

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SÍNTESE DE INIBIDORES DE CRUZAÍNA E RODESAÍNA

DÉBORA ASSUMPÇÃO ROCHA

Porto Alegre, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SÍNTESE DE INIBIDORES DE CRUZAÍNA E RODESAÍNA

Dissertação apresentada por **Débora Assumpção Rocha** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade
Co-Orientadora: Prof. Dra. Rafaela Salgado Ferreira

Porto Alegre, 2018

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19.03.2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Grace Gosmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Rocha, Débora Assumpção
SÍNTESE DE INIBIDORES DE CRUZAÍNA E RODESAÍNA /
Débora Assumpção Rocha. -- 2018.
162 f.
Orientador: Saulo Fernandes de Andrade.

Coorientador: Rafaela Salgado Ferreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Doença de Chagas. 2. Doença do Sono Africana. 3.
Síntese Orgânica Medicinal. 4. Inibidores de Cruzaína e
Rodesaína. I. Fernandes de Andrade, Saulo, orient.
II. Salgado Ferreira, Rafaela, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 705B – PHARSG – Laboratório de Síntese Farmacêutica do Departamento de Produção e Controle de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, com financiamento da CAPES, FAPERGS e CNPq - Universal 01/2016, 402318/2016-1.

A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por sempre estar ao meu lado.

Aos meus pais, Maria Regina e Regis, por todo amor, carinho, apoio incondicional e compreensão durante toda a minha vida.

Ao meu irmão Daniel, por ser sempre meu amigo e me apoiar em tudo que eu faço.

Ao meu namorado Norton, por todo amor, carinho e paciência ao longo desta caminhada. Por ser um companheiro tão compreensivo, abdicando de muitos passeios/viagens preteridos em prol do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus sogros, Magaly e Vitor por me acolherem muito bem. A minha cunhada Nicolle por todo carinho e ensinamentos desde a minha graduação até aqui.

Aos meus demais familiares por todo apoio durante os meus estudos, em especial as minhas avós, Suely e Teresa e aos meus padrinhos, Marlene e Renato.

Aos queridos amigos da turma 15 da Natanael, que sempre estiveram comigo, me dando força e incentivo.

Aos colegas do Laboratório 705B, em especial as Sauletes: Caroline e Marina, por serem mais do que colegas de laboratório, mas amigas sempre dispostas a ajudar. A Thaís, por ser tão positiva e ter sempre uma palavra amiga durante os momentos difíceis. A Angélica por ser minha dupla ao longo de todas as disciplinas, pelas muitas horas no RMN, mensagens de carinho e incentivo e pela nossa amizade. A Isadora, por ser minha parceira de bancada, mais do que uma aluna de iniciação científica, uma amiga com quem aprendi muito e que está sempre disposta a ajudar.

A Marcela, por ser sempre tão prestativa, carinhosa e paciente ao ensinar em todas as vezes em que precisei.

As colegas do Lab 105 por terem me recebido tão bem no laboratório. Em especial, a Prof. Dra. Grace Gosmann, por todos ensinamentos.

A Prof. Dra. Rafaela Salgado Ferreira, pela ótima co-orientação, mesmo que a distância. A Elany, por todo apoio neste trabalho e pelas dicas.

AGRADECIMENTOS (CONTINUAÇÃO)

Ao meu orientador, Prof. Dr. Saulo, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, por todo apoio, amizade e ensinamentos. Sem contar a infinita paciência quanto as minhas dúvidas, principalmente de RMN.

*“Há uma força motriz mais poderosa do que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”*

—Albert Einstein

RESUMO

As doenças de Chagas e do Sono Africana são doenças negligenciadas, tendo como agente etiológico *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, respectivamente. Uma classe de alvos terapêuticos validados para o tratamento destas doenças são as proteases, como cruzaina, principal cisteíno-protease (CP) do *T. cruzi* e rodesaina, principal CP do *T. brucei*. Numa triagem experimental de compostos de bases comerciais foi identificado o composto intitulado **PH100** como potencial inibidor reversível destas enzimas. Utilizando *High-Throughput Virtual Screening*, *docking* XP e modificações clássicas de química medicinal, priorizamos derivados de **PH100** para síntese. Neste trabalho foi feita a síntese de 10 derivados quinazolínicos, 2 pirimidínicos e 2 purínicos. Para a síntese dos quinazolínicos, o ácido antranílico **11** foi reagido com uréia, fornecendo a dioxaquinazolina **12**, que sofreu uma dicloração nas posições 2 e 4 do anel utilizando POCl₃ e DMA, resultando na 2,4-dicloroquinazolina **13**. Em seguida, foi feita uma substituição nucleofílica aromática (SNA) utilizando benzilamina, seletivamente na posição 4, formando o intermediário **14**. Por último, uma substituição com diferentes aminas na posição 2 do anel obtendo os 10 derivados quinazolínicos 2,4-dissubstituídos. Para obter os derivados **PH100-103** e **PH106-107** foi feita uma SNA com a amina apropriada em EtOH, enquanto para **PH104-105** e **PH108-109** o acoplamento foi feito através do Cross-coupling de Buchwald-Hartwig. Os compostos pirimidínicos foram obtidos a partir da 2,4-dicloropirimidina **16**, nas mesmas condições anteriores. Para os purínicos, partimos da 2,6-dicloro-9H-purina **18** sendo metilada utilizando ICH₃ e K₂CO₃. A 2,6-dicloro-9-metil-9H-purina **19** resultante sofreu uma SNA com benzilamina, formando o intermediário **20**. Por último, fizemos uma reação de Cross-coupling obtendo **PH111** e **PH113**. Os compostos foram testados quanto a sua atividade inibitória frente cruzaina e rodesaina: **PH100** e **PH107** apresentaram os melhores valores de IC₅₀ para cruzaina e **PH105** e **PH107** para rodesaina. No ensaio contra *T. cruzi*, **PH106** e **PH107** obtiveram os melhores resultados, este último com um IC₅₀ de 0,1 µM e com um bom índice de seletividade.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Doença do Sono Africana. *Trypanosoma cruzi*. *T. brucei*. Cruzaina. Rodesaina. Inibidores reversíveis. Reação de Buchwald-Hartwig.

ABSTRACT

Chagas disease and Human African trypanosomiasis (HAT), whose etiological agent are *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*, respectively, are neglected diseases. One of the validated drug target class for the treatment of these diseases are proteases, such as cruzain, the main *T. cruzi* cysteine protease (CP), and rhodesain, the main CP of *T. brucei*. After a screening with commercially available compounds from database, we have identified the compound named **PH100** as a potential reversible inhibitor of these enzymes. Next, we have prioritized its derivatives using *High-Throughput Virtual Screening*, *docking XP* or classical medicinal chemistry modifications. In this work, we have synthesized 10 quinazolinic, 2 pyrimidinic and 2 purinic derivatives. In the synthesis of the quinazolinic derivatives, anthranilic acid **11** was reacted with urea, providing 2,4 dioxaquinazoline **12**, which was submitted to a dichlorination at positions 2 and 4 of the ring with POCl_3 and DMA resulting in 2,4-dichloroquinazoline **13**. After, these positions were substituted with adequate amines. First, a nucleophilic aromatic substitution with benzilamine, selectively at position 4, gave the intermediate **14**. Then, the substitutions with different amines at position 2 of the ring afforded the 10 quinazolinic derivatives. To obtain derivatives **PH100-103** and **PH106-107** the intermediate **14** was submitted to a SNA with appropriate amine, while to obtain **PH104-105** and **PH108-109** we have employed the Buchwald-Hartwig reaction. The pyrimidinic compounds were obtained from the 2,4-dichloropyrimidine **16**, using the same previously conditions described. To prepare the purinic compounds, the start material was the 2,6-dichloro-9H-purine **18**, which was methylated with ICH_3 . The resulting 2,6-dichloro-9-methyl-9H-purine **19** was treated in the same previously described conditions with benzylamine providing intermediate **20**. Then, the substitution with appropriate amine at position 2 of the ring provided **PH111** and **PH113** in a cross-coupling reaction. All the compounds were evaluated against cruzain and rhodesain, being **PH100** and **PH107** the most active for cruzain and **PH105** and **PH107** have presented the best results for rhodesain. In the evaluation against *T. cruzi*, **PH106** and **PH107** were the most potent compounds, the last one presenting an IC_{50} value of 0,1 μM and with a good selectivity index.

Keywords: Chagas disease. Human African Trypanosomiasis. *Trypanosoma cruzi*. *T. brucei*. Cruzain. Rhodesain. Reversible inhibitors. Buchwald-Hartwig Reaction.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asn182	Asparagina 182
CC ₅₀	Metade da Concentração Citotóxica Máxima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCS	Cromatografia em Coluna de Sílica
Cys25	Cisteína 25
d	Dupleto
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dd	Dupleto duplo
DMA	N,N-dimetilanilina
DMEM	Dulbecco MEM
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
His162	Histidina 162
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
HTVS	<i>High Throughput Virtual Screening</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento escalar
m	Multiplete
MHz	Megahertz
M.M.	Massa molar
ppm	Partes por milhão
POCl ₃	Oxicloreto de Fósforo
p/v	Peso por volume
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
SFB	Soro fetal bovino
sl	Simpleto largo
t	Triplete

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (CONTINUAÇÃO)

td	Tripleto de dupletos
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
THF	Tetrahidrofurano
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS.....	27
3 REVISÃO	29
4 PARTE EXPERIMENTAL	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	67
7 REFERÊNCIAS.....	69
8 ANEXOS	
ANEXO A - ESPECTROS NO INFRAVERMELHO E DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	75
ANEXO B - ARTIGO REVIEW SUBMETIDO	103

£

1. INTRODUÇÃO

Doenças negligenciadas são doenças tropicais endêmicas que prevalecem em populações menos favorecidas economicamente de países da África, Ásia e América do Sul. Entre essas doenças destacam-se a doença de Chagas, que tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* e a Tripanossomíase Humana Africana (HAT ou Doença do Sono Africana), que é causada pelo *Trypanosoma brucei*. O *T. cruzi* é um protozoário que possui três diferentes formas de desenvolvimento: epimastigota, forma presente no vetor (triatomíneo) e em cultura axênica; tripomastigota, forma sanguínea circulante e infectante; e amastigota, forma de replicação intracelular (HOARE, 1966; DIAS, 2009). A doença apresenta-se em fase aguda (geralmente assintomática) e fase crônica (sintomática e que tipicamente se prolonga por toda a vida do hospedeiro - DIAS, 2009). Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, sendo sua maioria na América Latina (OMS, 2018). HAT pode ser causada por duas diferentes subespécies: *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*, sendo transmitida através da picada da mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.). O protozoário apresenta quatro diferentes formas de desenvolvimento: tripomastigota metacíclicos (forma infectante), tripomastigota (forma de multiplicação no hospedeiro em fluidos como sangue e linfa), epimastigota e tripomastigota procíclico (formas de multiplicação presentes somente no inseto vetor) (COX, 2004; CDC, 2018). A parasitemia apresenta-se em duas fases: aguda ou hemolinfática, que pode persistir por meses e causa febre e linfoedemopatia e a fase crônica ou neurológica, onde o parasita cruza a barreira hematoencefálica (BHE) causando alterações no sono, desordens psiquiátricas e distúrbios sensoriais que podem levar a morte (FERREIRA, 2017). Em 2009 houve uma diminuição nos novos casos de HAT, sendo que pela primeira vez foram relatados números inferiores a 10.000 casos. Esta redução se mostra como uma tendência e no ano de 2015 foram reportados 2804 novos casos da doença (OMS, 2018).

Atualmente, existem dois medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: nifurtimox **1** (Lampit®) e benznidazol **2** (Rochagan®), entretanto, esses fármacos apresentam limitações como baixa eficácia na fase crônica da doença e efeitos colaterais graves (URBINA, 2003; BERMUDEZ 2016, SILVA, 2017) (**Figura 1.1**).

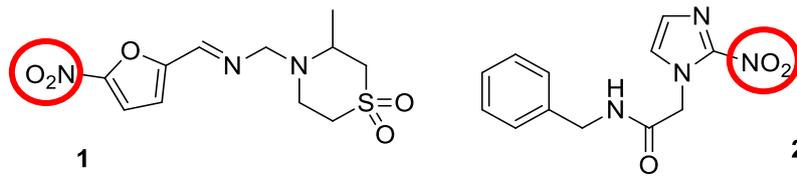


Figura 1.1. Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas: nifurtimox (**1**) e benznidazol (**2**). Estão marcados em vermelho seus grupamentos nitro, essenciais para a atividade.

Tanto o nifurtimox **1**, quanto o benznidazol (**2**), atuam por meio da formação de radicais livres, resultantes da biorredução do grupo nitro. A estas espécies radicais tem sido atribuído o efeito tripanossomicida, por mecanismos complexos que envolvem sua reação com lipídeos, proteínas e DNA do *T. cruzi*. Os radicais livres e os metabólitos eletrofílicos formados por estes fármacos não possuem especificidade para o parasita, sendo também nocivos para as células do hospedeiro. Essa falta de seletividade contribui para os diversos efeitos adversos, que muitas vezes levam ao abandono do tratamento (SAJID, 2011). Além disso, estes não são capazes de eliminar completamente o parasita e, também, foram relatados vários casos de resistência a estas terapias (MOTT, 2010).

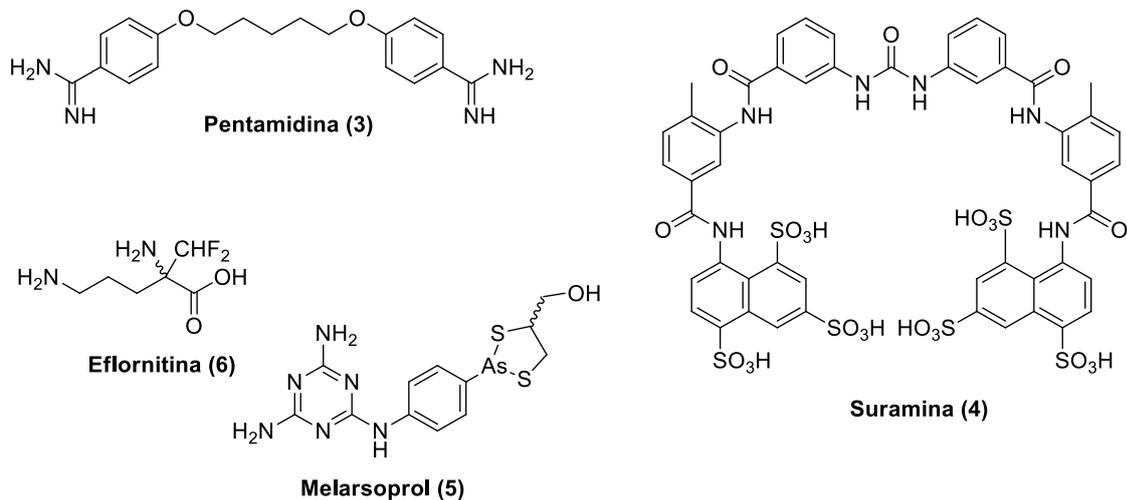


Figura 1.2. Fármacos utilizados no tratamento de HAT: Pentamidina (**3**), Suramina (**4**), Melarsoprol (**5**) e Eflornitina (**6**).

Os medicamentos disponíveis para o tratamento de HAT são: pentamidina **3** (NebuPent®), suramina **4** (Germanin®), melarsoprol **5** (Arsobal®) e eflornitina **6** (Ornidyl®) (**Figura 1.2**). Pentamidina e suramina podem ser utilizados somente na fase aguda da doença, pois não conseguem atravessar a BHE para tratar os sintomas neurológicos presentes na fase crônica (HAWKING, 1940; DELESPAUX, 2007). Melarsoprol e eflornitina são capazes de atravessar a BHE e utilizados na fase crônica. Entretanto, assim como no tratamento para doença de Chagas, estes fármacos apresentam importantes limitações quanto à eficácia, desenvolvimento de resistência e toxicidade ao paciente (DELESPAUX, 2007; WILKINSON, 2009; ETTARI 2016). Estas informações reforçam a ideia de que há uma grande necessidade de desenvolvimento de novos fármacos capazes de tratar estas doenças evitando efeitos adversos e aumentando assim a qualidade de vida do paciente e sua adesão ao tratamento (CLAYTON, 2010).

1.1 Cisteíno-Proteases: Cruzaína e Rodesaína como alvo no tratamento de tripanossomíases

Uma estratégia potencial para o tratamento de doenças causadas por parasitas é a síntese de compostos que inibem seletivamente enzimas cruciais para a sobrevivência destes parasitas no interior do hospedeiro (MCGRATH, 1995). Um dos alvos terapêuticos para o tratamento destas doenças são as proteases, devido ao seu papel na replicação, metabolismo, invasão celular e escape do parasita do sistema imune do hospedeiro, sendo essenciais para a sua sobrevivência (MCGRATH, 1995; DIAS, 2009). Entre elas destaca-se a enzima cruzaína, que é a principal cisteíno-protease do *Trypanosoma cruzi*, estando presente em todas as suas formas de vida (amastigota, tripomastigota e epimastigota). Esta enzima é importante na imunoinvasão do parasita, na aquisição de nutrientes e sobrevivência do organismo no hospedeiro. No *T. brucei* sua principal enzima é a rodesaína, sendo essencial para o processo de infecção deste parasita ao hospedeiro, assim como para atravessar a BHE e na evasão da resposta imune do hospedeiro (SANTOS, 2007; SILVA, 2016).

Em 1995, McGrath e colaboradores publicaram pela primeira vez a estrutura tridimensional da cruzaína, na qual esta se apresentava complexada com o inibidor

peptídico irreversível Z-Phe-Ala-fluormetilcetona, através da cristalografia por difração de raio-X. Neste estudo foi determinado que a enzima possui em sua estrutura 215 aminoácidos estruturados em dois domínios, sendo um predominantemente formado por alfa-hélices e o outro por folhas-beta antiparalelas. Entre estes domínios está sua tríade catalítica composta pelos resíduos: *Cys25*, *His162* e *Asn182* (**Figura 1.3**).

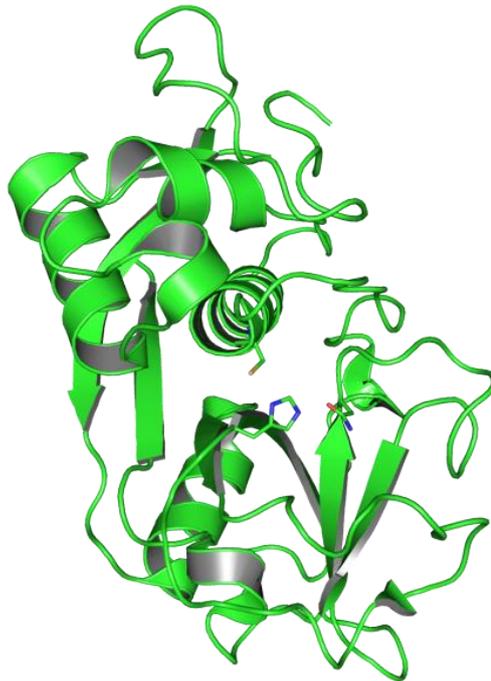


Figura 1.3 - Estrutura tridimensional da enzima cruzaina, com destaque para resíduos da tríade catalítica (*Cys 25*, *His162*, *Asn182*).

A estrutura cristalográfica de rodesaina também já foi elucidada (KERR, 2009) e sua estrutura primária possui uma homologia de aproximadamente 70 % com a estrutura da cruzaina (**Figura 1.4 - 1**). Ao mesmo tempo, seus sítios ativos são compostos basicamente pelos mesmos resíduos de aminoácidos dispostos em posição semelhante (**Figura 1.4 - 2**). Uma vantagem desta homologia é que geralmente os inibidores de uma das enzimas possuem atividade contra a outra (BRYANT, 2009; MOTT, 2010).

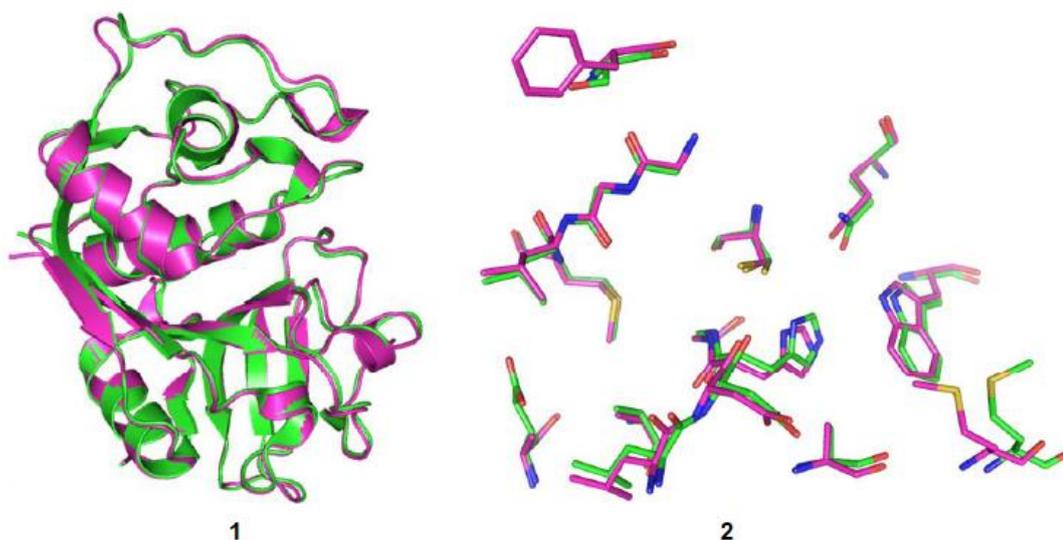


Figura 1.4. Comparação das estruturas cristalográficas de cruzaina (verde) e rodesaina (rosa): 1) Alinhamento total das estruturas de cruzaina (PDB 3KKU) e rodesaina (PDB 2P7U); 2) Alinhamento dos sítios ativos dessas enzimas.

Sendo estas enzimas essenciais à sobrevivência do protozoário, a publicação de suas estruturas tridimensionais elucidadas estimulou o desenvolvimento racional de diversas classes de inibidores (MOTT, 2010). Para cruzaina destacam-se a vinilssulfona K777 **7**, a 2,3,5,6-tetrafluorofenoximetilcetona **8** e as arilnitrilas **9** e **10** (**Figura 1.5**) (BARR, 2005, ENGEL, 1998 e MOTT, 2010). Estes três compostos são inibidores covalentes, exercendo inibição irreversível, e até o presente momento somente os inibidores irreversíveis de cruzaina demonstraram capacidade de curar a infecção pelo *T. cruzi*. Foi relatado que o K777 (**7**) e a 2,3,5,6-tetrafluorofenoximetilcetona (**9**) ligam-se covalentemente a enzima através de um ataque nucleofílico da cisteína 25 do sítio ativo da enzima ao centro eletrofílico destes inibidores (FERREIRA, 2010). As arilnitrilas (**9**) e (**10**) possuem em sua estrutura um anel triazina que, por natureza, é um forte grupo retirador de elétrons. Dessa forma, o grupo nitrila presente na estrutura desta classe de compostos é particularmente eletrofílico podendo formar uma ligação covalente com a Cys25, mas de maneira reversível (MOTT, 2010).

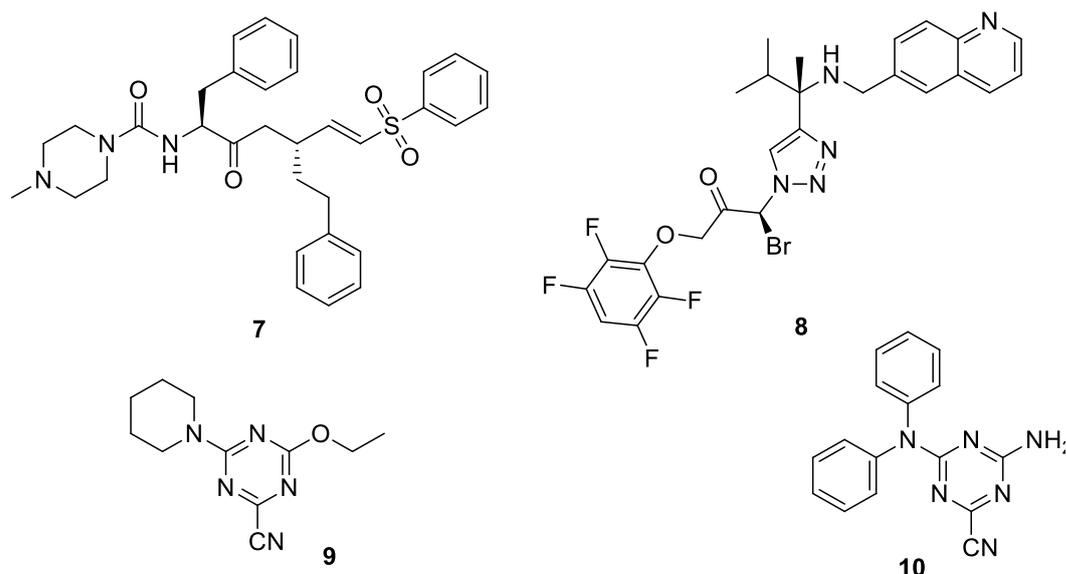


Figura 1.5. Inibidores covalentes de Cruzaína: K777 (**7**), 2,3,5,6 – tetrafluorofenoximetilcetona (**8**) e arilnitrilas (**9**) e (**10**).

Apesar dos bons resultados de inibição obtidos com estas substâncias, é sabido que inibidores covalentes podem inibir de forma inespecífica alvos indesejados do hospedeiro, resultando em toxicidade (BACHOVCHIN, 2012). Dessa forma, de um modo geral, é preferível a identificação de inibidores não-covalentes a fim de se evitar possíveis causas de toxicidade. Sendo assim, a identificação de novos inibidores não-covalentes de cruzaína e rodesaína é de grande importância na busca por novos candidatos a fármacos para estas doenças.

1.2 Inibidores Quinazolínicos

Em um estudo recente, foi realizada uma triagem de diversos compostos pelo nosso grupo de pesquisa contra as enzimas cruzaína e rodesaína a fim de se identificar possíveis inibidores não-covalentes para essas enzimas (Dados não publicados).

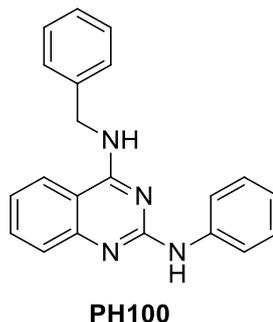


Figura 1.6. Estrutura do composto **PH100**.

Dentre os compostos analisados identificou-se o composto denominado **PH100** (**Figura 1.6**), um potencial inibidor para ambas as enzimas. Esse composto foi testado na concentração de 10 μM e apresentou valores de porcentagem de inibição de 82,6% para cruzaina e 82,8% para rodesaina. Além disso, o **PH100** também foi avaliado quanto à sua atividade tripanossomicida *in vitro*, apresentando valores relevantes de IC_{50} .

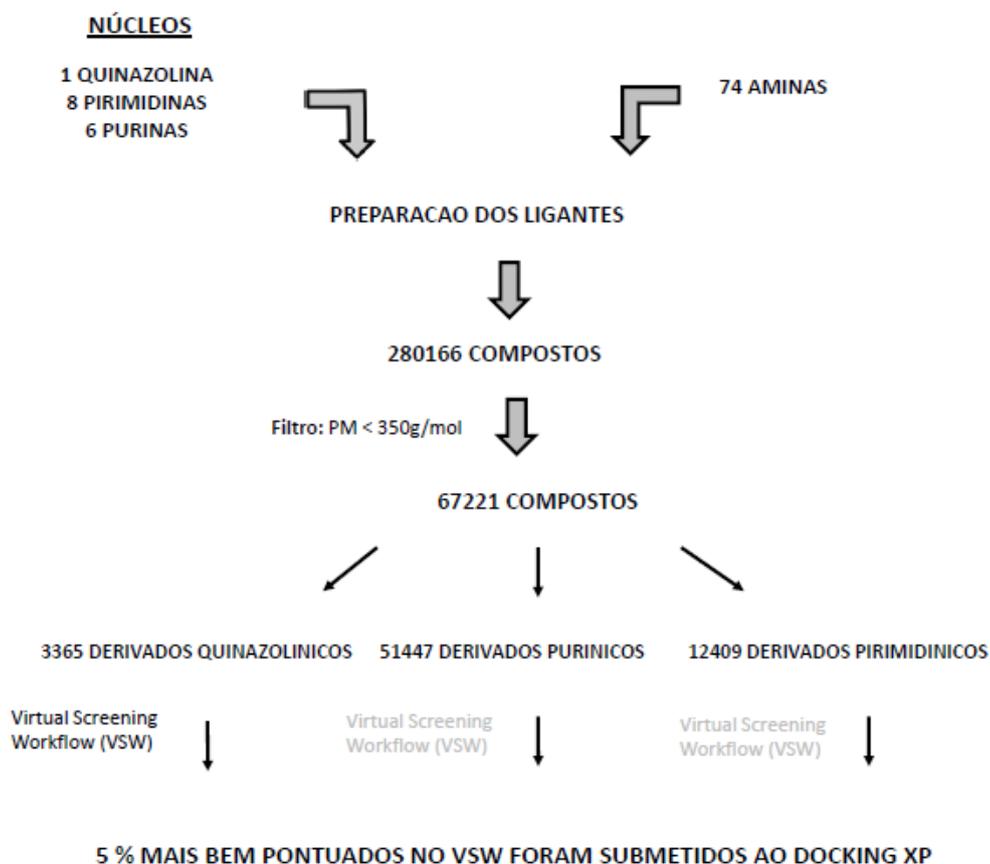


Figura 1.7. Triagem Virtual e construção da biblioteca de potenciais inibidores de cruzaina e rodesaina.

Devido aos bons resultados apresentados pelo protótipo **PH100**, um ensaio de *High Throughput Virtual Screening* (HTVS) foi realizado com compostos estruturalmente semelhantes a esse composto planejados pelo nosso grupo, no intuito de identificar novos inibidores das enzimas cruzaina e rodesaina. Foi realizada uma triagem com três classes de núcleos diferentes: quinazolina, purina e pirimidina e 74 diferentes aminas. 280166 compostos foram encontrados. No passo seguinte foi aplicado um filtro de peso molecular, priorizando compostos com peso molecular inferior a 350 g/mol, devido à possibilidade de apresentarem melhores características farmacocinéticas. Após esse filtro foram obtidos 67221 compostos, destes, 3365 derivados quinazolínicos foram triados e passaram por *Virtual Screening Workflow* (VSF), 5% dos compostos (47) mais bem pontuados neste processo foram submetidos a um estudo de docking XP. Após análise minuciosa das poses dos compostos, bem como dos grupos substituintes mais frequentes nos derivados com poses consistentes com modos de interação já conhecidos para a enzima, foram priorizados seis derivados quinazolínicos para síntese. Utilizando estratégias clássicas de modificação molecular outros 4 derivados foram desenhados, além dos derivados purínicos e pirimidínicos para comparação.

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Sintetizar derivados quinazolínicos, purínicos e pirimidínicos e avaliar a atividade inibitória contra cruzaina e rodesaina a fim de identificar potenciais candidatos a fármacos para tratamento de tripanossomíases.

2.2 Objetivos específicos

- * Realizar uma extensa pesquisa bibliográfica sobre síntese de inibidores de cruzaina e rodesaina, bem como, novos resultados de relação estrutura-atividade biológica;
- * Redigir um artigo de revisão completo inovador com os dados encontrados no item anterior para servir de referência para pesquisadores de química medicinal em todo o mundo na área;
- * Executar a síntese do protótipo e dos análogos selecionados na triagem virtual e planejados por modificações moleculares;
- * Realizar a síntese de análogos do protótipo com outros núcleos;
- * Avaliar a atividade dos compostos *in vitro* contra a enzima cruzaina e rodesaina a fim de confirmar a atividade do protótipo comercial e se identificarem novas substâncias com potencial para tratamento das Doenças de Chagas e do sono africana.
- * Avaliar a atividade dos compostos promissores contra a forma amastigota de *T. cruzi* e mioblastos C2C12.

3. REVISÃO

Foi feita uma revisão completa sobre a síntese de inibidores de cruzaina e rodesaina, englobando as principais classes de inibidores. O foco desta revisão foi a síntese destas moléculas e a relação estrutura atividade dos compostos obtidos. Esta revisão consta como **Anexo B** (p.103) neste trabalho, visto que é uma revisão que foi submetida a publicação.

4. PARTE EXPERIMENTAL

O texto completo desta seção, que na dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas 31-48, foi suprimido por tratar-se de informações para publicação em periódico científico. Consta da descrição de todos os métodos de síntese utilizados para obter os compostos descritos neste trabalho, assim como da descrição de toda a metodologia dos ensaios biológicos realizados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O texto completo desta seção, que na dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas 49-66, foi suprimido por tratar-se de informações para publicação em periódico científico. Consta da discussão dos resultados obtidos neste trabalho e de breve relação estrutura atividade dos compostos relatados.

6. CONCLUSÃO

O texto completo desta seção, que na dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas 67-68, foi suprimido por tratar-se de informações para publicação em periódico científico. Consta da conclusão deste trabalho, destacando os resultados mais relevantes.

7. REFERÊNCIAS

Andrade, S. F.; Campos, E. F. S. ; Teixeira, C. S. ; Bandeira, C. C. ; Lavorato, S. N. ; Romeiro, N. C. ; Bertollo, C. M. ; Oliveira, M. C. ; Souza-Fagundes, E. M. ; Alves, R. J. . Synthesis of Novel 2,3,4-trisubstituted-oxazolidine Derivatives and In Vitro Cytotoxic Evaluation. **Medicinal Chemistry (Hilversum)**.10, 609-618, 2014.

Bachovchin D. A.; Cravatt B. F. The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases. **Nat. Rev. Drug. Discov.** 11, 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*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 49, 5160-1, 2005.

Beaman, A. G.; Robins, R. K. The Direct Conversion of Chloropurines to Fluoropurines. **Journal of Organic Chemistry.** 28, 2310-2313, 1963.

Bermudez, J.; Davies, C.; Simonazzi, A.; Real, J.P.; Palma, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Trop.** 156, 1-16, 2016.

Bogert, M.T. e Scatchard, G. Researches on quinazolines. Xxxiv. The synthesis of certain nitro and amino benzoylene ureas and some compounds related thereto. **J. Am. Chem. Soc.**, 41 (12), 2052–2068, 1919.

Braga, S.F.; Martins, L.C.; da Silva, E.B.; Sales Júnior, P.A.; Murta, S.M.; Romanha, A.J.; Soh, W.T.; Brandstetter, H.; Ferreira, R.S.; de Oliveira, R.B. Synthesis and biological evaluation of potential inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain designed by molecular simplification. **Bioorg Med Chem.**, **2017**, 25, 1889-1900.

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, 6218-6221, 2009.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov> – Acessado em 15 de fevereiro de 2018.

Clayden, J. P.; Greeves, N.; Warren, S. G.; Organic Chemistry (2^a ed.). Oxford. Oxford University Press, 2012.

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

Cox, F. E. G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infect. Dis. Clin. North Am.** 18, 231–245, 2004.

Delespaux, V.; de Koning, H.P. Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. **Drug Resist Updat.** 10, 30-50, 2007.

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. **Quim. Nova.** 32, 2444-2457, 2009.

Ekins, S.; Siqueira-Neto, J.L.; Laura-Isobel McCall, L.I.; Sarker, M.; Yadav, M.; Ponder, E.L.; Kallel, E.A.; Kellar, D.; Chen, S.; Arkin, M.; Bunin, B.A.; McKerrow, J.H.; Talcott, C. Machine Learning Models and Pathway Genome Data Base for *Trypanosoma cruzi* Drug Discovery. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 9(6) 2015.

Engel, J. C.; Doyle, P. S.; Hsieh, I.; McKerrow, J. H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.** 188, 725-734, 1998.

Ettari, R.; Previti, S.; Tamborini, L.; Cullia, G.; Grasso, S.; Zappalà, M. The Inhibition of Cysteine Proteases Rhodesain and TbCatB: A Valuable Approach to Treat Human

African Trypanosomiasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. 16, 1374-1391, 2016.

Ferreira, L.G.; Andricopulo, A.D. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug Discovery. **Pharmacol Ther**. 180, 49-61, 2017.

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. **J. Med. Chem**. 53, 4891-4905, 2010.

Frank Hawking, D.M., D.T.M. Concentration of Bayer 205 (Germanin) in human blood and cerebrospinal fluid after treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 34, 37-52, 1940.

Hoare, C. A.; Wallace, F. G.; **Nature**. 212, 1385-1386, 1966.

Kerr, D.; Lee, J.H.; Farady, C.J.; Marion, R.; Rickert, M.; Sajid, M.; Pandey, K.C.; Caffrey, C.R.; Legac, J.; Hansell, E.; McKerrow, J.H.; Craik, C.S.; Rosenthal, P.J.; Brinen, L.S. Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. **J Biol Chem**. 284, 25697-25703, 2009.

McGrath, M. E.; Eakin, A. E.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H.; Craik, C. S.; Fletterick, R. J. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. **J. Mol. Biol**. 247, 251-259, 1995.

Mohamed, T.; Abdeljalil, A.; Raob, P. P. N. N-Benzyl-2-chloroquinazolin-4-amine. **Acta Cryst. Section E**. 70, o554, 2014.

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. **J. Med. Chem.** 53, 52-60, 2010.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 15 de fevereiro 2018.

Sajid, M.; Robertson, S. A.; Brinen, L. S.; McKerrow, J. H. Cruzain: the path from target validation to the clinic. **Adv Exp Med Biol.** 712:100-15, 2011.

Santos, C.C.; Coombs, G.H.; Lima, A.P.; Mottram, J.C. Role of the Trypanosoma brucei natural cysteine peptidase inhibitor ICP in differentiation and virulence. **Mol Microbiol.** 66, 991-1002, 2007.

Silva, E.B.; do Nascimento Pereira, G.A.; Ferreira, R.S. Trypanosomal Cysteine Peptidases: Target Validation and Drug Design Strategies In: Comprehensive Analysis of Parasite Biology: From Metabolism to Drug Discovery; S. Müller, R. Cerdan and O. Radulescu, Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Vol. 7, pp. 121-145, 2016.

Silva, E.B.; Oliveira E Silva, D.A.; Oliveira, A.R.; da Silva Mendes, C.H.; Dos Santos, T.A.; da Silva, A.C.; de Castro, M.C.; Ferreira, R.S.; Moreira, D.R.; Cardoso, M.V.; de Simone, C.A.; Pereira, V.R.; Leite, A.C. Design and synthesis of potent anti-Trypanosoma cruzi agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **Eur J Med Chem.** 130, 39-50, 2017.

Urbina, J. A.; Docampo, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.** 19, 495-501, 2003.

Van Horn, K.S.; Zhu, X.; Pandharkar, T.; Yang, S.; Vesely, B.; Vanaerschot, M.; Dujardin, J.; Rijal, S.; Kyle, D. E.; Wang, M.Z.; Karl A. Werbovetz, K.A.; Manetsch, R.

Antileishmanial Activity of a Series of N₂,N₄-Disubstituted Quinazoline-2,4-diamines. **J. Med. Chem.** 57, 5141–5156, 2014.

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

Zhang, G.; Wang, X.; Li, C.; Yin, D. Palladium-catalyzed cross-coupling of Electron-deficient heteroaromatic amines with heteroaryl halides. **Synthetic Communications**. 43: 456–463, 2013.

ANEXO A - Espectros no infravermelho e de ressonância magnética nuclear

O texto completo desta seção, que na dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas 75-102, foi suprimido por tratar-se de informações para publicação em periódico científico. Consta da disposição de todos os espectros de Infravermelho, RMN de Hidrogênio e de Carbono referentes a todos os compostos apresentados na dissertação defendida.

ANEXO B - REVIEW - Synthesis and Structure-activity Relationship Studies of the cruzain and rhodesain inhibitors – Artigo submetido na Revista European Journal of Medicinal Chemistry em 18 de março de 2018.

Débora Assumpção Rocha^{a,b}, Elany Barbosa Silva^c, Isadora Serraglio Fortes^a, Marcela Silva Lopes^d, Rafaela Salgado Ferreira^c and Saulo Fernandes de Andrade^{a,b*}

O texto completo desta seção, que na dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas 103-162, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido para publicação em periódico científico. Consta de uma revisão da literatura focada nos anos de 2015-2017 a cerca da síntese e relação estrutura atividade dos principais inibidores de cruzaina e rodesaina.

