UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Tese de Doutorado

Síntese e caracterização química de dipeptidilnitrilas como inibidores da enzima cruzaína visando atividade antiparasitária no *Trypanosoma cruzi*

Cristian David Camilo Reyes

São Carlos

Outubro de 2018

Cristian David Camilo Reyes

Síntese e caracterização química de dipeptidilnitrilas como inibidores da enzima cruzaína visando atividade antiparasitária no *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do titulo de doutor em ciências

Área de concentração: **Química Orgânica e Biológica**

Orientadora: **Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi**

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Outubro de 2018

Resumo

A enzima cruzaína, expressa durante todo o ciclo de vida do parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é a principal cisteíno protease desse parasita e, vem se apresentando como alvo promissor para o tratamento da doença de Chagas. Neste trabalho, foi sintetizada uma série de dipeptidilnitrilas que apresentam atividade sobre a enzima cruzaína em concentrações da ordem de micromolar. Esses compostos apresentam também atividade diante do parasita *T. cruzi*, sendo prototípico o composto 09, um dos mais potentes, capaz de inibir a enzima de forma reversivel com IC_{50} de $1,89 \pm 0,11$ μM ($pIC_{50} = 5,7$) e, o parasita na forma epimastigota, IC_{50} de $2,7 \pm 0,3$ μM ($pIC_{50} = 5,6$). Foi constatado que o composto 09 é cerca de 40% mais potente que o fármaco benzonidazol (BZ), que foi usado como controle nos ensaios das moléculas sintetizada sendo que o BZ apresentou $pIC_{50} = 4,6$.

Os compostos 09 e 07 apresentam efeito similar diante do *T. cruzi*. Estes dois compostos foram marcados mediante a incorporação de um fluoróforo Bodipy e, finalmente, analisados por microscopia confocal para identificar processos biológicos específicos e a resposta celular *in vitro* nas moléculas, assim como a determinação do mecanismo de morte celular, bem como de alterações morfológicas dos parasitas causadas pelos compostos.

Os resultados sugerem que estas dipeptidilnitrilas sintetizadas apresentam potencial para tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, Dipeptidilnitrilas, Cruzaína, Bodipy.

Abstract

The Cruzaíne enzyme, a cysteine protease expressed throughout the life cycle of the parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), is the main cysteine protease of this parasite and has been presented as a promising target for the treatment of Chagas' disease. In this work, we have synthesized a series of dipeptidylnitriles that have activity against the enzyme cruzaína in micromolar concentrations. These compounds also present activity against the parasite *T. cruzi*, the prototypical compound (09) being one of our most potent compounds, which inhibits the enzyme with IC_{50} of 1.89 89 ± ± 0.11 μM (pIC_{50} pIC_{50} = = 5.7), and against the parasite (trypomastigote form) IC_{50} of 2.7 7 ± ± 0.3 3 μM (pIC_{50} pIC_{50} = = 5.6), compound 9 is 40% more potent than the drug Benzonidazole (BZ) which was used as a control in the assays of these molecules, this (BZ) had pIC_{50} pIC_{50} = = 4.6.

Compounds 09 and 07 have a similarity in the assays against the *T. cruzi* parasite, these two compounds were labelled by the incorporation of borodipyrromethene family fluorophores (Bodipy) and finally, they were monitored by microscopy confocal, to identify specific biological processes or some cellular response in vitro to these molecules, cell death mechanisms and, morphological variations of the parasites by the compounds.

The results suggest that these synthetized molecules present potential to the treatment of Chagas disease.

Keywords: *Trypanozoma cruzi*, Chagas disease , dipeptidylnitriles, Cruzaine, Bodipy

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ÁREAS ENDÊMICAS COM AÇÕES DE CONTROLE NO BRASIL[7] 16
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DO NIFURTIMOX E BENZONIDAZOL 19
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO POSACONAZOL 20
FIGURA 4: ESTRUTURA MOLECULAR K11777 (K777) 20
FIGURA 5: ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA CRUZAÍNA (PDB: 2AIM). EM DESTAQUE, OS RESÍDUOS QUE PARTICIPAM DO MECANISMO CATALÍTICO 21
FIGURA 6: DIFERENTES BODIPY USADOS E SUA PRINCIPAL BANDA DE ABSORÇÃO E EMISSÃO[40] 25
FIGURA 7: ORIENTAÇÃO DO COMPOSTO PROTÓTIPO (09) NO SÍTIO CATALÍTICO DA CRUZAÍNA. 26
FIGURA 8: ESTRUTURA DE RAIOS X DO MODO DE INTERAÇÃO DO COMPOSTO PROTÓTIPO (09) COCRISTALIZADO COM A CRUZAÍNA MUTANTE (C25S) 27
FIGURA 9: ROTA SINTÉTICA PARA OBTENÇÃO DA MOLÉCULA PROTÓTIPO (COMPOSTO 09)[5] 30
FIGURA 10: ROTA SINTÉTICA EMPREGADA PARA SÍNTESE DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO PROTÓTIPO . 33
FIGURA 11: ROTA SINTÉTICA EMPREGADA PARA SÍNTESE DOS COMPOSTOS MARCADOS COM SONDA FLUORESCENTE 34
FIGURA 12: ESPECTRO ^{1}H RMN DO COMPOSTO PROTÓTIPO 09 45
FIGURA 13: ESPECTRO DE RMN DE HIDROGÊNIO DO MATERIAL DE PARTIDA 48
FIGURA 14: ESPECTRO DE RMN DE CARBONO DO MATERIAL DE PARTIDA 49
FIGURA 15: ESTRUTURA BODIPY 630/650-X NHS ÉSTER 52
FIGURA 16: CROMATOGRAMA DA MISTURA RACÊMICA DO COMPOSTO PROTÓTIPO, COLUNA: CELLULOSA – 2, D.I.: 2,0 MM TR = 9,23 E 11,88 53
FIGURA 17: CROMATOGRAMA DO COMPOSTO PROTÓTIPO APÓS PURIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS, COLUNA: CELLULOSA – 2, D.I.: 2,0 MM TR = 9,23 E 11,74 53
FIGURA 18: PERFIL DAS CURVAS DOSE-RESPOSTA OBTIDAS 55
FIGURA 19: ACUMULAÇÃO MOLECULAR INTRACELULAR DOS COMPOSTOS 07 E 09 MARCADOS COM SONDA FLUORESCENTE 59
FIGURA 20 VIABILIDADE DAS CÉLULAS HUVEC E VERO APÓS TRATAMENTO DE 24H COM O COMPOSTO 07 EM 4 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. 60
FIGURA 21 VIABILIDADE DAS CÉLULAS HUVEC E VERO PÓS TRATAMENTO DE 24H COM O COMPOSTO 09 EM 4 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. 61
FIGURA 22 VIABILIDADE DAS CÉLULAS HUVEC E VERO PÓS TRATAMENTO DE 24H DE TRATAMENTO COM O COMPOSTO 01 EM 4 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. 61
FIGURA 23 VIABILIDADE DAS CÉLULAS HUVEC E VERO PÓS TRATAMENTO DE 24H DE TRATAMENTO COM O COMPOSTO PADRÃO BZ EM 4 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. 62
FIGURA 24 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO *T. CRUZI* (EPIMASTIGOTA), APÓS SEM TRATAMENTO (CONTROLE). 64
FIGURA 25 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO *T. CRUZI* (EPIMASTIGOTA), APÓS 24H DE TRATAMENTO COM O COMPOSTO 07 (>100 MMOL L^{-1}). 65
FIGURA 26 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO *T. CRUZI* (EPIMASTIGOTA), APÓS 24H DE TRATAMENTO COM O COMPOSTO 09 (2 MMOL L^{-1}).. 66
FIGURA 27 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO *T. CRUZI* (EPIMASTIGOTA), APÓS 24H DE TRATAMENTO COM O COMPOSTO 01 (3 MMOL L^{-1}).. 67
FIGURA 28 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO *T. CRUZI* (EPIMASTIGOTA), APÓS 24H DE TRATAMENTO COM O COMPOSTO PADRÃO BZ (12 MMOL L^{-1}).. 68
FIGURA 29: IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS PARASITAS *T. CRUZI* APÓS 24 H, COM CONTROLE NEGATIVO DE DIMETILSULFOXIDO (DMSO) 2%; OBJETIVAS 40 E 100× 69
FIGURA 30: IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS PARASITAS *T. CRUZI* APÓS 24 H DO TRATAMENTO COM O COMPOSTO PADRÃO BENZONIDAZOL (12 MMOL L^{-1}); OBJETIVAS DE 40 E 100× 70
FIGURA 31: IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS PARASITAS *T. CRUZI* APÓS 24 H DO TRATAMENTO COM O COMPOSTO 7 (20 MMOL L^{-1}); OBJETIVAS DE 40 E 100× 70
FIGURA 32: IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS PARASITAS *T. CRUZI* APÓS 24 H DO TRATAMENTO COM O COMPOSTO 09 (3 MMOL L^{-1}) OBJETIVAS DE 40 E 100× 71
FIGURA 33: IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS PARASITAS *T. CRUZI* APÓS 24 H DO TRATAMENTO COM O COMPOSTO 01 (3 MMOL L^{-1}); OBJETIVAS DE 40 E 100× 71
FIGURA 34: IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL DOS PARASITAS *T. CRUZI* APÓS 2 H DE ENCUBAÇÃO, COM O COMPOSTO 07B (B), O MARCADOR DE LISOSSOMOS (C) E UMA SUPERPOSIÇÃO DAS IMAGENS B E C (D) EM UMA OBJETIVA DE 40× 73

FIGURA 35: IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL DOS PARASITAS *T. CRUZI* APÓS 2 H DE ENCUBAÇÃO, COM O COMPOSTO 07B (B), O MARCADOR DE MITOCÔNDRIA (C) E UMA SUPERPOSIÇÃO DAS IMAGENS B E C (D) EM UMA OBJETIVA DE 40×.....73
FIGURA 36: IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL DOS PARASITAS *T. CRUZI* APÓS 2 H DE ENCUBAÇÃO, COM O COMPOSTO 09B (B), O MARCADOR DE LISOSSOMOS (C) E UMA SUPERPOSIÇÃO DAS IMAGENS B E C (D) EM UMA OBJETIVA DE 40×.....75
FIGURA 37: IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL DOS PARASITAS *T. CRUZI* APÓS 2 H DE ENCUBAÇÃO, COM O COMPOSTO 09B (B), O MARCADOR DE MITOCÔNDRIA (C) E UMA SUPERPOSIÇÃO DAS IMAGENS B E C (D) EM UMA OBJETIVA DE 40×.....75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CONDIÇÕES DE SECAGEM DE SOLVENTES SOB PENEIRA MOLECULAR[62] 29
TABELA 2: ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS ^{1}H DO COMPOSTO PROTÓTIPO 09 46
TABELA 3: VARIAÇÕES NAS CONDIÇÕES REACIONAIS NA INSERÇÃO DO *LINKER* 51
TABELA 4: RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE DOS COMPOSTOS DIANTE DA ENZIMA CRUZAÍNA 57
TABELA 5: VALORES DE IC_{50} DOS COMPOSTOS ESTUDADOS DIANTE DO *T. CRUZI* NA FORMA EPIMASTIGOTA 63

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: PREPARAÇÃO DO ÉSTER METÍLICO DA L-FENILALANINA 41
ESQUEMA 2: MECANISMO DE ESTERIFICAÇÃO DA FENILALANINA 42
ESQUEMA 3: REAÇÃO DE BENZOILAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO OBTIDO 42
ESQUEMA 4: MECANISMO DE BENZOILAÇÃO 42
ESQUEMA 5: REAÇÃO DE HIDRÓLISE 43
ESQUEMA 6: MECANISMO DE HIDRÓLISE 44
ESQUEMA 7: MECANISMO DE ACOPLAMENTO DO COMPOSTO PROTÓTIPO 45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

1.1 DOENÇA DE CHAGAS 14
1.2 DOENÇA DE CHAGAS NO BRASIL 15
1.3 O TRYPANOSOMA CRUZI 17
1.4 TRATAMENTOS DA DOENÇA DE CHAGAS 18
1.5 PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS 19
1.6 CISTEÍNO PROTEASES COMO ALVOS TERAPÊUTICOS PARA A DOENÇA DE CHAGAS 20
1.7 A ENZIMA CRUZAÍNA 21
1.8 SÍNTESE E MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS 23
1.9 BORODIPIRROMETENOS (BODIPY) COMO SONDAS NA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA 23
1.9.1 PRECEDENTES DA PESQUISA 25

2 OBJETIVOS 28

2.1 OBJETIVO GERAL 28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28

3 PARTE EXPERIMENTAL 29

3.1 SÍNTESES DOS COMPOSTOS **29**
3.1.1 REAGENTES E SOLVENTES 29
3.1.2 SÍNTESE DA MOLÉCULA PROTÓTIPO (COMPOSTO 09) 29
3.1.3 PROTOCOLO DE REAÇÃO DA MOLÉCULA PROTÓTIPO (COMPOSTO 09) 30
3.1.4 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO COMPOSTO PROTÓTIPO 33
3.2 PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR HPLC SEMI-PREPARATIVO 34
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS 35
3.4 ENSAIOS BIOQUÍMICOS 36
3.4.1 REAGENTES E SOLVENTES 36
3.4.2 INIBIÇÃO DAS ENZIMAS CRUZAÍNA PARA DETERMINAÇÃO DE IC_{50} 36
3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS **37**
3.5.1 CÉLULAS UTILIZADAS PARA O ESTUDO DE ACUMULAÇÃO, CITOTOXICIDADE E INFECÇÃO CELULAR 37
3.5.2 PARASITOS 37
3.5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE 38
3.5.4 ACUMULAÇÃO INTRACELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA.. 38
3.5.5 AVALIAÇÃO DA AÇÃO TRIPANOCIDA 39
3.5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 39
3.5.7 MARCAÇÃO DE CÉLULAS SIMILAR À APOPTOSE E NECRÓTICAS 40
3.5.8 COLOCALIZAÇÃO INTRACELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL 40

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41

4.1 COMPOSTO PROTÓTIPO 41
4.1.1 REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO ÉSTER METÍLICO DA L-FENILALANINA 41
4.1.2 BENZOILAÇÃO 42
4.1.3 HIDROLISE DO ÉSTER (DESPROTEÇÃO DO ÁCIDO CARBOXILICO) 43
4.1.4 REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE LIGAÇÃO PEPTÍDICA (REAÇÃO DE ACOPLAMENTO) 44
4.2 MODIFICAÇÕES SINTÉTICAS 47
4.3 SEPARAÇÃO POR HPLC DOS COMPOSTOS 52
4.4 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DAS ENZIMAS CRUZAÍNA PARA DETERMINAÇÃO DE IC_{50} 54
4.5 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE 56
ACUMULAÇÃO INTRACELULAR DOS COMPOSTOS POR MICROSCOPIA CONFOCAL 58
4.5.1 CITOTOXICIDADE CELULAR 60

4.5.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO TRIPANOCIDA 62
4.5.3 MARCAÇÃO DE CÉLULAS SIMILAR A APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS 69
4.6 COLOCALIZAÇÃO INTRACELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL **72**

5 CONCLUSÕES 76

6 REFERÊNCIAS 77

7 ANEXOS 84

7.1 ANEXO 1: ESPECTROS DE RMN ^{1}H, ^{13}C E MASSAS NA SÍNTESE DO COMPOSTO **09** MARCADO COM A SONDA FLUORESCENTE (COMPOSTO **09B**) **84**
7.2 ANEXO 2: ESPECTROS DE MASSAS DO COMPOSTO **09** MARCADO COM A SONDA FLUORESCENTE (COMPOSTO **09B**) **92**
7.3 ANEXO 3: ESPECTROS DE RMN ^{1}H, ^{13}C E MASSAS NA SÍNTESE DO COMPOSTO **07** MARCADO COM A SONDA FLUORESCENTE (COMPOSTO **07B**) **93**
7.4 ANEXO 4: ESPECTROS DE MASSAS DO COMPOSTO **07** MARCADO COM A SONDA FLUORESCENTE (COMPOSTO **07B**) **99**

Ao meu bem mais precioso minha família,
em especial a minha esposa Lina pelo amor e paciência,
e a minha filha Victoria por me mostrar a cada dia no seu ser o amor infinito

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pela graça que posso encontrar nele a cada dia, e por ser a força necessária para a realização de cada objetivo proposto.

A minha família, por todo o apoio desde o começo de cada uma das minhas etapas, e mesmo sem a certeza de qual será o resultado, sempre estão aqui com o seu exemplo e principalmente com o seu amor infinito me ensinando o caminho.

À professora Dra Janice Rodrigues Perussi, pela confiança depositada, dedicação, apoio e paciência na orientação de este trabalho.

Aos meus colegas de laboratório pelo apoio, paciência, e principalmente pelos momentos vividos a cada dia, onde além de ser os meus colegas e coautores de este trabalho, tortaram-se meus amigos.

Ao professor Dr Alberico Borgues Ferreira da Silva, pela amizade sincera e apoio neste processo

Ao grupo NEQUIMED do IQSC por ser parte fundamental na realização de este trabalho

Ao professor Dr. Antônio Burtoloso, e ao professor Dr. Kleber de Oliveira pela orientação e apoio na síntese dos compostos

Ao centro de pesquisas de ótica e fotônica (CePOF), pelo apoio neste trabalho e ajuda na obtenção das imagens de microscopia confocal.

À escola de farmácia da universidade de Nottingham e em especial ao professores Dr Barrie Kellam e Dr Charlie Laughton, pela orientação e apoio na sínteses das moléculas.

Ao departamento de Análises Clínicas da universidade estadual Paulista (UNESP) e, em especial à professora Marcia Graminha e ao seu grupo de pesquisa

Ao instituto de química de São Carlos da USP pela oportunidade e á capes e CNPq pelas bolsas concedidas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	Brometo de Etídio
BODIPY	Borodipirrometenos
BZ	Benzonidazol
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
$CHCl_3$	Clorofórmio
CO_2	dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfoxido
DCM	Diclorometano
EDTA	*Ethylendiamine Tetraacetic Acid*
EtOAc	*Ethyl Acetate*
HRMS	*High Resolution Mass Spectroscopy*
IC_{50}	Concentração Inibitória Media
LA	Laranja de Acridina
MTT	3-4, 5–dimetiltiazol–2–il)-2, 5- difenil brometo de tetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAHO	*Pan American Health Organization*
PBS	*Phosphate Buffer Saline*
RPMI	Meio de cultura 1640
SBF	Soro Bovino Fetal
SI	*selectivity index*
T. cruzi	*Trypanosoma cruzi*
THF	Tetrahidrofurano

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas apresenta uma evolução clinica essencialmente crônica, e é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como enfermidade negligenciada. A ocorrência da doença principalmente no continente americano, onde há mais de 140 espécies do inseto vetor (*Triatominae, Hemiptera, Reduviidae*), fez com que ela fosse conhecida também por tripanossomíase americana. No entanto, a doença tem sido cada vez mais diagnosticada em países não-endêmicos, efeito, sobretudo, do deslocamento de pessoas infectadas. A doença recebeu esse nome como homenagem ao pesquisador brasileiro e médico sanitarista dr. Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, que em 1909 descreveu a etiologia da doença e identificou seu agente etiológico, um protozoário hemoflagelado denominado *Trypanosoma cruzi* (*T. Cruzi*). [1]

A OMS estima aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas pelo parasita *T. cruzi*, provocando mais de 10 mil mortes anuais por complicações relacionadas à doença, e mais de 25 milhões de pessoas suscetíveis à ela, a maioria no continente americano, principalmente na América Latina, onde a doença tornou-se endêmica em 21 países, matando mais pessoas nesta região do que qualquer outra enfermidade transmitida por parasitas, como malária ou leishmaniose. [2]

A contaminação acontece principalmente pelo contato com as fezes do inseto vetor (conhecido como barbeiro), podendo também ocorrer por transfusão de sangue, transplante de órgão, ingestão de alimentos contaminados e transmissão congênita. Atualmente o vetor pertence a uma família de aproximadamente 130 espécies, das quais cerca de doze podem transmitir a doença. [3; 4; 5]

A infecção pelo parasita *T. cruzi* apresenta duas fases, aguda e crônica, para cada uma dessas as manifestações clínicas são bem diferentes. A fase aguda na maioria das vezes é bem discreta e assintomática, imperceptível; no entanto, apresenta manifestações oligossintomáticas ou sintomáticas. Quando sintomáticas, observa-se alteração bipalpebral unilateral (*sinal de Romaña*), e manifestações comuns a outras doenças como adenomegalia e hepatoesplenomegalia.[6]

A fase aguda pode levar à morte em casos graves, principalmente por meningoencefalite, manifestação clínica fatal na maioria dos casos em menores de dois anos. Os sintomas na fase crônica aparecem após um período de latência de 10 a 15 anos. Durante esse período os indivíduos não apresentam sintomas; após, cerca do 30% das pessoas cronicamente infectadas poderão apresentar alterações cardíacas e aproximadamente 10% poderão apresentar alterações digestivas, neurológicas ou mistas. A forma cardíaca é caracterizada por distúrbios de condução e insuficiência cardíaca, eventualmente pode ocorrer morte súbita por arritmia. A forma digestiva é caracterizada por um aumento exagerado do esôfago e cólon (megaesôfago e megacólon) e eventual hemorragia digestiva. Já a forma mista é caracterizada pela simultaneidade das formas cardíaca e digestiva.[7]

Quanto ao aspecto socioeconômico, a doença resulta ter grande impacto na América Latina. Somente no Brasil estima-se prejuízo de mais de 1,3 bilhões de dólares em salários e produtividade industrial decorrente de trabalhadores infectados pela doença de Chagas.[8] Em 2008, a Colômbia destinou cerca de 267 milhões de dólares ao tratamento de pacientes infectados. São mais de 7 milhões de pessoas do Sul dos Estados Unidos à Patagônia infectadas, e mais de 10 mil mortes anuais.[4]

Apesar das graves consequências socioeconômicas, as doenças tropicais não são vistas pela indústria farmacêutica como um mercado atraente para impulsionar investimentos no desenvolvimento de novos fármacos, pois quem mais necessita dos medicamentos não garante o retorno financeiro pretendido. Por isso, doenças como malária, leishmaniose, Tripanossomíase Africana e doença de Chagas são geralmente denominadas como "doenças negligenciadas" [9]

1.2 Doença de Chagas no Brasil

Apesar do elevado impacto econômico que a doença de Chagas provoca no Brasil, as estatísticas apresentam um lento avanço no seu controle e tratamento efetivo. No final dos anos 1970, 711 municípios de 18 estados foram identificados como zonas endêmicas. As de maior incidência e com maior risco de transmissão da doença são os estados da Bahia, Ceará, Minas Gerais, Alagoas, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Goiás,

Sergipe, São Paulo e Tocantins; dos quais Minas Gerais apresenta maior prevalência, além de ser o lugar onde foi descoberta a doença.[10]

Entre os anos 1979 e 2009, realizou-se um estudo de tendência em que se verificou que dos 27.560.043 óbitos analisados, 172.066 mortes tiveram a doença de Chagas como causa básica.[11]

No estado de São Paulo, no período de 1985 a 2006 foram identificados 40.002 óbitos relacionados à doença de Chagas, dos quais 34.917 (87,3%) como causa básica e 5.085 (12,7%) como causa associada.[12]

Entre os anos 2006 e 2010 foram notificados 799 casos de doença de Chagas aguda, com índice de letalidade de 2,25%. No estágio crônico, onde está a maioria dos chagásicos, 30 a 40% dos casos evoluem para formas graves de cardiopatia e/ou megaformações digestivas, o que provoca grande impacto nos sistemas de saúde pública.[13]

Figura 1: Áreas endêmicas com ações de controle no Brasil[7]

Fonte: Guia de Vigilância Epidemiológica (2005, p. 302).

Portanto, o controle e tratamento de pacientes e a redução da ocorrência da doença de Chagas é um grande desafio para América Latina. A busca por novos fármacos de forte indicação do efeito curativo, com ou sem baixo efeito tóxico, permitindo a identificação de compostos eficazes a baixo custo de produção é de extrema necessidade.[14; 15]

1.3 o Trypanosoma cruzi

O protozoário flagelado *T. cruzi*, da ordem cinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero Trypanosoma, é o agente etiológico da doença de Chagas. O parasita possui um complexo ciclo biológico do tipo heteroxênico, que envolve um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado e apresenta três formas principais distintas: (i) epimastigota, forma presente no vetor e em cultura axênica; (ii) tripomastigota, forma circulante e infectante, encontrada no hospedeiro vertebrado (tripomastigota sanguínea) e invertebrado (tripomastigota metacíclico); e (iii) amastigota, forma de replicação intracelular.[11; 16] O parasito passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos).[5]

O gênero *Trypanosoma* apresenta espécies que infectam vertebrados de todos os grupos (peixes, aves, répteis e mamíferos), tendo como principal vetor de transição os invertebrados hematófagos.[17]
Centenas de espécies de *Trypanosoma* foram observadas em infecção de mamíferos, com mais de uma podendo infectar o mesmo hospedeiro. Apenas as espécies *T. brucei gambienc e T. b. rhodesiense* na África, e *T. cruzi* e *T. rangeli* nas Américas, infectam o homem. Com exceção de *T. rangeli,* essas espécies são consideradas patogênicas para o homem.[18; 19]

Considerando o mecanismo natural de infecção pelo *T. cruzi*, os tripomastigotas eliminados nas fezes e urina do vetor, durante ou logo após o hematofagismo, penetram pelo local da picada e causam a contaminação. Em seguida, os parasitas são fagocitados e uma vez dentro da célula, ocorre a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária simples. Depois, ocorre a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas, que são liberados da célula hospedeira caindo no interstício. Esses tripomastigotas caem na corrente circulatória, atingem outras células de qualquer tecido ou órgão para cumprir novo ciclo celular ou são destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro. Podem ainda ser ingeridos por triatomíneos, onde cumprirão seu ciclo extracelular.[20]

No estômago do inseto os parasitas se transformam na forma epimastigota. No intestino médio, os epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples, sendo,

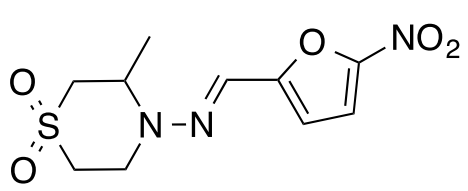
portanto, responsáveis pela manutenção da infecção no vetor. Na porção terminal do tubo digestivo, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas (infectantes para os vertebrados), sendo eliminados nas fezes ou urina. Normalmente, é essa a descrição clássica adotada para o ciclo do *T. cruzi*.[20]

1.4 Tratamentos da doença de Chagas

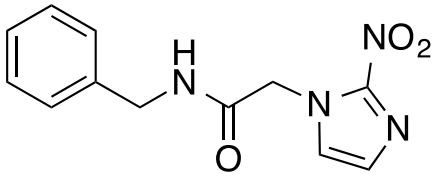
No que se refere ao tratamento, o caráter negligenciado da doença é evidenciado pela limitação das opções terapêuticas e o baixo investimento das empresas farmacêuticas. O caso da doença de Chagas é ainda mais grave, ao ponto de alguns pesquisadores a considerarem uma doença tropical "supernegligenciada", onde só o 5% do investido para doenças negligenciadas é destinado a doenças extremamente negligenciadas.[16] Os únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença são ativos apenas na fase aguda da doença e são os mesmos introduzidos há mais de 40 anos: nifurtimox (Lampit®) e benzonidazol (Rochagan®)(Figura 2). Devido à natureza empírica da descoberta e desenvolvimento do nifurtimox e do benzonidazol, esses fármacos foram registrados e utilizados clinicamente por vários anos sem um entendimento claro dos seus mecanismos de ação. Atualmente, sabe-se que a ação antiparasitária do nifurtimox está associada a produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (tais como aníons, superóxidos e peróxido de hidrogênio), resultantes da reação do oxigênio com metabólitos nitro-aníons instáveis produzidos a partir do grupo nitro presente na molécula. Entretanto, a citotoxicidade do benzonidazol não está associada a geração de níveis significantes de espécies reativas tóxicas de oxigênio; ao contrário, está provavelmente associada ao estresse redutivo, o qual envolve modificações covalentes de macromoléculas por intermediários de nitro-redução.[16; 21]

Ademais, o tratamento só resulta efetivo na fase aguda da doença. Há efeitos colaterais severos como anorexia, perda de peso, vômito, náusea e diarreia. Por serem os quimioterápicos teratogênicos, apresentarem alto custo, dentre outros motivos, a empresa Bayer AG diminuiu a fabricação do nifurtimox, produzido agora somente em El Salvador e já não mais comercializado no Brasil, fazendo com que o medicamento de primeira escolha para o tratamento da doença seja o benzonidazol, atualmente produzido no Brasil e distribuído por meio de solicitação junto ao Ministério de Saúde, não havendo distribuição ao mercado farmacêutico geral.[7]

Figura 2: Representação das estruturas químicas do nifurtimox e benzonidazol



Nifurtimox



Benzonidazol

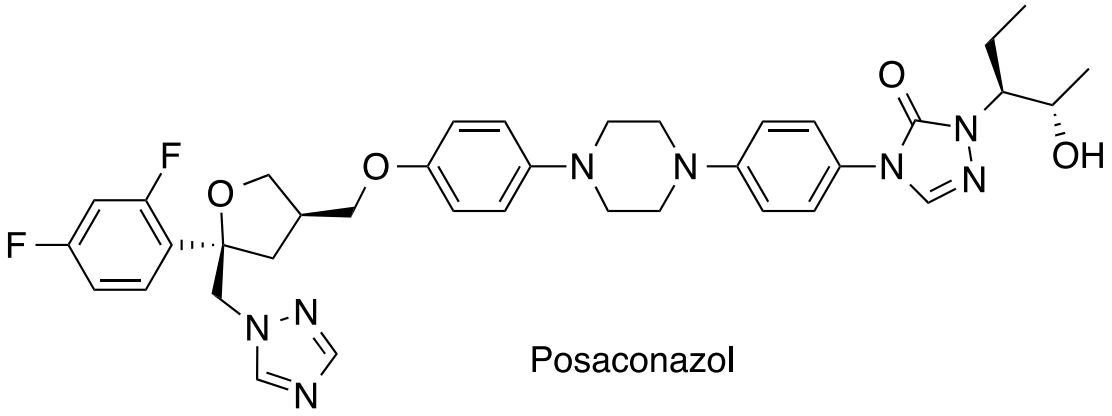
Fonte: Autoria propriá.

Um estudo feito no Brasil no ano 2013, publicado na revista *Plos One*,[7] mostrou que de 179 pacientes tratados com benzonidazol em fase aguda da doença de Chagas por via oral, e que tiveram um acompanhamento durante um período de 5 a 6 anos, ocorreu cura sorológica em 26,3%, mais evidente durante o quarto ano após o tratamento. Outros 2,7% evoluíram com cardiopatia crônica leve a moderada, e 73,7% persistiram com a doença.[7]

1.5 Perspectivas terapêuticas

No cenário terapêutico mais recente no tratamento da doença de Chagas, têm sido incorporados triazois em numerosos ensaios (em modelos *in vitro* e *in vivo*). Alguns desses compostos têm sido usados em ensaios clínicos, gerando novas expectativas no tratamento da doença. Um dos fármacos mais estudados dessa família é o posaconazol (fármaco comercial utilizado para tratamento de infecções invasivas) (Figura 3), que apresentou resultados promissores tratando a doença em modelos animais em ambas fases (aguda e crônica), porém não mostrou efetividade em ensaios clínicos, pois apresentou atividade nos testes em humanos frente ao *T. cruzi* mas comprovou-se que não consegue curar a doença sem o uso de medicamentos complementares.

Figura 3: Representação da estrutura química do posaconazol



Fonte: Autoria propriá.

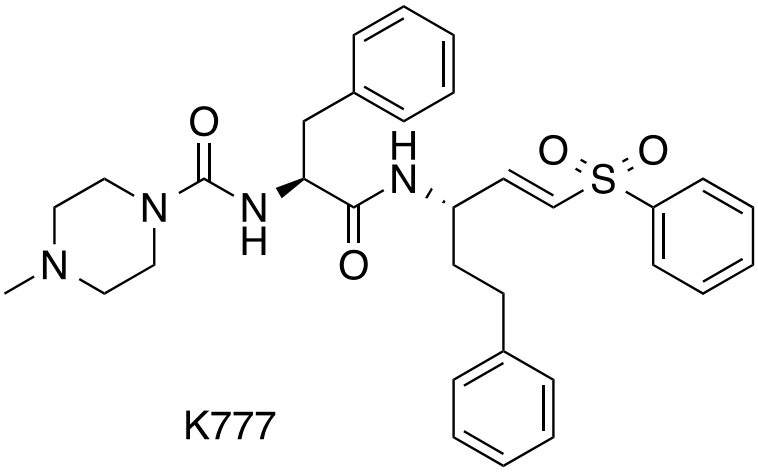
1.6 Cisteíno proteases como alvos terapêuticos para a doença de chagas

Estudos realizados na década de 1990 demonstram a eficácia terapêutica de inibidores de cisteíno proteases em modelos experimentais de doenças parasitárias como doença de Chagas e leishmaniose.[22; 23]

O composto K777 ou K11777 (Figura 4) é atualmente o inibidor de cisteíno protease mais estudado para o tratamento da doença de Chagas. Ele se liga irreversivelmente à cruzaína por meio da adição nucleofílica da cisteína catalítica ao grupo vinil sulfona presente em sua estrutura.[24] Esse inibidor foi capaz de bloquear as etapas de diferenciação celular e produziu um efeito letal sobre o parasita.[22] Engel e colaboradores descreveram as principais modificações ultraestruturais relacionadas à ação desse composto contra a forma epimastigota do *T. cruzi*, por meio do bloqueio do processamento autocatalítico da cruzaína no complexo de Golgi, acúmulo de material proteico não processado, choque osmótico e lise celular.[25]

Além disso, o K777 promoveu a cura parasitológica em estudos *in vivo* realizados em modelos de camundongos infectados com *T. cruzi*. O K777 não conseguiu avançar em estúdios pré-clínicos pelo fato de que ao se ligar irreversivelmente à cisteína catalítica das cisteíno proteases, ele apresentava efeitos *off-target,* inibindo cisteíno proteases homólogas presentes em nosso corpo, gerando efeitos adversos.[25]

Figura 4: Estrutura molecular K11777 (K777)



Fonte: Autoria Propriá.

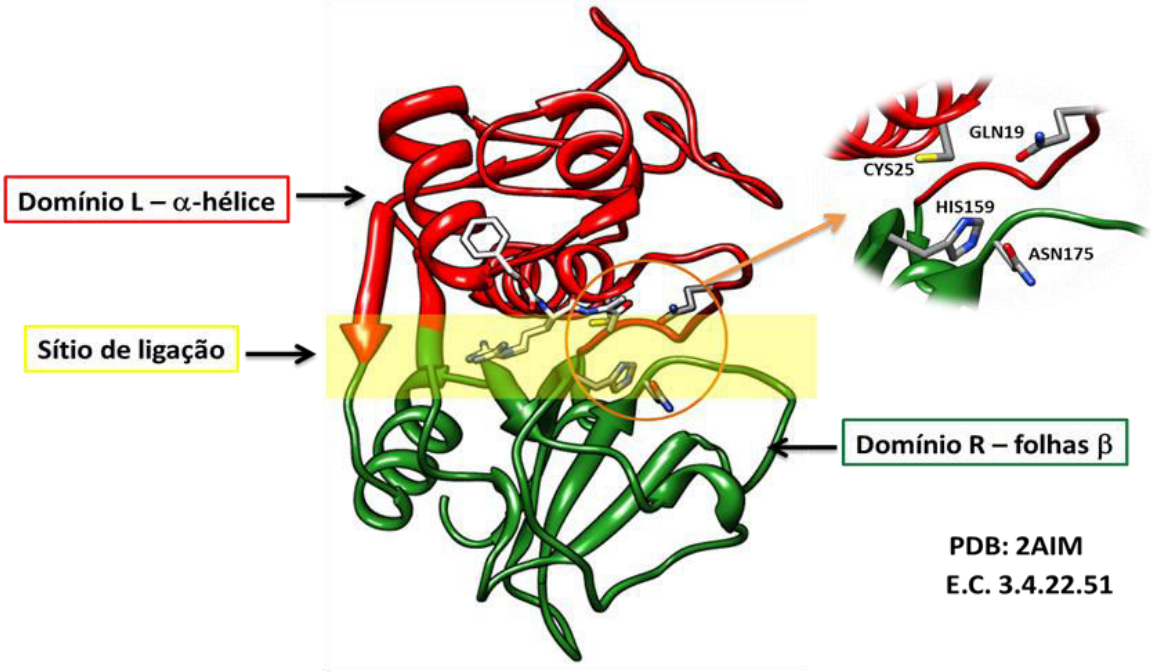
1.7 A enzima cruzaína

A enzima cruzaína é uma cisteíno protease chave no *T. cruzi*, pois é a principal protease deste, essencial para a sobrevivência do parasita. Essa enzima está envolvida em todas as fases do ciclo de vida do *T. cruzi* e pertence à superfamília papaína de cisteíno proteases, com estrutura e funções similares às enzimas humanas catepsina B, L, K, S, F e V.[5; 26; 27] Ela está envolvida na replicação, diferenciação celular do parasita e nutrição com a hidrólise de proteínas do hospedeiro, além de essencial para a infecção das células hospedeiras, metabolismo e imunoevasão (evasão da resposta imune).[28, 29-30]

A cruzaína catalisa reações de hidrólise de ligações peptídicas e seu número de classificação segundo a comissão de nomenclatura de enzimas (*Enzyme Commission*) é EC 3.4.22.51. Os números 3, 4 e 22 correspondem, respectivamente, à classe de hidrolases, à sua atuação em ligação peptídica e ao grupo de cisteíno endopeptidases, enquanto 51 é o número específico da cruzaína.[2]

A estrutura cristalográfica da cruzaína Figura 5 revela que ela é composta por uma cadeia polipeptídica de 215 resíduos de aminos, dobrada em dois domínios. Um domínio é principalmente helicoidal (domínio L), e o outro é composto por folhas β antiparalelas (domínio R). Para as enzimas da família da papaína, existe uma extensa fenda entre os dois domínios, em que está localizado o sítio ativo, sendo a tríade catalítica composta pelos resíduos Cys25, His159 e Asn175.[31]

Figura 5: Estrutura cristalográfica da cruzaína (PDB: 2AIM). Em destaque, os resíduos que participam do mecanismo catalítico



Fonte: Protein Data Bank PDB: 2AIM.

As proteases têm um papel importante em vários processos patológicos, pois estão implicadas em doenças como artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, infecções bacterianas e virais, câncer e doença de Alzheimer.[32]

Todas as cisteíno proteases têm em comum um sítio ativo que consiste de resíduos dos aminoácidos cisteína, histidina e glutamina. A cisteína e a histidina formam um par iônico estabilizado pela glutamina. [24]

A cruzaína possui provas de validação pré-clínica como um alvo de fármacos viável. Vários inibidores dessa protease, com diferentes esqueletos moleculares e mecanismos catalíticos, mostraram ser capazes de curar a infecção em modelos celulares, caninos e em ratos.[33, 34; 35] Inibidores seletivos desta enzima bloqueiam a proliferação do parasito epimastigota extracelular e amastigota intracelular, e suspendem a metaciclogênese (transformação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos).[34, 28, 36]

A cruzaína e demais cisteíno proteases são efetivamente moduladas por várias classes de inibidores covalentes baseados no estado de transição da reação catalisada pela enzima. Nestes compostos estão presentes grupos (*warheads*) contendo um átomo de carbono, susceptível ao ataque nucleofílico efetuado pela cisteína ativada presente no

sítio ativo da enzima. Este ataque, dependendo da natureza do *warhead*, pode promover a ligação dos compostos de forma irreversível e reversível. Usualmente, a inibição reversível envolve interação não covalente entre a enzima e o inibidor, mas, em alguns casos, a ligação covalente formada é lábil o bastante para ser hidrolisada e liberar as duas moléculas envolvidas.[12]

1.8 Síntese e modificações estruturais de substâncias bioativas

A síntese e modificação estrutural são essenciais na introdução de novos fármacos na terapêutica. O processo de modificação estrutural permite que as propriedades desejáveis em uma molécula sejam ressaltadas, mediante a retirada, substituição ou introdução de novos grupos químicos, cuja participação na atividade da molécula é determinante. A modificação estrutural, surgida no final do século XX, como suporte racional para o planejamento de novos fármacos, permitiu que este processo resultasse útil na introdução de fármacos na terapêutica. [37]

A introdução de um substituinte pode produzir modificações atingindo várias propriedades físico-químicas da molécula, como hidrofobicidade, densidade eletrônica, conformação estrutural, propriedades fármaco-cinéticas etc., cuja análise poderá orientar as sínteses a serem seguidas.[38]

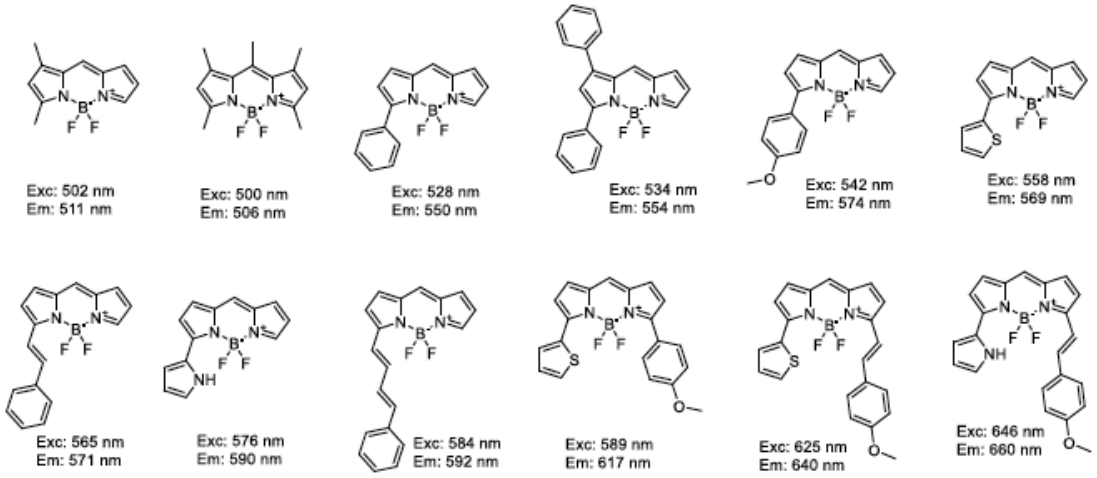
As relações estrutura-atividade (SAR) geralmente são determinadas com pequenas alterações na molécula protótipo, seguidas da avaliação do efeito sobre a atividade biológica. Pesquisas de SAR são realizadas preparando-se muitos análogos para serem então avaliados.[39] Essas alterações podem ser classificadas de acordo com o tamanho e conformação do esqueleto carbônico, natureza e grau de substituição e a estereoquímica do protótipo, por exemplo, e são realizadas considerando-se as atividades dos compostos com estruturas semelhantes e a natureza química e bioquímica do análogo desejado. Na química medicinal, os estudos de relação estrutura-atividade são fundamentados no efeito do substituinte em um determinado anel aromático, uma vez que mais de 50% dos fármacos ou compostos bioativos possuem este tipo de anel.[37]

1.9 Borodipirrometenos (bodipy) como sondas na microscopia de fluorescência

Para o desenvolvimento da química medicinal, a aplicação de novas tecnologias e técnicas de bioimagens é fundamental na descoberta de novas terapias. Esse desenvolvimento gera a necessidade de uso de novos fluoróforos com propriedades que favoreçam aplicações biológicas, a capacidade de absorção e emissão no infravermelho e infravermelho próximo, no espectro visível, na faixa biológica ideal de 600-800 nm,[40] que permita a interface *in-vivo* com a mínima interferência por parte de cromóforos endógenos, como heme, e uma ótima penetração da luz pelo tecido, com baixa dispersão de luz e mínimo dano ao tecido.[41; 42; 43; 44] Por essas e outras características específicas, borodipirrometenos (Bodipy) são compostos amplamente utilizados como marcadores moleculares no desenvolvimento de novas terapias; são relativamente estáveis e apresentam boa solubilidade em solventes orgânicos. Estruturalmente, Bodipy contém um núcleo 4,4-difluoro-4-bora-3a-4a-diaza-s-indaceno. Este núcleo confere a esse tipo de moléculas o acrônimo "Bodipy".[40] Bodipys estão entre os fluoróforos mais conhecidos e com aplicação mais difundida, apresentando um brilho intenso entre outras propriedades. Em geral, apresentam um pico intenso de absorção na região visível do espectro eletromagnético referente à transição S0-S1 (π-π^*) aproximadamente em 480 nm, com coeficiente de absortividade molar entre 40,000 a 80,000M^{-1} cm^{-1}. A transição vibracional S0-S1 é em geral observada como um ombro do pico principal, e a transição S0-S2 pode ser observada como uma banda larga e pouco intensa, de absorção abaixo de 480 nm.[45] A emissão é observada como um pico fino intenso, com desvio de Stokes pequeno.[45; 46; 47] Esse último fenômeno apresenta algumas exceções,[48; 49] e a fosforescência não é comumente observada, já que o estado tripleto dos Bodipys é raramente populoso.

A versatilidade química do núcleo dos Bodipy é outro ponto positivo na aplicabilidade desses compostos. A possibilidade de funcionalização em diferentes posições do núcleo aromático pode facilmente modificar suas propriedades. Visando modular as propriedades físico-químicas das moléculas, alguns exemplos são apresentados na Figura 6:[46]

Figura 6: Diferentes Bodipy usados e sua principal banda de absorção e emissão[40]



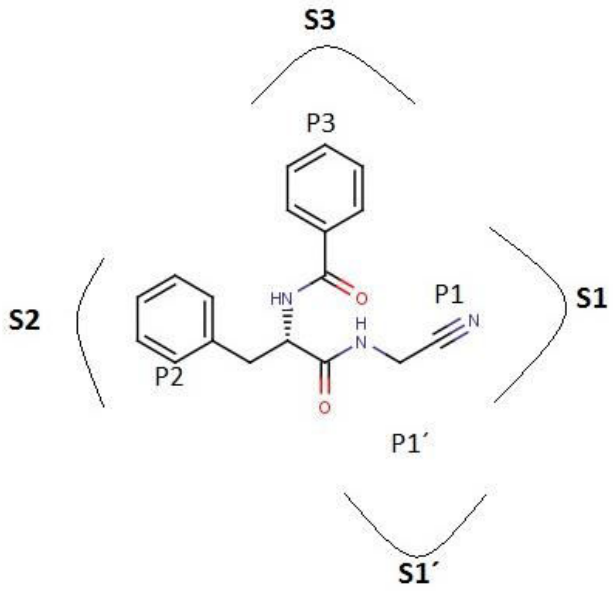
Adaptado: Boens 2012 [40]

1.9.1 Precedentes da pesquisa

O composto protótipo é um dipeptídeo que apresenta inibição em outras cisteíno proteases.[50] Compostos peptídeo miméticos tem demostrado ser inibidores de cisteíno proteases, especificamente da cruzaína.[24; 51; 52; 53] O composto protótipo **09** é um inibidor planejado para inativar a enzima cruzaína por ser peptídeo mimético e conservar a fenilalanina presente na molécula K11777, que é um dos fragmentos melhor reconhecidos no subsítio S2 da proteína.[54; 55] No lugar do vinil sulfona, que ocupa a região, do sítio S1, o composto protótipo possui um grupo ciano que interage com a cisteína do sítio catalítico das enzimas catepsinas K, L e S (enzimas da mesma família da cruzaína). [56; 57; 58; 59; 60]

Em um trabalho realizado no grupo de pesquisa Nequimed do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (Nequimed/IQSC-USP), este composto foi cocristalizado com a cruzaína, dando base para validação da orientação e modos de interação esperados no composto protótipo **09** com a cruzaína (Figura 7).[61]

Figura 7: Orientação do composto protótipo (**09**) no sítio catalítico da cruzaína.

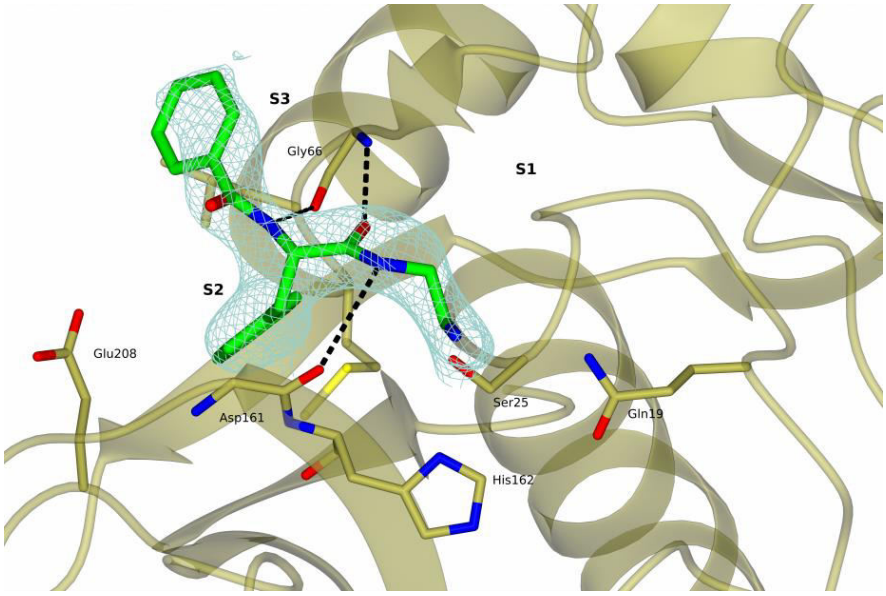


Fonte: Autoria própria.

O modo de interação (MOB) do inibidor protótipo **09**, mostrando posição, orientação e interações com o sítio catalítico da cruzaína, foi obtido por cristalografia por difração de raios X, em uma construção mutante (C25S) da cruzaína. Essa construção preserva todas as propriedades no sítio catalítico da enzima *wild type*, tendo porém a substituição de um grupo tiol da cysteína25 por uma hidroxila (Ser25) no resíduo catalítico. Esta estrutura cristalográfica foi determinada a 3A de resolução no grupo espacial P43212 pelo grupo Nequimed/IQSC-USP e está em processo de publicação. A estrutura mostra que o inibidor está presente no sítio catalítico com os grupos P2 e P3 do inibidor, interagindo muito eficientemente com os subsítios S2 e S3, conforme a hipótese original para a criação do composto. Além disso, a porção peptídeo-mimética da cadeia principal do inibidor está estabilizada por três ligações de hidrogênio com os aminos Gly66 e Asp161 (considerados resíduos de reconhecimento no sítio catalítico da enzima). A homofenilalanina da posição P2 do inibidor interage com os resíduos Leu67, Met68, Ala138 e Leu160 do subsítio S2 (importante para a seletividade da enzima) por interações hidrofóbicas. A porção P3 do inibidor interage apenas com a Leu67 do subsítio S3, um subsítio grande, superficial e com poucos pontos de ancoragem. A nitrila não está covalentemente ligada no resíduo catalítico da

enzima, lembrando que se trata de uma enzima mutante, uma serina no lugar da cisteína catalítica, que em pH 7,5 a hidroxila estaria protonada, não havendo possibilidades de uma ligação covalente. Mas com este MOB (Figura 8) é perfeitamente válido assumir que o inibidor na enzima *wild type* ativa estaria covalentemente ligado assumindo as mesmas interações intermoleculares, justificando sua alta potência. [54]

Figura 8: Estrutura de raios X do modo de interação do composto protótipo (**09**) cocristalizado com a cruzaína mutante (C25S)



Fonte: Fernandes[54].

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Sintetizar inibidores da enzima cruzaína que permitam mapear seu sítio catalítico e estudar o efeito destes compostos frente ao parasita *T. cruzi.*

2.2 *Objetivos específicos*

- Utilizando a síntese orgânica, realizar modificações no composto protótipo, alternando grupos que possam levar ao aumento na seletividade e potência frente à enzima cruzaína, permitindo assim mapear o sítio catalítico desta enzima.
- Sintetizar os mais potentes inibidores e incluir neles sondas fluorescentes do tipo Bodipy que permitam estudar a interação dessas moléculas frente a células humanas e ao parasita *T. cruzi*.
- Determinar a atividade tripanocida dos composcos frente ao parasita *T. cruzi*, mecanismo de morte celular, estudos de acumulação, localização e colocalização.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Sínteses dos compostos

3.1.1 Reagentes e solventes

Para a síntese dos compostos, os solventes utilizados foram adquiridos das empresas Synth, Sigma-Aldrich e Vetec. Quando necessários, foram secados sob peneira molecular de 3 Å (20% m/v), segundo os dados da Tabela 1.

Os reagentes utilizados para a síntese foram adquiridos das empresas Synth, Enamine, Aldrich, Merck e Thermofisher, com pureza superior a 97% e utilizados conforme recebidos.

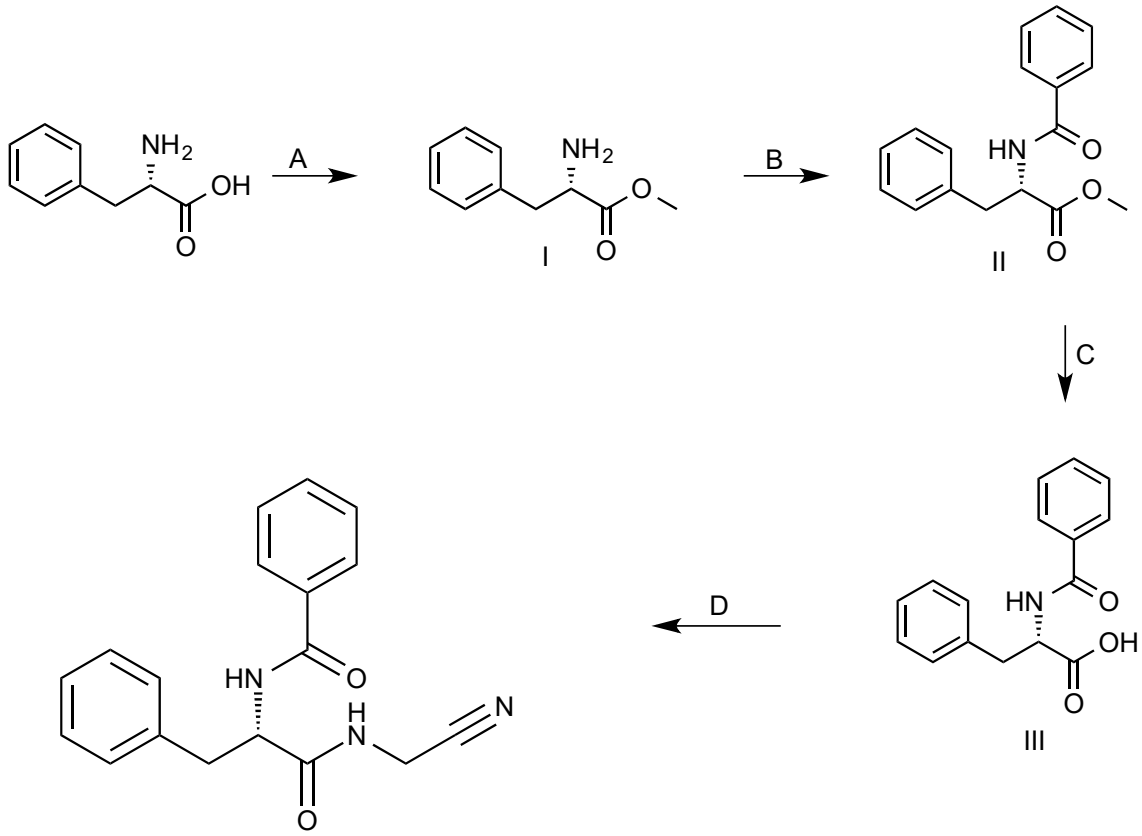
Tabela 1: Condições de secagem de solventes sob peneira molecular[62]

Solvente	Conteúdo de água (ppm) 0 h	Conteúdo de água (ppm) 24 h	Conteúdo de água (ppm) 48 h	Conteúdo de água (ppm) 72 h
THF	107,8 ± 0,7	14,7 ± 0,3	6,1 ± 0,2	4,1 ± 0,1
DCM	22,4 ± 1,2	0,1 ± 0,1	------	-----
MeOH	175,1 ± 0,4	28,1 ± 0,4	23,1 ± 0,6	19,2 ± 0,6
EtOH	1428,3 ± 3,8	119,8 ± 0,7	25,0 ± 0,7	20,5 ± 0,5

3.1.2 Síntese da molécula protótipo (composto 09)

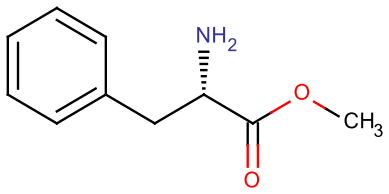
A síntese do composto protótipo foi realizada seguindo uma rota utilizada em trabalhos prévios no laboratório, representada na Figura 9.

Figura 9: Rota sintética para obtenção da molécula protótipo (composto **09**)[5]



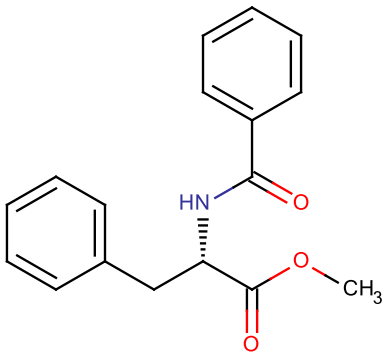
Reagentes e condições: a) $SOCl_2$, MeOH, 12 h. t.a.; b) cloreto de benzoila, TEA, THF, 0 ºC 12 h.; c) LiOH, THF, H_2O, 4 h t.a.; d) aminoacetonitrila, Hatu, Diea, DMF, t.a. 22 h

3.1.3 Protocolo de reação da molécula protótipo (composto 09)

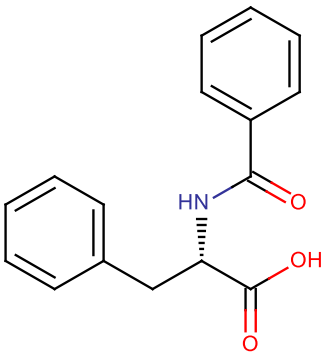


Metil (2s)-2-amino-3-fenilpropanoato ***(I)***.[63] Uma solução de fenilalanina (6,60 g, 40 mmol) em metanol seco (80 mL) a -10 °C foi adicionado $SOCl_2$ (1,2 equiv., 48 mmol, 4 mL) sem permitir que a temperatura aumentasse de 5 °C. Depois da adição, o banho frio (gelo, NaCl) foi retirado, e a reação deixada em agitação à temperatura ambiente durante 12h. Posteriormente, foi levado a refluxo por duas horas, e a mistura de reação foi seca a vácuo e lavada com éter. Em seguida, filtrou-se a pressão reduzida,

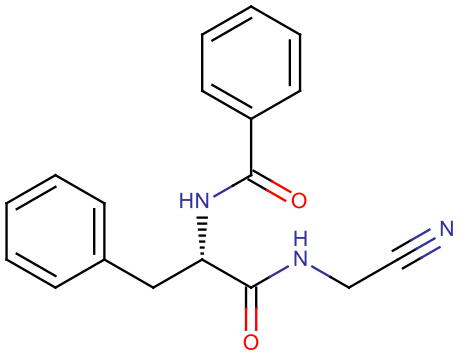
a fim de se obter o produto como um sólido branco (6,8 g) com um rendimento de 95%. O produto foi suficientemente puro para ser usado na seguinte reação, sem necessidade de qualquer purificação adicional: Pf 150-151 °C (valor da literatura 158-160 °C).[63] IV (KBr) 2985, 2838, 1750, 1580, 1494, 1242 cm^{-1}. ^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 3,09 (dd, *J* = 14,0 7,5 Hz, 1H), 3,20 (dd, *J* = 14,0 5,8 Hz, 1H), 3,64 (s, 3H), 4,22 (dd, *J* = 7,3 6,0 Hz, 1H), 7,28 (m 5H).



(S)-N-(acyl)-amino acid methyl éster ***(II)***.[56] A uma solução do éster metílico da fenilalanina (1,5 g 7,0 mmol) em THF seco sob peneira molecular, foi adicionado Et_3N (2 ml 15,4 mmol) a 0 °C. O cloreto de benzoílo (0,9 ml 7,7 mmol) foi adicionado lentamente, em seguida, o banho de gelo foi retirado e a mistura de reação mantida em agitação até o consumo total do material de partida (monitorado por CCD). A mistura de reação foi lavada com 1 M HCl, solução saturada de $NaHCO_3$ e seca sob Na_2SO_4. O solvente foi evaporado a vácuo, para se obter o produto como um sólido branco, que foi purificado em coluna cromatográfica (sílica gel, hexano/acetato de estila 1/1) (0,90 g 3,07 mmol) P.F. 81-82 °C (valor da literatura 81-83 °C.). IV (KBr) 3315, 3024, 2946, 1738, 1637, 1531, 1214, 697 cm^{-1}. ^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 3,13 (ddd, *J* = 23,8 13,8 7,7 Hz, 2H), 3,63 (s, 3H), 4,67 (ddd, *J* = 10,0 7,9 5,4 Hz, 1H), 7,18 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H), 7,32 – 7,23 (m, 4H), 7,45 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,45 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,52 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,83 – 7,74 (m, 2H), 8,82 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H).



(2s)-3-fenil-2-(ácido propanoico) fenilformamido ***(III).*** A uma solução do intermediário II (0,68 g 2,4 mmol) em THF (8 mL), foi adicionado gota a gota uma solução de hidróxido de lítio (LiOH) (0,165 g 7,2 mmol) em água. A mistura de reação foi mantida em agitação por 4h, concentrada sob pressão reduzida, em seguida foi levada a pH 2~3 com uma solução 4 mol L^{-1} de ácido clorídrico em 1,4 dioxanosal. Logo após, a solução foi seca com pressão reduzida e lavada com éter, o produto foi obtido como um sólido branco e usado na seguinte etapa sem purificação adicional: IV (KBr) 3323, 3059, 1615, 1535, 1413, 698 cm^{-1}. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO) δ 3,04 (dd, *J* = 13,3 6,6 Hz, 1H), 3,21 (dd, *J* = 13,3 4,8 Hz, 1H), 4,28 (dd, *J* = 11,7 6,6 Hz, 1H), 7,13 – 7,06 (m, 1H), 7,20 – 7,14 (m, 4H), 7,41 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,48 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,71 – 7,66 (m, 2H), 7,73 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H).



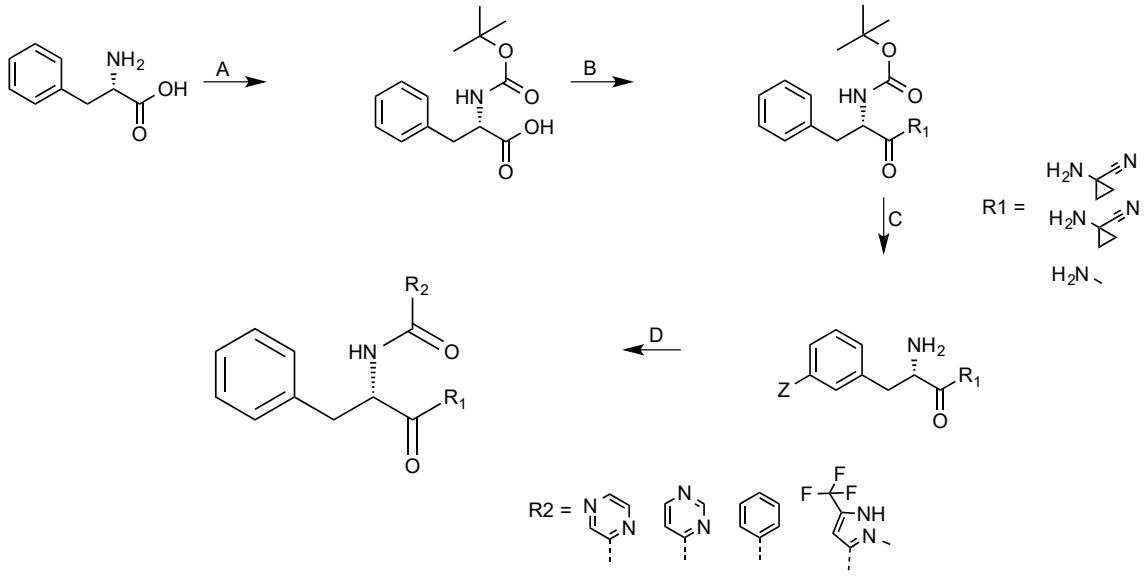
*(2s)-N-(cianometil)-3-fenil-2-(fenilformamido) propanamida (***composto 09***).*[50] O intermediarion III (0.2 g 0,74 mmol), O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (Hatu) (0,306 g 0,81 mmol) e N-etildiisopropilamina (Diea) (0,144 mL 0,81 mmol) foi dissolvido em DCM (20 ml). Após 30 minutos, adicionou-se sal hidro clórica do aminoacetonitrila (0.071 g 0,76 mmol). A solução resultante foi agitada à temperatura ambiente por 24 horas, a mistura de reação foi

diluída em EtOAc, lavada com água (10x), 1N NaOH (2x), 1N HCl (1x) e concentrada a vácuo. A purificação foi feita por coluna cromatográfica (sílica gel, hexano/acetado de etila/1:1). O produto foi obtido como um sólido (1,53 g 0,47 mmol 63%). P.F. 179-180 °C. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 3,02 (dd, 13,6 10,8 Hz, 1H), 3,14 (dd, 13,7 4,3 Hz, 1H), 4,17 (d, 5,6 Hz, 2H) , 4,70 (ddd, 10,7, 8,4, 4,4 Hz, 1H), 7,17 (t,7,3 Hz, 1H) , 7,26 (t, 7,5 Hz, 2H), 7,34 (d, 7,3 Hz, 2H), 7,45 (t, 7,4 Hz, 2H) , 7,52 (t, 7,3 Hz, 1H) , 7,84 – 7,78 (m, 2H) , 8,69 (d, 8,3 Hz, 1H), 8,79 (t, 5,5 Hz, 1H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO-d6) δ 27,62 37,25 55,22 117,32 127,11 127,49 128,75 128,87 129,35 132,30 133,53 137,24 168,21 172,88 IV (KBr) 3299, 3060, 2236, 1673, 1636, 1532, 1326, 693 cm^{-1}. HRMS (ESI (+)) Calcd. [C18H17N3O2] 307,1320, presente: 308,1387 [M+H].

3.1.4 Modificações estruturais do composto protótipo

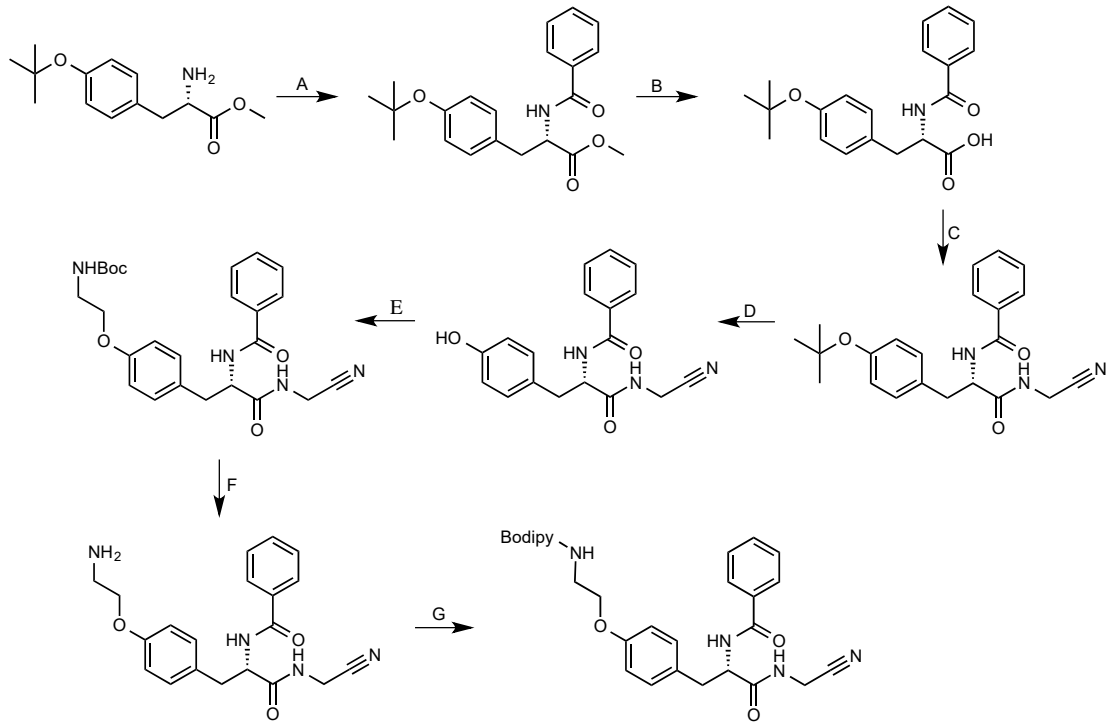
Os compostos foram sintetizados usando duas principais rotas sintéticas, nas quais foi necessário fazer alterações pertinentes para cada substrato. A primeira rota sintética utilizada permitiu a obtenção do composto prototípico e seus derivados (Figura 10). A segunda rota utilizada Figura 11 permitiu obter os compostos 07 09, marcados com uma sonda fluorescente da família Bodipy (compostos 07B e 09B).

Figura 10: Rota sintética empregada para síntese dos compostos derivados do protótipo



Reagentes e condições: a) BOC_2O, $NaHCO_{3(aq)}$, TFH 4 h. 0 ^{0}C – t.a.; b) aminonitrile derivado, Hatu, DIPEA, DMF, t.a. 22 h.c, ou IBCF, DCM Et3N diazometano; c) ácido fórmico 18 h.; d) correspondente ácido, Hatu, DIPEA, DCM, t.a. 22 h

Figura 11: Rota sintética empregada para síntese dos compostos marcados com sonda fluorescente



Reagentes e condições: a) ácido benzoico, Hatu, THF, Et_3N, 0 °C – rt 18 h.; b) $NaHCO_3$, MeOH, 6 h rt; c) aminoacetonitrila, EDC, HOBT, THF, Et_3N 0 °C – rt 18 h.; d) ácido fórmico 30 min rt; e) (Boc-amino) ethil brometo, K_2CO_3 ACN 80 °C; f) ácido fórmico 12 h rt; g) Bodipy 630/650, DMF, Et_3N rt overnight

3.2 Purificação dos compostos por HPLC semi-preparativo

As moléculas finais foram purificadas antes das análises bioquímicas e biológicas com finalidade de garantir uma pureza maior do que 95%. Os métodos desenvolvidos para purificação das moléculas foram feitos em um sistema de HPLC que consistiu de: bomba JASCO modelo PU-980, automostrador Waters 717 Plus, usando 2000 µl loop, detector e coletor de frações UV/VIS modelo JASCO UV-975, programado entre 200 e 800 nm; O sistema foi controlado pelo software *Millennium 2010*.

Método A

A análise de pureza enantiomérica dos compostos foi realizada a 35°C (forno da coluna), usando o par de colunas analíticas de celulose e semipreparativas da Phenomenex (analítica: 5 µm, 250 mm, 2,0 mm diâmetro interno (DI); semiprepatativa: 5 µm, 250 mm, 4,6 mm I.D), por eluição isocrática com um fluxo de 0,5 mL min^{-1}

(analítica) e 2,36 mL min^{-1} (semipreparativa). A composição da fase móvel foi acetonitrila: água (60:40) (v/v). Todos os solventes foram previamente filtrados em filtro de 0,45 µm (Millipore) e degaseificados em banho ultrassônico, os volumes de injeção foram de 10 µL (analítica) e 1000 µL (semipreparativa); Os cromatogramas foram obtidos por 20 min e o detector programado na região de 200 a 800 nm.

Método B

A análise de pureza foi realizada a 35°C (forno da coluna), usando a coluna analítica C8 da Phenomenex (5 µm, 250 mm, 2,0 mm I.D), por eluição isocrática com um fluxo de 0,5 mL min^{-1}; a composição da fase móvel foi variada entre 50 e 70% de metanol. Todos os solventes foram previamente filtrados em filtro de 0,45 µm (Millipore) e degaseificados em banho ultrassônico, os volumes de injeção foram de 10 µL, os cromatogramas foram obtidos por 20 minutos e a detector programado na região de 200 a 800 nm.

3.3 Caracterização dos compostos obtidos

Para o monitoramento do andamento das reações foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD), com placas cromatográficas da empresa Fluka, com indicador de fluorescência (254 nm) e com gradientes dos sistemas de solventes de diferentes polaridades, permitindo detectar a formação dos produtos em reação dos reagentes iniciais. A purificação dos compostos foi feita por recristalização nos solventes adequados e, quando necessário, por cromatografia em sílica gel, usando sílica da empresa Fluka (tamanho de poro 60Å e tamanho de partícula 35-75 µm).

Para a caracterização espectroscópica (UV-VIS) dos compostos foi utilizado o espectrofotômetro (HITACHI U-2800).

Para a caracterização estrutural dos compostos foi obtido o espectro de hidrogênio ^{1}H e ^{13}C no equipamento de ressonância magnética nuclear (RMN) da empresa Agilent Technologies, modelos 500/54 Premium Shield e 400/54 Premium Shield no CAQUI.

3.4 Ensaios bioquímicos

3.4.1 Reagentes e solventes

Os reagentes fosfato de sódio monobásico e dibásico, etilenodiamino tetra-acético (EDTA), dimetilsulfóxido (DMSO), Triton-x100, acetato de sódio, glicerol, cloreto de sódio e carbobenzoxi-Phe-Arg-amida-4metilcumarina(ZFRMCA) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O reagente Ditiotreitol (DDT) foi adquirido da empresa USB Corporation, com alto grau de pureza. Todos os reagentes têm certificação do fabricante de pureza > 99%. Nenhuma purificação/avaliação da integridade adicional foi realizada.

Os ensaios bioquímicos foram feitos utilizando o fluorímetro Synergy HTMicroplate Nender da Biotek. Utilizou-se também uma placa de 96 poços; os filtros de banda de excitação e emissão foram de 355 nm e 460 nm respectivamente. O volume final de cada poço foi de 200 µL e as medições para cada poço foram feitas em duplicada.

3.4.2 Inibição das enzimas cruzaína para determinação de IC_{50}

Solução stock da enzima cruzaína: tampão fosfato de sódio 100 mM em pH 6,3, 100 mM de NaCl, 10 mM EDTA, 5,0% v/v de DMSO, 5,0 mM de DTT e Triton X-100 0,01% v/v. A concentração da enzima utilizada foi 2,0 nM e do substrato ZFRMCA 2,0 µM.

Os valores de concentração para inibir 50% da atividade enzimática (IC_{50}) foram determinados pela curva dose-resposta. A concentração dos inibidores nos ensaios variam de 10 a 1000 nmol L^{-1}. Essas concentrações, foram obtidas segundo um esquema de diluição seriada na proporção de diluição 2:1 , partindo da concentração mais alta de 10 mmol L^{-1}. O procedimento utilizado foi incubar a enzima na solução tampão contendo DTT por 5 min; em seguida o inibidor foi incubado também por 5 min antes de adicionar o substrato; a hidrólise do substrato foi acompanhada por fluorescência com excitação em 355 nm e emissão em 460 nm durante 6 min. A velocidade foi determinada pela lei da velocidade inicial. Todos os experimentos foram feitos no mínimo em triplicata para avaliação do erro experimental. As curvas de percentual de

inibição em função da concentração das moléculas testadas foram ajustadas na curva dose-resposta, utilizando o programa Sigmaplot 12.0.

Os compostos a testar foram distribuídos em uma placa de 96 poços: as soluções dos compostos dissolvidos em DMSO foram colocadas na placa no volume de 7,5 µL. Na coluna 01 da placa pôs-se o DMSO puro (branco) e adicionou-se nas 11 colunas subsequentes as soluções em diferentes concentrações de cada composto. Nas duas primeiras filas pôs-se E64 (inibidor padrão) em concentrações entre 2 nmol L^{-1} e 2 µmol L^{-1}, com a finalidade de monitorar a concentração da enzima no correr dos ensaios, e nas seguintes seis filas puseram-se três compostos, cada um em triplicata.

3.5 Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram desenvolvidos no Laboratório do Grupo de Fotossensibilizadores do IQSC-USP, sob orientação da Profa. Janice Rodrigues Perussi.

3.5.1 Células utilizadas para o estudo de acumulação, citotoxicidade e infecção celular

Nos ensaios biológicos utilizou-se a linhagem de células endoteliais de cordão umbilical HUV-EC-C (Huvec, ATCC CRL-1730), células epiteliais de rim de macaco verde africano (Vero, ATCC CCL-81), além das células J774 monócitos de camundongo cultivadas aderidas em garrafas de polipropileno em meio de cultura RPMI 1640 (Huvec e J774) e meio mínimo essencial modificado por Dulbeco (DMEM) para a linhagem Vero acrescidos com soro fetal bovino (SFB) (10% para Vero e Huvec e 20% para J774) e antibióticos penicilina (10.000 U.I. mL^{-1}) e estreptomicina (10 mg mL^{-1}). As células foram mantidas em estufa a 37 °C, 95% de ar e 5% de CO_2. As manipulações celulares realizaram-se em ambiente previamente esterilizado com radiação ultravioleta, numa capela de fluxo laminar, com materiais estéreis.

3.5.2 Parasitos

As formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Sergio de Albuquerque da Escola de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. Esses parasitos foram mantidos em cultura (repiques semanais) em meio LIT (*Liver Infusion Triptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1%

hemina (Sigma), penicilina (10.000 U.I. mL^{-1}) e estreptomicina (10 mg mL^{-1}) (Cultilab)e quando necessário foram criopreservados e armazenados em freezer a -180 °C.

Os parasitas da forma tripomastigota foram obtidos mediante transformação da forma epimastigota pelo processo de metaciclogênese e posteriormente cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% hemina (Sigma), penicilina (10.000 U.I. mL^{-1}) e estreptomicina (10 mg mL-1) (Cultilab), mantidos em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2 por 7 dias, juntamente com células da linhagem J774, as quais são infetadas com os parasitas e posteriormente (entre 5 e 12 dias), após lise das células J774, um número maior de parasitas na forma tripomastigotas é liberado no meio.

3.5.3 Avaliação da citotoxicidade

Para os ensaios citotóxicos utilizou-se células Vero em placas de cultura de 96 poços contendo 1×10^5 células mL^{-1} cada um, incubadas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO_2 por 24 h. A seguir, o meio de cultura foi removido por aspiração e a monocamada celular lavada com PBS. Após esse período, os compostos em diferentes concentrações (100; 50; 25; 10; 1 μg mL^{-1}) foram adicionados e incubados (junto com o controle sem composto) por 24 horas. Em seguida ao período de incubação, o meio contendo os compostos foi removido por aspiração e os poços lavados com PBS; em seguida as células foram tratadas com 3-4, 5–dimetiltiazol–2–il)-2, 5- difenil brometo de tetrazólio (MTT) na concentração 0,25 mg/mL. Após 3 h de incubação, o MTT foi removido lentamente, evitando-se danificar os cristais de formazan obtidos; estes foram dissolvidos em 100 μL de álcool etílico e posteriormente em 100 μL de uma mistura de PBS e álcool isopropílico (1:1). A absorbância proveniente da solução de cada poço foi determinada no leitor de placas (Biotek-Synergy HT) com filtro em 570 nM; Os valores obtidos foram tratados utilizando o programa GraphPrism 6.

3.5.4 Acumulação intracelular por microscopia confocal de fluorescência

Com a finalidade de evidenciar e estudar a acumulação intracelular dos compostos nas células em função do tempo, foram realizados ensaios por microscopia de fluorescência confocal. Primeiramente, uma suspensão celular de 5×10^4 células mL^{-1} (Huvec) foi incubada em lâminas de cultivo de oito poços durante 24 horas. Realizou-se

ensaios em duplicata, deixando dois poços como controle e nos outros seis poços o composto a ser avaliado; incubou-se a uma concentração de 10 μmol L^{-1} por três tempos diferentes: 20, 30 e 60 minutos. Após esses períodos de incubação, o meio celular foi retirado, as células lavadas com PBS e em seguida analisadas no microscópio confocal (LSM780 – Carl Zeiss). As moléculas foram excitadas em 540 nm e a emissão de fluorescência foi coletada em 650 nm (vermelho), analisadas numa objetiva de 40X.

3.5.5 Avaliação da ação tripanocida

Parasitas na forma epimastigota do *T. cruzi* (concentração entre 5×10^6 e 1×10^7 parasitas mL^{-1}) foram colocados em placas de 96 poços em meio LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% hemina (Sigma), penicilina (10.000 U.I. mL^{-1}) e estreptomicina (10 mg mL^{-1}) (Cultilab), na presença dos compostos a testar, em diferentes concentrações (80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 μg mL^{-1}). Em todas as análises utilizou-se o benzonidazol (Sigma) como controle positivo. Após 24 h os parasitas viáveis foram contados em câmara de Neubauer. As diferentes concentrações dos compostos foram testadas com a finalidade de avaliar a concentração que reduz em 50% a viabilidade dos parasitas (IC_{50}). Os valores de IC_{50} foram determinados com base nas porcentagens de inibição do crescimento e viabilidade dos parasitas. Os valores de IC_{50} para os compostos foram determinados mediante regressão não linear utilizando o programa GraphPrism 6.

3.5.6 Microscopia eletrônica de varredura

Parasitas na forma epimastigota do *T. cruzi* (5×10^6 parasitas/mL) em meio LIT foram dispostos lamínulas de polipropileno de 1 cm^2 dispostas no fundo de cada um dos poços de placas de 24 poços e submetidos ao tratamento com os compostos a serem testados na concentração igual ao $IC_{50,}$ mantidos por 24 h a 28 °C. Após esse período, os parasitas foram concentrados na centrífuga de placas (Benchmark Scientific) operando a 2000 rpm por 10 min, lavados com solução salina e fixados por 20 min–à temperatura ambiente, com uma solução de 4% de formaldeído e 2,5% de glutaraldeido, em tampão fosfato de sódio pH 7,4. A seguir, as amostras foram lavadas com PBS e submetidas à desidratação em soluções de concentração crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) por 5 min em cada concentração; na sequência, foram metalizadas com ouro e

observadas em microscópio eletrônico de varredura. Este procedimento permitiu observar variações na morfologia dos parasitas tratados e não tratados, assim como evidenciar o processo de metaciclogênese.

3.5.7 Marcação de células similar à apoptose e necróticas

Parasitas na forma epimastigota (5×10^6 parasitas mL^{-1}) em meio LIT foram tratados com os compostos a serem testados na concentração igual ao IC_{50}, mantidos por 24 h a 28 °C. Após esse período os parasitas foram concentrados por centrifugação e ressuspensos em meio fresco; em seguida, marcados com 20 µL de uma solução 100 µg/mL de laranja de acridina e brometo de etídio em PBS. Após cinco min, os parasitas foram lavados com PBS para retirar o excesso dos corantes e visualizados no microscópio de fluorescência Olympus BX41, na objetiva de 100×.

3.5.8 Colocalização intracelular por microscopia confocal

Com finalidade de evidenciar e estudar a localização intracelular de nossos compostos, foram realizados ensaios por microscopia confocal, utilizando os marcadores *Mitotracker Green* e *Lysotracker Green* (ThermoFisher Scientific). Os ensaios foram feitos em duplicata; primeiramente, uma suspensão celular (5×10^6 parasitas mL^{-1}) foi centrifugada (2000 rpm 10 min) para formar o *pellet*; o sobrenadante foi removido por aspiração e meio fresco contendo o composto a ser testado em uma concentração de 10 µmol L^{-1} foi adicionado. Após 1 h de incubação os parasitas foram centrifugados novamente e o *pellet* formado lavado com PBS e resuspendido em duas soluções diferentes, uma contendo Lysotracker Green (75 nmol L^{-1}) em meio DMEM sem soro e a outra fração ressuspendida em Mitotracker Green (200 nmol L^{-1}) em meio DMEM sem soro. Ambas as frações foram incubadas por duas horas. Posteriormente, o pellet foi formado por centrifugação e o sobrenadante removido; em seguida, os parasitas foram lavados com PBS e ressuspendidos em meio DMEM sem soro e sem vermelho fenol. Para imobilização dos parasitas, 10 µL de cada solução foi adicionado em uma lamínula contendo Cellteck (Corning ™) e finalmente as amostras foram analisadas no microscópio confocal (LSM780 – Carl Zeiss). As moléculas foram excitadas no

comprimento de onda de 540 nm e sua visualização de fluorescência foi feita em 650 nm (vermelho), analisadas numa objetiva de 40X.

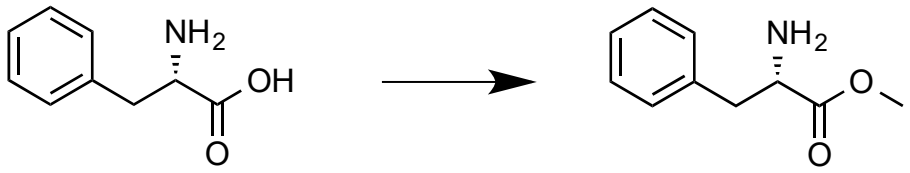
4 Resultados e Discussão

4.1 Composto protótipo

O composto protótipo foi obtido em uma rota sintética de quatro reações previamente descritas;[57; 60; 64; 65] cada uma das reações será discutida e apresentado o mecanismo proposto.

4.1.1 Reação de formação do éster metílico da L-fenilalanina

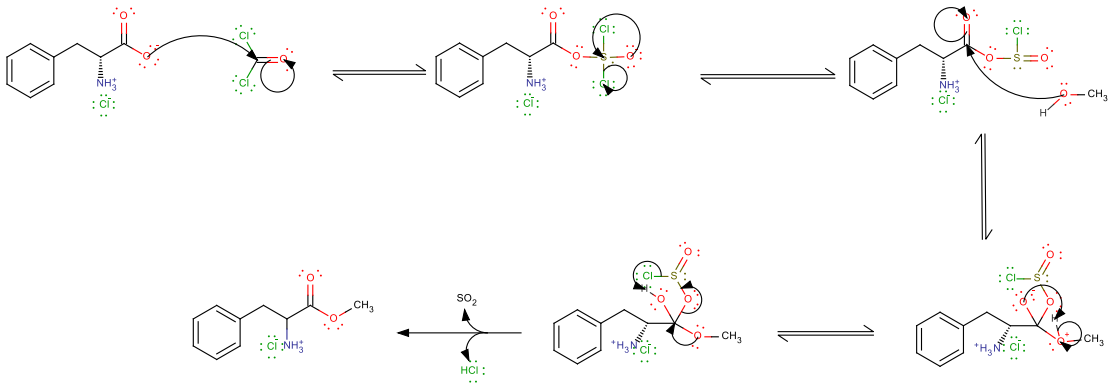
Esquema 1: Preparação do éster metílico da L-fenilalanina



Reagentes e condições: $SOCl_2$, MeOH, 12 h. t.a.

Foi proposta, inicialmente, a ativação do nitrogênio no amino pela abstração do próton por parte da amina terciária utilizada como base, deixando os elétrons no nitrogênio disponíveis para atacar a carbonila do cloreto de benzoíla. Posteriormente, eliminou-se o cloreto, o qual sabe-se que é um bom grupo abandonador, que promove transferência de prótons, formando o éster desejado. A reação é bastante limpa, pois os subprodutos são gasosos (HCl e SO_2). O produto final é um sólido obtido como sal hidroclórico em excelente rendimento (95%). A formação do produto foi confirmada pelo ponto de fusão (PF) do produto (150-154 °C), o qual coincide com o valor citado na literatura (158-160 °C), e foi totalmente diferente do ponto de fusão do material de partida (268-270 °C).

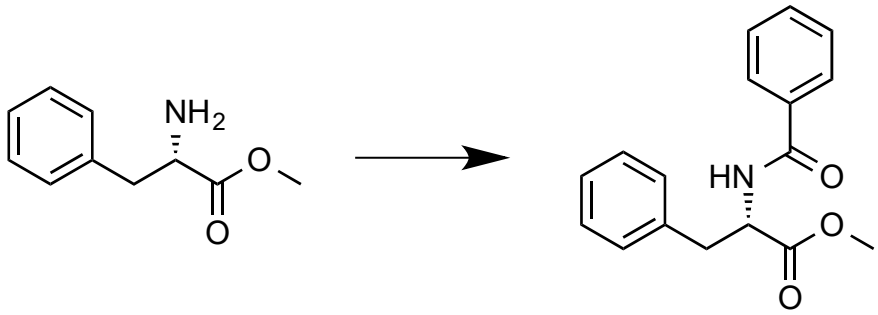
Esquema 2: Mecanismo de esterificação da fenilalanina



Fonte: Autoria própria.

4.1.2 Benzoilação

Esquema 3: Reação de benzoilação do intermediário obtido

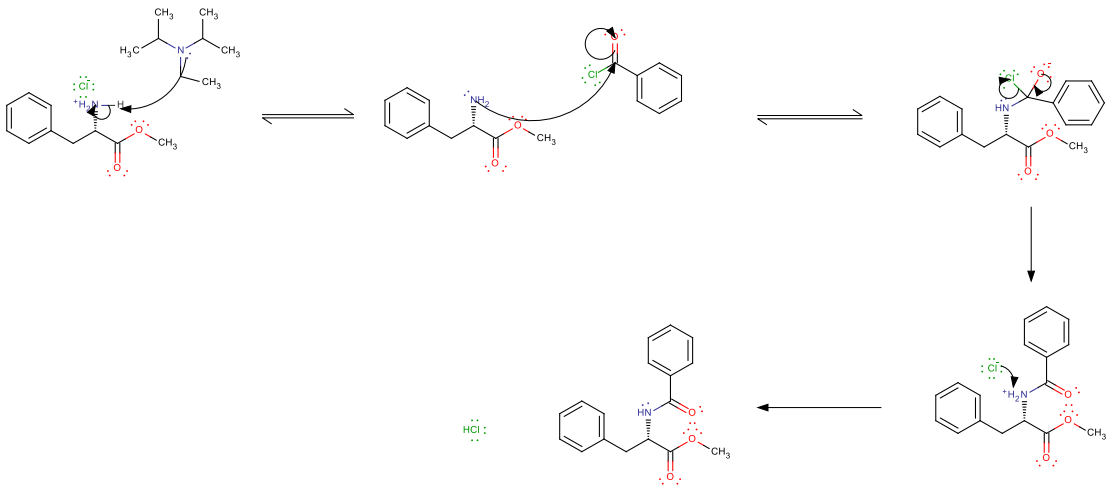


Reagentes e condições: cloreto de benzoica, TEA, THF, 0 ^{o}C 12 h

Fonte: Autoria própria.

O mecanismo de reação para acoplamento com Hatu para formação do composto protótipo inicia-se com uma reação base entre a Diea e o éster metílico da fenilalanina. Posteriormente, a carboxila precisou ser ativada para sofrer o ataque do aminoaceto nitrilo; o processo de ativação ocorreu depois da formação do éster, um intermediário gerado *in situ* que permite à carbonila ser atacada pelo aminoaceto nitrilo. A formação do produto foi confirmada pelo espetro ^{1}H RMN.

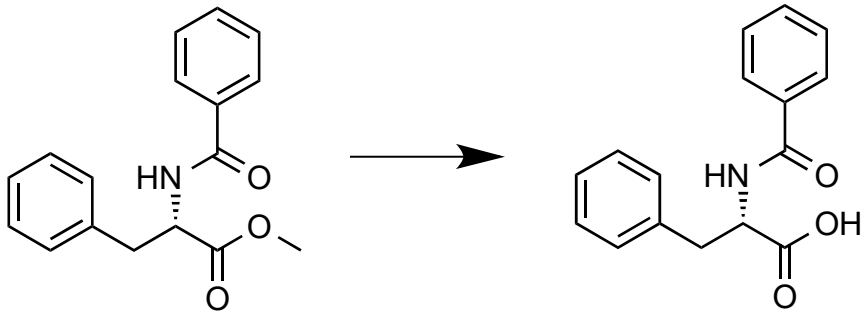
Esquema 4: Mecanismo de benzoilação



Fonte: Autoria própria.

4.1.3 Hidrolise do éster (desproteção do ácido carboxilico)

Esquema 5: Reação de hidrólise

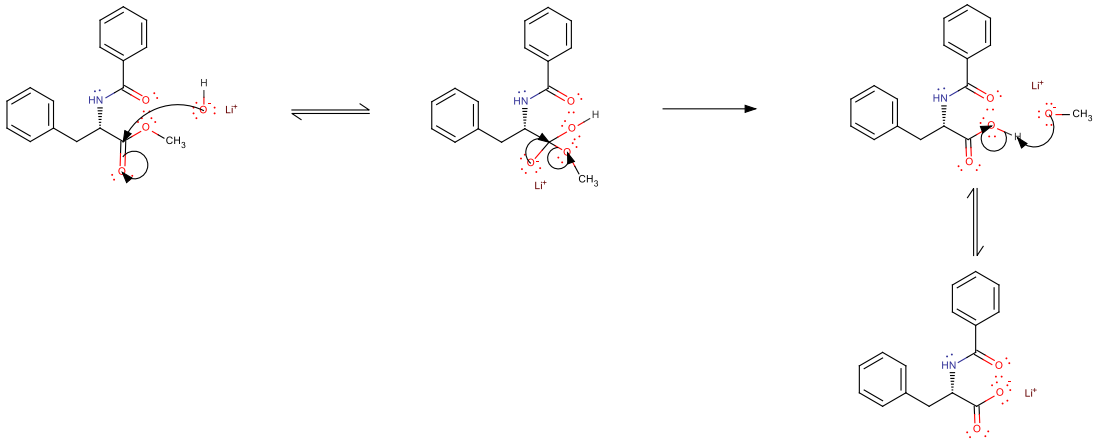


Reagentes e condições: LiOH, THF, H_2O, 4h t.a.

Fonte: Autoria própria.

O mecanismo é proposto em três etapas: inicialmente, o ataque do hidróxido ao carbono electrofilico da carbonila, formando o intermediário tetraédrico; posteriormente, a restauração da dupla ligação carbono-oxigênio, levando à perda do metóxido, gerando o carboxílico; e, finalmente, a reação ácido-base, gerando o sal de lítio da molécula, que pode ser recuperada ajustando o pH para deslocar o equilíbrio ácido-base e obter, assim, ácido carboxílico, e não sal. A formação deste produto foi confirmado pelo espectro ^{1}H RMN.

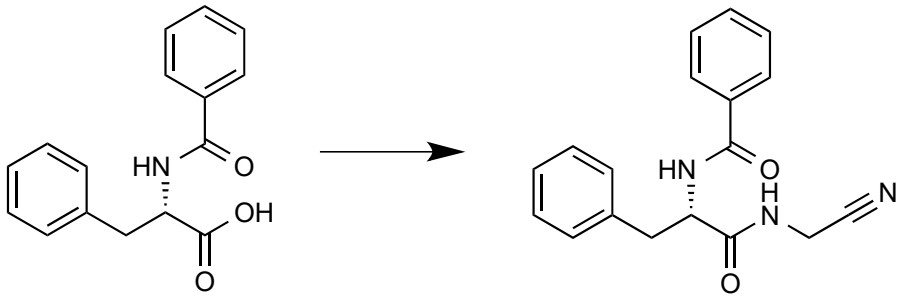
Esquema 6: Mecanismo de hidrólise



Fonte: Autoria própria.

4.1.4 Reação de formação de ligação peptídica (reação de acoplamento)

Esquema 10: Reação de formação de ligação peptídica (composto protótipo 09)



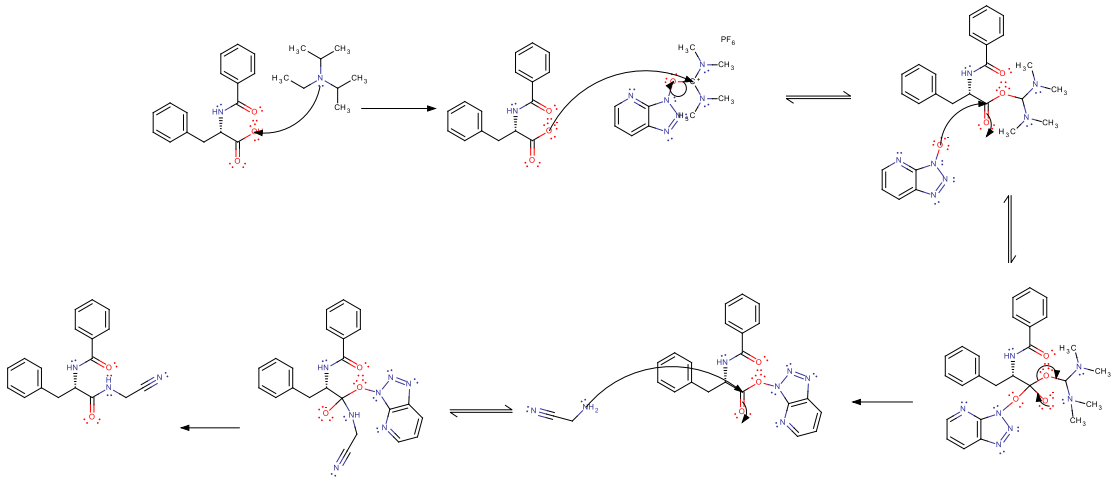
4.1.4.1

Reagentes e condições: aminoacetonitrila, Hatu, Diea, DMF, t.a. 22 h

Fonte: Autoria própria.

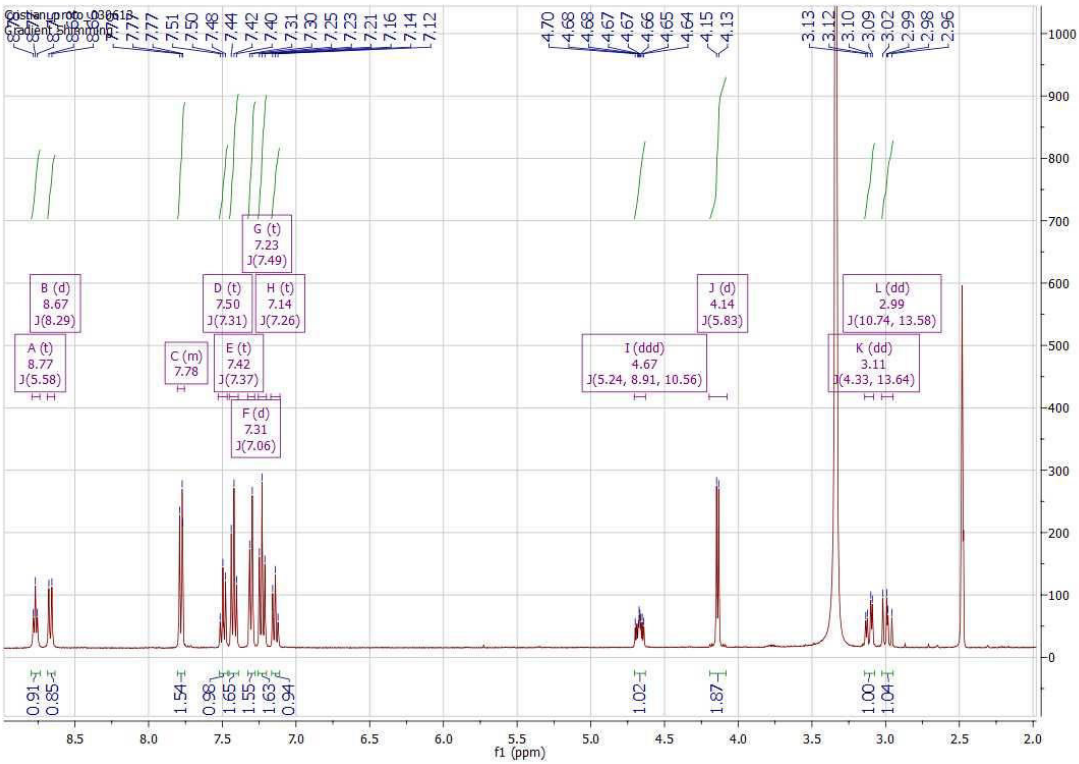
O mecanismo de reação para acoplamento com HATU com a finalidade de formação do composto protótipo inicia-se com uma reação-base entre a DIEA e o derivado carboxílico. Posteriormente, a carboxila precisou ser ativada para sofrer ataque do aminoacetonitrilo; o processo de ativação ocorreu depois da formação do éster, intermediário gerado *in situ* que permite à carbonila ser atacada pelo aminoacetonitrilo. A formação do produto foi confirmada pelo espetro ^{1}H RMN.

Esquema 7: Mecanismo de acoplamento do composto protótipo



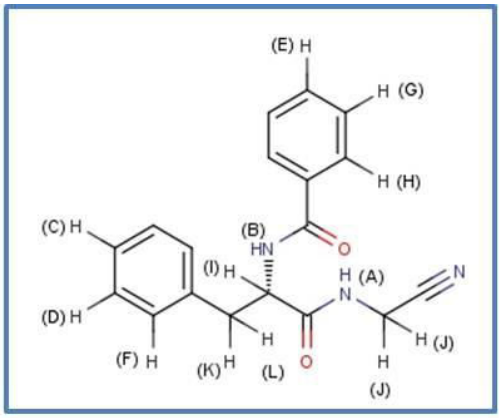
Fonte: Autoria própria.

Figura 12: Espectro ^{1}H RMN do composto protótipo **09**



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2: Atribuição dos sinais ^{1}H do composto protótipo 09



Próton	Sinal (δ)	(Multiplicidade) e Constante de acoplamento (J)
A	8,77	(t) 5,58
B	8,67	(d) 8,29
C	7,78	(m) ---
D	7,50	(t) 7,31
E	7,42	(t) 7,37
F	7,31	(d) 7,06
G	7,23	(t) 7,49
H	7,14	(t) 7,26
I	4,67	(ddd) 5,24 / 8,91 / 10,56
J	4,14	(d) 5,83
K	3,11	(dd) 4,33 / 13,64
L	2,99	(dd) 10,74 / 13,58d

Fonte: Autoria própria.

Os sinais **A** e **B** são evidência de que a molécula apresenta duas ligações peptídicas na sua estrutura (sinais N-H de amidas). Além disso, a multiplicidade dos sinais e o valor das constantes do acoplamento químico (J) evidenciam que estes apresentam acoplamento com os sinais **I** e **J** hidrogênios vizinhos; apresenta-se também no composto 09 (**C**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**) sinais correspondentes a dez hidrogênios aromáticos e, em um deslocamento químico de 4,14 sinal **J**, um dubleto correspondente aos dos

hidrogênios vizinhos à nitrila. Não foram feitas análises adicionais para comprovar a formação do composto, pois trata-se de uma composição descrita na literatura é bem conhecida.[57; 60; 65]

4.2 Modificações sintéticas

Na finalidade de estudar o sitio catalítico da enzima cruzaína, os três principais subsítios (S1, S2 e S3) foram mapeados mediante modificações realizadas na molécula protótipo (composto 09); estas permitiram a obtenção de dez novas moléculas, oito análogas ao composto 09 e duas marcadas (07B e 09B) com sondas fluorescentes. Essas modificações foram realizadas conforme o apresentado na parte experimental e acompanhadas por diferentes técnicas de caracterização; sinais-chave no espectro de RMN e propriedades dos compostos, como cor e ponto de fusão, permitiram acompanhar as modificações nos espectros ^{1}H RMN dos compostos. Os sinais correspondentes aos hidrogênios N-H das ligações amida, dependendo do grupo ligado a elas, sofriam modificações no formato, no deslocamento químico, na multiplicidade e nas constantes de acoplamento. Além disso, o número de sinais dos hidrogênios dos anéis aromáticos variava de acordo com o tamanho do anel aromático e substituintes presentes nele, que, por sua vez, mudavam o deslocamento químico, a multiplicidade e as constantes de acoplamento. Nos espectros ^{13}C RMN, obteve-se modificações nos sinais na região de carbonos das duas ligações amida; além disso, sinais de carbonos aromáticos mudam dependendo do tamanho do anel e da presença de heteroátomos nos anéis. O sinal correspondente ao carbono C≡N da nitrila também foi chave na elucidação das estruturas.

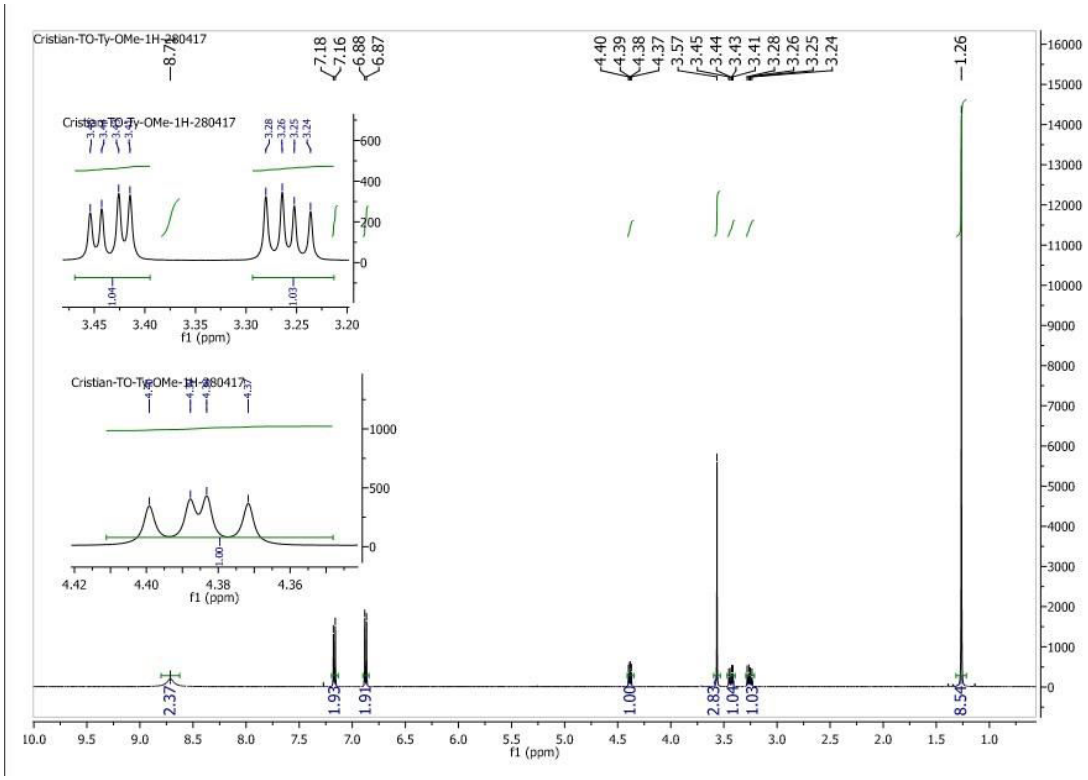
Para a síntese dos compostos marcados com sondas fluorescentes, foram implementadas rotas sintéticas, já conhecidas e descritas na literatura. Na continuação, será descrito o raciocínio executado para obtenção da molécula protótipo (composto 09) marcada com a sonda fluorescente.

Como base de construção desse composto, foi usado o aminoácido tirosina, no qual a fração ácida da molécula está protegida com éster metílico, enquanto que o álcool aromático está protegido pelo grupo terbutila. O espectro de ^{1}H RMN dessa molécula

(Figura 13) foi a chave para confirmar as modificações ao longo da rota sintética, na qual a maior parte da caracterização foi feita mediante RMN.

O espectro de RMN de hidrogênio da Figura 13 se apresenta sinal, em 1,26 ppm, correspondente aos nove hidrogênios do grupo terbutila. Os dois hidrogênios ligados ao carbono adjacente ao centro estereogênico apresentam dois sinais próximos, 3,26 e 3,44. Esses sinais aparecem como dubletos; um único sinal representa os três hidrogênios do grupo metila (do metil éster) a um deslocamento de 3,57 ppm. Próximo a este, um multipleto em 4,39 ppm representa o hidrogênio do centro estrereogênico. Os dois hidrogênios do grupo amina da molécula aparecem em 8,72 ppm, enquanto os quatro hidrogênios presentes no anel aromático são evidenciados como dois sinais em 6,88 e 7,18 ppm; estes são os sinais que apresentam essa molécula no espectro RMN de hidrogênio serão considerados e analisados, para evidenciar as futuras modificações.

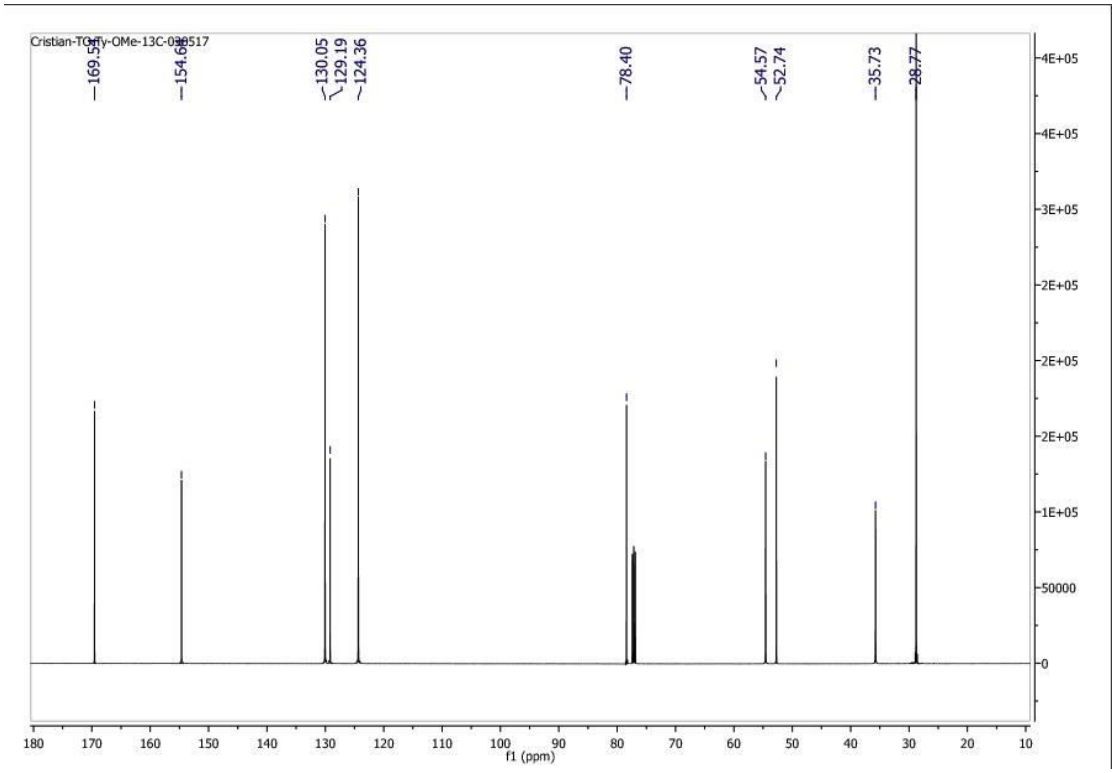
Figura 13: Espectro de RMN de hidrogênio do material de partida

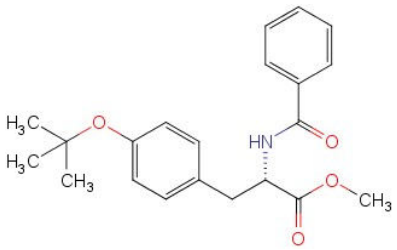


No espectro de carbono ^{13}C RMN (Figura 14) é possível perceber dez sinais, que representam os catorze carbonos da molécula; em 169,5 ppm aparece um sinal referente à carbonila (C=O) na molécula; entre 124 e 160 ppm, temos quatro sinais referentes aos

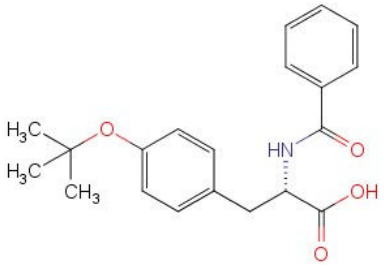
seis carbonos aromáticos, o que sugere que há dois sinais que representem quatro hidrogênios (cada um representa dois carbonos equivalentes). Outros três sinais, entre 50 e 80 ppm, representam os três carbonos alifáticos, em 35,73 e 28,77 ppm, o carbono tetra é substituído pelos três metilenos do grupo terbutila, respectivamente.

Figura 14: Espectro de RMN de carbono do material de partida

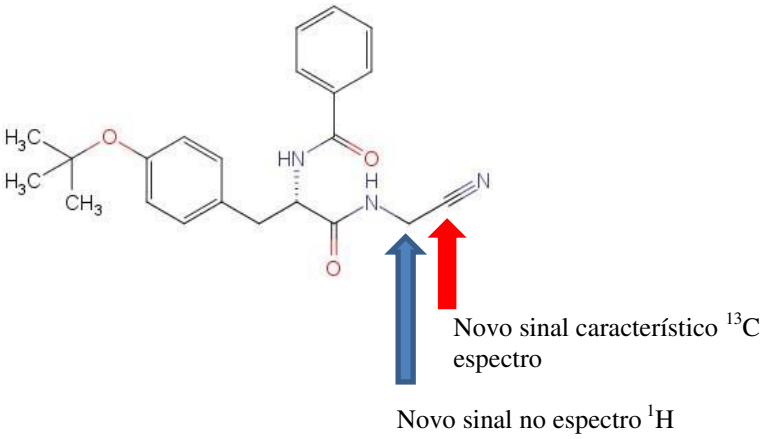




A inclusão do grupo benzoíla na molécula, ligada ao nitrogênio do aminoácido, foi confirmada, principalmente pela aparição de novos sinais na região dos hidrogênios aromáticos (entre 6,5 e 8 ppm) do mesmo modo que no carbono novas sinais de aromáticos (entre 120 e 160 ppm) foram evidenciadas, e um novo sinal em 166,83 ppm, referente a uma nova ligação amida, confirma a formação da molécula. (Anexo).

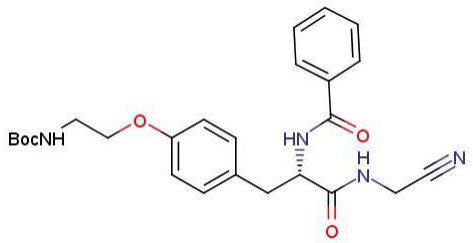


A reação de desproteção do éster metílico para obtenção do ácido carboxílico foi monitorada por cromatografia de camada delgada e mantida em agitação até o consumo total dos reagentes (um único ponto na base da placa). O produto foi confirmado por HPLC, acoplado ao detector de massas.



A reação de acoplamento para formação do composto que aparece logo anteriormente foi conseguida conforme descrito na rota sintética, utilizando o reagente de acoplamento EDC. A estrutura foi confirmada por ^{1}H e ^{13}C RMN. No espectro de hidrogênio, um novo sinal perto de 4 ppm corresponde aos hidrogênios vizinhos à nitrila (apresentados anteriormente) – e, no espectro de carbono, o sinal do carbono da nitrila é evidenciado (perto de 116 ppm). Esses novos sinais devem ser mantidos ao longo da rota sintética, até a obtenção do produto final, pois o substituinte aminonitrila fica na molécula até o produto final.

A desproteção do álcool da tirosina foi confirmada por RMN. No espectro de hidrogênio, não aparece mais o sinal dos nove hidrogênios do grupo terbutila (entre 1,2 e 1,4 ppm); do mesmo modo, no espectro de carbono, os dois sinais naturais desse carbono não estão mais presentes.



A reação para incorporar o *linker* na molécula foi a de rota sintética, que tem menor rendimento e maior tempo de duração. Ela apresentou valor de 16%, a princípio, e período de 24 horas, respectivamente; algumas modificações foram feitas no solvente – equivalentes, tempo de reação e base – com a finalidade de melhorar esses dois parâmetros, conforme mostrado na Tabela 3.

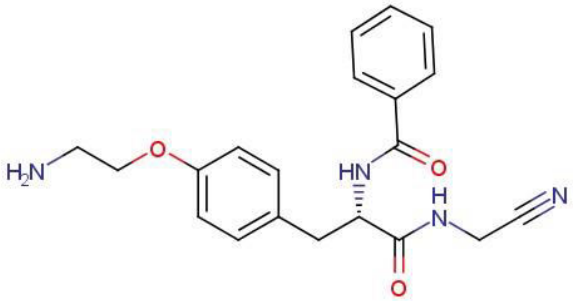
Tabela 3: Variações nas condições reacionais na inserção do *linker*

SOLVENTE	BASE	EQUIVALENTES	TEMPERATURA (°C)	TEMPO RX (H)	RENDIMENTO*
MEOH	Na_2CO_3	2	50	24	16
MEOH	K_2CO_3	2	50	24	22
MEOH	K_2CO_3	2	50	48	24
ACN	K_2CO_3	2	50	48	32
ACN	K_2CO_3	2	70	48	36
DMF	Na_2CO_3	2	60	48	42
DMF	K_2CO_3	2	50	48	56
DMF	K_2CO_3	2	80	48	48
DMF	K_2CO_3	4	80	48	62
DCM	Et_3N	2	ta	12	NR

* Rendimento após a purificação ta temperatura ambiente NR não reativo

A melhor condição para essa reação (linha 9) foi usada nesta rota sintética.

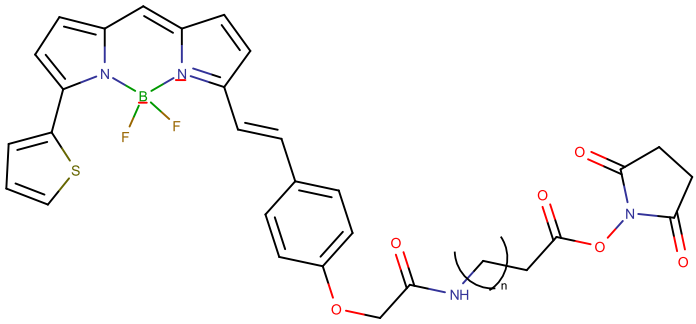
A formação do produto foi confirmada por RMN de hidrogênio, no qual dois novos sinais, 3,89 e 3,42 ppm, são exibidos para quatro hidrogênios dos dois CH_2. Do mesmo modo, um sinal intenso, que integra para nove hidrogênios, aparece em 1,36 ppm, característico do grupo terbutila.



Para a obtenção dessa molécula, o grupo de proteção boc foi removido usando ácido fórmico, e a evolução da reação foi monitorada por CCD, detectando o final da reação, analisado por LC-MS, e confirmando o produto final.

Para incluir a sonda fluorescente na molécula, foi utilizado o Bodipy 630/650 como éster de succinimida (muito reativo diante de espécies nucleofílicas) e um excesso de duas vesses de dipeptidil-nitrila em dimetilformamida. A reação foi monitorada por CCD e, no final, por cromatografia liquida com detector de massas – permitindo, assim, confirmar a reação total da sonda.

Figura 15: Estrutura Bodipy 630/650-X NHS éster



4.3 Separação por HPLC dos compostos

Devido à presença do centro estereogênico das moléculas, proveniente do aminoácido empregado na síntese (L-fenilalanina, L-tirosina), foi necessário comprovar que ele não teria afetado sua quiralidade, já que é sabido que condições como altos pH e elevadas temperaturas, entre outras, permitem que a geração de misturas escalêmicas dos enantiômeros no meio reacional, com objetivo de confirmar que o produto final foi obtido como único enantiômero, o composto protótipo composto 09 foi sintetizado como mistura racêmica (partindo da DL-fenilalanina); sob a mesma rota sintética inicial, após caracterização, com a finalidade de comprar com o composto 09 enantiômericamente puro essa mistura foi separada utilizando o método A (descrito na parte experimental) e o cromatograma obtido e apresentado na Figura 16:

Figura 16: Cromatograma da mistura racêmica do composto protótipo, coluna: cellulosa – 2, D.I.: 2,0 mm tr = 9,23 e 11,88

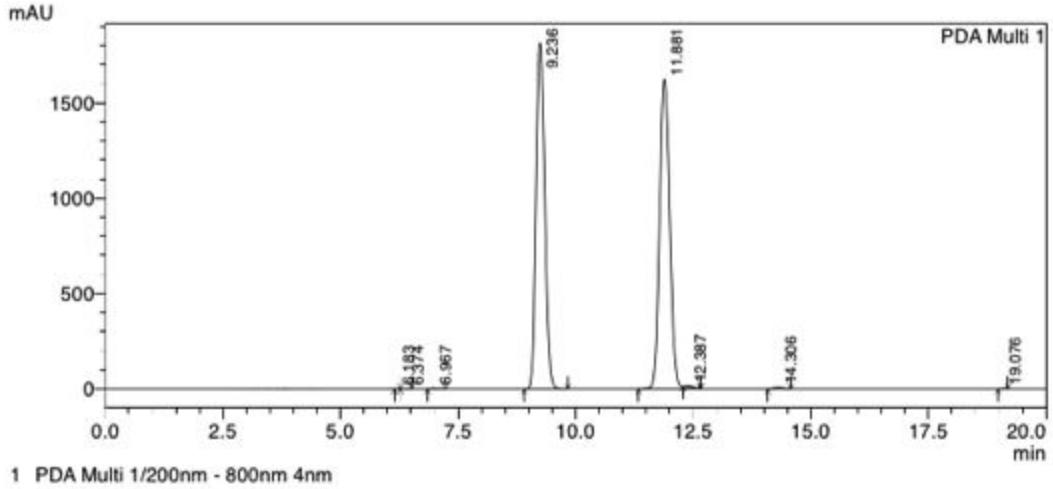
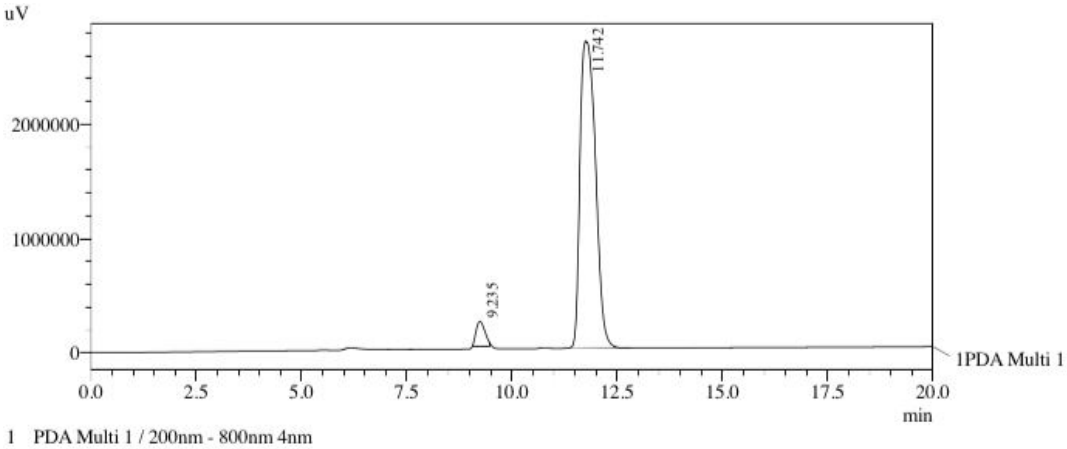
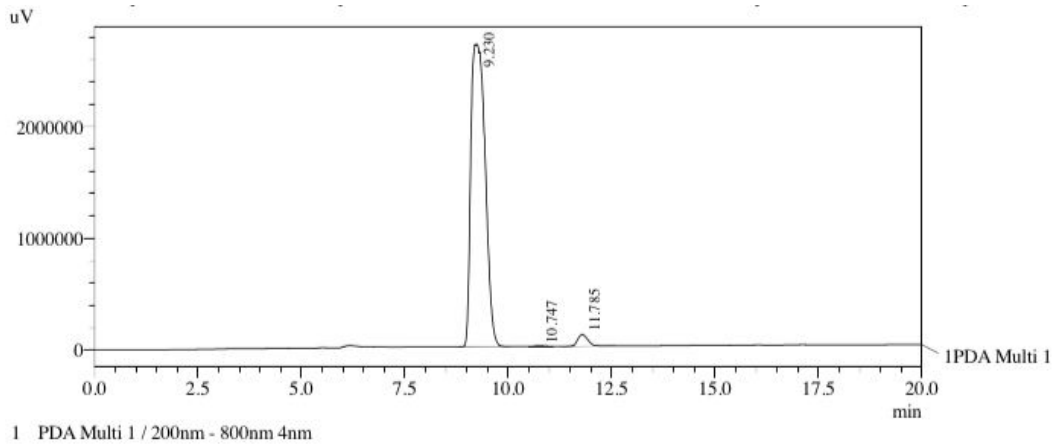


Figura 17: Cromatograma do composto protótipo após purificação dos enantiômeros, coluna: cellulosa – 2, D.I.: 2,0 mm tr = 9,23 e 11,74





Os compostos referentes a os picos de tempo 9,236 e 11,881 foram separados e coletados (HPLC semipreparativo).

Uma vez separados os compostos (Figura 17) e comparados com o composto 09 obtido da rota sintética, comprovou-se que este não tinha sofrido modificação alguma no centro estereogênico.

4.4 Ensaios de inibição das enzimas cruzaína para determinação de IC_{50}

A inibição da enzima cruzaína foi determinada mediante curvas de doses-resposta, permitindo medir a concentração do composto necessária para inibir 50% da atividade da enzima IC_{50}. O IC_{50} permitiu comparar a potência dos inibidores sintetizados, testados nas mesmas condições experimentais; fatores como pH, força iônica e temperatura podem causar mudanças no valor de IC_{50} e, por isso, foram mantidos constantes, a fim de gerar dados comparáveis para uma série de compostos. A concentração da enzima utilizada para os ensaios foi 2,0 nM, enquanto a do substrato ZFRMCA foi 2,0 μM; o excesso do substrato garante que a enzima opere em estado estacionário. O E64, inibidor padrão da cruzaína, foi utilizado como controle sob as condições dos ensaios.

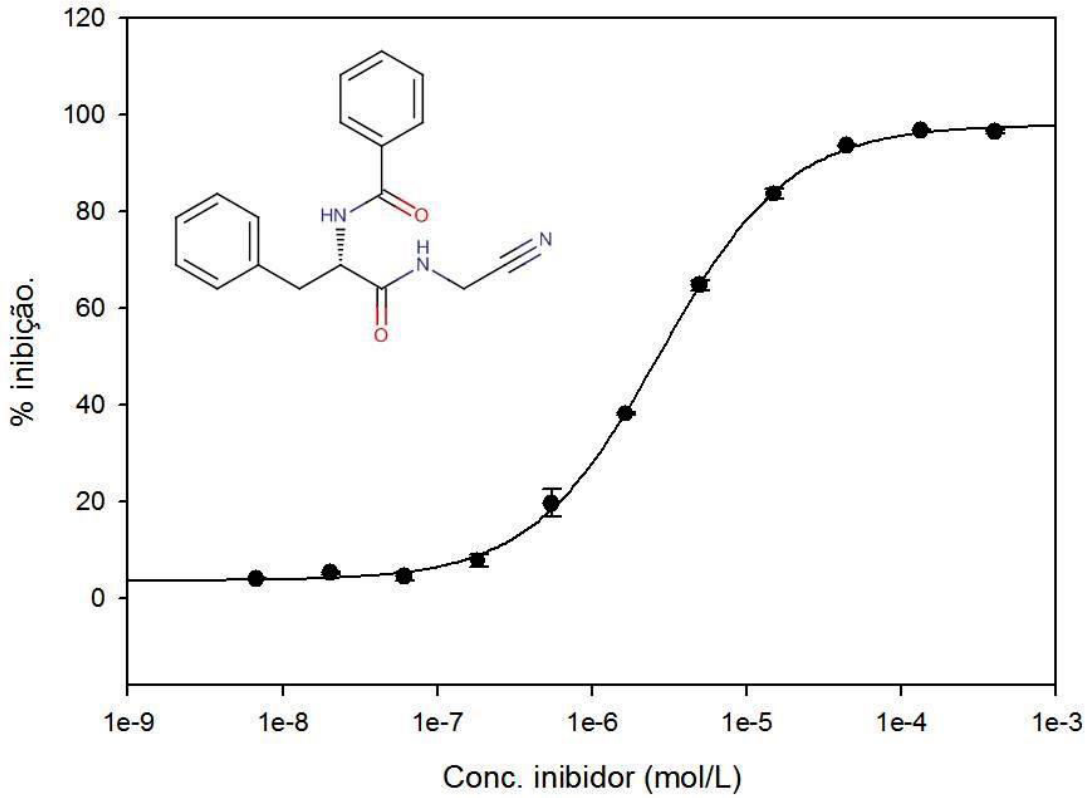
Para qualquer concentração de inibidor, a concentração total de enzima é a soma da enzima livre e do complexo enzima-inibidor. A atividade fracional da enzima v_i/v_b (v_i tem atividade sem inibidor, enquanto v_b a tem com inibidor) está diretamente relacionada com a razão entre a concentração de enzima livre e a concentração total de enzima. A fração ocupada pelo inibidor, segundo o balanço de massas, será 1 – isto é, v_i/v_b a uma concentração fixa de enzima e substrato. A velocidade da reação diminui com o aumento da concentração do inibidor até não haver atividade residual (exceto em caso de inibição parcial). Uma curva da fração da velocidade (ou percentual de inibição da enzima), em função da concentração do inibidor, terá formato sigmoidal (perfil de curva dose-resposta); o ponto médio da curva, no qual a fração da velocidade é igual a 0,5, corresponde a 50% de inibição da enzima IC_{50}.[66]

O percentual de inibição em cada ponto de concentração foi calculado utilizando-se a equação[60]

$$\% \, inibição = 100\left(1 - \frac{v_i}{v_b}\right)$$

Aqui, v_i é a velocidade na presença de inibidor e v_b a velocidade do experimento controle. A Figura 18 (curva de dose-resposta para o composto protótipo) mostra o perfil das curvas, com ajuste matemático da equação da curva de dose-resposta nos pontos determinados experimentalmente para as substâncias que apresentaram atividade inibitória diante da enzima cruzaína.

Figura 18: Perfil das curvas dose-resposta obtidas



Fonte: Autoria própria.

Os valor do percentual de inibição das enzimas foi considerado na variável dependente (eixo Y), enquanto que os valores da concentração dos inibidores foi calculado em logaritmos e considerados nas variáveis independentes (eixo X).

O valor de IC_{50} foi calculado utilizando esta equação – o método de ajuste foi não linear nos mínimos quadrados:

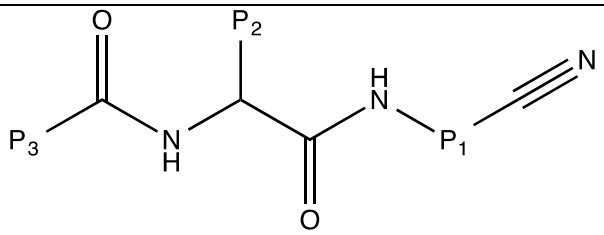
$$\%inibição = A_0 + \frac{(A_1 - A_0)}{1 + 10^{(LogIC_{50})h}}$$

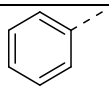
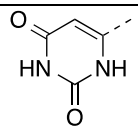
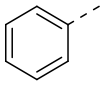
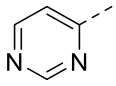
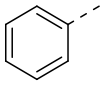
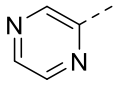
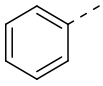
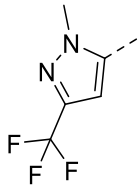
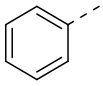
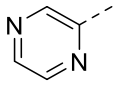
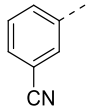
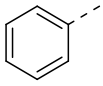
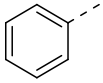
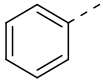
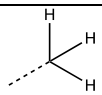
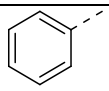
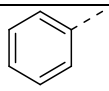
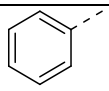
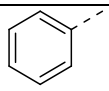
Aqui, A_0 é o patamar inferior da curva, A_1 é o patamar superior, $LogIC_{50}$ é o logaritmo da concentração de IC_{50} e h o coeficiente de Hill. Os valores de A_1 e A_0 representam resposta máxima e ausência de resposta, respectivamente, da enzima na presença do inibidor.[61]

4.5 Relação estrutura atividade

Uma etapa imprescindível no processo de descoberta de substâncias bioativas é a confirmação da atividade inibitória de ligantes identificados e o estabelecimento de relações entre a estrutura química e a atividade biológica.

Tabela 4: Relação entre estrutura e atividade dos compostos diante da enzima cruzaína



Composto	P1	P2	P3	pK_i (Incert.) Cruzaína
01				6,3 (0,05)
02				5,3 (0,02)
03				5,2 (0,03)
04				6,4 (0,02)
05				6,3 (0,03)
06				5,4 (0,05)
07				6,6 (0,03)
08				*
09				6,3 (0,03)

* Molécula não tem na sua estrutura o grupo nitrila (*warhead*) e não apresentou atividade.

O subsítio S2 da cruzaína possui características bastante distintas do S3, tanto em termos de forma quanto nas possibilidades de formação de interações específicas e hidrofóbicas. Além do S2 ser uma cavidade mais pronunciada que os demais subsítios, o que permite ancoragem de substituintes, ainda podem ser formadas interações com resíduos capazes de aceitar Glu208 ou doar ligações de hidrogênio ao interagir com

substituintes posicionados sobre ele. O caráter mais hidrofóbico do substituinte fenila poderia tirar vantagem da interação com o subsítio S2; por isso, o composto 6 foi sintetizado, com intuito de avaliar essa hipótese. A substituição na posição *meta* se mostra prejudicial para a atividade; é possível que a posição mais adequada seja a *orto*, como foi observado para o ligante não covalente cocristalizado com cruzaína, que é substituído por bromo nessa posição.[26]

Na entrada 8, o composto que não apresenta *warhead* (nitrila) não tem como realizar ligação covalente com a cisteína 25 da cruzaína – porém, espera-se que essa molécula seja simplesmente clivada nas suas duas funções amida, pois atuaria como substrato para a enzima, que se especializa em clivagem desse tipo de ligações.

Há perda de potência quando a feníla do composto protótipo 09 é substituída por outros substituintes, mas essa perda não permite considerar a modificação como negativa, pois é preciso avaliar outras propriedades também importantes como são a administração metabolismo excreção entre outras. Por outro lado, em relação a esse grupo e quanto ao fechamento de um ciclo propila que deve ocupar o subsítio S1, estes oferecem ganhos de potência. Esses dados indicam que a substituição deve ser considerada promissora quando acumulada à substituição de grupo no subsítio S2 e S3, encontrados nos compostos 4, 5 e 7, por exemplo. Dessa forma, os resultados encontrados pelos ensaios dos compostos sintetizados se mostraram úteis para o entendimento e ganho de conhecimento sobre a relação estrutura-atividade, de modo a fomentar estudos posteriores de síntese para otimização da potência dos inibidores de cruzaína. Além disso, com base nessas observações, é razoável esperar incremento na potência que resultará em novos ligantes com IC_{50} na faixa submicromolar.

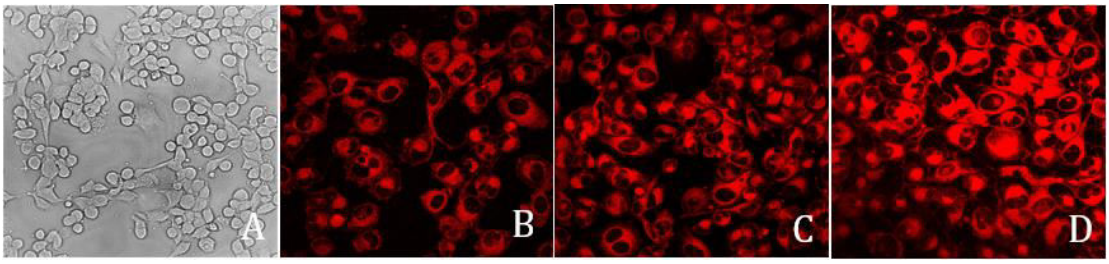
Acumulação intracelular dos compostos por microscopia confocal

A acumulação intracelular foi realizada em lâminas de cultivo de oito câmaras, utilizando certa concentração dos compostos 07B e 09B de 10 μmol L^{-1} para todos os ensaios. Os compostos foram excitados a 540 nm, apresentando emissão de 650 nm, de modo a serem detectados no microscópio confocal. A seguir, apresentam-se as análises de fluorescência obtidas em células Huvec.

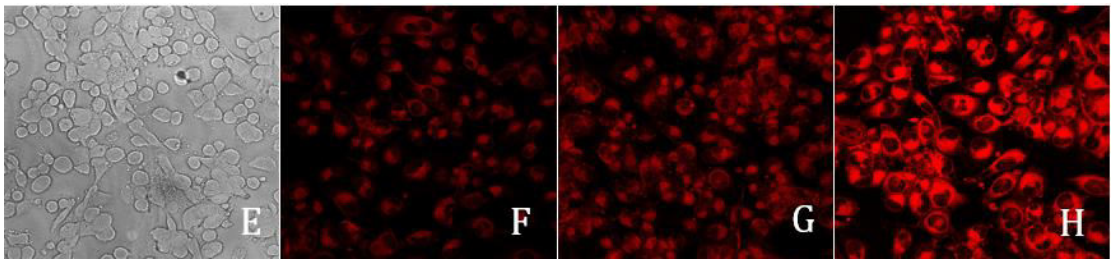
Os compostos foram preparados em concentrações de 10 μmol L^{-1}, partindo de uma diluição de concentração de 10 mmol L^{-1} do composto, garantindo assim que, na câmara, a concentração final de DMSO não fosse maior do que 2%. Desse modo, é possível dizer que o DMSO não tem interferência na permeabilidade da membrana da célula por parte dos compostos, a concentração dos compostos, foi mantida , já que aumentar a concentração desse composto implicaria debilitá-la e aumentar a permeabilidade da membrana celular

As imagens de acumulação das moléculas 07 e 09 apresentaram intensidade de fluorescência, de cor vermelha (650 nm), devido à sonda Bodipy.

Figura 19: Acumulação molecular intracelular dos compostos 07 e 09 marcados com sonda fluorescente



Acumulação do composto 07B
a) controle; b) 10 min de incubação; c) 30 min de incubação; d) 60 min de incubação



Acumulação do composto 09B
e) controle; f) 10 min de incubação; g) 30 min de incubação; h) 60 min de incubação

A penetração dos compostos foi monitorada em três tempos diferentes de incubação: 10, 30 e 60 minutos. Desde o minuto 10 de incubação, foi possível detectar alta intensidade de fluorescência no citoplasma, sugerindo assim rápida penetração da membrana citoplasmática. Com o transcorrer do tempo, a molécula continuou penetrando a membrana plasmática, acumulando-se no interior da célula, o que resulta interessante, pois, idealmente espera-se que a molécula apresente acumulação no local onde há maior concentração da enzima cruzaína, ou seja, no retículo endoplasmático e no complexo golgiense.

4.5.1 Citotoxicidade celular

Os dados de citotoxicidade celular dos compostos em células VERO e HUVEC, confirmam que – mesmo existindo proteases e, principalmente, cisteinoproteases suscetíveis a serem inibidas pelos compostos testados nessas células[63] – estes não exercem efeito citotóxico significativo sobre as células: a concentrações fica abaixo de 100 μmol L^{-1}.

Figura 20 Viabilidade das células HUVEC e VERO após tratamento de 24h com o composto **07** em 4 diferentes concentrações.

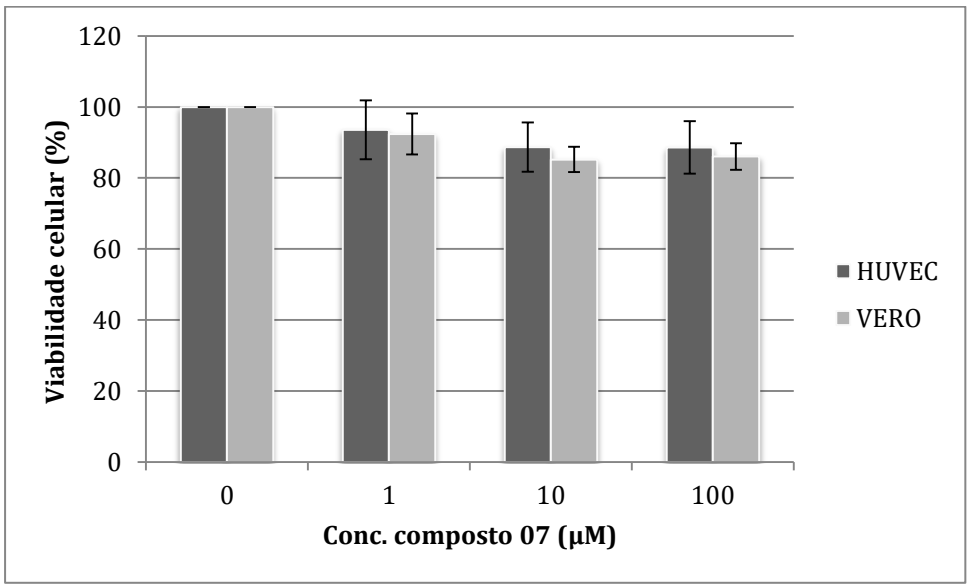
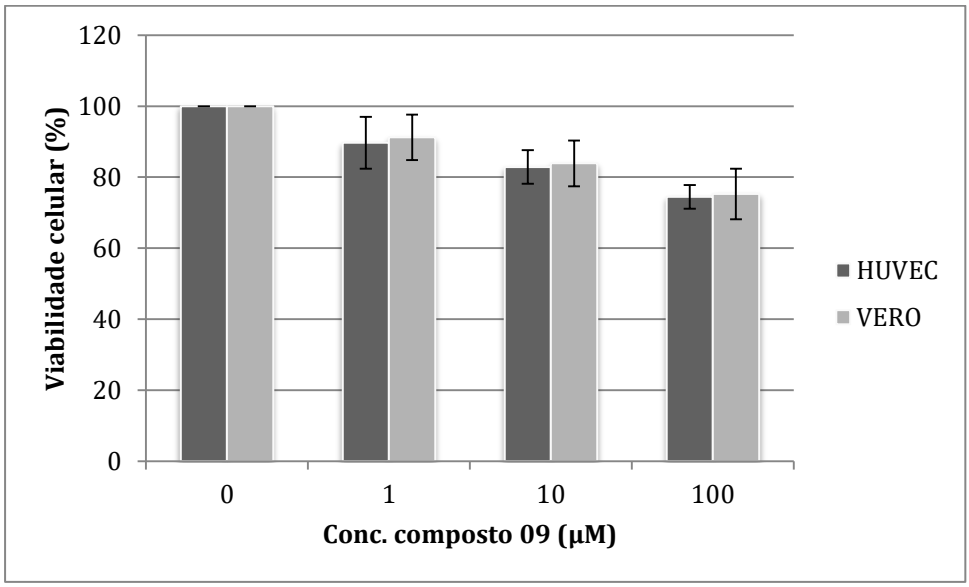


Figura 21 Viabilidade das células HUVEC e VERO pós tratamento de 24h com o composto **09** em 4 diferentes concentrações.



Se analisarmos outros inibidores de cisteíno proteases que não apresentam seletividade (citotóxicos em células humanas) – estes terminam inibindo enzimas homólogas humanas.[63] Esse tipo de inibidor contém na sua estrutura um grupo eletrofílico que atua como *warhead*: dependendo da reatividade deste como aceitador de Michael, ele pode ser pouco seletivo e gerar ligações irreversíveis com diferentes enzimas.

Figura 22 Viabilidade das células HUVEC e VERO pós tratamento de 24h de tratamento com o composto **01** em 4 diferentes concentrações.

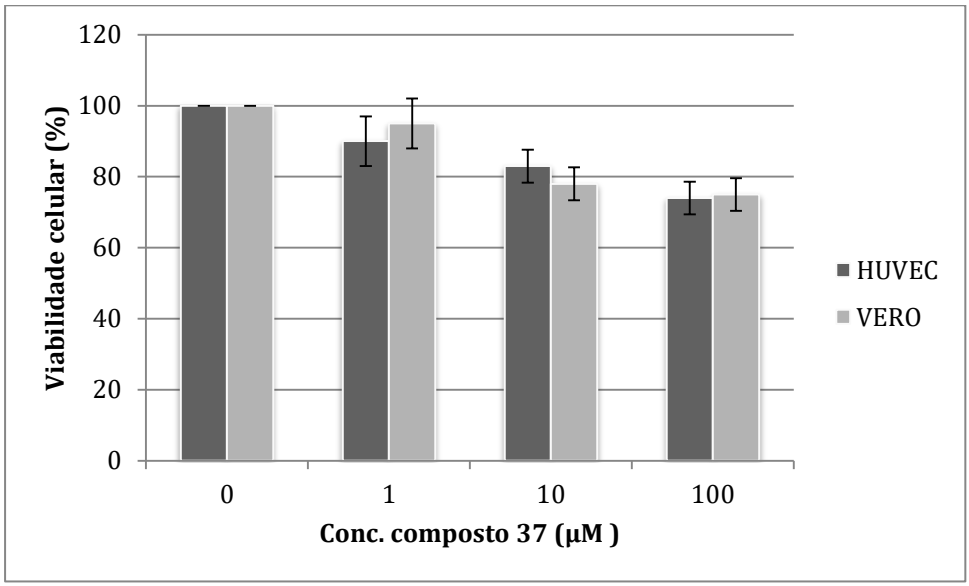
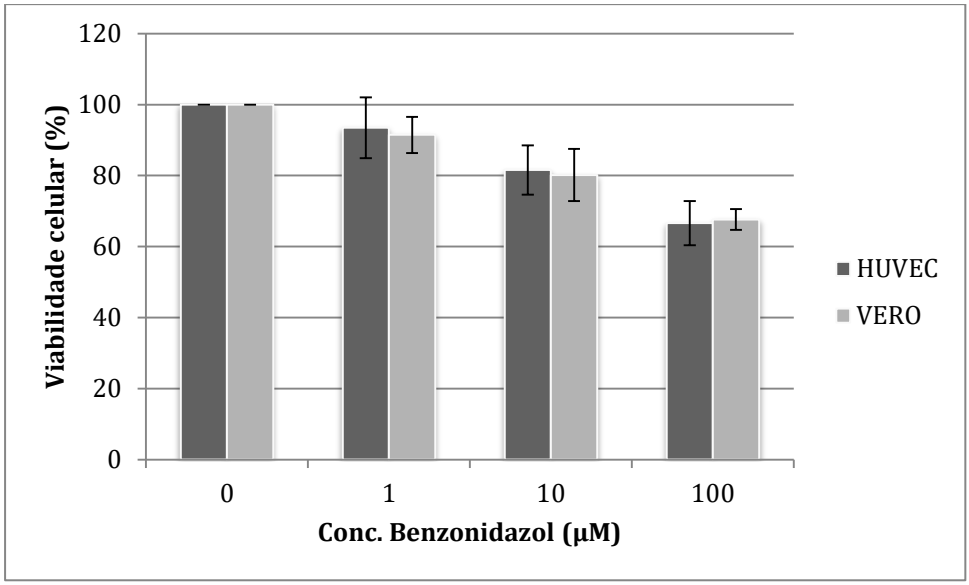


Figura 23 Viabilidade das células HUVEC e VERO pós tratamento de 24h de tratamento com o composto padrão **BZ** em 4 diferentes concentrações.



No caso das moléculas aqui estudadas, estas apresentam na sua estrutura uma nitrila que foi escolhida como *warhead*, sobretudo porque, devido a sua interação irreversível, e mesmo interagindo com outras enzimas homólogas, o tempo de inibição não gera impacto significativo, podendo assim apresentar ou não efeitos indesejados, como consequências da inibição de enzimas presentes em células hospedeiras (diminuição do efeito *off target*).

4.5.2 Avaliação da ação tripanocida

A ação tripanocida de um composto frente ao *T. cruzi* pode estar associada, além da diminuição de viabilidade, à inibição do crescimento dos parasitas.

Dependendo da forma que o parasita é estudado, o efeito na forma amastigota e epimastigota dos compostos, além de diminuir a viabilidade, deve também inibir a replicação desses seres. Já na forma tripomastigota (não replicativa), será avaliada a ação sobre a viabilidade.

A ação tripanocida dos compostos testados (07; 09; 01; 02; 03 e 04) mostrou que, apesar da similitude estrutural dos compostos, e mesmo eles apresentando alta

potência sobre a enzima cruzaína, os resultados diante do parasita na forma epimastigota foram bastante diversos. Os compostos 09 e 01 foram mais potentes que o benzonidazol; já os outros quatro compostos testados não apresentaram atividade diante da forma epimastigota do parasita. Contudo, estes devem ser testados também em outras formas do diclo de vida do parasita, já que é conhecido que alguns compostos, mesmo não apresentando atividade na forma epimastigota, podem apresentá-la em outras formas do ciclo de vida do parasita.[64]

Tabela 5: Valores de IC_{50} dos compostos estudados diante do *T. cruzi* na forma epimastigota

Composto	pK_i cruzaína	IC_{50} epimastigota (umol L^{-1})	Índice de Seletividade (SI)
07	6,6 ± 0,03	> 100	ND
09	6,3 ± 0,03	2,3 ± 0,6	43,5
01	6,3 ± 0,05	4,4 ± 0,7	22,7
02	5,3 ± 0,02	> 100	ND
04	6,4 ± 0,02	> 100	ND
03	5,2 ± 0,03	> 100	ND
BZ	ND	11,9 ± 1,7	8,4

* ND = não determinado

A ação tripanocida dos compostos Tabela 5, mostrou que os compostos 09 e o composto **01** apresentaram uma potencia maior frente ao parasita *Trypanosoma cruzi* cepa Y na forma epimastigota, e também, que calculando o índice de seletividade segundo a equação proposto pela *DNDi*, [67] podem se entender que estas apresentam uma seletividade de mais de 43 e 22 vesses respetivamente, sendo que um numero maior que 10 é considerado promissório para um novo candidato ao tratamento de estas doença.

$$SI = \frac{IC_{50}\ em\ células\ de\ mamífero}{IC_{50}\ no\ parasita}$$

Adaptada de *DNDi* [67]

Nas seguintes imagens se apresenta o efeito causado na morfologia dos parasitas apos tratamento químico, que mostra

Figura 24 Microscopia eletrônica de varredura do *T. cruzi* (epimastigota), após sem tratamento (controle)**.**

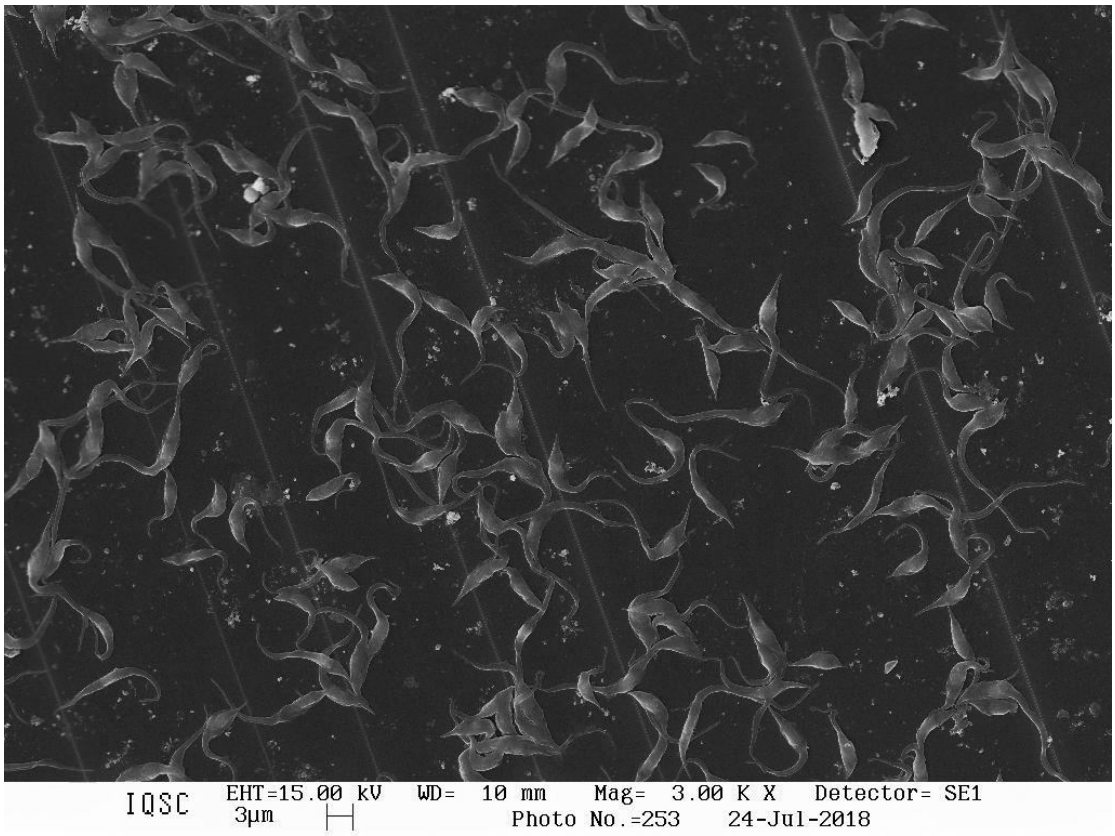


Figura 25 Microscopia eletrônica de varredura do *T. cruzi* (epimastigota), após 24h de tratamento com o composto **07** (>100 μmol L^{-1})**.**

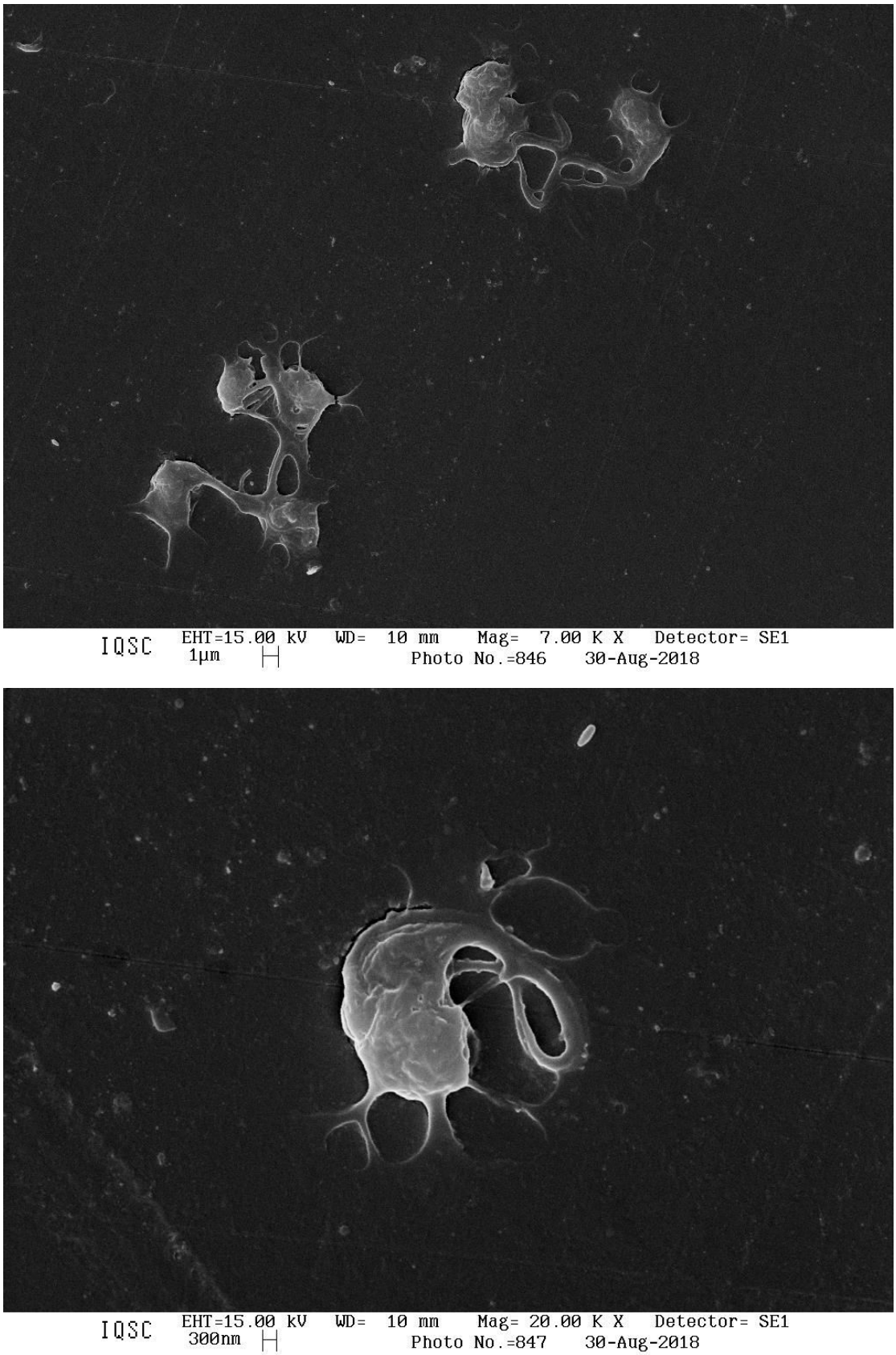
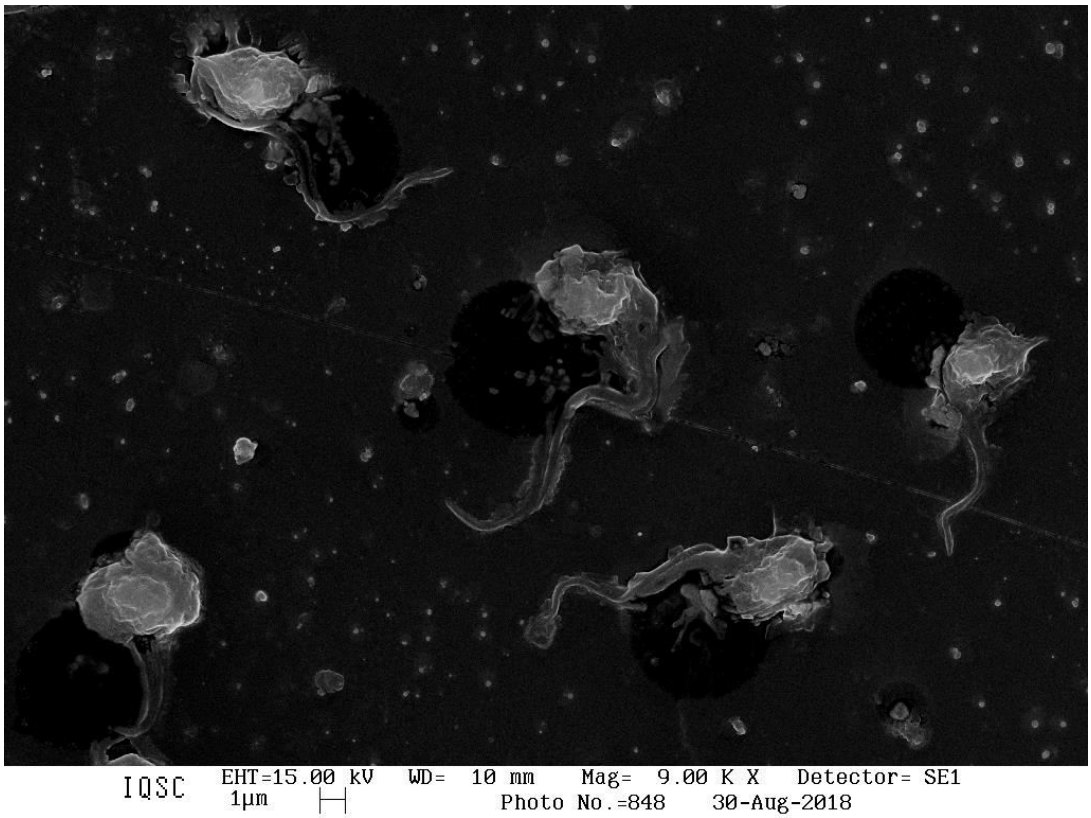


Figura 26 Microscopia eletrônica de varredura do *T. cruzi* (epimastigota), após 24h de tratamento com o composto **09** (2 μmol L^{-1})**..**



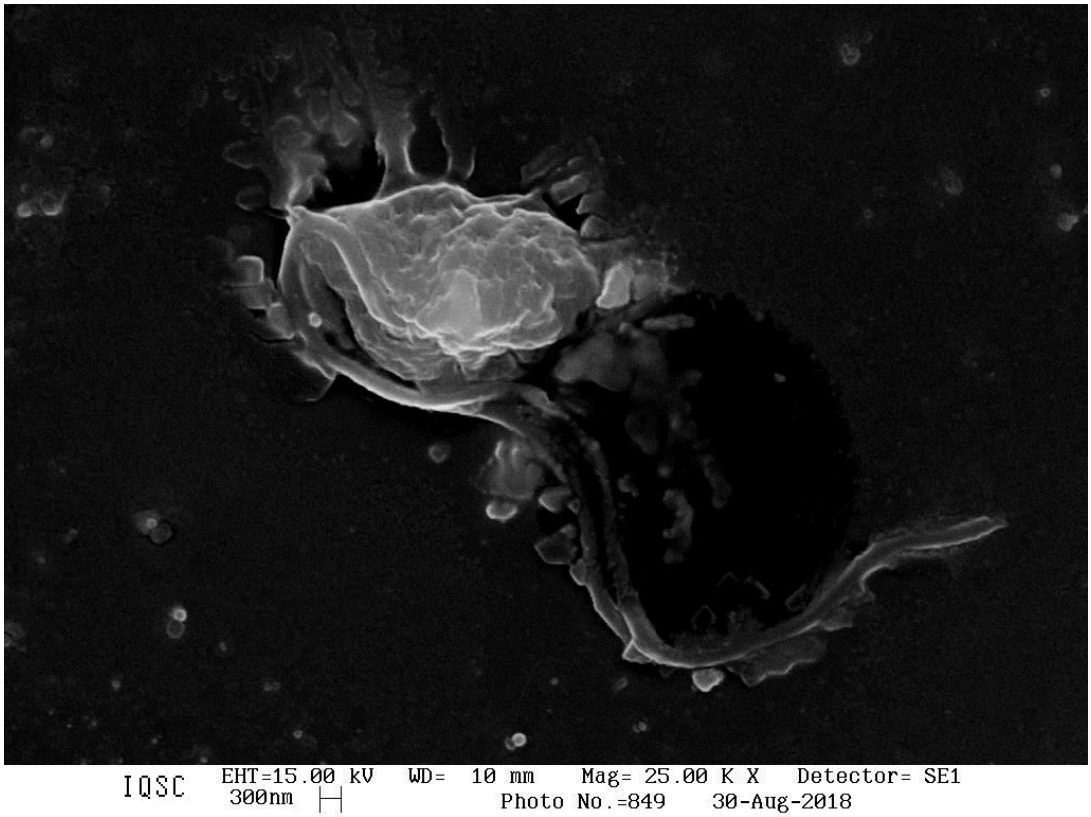
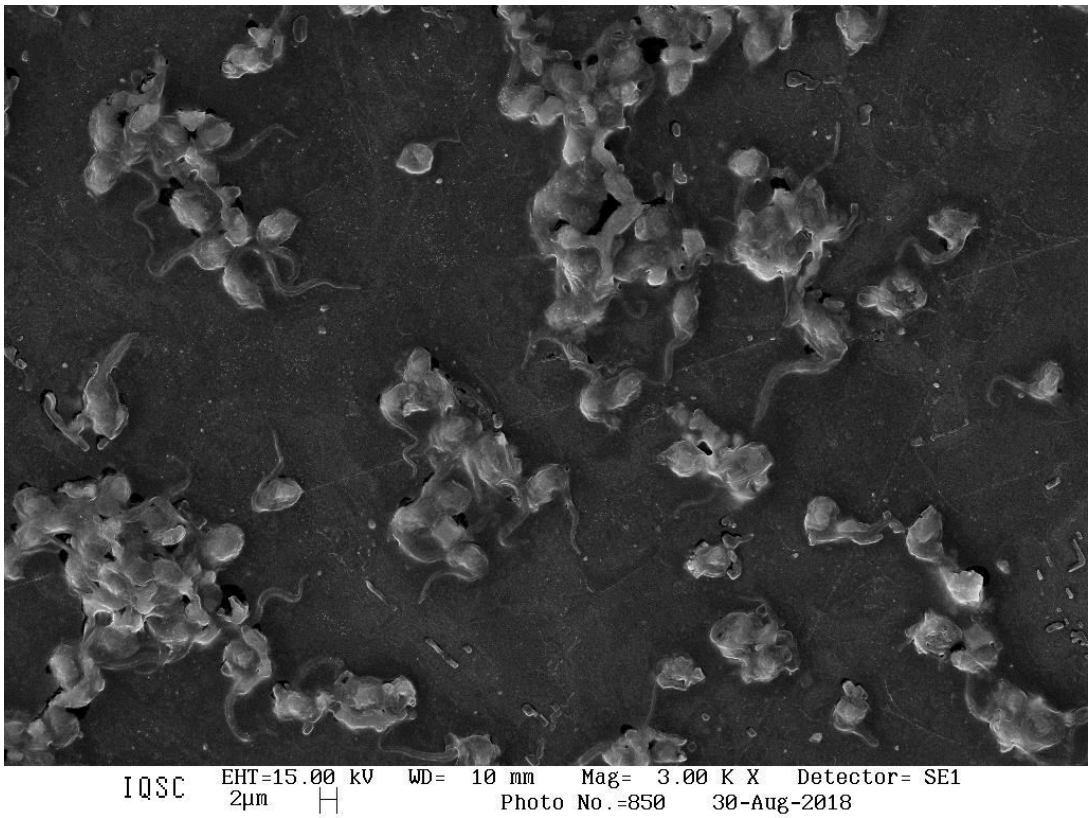


Figura 27 Microscopia eletrônica de varredura do *T. cruzi* (epimastigota), após 24h de tratamento com o composto **01** (3 µmol L^{-1})**..**



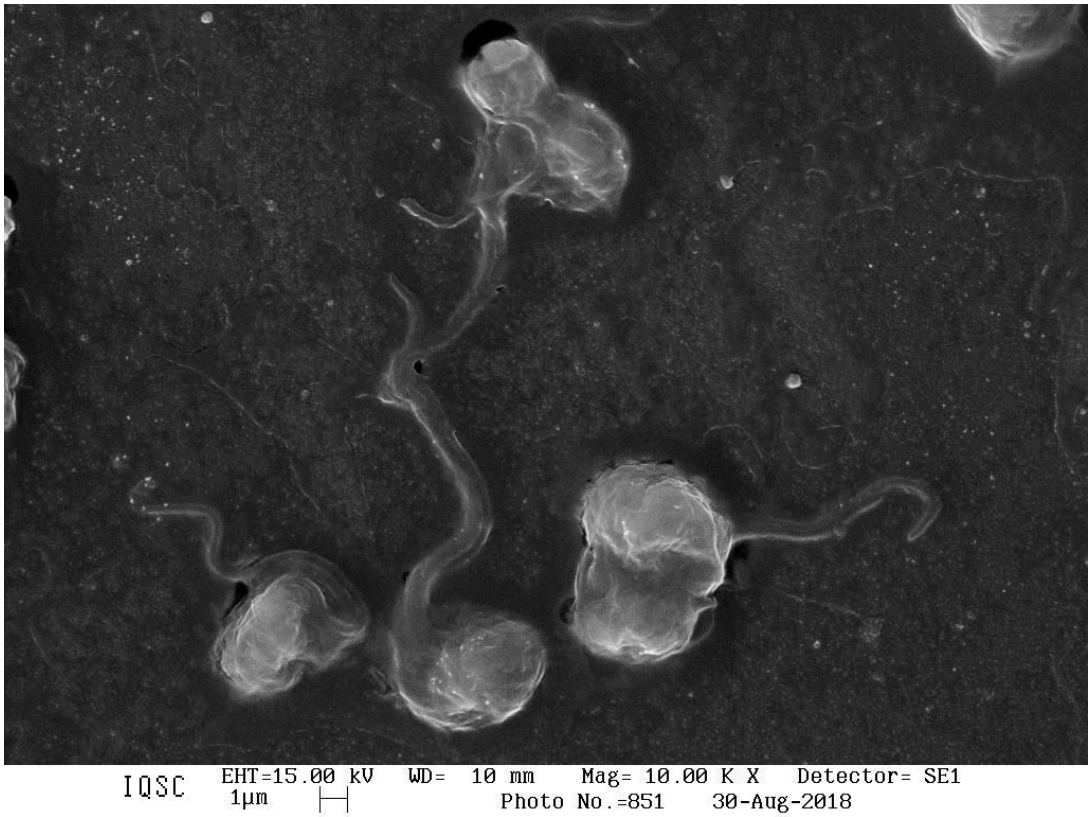
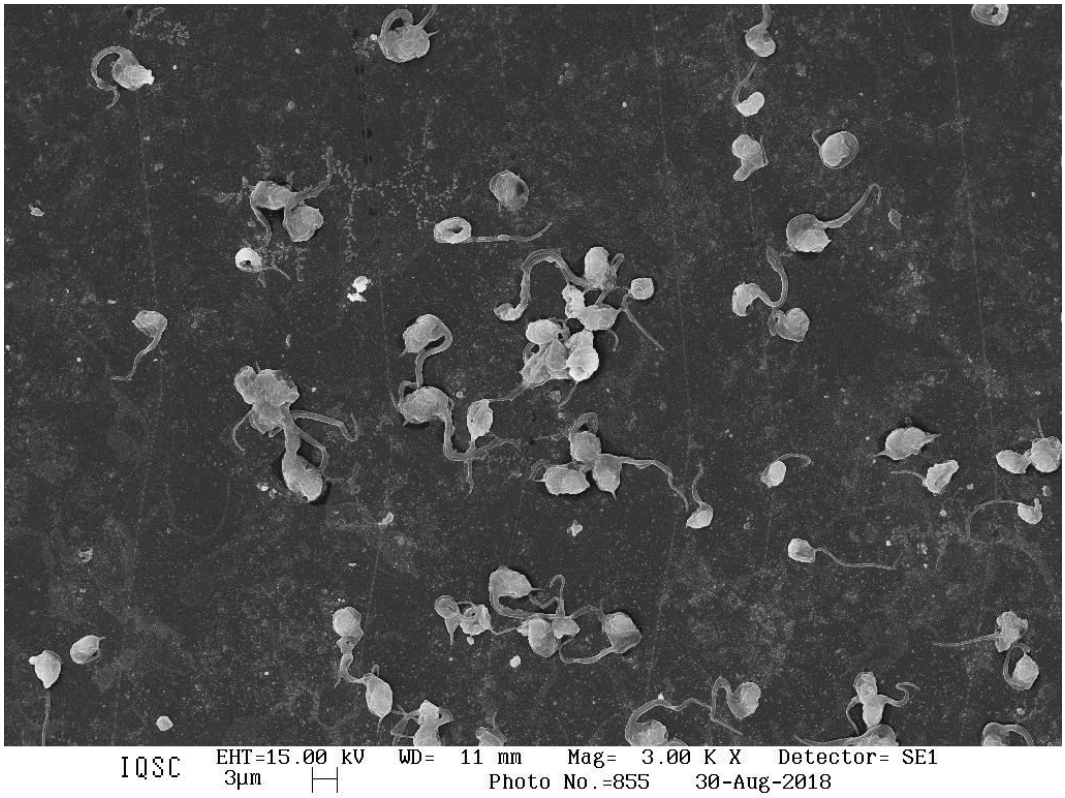
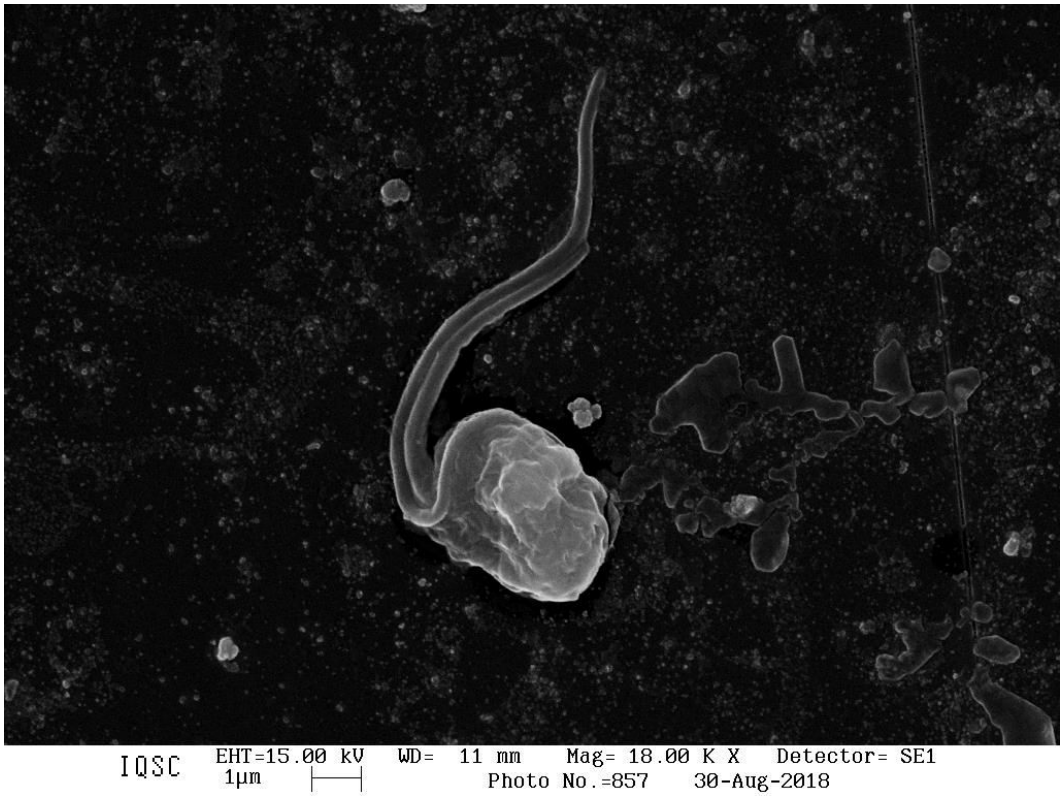


Figura 28 Microscopia eletrônica de varredura do *T. cruzi* (epimastigota), após 24h de tratamento com o composto padrão **BZ** (12 µmol L^{-1})**..**



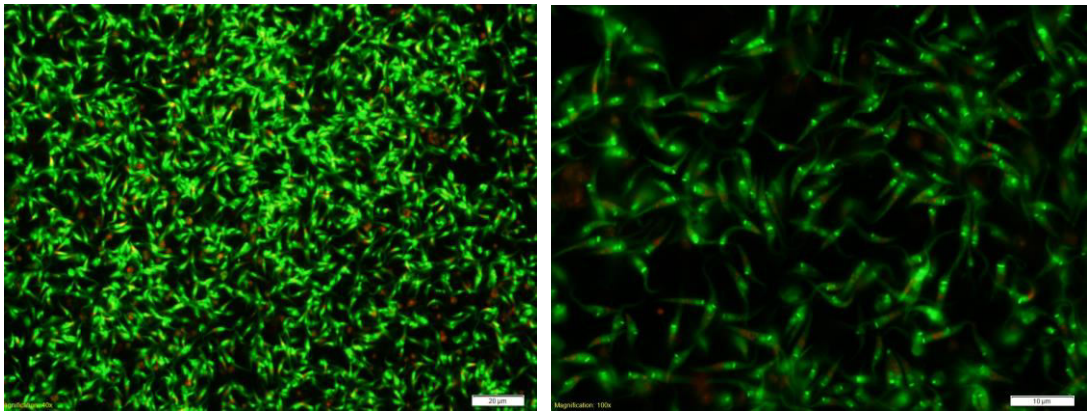


Esse resultado é bastante interessante, já que, considerando o fato de que os compostos foram planejados baseados na estrutura do protótipo 09, e que todos os compostos foram ativos diante da enzima cruzaína, podemos ver que essa atividade enzimática não foi transferida para os ensaios em face do parasita. O exemplo mais claro é o composto 7, que, diante da cruzaína, teve pK_i de 6,6 e não apresentou atividade quando exposto ao parasita. O composto 09, com pK_i menor (6,3), foi o mais ativo: esse resultado terminou motivando a síntese desses dois compostos, marcados com sonda fluorescente, com o fim de conseguir, assim, monitorá-los dentro do parasita e entender um pouco melhor sua interação com ele.

4.5.3 Marcação de células similar a apoptóticas e necróticas

Marcadores celulares permitem evidenciar a ocorrência de diversos processos que têm lugar na célula como produtos da interação entre esta e os compostos estudados. Neste ensaio em particular, foram utilizados o laranja de acridina (LA) e o brometo de etídio (BE), com o intuito de determinar o mecanismo de morte celular nos parasitas (por apoptose ou necrose), induzido pelos compostos testados. O LA marca as células viáveis: estas aparecem em verde e com estrutura organizada; as células apoptóticas são marcadas pelos dois fluoróforos e aparecem laranjas ou verdes, com cromatina condensada ou fragmentada. As células necróticas aparecem de modo similar às vivas, exceto por apresentar cor vermelha.[65]

Figura 29: Imagens de microscopia de fluorescência dos parasitas *T. cruzi* após 24 h, com controle negativo de dimetilsulfoxido (DMSO) 2%; objetivas 40 e 100×



As soluções *stock* dos compostos em DMSO foram utilizadas para preparo de novas e diferentes concentrações, que iriam posteriormente interagir com os parasitas nos diferentes ensaios realizados. Com a finalidade de avaliar o efeito do DMSO na viabilidade dos parasitas, uma concentração de 2% desse solvente foi encubado por 24 h e posteriormente marcado com LA e BE. Como resultado, obteve-se que, após esse período, 98% dos parasitas se encontraram viáveis e 2% em necrose.

Como controle positivo **Figura 30** ulitizou-se o principal fármaco empregado no tratamento da doença de chagas (benzonidazol), na concentração do IC_{50} (12 μmol L^{-1}); após 24 h de encubação, observou-se que 30% dos parasitas se encontravam viáveis, e que, dos 70% de parasitas restantes, 40% similar à apoptose e 30% necrose.

Figura 30: Imagens de microscopia de fluorescência dos parasitas *T. cruzi* após 24 h do tratamento com o composto padrão benzonidazol (12 μmol L^{-1}); objetivas de 40 e 100×

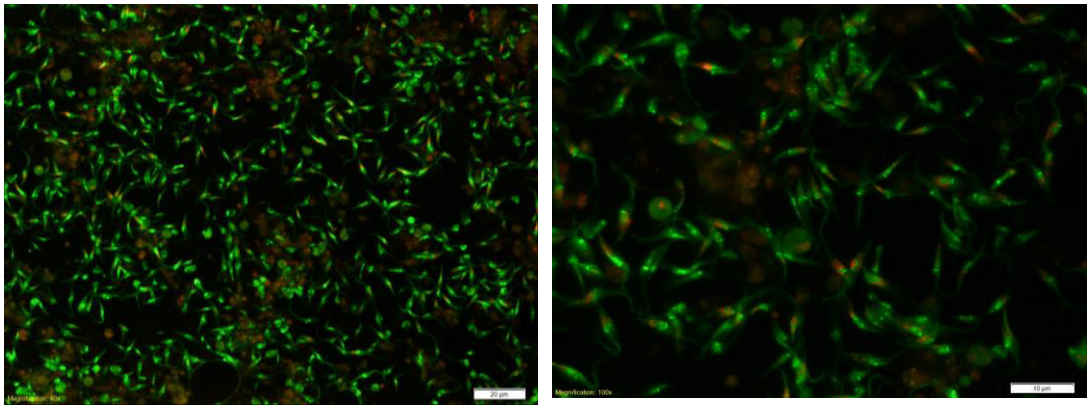
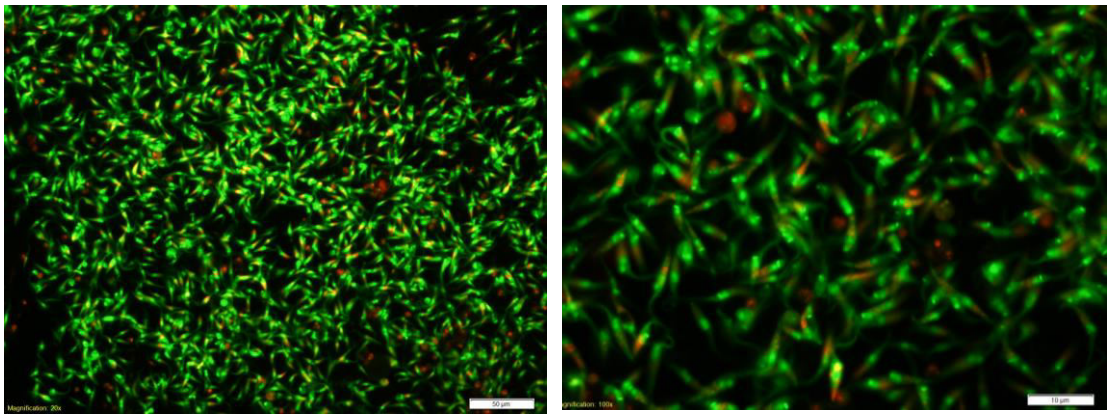


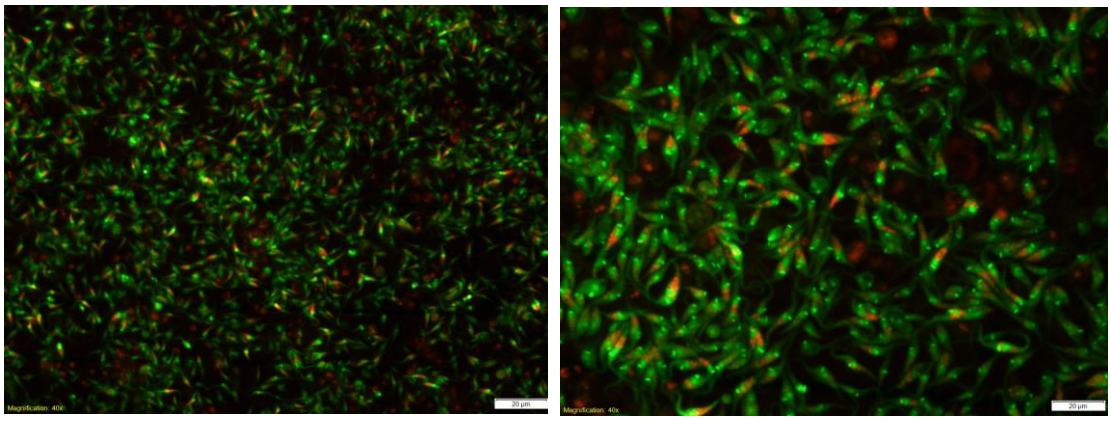
Figura 31: Imagens de microscopia de fluorescência dos parasitas *T. cruzi* após 24 h do tratamento com o composto 7 (20 μmol L^{-1}); objetivas de 40 e 100×



Na **Figura 31**, analisou-se o efeito do composto 07 após 24 h de encubação com os parasitas. Esse composto, que tinha apresentado aumento de potência diante da

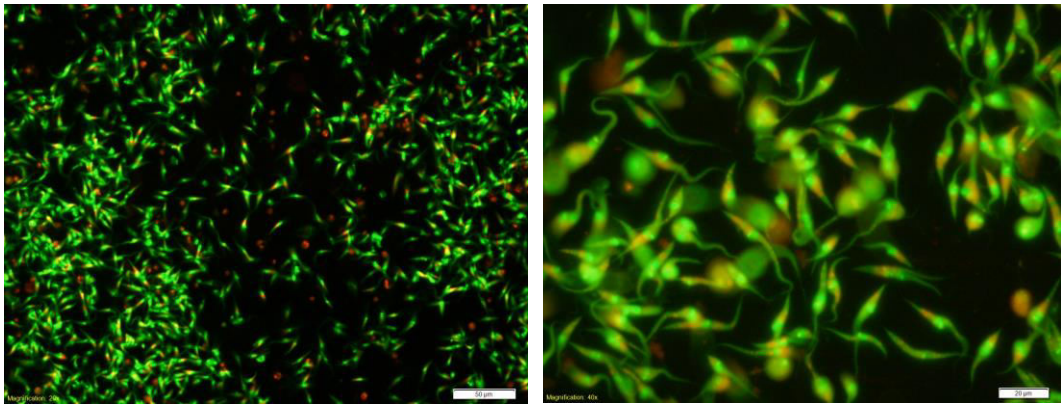
enzima cruzaína (Tabela 4) em relação ao composto protótipo (09), mostrou, porém, ter baixo efeito tripanocida (Tabela 5) Após o período de encubação, observou-se que 73% dos parasitas continuaram viáveis, 16% similar à apoptose e 11% necrose, o que corrobora seu baixo efeito diante do parasita.

Figura 32: Imagens de microscopia de fluorescência dos parasitas *T. cruzi* após 24 h do tratamento com o composto 09 (3 μmol L^{-1}) objetivas de 40 e 100×



A **Figura 32** apresenta o efeito do composto 09 diante dos parasitas após 24 h de encubação. Esse composto foi o que apresentou uma das maiores atividades frente á enzima cruzaína e foi o mais potente quando exposto ao parasita, conseguindo ser mais potente que o fármaco padrão benzonidazol. Após o período de encubação, observou-se que 33% dos parasitas continuaram viáveis, 56% similar à apoptose e 11% necrose. Quanto a isso, destaca-se que o composto leva à morte dos parasitas, principalmente por mecanismo similar à apoptose, que é o mecanismo que gera menos efeitos indesejados associados no organismo.

Figura 33: Imagens de microscopia de fluorescência dos parasitas *T. cruzi* após 24 h do tratamento com o composto **01** (3 μmol L^{-1}); objetivas de 40 e 100×



4.6 Colocalização intracelular por microscopia confocal

O ensaio de colocalização por microscopia confocal permitiu validar a hipótese de que os compostos conseguem atravessar a membrana e, do mesmo modo, atingir diferentes organelas no parasita *T. cruzí*.

Na imagem B da **Error! Reference source not found.**, apresenta-se a fluorescência gerada devido à presença do composto 7 (marcado com a sonda fluorescente) dentro do parasita. Na imagem C, é possível observar a fluorescência gerada pelo marcador de lisossomos. Uma sobreposição das duas imagens (imagem D) permite observar que a fluorescência dessas duas moléculas coincide, gerando tonalidade laranja no produto da superposição da emissão dos compostos colocalizados. Desse modo, pode-se afirmar que o composto 07 mostrou ter capacidade de se localizar parcialmente nos lisossomos do parasita, lugar onde se espera concentração considerável da enzima cruzaína. Observa-se também, todavia, que regiões em verde são mantidas no corpo todo do parasita, o que sugere que o composto consegue atingir de modo parcial os lisossomos, deixando ainda algumas dessas organelas inatingidas.

Na **Figura 35** se realizarmos a mesmo análise, pode-se dizer que o composto 07 conseguiu atingir a mitocôndria do parasita; na imagem B da figura, apresenta-se a fluorescência gerada devido à presença do composto 07 marcado com a sonda dentro do parasita. Na imagem C, é possível observar a fluorescência gerada pelo marcador de mitocôndria. Na sobreposição das imagens B e C, observa-se a presença de uma tonalidade laranja, produto da superposição das duas emissões individuais – porém, observa-se também que regiões em verde são abundantes no corpo do parasita, o que sugere que o composto consegue atingir de modo parcial a mitocôndria, deixando ainda regiões a serem atingidas.

Figura 34: Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos parasitas *T. cruzi* após 2 h de encubação, com o composto 07B (B), o marcador de lisossomos (C) e uma superposição das imagens B e C (D) em uma objetiva de 40×

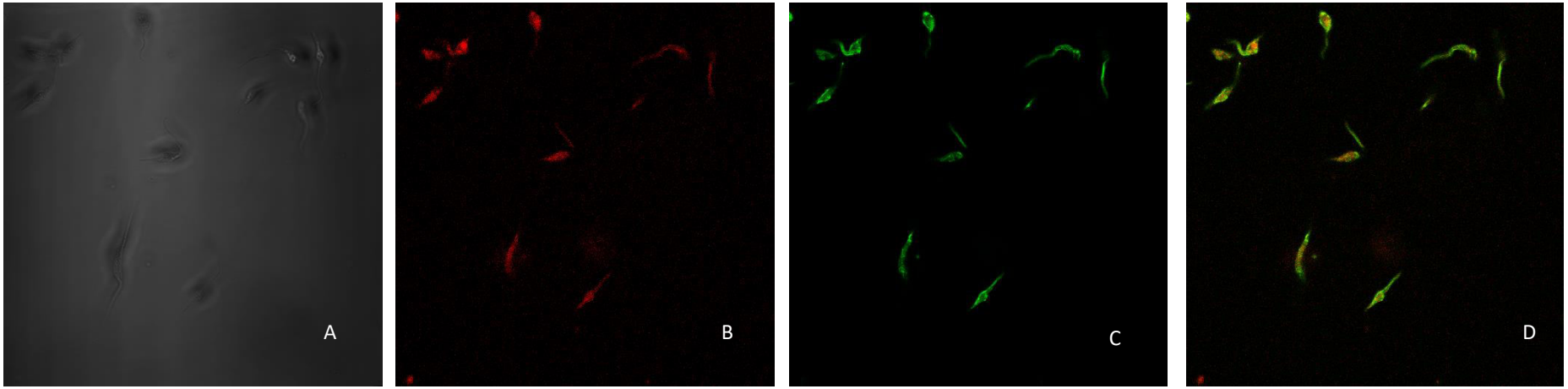
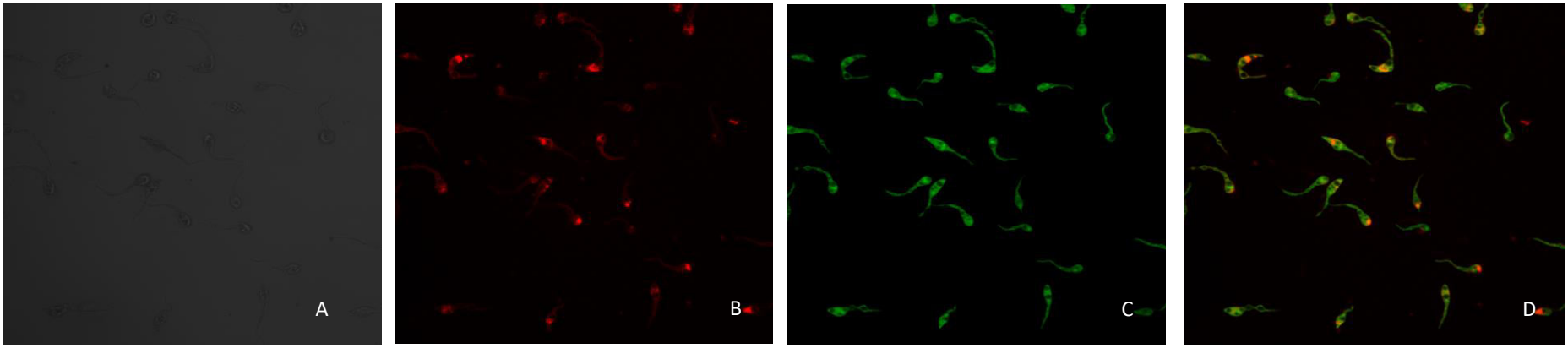


Figura 35: Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos parasitas *T. cruzi* após 2 h de encubação, com o composto 07B (B), o marcador de mitocôndria (C) e uma superposição das imagens B e C (D) em uma objetiva de 40×



Na **Figura 36**, imagem B, apresenta-se a fluorescência gerada devido à presença do composto 09 (marcado com a sonda fluorescente) dentro do parasita. Quando comparado com o mesmo ensaio para o composto 7 (a imagem B) pode-se visualmente inferir que, embora os ensaios tenham sidos feitos em paralelo e sob as mesmas condições de encubação, a imagem B **Figura 36** mostra como os parasitas em contato com a molécula 09 apresentam fluorescência ao longo de todo o corpo, o que não aconteceu no composto 07.

A imagem D **Figura 36**(sobreposição de B e C) permite observar que a fluorescência dessas duas moléculas coincide, gerando a tonalidade laranja, produto da superposição da emissão dos compostos. Observa-se ainda que regiões em verde são mantidas no corpo todo do parasita, o que sugere que o composto consegue atingir apenas de modo parcial os lisossomos, embora em maior quantidade que no composto 7.

Na **Figura 37** o mesmo fenômeno foi evidenciado quando comparada a acumulação do composto 09 no parasita (imagem B) e a acumulação do composto 07 (imagem B da **Figura 36**). O preenchimento da cor vermelha no corpo do parasita é realizado de forma mais eficiente com o composto 09, o que sugere que este consegue atingir diferentes organelas no microrganismo.

Na, imagem D (sobreposição de B e C), sugere-se que o composto 09 conseguiu atingir a mitocôndria do parasita. A tonalidade laranja, produto da superposição das duas emissões individuais, está presente ao longo do corpo todo do parasita, sugerindo novamente melhor acumulação do composto 09 nas organelas do parasita.

Figura 36: Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos parasitas *T. cruzi* após 2 h de encubação, com o composto 09B (B), o marcador de lisossomos (C) e uma superposição das imagens B e C (D) em uma objetiva de 40×

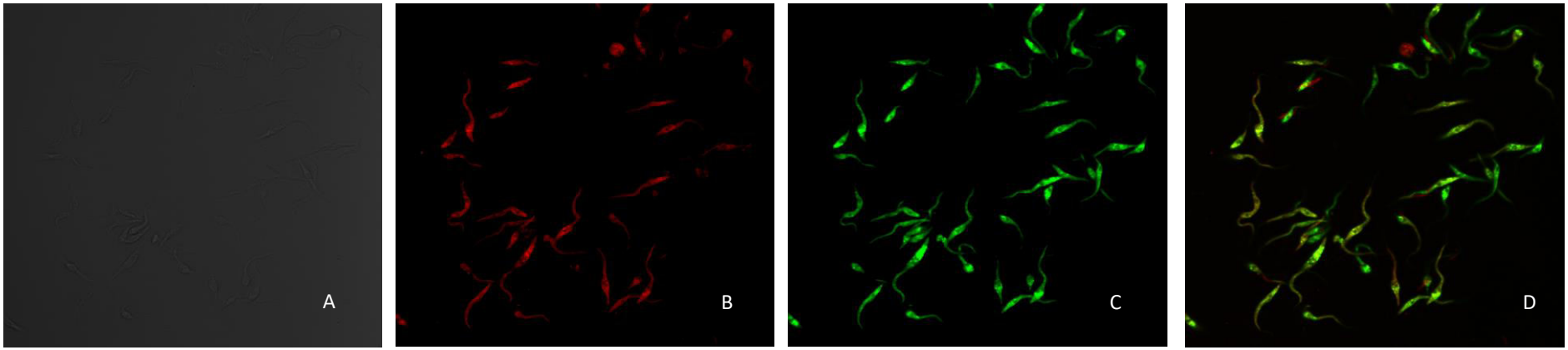
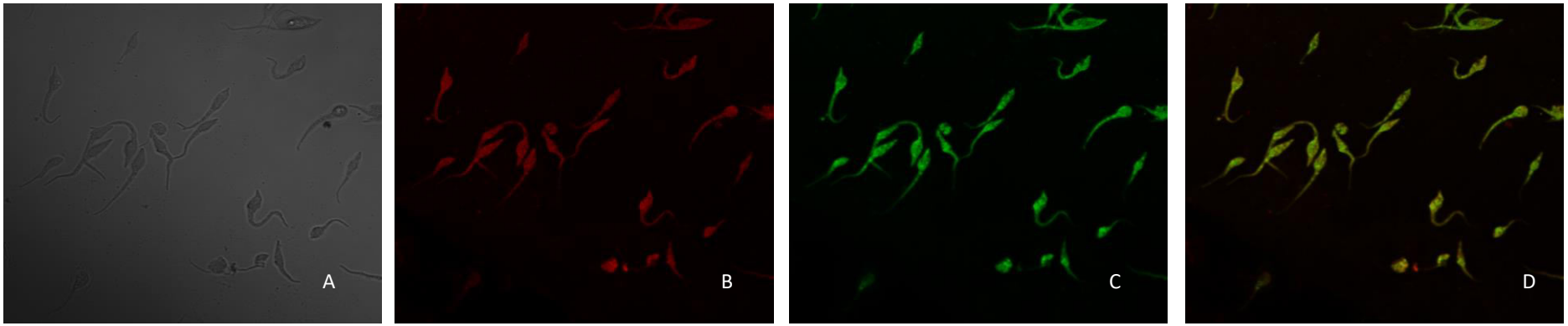


Figura 37: Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos parasitas *T. cruzi* após 2 h de encubação, com o composto 09B (B), o marcador de mitocôndria (C) e uma superposição das imagens B e C (D) em uma objetiva de 40×



5 Conclusões

As rotas sintéticas utilizadas permitieram a obtenção dos compostos – que, conforme planejado, conseguiram inibir a enzima cruzaína com boa potência (baixo-micromolar).

A primeira série de compostos sintetizada permitiu incrementar a informação sobre o reconhecimento por parte da enzima cruzaína sob esse tipo de inibidor (dipeptidilnitrilas), assim como a complementaridade que esses compostos possam apresentar diante da enzima.

Com o uso de coluna quiral em HPLC foi possivel separar e caracterizar moléculas que, após o processo de síntese, apresentem centros estereogênicos, garantindo assim pureza dos compostos acima de 95%.

O efeito gerado pela modificação estrutural das moléculas na inibição da enzima cruzaína não apresentou relação direta com mudanças na potência diante do parasita, já que algumas moléculas potentes não tiveram atividade quando expostas à forma epimastigota do *T. cruzi*.

O estudo do mecanismo de morte celular utilizando o kit LA e BE, mostrou que a atividade tripanocida do efeito tem lugar principalmente mediante o caminho de apoptose.

Os ensaios de citotoxicidade em células Vero e Huvec mostraram que os compostos, mesmo em altas concentrações (acima de 100 $\mu mol\ L^{-1}$), não se tornam tóxicos em células humanas.

Os dois compostos sintetizados que apresentam na sua estrutura uma sonda fluorescente do tipo Bodipy conseguiram, em ensaios sob células Huvec, penetrar a membrana celular, acumulando-se no citoplasma com o transcorrer do tempo – do mesmo modo que conseguiram penetrar a membrana celular do parasita e se colocalizar com os marcadores de lisossomos e mitocôndria, sugerindo assim que conseguem atingir a enzima cruzaína, presente nos lisossomos. No entanto, o composto 09 tem mais facilidade em abranger organelas no parasita de modo mais eficiente.

7 REFERÊNCIAS

1 Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organization**, Geneva, 2018. Disponível em: < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/ >. Acesso em: 02 outro 2018.

2 PEREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, Jan 6 2018. ISSN 0140-6736.

3 CHIRAC, P.; TORREELE, E. Global framework on essential health R&D. **Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1560-1561, 2006. ISSN 01406736 (ISSN). Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33646368910&partnerID=40&md5=cc8d708711903e59b562e85d27fd023e >.

4 MORAN, M. et al. Neglected disease research and development: How much are we really spending? **PLoS Medicine**, v. 6, n. 2, p. 0137-0146, 2009. ISSN 15491277 (ISSN). Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-61449194131&partnerID=40&md5=587a908bea131031468d14a415e2ffae >.

5 REYES, C. D. C. **síntese de Dipeptidil-nitrilas coo inibidores da Enzima Cruzaina**. 2014. 95 Instituto de Química de Sao Carlos, Universidade de Sao Paulo

6 DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7-86, 2016. ISSN 2237-9622. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222016000500007&nrm=iso >.

7 DIAS, J. C. et al. [Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015]. **Epidemiol Serv Saude**, v. 25, n. spe, p. 7-86, Jun 2016. ISSN 1679-4974.

8 Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organization**, Geneva, 2018. Disponível em: < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/ >. Acesso em: 02 outro 2018.

9 COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301_supp, p. S6-S7, 2010. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/nature09221 >.

10 VIELLELA, M. B., MARIA. MELO, VICENTE. PINTO JOÃO. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em programa descentralizado: avaliação de conhecimentos e práticas de agentes municipais em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. **VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA DOENÇA DE CHAGAS**, p. 2428-2438, 2007.

11 PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. Guanabara Koogan, v. 11, p. 872,

12 **Guia de Vigilância em saude**, Ministério da Saúde. Brasília/DF: Secretaria de Vigilância em Saúde. 3 2017.

13 **Doença de chagas**. Ministério da Saúde Acesso em: fev. 2012: http://portalsaude.saude.gov.br p. 2017.

14 COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269466900002 >.

15 URBINA, J. A. New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 13, n. 5, p. 661-669, 2003. Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0038446640&partnerID=40&md5=cf584471dee195a5e62143e260774b33 >.

16 DIAS, L. C. et al. Chemotherapy of Chagas' disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. **Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009. ISSN 01004042 (ISSN).

17 INAOKA, D. K. et al. Structures of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. **Biochemistry**, v. 47, n. 41, p. 10881-10891, 2008. ISSN 0006-2960. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/bi800413r >.

18 HOARE, C. A. - **The trypanosomes of mammals. A zoological monograph**. 1972.

19 HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Mol Phylogenet Evol, v. 44, n. 1, p. 15-25, Jul 2007. ISSN 1055-7903 (Print)
1055-7903.

20 TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472-480, 2001. ISSN 0020-7519. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7F-42WX3BM-8/2/71efc3e671127f26a8ce080c13404975 >.

21 MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. Epidemiology and Infection, v. 136, n. 9, p. 1153-1164, 2008. ISSN 09502688 (ISSN). Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0 48249085713&partnerID=40&md5=618886ebf3e140af247f51891f1655d8 >.

22 MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 639-644, 1999. ISSN 0968-0896. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089699000085 >.

23 SELZER, P. M. et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: **Lessons from a parasite target. Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 20, p. 11015-11022, September 28, 1999 1999. Disponível em: < http://www.pnas.org/content/96/20/11015.abstract >.

24 BRYANT, C. et al. Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 21, p. 6218-6221, 2009. Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-71749099614&partnerID=40&md5=1c439b6fdaafb986f16c12d0bb7abb4b >.

25 ENGEL, J. C. et al. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in Trypanosoma cruzi. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. 5, p. 597-606, 1998. Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031937742&partnerID=40&md5=09ac1e05b7c1976d73b4db7cef43df5d >.

26 FERREIRA, R. S. et al. Complementarity Between a Docking and a High-Throughput Screen in Discovering New Cruzain Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 4891-4905, 2010. ISSN 0022-2623. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/jm100488w >.

27 MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 100, n. 8, p. 663-677, 2006. ISSN 00034983 (ISSN). Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34250635871&partnerID=40&md5=5d82e73113e11ffdf4dd4b519abd5a0f >.

28 ROMEIRO, N. C. et al. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 641-652, 2009. ISSN 09680896 (ISSN). Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-58549106331&partnerID=40&md5=586b705e18516674a3890186e84da4e1 >.

29 DOS SANTOS FILHO, J. M. et al. Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-N-acylhydrazones as anti-Trypanosoma cruzi agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, p. 6682-6691, 2009. ISSN 09680896 (ISSN). Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-69349097629&partnerID=40&md5=428b6dbc9544376974f5cedacae0db49 >.

30 CHEN, Y.; POHLHAUS, D. T. In silico docking and scoring of fragments. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 7, n. 3, p. e149-e156, 2010. ISSN

17406749 (ISSN). Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78650717723&partnerID=40&md5=490964b0519e57a5bd60d3d744a7c50c >.

31 SALES JUNIOR, P. A. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: **A Review. Am J Trop Med Hyg,** v. 97, n. 5, p. 1289-1303, Nov 2017. ISSN 0002-9637.

32 SALISBURY, C. M.; ELLMAN, J. A. Rapid identification of potent nonpeptidic serine protease inhibitors. **Chembiochem**, v. 7, n. 7, p. 1034-1037, Jul 2006. ISSN 1439-4227. Disponível em: < <Go to ISI>://000238879600008 >.

33 FUJII, N. et al. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 1, p. 121-123, 2005. Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-9644265257&partnerID=40&md5=b4939d2515b6233d76d52fc48fbf7cac >.

34 BRAK, K. et al. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 20, p. 6404-6410, 2008. Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-43949095150&partnerID=40&md5=265319c177cac7d2d56cce1d8cf2522c >.

35 FRICKER, S. P. et al. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 10, p. 1839-1845, 2008. ISSN 01620134 (ISSN). Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-50649103962&partnerID=40&md5=a84dbe4ed8273bb2fc0172ddbe5cfbd2 >.

36 DURRANT, J. D. et al. Computational identification of uncharacterized cruzain binding sites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, 2010. Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77955297439&partnerID=40&md5=8ade76c5d1109d62513816ae0d0f0f0d >.

37 PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: **A Rational Approach in Drug Design. Chemical Reviews**, v. 96, n. 8, p. 3147-3176, 1996/01/01 1996. ISSN 0009-2665. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/cr950066q >. Acesso em: 2014/01/26.

38 SILES, R. et al., ISSN 16. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X0600583X >.

39 CHAUDHRY, B. et al. Systematic Review: Impact of Health Information Technology on Quality, Efficiency, and Costs of Medical Care. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 742-752, 2006. ISSN 0003-4819. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00125 >.

40 BOENS, N.; LEEN, V.; DEHAEN, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 3, p. 1130-1172, 2012. ISSN 0306-0012. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1039/C1CS15132K >.

41 ESCOBEDO, J. O. et al. NIR dyes for bioimaging applications. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 1, p. 64-70, 2010. ISSN 1367-5931. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136759310900163X >.

42 NTZIACHRISTOS, V.; BREMER, C.; WEISSLEDER, R. Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. **European Radiology**, v. 13, n. 1, p. 195-208, 2003. ISSN 1432-1084. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00330-002-1524-x >.

43 AMIOT, C. et al. Near-Infrared Fluorescent Materials for Sensing of Biological Targets. **Sensors**, v. 8, n. 5, p. 3082, 2008. ISSN 1424-8220. Disponível em: < http://www.mdpi.com/1424-8220/8/5/3082 >.

44 NIU, S. L. et al. Water-solubilisation and bio-conjugation of a red-emitting BODIPY marker. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 66-69, 2011. ISSN 1477-0520. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1039/C0OB00693A >.

45 QIN, W. et al. Photophysical Properties of Borondipyrromethene Analogues in Solution. **The Journal of Physical Chemistry** A, v. 109, n. 33, p. 7371-7384, 2005. ISSN 1089-5639. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/jp052626n >.

46 BARUAH, M. et al. Solvent and pH Dependent Fluorescent Properties of a Dimethylaminostyryl Borondipyrromethene Dye in Solution. **The Journal of Physical Chemistry** A, v. 110, n. 18, p. 5998-6009, 2006. ISSN 1089-5639. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/jp054878u >.

47 KAROLIN, J. et al. Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 17, p. 7801-7806, 1994. ISSN 0002-7863. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/ja00096a042 >.

48 YOGO, T. et al. Highly Efficient and Photostable Photosensitizer Based on BODIPY Chromophore. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 35, p. 12162-12163, 2005. ISSN 0002-7863. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/ja0528533 >.

49 WU, W.; CUI, X.; ZHAO, J. Hetero Bodipy-dimers as heavy atom-free triplet photosensitizers showing a long-lived triplet excited state for triplet-triplet annihilation upconversion. **Chemical Communications**, v. 49, n. 79, p. 9009-9011, 2013. ISSN 1359-7345. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1039/C3CC45470C >.

50 LÖSER, R. et al. Interaction of Papain-like Cysteine Proteases with Dipeptide-Derived Nitriles†. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 24, p. 7688-7707, 2005/12/01 2005. ISSN 0022-2623. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/jm050686b >. Acesso em: 2013/12/01.

51 ALVES, L. C. et al. Analysis of the S2 subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of Leishmania mexicana, and cruzain of Trypanosoma cruzi, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, n. 2, p. 137-143, 2001. Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034788639&partnerID=40&md5=cf455e83451dc0717f894f6dd35f963c >.

52. Substrate specificity of recombinant cysteine proteinase, CPB, of Leishmania mexicana. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 1-9, 2001. ISSN 01666851 (ISSN). Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034910189&partnerID=40&md5=047f778c2c55cb3c0c362e88a98dfb66 >.

53 JAISHANKAR, P. et al. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 2, p. 624-628, 2008. ISSN 0960894X (ISSN). Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-38149118059&partnerID=40&md5=491f4a3adfd287f29b325e749c12dc02 >.

54 SERVEAU, C. et al. Discrimination of cruzipain, the major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi, and mammalian cathepsins B and L, by a pH-inducible fluorogenic substrate of trypanosomal cysteine proteinases. **European Journal Of Biochemistry** / FEBS, GERMANY, v. 259, n. 1-2, p. 275-280, 1999. ISSN 0014-2956. Disponível em: < http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=9914503⟨ =pt-br&site=ehost-live >.

55 ENGEL, J. C. et al. Cysteine protease inhibitors cure an experimental Trypanosoma cruzi infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 4, p. 725-734, 1998. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075553100011 >.

56 ALTMANN, E. et al. Dipeptide nitrile inhibitors of cathepsin K. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 9, p. 2549-2554, 5/1/ 2006. ISSN 0960-894X. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X06001132 >.

57 ASAAD, N. et al. Dipeptidyl nitrile inhibitors of Cathepsin L. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4280-4283, 8/1/ 2009. ISSN 0960-894X. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X09007628 >.

58 BETHEL, P. A. et al. Design of selective Cathepsin inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 16, p. 4622-4625, 2009. Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67749118106&partnerID=40&md5=e55e518fe2f14fb5842fba7362b790bf >.

59 BOYD, M. J. et al. Investigation of ketone warheads as alternatives to the nitrile for preparation of potent and selective cathepsin K inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 3, p. 675-679, 2/1/ 2009. ISSN 0960-894X. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X0801562X >.

60 GUAY, D. et al. Design and synthesis of dipeptidyl nitriles as potent, selective, and reversible inhibitors of cathepsin C. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 18, p. 5392-5396, 9/15/ 2009. ISSN 0960-894X. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X09010889 >.

61 FERNANDES, W. B. **Determinação do modo de interação de inibidores reversíveis da cruzaína de Trypanosoma cruzi via cristalografia de raios X**. 2015. (doutor). Instituto de Química de São Carlos, USP

62 BRADLEY, D.; WILLIAMS, G.; LAWTON, M. Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 24, p. 8351-8354, Dec 2010. ISSN 0022-3263. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000285081100002 >.

63 MALAVAŠIČ, Č. et al. Synthesis and structure of novel (S)-1,6-dialkylpiperazine-2,5-diones and (3S,6S)-1,3,6-trialkylpiperazine-2,5-diones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 22, n. 6, p. 629-640, 3/30/ 2011. ISSN 0957-4166. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0957416611001704 >.

64 BONDEBJERG, J. et al. Dipeptidyl nitriles as human dipeptidyl peptidase I inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 13, p. 3614-3617, 7/1/ 2006. ISSN 0960-894X. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X06001168 >.

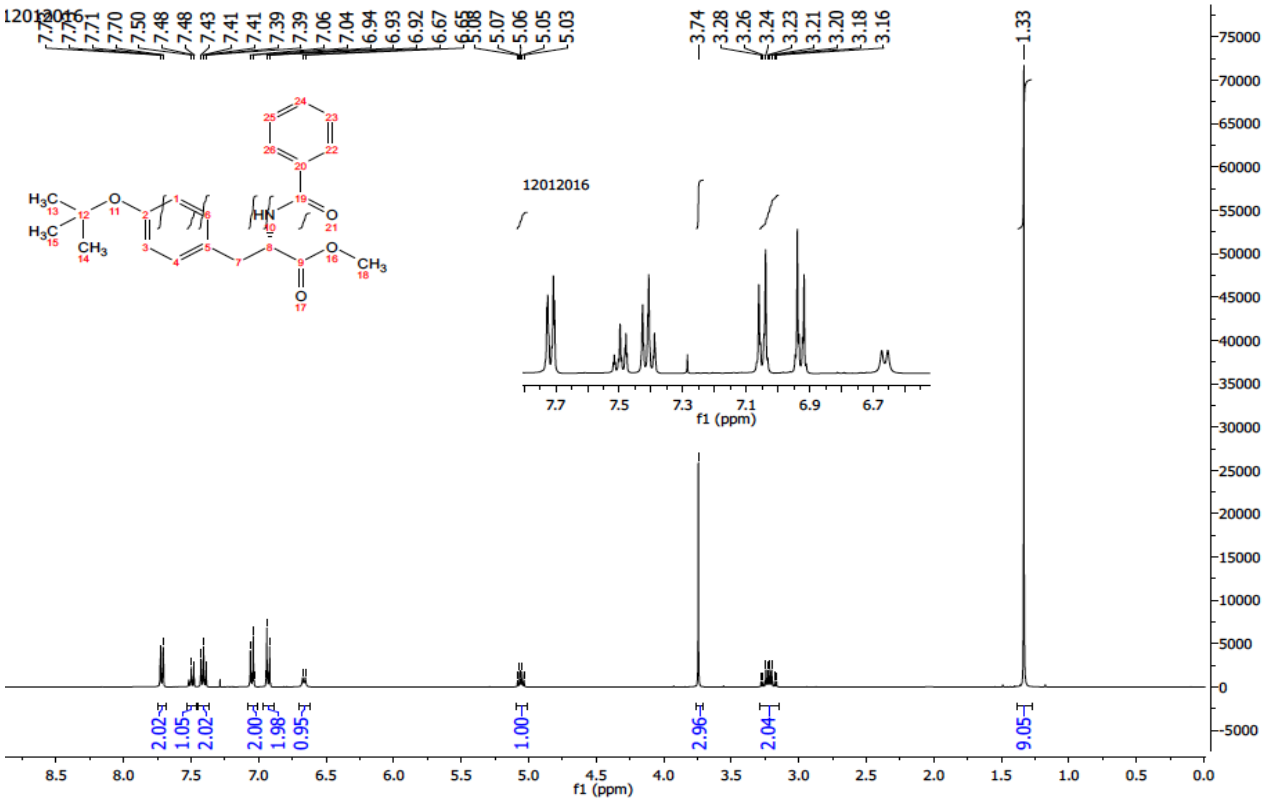
65 AVELAR, L. A. A. et al. Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003916, 2015. Disponível em: < https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003916 >.

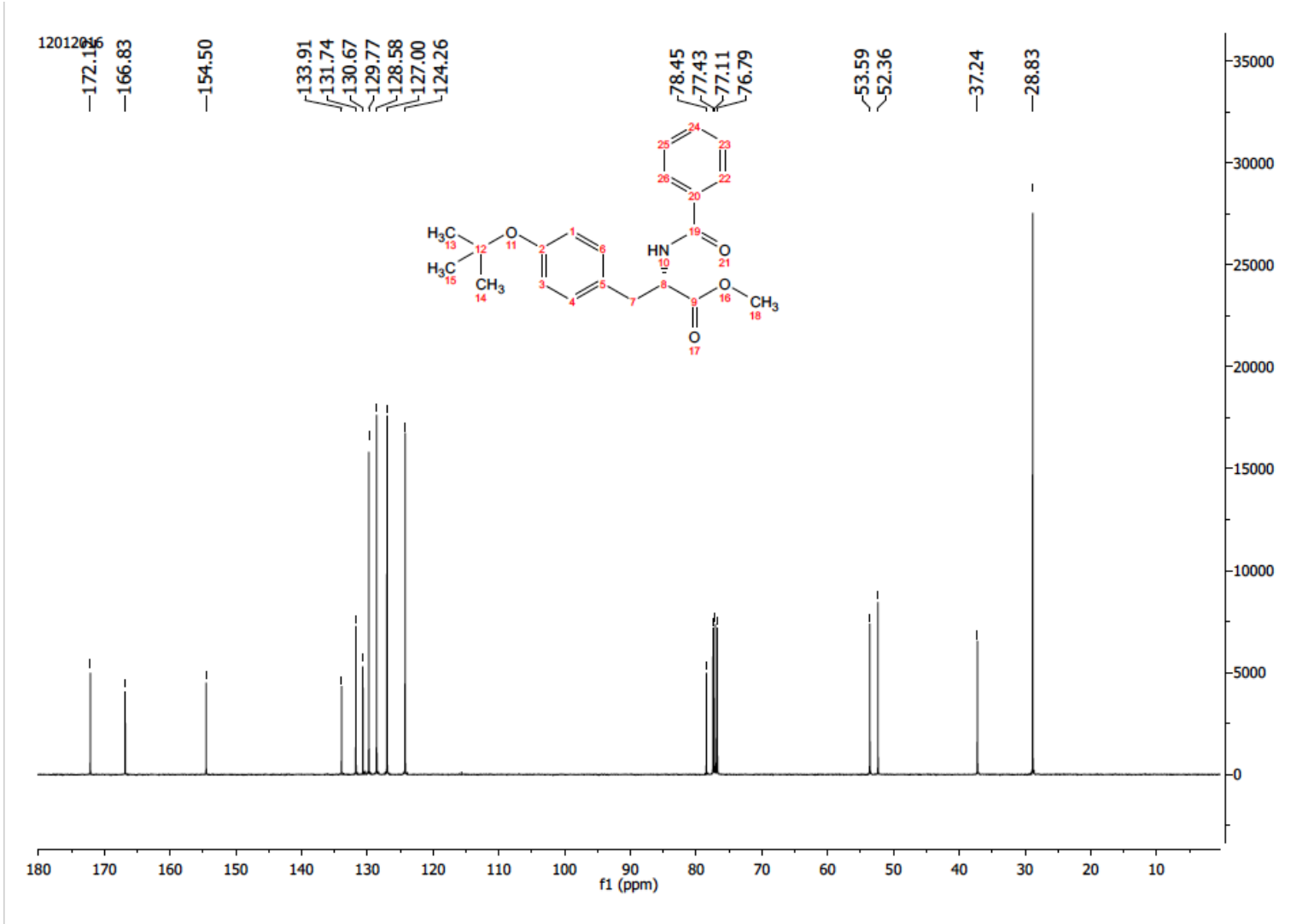
66 WIGGERS, H. J. **Planejamento de Inibidores da Enzima Cruzaína de Trypanosoma cruzi: dos Ligantes aos Compostos Matrizes**. 2011. 173p. Tese de doutorado (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, São Carlos.

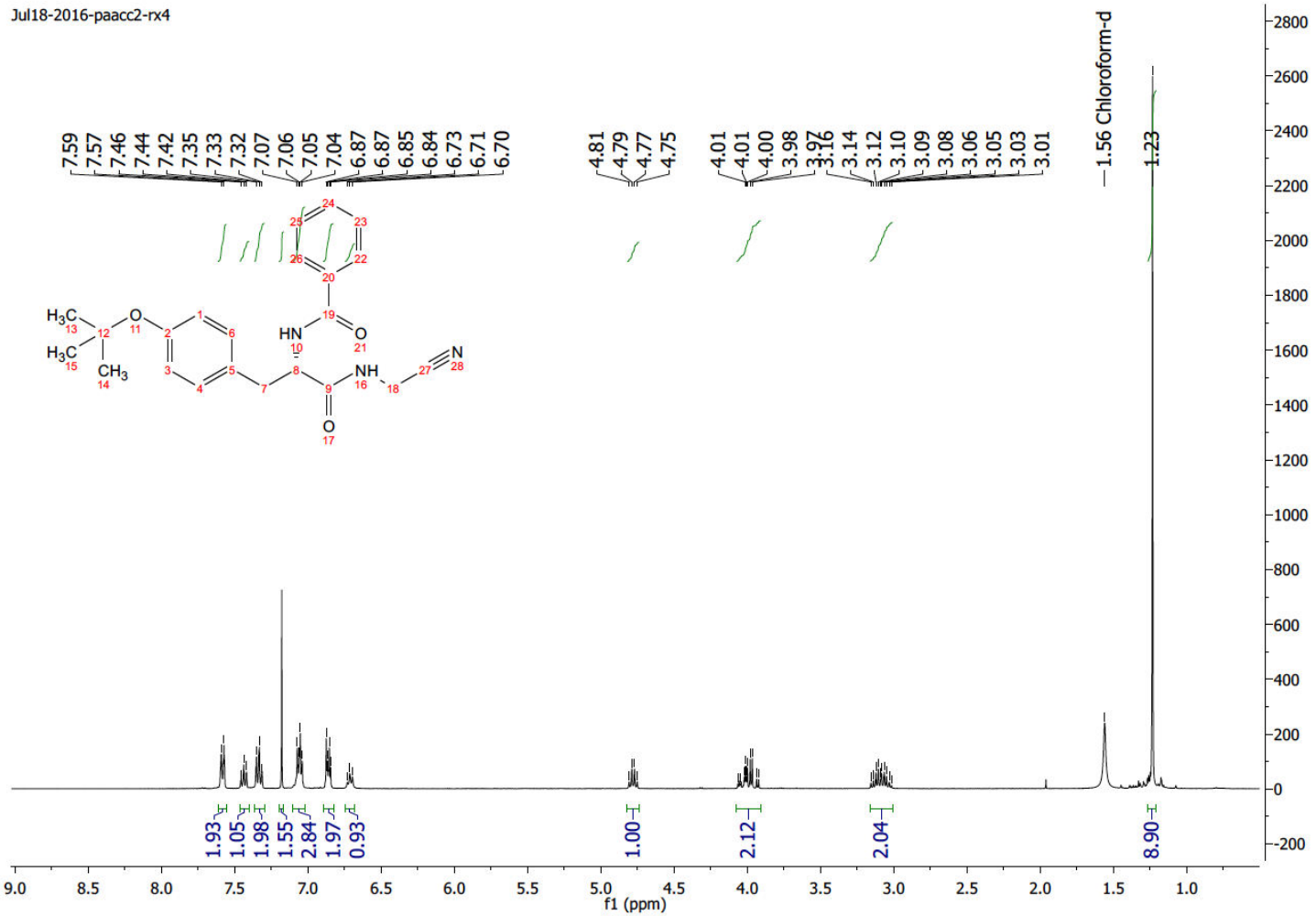
67 NETWORK, T. P.-A. S. A Training Manual for Screening in Neglected Diseases DND*i* and Pan-Asian Screening Network 2009.

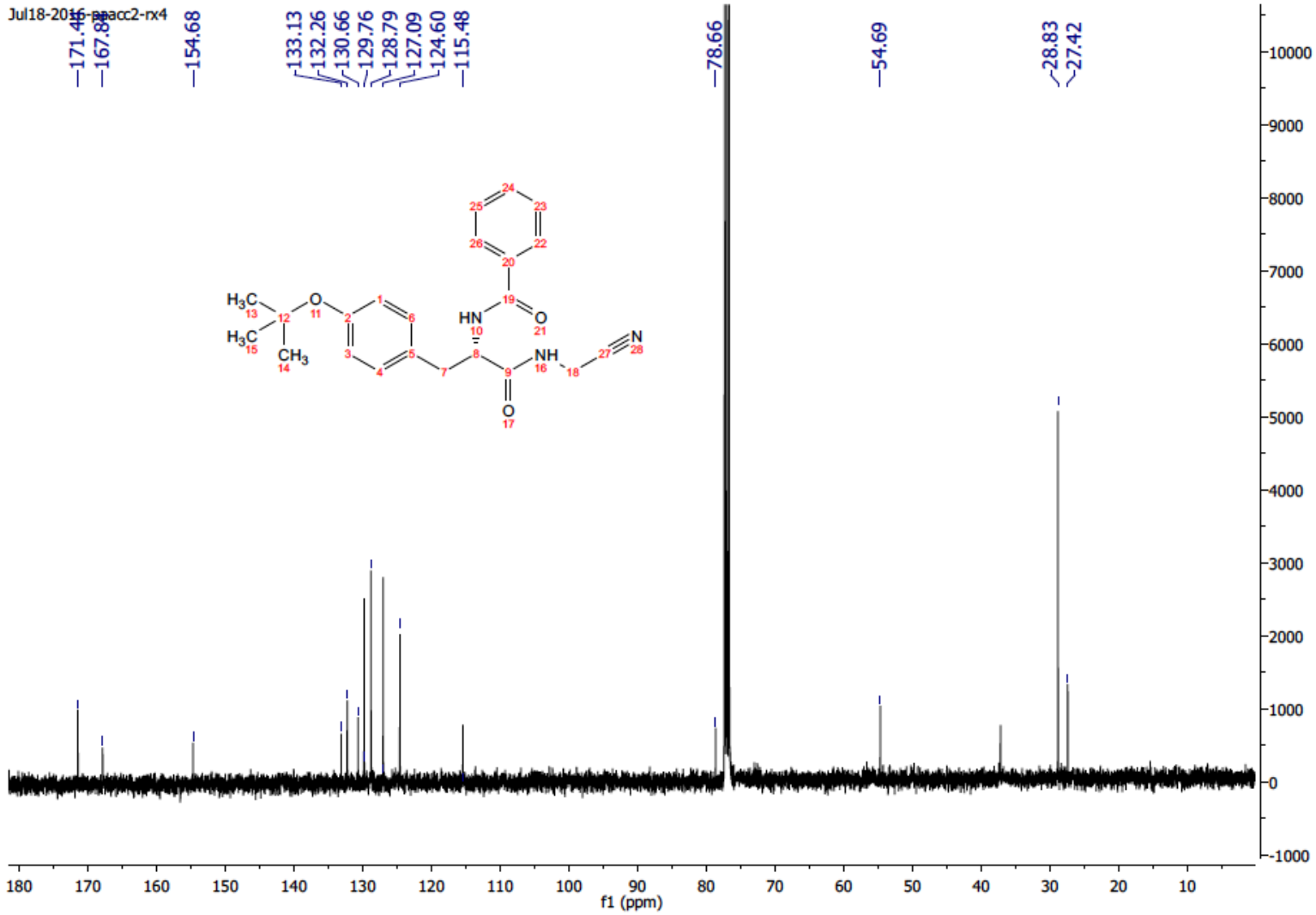
8 Anexos

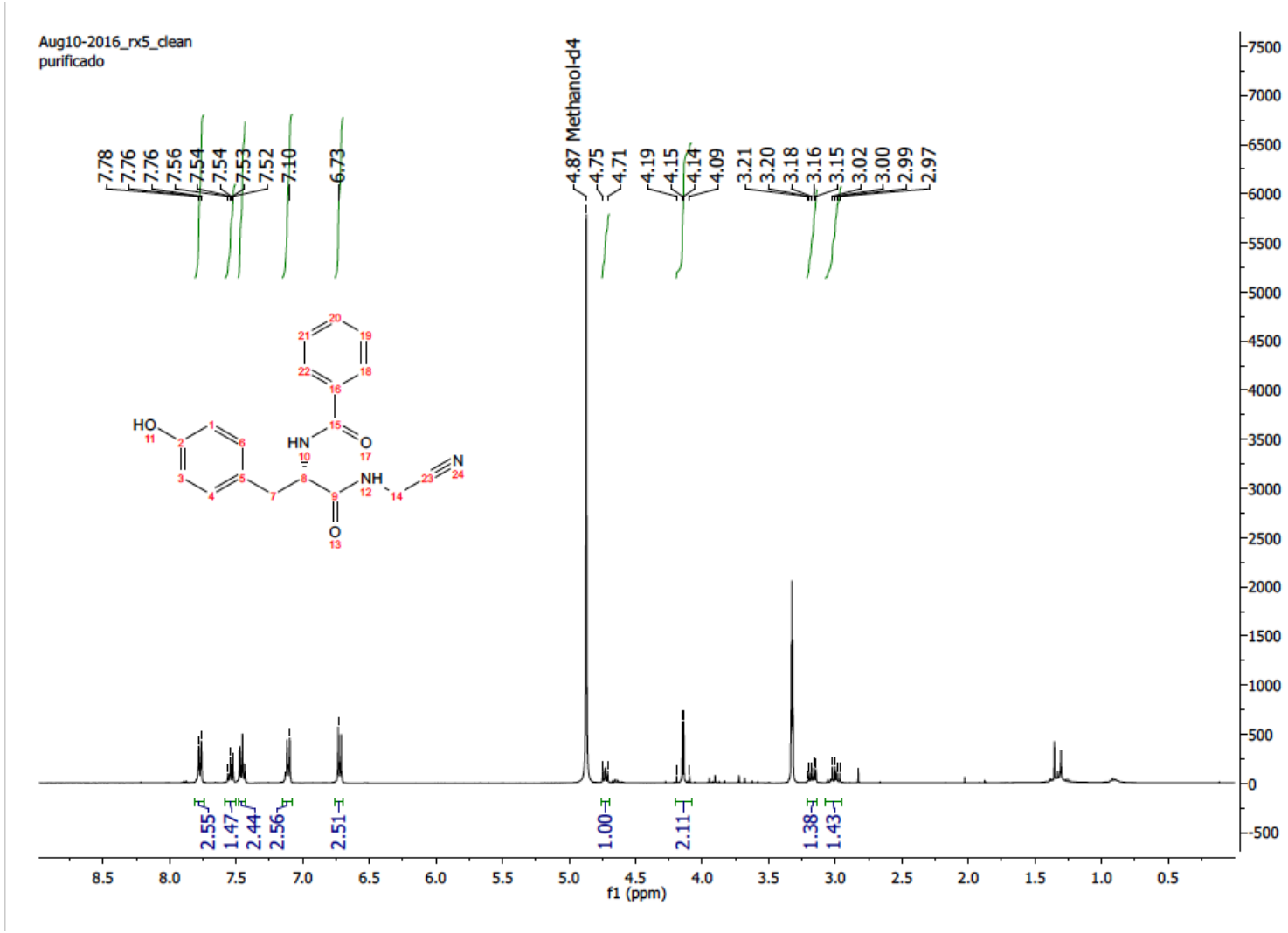
*8.1 **Anexo 1:** espectros de RMN ^{1}H, ^{13}C e Massas na síntese do composto **09** marcado com a sonda fluorescente (composto **09B**)*

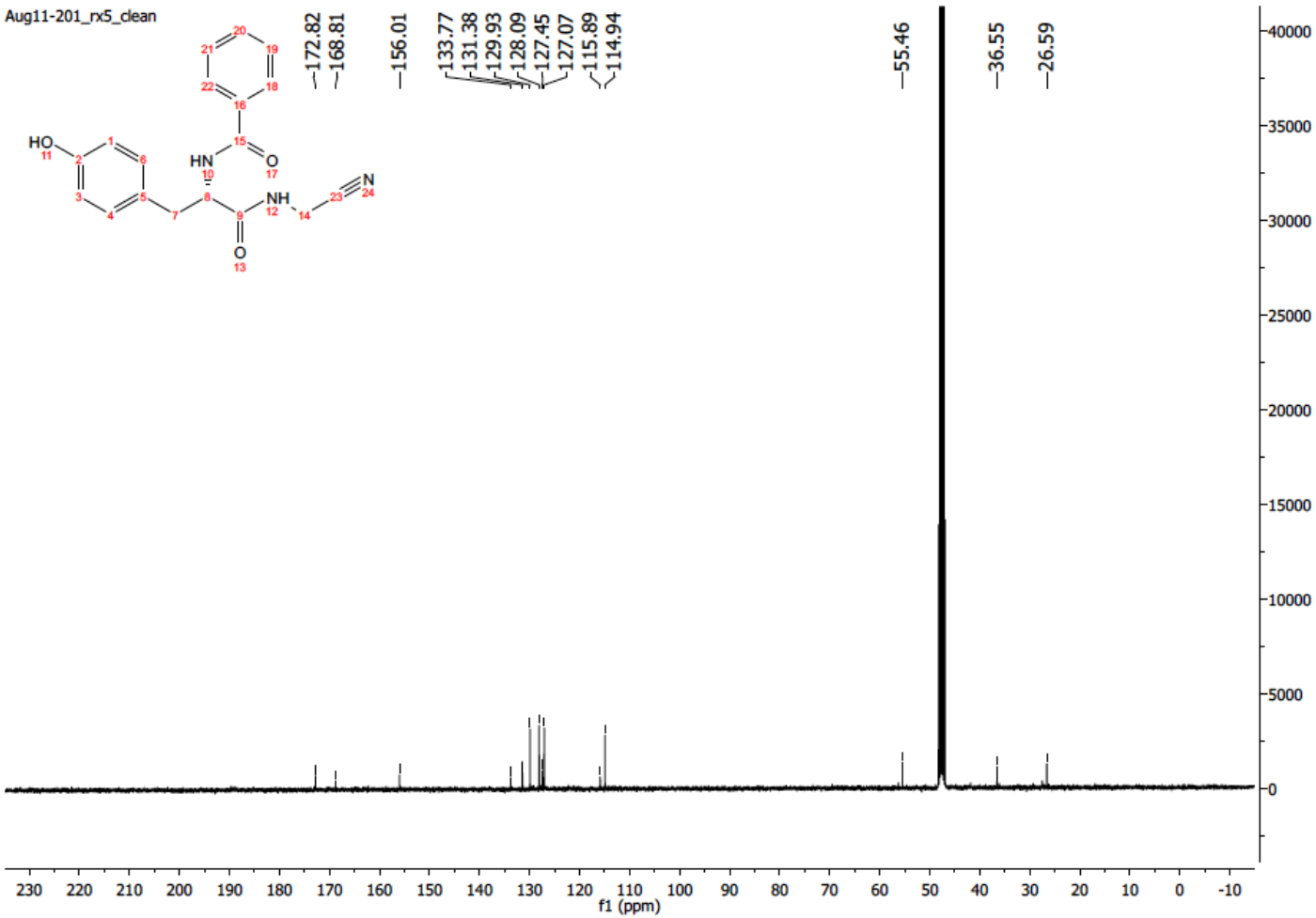


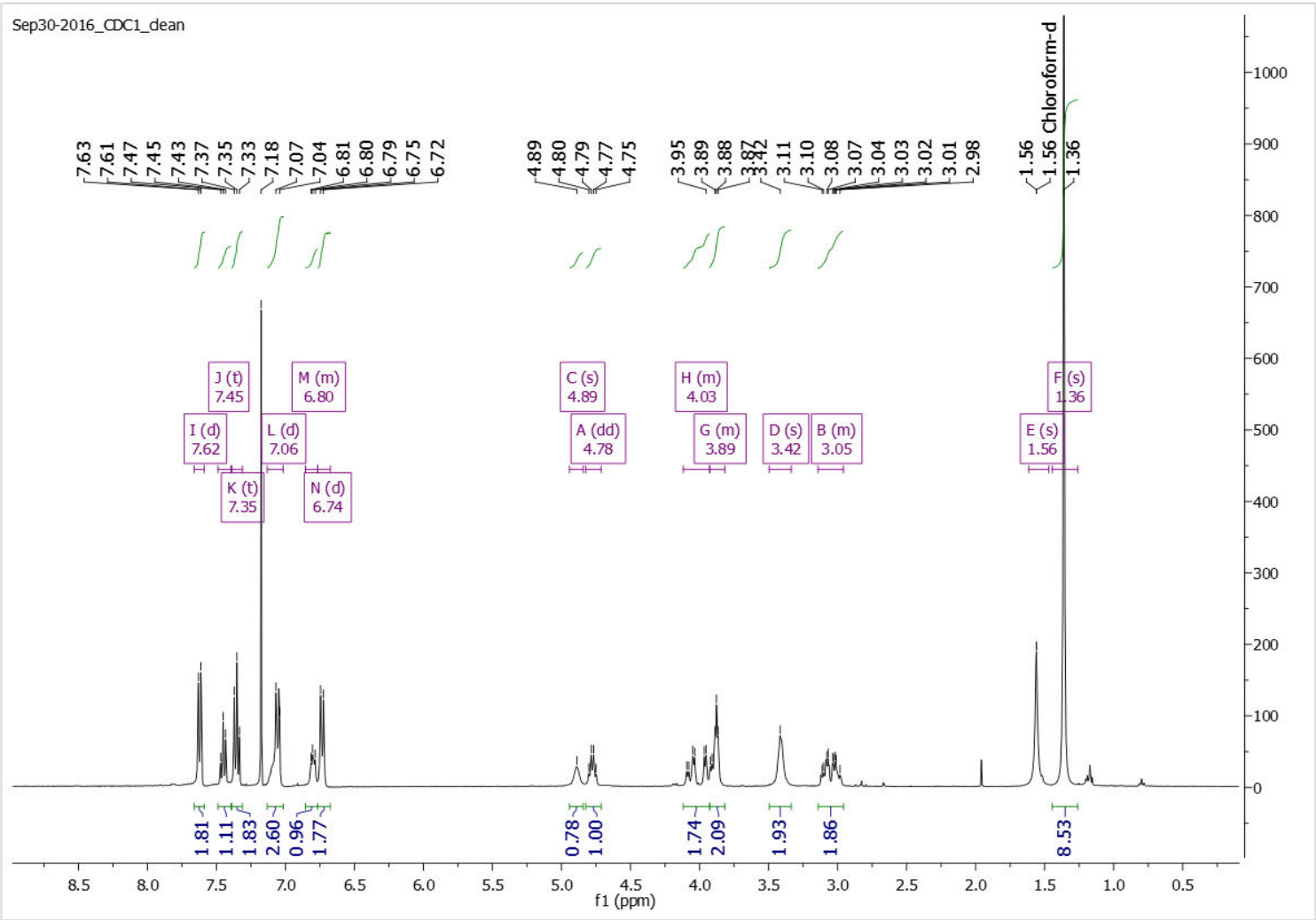

172.15
166.83
154.50
133.91
131.74
130.67
129.77
128.58
127.00
124.26
78.45
77.43
77.11
76.79
53.59
52.36
37.24
28.83
f1 (ppm)

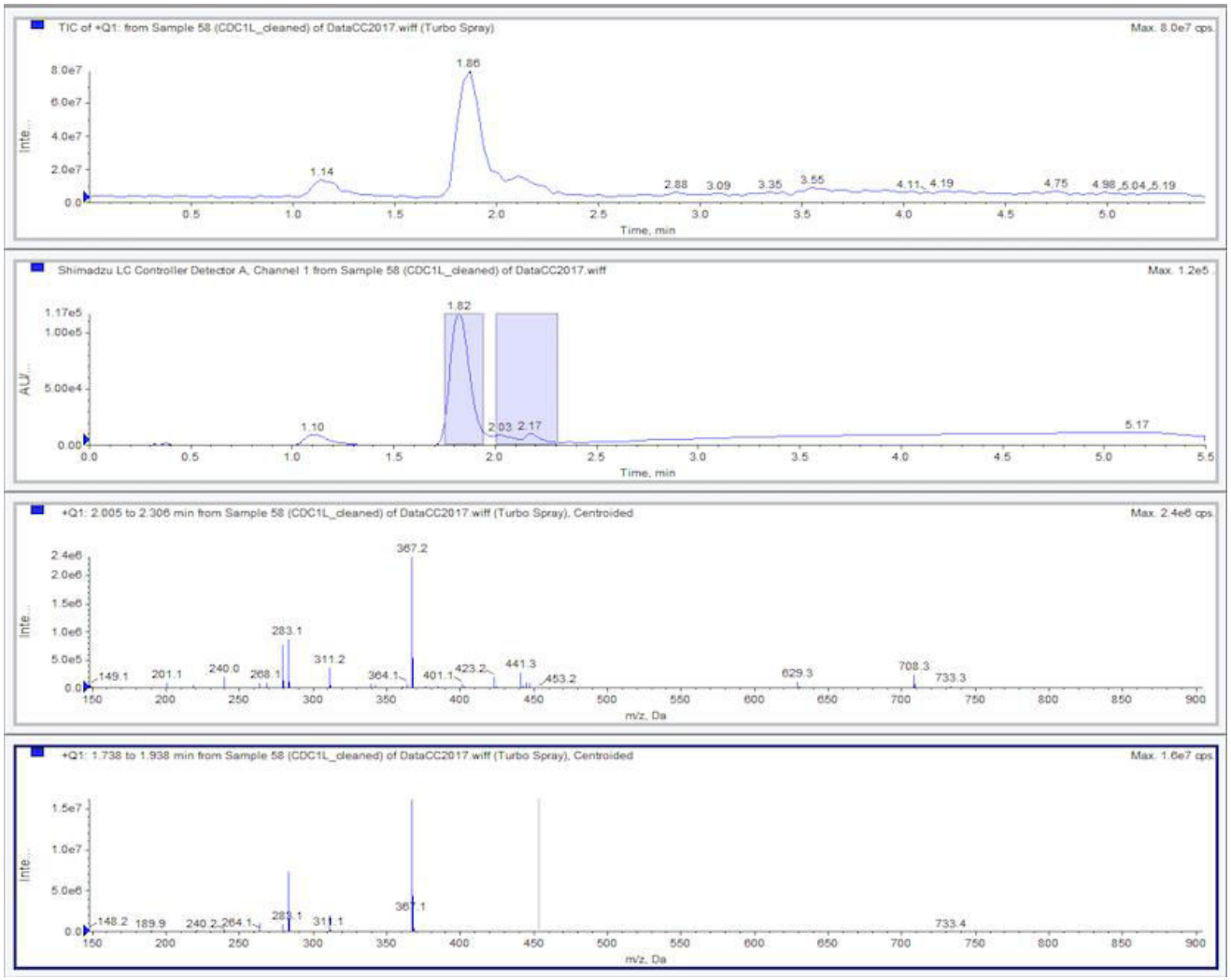

Jul18-2016-paacc2-rx4
7.59
7.57
7.46
7.44
7.42
7.35
7.33
7.32
7.07
7.06
7.05
7.04
6.87
6.87
6.85
6.84
6.73
6.71
6.70
4.81
4.79
4.77
4.75
4.01
4.01
4.00
3.98
3.97
3.16
3.14
3.12
3.10
3.09
3.08
3.06
3.05
3.03
3.01
1.56 Chloroform-d
1.23
1.93
1.05
1.98
1.55
2.84
1.97
0.93
1.00
2.12
2.04
8.90
f1 (ppm)


Jul18-2016-aaacc2-rx4
171.48
167.84
154.68
133.13
132.26
130.66
129.76
128.79
127.09
124.60
115.48
78.66
54.69
28.83
27.42
f1 (ppm)


Aug10-2016_rx5_clean
purificado
7.78
7.76
7.76
7.56
7.54
7.54
7.53
7.52
7.10
6.73
4.87 Methanol-d4
4.75
4.71
4.19
4.15
4.14
4.09
3.21
3.20
3.18
3.16
3.15
3.02
3.00
2.99
2.97
HO
HN
O
NH
N
O
2.55
1.47
2.44
2.56
2.51
1.00
2.11
1.38
1.43
f1 (ppm)


Aug11-201_rx5_clean
172.82
168.81
156.01
133.77
131.38
129.93
128.09
127.45
127.07
115.89
114.94
55.46
36.55
26.59
HO
HN
O
NH
N
O
f1 (ppm)


Sep30-2016_CDCl1_dean
7.63
7.61
7.47
7.45
7.43
7.37
7.35
7.33
7.18
7.07
7.04
6.81
6.80
6.79
6.75
6.72
4.89
4.80
4.79
4.77
4.75
3.95
3.89
3.88
3.87
3.42
3.11
3.10
3.08
3.07
3.04
3.03
3.02
3.01
2.98
1.56
1.56 Chloroform-d
1.36
J (t) 7.45
M (m) 6.80
I (d) 7.62
L (d) 7.06
K (t) 7.35
N (d) 6.74
C (s) 4.89
A (dd) 4.78
H (m) 4.03
G (m) 3.89
D (s) 3.42
B (m) 3.05
F (s) 1.36
E (s) 1.56
1.81
1.11
1.83
2.60
0.96
1.77
0.78
1.00
1.74
2.09
1.93
1.86
8.53
f1 (ppm)


TIC of +Q1: from Sample 58 (CDC1L_cleaned) of DataCC2017.wiff (Turbo Spray)
Max. 8.0e7 cps.
Inte...
Time, min
Shimadzu LC Controller Detector A, Channel 1 from Sample 58 (CDC1L_cleaned) of DataCC2017.wiff
Max. 1.2e5
AU...
Time, min
+Q1: 2.005 to 2.306 min from Sample 58 (CDC1L_cleaned) of DataCC2017.wiff (Turbo Spray), Centroided
Max. 2.4e6 cps.
Inte...
m/z, Da
+Q1: 1.738 to 1.938 min from Sample 58 (CDC1L_cleaned) of DataCC2017.wiff (Turbo Spray), Centroided
Max. 1.6e7 cps.
Inte...
m/z, Da

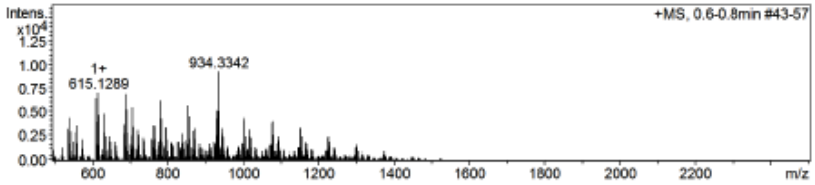
8.2 *Anexo 2: espectros de Massas do composto **09** marcado com a sonda fluorescente (composto **09B**)*

Mass Spectrometry
Analytical Services
School of Chemistry

The University of Nottingham

Sample-ID	c_cam_CDC1_P2	Lab	C13
Submitter	Cristian Camilo Reyes	Supervisor	Barrie Kelham
Analysis Name	c_cam_CDC1_P2_546026_39_01_42717.d	Acquisition Date	3/27/2017 11:48:42 AM
Ionisation Mode	ESI Positive	Instrument	Bruker MicroTOF

+MS, 0.6-0.8min #43-57



#	m/z	I %
1	541.1238	47.4
2	610.1758	70.1
3	615.1289	75.9
4	616.1315	46.3
5	617.1215	50.1
6	633.1320	51.5
7	689.1450	74.5
8	690.1446	48.3
9	691.1357	56.6
10	707.1494	59.1
11	781.1763	67.2
12	782.1752	46.0
13	855.1996	61.5
14	856.1966	48.3
15	929.2269	55.5
16	930.2282	46.4
17	934.3342	100.0
18	935.3388	54.8
19	1003.2547	47.0
20	1004.2503	44.0

Generate Molecular Formula Parameters

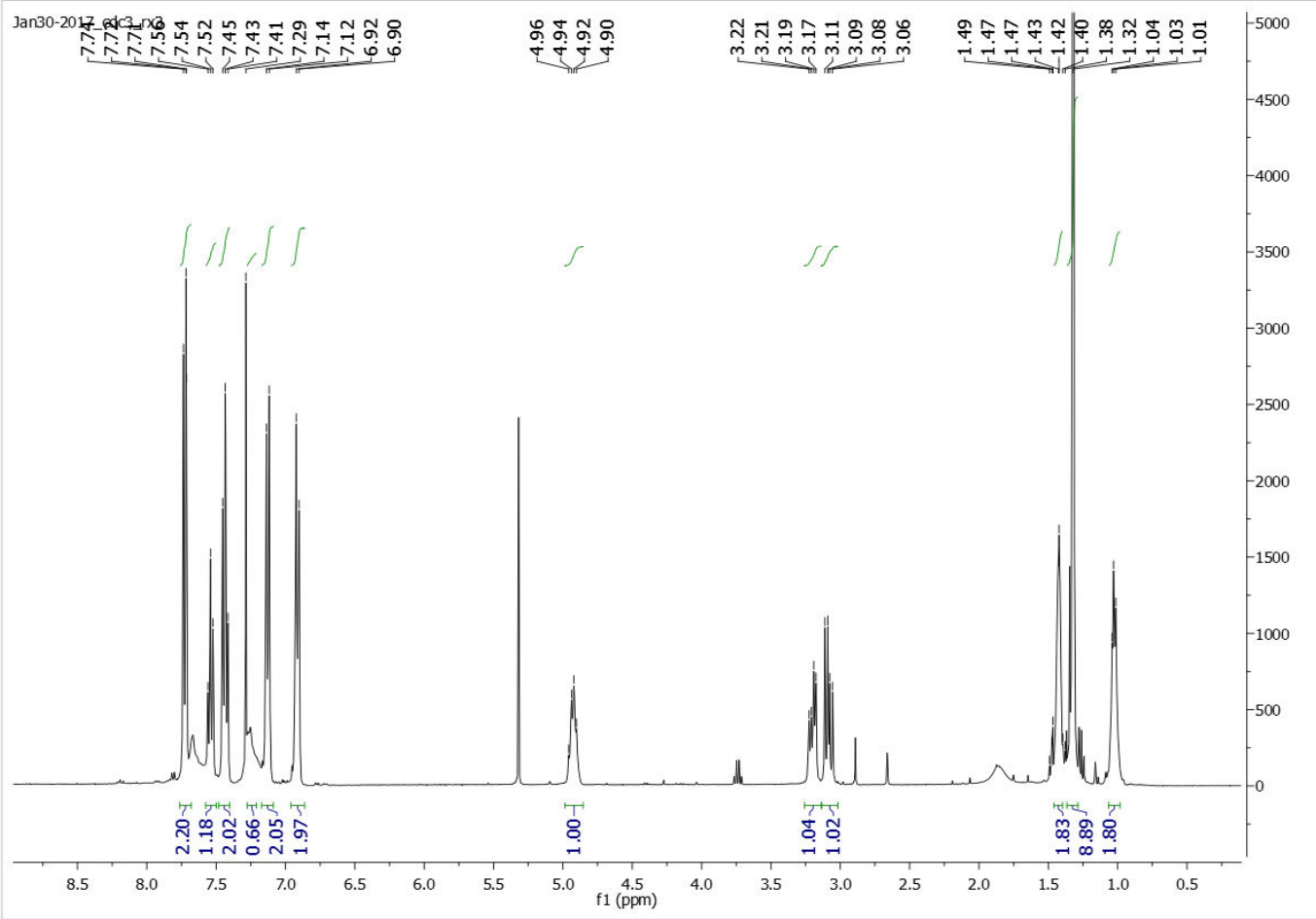
Charge	Tolerance	sigma limit	H/C Ratio	Electron Conf.	Nitrogen Rule	Chrom.BackGround	Calibration
+1	6 ppm	0.08	3 - 0	both	false	false	TRUE

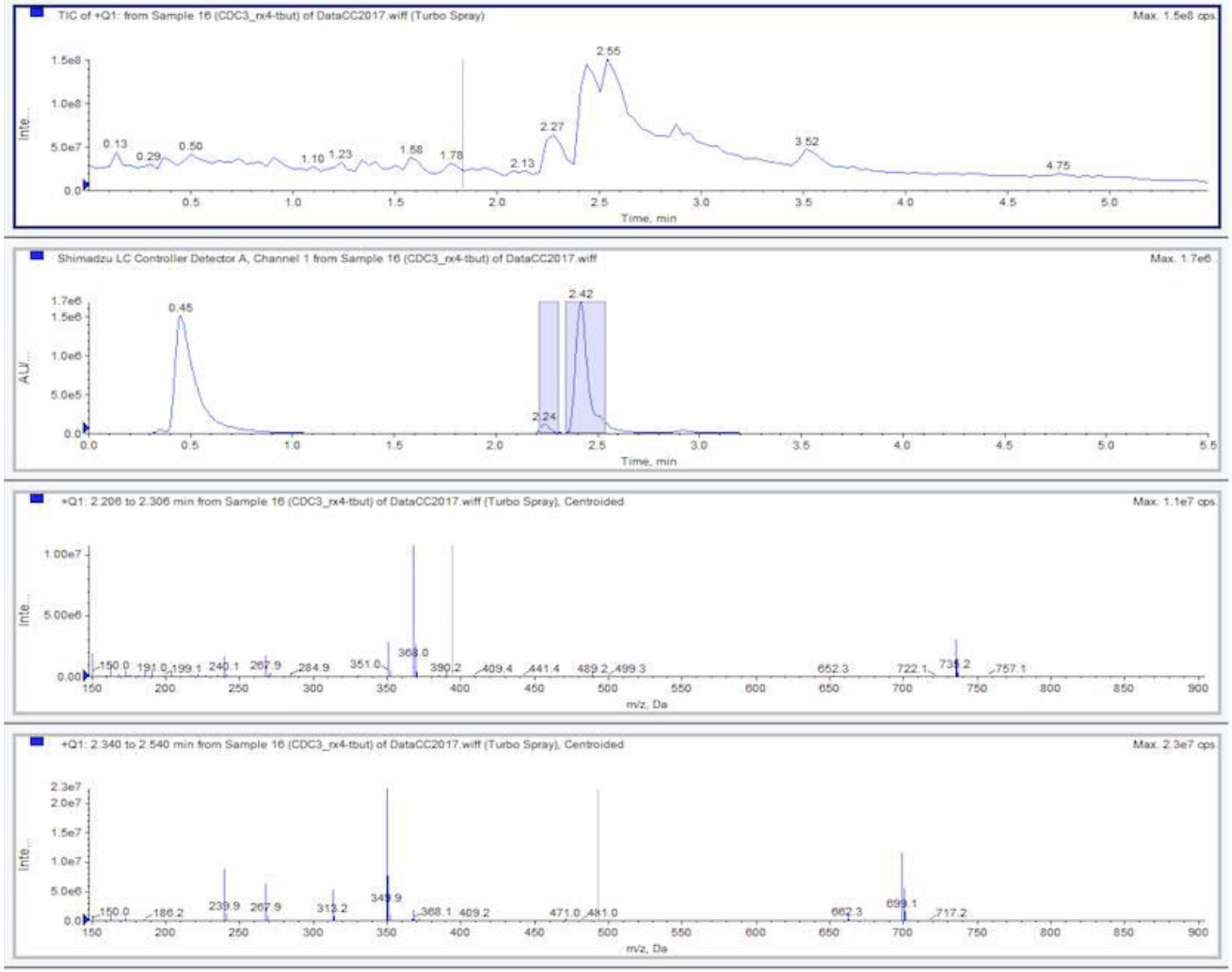
Expected Formula C49 H4 B1 F2 N7 O6 S1 **Adduct(s):** H, Na, NH4, C3H5N2, radical

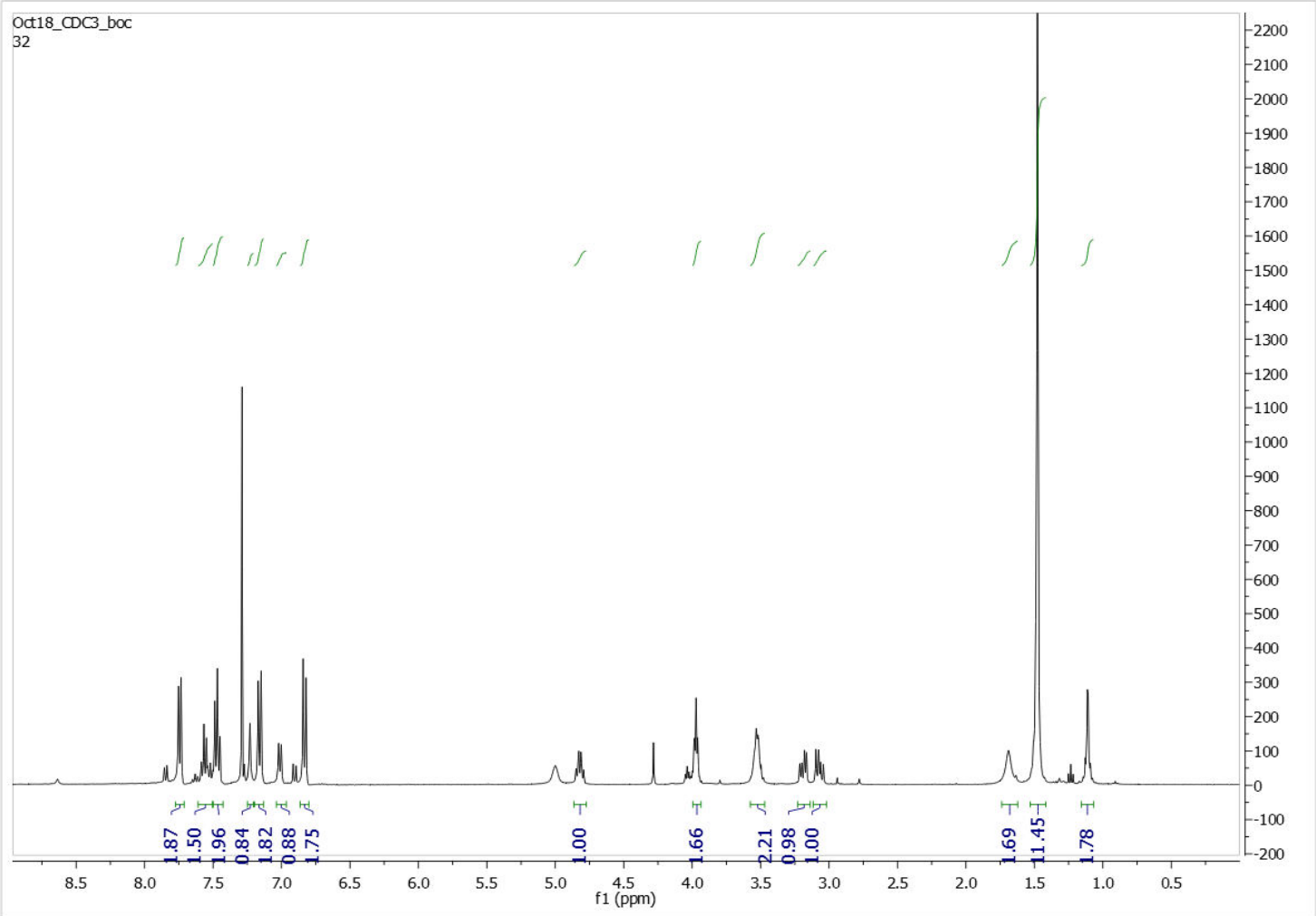
Note: Sigma fits < 0.05 indicates high probability of correct MF

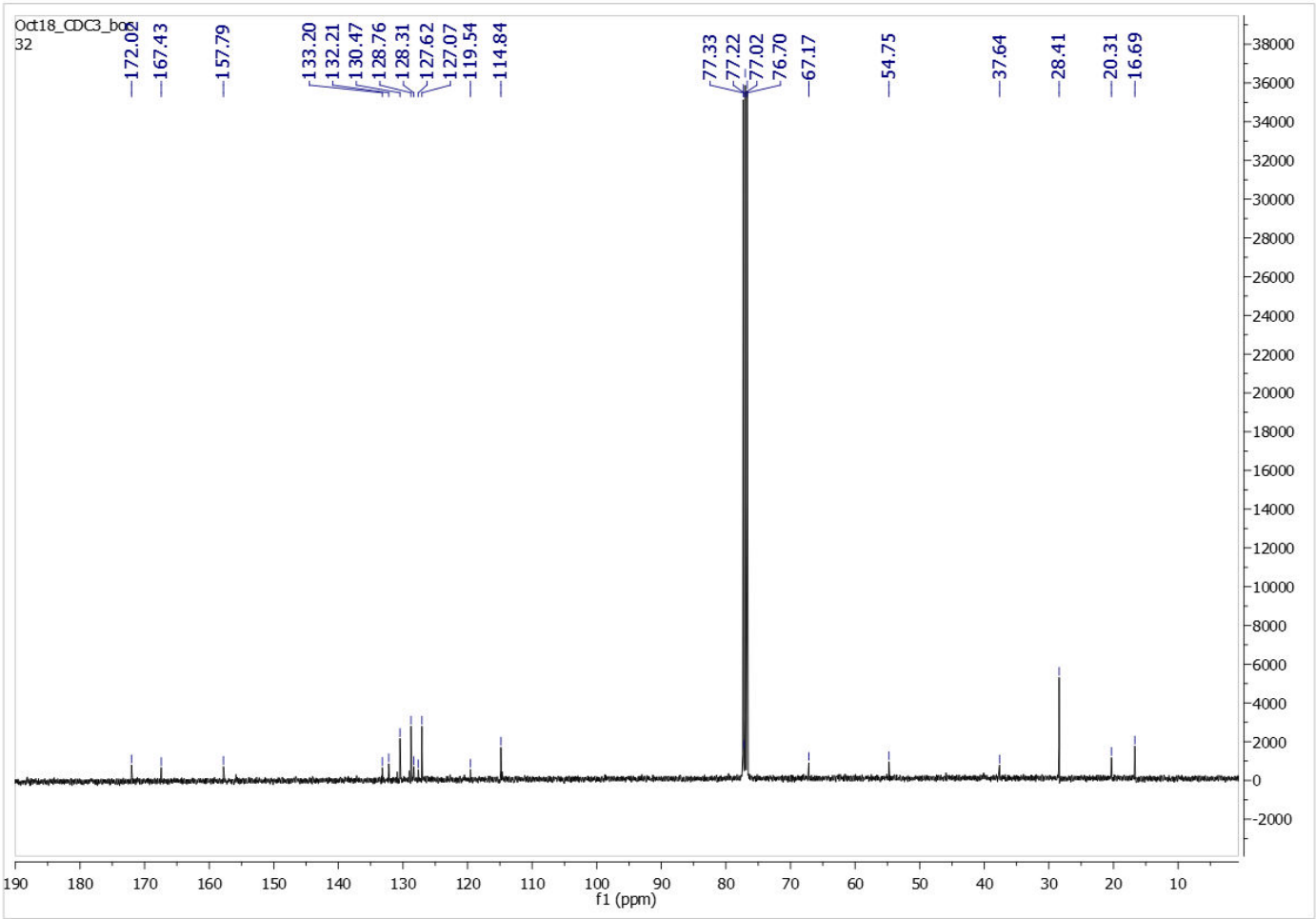
Analysis Name c_cam_CDC1_P2_546026_39_01_42717.d The School of Chemistry
Bruker Compass DataAnalysis 4.2 printed: 3/27/2017 11:50:56 AM Page 1 of 1

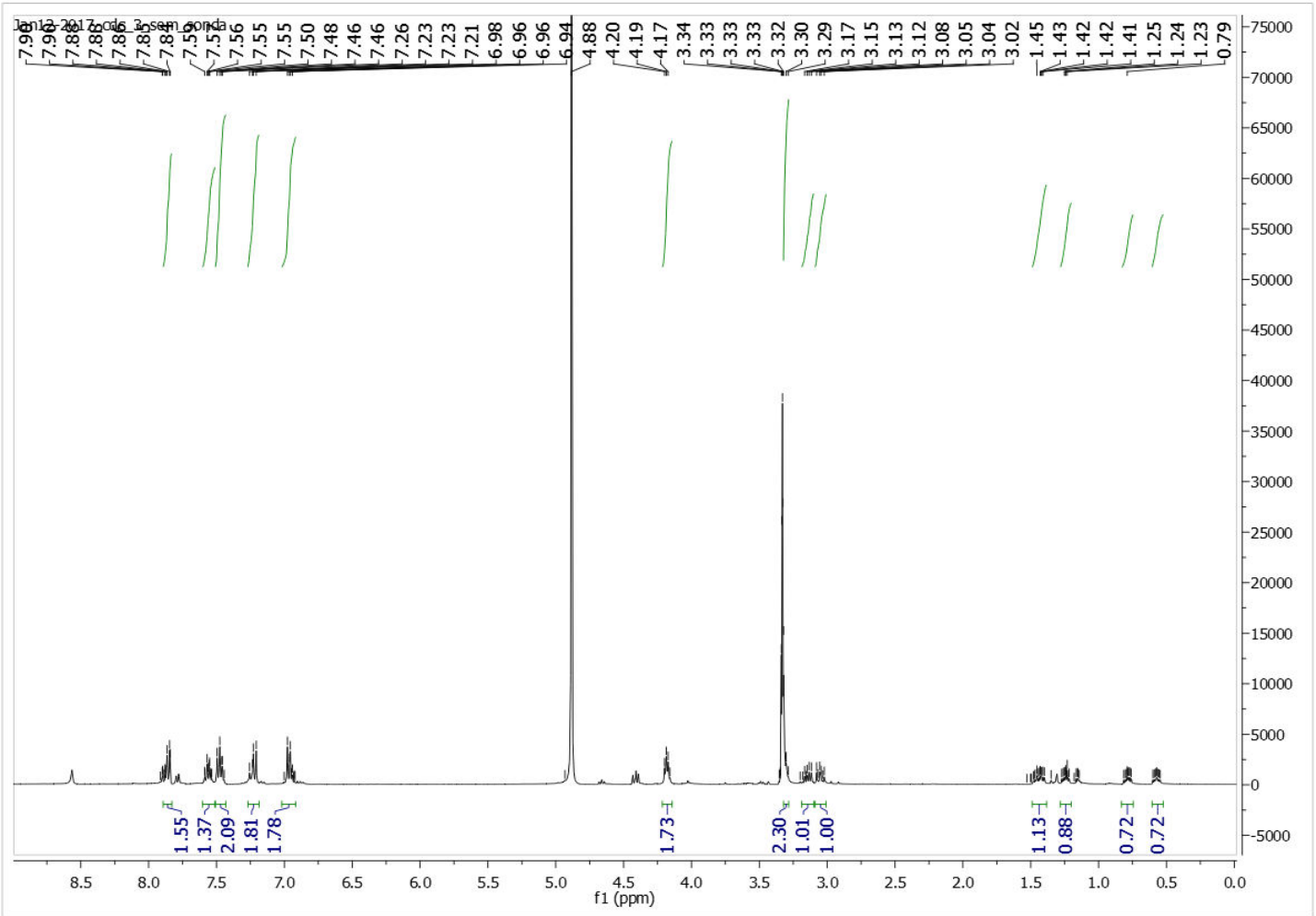
8.3 *Anexo 3: espectros de RMN ^{1}H, ^{13}C e Massas na síntese do composto **07** marcado com a sonda fluorescente (composto **07B**)*

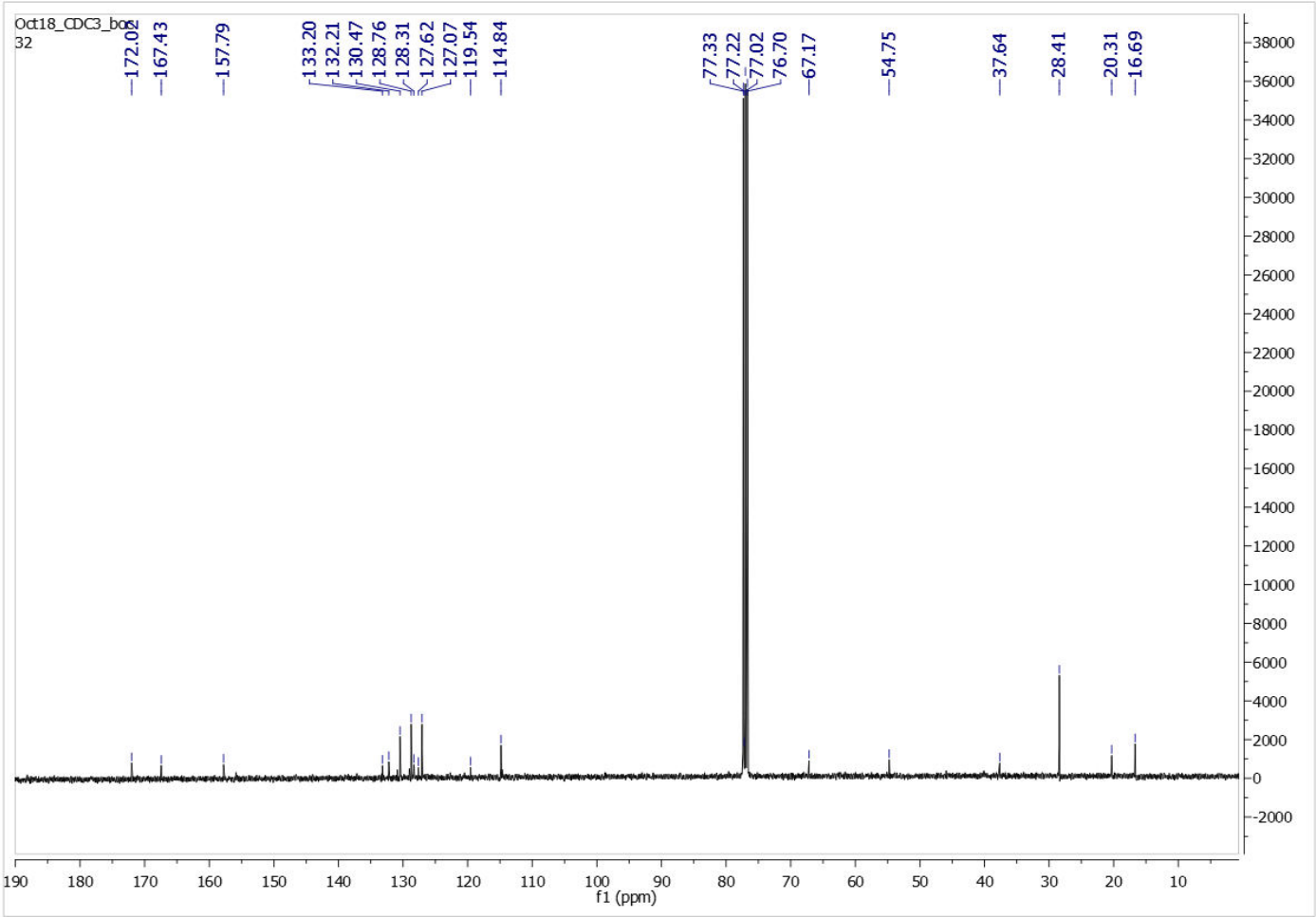



TIC of +Q1: from Sample 16 (CDC3_rx4-tbut) of DataCC2017.wiff (Turbo Spray)
Max. 1.5e8 cps.
Time, min
Shimadzu LC Controller Detector A, Channel 1 from Sample 16 (CDC3_rx4-tbut) of DataCC2017.wiff
Max. 1.7e6
AUV...
Time, min
+Q1: 2.206 to 2.306 min from Sample 16 (CDC3_rx4-tbut) of DataCC2017.wiff (Turbo Spray), Centroided
Max. 1.1e7 cps.
m/z, Da
+Q1: 2.340 to 2.540 min from Sample 16 (CDC3_rx4-tbut) of DataCC2017.wiff (Turbo Spray), Centroided
Max. 2.3e7 cps.
m/z, Da


Oct18_CDC3_boc
32
1.87
1.50
1.96
0.84
1.82
0.88
1.75
1.00
1.66
2.21
0.98
1.00
1.69
11.45
1.78
f1 (ppm)


Oct18_CDCl3_bo
32
172.02
167.43
157.79
133.20
132.21
130.47
128.76
128.31
127.62
127.07
119.54
114.84
77.33
77.22
77.02
76.70
67.17
54.75
37.64
28.41
20.31
16.69
f1 (ppm)


Jan13 2017 cds 3 sem sonda
7.96 7.96 7.88 7.86 7.85 7.84 7.59 7.57 7.56 7.55 7.55 7.50 7.48 7.46 7.46 7.26 7.23 7.23 7.21 6.98 6.96 6.96 6.94 4.88 4.20 4.19 4.17 3.34 3.33 3.33 3.33 3.32 3.30 3.29 3.17 3.15 3.13 3.12 3.08 3.05 3.04 3.02 1.45 1.43 1.42 1.42 1.41 1.25 1.24 1.23 0.79
1.55 1.37 2.09 1.81 1.78 1.73 2.30 1.01 1.00 1.13 0.88 0.72 0.72
f1 (ppm)


Oct18_CDCl3_bo2
32
172.02
167.43
157.79
133.20
132.21
130.47
128.76
128.31
127.62
127.07
119.54
114.84
77.33
77.22
77.02
76.70
67.17
54.75
37.64
28.41
20.31
16.69
f1 (ppm)

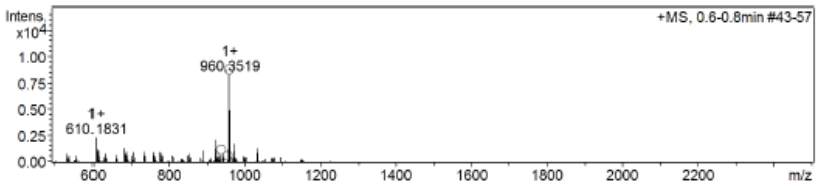
8.4 *Anexo 4: espectros de Massas do composto **07** marcado com a sonda fluorescente (composto **07B**)*

Mass Spectrometry
Analytical Services
School of Chemistry

The University of Nottingham

Sample-ID	c_cam_CDC3P	Lab	C13
Submitter	Cristian Camilo Reyes	Supervisor	Barrie Kelham
Analysis Name	c_cam_CDC3P_546104_3_01_42791.d	Acquisition Date	3/27/2017 4:39:09 PM
Ionisation Mode	ESI Positive	Instrument	Bruker MicroTOF

+MS, 0.6-0.8min #43-57



#	m/z	I %
1	610.1831	28.2
2	611.1821	15.3
3	612.1811	12.1
4	615.1381	13.4
5	684.2004	15.7
6	689.1560	12.5
7	707.1698	11.1
8	735.2104	12.4
9	777.2446	11.1
10	890.3710	13.5
11	923.3576	25.5
12	924.3330	15.6
13	958.3423	14.4
14	959.3513	28.8
15	960.3519	100.0
16	961.3532	59.3
17	962.3505	24.4
18	972.3743	21.3
19	973.3702	12.6
20	1034.4226	16.1

Generate Molecular Formula Parameters

Charge	Tolerance	sigma limit	H/C Ratio	Electron Conf.	Nitrogen Rule	Chrom.BackGround	Calibration
+1	6 ppm	0.08	3 - 0	both	false	false	TRUE

Expected Formula C51 H50 B1 F2 N7 O6 S1 **Adduct(s):** H, Na, NH4, C3H5N2, radical

#	meas. m/z	theo. m/z	|Err|[ppm]	Sigma	Formula	Adduct	Adduct Mass
1	960.3519	960.3497	1.50	0.0338	C51H50BF2N7NaO6S	M+Na	22.9898

Note: Sigma fits < 0.05 indicates high probability of correct MF

Analysis Name c_cam_CDC3P_546104_3_01_42791.d The School of Chemistry
Bruker Compass DataAnalysis 4.2 printed: 3/27/2017 4:41:23 PM Page 1 of 1