Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, FacFar, UFRGS).

Os espectros no infravermelho foram obtidos em aparelho Spectrum BX + UATR, PerkinElmer (Central Analítica II, FacFar, UFRGS).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrômetro Bruker 400 MHz (Instituto de Química, UFRGS) com colaboração do Professor Francisco Paulo dos Santos. Como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano (TMS). O programa MestReNova foi utilizado para processar os espectros.

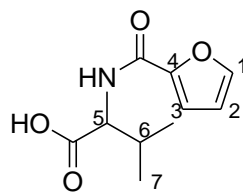
5.2 Obtenção dos compostos 3 – 8.

5.2.1 Éster metílico de *N*-(2-furanilcarbonil)-valina (3).



A uma solução do ácido 2-furoico **2** (1,74 g, 0,0155 mol) em THF anidro (22 mL), foram adicionados cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodimida (EDC, 3,65 g, 0,01904 mol), dimetilaminopiridina (DMAP, 0,189 g, 0,00155 mol), cloridrato do éster metílico da L ou D-valina (2,00 g, 0,0119 mol) e *N,N*- diisopropiletilamina (DIPEA, 5,2 mL, 0,02975 mol). A mistura foi mantida sob agitação a 60°C por duas horas. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (Hexano/EtOAc/Ácido acético 5:5:0,5, UV). À suspensão resultante adicionou-se acetato de etila (240 mL) e ácido clorídrico 2 M (120 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução de bicarbonato de sódio 10% (p/v) (2 x 120 mL), água destilada (120 mL), secada com Na₂SO₄ e concentrada em evaporador rotatório. Foram obtidos 2,03 g (76% de rendimento bruto) de um sólido branco para o isômero **S** e 2,16 g (81% de rendimento bruto) de um sólido branco para o isômero **R**. O composto **3** foi obtido com um teor de pureza suficiente para ser utilizada na próxima etapa sem purificação: C₁₁H₁₅NO₄; 225 g/mol; IV(ν /cm⁻¹): 3343 (N-H), 1731 (C=O de éster), 1649 (C=O de amida); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8,41 (d, 1H, NH, $J_{\text{NH},5}$ = 8,0 Hz), 7,85 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 1,6 Hz, $J_{1,3}$ = 0,8 Hz), 7,25 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = 3,4 Hz; $J_{1,3}$ = 0,8 Hz), 6,63 (dd, 1H, H-2, $J_{2,3}$ = 3,4 Hz; $J_{1,2}$ = 1,6 Hz), 4,26 (t, 1H, H-5, $J_{5,6}$ = $J_{\text{NH},5}$ = 8,0 Hz), 3,65 (s, 3H, H-8), 2,17 (m, 1H, H-6), 0,937 (d, 3H, H-7, $J_{6,7}$ = 6,4 Hz), 0,905 (d, 3H, H-7', $J_{6,7'}$ = 6,8 Hz). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 171,99 (COOCH₃), 158,04 (C=O amida), 147,10 (C-4), 145,37 (C-1), 114,18 (C-3), 111,84 (C-2), 57,80 (C-5), 51,74 (C-8), 29,49 (C-6), 19,10 (C-7), 18,82 (C-7').

5.2.2 *N*-(2-furanilcarbonil)-valina (**4**)

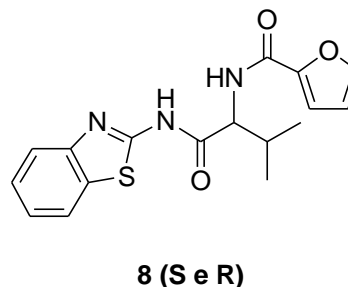
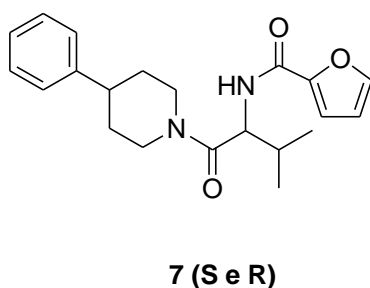
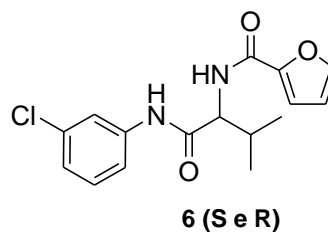
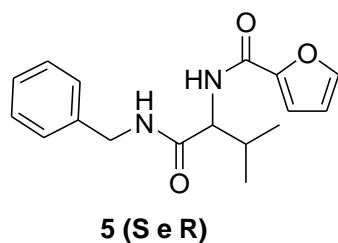


4

A uma solução de **3** (0,5002 g, 0,00222 mol) em THF (5 mL), adicionou-se, aos poucos, uma solução de hidróxido de potássio 0,5M. A mistura foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente, overnight. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (Hexano/EtOAc/Ácido acético 5:5:0,5, UV). À suspensão resultante adicionou-se

água destilada (25 mL) e acetato de etila (25 mL). A fase aquosa foi acidificada com a adição de uma solução de bissulfato de potássio 1M (3 mL) até pH 3. Extraíu-se com acetato de etila (2 x 25 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com água destilada (50 mL), secadas com Na₂SO₄ e concentradas em evaporador rotatório. Foram obtidos 0,4762 g (rendimento bruto de 96%) de uma cera levemente amarelada (isômero **S**). O rendimento bruto da reação para o isômero **R** foi de 100%. A substância foi obtida com um teor de pureza suficiente para ser utilizada na próxima etapa sem purificação: C₁₀H₁₃NO₄; 211 g/mol; IV (ν/cm^{-1}): centro de gravidade próximo a 3000 (O-H), 1722 (C=O); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8,14 (d, 1H, NH, $J_{\text{NH},5} = 8,4$ Hz), 7,84 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2} = 1,8$ Hz, $J_{1,3} = 0,8$ Hz), 7,25 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3} = 3,6$ Hz, $J_{1,3} = 0,8$ Hz), 6,23 (dd, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3,6$ Hz, $J_{1,2} = 1,8$ Hz), 4,25 (dd, 1H, H-5, $J_{\text{NH},5} = 8,4$ Hz, $J_{5,6} = 6,8$ Hz), 2,23-2,11 (m, 1H, H-6), 0,94-0,92 (m, 6H, H-7, H-7'); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 172,93 (COOH), 157,99 (C=O amida), 147,29 (C-4), 145,30 (C-1), 114,04 (C-3), 111,88 (C-2), 57,63 (C-5), 29,60 (C-6), 19,28 (C-7), 18,66 (C-7').

5.2.3 Obtenção dos compostos 5 ao 8



A uma solução de **4** (0,100 g, 0,000473 mol) em THF anidro (1,5 mL), foram adicionados cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodimida (EDC, 0,145 g, 0,000757 mol), dimetilaminopiridina (DMAP, 0,0075 g, 0,0000615 mol) e a amina

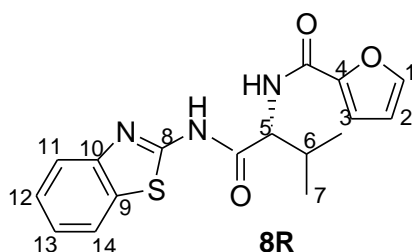
apropriada (0,00189 mol de benzilamina, 3-cloroanilina, 4-fenilpiperidina ou 2-aminobenzotiazol), observando-se a formação de um precipitado branco. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, overnight. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (Hexano/EtOAc/Ácido acético 6:4:0,5, UV, para o composto **5** e Hexano/EtOAc/Ácido acético 5:5:0,5, UV, para os compostos **6**, **7** e **8**). À suspensão resultante adicionou-se acetato de etila (20 mL) e ácido clorídrico 1 M (10 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (10 mL), com uma solução de bicarbonato de sódio 10% (p/v) (2 x 10 mL), água destilada (10 mL), secada com Na₂SO₄ e concentrada em evaporador rotatório.

Para a purificação dos compostos **5** ao **8** a eluição das substâncias em coluna de sílica (CCS) ou coluna de sílica flash (CCSF) forneceu o produto desejado com alto teor de pureza (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Sistema de cromatografia em coluna de sílica para purificação dos Compostos 5-8.

Composto	Sistema para purificação (coluna de sílica)
5 (S ou R)	CCS; hexano:EtOAc (75:25) e hexano:EtOAc (50:50)
6 (S ou R)	CCSF; hexano:EtOAc (80:20)
7 (S ou R)	CCS; hexano:EtOAc (55:45)
8 (S ou R)	CCS; hexano:EtOAc (60:40)

5.2.3.1 *N*-[(*R*)-2-metil-1-[2-(benzotiazolil(amino)carbonil)propil]-2-furanocarboxamida



$C_{17}H_{17}N_3O_3S$: 343 g/mol; F.F. 216-220°C; IV (ν/cm^{-1}): 3196 (N-H), 1633 e 1598 (C=O de amida); RMN de 1H (400 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,58 (s, 1H, NHbenzotiazol), 8,42 (d, 1H, H-N, $J_{NH,5} = 8,0$ Hz), 7,97 (d, 1H, H-11, $J_{11,12} = 7,6$ Hz), 7,87 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2} = 1,6$ Hz, $J_{1,3} = 0,8$ Hz), 7,75 (d, 1H, H-14, $J_{13,14} = 8,0$ Hz), 7,46-7,27 (m, 2H, H-12, H-13), 7,26 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3} = 3,6$ Hz, $J_{1,3} = 0,8$ Hz), 6,65 (dd, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3,6$ Hz, $J_{1,2} = 1,6$ Hz), 4,53 (t, 1H, H-5, $J_{NH,5} = J_{5,6} = 8,0$ Hz;), 2,28-2,19 (m, 1H, H-6), 0,99-0,94 (m, 6H, H-7 e H-7'); RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 171,40 (C=O NHbenzotiazol), 158,10, 157,53 (C=O, C-8), 148,54 (C-10), 147,10 (C-4), 145,46 (C-1), 131,48 (C-9), 126,21, 123,70, 121,76, 120,64 (C-11, C-12, C-13, C-14), 114,35 (C-3), 111,95 (C-2), 58,77 (C-5), 29,93 (C-6), 19,03 (C-7).

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram investigadas modificações no composto difurânico **1** por simplificação molecular, através do acoplamento do composto **4** (**S** ou **R**) a diferentes aminas, fornecendo oito substâncias inéditas. Comparando-se a atividades dos análogos sintetizados foi possível estabelecer uma provável relação estrutura- atividade. Quanto à estereoquímica, de uma maneira geral, as substâncias mais ativas foram as de configuração **R**. A homologação da cadeia ou adição de um segundo anel resultou em um aumento de atividade demonstrando que o bolso hidrofóbico poderia acomodar grupos volumosos. A substância **8R** apresentou atividade inibitória interessante frente às enzimas alvo, visto que foi capaz de inibir a rodesaína em, aproximadamente, 60% a 100 μ m. Considerando que este derivado é bem mais simples que o protótipo e que pode ser sintetizado em apenas três etapas, conclui-se que foi possível identificar um novo protótipo por simplificação molecular e este poderá ser modificado posteriormente para a obtenção de um novo candidato a fármaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S. F.; FIGUEIREDO, R. C.; SOUZA-FILHO, J. D.; ALVES, R. J. An efficient synthesis of D-galactose-based multivalent neoglycoconjugates. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, p. 1062-1069, 2012.

ANDREOLLO, N. A.; MALAFAIA, O. Os 100 anos da doença de Chagas no Brasil. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 22(4), p.189-91, 2009.

BACHOVCHIN, D. A.; CRAVATT, B. F. The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11, p. 52-68, 2012.

BARR, S. C.; WARNER, K. L.; KORNREIC, B. G.; PISCITELLI, J.; WOLFE, A.; BENET, L.; MCKERROW, J. H. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, p. 5160-1, 2005.

BRAK, K.; KERR, I. D.; BARRETT, K. T.; FUCHI, N.; DEBNATH, M.; ANG, K.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; DOYLE, P. S.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, p. 1763-1773, 2010.

BRYANT, C.; KERR, I. D.; DEBNATH, M.; ANG, K. K.; RATNAM, J.; FERREIRA, R. S.; JAISHANKAR, P.; ZHAO, D.; ARKIN, M. R.; MCKERROW, J. H.; BRINEN, L. S.; RENSLO, A. R. Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, p. 6218-6221, 2009.

CHAMBERS, D. J.; EVANS, G. R.; FAIRBANKS, A. J. Synthesis of C-glycosyl amino acids: scope and limitations of the tandem Tebbe/Claisen approach. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, p. 45-55, 2005.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature*, 465, p. S12-S15, 2010.

COURA, J.R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R.; PEREIRA, J. B. Chagas disease. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), p. 641- 645, 2011.

COURA, J. R.; PEREIRA, J. B. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(3), p. 286-296, 2012.

COSTA, M.; TAVARES, V. R.; AQUINO, M. V. M.; MOREIRA, D.B. Doença de Chagas: uma revisão bibliográfica. 2013. Disponível em: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/PC/Meus%20documentos/Downloads/42-142-1-PB%20(2).pdf>. Acesso: 07/08/2015, 9 horas e 25 minutos.

DE CARLI, G. A.; TASCA. T. *Atlas de Diagnóstico em Parasitologia Humana*. 1ª Edição. Editora Atheneu, p. 52-53, 2014.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Chemotherapy of Chagas disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Química Nova*, 32, p. 2444-2457, 2009.

EAKIN, A. E.; MCGRATH, M. E.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *Journal of Molecular Biology*, 247, p. 251-259, 1995.

EHMKE, V.; QUINSAAT, J. E.; RIVERA-FUENTES, P.; HEINDL, C.; FREYMOND, C.; ROTTMANN, M.; BRUN, R.; SCHIRMEISTER, T.; DIEDERICH, F. Tuning and predicting biological affinity: aryl nitriles as cysteine protease inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10, p. 5764-5768, 2012.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 188, p. 725-734, 1998.

FERREIRA, R. S.; SIMEONOV, A.; JADHAV, A.; EIDAM, O.; MOTT, B. T.; KEISER, M. J.; MCKERROW, J. H.; MALONEY, D. J.; IRWIN, J. J.; SHOICHET, B.

K. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, p. 4891-4905, 2010.

GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *TRENDS in Parasitology*, 19(1), p. 19- 22, 2003.

HARTH, G.; ANDREWS, N.; MILLS, A. A.; ENGEL, J. C.; SMITH, R.; MCKERROW, J. H. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58, p. 17-24, 1993.

JR, R. A.; RASSI, A; NETO, J. A. M. Chagas disease. *The lancet*, 375, p. 1388-1402, 2010.

KESERU, G. M.; MAKARA, G. M. Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discovery Today*, 11, p. 741-748, 2006.

LEITE, M. Triagem e seleção de inibidores da enzima cruzaina do parasita *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física aplicada Biomolecular), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today Technologies*, 1, p. 337-341, 2004.

MALVY, D.; CHAPPUIS, F. Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), p. 986-995, 2011.

MAYR, L.M.; BOJANIC, D. Novel trends in high-throughput screening. *Current Opinion in Pharmacology*, 9, p. 580-588, 2009.

MOTT, B. T.; FERREIRA, R. S.; SIMEONOV, A.; JADHAV, A.; ANG, K. K. H.; LEISTER, W.; SHEN, M.; SILVEIRA, J. T.; DOYLE, P. S.; ARKIN, M. R.; MCKERROW, J. H.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; THOMAS, C. J.; SHOICHET, B. K.; MALONEY, D. J. Identification and optimization of inhibitors of trypanosomal cysteine proteases: cruzain, rhodesain and TbCatB. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, p. 52-60, 2010.

OPREA, T. I.; DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J.; LEESON, P. D. Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41, p. 1308-1315, 2001.

OVERINGTON, J. P.; AL-LAZIKANI, B.; HOPKINS, A. L. Opinion - how many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, p. 993-996, 2006.

PEREIRA, L. S.; FREITAS, E. C.; FIDALGO, A. S. O. B. V.; ANDRADE, M. C.; CÂNDIDO, D. S.; FILHO, J. D. S.; MICHAJLOWSKY, V.; OLIVEIRA, M. F.; QUEIROZ, J. A. N. Clinical and epidemiological profile of elderly patients with Chagas Disease followed between 2005-2013 by pharmaceutical care service in Ceará State, northeastern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57 (2), p. 145-152, 2015.

SAJID, M.; ROBERTSON, S. A.; BRINEN, S. A.; MCKERROW, J. H. CRUZAIN. The Path from Target Validation to the Clinic. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 712, p. 100-115, 2011. In: ROBINSON, M. W.; DALTON, J. P. (Ed) Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms. Capítulo 7.

SILVA, E. M.; ROCHA, M. O. C.; SILVA, R. C.; PAIXÃO, G. C.; Buzzati, H.; Santos, A. N.; Nunes, M. C. P. Estudo clínico-epidemiológico da doença de Chagas no distrito de Serra Azul, Mateus Leme, centro-oeste do Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(2), p. 178-181, 2010.

STEVERDING, D.; CAFFREY, C. R.; SAJID, M. Cysteine protein inhibitors as therapy for parasitic diseases: Advances in inhibitor design. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 6, p. 1025-1032, 2006.

STICH, A.; ABEL, P. M.; KRISHNA, S. Human African trypanosomiasis. *British Medical Journal*, 325(7357), p. 203-206, 2002.

WESTPHALEN, E. V. N.; BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L. A. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. *BEPA*, 9 (105), p. 17-34, 2012.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, p. 1-24, 2009.

7 APÊNDICE

Figura A.1 - Espectro no infravermelho de 3S.

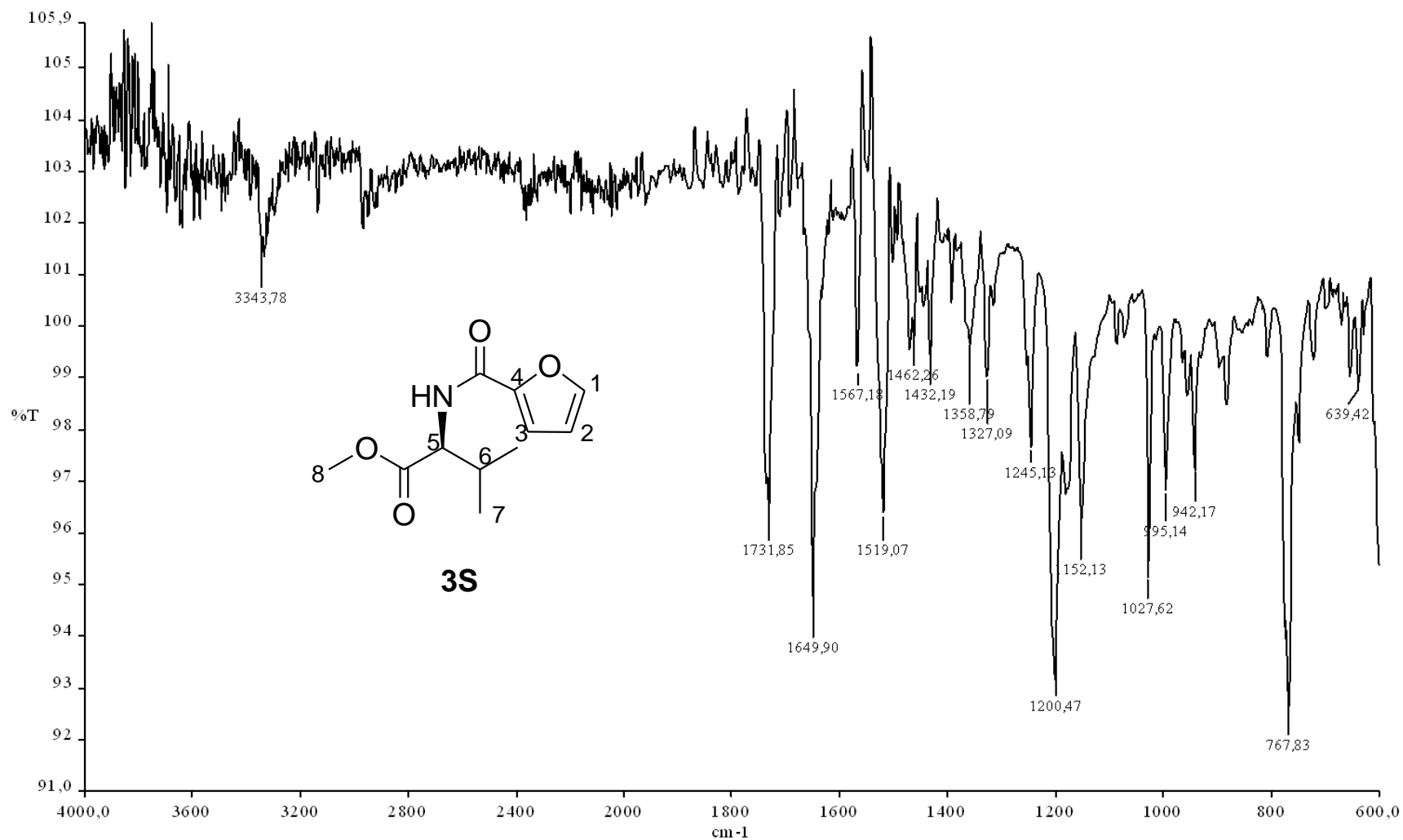


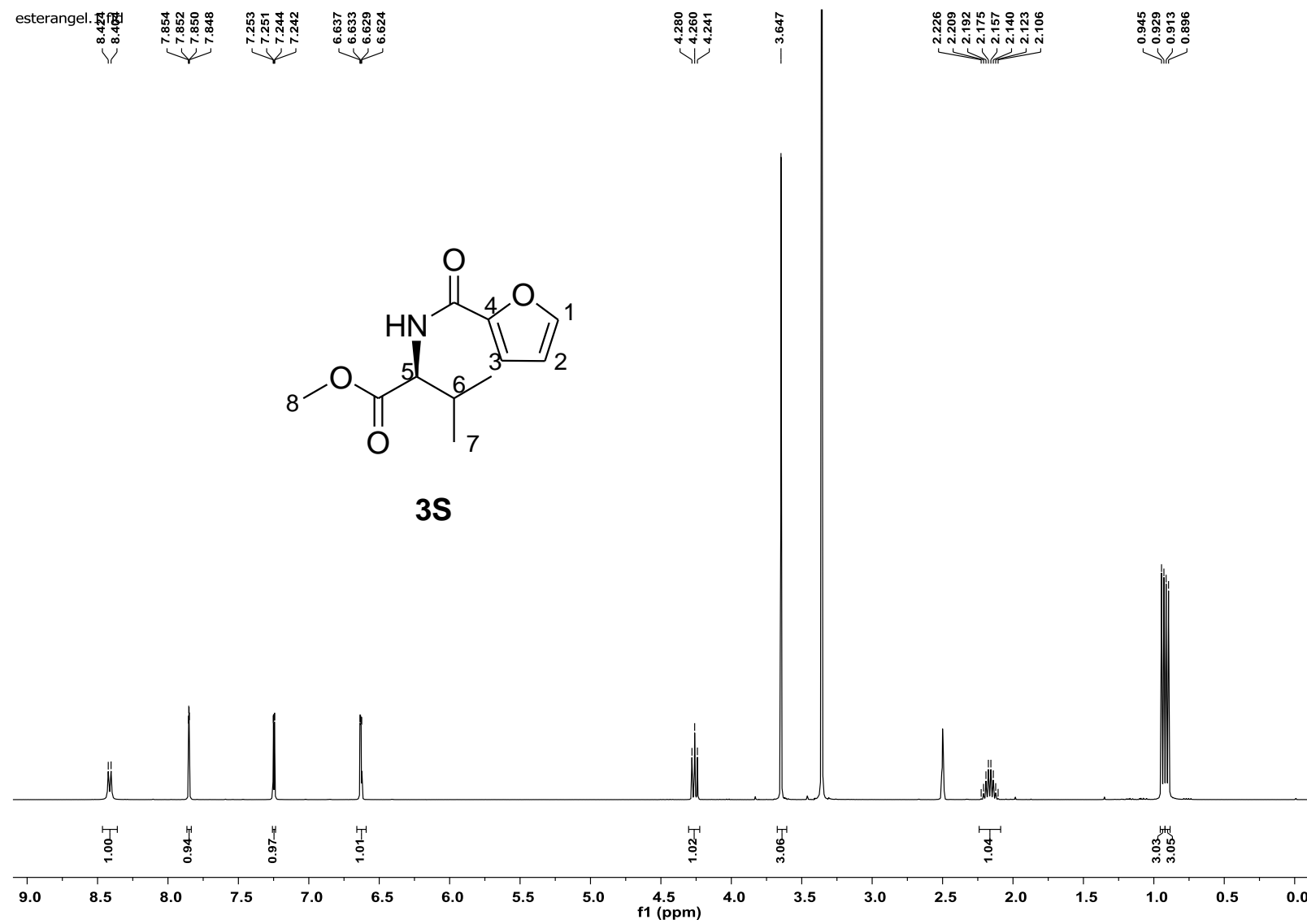
Figura A.2 - Espectro de RMN de ^1H de 3S (400 MHz, DMSO- d_6).

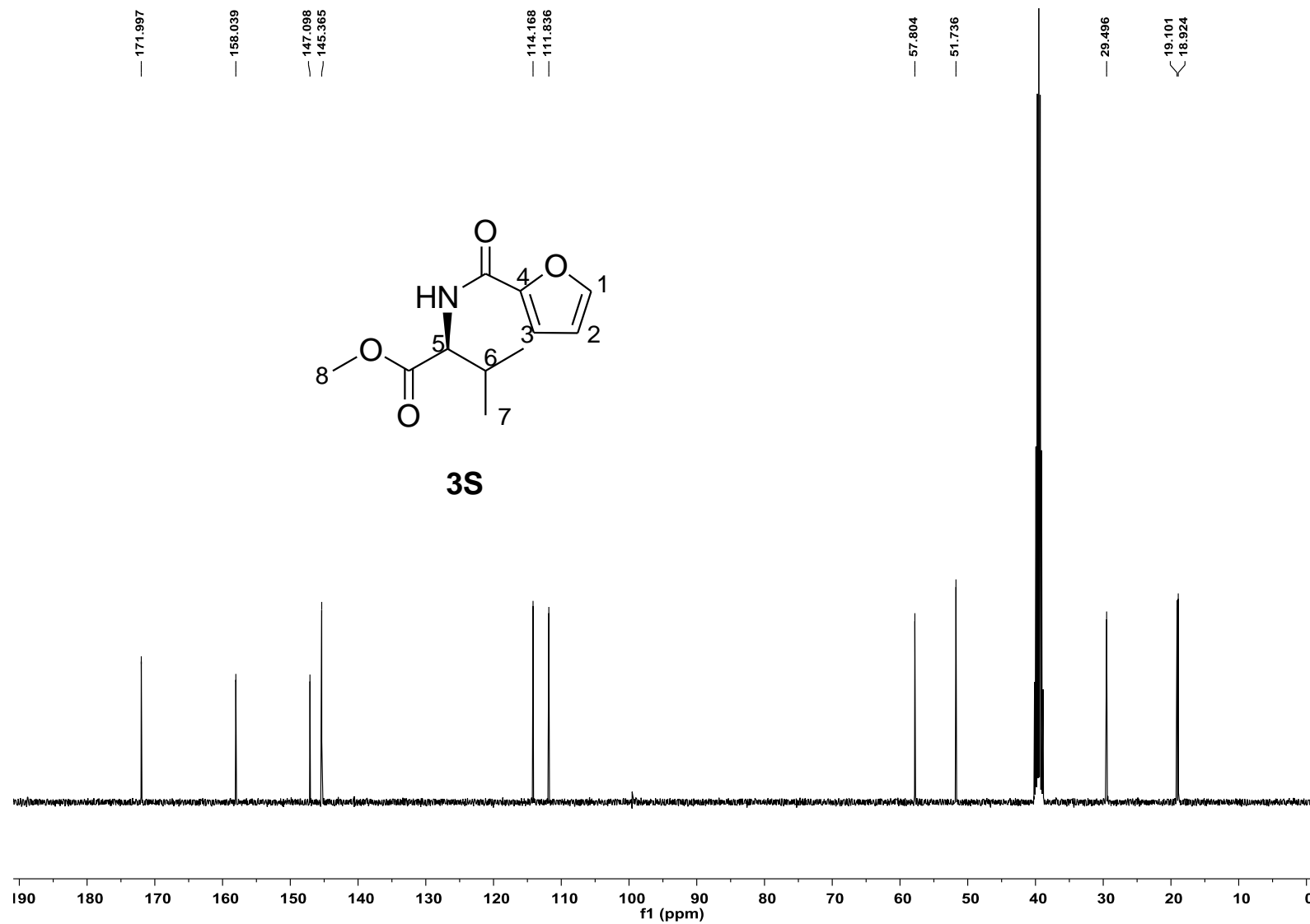
Figura A.3 - Espectro de RMN de ^{13}C de 3S (100 MHz, DMSO- d_6).

Figura A.4 - Espectro no infravermelho de 4S.

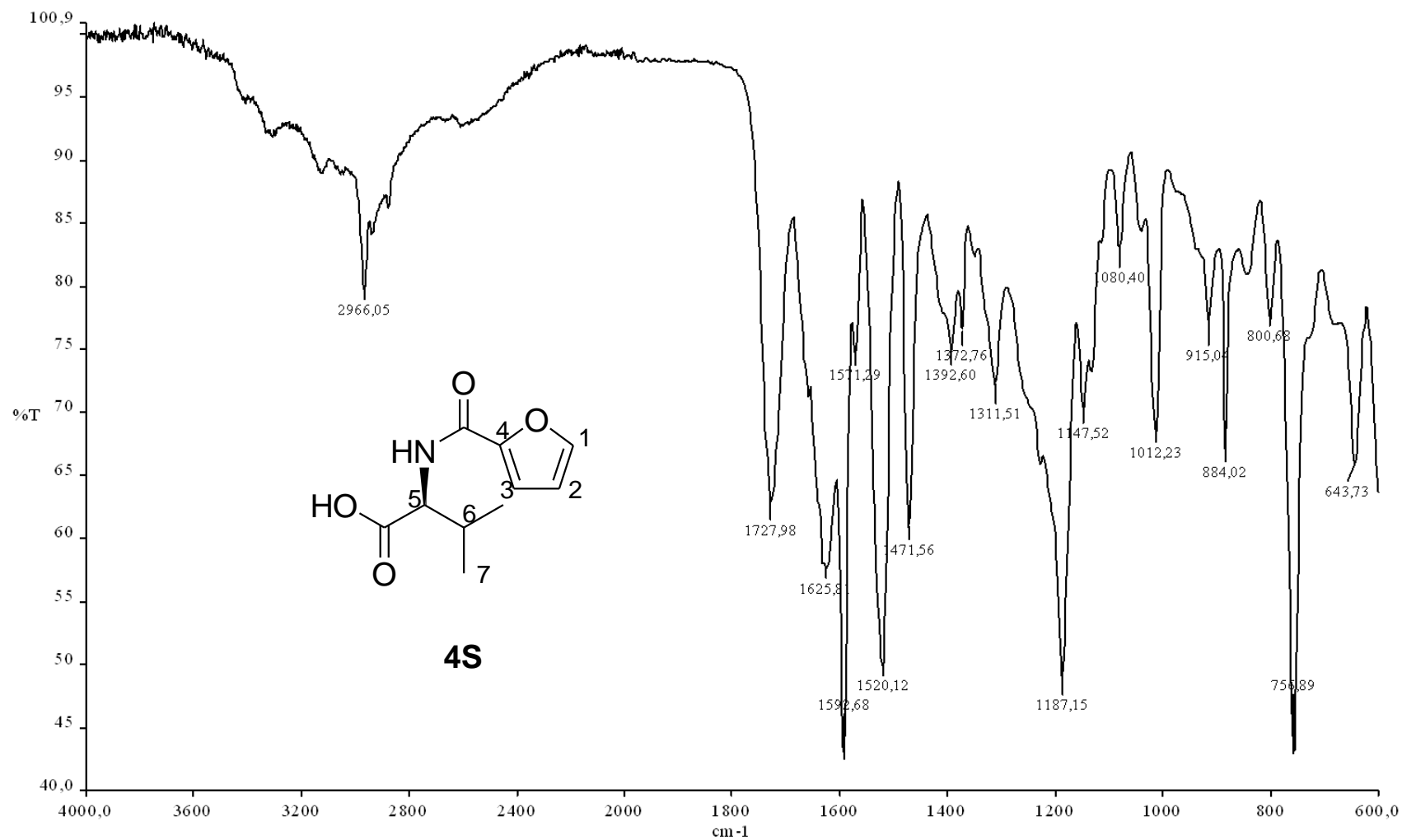


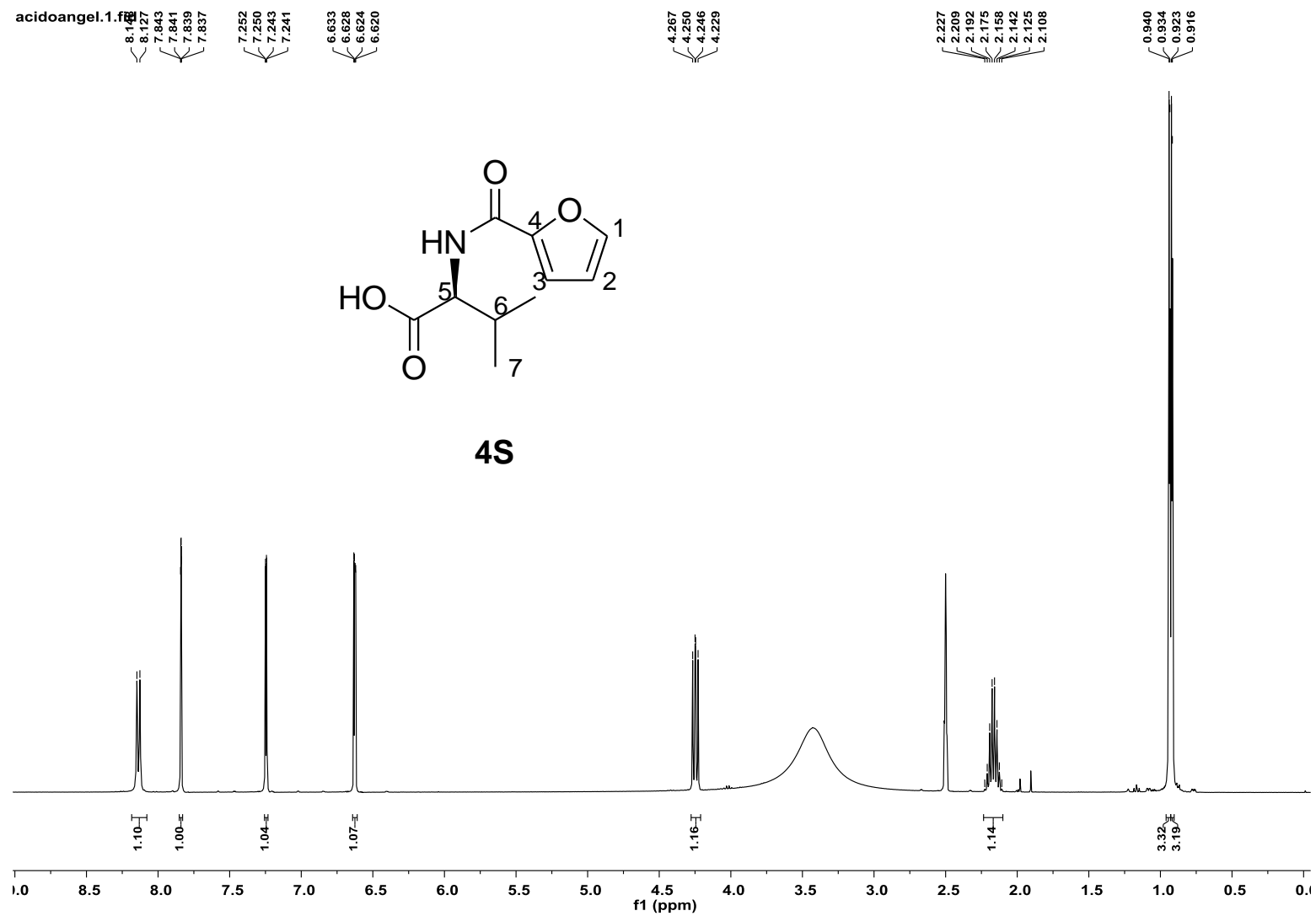
Figura A.5 - Espectro de RMN de ^1H de 4S (400 MHz, DMSO- d_6).

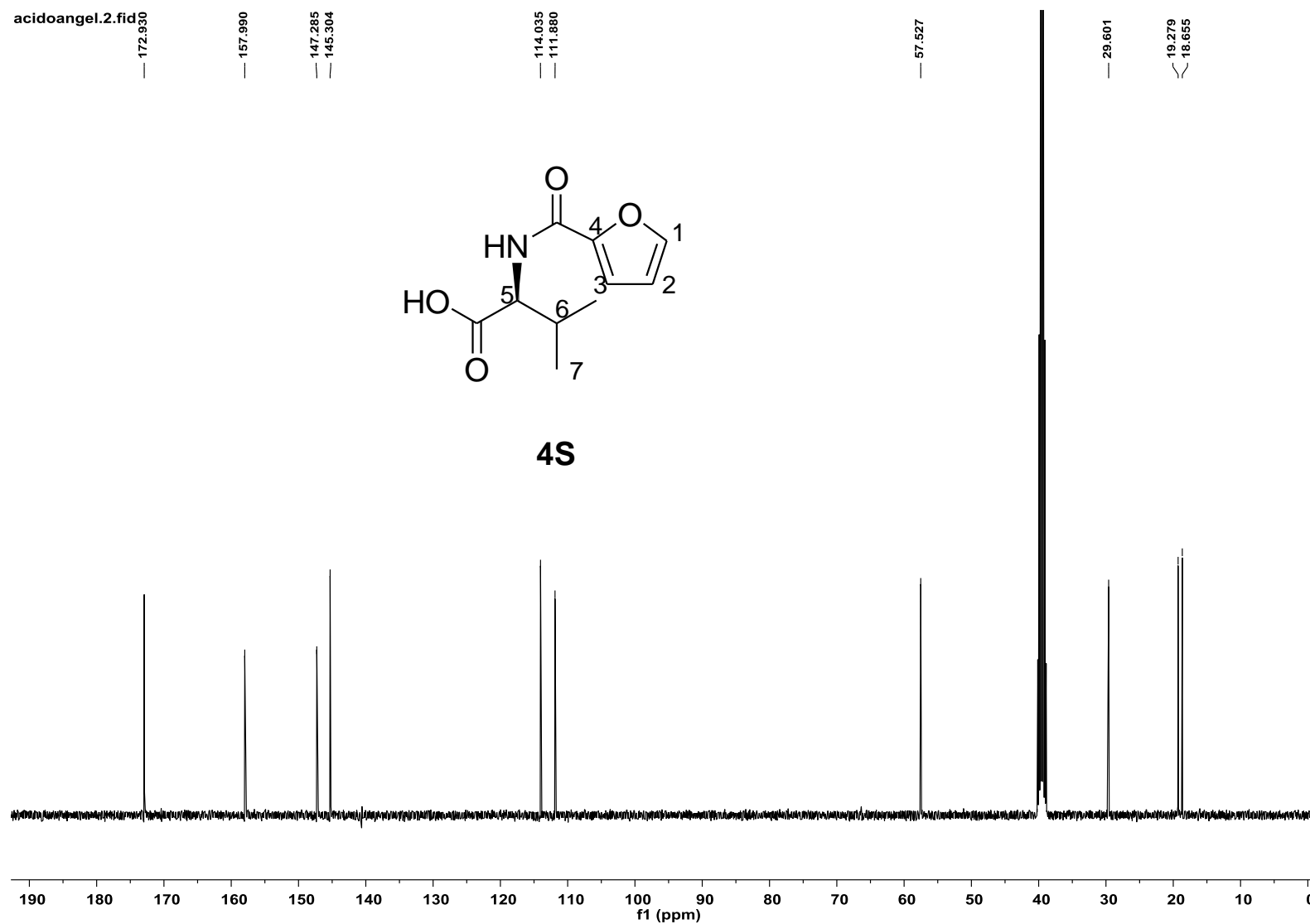
Figura A.6 - Espectro de RMN de ^{13}C de 4S (100 MHz, DMSO- d_6).

Figura A.7 - Espectro no infravermelho de 8R

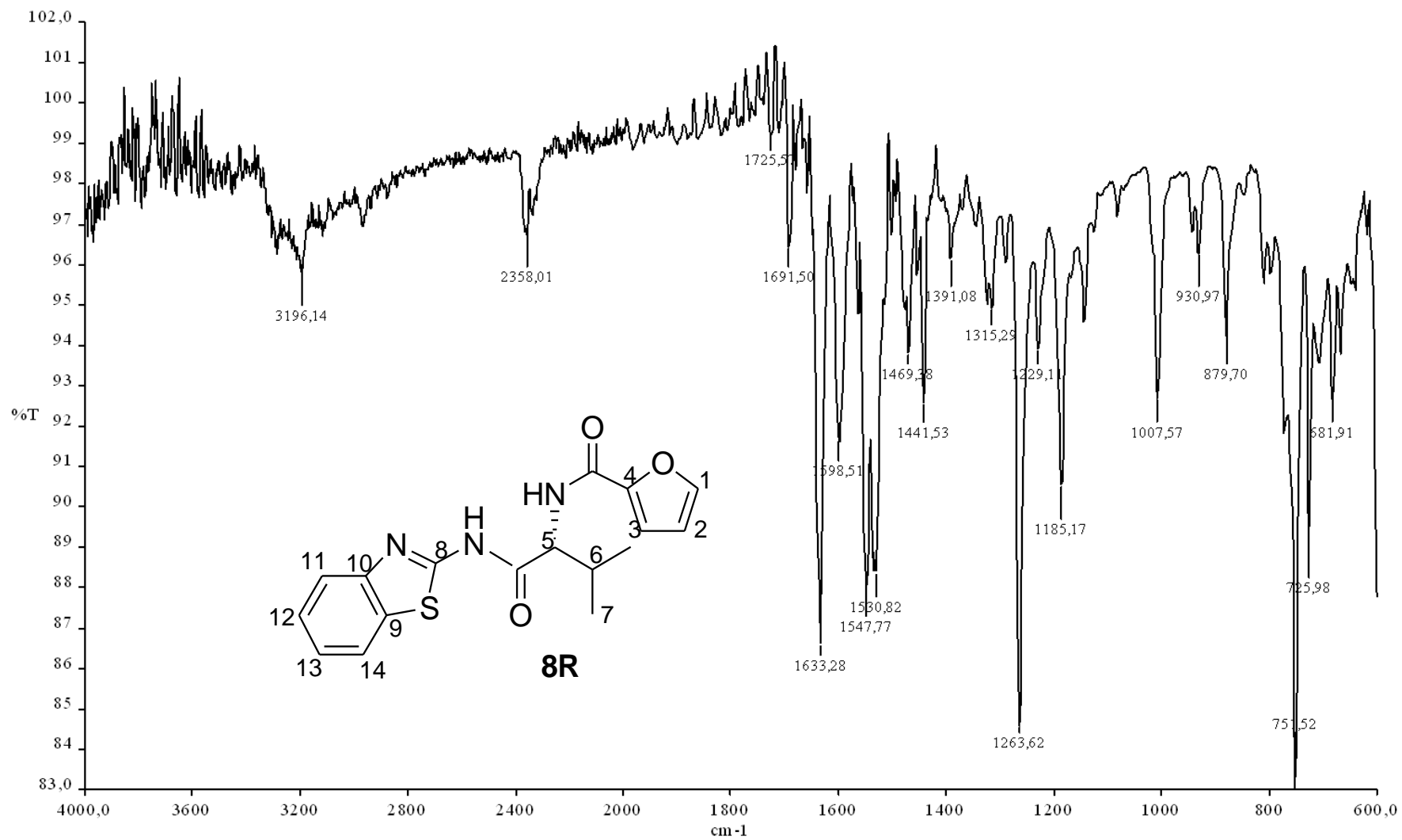


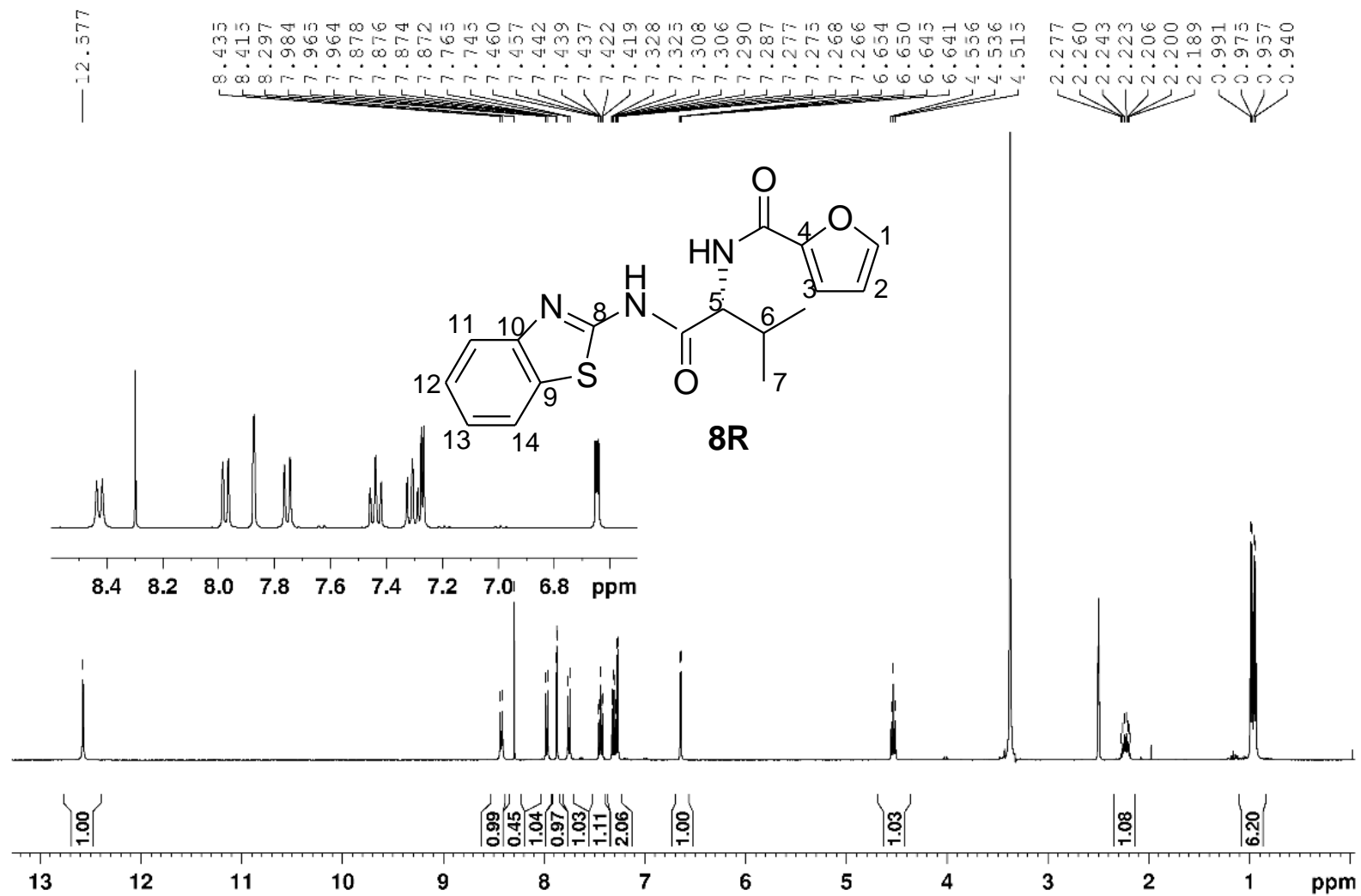
Figura A.8 - Espectro de RMN de ^1H de 8R (400 MHz, DMSO- d_6).

Figura A.9 - Espectro de RMN de ^{13}C de 8R (100 MHz, DMSO-d₆).