UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Grupo de Química Medicinal - NEQUIMED

**SÍNTESE DE PEPTOIDES DE NITRILAS INIBIDORAS REVERSÍVEIS
DE CISTEÍNO PROTEASES**

Candidata: Luana Alves Galvão de Souza

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos, SP

2020

LUANA ALVES GALVÃO DE SOUZA

Exemplar revisado

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

**SÍNTESE DE PEPTOIDES DE NITRILAS INIBIDORAS REVERSÍVEIS
DE CISTEÍNO PROTEASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Química com ênfase em Química Orgânica e Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

SÃO CARLOS, janeiro de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, especialmente minha mãe,
minha avó e Lis, que são minhas maiores inspirações de vida.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por todo incentivo, apoio e esforço para que eu continuasse estudando e realizando meus sonhos. Sem a sua amizade, companheirismo e compreensão nada disso estaria sendo realizado.

À minha família, especialmente minha avó, minha tia Ana, e meus primos Thiago e Victor. Eles não sabem, mas fazem com que todos os lugares se tornem lar.

Ao meu orientador, Professor Doutor Andrei Leitão, pela orientação e oportunidade nos últimos dois anos, que me fizeram evoluir profissional e pessoalmente.

À Deborah, que sempre me ajudou e explicou todas as coisas necessárias, além da indicação de ótimos podcasts.

À todos os meus amigos integrantes do grupo, pelos conselhos, almoços no bandeirão e ensinamentos.

Ao Henrique, que me motivou todas as inúmeras vezes que me senti cansada, desmotivada e com medo. Obrigada por permanecer ao meu lado esses anos todos e os outros que ainda virão.

À todos os meus amigos, com um carinho especial à Carol e Dani, que mesmo longe, aquecem meu coração com nossas conversas, Luíza, minha amiga da pós graduação que deixou as coisas mais leves quando parecia tudo difícil e Lis, por todo o carinho, pelas brigas, aprendizados, diversão e por me ensinar a nunca desistir mesmo quando tudo parece perdido, esse ensinamento já está marcado na pele.

Aos funcionários do IQSC por todos os serviços prestados.

Às agências de fomento pelo financiamento dos projetos do grupo NEQUIMED, pela bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

RESUMO

Doenças Tropicais Negligenciadas são um grupo de infecções que afetam, em sua grande maioria, população de países subdesenvolvidos. Atualmente, estima-se que aproximadamente 6 milhões de pessoas sejam afetadas pela Doença de Chagas, que causa cerca de 12 mil mortes por ano. Dois fármacos são comercializados para o tratamento da Doença de Chagas: o Benznidazol (BZL) e o Nifurtimox (NFX), no entanto, ambos apresentam várias reações adversas e indesejáveis, e não são tão eficientes na fase crônica da doença, aumentando a necessidade do desenvolvimento de novos candidatos a fármaco. A Cruzaína, é uma cisteína protease de suma importância para o ciclo de vida do transmissor da doença, transformando-a em um alvo para a investigação de inibidores capazes de matar o parasito. O grupo NEQUIMED trabalha com o planejamento, síntese e estudo de inibidores de cisteína proteases e, para a síntese dos compostos, utiliza-se como grupo funcional a nitrila, que se liga à enzima através de uma ligação covalente reversível. Criou-se a hipótese que a classe de compostos conhecidas como peptóides, bioisósteros de peptídeos, também possam essa habilidade de serem reconhecidos pela enzima levando à inibição da mesma. Com isso, fez-se a introdução da nitrila nos peptóides, cujas estruturas foram baseadas em inibidores previamente sintetizados no grupo NEQUIMED, possibilitando assim a síntese de uma série de compostos que apresentam características interessantes de candidatos a fármacos, como uma elevada resistência à degradação de proteases, um grande interesse farmacêutico com relação ao desenvolvimento de inibidores. Até o momento foram sintetizados 10 compostos com o esqueleto de peptóides e 2 compostos com o esqueleto de dipeptidil nitrila. Os peptóides sintetizados apresentaram uma baixa inibição da cruzaína e da catepsina-L, com valores de pK_i na faixa de 5 a 6.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Cruzaína, Inibidores enzimáticos, Peptóides de nitrila.

ABSTRACT

Neglected Tropical Diseases are a group of infections that affect mostly the population of underdeveloped countries. Currently, it is estimated that approximately 6 million people are affected by Chagas disease, which causes about 12 thousand deaths per year. Two drugs are commercialized for the treatment of Chagas' disease: Benznidazole (BZL) and Nifurtimox (NFX), however, both have several adverse and undesirable reactions, and are not as efficient in the chronic phase of the disease, increasing the need for development of new drug candidates. Cruzaína, is a protease cysteine of supreme importance for the life cycle of the parasite, making it a target for the investigation of inhibitors capable of killing the parasite. The NEQUIMED group works with the planning, synthesis and study of cysteine protease inhibitors and, for the synthesis of compounds, nitrile is used as a functional group, which binds to the enzyme through a reversible covalent bond. It was hypothesized that the class of compounds known as peptoids, peptide bioisomers, also have this ability to be recognized by the enzyme leading to its inhibition. As a result, nitrile was introduced in the peptoids, whose structures were based on inhibitors previously synthesized in the NEQUIMED group, thus allowing the synthesis of a series of compounds that have interesting characteristics of candidates for drugs, such as a high resistance to the degradation of proteases, a great pharmaceutical interest regarding the development of inhibitors. So far, 10 compounds with the peptoid skeleton and 2 compounds with the dipeptidyl nitrile skeleton have been synthesized. The peptoids synthesized showed a low inhibition of cruzain and cathepsin-L, with pK_i values in the range of 5 to 6.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Cruzaína, Enzyme inhibitors, Nitrile peptoids

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Determinação da constante de inibição aparente K_i'	76
Equação 2 - Determinação da constante de inibição verdadeira K_i	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de desenvolvimento de fármacos.....	16
Figura 2 - Formas assumidas pelo parasito dentro do organismo humano	22
Figura 3 - Estruturas do Benznidazol e Nifurtimox	23
Figura 4 - Estrutura cristalográfica da cruzaina e tríade catalítica da reação	25
Figura 5 - Possível mecanismo de inibição da cruzaina utilizando dipeptidil nitrilas	26
Figura 6 - Primeiros inibidores covalentes reversíveis de cisteíno proteases a serem descritos	27
Figura 7 - Representação estrutural dos compostos conhecidos como K777 e do Odanacatib.	27
Figura 8 - Classes de inibidores de cisteíno proteases contendo nitrilas.....	29
Figura 9 - Diferenças estruturais entre peptoides e peptídeos	30
Figura 10 - Precursores sintetizados usados para a produção dos peptoides contendo nitrila	34
Figura 11 - Rota sintética para o composto (2)	35
Figura 12 - Rota sintética para o composto (3)	36
Figura 13 - Rota sintética para o composto (4)	38
Figura 14 - Rota sintética para a produção do composto (6).....	39
Figura 15 - Rota sintética para a produção do composto (8).....	40
Figura 16 - Rota sintética para o composto (10)	43
Figura 17 – Regiões passíveis de substituições na estrutura dos peptoides	44
Figura 18 - Procedimento geral para a síntese dos peptoides.....	44
Figura 19 - Estrutura das dipeptidil nitrilas sintetizadas	50
Figura 20 - Rota sintética usada na produção do composto (12)	51
Figura 21 - Procedimento geral para a síntese das dipeptidil nitrilas.....	51
Figura 22 - Exemplo de reação de acilação.....	56
Figura 23 - Mecanismo proposto para a reação de acilação.....	56
Figura 24 - Exemplo de reação de hidrólise alcalina de ésteres.....	57
Figura 25 - Mecanismo proposto para a reação de hidrólise alcalina de ésteres.....	57
Figura 26 - Exemplo de reação de acoplamento	58
Figura 27 - Mecanismo proposto para a reação de acoplamento	59
Figura 28 - Representação esquemática de uma reação multicomponentes.....	60
Figura 29 - Exemplo de reação multicomponente usada no trabalho	60

Figura 30 - Mecanismo proposto para a reação multicomponente.....	61
Figura 31 - Exemplo de reação de síntese da formamida.....	61
Figura 32 - Mecanismo proposto para a reação de formação da formamida	62
Figura 33 - Exemplo de reação de síntese da isonitrila	62
Figura 34 - Mecanismo proposto para a síntese da isonitrila	63
Figura 35 - Exemplo de reação de formação de amida	63
Figura 36 - Mecanismo proposto para a reação de formação da amida	64
Figura 37 – Representação estrutural do composto codificado como Neq1033	64
Figura 38 - RMN ^1H (500 MHz) do composto Neq1033 em CDCl_3	65
Figura 39 - RMN ^{13}C para o composto Neq1033.....	68
Figura 40 - Cone de blindagem da nitrila	69
Figura 41 - Espectrometria de massas do peptóide Neq1033.....	71
Figura 42 - Cromatograma do composto Neq1033	72
Figura 43 - Tipos de vibrações moleculares analisadas no espectro de infravermelho.....	73
Figura 44 - Espectro de infravermelho para o composto Neq1033.....	73
Figura 45 - Estruturas dos compostos utilizados como controle nos ensaios enzimáticos do grupo NEQUIMED	75
Figura 46 - Relação estrutura-atividade para os valores de pK_i obtidos para a cruzaina.....	77
Figura 47 - Comparação de valores de pK_i para a cruzaina obtidos para peptóides e dipeptidil nitrilas	79
Figura 48 - Relação estrutura-atividade para os valores de pK_i obtidos para a CatL	82
Figura 49 - Comparação de pK_i para a catepsina L obtidos para peptóides e dipeptidil nitrilas	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valores de referência para as regiões do espectro de RMN ^1H para átomos de hidrogênio ligados a carbono.....	65
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados das reações de acoplamento para a síntese dos peptoides	45
Tabela 2 - Dados sobre as reações de acoplamento para as dipeptidil nitrilas	52
Tabela 3 - Parâmetros observados na regra dos 5 de Lipinski	55
Tabela 4 - Atribuições vibracionais do espectro de infravermelho do Neq1033	74
Tabela 5 - Valores de pKi obtidos para a enzima cruzafina	77
Tabela 6 - Valores de pKi obtidos para a catepsina - L.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

ADME	Administração, distribuição, metabolismo e excreção
BZL	Benznidazol
CAQI	Central de análises químicas instrumentais do Instituto de Química
CC	Coluna cromatográfica
CCD	Coluna delgada cromatográfica
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier
HATU	2-(1- <i>H</i> -7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronioexafluorofosfato
HPLC	do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas
IV	Infravermelho
MeOH	Metanol
Neq	Código nequimed interno do grupo
NFX	Nifurtimox
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
r.t.	Tempo de retenção
SUCEN	Serviço Regional da Superintendência de Controle de Endemias
t.a.	Temperatura ambiente
THF	Tetraidrofurano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Química Medicinal.....	15
1.2. Desenvolvimento de fármacos	16
1.3. Doenças Tropicais Negligenciadas	17
1.4. Doença de Chagas	18
1.4.1. Doença de Chagas no Brasil	19
1.4.2. Transmissão	20
1.4.3. Fases da doença	20
1.5. <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.5.1. Ciclo de vida	21
1.6. Tratamento da doença de Chagas.....	22
1.7. Cruzaína	24
1.7.1. Inibidores da cruzaína.....	25
1.7.2. Planejamento de inibidores	28
1.8. Peptoides	29
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo geral.....	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Solventes e reagentes	33
3.2. Caracterização dos compostos	33
3.3. Síntese dos precursores	34
3.3.1. Procedimento geral para a síntese do Ácido 2-(<i>N</i> -benzil-1-fenilformamido) acético (2)	
35	
3.3.2. Procedimento geral para a síntese do Ácido 2-(<i>N</i> -benzil-1-{4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-il}fomamido) acético (3)	36

3.3.3. Procedimento geral para a síntese do <i>N</i> -([1,1'-bifenil]-4-carbonil)- <i>N</i> -benzilglicina (4)	38
3.3.4. Procedimento geral para a síntese do 2 -{[3-clorofenil)metil]amino}- <i>N</i> -(cianometil)acetamida (6).....	39
3.3.5. Procedimento geral para a síntese de (R)-2-(benzilamino)- <i>N</i> -(1-ciano-2-feniletil)acetamida (8).....	40
3.3.6. Procedimento geral para síntese de 2-isocianoacetamida (10)	42
3.4. Procedimento geral para a síntese dos peptoides	44
3.5. Pirazóis.....	50
3.5.1. Procedimento geral para a síntese de (12)	50
3.5.2. Procedimento geral para a síntese das dipeptidil nitrilas	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Regra dos 5 de Lipinski.....	54
4.2. Síntese dos peptoides	55
4.2.2. Reação multicomponente.....	59
4.3. Identificação dos compostos	64
4.3.1. Ressonância Magnética Nuclear ¹ H.....	64
4.3.2. Ressonância Magnética Nuclear ¹³ C	67
4.3.3. Caracterização por espectrometria de massas.....	71
4.3.4. Pureza	71
4.3.5. Análise por infravermelho	72
4.4. Relação estrutura-atividade.....	75
4.4.1. Ensaios para a cruzaina.....	76
4.4.2. Ensaios para a catepsina L	79
5. CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICE	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química Medicinal

A humanidade busca tratamentos para as mais diversas doenças há mais de 3500 anos, quando já se observava o uso de óleos com finalidades terapêuticas (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009) e nos dias atuais aplica-se a Química Medicinal, que é uma área interdependente que combina a ciência aplicada e a ciência básica que abrange a descoberta, o desenvolvimento, a identificação e a interpretação do modo de ação de compostos que apresentem alguma atividade biológica em nível molecular (FARUK KHAN; DEIMLING; PHILIP, 2011).

Existem dois domínios principais da Química Medicinal que são extremamente valiosos: o planejamento e desenvolvimento de fármacos e os estudos ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade). A interpretação do modo de ação à nível molecular e a construção de um estudo de relação estrutura-atividade de compostos biologicamente ativos são facetas vitais da Química Medicinal e os estudos ADMET tem uma influência significativa no desenvolvimento de fármacos (FARUK KHAN; DEIMLING; PHILIP, 2011).

A Química Medicinal moderna tem um papel crucial nas fases iniciais da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos: os químicos responsáveis realizam a síntese, purificação e caracterização de novos compostos baseado em conhecimentos de alvos e/ou ligantes. Quando existem bons resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, os químicos são responsáveis pela elaboração de novos análogos que possam alcançar maiores atividades no alvo. O objetivo nesses estágios iniciais é maximizar a eficácia do composto enquanto efeitos colaterais são reduzidos. Para que isso possa ser alcançado, o profissional deve ter um profundo conhecimento em química orgânica e medicinal, sobre o alvo terapêutico e também da influência que os fatores ADMET tem sob a ação de um composto (LOMBARDINO; LOWE, 2004).

O grupo de química medicinal NEQUIMED, fundado em 2005, atua na busca de novas substâncias que apresentem atividade contra Doenças Tropicais e também antitumorais. O planejamento dos compostos sintetizados se baseia na estrutura de ligantes e de alvos biomacromoleculares.

1.2.Desenvolvimento de fármacos

Até 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) havia descrito uma lista de 433 medicamentos considerados essenciais para a saúde (MEDICINES, 2017), porém o processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é longo e caro (DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003; LOMBARDINO; LOWE, 2004): entre o projeto inicial e o lançamento de um medicamento estima-se que sejam necessários entre 12 e 14 anos para a maioria dos fármacos encontrados atualmente (LOMBARDINO; LOWE, 2004), como ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Processo de desenvolvimento de fármacos

Fonte: Autoria própria

Após a síntese e otimização da estrutura química dos compostos levando-se em consideração vários fatores, tais quais os testes celulares e em animais para observar a atividade farmacológica e tóxica (visando a análise da eficácia e segurança), estudos de estabilidade química e biológica, dentre outros, tem-se a submissão do formulário à agência regulamentadora para o início dos testes clínicos, divididos classicamente em fases I, II e III (DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003; LAUFER; HOLZGRABE; STEINHILBER, 2013).

Após os testes os resultados são entregues aos órgãos reguladores para a aprovação e liberação do medicamento, após um processo que tem um custo estimado em aproximadamente 1,4 bilhão de dólares para apenas um candidato à fármaco (LOMBARDINO; LOWE, 2004). Os estudos continuam na fase IV, realizada após a liberação do produto, que pode durar vários anos, engloba milhares de voluntários e tem como objetivo a realização de estudos de

farmacovigilância, identificação de efeitos colaterais mais raros ou demorados e avaliar possíveis novas indicações.

Nem todos os compostos testados chegam à fase de desenvolvimento do fármaco: apenas 1 em cada 15-25 passam pela fase de eficácia e segurança e, embora alguns deles cheguem ao mercado, alguns não recuperam os custos investidos (LOMBARDINO; LOWE, 2004).

Para se ter uma ideia do panorama no setor farmacêutico, somente em 2017 foram aprovados 113 novos medicamentos para comercialização (GRAUL; PINA; STRINGER, 2018).

1.3. Doenças Tropicais Negligenciadas

As Doenças Tropicais Negligenciadas são classificadas, pela OMS, como um grupo de diversas infecções que afetam, principalmente a população de países subdesenvolvidos (BERMUDEZ et al., 2016) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). O grupo recebe esse nome porque todas as doenças estão diretamente associadas com a pobreza e tem sua maior incidência em áreas tropicais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017) e embora antigas, com o desenvolvimento das economias, passaram a apresentar maiores incidências em países e locais que não apresentem condições de saneamento adequadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017) e elas podem cegar, desfigurar, debilitar e mutilar os atingidos, aumentando assim ainda mais a miséria em populações que se encontram em situações de pobreza (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Entre elas estão a hanseníase, a raiva, as leishmanioses, a doença do sono e a doença de Chagas, que são causadas por protozoários, as esquistossomíases, a oncocercíase e as filarioses linfáticas, causadas por vermes, e a dengue, que é viral (BERMUDEZ et al., 2016; CAMARGO, 2008).

A descoberta de novos compostos com potencial atividade para se tornarem fármacos é um importante componente no desenvolvimento de novos medicamentos, mas esse ainda é o obstáculo principal no desenvolvimento de novos compostos contra Doenças Tropicais. Existe uma preferência por pesquisa e desenvolvimento de compostos que possam ser usados em doenças que sejam consideradas comercialmente atrativas, enquanto que as que afetam, em sua maioria, países desenvolvidos e uma população pobre são negligenciadas (NWAKA et al., 2009).

Nos últimos anos, tem-se observado uma ênfase na necessidade de inovação e investimentos em pesquisas para algumas dessas doenças, que são amplamente financiadas por governos e agências filantrópicas, mas ainda assim existem problemas ao longo desse processo. Devido à isso, aproximadamente 1 bilhão de pessoas sofrem com Doenças Tropicais Negligenciadas, e, em sua maioria essa população é pobre, o que significa que existem poucos incentivos para o investimento em pesquisa e desenvolvimento de medicamentos para essas doenças e os existentes apresentam problemas em relação à seu custo, segurança, estabilidade, e resistência (NWAKA et al., 2009).

1.4.Doença de Chagas

Alguns estudos da paleoparasitologia afirmam que a doença de Chagas, causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*, atinge a humanidade há mais de 9000 anos (RASSI JR; MARIN-NETO, 2010), mas foi somente em 1909 que o primeiro registro da tripanossomíase foi feita no Brasil por Carlos Chagas (COURA et al., 2002; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010)

A doença existiu por muitos anos como um problema enzoótico (exclusivo de animais silvestres), porém o aumento da industrialização e do desmatamento obrigou o triatomíneo transmissor da doença, conhecido como barbeiro, a se adaptar e a se alimentar do sangue de animais domésticos e seres humanos, estabelecendo um novo ciclo de infecção, o que transformou a doença de Chagas em uma zoonose (transmitida endemicamente entre humanos e animais) (SCHMUNIS; YADON, 2010; ZINGALES, 2018).

Na primeira metade da década de 1980, foi estimado que cerca de 25% de todos os habitantes da América Latina estavam em risco de contaminação da doença e cerca de 17,4 milhões de pessoas estavam infectadas nos países considerados endêmicos (RASSI JR; MARIN-NETO, 2010). Atualmente afeta aproximadamente 6 milhões de pessoas e causa 12 mil mortes por ano (CRESPILLO-ANDÚJAR et al., 2018). Nos países meridionais da América, a doença de Chagas é responsável pela perda de cerca de 752 mil dias de trabalho, além de prematuras, causando um prejuízo avaliado em 1,2 bilhão de dólares em produtividade (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Estima-se que sejam gastos anualmente quase 630 milhões de dólares com cuidados à saúde devido à doença de Chagas e 10% desse valor afeta países considerados não endêmicos, devido à migração e ao modo de transmissão da doença: Nos EUA existem aproximadamente 300 mil imigrantes infectados e esse número pode ser ainda maior devido ao despreparo dos

profissionais da área da saúde para realizar um diagnóstico correto (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Nas últimas décadas, a migração de pessoas contaminadas permitiu que a doença se espalhasse ao redor do globo e, além de seres humanos, o parasito é capaz de infectar uma grande porção de animais domésticos e selvagens como gatos, cachorros, ratos e tatus (BERMUDEZ et al., 2016; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010; ZINGALES, 2018).

1.4.1. Doença de Chagas no Brasil

Juntamente com a malária, a doença de Chagas era considerada uma das mais graves endemias do território brasileiro. Até a década de 70 aproximadamente 20 milhões de brasileiros encontravam-se infectados pela doença e 120 mil novos casos eram registrados por ano (CAMARGO, 2008). Em 2012, a estimativa era que entre 2 a 3 milhões de pessoas ainda encontravam-se contaminadas, das quais 600 mil possuíam complicações cardíacas ou digestivas, causando a morte de aproximadamente 5 mil pessoas por ano (MARTINS-MELO et al., 2012).

Em 2011, um estudo apontou que entre os anos 1999 e 2007, quase 54 mil atestados de óbito apresentavam alguma menção à doença de Chagas, nos quais 57% deles eram indivíduos do sexo masculino, em 62,8% dos casos com idade superior a 60 anos, e 77,1% dos mesmos não moravam em capitais brasileiras (MARTINS-MELO et al., 2012). Um estudo mais recente capturou cerca de 500 triatomíneos em ambientes domésticos e selvagens e 21% dos insetos selvagens apresentaram resultados positivos para a infecção por *T. cruzi* (DAFLON-TEIXEIRA et al., 2019), mostrando que o parasito continua presente em todo o território brasileiro (CAMARGO, 2008).

No período de 2010 a 2012, apenas no estado de São Paulo, 2785 insetos foram encaminhados ao Serviço Regional da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de mais de 300 municípios (49,3% dos municípios do estado) e identificados como triatomínios, sendo que 3,4% apresentaram resultados positivos para infecção por *T. cruzi* (SILVA; BARBOSA; RODRIGUES, 2014).

1.4.2. Transmissão

No ciclo de vida natural, o parasito é transmitido por insetos da sub-família *Triatominae* a vertebrados enquanto eles dormem (BERMUDEZ et al., 2016; CAMARGO, 2008; TZIZIK; BORCHARDT, 2018; ZINGALES, 2018) e triatomínios de ambos os sexos servem como vetor (TZIZIK; BORCHARDT, 2018). Enquanto se alimenta de sangue, o inseto defeca e os parasitos presentes nas fezes entram no hospedeiro através de lesões causadas pelo mesmo (BERMUDEZ et al., 2016; TZIZIK; BORCHARDT, 2018).

Além da transmissão natural, existem outros métodos que incluem a infecção congênita, a transfusão de sangue de doador contaminado, o transplante de órgãos infectados e a ingestão de alimentos contaminados com o inseto ou suas fezes/urina (RASSI JR; MARIN-NETO, 2010; TZIZIK; BORCHARDT, 2018; ZINGALES, 2018).

1.4.3. Fases da doença

A doença de Chagas apresenta duas fases distintas: a fase aguda e a fase crônica.

A fase aguda se inicia após o período de incubação, que dura entre 1 e 2 semanas, e é geralmente assintomática (BERN, 2015; KASHIWABARA¹ et al., 2013; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010; TZIZIK; BORCHARDT, 2018). No entanto, os possíveis sintomas aparentes podem incluir febre, fadiga, dores de cabeça e pelo corpo, coceira, anorexia, vômito e diarreia (KASHIWABARA¹ et al., 2013; TZIZIK; BORCHARDT, 2018) e, em alguns casos raros, é possível observar a presença de um nódulo na pele, indicando a inoculação (BERN, 2015). Os casos de morte não chegam a 5% na fase aguda e são majoritariamente observados em pacientes previamente imunocomprometidos ou crianças, sendo causados principalmente por miocardite severa ou meningoencefalite (TZIZIK; BORCHARDT, 2018). Após um período de 4 a 8 semanas existe uma resposta do sistema imunológico do hospedeiro, numa tentativa de controlar a replicação do parasito, e os sintomas desaparecem (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A fase crônica, que segue a fase aguda, pode ser subdividida em fase indeterminada e assintomática e fase determinada sintomática. Cerca de 60-70% dos pacientes se encontram no primeiro caso, não apresentando evidências clínicas (KASHIWABARA¹ et al., 2013; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; TZIZIK; BORCHARDT, 2018). Os pacientes restantes progridem para a fase crônica determinada, que se caracteriza por complicações cardíacas (BERN, 2015; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010; TZIZIK; BORCHARDT, 2018). Geralmente as

manifestações clínicas levam décadas para se desenvolver e entre 14-45% dos pacientes apresentam problemas cardíacos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010). As maiores causa de morte são devido à falência do coração e tromboembolismo (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

1.5. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é o causador da doença de Chagas, geralmente transmitido pelo inseto barbeiro (EL-SAYED et al., 2005), e tem como uma de suas características a alta diversidade genética e fenotípica (ZINGALES, 2018).

Existem dois grupos bem definidos na taxonomia do *T. cruzi*: I e II (EL-SAYED et al., 2005; ZINGALES, 2018), sendo o primeiro associado ao ciclo de transmissão silvestre, responsável pela infecção de marsupiais e o segundo ao ciclo de transmissão doméstico e a infecção de mamíferos placentários (EL-SAYED et al., 2005).

1.5.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida do parasito pode ser dividido em dois diferentes tipos: o primeiro é exclusivo do inseto transmissor barbeiro e o segundo dos mamíferos contaminados.

O ciclo de vida no barbeiro tem início quando o inseto vetor ingere o parasito na forma de tripomastigota ao se alimentar do sangue contaminado de um hospedeiro mamífero (BERN, 2015). Dentro do inseto os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e se replicam por fissão binária (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). As epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são excretados pelas fezes do inseto e entram no organismo do hospedeiro através de machucados da picada do animal (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010) [15].

Dentro das células do mamífero, os tripomastigotas metacíclicos se transformam em amastigotas que se multiplicam, novamente por fissão binária (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010). Antes da ruptura da célula, os amastigotas intracelulares se transformam em tripomastigotas que, após a ruptura, invadem a corrente sanguínea do hospedeiro (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010), podendo agora infectar novas células e começar um novo ciclo de replicação (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

O parasito assume duas diferentes formas dentro do organismo humano: a forma tripomastigota não sofre divisão dentro do sangue do hospedeiro e tem como função carregar a infecção pelo organismo do mamífero (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010); e a forma amastigota tem como função a multiplicação em vários tipos de célula (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). As diferentes formas podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2 - Formas assumidas pelo parasito dentro do organismo humano

Fonte: Adaptado de (TYLER; OLSON; ENGMAN, 2003)

1.6.Tratamento da doença de Chagas

O parasito *T. cruzi* possui diferentes caminhos metabólicos ou até mesmo proteínas comuns a outros organismos, mas que apresentam características estruturais e funcionais diferentes. Embora estudos mais recentes tenham sido conduzidos na esperança de produzir uma vacina contra a doença, existem diversos obstáculos a serem superados, o que torna o controle dos vetores e o tratamento de pacientes identificados nas únicas medidas palpáveis no momento (BERMUDEZ et al., 2016).

Visto que as Doenças Tropicais Negligenciadas ocorrem em sua maioria em países subdesenvolvidos, existe pouco dispêndio com o desenvolvimento de novos fármacos pelas grandes indústrias farmacêuticas (BERMUDEZ et al., 2016).

No caso da infecção pelo parasito causador da doença de Chagas, os fármacos lançados no início da década de 1970 - Benznidazol (BZL) e Nifurtimox (NFX) são atualmente os únicos fármacos aprovados para o uso em humanos (BERMUDEZ et al., 2016; CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006; KASHIWABARA¹ et al., 2013), Figura 3. O nifurtimox foi descontinuado no Brasil devido aos efeitos colaterais.

Figura 3 - Estruturas do Benznidazol e Nifurtimox

Fonte: Adaptado de (BERMUDEZ et al., 2016)

O tratamento é recomendado para todos os casos da doença na fase aguda e congênita para todas as crianças; e para pacientes acima de 18 anos que já estejam na fase crônica da doença, a fim de reduzir a severidade dos sintomas e a duração da parasitemia. A taxa de sucesso é de 80% a 90% na fase aguda (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010), mas é bem menor na fase crônica.

Para adultos entre 19 e 50 anos, o tratamento deve ser oferecido apenas para os casos nos quais os pacientes não possuam problemas cardíacos e passa a ser opcional para maiores de 50 anos, visto que os benefícios nessa população ainda não foram comprovados (RASSI JR; MARIN-NETO, 2010).

O fármaco de escolha geralmente é o Benznidazol, pois em crianças a taxa de toxicidade e interrupção do tratamento é inferior a 4% (BERN, 2015; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010). No entanto, pacientes adultos apresentam baixa tolerância e a taxa de descontinuidade do tratamento sobe para 29,7% (BERN, 2015). Entre os efeitos colaterais indesejados encontram-se a anorexia, náuseas, vômitos, convulsões, desorientação, alterações psíquicas e também cólicas intestinais (CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006).

Existem evidências que apontam que parasitos isolados de diversos pacientes em diferentes regiões endêmicas apresentaram sensibilidades variadas aos fármacos (CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006; URBINA, 2010; ZINGALES, 2018). Nos últimos anos tem sido notado um aumento na preocupação com o desenvolvimento de novos fármacos que possam ser utilizados em pacientes adultos e na fase crônica da doença (BERN, 2015), com o objetivo de se produzir um composto que seja mais eficaz, menos tóxico e que possa ser mais facilmente disponibilizado à populações de baixa renda (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012; CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006).

1.7.Cruzaína

Proteases são enzimas que são caracterizadas por realizarem a hidrólise reversível de uma ligação peptídica em uma sequência de aminoácidos, sendo divididas de acordo com a chave catalítica do sítio ativo (MCKERROW, 1989; POWERS et al., 2002; SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015): serina, treonina, metalo, tiol (cisteína) e aspartato. São responsáveis por catalisar um amplo espectro de reações biológicas muito importantes e, por isso, realizam um papel crítico na patogênese de doenças parasitárias, tornando-se potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos contra essas doenças (grupo carboxilato) (MCKERROW, 1989). No grupo NEQUIMED, a cruzaína vem sendo utilizada como alvo terapêutico em diversos estudos (AVELAR et al., 2015; BURTOLOSO et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2018; SILVA et al., 2017), sendo que a inibição da mesma leva à morte do parasito.

Cisteíno proteases são membros da família da papaína e possuem similaridades em relação ao substrato com as catepsinas B e L dos mamíferos (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2017; TZIZIK; BORCHARDT, 2018). A cruzaína é uma glicoproteína e a principal cisteíno protease do parasito *T. cruzi* (EL-SAYED et al., 2005; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2017). Ela está envolvida nos processos de nutrição do parasito, na penetração dos tripomastigotas na célula hospedeira, no sistema de defesa do parasito contra o sistema imune do mamífero infectado e nos processos de diferenciação entre um estágio e outro (BERMUDEZ et al., 2016; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2017; MCKERROW, 1989).

O sítio ativo da cruzaína está localizado entre os dois principais domínios que a constituem, sendo um deles formado por α -hélices e outro por folhas β -antiparalelas, e possui uma tríade catalítica formada por Cys25, His159 e Asn175 e vários subsítios (KASHIWABARA¹ et al., 2013). Na Figura 4 observa-se a estrutura geral da cruzaína e sua tríade catalítica.

Figura 4 - Estrutura cristalográfica da cruzaina e tríade catalítica da reação

Fonte: Protein Data Bank (PDB): 2AIM.

Métodos *in silico* e *in vitro* têm sido utilizados em conjunto para a identificação e otimização de ligantes que possuam potência e seletividade contra seus alvos moleculares, sendo a cruzaina um alvo de investigação para o planejamento de fármacos contra a doença de Chagas (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2017).

1.7.1. Inibidores da cruzaina

Os inibidores de cisteíno proteases são divididos em inibidores covalentes irreversíveis (formam ligações covalentes estáveis com a enzima), inibidores covalentes reversíveis (formam ligações covalentes instáveis que se quebram com o centro reativo da enzima) e inibidores não covalentes (formam interações intermoleculares com a enzima e podem inibir o sítio ativo da enzima com ou sem a presença do substrato ou com o substrato já ligado ao sítio ativo) (SILVA; BARBOSA; RODRIGUES, 2014).

Uma vez que as proteases estão presentes em diversos organismos e processos essenciais aos mesmos, ela torna-se um alvo para a descoberta de fármacos (EL-SAYED et al., 2005). Diversas tentativas vêm sendo feitas de modo a encontrar pequenas moléculas com perfis de toxicidade aceitáveis que possam auxiliar no desenvolvimento de candidatos a fármacos que interajam com as proteínas alvo (FRIZLER et al., 2010).

Compostos de baixa massa molecular contendo nitrilas (incluindo peptidil nitrilas) têm apresentado bons resultados como inibidores de cisteíno proteases (FRIZLER et al., 2010; SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015). A inibição de cisteíno proteases utilizando

compostos que contenham como grupo reativo (*warhead*) a nitrila segue um mecanismo reversível que envolve um resíduo de cisteína e o próton da histidina adjacente (DOS SANTOS et al., 2018) ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Possível mecanismo de inibição da cruzaína utilizando dipeptidil nitrilas

Fonte: Adaptado de (DOS SANTOS et al., 2018)

Propõe-se que o grupo imidazol do grupo histidina polariza o grupo SH da cisteína, seguido da formação de um par iônico, que são comprovados por diferentes estudos e modelagem computacional (DOS SANTOS et al., 2018). Uma vez que o inibidor contém um grupo eletrofílico (nitrila), o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima por meio de um ataque nucleofílico do tiolato, formando uma ligação covalente reversível (DOS SANTOS et al., 2018; POWERS et al., 2002).

Existem dois mecanismos coerentes propostos para esse tipo de inibição: no primeiro caso ocorre em duas etapas, nas quais o ataque nucleofílico do ânion tiolato ao carbono eletrofílico da nitrila é seguido da protonação do átomo de nitrogênio pelo resíduo de histidina protonado; e no segundo caso é proposto um mecanismo no qual em uma única etapa ocorre o ataque nucleofílico e a transferência de próton da histidina adjacente (DOS SANTOS et al., 2018). A inibição que utiliza nitrila como *warhead* ocorre, segundo estudos computacionais, através do mecanismo em que a transferência de próton acontece de maneira concertada com o ataque nucleofílico (DOS SANTOS et al., 2018; POWERS et al., 2002). A reação entre inibidores contendo nitrila e cisteíno proteases envolve a formação de um aduto tioimidato, no qual o carbono adota a geometria trigonal (FRIZLER et al., 2010). A reversibilidade da reação ocorre no caminho inverso, com o ataque nucleofílico da histidina básica ao nitrogênio do

tioimidato, sendo que essa desprotonação gera um par de elétrons livres que retoma a ligação tripla liberando o composto em sua forma inicial, assim como a enzima.

Os primeiros inibidores da cruzaina, dessa classe, a serem descritos foram a acetamido-acetonitrila e a benzamidoacetonitrila (FRIZLER et al., 2010), apresentados na Figura 6.

Figura 6 - Primeiros inibidores covalentes reversíveis de cisteíno proteases a serem descritos

Fonte: Adaptado de (FRIZLER et al., 2010)

Algumas pequenas moléculas são capazes de inibir a cruzaina e matar o parasito, devido à inibição do processo enzimático (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012; MOTT et al., 2010), como por exemplo o potente inibidor de cisteíno proteases K777 (Figura 7), que inibe a mesma ao se ligar irreversivelmente ao grupo catalítico tiol da Cys25. Outro exemplo da inibição de cisteíno proteases é o inibidor de catepsina K, Odanacatib (Figura 7), que evoluiu até a fase clínica III para o tratamento de osteoporose (MARTINEZ-MAYORGA et al., 2015).

Figura 7 - Representação estrutural dos compostos conhecidos como K777 e do Odanacatib.

Fonte: Adaptado de (MARTINEZ-MAYORGA et al., 2015)

Uma vez que nitrilas são utilizadas como grupos reativos com relativa segurança (MARTINEZ-MAYORGA et al., 2015; NDAO et al., 2014; SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015c), vários inibidores desenvolvidos são baseados na estrutura do Odanacatib e se ligam à enzima por meio de uma ligação covalente reversível (AVELAR et al., 2015).

1.7.2. Planejamento de inibidores

Um importante questionamento que deve ser feito durante a síntese de potenciais inibidores de proteases está relacionado à seletividade que este deve ter e como atingir esse objetivo (SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015b).

Na indústria farmacêutica, há preferência pelo uso de inibidores reversíveis, devido à preocupações com as consequências que podem surgir com a inibição irreversível de algum alvo terapêutico (SILVA et al., 2017), caso o inibidor não apresente alta seletividade e seja capaz de inativar também outros compostos que possuam um esqueleto parecido com o alvo, podendo impedir diversas funções importantes para o organismo. Além disso, compostos que possuem um grupo reativo com maior instabilidade são, geralmente, descartados durante os testes de estabilidade e segurança, uma vez que esse tipo de grupo químico tende a se ligar a macromoléculas biológicas como proteínas indesejáveis ou até mesmo DNA, o que pode causar diversos efeitos tóxicos adversos, de modo que ligações covalentes estáveis devem ser evitadas (FRIZLER et al., 2010).

Idealmente os compostos devem ser pouco reativos em condições fisiológicas, porém o grupo reativo (ou “warhead” em inglês) deve ser forte o suficiente para interagir e reagir com o alvo (FRIZLER et al., 2010). Aldeídos, cetonas e nitrilas são inibidores covalentes reversíveis importantes de cisteíno proteases (FRIZLER et al., 2010).

São conhecidas três classes de inibidores de cisteíno proteases contendo nitrilas: cianamidas (DEATON et al., 2005), nitrilas aromáticas (ALTMANN; COWAN-JACOB; MISSBACH, 2004) e derivados de aminoacetonitrilas (DOS SANTOS et al., 2018) (Figura 8), que diferem em suas propriedades eletrofílicas de acordo com os grupos substituintes (FRIZLER et al., 2010). Por apresentar uma alta estabilidade metabólica, por sua polaridade e por apresentar uma pequena contribuição em relação à massa molecular do composto, o grupo nitrila é considerado um *warhead* muito útil na inibição de cisteíno proteases (SALVESEN, GUY S, 2010). Existem estudos que comprovam que esse grupo age como um inibidor competitivo e reversível (DOS SANTOS et al., 2018), sendo escolhido para o desenvolvimento de inibidores neste trabalho.

Figura 8 - Classes de inibidores de cisteíno proteases contendo nitrilas

Fonte: Adaptado de (ALTMANN; COWAN-JACOB; MISSBACH, 2004; DEATON et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2018)

O grupo NEQUIMED, trabalha com o planejamento de inibidores que possuam esqueletos de dipeptidil-nitrilas (AVELAR et al., 2015; BURTOLOSO et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2018; SILVA et al., 2017), reconhecidos pelos subsítios da cruzaina, dessa maneira agindo como inibidores. A partir disso, desenvolveu-se a hipótese de que estruturas conhecidas como peptoides também pudessem ser reconhecidas por proteases e, especificamente, pela cruzaina, levando à inibição da mesma.

1.8. Peptoides

Poliglicinas *N*-substituídas, mais conhecidas como peptoides, são peptídeomiméticos: estruturas nas quais a cadeia lateral presente em um carbono- α de um peptídeo é inserida no átomo de nitrogênio da amida (LAU, 2014; MÁNDITY; FÜLÖP, 2015; SUN; ZUCKERMANN, 2013; ZUCKERMANN, 2011), como ilustrado na Figura 9.

Figura 9 - Diferenças estruturais entre peptoides e peptídeos

Fonte: Adaptado de (GANESH et al., 2017)

Desenvolvidos inicialmente no final dos anos 1980, os peptídeos fizeram parte de um estudo que buscava a descoberta de pequenas moléculas que possuíam atividade biológica, cuja abordagem era mimetizar a maneira que a própria natureza desenvolve a diversidade molecular e combinar um pequeno número de blocos construtores bioquímicos em uma possível sequência oligomérica para gerar uma grande quantidade de entidades químicas (KIRSHENBAUM et al., 1998; LAU, 2014; SUN; ZUCKERMANN, 2013; ZUCKERMANN, 2011).

Sabe-se que pequenos peptídeos são conhecidos por se conectar a uma grande variedade de moléculas, porém alguns possuem propriedades farmacocinéticas insatisfatórias, podendo apresentar problemas de absorção, distribuição, metabolização e excreção de compostos bioativos, de modo que o desenvolvimento de peptídomiméticos foi um esforço para a obtenção de estruturas que apresentassem um esqueleto o mais próximo possível de polipeptídeos mas que resistissem à metabolização de proteases (LAU, 2014; ZUCKERMANN, 2011).

O resultado é uma estrutura que consiste em unidades repetitivas de glicina *N*-substituída que é essencialmente um regioisômero de um peptídeo. Essa mudança da cadeia lateral significa que o grupo doador da ligação de hidrogênio (grupo NH) e o centro estereogênico do carbono- α são perdidos (MÁNDITY; FÜLÖP, 2015; SUN; ZUCKERMANN, 2013; ZUCKERMANN, 2011). Embora essas perdas sejam significativas, existem vantagens que as superam, como a ligação de um substituinte diretamente ao nitrogênio das amidas que pode bloquear a ação das proteases (devido ao impedimento estérico realizado pelo substituinte

ligado ao nitrogênio), transformando os peptoides em compostos menos susceptíveis a reação de hidrólise e em potenciais candidatos a fármacos (LAU, 2014).

Essa classe de polímeros biomiméticos apresenta muitas aplicações biomédicas (GANESH et al., 2017; SUN; ZUCKERMANN, 2013) e a redução da complexidade estrutural (devido à perda do centro quiral da molécula) facilita o planejamento da síntese desses compostos (FOWLER; BLACKWELL, 2009; LAU, 2014; MÁNDITY; FÜLÖP, 2015). O esqueleto dos peptoides permite que a escolha da cadeia lateral a ser usada seja um atrativo para a síntese de moléculas bioativas, permitindo novos tipos de aplicações (GANESH et al., 2017).

Como exemplo da aplicação biomédica desses compostos pode-se citar a primeira geração de peptoides que provaram ser potentes agentes antimicrobianos (MÁNDITY; FÜLÖP, 2015) com atividades contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (MÁNDITY; FÜLÖP, 2015). Os peptoides também mostraram atividade biológica ao bloquear a interação entre a apolipoproteína E e a amiloide- β , mostrando que essa classe de compostos pode também ser utilizado para o tratamento do mal de Alzheimer. Além disso, peptoides que apresentam uma maior hidrofiliabilidade apresentam melhor permeabilidade nas células (MÁNDITY; FÜLÖP, 2015).

Os peptoides se tornaram então uma classe de compostos para o estudo de interações biomoleculares e uma grande promessa para aplicações terapêuticas devido a sua elevada estabilidade proteolítica e permeabilidade celular quando comparados aos peptídeos, fatores que se tornam ainda mais interessantes ao analisar que a facilidade da síntese desses compostos permite um grande espectro de aplicação (FOWLER; BLACKWELL, 2009).

Neste trabalho, peptoides contendo nitrila como grupo reativo foram sintetizados para avaliação da atividade inibitória em cisteína protease (cruzaína), sendo descritos pela primeira vez este tipo de estudo para esta classe de substâncias. As estruturas foram baseadas e planejadas de acordo com compostos com esqueleto de dipeptidil-nitrilas previamente sintetizados no grupo NEQUIMED que apresentaram atividade contra a cruzaína.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo geral

Síntese planejada baseado em hipótese de uma série de derivados de peptoides de nitrilas inéditos que atuam como inibidores de cisteíno proteases.

2.2.Objetivos específicos

- Análise da viabilidade sintética de peptoides contendo como grupo reativo a nitrila;
- Realização dos planejamentos sintéticos para estabelecimento da série congênica de substâncias;
- Caracterização estrutural dos compostos preparados com pureza mínima de 95% para realização de ensaios enzimáticos e celulares;
- Análise dos resultados obtidos para a determinação da relação estrutura-atividade (SAR).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Solventes e reagentes

Para a síntese dos compostos, os reagentes e solventes utilizados foram obtidos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, Combi-Blocks, Enamine e Synth). Quando necessário, os solventes passaram por secagem em peneira molecular 3 Å conforme descrito na literatura (WILLIAMS; LAWTON, 2010).

3.2. Caracterização dos compostos

Para o monitoramento qualitativo das reações fez-se uso da cromatografia de camada delgada (CCD), na qual foram utilizadas placas cromatográficas de sílica gel sobre folhas de alumínio da Sigma-Aldrich com indicador de fluorescência (254 nm) e misturas de solventes de diferentes polaridades foram escolhidos como eluentes. A purificação dos compostos ocorreu por meio de cromatografia de adsorção em coluna (CC) na qual utilizou-se sílica gel da Sigma-Aldrich e com tamanho de poro 60 Å como fase estacionária. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a massa de produto utilizado para a purificação. As placas de cromatografia de camada delgada utilizadas durante o processo de purificação dos compostos foram relevadas na luz UV 254 nm com ácido fosfomolibdico ou vanilina. Quando necessário, os compostos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com um sistema Shimadzu Proeminence.

A determinação do ponto de fusão foi feita com o equipamento da empresa Microquímica Equipamentos modelo MQAPF-302. A aquisição dos espectros na região do infravermelho (IV) foi realizada no equipamento FTIR da Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos, com as amostras preparadas em janela de brometo de potássio (KBr). Para a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono 13 fez-se uso dos solventes deuterados CDCl₃ ou DMSO-d₆ (Sigma-Aldrich), com os espectros foram obtidos no equipamento da CAQI-IQSC, da empresa Agilent Technologies modelos 500/54 premium shield e 400/54 premium shield.

Todas as análises de pureza foram realizadas utilizando o sistema Shimadzu Proeminence HPLC acoplado ao espectrômetro de massa Amazon Ion Trap (Brucker GmbH, Bremen, Alemanha), com ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo. O HPLC é

equipado com um sistema de bombas ternário LC-20AT / AD, amostrador automático SIL-20A e forno de coluna CTO-20A (Shimadzu Corp). A coluna utilizada foi um Chiralpak® IC 5,0 μm (4,6 x 250 mm, Diacel Corporation, West Chester, PA). A eluição em gradiente, usada para análise de pureza, consistiu em um gradiente linear de 5-100% de B (A: H₂O/ B: ACN) em 30 minutos, sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 graus, com um volume de injeção de 5 μL .

Para a espectrometria de massas de alta resolução utilizou-se o equipamento da CAQI-IQSC, modelo LTQ Velos, da marca Termo Scientific.

As purificações e análise de pureza e massa dos compostos feitas no HPLC foram realizadas pelo doutorando do grupo Pedro Henrique Jatai, enquanto os ensaios enzimáticos foram realizados pela ex-aluna Fernanda Rocho e pelo mestrando Rodrigo Cendron.

3.3.Síntese dos precursores

Os peptídeos de interesse foram planejados, sendo necessário realizar a síntese de precursores, apresentados na Figura 10 abaixo e descritos posteriormente.

Figura 10 - Precursores sintetizados usados para a produção dos peptídeos contendo nitrila

Fonte: Autoria própria

3.3.1. Procedimento geral para a síntese do Ácido 2-(*N*-benzil-1-fenilformamido)acético (**2**)

A síntese de (**2**) seguiu a rota sintética descrita por Lateef e colaboradores (LATEEF; REDDY KRISHNA MOHAN; REDDY JAYARAMA REDDY, 2007), descrita na Figura 11.

Figura 11 - Rota sintética para o composto (**2**)

Fonte: Autoria própria

Etil-2-(N-benzil-1-fenilformamido)acetato (1a). Em uma solução de de etil (benzilamino)acetato (**1**) (10,0 mmol, 1,93 g) em de piridina seca (10 mL) e de tolueno seco (20 mL), o cloreto de benzoíla (10 mmol, 1,4 g) foi adicionado gota a gota. A mistura foi mantida em refluxo por 30 min e em seguida 100 mL de água foram adicionados. A camada de tolueno foi então separada e a camada aquosa extraída com tolueno (3 x 10 mL). As camadas orgânicas foram combinadas e inicialmente lavadas com 15 mL de solução de carbonato de sódio 5%, em seguida 10 mL de água e secas sob Na₂SO₄ anidro. O tolueno foi removido sob vácuo (LATEEF; REDDY KRISHNA MOHAN; REDDY JAYARAMA REDDY, 2007) e o produto foi obtido como um sólido branco, com rendimento de reação de 92,1% (2,7 g). O composto **1a** foi utilizado na etapa seguinte sem purificação adicional. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.54 – 7.21 (m, 10H), 4.84 (s, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.23 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.86 (s, 1H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 172.60, 169.01, 136.09, 133.50, 130.11, 129.98, 128.94, 128.53, 128.43, 127.83, 126.99, 126.89, 126.56, 61.23, 53.75, 46.22, 14.15.

Ácido 2-(*N*-benzil-1-fenilformamido) acético (**2**). À uma solução de **1a** (2,7 g) em MeOH (5 mL) à 0 °C foi adicionado 4 mL de uma solução NaOH 4N. A mistura foi agitada por 1 h e o excesso de solvente foi removido sob pressão reduzida. O composto foi acidificado até pH ~2 com HCl 1 N e extraída com acetato de etila. As camadas orgânicas foram combinadas, secas sob Na₂SO₄ anidro e concentradas sob vácuo (LATEEF; REDDY KRISHNA MOHAN; REDDY JAYARAMA REDDY, 2007), resultando no **composto 2**, um sólido branco, com rendimento de 87% (2,15 g). O produto foi diretamente utilizado na próxima etapa sem necessidade de purificação adicional.

3.3.2. Procedimento geral para a síntese do Ácido 2-(*N*-benzil-1-{4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-il}fomamido) acético (**3**)

A síntese de (**3**) foi composta de uma reação de acoplamento descrita por dos Santos e colaboradores (DOS SANTOS et al., 2018) e uma reação de hidrólise alcalina de ésteres, descrita por Schwieter e colaboradores (SCHWIETER; JOHNSTON, 2016). A rota sintética completa encontra-se na Figura 12.

Figura 12 - Rota sintética para o composto (3)

Fonte: Autoria própria

Etil-2-(N-benzil-1-{4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-il}formamido)acetato (**1b**). A um balão de fundo de redondo sob atmosfera de argônio, adicionou-se o **composto 1** (1 mmol, 0,1912 mL) juntamente com o ácido 4-(4-metoxifenil) benzóico (1,3 mmol, 302 mg) e HATU (1,1 mmol, 418 mg) em DMF anidro (1,70 mL). Em seguida, DIPEA foi adicionada lentamente a 0 °C (4,0 mmol, 0,70 mL). O balão foi removido do banho de gelo e a reação teve duração de 18 h à temperatura ambiente. Após esse período, 50 mL de acetato de etila

foram adicionados ao balão e realizou-se uma extração da mistura, com soluções de NaHCO₃ saturado (3x 20 mL) e NaCl saturado (3 x 20 mL) (DOS SANTOS et al., 2018). O solvente foi removido sob pressão reduzida para gerar 300 mg de **1b**, um sólido branco, com rendimento de reação de 78%. Para a etapa posterior, composto foi purificado por coluna cromatográfica com o uso de diclorometano:acetato de etila. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.58 – 7.25 (m, 11H), 6.99 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 4.71 (s, 2H), 4.24 (q, *J* = 7,03 Hz, 2H), 4.17 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 1.31 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 173.31, 169.62, 143.51, 137.96, 136.96, 135.39, 132.69, 129.65, 129.10, 128.17, 127.63, 127.16, 126.96, 119.79, 54.67, 50.07, 21.13, 20.31, 16.76.

Ácido 2-(N-benzil-1-{4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-il}fomamido) acético (**3**). À uma solução de **1b** em THF (2,11 mL) foi adicionada uma solução de LiOH (2,6 mmol, 62,3 mg) em água:metanol (1:1, 3,5 M, 7,43 mL). A mistura foi agitada por 18 h a temperatura ambiente e em seguida os voláteis foram removidos sob pressão reduzida e o resíduo foi transferido para água. O pH foi ajustado para ~2 com HCl 1 M (SCHWIETER; JOHNSTON, 2016). O sólido foi filtrado e gerou 246 mg de (**3**), um sólido branco, com rendimento de reação de 88%. O produto foi utilizado sem

necessidade de purificação adicional. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (s, 4H), 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 3H), 7.37 (td, *J* = 14.4, 7.1 Hz, 5H), 7.24 (s, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 2.40 (s, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 173.18, 172.44, 143.24, 137.81, 137.12, 135.66, 132.91, 129.60, 129.09, 128.05, 127.64, 127.03, 126.96, 54.13, 46.79, 21.12.

3.3.3. Procedimento geral para a síntese do *N*-([1,1'-bifenil]-4-carbonil)-*N*-benzilglicina (**4**)

A síntese de (**4**) foi baseada na síntese do **composto (3)**, no qual a única modificação feita foi no ácido utilizado na etapa da reação de acoplamento. A síntese completa está demonstrada na Figura 13.

Figura 13 - Rota sintética para o composto (**4**)

Fonte: Autoria própria

Etil 2-(N-benzil-1-([1,1'-bifenil]-4-il)formamido)acetato (1c). A um balão de fundo de redondo, sob atmosfera de argônio, adicionou-se o composto **1** (1 mmol, 0,1912 mL) juntamente com o ácido 4-(4-metoxifenil) benzóico (1,3 mmol, 271 mg) e HATU (1,1 mmol, 418 mg) em DMF anidro (1,70 mL). Em seguida, DIPEA foi adicionada lentamente a 0 °C (4,0 mmol, 0,70 mL). O balão foi removido do banho de gelo e a reação teve continuidade por 18 h a temperatura ambiente.

Após esse período, 50 mL de acetato de etila foram adicionados ao balão e realizou-se uma extração da mistura, com soluções de NaHCO₃ saturado (3x 100 mL) e NaCl saturado (3 x 100 mL) (DOS SANTOS et al., 2018). O solvente foi removido sob pressão reduzida para gerar 353,5 mg do composto **1c**, um sólido branco, com rendimento de reação de 92,8%. Para a etapa posterior, o composto foi purificado por coluna cromatográfica com o uso de diclorometano:acetato de etila. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.57 – 7.24 (m, 14H), 4.70 (s,

2H), 4.23 (dd, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 2H), 4.17 (s, 2H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 172.46, 169.04, 142.94, 140.15, 136.12, 133.94, 128.98, 128.86, 127.85, 127.80, 127.49, 127.23, 127.13, 126.97, 61.26, 53.83, 46.35, 14.16.

N-([1,1'-bifenil]-4-carbonil)-*N*-benzilglicina (**4**). À uma solução de **1c** em THF (2,11 mL) foi adicionada uma solução de LiOH (3,3 mmol, 79 mg) em água:metanol (1:1, 3,5 M, 7,43 mL). A mistura foi agitada por 18 h a temperatura ambiente e em seguida os voláteis foram removidos sob pressão reduzida e o resíduo foi transferido para água. O pH foi ajustado para ~2 com HCl 1 M (SCHWIETER; JOHNSTON, 2016). O sólido foi filtrado e gerou 327 mg de (**4**), um sólido branco, com rendimento de reação de 84,5%. O produto foi utilizado sem necessidade de purificação adicional. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.57-7.24 (m, 14H), 4.71 (s, 2H), 4.22 (s, 2H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 173.08, 172.51, 143.30, 140.03, 135.64, 133.26, 129.10, 128.88, 128.06, 127.88, 127.64, 127.29, 127.14, 126.99, 54.11, 46.75.

3.3.4. Procedimento geral para a síntese do 2 -{[3-clorofenil)metil]amino}-*N*-(cianometil)acetamida (**6**)

O **composto 6** foi sintetizado com base na reação multicomponentes descrita por Elders e colaboradores (ELDERS et al., 2009) descrita na Figura 14.

Figura 14 - Rota sintética para a produção do composto (**6**)

Fonte: Autoria própria

2 -{[3-clorofenil]metil}amino}-N-(cianometil)acetamida (**6**). Em um balão de fundo redondo adicionou-se o paraformaldeído (1 mmol, 30 mg) juntamente com a 3-clorobenzilamina (1 mmol, 0,122 mL) e o sulfato de magnésio anidro (1 mmol, 300 mg) em 2 mL de metanol. A mistura foi agitada por 2 h a temperatura ambiente e em seguida adicionou-se a 2-isocianoacetamida (**5**) (1 mmol, 84 mg) e a solução foi aquecida a 60 °C por 5 h. Após resfriada, a mistura foi concentrada e extraída com diclorometano (3x), seca sob MgSO₄ e concentrada (ELDERS et al., 2009). O produto foi purificado por coluna cromatográfica com o uso de diclorometano:metanol, resultando em 123 mg do composto **6**, um pó alaranjado, com rendimento de 52%. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (s, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 4H), 7.18 – 7.16 (m, 1H), 4.21 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.38 (s, 2H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 171.79, 140.94, 134.47, 129.96, 128.11, 127.69, 126.22, 116.09, 53.30, 51.44, 27.03.

3.3.5. Procedimento geral para a síntese de (R)-2-(benzilamino)-N-(1-ciano-2-feniletil)acetamida (**8**)

Para a síntese do composto **8** foram necessárias 4 etapas reacionais, baseadas nos trabalhos de Elders e colaboradores (ELDERS et al., 2007), Aaron e colaboradores (SOCHA et al., 2010) e, novamente no trabalho de Elders e colaboradores (ELDERS et al., 2009). A rota sintética completa está descrita na Figura 15.

Figura 15 - Rota sintética para a produção do composto (**8**)

Fonte: Autoria própria

Metil formil-L-fenilalaninato (7a). Em um balão de fundo redondo adicionou-se uma solução de (**7**) em 10,8 mL de diclorometano grau HPLC e trietilamina (4 mmol, 558 μ L) e gota a gota o anidrido acético fórmico (8,8 mmol, 1,20 mL) (previamente preparado com 1,0 eq de anidrido acético e 1,1 eq de ácido fórmico agitados durante 2 h a 55°C). A mistura foi agitada por 2 h em temperatura ambiente e os voláteis foram removidos sob pressão reduzida (ELDERS et al., 2007). Foram obtidos 754 mg do composto **7a**, um óleo amarelado, com rendimento de 89%. O produto foi utilizado na etapa posterior sem purificação adicional. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (s, 1H), 7.30 – 7.10 (m, 5H), 4.97 (dtd, J = 7.9, 5.7, 0.6 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.15 (dd, J = 9.1, 5.7 Hz, 2H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 171.60, 160.73, 135.44, 129.24, 128.62, 127.24, 52.49, 51.82, 37.72.

Metil (S)-2-isociano-3-fenilpropanoato (7b). Em um balão de fundo redondo foi dissolvido o composto **7a** (3,44 mmol, 713 mg) em 10,24 mL de diclorometano seco e a solução foi resfriada a -78 °C. Em outro balão seco adicionou-se trifosgênio (1,17 mmol, 350 mg) em 1,14 mL de diclorometano seco e a solução foi adicionada lentamente à solução do composto **7a**. À mesma solução adicionou-se, também lentamente, *N*-metilmorfolina (NMM) (6,88 mmol, 0,76 mL). A solução foi agitada por 1,5 h a -78 °C e, após esse tempo, 4,5 mL de água destilada foram adicionadas e uma saída e ar foi colocada no balão. A solução foi aquecida até a temperatura ambiente e a mistura foi separada e a fração orgânica coletada, seca sob Na_2SO_4 para a remoção do solvente (SOCHA et al., 2010). O produto foi purificado por coluna cromatográfica com o uso de hexano:acetato de etila e foram obtidas 331,5 mg do composto **7b**, um sólido alaranjado, com rendimento de reação de 47,4%. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.40 – 7.25 (m, 5H), 4.48 (dd, J = 8.4, 4.9 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.28 (dd, J = 13.9, 4.8 Hz, 1H), 3.16 (dd, J = 13.9, 8.4 Hz, 1H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 166.56, 160.92, 134.31, 129.25, 128.81, 127.84, 58.02, 53.40, 38.91.

(*S*)-2-isociano-3-fenilpropanamida (**7c**). Em um balão de fundo redondo dissolveu-se o composto **7b** (1,66 mmol, 331,5 mg) em 1,75 mL de uma solução de amônia em metanol (2 M) e a mistura foi agitada durante 18 h a temperatura ambiente. Em seguida o solvente foi removido e o composto **7c**, um pó alaranjado obtido quantitativamente, foi utilizado sem purificação

adicional. RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ 7.72 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.35 – 7.24 (m, 5H), 4.57 (dd, J = 9.2, 5.0 Hz, 1H), 3.13 (dd, J = 13.6, 5.0 Hz, 1H), 2.95 (dd, J = 13.7, 9.2 Hz, 1H). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 167.14, 162.49, 134.41, 129.53, 128.74, 127.78, 59.53, 38.48.

(*R*)-2-(benzilamino)-*N*-(1-ciano-2-feniletil)acetamida (**8**). Em um balão de fundo redondo adicionou-se o paraformaldeído (1 mmol, 30 mg) juntamente com a benzilamina (1 mmol, 0,109 mL) e o sulfato de magnésio anidro (1 mmol, 300 mg) em 2 mL de metanol. A mistura foi agitada por 2 h a temperatura ambiente e

em seguida adicionou-se o composto **7c** (1 mmol, 174 mg) e a solução foi aquecida a 60 °C por 5 h. Após resfriada, a mistura foi concentrada e extraída com diclorometano (3x), seca sob MgSO_4 e concentrada (ELDERS et al., 2009). O produto foi purificado por coluna cromatográfica com o uso de diclorometano:acetato de etila, resultando em 72,7 mg de (**8**), um pó alaranjado, com rendimento de 24,8%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.68 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.32 (tdt, J = 11.2, 4.3, 1.7 Hz, 8H), 7.21 – 7.17 (m, 2H), 5.18 – 5.12 (m, 1H), 3.68 (s, 2H), 3.31 (q, J = 17.2 Hz, 2H), 3.13 – 3.02 (m, 2H). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 170.54, 161.03, 137.38, 136.29, 129.30, 128.62, 128.56, 127.57, 127.43, 126.99, 77.30, 77.04, 76.79, 53.28, 43.46, 38.78.

3.3.6. Procedimento geral para síntese de 2-isocianoacetamida (**10**)

Para a síntese do composto **10**, foi realizada a síntese da α -isocianamida, baseada no trabalho de Elders e colaboradores (ELDERS et al., 2009) e está descrita na Figura 16.

Figura 16 - Rota sintética para o composto (10)

Fonte: Autoria própria

2-isocianoacetamida (10) Em um balão de fundo redondo dissolveu-se o composto **9** (10 mmol, 1,09 mg) em 10 mL de uma solução de amônia em metanol (2 M) e a mistura foi agitada durante 18 h em temperatura ambiente.

Em seguida o solvente foi evaporado e o composto **10**, um pó alaranjado, foi obtido em rendimento quantitativo. O produto foi utilizado posteriormente sem purificação adicional. RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.28 (s, 2H). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165.23, 158.43, 45.12.

Em um balão de fundo redondo adicionou-se o paraformaldeído (2 mmol, 60 mg), a benzilamina (1 mmol, 0,218 mL) e o MgSO_4 (2 mmol, 600 mg) em 4 mL de metanol. A mistura foi agitada por 2 h (t.a.). Em seguida, adicionou-se o composto **9a** (2 mmol, 168 mg) e

a solução foi aquecida por 5 h a 60 °C. Após resfriada, a mistura foi extraída à vácuo, lavada com metanol e o solvente foi removido sob pressão reduzida (ELDERS et al., 2009). O produto foi purificado por coluna cromatográfica com o uso de diclorometano e acetato de etila e foram obtidos 152,4 mg de um óleo amarelo viscoso (composto **10**), com rendimento de reação de 37,5%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.70 (s, 1H), 7.39 – 7.26 (m, 5H), 4.17 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.36 (d, J = 4.5 Hz, 2H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 171.86, 138.78, 128.75 (2), 128.10 (2), 127.63, 115.96, 54.05, 51.50, 26.93.

3.4. Procedimento geral para a síntese dos peptoides

Os peptoides podem ser divididos em três regiões diferentes, identificadas como Posição 1 (P1), Posição 2 (P2) e Posição 3 (P3), que estão exemplificadas na Figura 17 abaixo, cuja estrutura representa o peptóide Neq0924.

Figura 17 – Regiões passíveis de substituições na estrutura dos peptoides

Fonte: Autoria própria

Os peptoides seguiram o procedimento sintético descrito na Figura 18 abaixo, baseados no trabalho de (DOS SANTOS et al., 2018).

Figura 18 - Procedimento geral para a síntese dos peptoides

Fonte: Autoria própria

As identificações das dipeptidil nitrilas originais, as quantidades de ácido, amina, HATU, DIPEA, DMF utilizados em casa síntese e os rendimentos de reação estão apresentados na Tabela 1 abaixo.

Em um balão de fundo redondo adicionou-se a aminonitrila, o ácido e o HATU. O balão foi colocado sob atmosfera inerte e banho de gelo. Em seguida adicionou-se DMF e, gota a gota a DIPEA. A reação teve continuidade por 16 h à temperatura ambiente. Após esse período adicionou-se 50 mL de acetato de etila e foi realizada uma extração da mistura, com soluções de NaHCO₃ saturado (3x 20 mL) e NaCl saturado (3 x 20 mL) (DOS SANTOS et al., 2018). Todos os compostos foram purificados por coluna cromatográfica com solventes que variaram entre acetato de etila e diclorometano ou hexano.

Tabela 1 - Dados das reações de acoplamento para a síntese dos peptídeos

Peptídeo	Ácido	Amina	HATU/COMU*	DIPEA	DMF/DCM**	% rendimento
Neq0924	1,3 mmol, 350 mg	1 mmol, 92,5 mg	1,1 mmol, 418 mg	4 mmol 0,70 mL	1,70 mL	120 mg (38%)
Neq0982	1,3 mmol, 350 mg	1 mmol, 122 mg	1,1 mmol, 418 mg	4 mmol 0,70 mL	1,70 mL	64,9 mg (19%)
Neq0973	1,3 mmol, 350 mg	1 mmol, 127 mg	1,1 mmol, 418 mg	4 mmol 0,70 mL	1,70 mL	190 mg (54%)
Neq0994	0,37 mmol, 138 mg	0,28 mmol, 26,16 mg	0,31 mmol, 118 mg	1,13 mmol, 1,97 mL	0,478 mL	80,4 mg (93%)
Neq0986	0,15 mmol, 55 mg	0,11 mmol, 13,8 mg	0,124 mmol, 47 mg,	0,450 mmol, 0,08 mL	0,190 mL	87,3 mg (94%)
Neq0995	0,29 mmol, 100 mg	0,23 mmol, 21,4 mg	0,25 mmol, 94,90 mg,	0,158 mmol, 0,376 mL	0,91 mL	65,7 mg (74%)
Neq1014	0,29 mmol, 100 mg,	0,23 mmol, 27,73 mg	0,25 mmol, 94,90 mg	0,91 mmol, 0,158 mL	0,376 mL	74,4 mg (78%)
Neq1033	0,67 mmol, 126 mg	0,52 mmol, 123,5 mg	0,572 mmol, 250 mg*	2,08 mmol, 0,2 mL	0,90 mL	66,62 mg (30,6%)
Neq1068	0,2 mmol, 40,9 mg	0,2 mmol, 58,63 mg	***	0,4 mmol, 0,07 mL	5 mL**	40,4 mg (44%)
Neq1080	0,486 mmol, 123 mg	0,374 mmol, 75,9 mg	0,4114 mmol, 176 mg*	1,496 mmol, 0,26 mL	0,632 mL	46,2 mg (28%)
LA012	0,34 mmol, 0,046 mL	0,34 mmol, 70 mg	***	0,68 mmol, 0,118 mL	1,7 mL **	-
LA013	0,191 mmol, 39,20 mg	0,21 mmol, 42 mg	0,248 mmol, 94,41 mg	0,4202 mmol, 0,073 mL	0,248 mL	-

* COMU foi utilizado como substituição ao HATU

** DCM foi utilizado como substituição ao DMF

*** Não fez-se uso de reagente de acoplamento pois, nesses casos, utilizou-se o cloreto de ácido

Fonte: Autoria própria

N-benzil-*N*-(2-((cianometil)amino)-2-oxoetil)benzamida (**Neq0924**). Óleo incolor (120 mg, 38% rendimento). $R_f = 0.36$ (Hex:AcOEt 7:3). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.50 – 7.33 (m, 9H), 7.18 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.09 (s, 4H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 173.50, 168.94, 135.23, 134.18, 130.69, 129.08, 128.81, 128.17, 127.06, 115.80, 54.58, 49.39,

27.28. FTIR ($\nu_{\text{máx}}$): 516, 561, 603, 700, 750, 786, 842, 966, 1006, 1076, 1149, 1238, 1301, 1355, 1436, 1456, 1543, 1629, 1689, 2250, 2864, 2935, 3047, 3354. HPLC: $t_R = 12.9$ min (majoritário), pureza: >99%; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 μm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/ H_2O ; forno da coluna: 35 °C. MS: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}^+$ $[\text{M}+1]^+$ $m/z = 330.12$, encontrado $m/z = 330.19$.

N-benzil-*N*-(2-((cianociclopropil)amino)-2-oxoetil)benzamida (**Neq0982**). Sólido branco (64.9 mg, 19% rendimento). $p.f = 154.8 - 155.3$ °C. $R_f = 0.31$ (Hex:AcOEt 7:3). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.52 – 7.29 (m, 10H), 7.17 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.03 (s, 2H), 1.50 (s, 2H), 1.17 (s, 2H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 173.71, 169.94, 135.66, 134.78, 130.94,

129.41, 129.12, 128.51, 127.57, 127.33, 120.12, 54.91, 50.15, 20.62, 17.06. FTIR ($\nu_{\text{máx}}$): 532, 569, 715, 796, 962, 997, 1249, 1303, 1435, 1523, 1635, 2237, 3026, 3338. HPLC: $t_R = 20.640$ min (majoritário), pureza: 96.201%; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 μm); taxa de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/ H_2O ; forno da coluna: 35 °C. HRMS: Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2^+$ $[\text{M}+1]^+$ $m/z = 334.15108$, encontrado $m/z = 334.15296$.

N-benzil-*N*-(2-((2-cianopropan-2-il)amino)-2-oxoetil)benzamida. (**Neq0973**). Sólido branco (190 mg, 54% rendimento). $p.f = 132 - 133$ °C. $R_f = 0.58$ (Hex:AcOEt 7:3). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.40 – 7.14 (m, 11H), 4.68 (s, 2H), 4.05 (s, 2H), 1.66 (s, 6H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 173.37, 168.21, 135.40, 134.52, 130.53, 129.06, 128.74, 128.10,

127.20, 126.90, 120.60, 54.48, 50.01, 46.27, 27.09. FTIR ($\nu_{\text{máx}}$): 3264, 3051, 2239, 1692, 1617, 1540, 1438, 1410, 1366, 1251, 1134, 1078, 987, 937, 833, 753, 703, 649. HPLC: $t_R =$

21.242 min (majoritário), pureza: 97.427%; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 µm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/H₂O; forno da coluna: 35 °C. HRMS: Calculado para C₂₀H₁₉N₃O₂⁺ [M+1]⁺ m/z = 336.16673, encontrado m/z = 336.11728.

N-benzil-*N*-(2-((cianometil)amino)-2-oxoetil)-4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida. (**Neq0994**). Sólido branco (80.4 mg 93% rendimento). p.f = 157,7 – 158,3°C. R_f = 0.56 (DCM:AcOEt 1:1). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.62 – 7.11 (m, 14H), 4.74 (s, 2H), 4.18 – 4.07 (m, 4H), 2.41 (s, 3H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 173.45, 169.08, 143.57, 137.99, 136.92, 135.30, 132.61, 129.66, 129.11, 128.18, 127.17, 126.96, 115.77, 60.40, 54.64, 49.74, 29.70. FTIR (ν_{máx}): 3327, 2921, 2851, 1737, 1678, 1604, 1517, 1465, 1404, 1342, 1242,

1163, 1080, 999, 946, 906, 856, 813, 768, 708. HPLC: t_R = 37.667 min (majoritário), pureza: >99 %; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 µm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/H₂O; forno da coluna: 35°C. HRMS: Calculado para C₂₅H₂₃N₃O₃⁺ [M+1]⁺ m/z = 414.17730, encontrado m/z = 414.26748.

N-benzil-*N*-(2-((1-cianociclopropil)amino)-2-oxoetil)-4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (**Neq0986**). Sólido branco (87.3 mg, 94% rendimento). p.f = 202.8 – 203.5 °C. R_f = 0.37 (DCM:AcOEt 7:3). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.63 – 7.22 (m, 14H), 4.74 (s, 2H), 4.07 (s, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.52 (s, 2H), 1.20 (s, 2H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 173.29, 169.65, 143.50, 137.96, 136.93, 135.37, 132.69, 129.65, 129.09, 128.16, 127.63, 127.16, 126.96, 119.79, 54.70, 50.02, 21.13, 20.29, 16.74. FTIR (ν_{máx}): 3339, 3029, 2925, 2242, 1690, 1636, 1519,

1432, 1405, 1364, 1299, 1256, 1212, 1055, 1004, 961, 857, 815, 763, 700, 631. HPLC: t_R = 36.978 min (majoritário), pureza: >99%; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 µm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/H₂O; forno da coluna: 35°C. HRMS: Calculado para C₂₇H₂₅N₃O₃⁺ [M+1]⁺ m/z = 440.19295, encontrado m/z = 440.19530.

N-benzil-*N*-(2-((cianometil)amino)-2-oxoetil)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida. (**Neq0995**). Sólido branco (65.7 mg, 74% rendimento). p.f = 144.7 – 145.1 °C. R_f = 0.44 (DCM:AcOEt 8:2). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.60 – 7.22 (m, 15H), 4.73 (s, 2H), 4.12 (s, 4H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 205.85, 169.05, 143.61, 139.80, 135.24, 132.92, 129.11, 128.93, 128.19, 128.03, 127.66, 127.42, 127.14, 115.78, 54.62, 49.69, 27.32. FTIR ($\nu_{\text{máx}}$): 3371, 3057, 2934, 2850, 2255, 1678, 1636, 1509,

1458, 1404, 1344, 1296, 1260, 1199, 1153, 1078, 1001, 897, 856, 739, 693, 636. HPLC: t_R = 24,373 min (majoritário), pureza: > 99%; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 μm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/ H_2O ; forno da coluna: 35 °C. HRMS: Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2^+$ $[\text{M}+1]^+$ m/z = 384.16673, encontrado m/z = 384.16906.

N-benzil-*N*-(2-((cianociclopropil)amino)-2-oxoetil)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida. (**Neq01014**). Sólido branco (74,4 mg 78% rendimento). p.f = 189.2 – 190 °C. R_f = 0.64 (DCM:AcOEt 8:2). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.65 – 7.62 (m, 1H), 7.58 (dd, J = 7.1, 1.4 Hz, 4H), 7.48 – 7.30 (m, 8H), 7.21 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.73 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 1.51 (s, 2H), 1.19 (s, 2H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 173.24, 169.64, 143.58, 139.85, 135.36, 133.00, 129.10, 128.93, 128.18, 128.01, 127.42, 127.14, 119.81, 54.65, 49.96, 20.30, 16.74. FTIR ($\nu_{\text{máx}}$): 3339, 2242, 1689, 1636, 1519, 1431, 1405, 1296, 1211, 1056, 1006, 963, 851, 747,

693, 644. HPLC: t_R = 24.939 min (majoritário), pureza: 98.422 %; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 μm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradient 5-100% acetonitrila/ H_2O ; forno da coluna: 35 °C. HRMS: Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2^+$ $[\text{M}+1]^+$ m/z = 410.18238, encontrado m/z = 410.18453.

3-(tert-butil)-N-(3-clorobenzil)-N-(2-((cianometil)amino)-2-oxoetil)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida (**Neq1033**).

Sólido branco (66.62 mg, 30.6% rendimento). p.f = 36°C. R_f = 0.30 (DCM:AcOEt 8:2). RMN ^1H (500 MHz, cdcl_3) δ 7.37 – 7.30 (m, 2H), 7.19 – 6.98 (m, 3H), 6.16 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.17 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 1.24 (s, 9H). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 168.35, 164.65, 160.76, 137.60, 135.34, 130.67, 128.69, 127.26, 125.19, 115.68, 103.26, 77.16, 54.10, 49.73, 38.33, 32.15, 30.54, 27.57. FTIR ($\nu_{\text{máx}}$): 3304, 3053, 2959, 2257, 1688, 1631, 1528, 1486, 1416, 1361, 1231, 1078, 993, 903, 846, 774, 681. HPLC: t_R = 23.3 min (majoritário), pureza: >99%; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 μm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/ H_2O ; forno da coluna: 35°C. MS: Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{O}_2^+$ $[\text{M}+1]^+$ m/z = 401,16, encontrado m/z = 402.24

(R)-N-benzil-3-(tert-butil)-N-(2-((1-ciano-2-feniletil)amino)-2-oxoetil)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida (**Neq1078**). Óleo incolor (40,4 mg 44% rendimento). R_f = 0.49 (Hex:AcOEt 8:2). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.41 – 7.27 (m, 10H), 7.05 (s, 1H), 6.15 (s, 1H), 5.11 – 5.04 (q, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.94 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.07 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 1.23 (s, 9H). RMN

^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 167.81, 160.57, 135.23, 133.98, 133.70, 129.43, 129.14, 129.02, 128.24, 127.98, 126.98, 117.80, 103.11, 54.34, 49.41, 41.50, 38.62, 38.13, 31.93, 30.45. FTIR ($\nu_{\text{máx}}$): 3287, 3032, 2959, 2859, 2248, 2139, 1693, 1629, 1528, 1486, 1438, 1361, 1230, 1078, 995, 909, 810, 730, 698. HPLC: t_R = 29.7 min (majoritário), pureza: >99%; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 μm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/ H_2O ; forno da coluna: 35°C. MS: Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_2\text{Na}^+$ $[\text{M}+1]^+$ m/z 480.23, encontrado m/z = 480.31

3-(tert-butyl)-N-(3-clorobenzil)-N-(2-((cianometil)amino)-2-oxoetil)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida (Neq1080). Sólido alaranjado (46.2 mg, 28% rendimento). p.f = 66°C. R_f = 0.66 (DCM:AcOEt 1:1). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.86 (s, 1H), 7.79 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.45 – 7.16 (m, 8H), 4.63 (s, 2H), 4.15 – 4.06 (m, 4H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 219.41, 200.28, 195.74, 168.68, 139.57, 136.00, 134.93, 130.31, 129.16, 128.32, 127.12, 125.88, 115.64, 94.36, 54.54, 49.49, 27.35. FTIR ($\nu_{\text{máx}}$): 3285, 3059, 2925, 2853, 2255, 1683, 1621, 1555, 1432, 1233, 1149, 1077, 993, 903, 799, 735, 696. HPLC: t_R = 25.6 min (majoritário), pureza: >99%; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 μm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/ H_2O ; forno da coluna: 35°C. MS: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{IN}_3\text{O}_2\text{Na}^+$ $[\text{M}+1]^+$ m/z 456.01, encontrado m/z = 456.10.

3.5.Pirazóis

Em colaboração com outra integrante do grupo Nequimed foram sintetizadas algumas outras estruturas com esqueleto de dipeptidil nitrilas, ilustrados na Figura 19.

Figura 19 - Estrutura das dipeptidil nitrilas sintetizadas

Fonte: Autoria própria

3.5.1. Procedimento geral para a síntese de (12)

Para a síntese de ambos os compostos, foi necessária a síntese do ácido precursor utilizado posteriormente na reação de acoplamento. A rota sintética do mesmo está ilustrada na Figura 20 e foi baseada nos trabalhos de Song e colaboradores (SONG et al., 2012)

Figura 20 - Rota sintética usada na produção do composto (12)

Fonte: Autoria própria

Em um balão de fundo redondo adicionou-se uma solução de **(11)** (2,57 mmol, 56 mg) em 30 mL de etanol, com posterior adição de NaOH (5,14 mmol, 1,03 g) em aquecimento, ficando sob refluxo por 3 h. O álcool foi removido em vácuo e o resíduo foi acidificado a pH 2 com HCl 2M (SONG et al., 2012). O produto foi filtrado e lavado com água para gerar 310 mg do **composto 12** com 61% de rendimento. O produto foi usado sem necessidade de purificação. RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ 13.16 (s, 1H), 6.56 (d, $J = 0.5$ Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.13 (s, 3H).

3.5.2. Procedimento geral para a síntese das dipeptidil nitrilas

As dipeptidil nitrilas seguiram o mesmo procedimento sintético para os peptídeos, descrito na Figura 21, baseado no trabalho de (DOS SANTOS et al., 2018).

Figura 21 - Procedimento geral para a síntese das dipeptidil nitrilas

Fonte: Autoria própria

Em um balão de fundo redondo adicionou-se a aminonitrila, o ácido e o HATU. O balão foi colocado sob atmosfera inerte e banho de gelo. Em seguida adicionou-se DMF e, gota a gota, a DIPEA. A reação teve continuidade por 16 h em temperatura ambiente. Após esse período adicionou-se 50 mL de acetato de etila e foi realizada uma extração da mistura, com soluções de NaHCO₃ saturado (3x 20 mL) e NaCl saturado (3 x 20 mL) (DOS SANTOS et al., 2018). Todos os compostos foram purificados por coluna cromatográfica.

As identificações das quantidades de ácido, amina, HATU, DIPEA, DMF utilizados em casa síntese e os rendimentos de reação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados sobre as reações de acoplamento para as dipeptidil nitrilas

Composto	Ácido	Amina livre	HATU	DIPEA	DMF	% rendimento
Neq1064	0,15 mmol, 21,2 mg	0,165 mmol, 49,53 mg	0,195 mmol, 4,14 mg	0,33 mmol, 0,06 mL	0,195 mL	31,6 mg (54%)
Neq1076	0,118 mmol, 16,43 mg	0,129 mmol, 29,84 mg	0,1534 mmol, 60,13 mg	0,256 mmol, 0,046 mL	0,1534 mL	29,0 mg (78%)

Fonte: Autoria própria

(S)-N-(3-(3-clorofenil)-1-((1-cianociclopropil)amino)-1-oxopropan-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-5-carboxamida

(Neq1064). Sólido branco. p.f = 223,8 °C – 224,1 °C. RMN

¹H (400 MHz, DMSO) δ 9.05 (s, 1H), 8.59 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.27 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.22 (ddt, *J* = 7.2, 3.2, 1.5 Hz, 2H), 6.65 (s, 1H), 4.51 (ddd, *J* = 10.2, 8.4, 4.9 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.04 (dd, *J* = 13.5, 4.9

Hz, 1H), 2.90 (dd, *J* = 13.5, 10.4 Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 1.47 (td, *J* = 4.8, 2.9 Hz, 2H), 1.07 – 1.01 (m, 2H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO) δ 191.59, 172.58, 170.36, 159.79, 145.69, 140.77, 135.66, 133.09, 130.39, 129.49, 128.36, 126.85, 121.11, 107.30, 54.17, 38.74, 36.79, 20.21, 16.10, 13.49. FT-IR (ν_{máx}): 3269, 2923, 2246, 1671, 1640, 1526, 1442, 1380, 1288, 1080, 856, 643 cm⁻¹. HPLC: t_R = 22.1 min (majoritário), pureza: >99%; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 μm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/H₂O; forno da coluna: 35°C. HRMS: Calculado para C₁₉H₂₀ClN₅O₂Na⁺ [M+1]⁺ m/z 408.12, found m/z = 408.21.

(S)-N-(1-((1-cianociclopropil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-5-carboxamida (**Neq1076**).

Sólido branco. Ponto de fusão: 138,9 °C – 140,3 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.57 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.55 (dd, $J = 14.3, 8.1$ Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.74 – 1.68 (m, 3H), 1.50 (dd, $J = 6.0, 3.5$ Hz, 2H), 1.20 (dd, $J = 8.1, 2.8$ Hz, 2H), 0.94 (dd, $J = 13.4, 6.0$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 180.08, 173.35, 160.52, 146.94, 134.68, 119.72, 106.68, 51.30, 40.30, 38.87, 24.83, 22.87, 16.64, 16.54, 13.21 FT-IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3458, 3258, 3069, 3018, 2955, 2925, 2872, 2240, 1685, 1640, 1550, 1524, 1446, 1384, 1299, 1277, 1238 cm^{-1} . HPLC: $t_R = 19,231$ min (majoritário), pureza: 97.513%; Coluna Chiralpack Diacel IC (250x4.6 mm, 5 μm); quociente de vazão: 0.5 mL/min; gradiente 5-100% acetonitrila/ H_2O ; forno da coluna: 35°C. HRMS: Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_2^+$ $[\text{M}+1]^+$ m/z 318.18, found $m/z = 318.28$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Regra dos 5 de Lipinski

Estudos computacionais e experimentais feitos com a finalidade de estimar a solubilidade e permeabilidade de compostos sugerem 4 fatores que são capazes de influenciar na absorção e permeação do composto (LIPINSKI et al., 1996): LogP, massa molecular, grupos doadores de ligação de hidrogênio e grupos aceptadores de ligação de hidrogênio (ANN L COKER, 2017).

De acordo com a regra dos 5 de Lipinski, quando o log P calculado é maior que 5, a massa molecular é maior que 500, o número de grupos doadores de ligação de hidrogênio maior do que 5 e os grupos aceptadores de ligação de hidrogênio maiores do que 10 existe uma maior probabilidade de o composto apresentar baixas taxas de absorção e permeabilidade (LIPINSKI et al., 1996). 90% dos compostos administrados oralmente e que chegaram até os estudos de fase clínica II encontram-se dentro da regra dos cinco (LIPINSKI, 2004). Além disto, o composto pode possuir uma infração a regra dos 5 que ainda poderá ser absorvido. Produtos naturais não são considerados nesta regra porque possuem transportadores específicos no organismo.

Pensando nessas informações, fez-se um estudo a fim de observar o comportamento dos compostos sintetizados até o momento frente à regra dos cinco de Lipinski. A Tabela 3 abaixo apresenta os 4 parâmetros para todos os peptoides sintetizados.

Tabela 3 - Parâmetros observados na regra dos 5 de Lipinski

Peptóide	Log P	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Aceitador de ligação de hidrogênio	Doador de ligação de hidrogênio
Neq0924	2,01	307,35	3	1
Neq0982	2,29	333,38	3	1
Neq0973	2,38	335,40	3	1
Neq0994	3,33	413,47	4	1
Neq0986	3,65	439,51	4	1
Neq0995	3,26	383,44	3	1
Neq1014	3,70	409,48	3	1
Neq1033	2,36	401,89	4	1
Neq1078	3,49	457,57	4	1
Neq1080	2,69	433,24	3	1
LA012	2,09	321,37	3	1
LA013	2,67	386,24	3	1

Fonte: Autoria própria

Como é possível observar na Tabela 3, nenhum dos peptóides sintetizados viola os 4 parâmetros da regra dos 5 de Lipinski. Esses parâmetros observados se relacionam com a solubilidade em fase aquosa e permeabilidade intestinal dos compostos e compreende as primeiras etapas da biodisponibilidade dos compostos administrados oralmente (LIPINSKI, 2004).

4.2. Síntese dos peptóides

4.2.1. Rota sintética a partir da Bn-Gly-OEt

A primeira rota sintética escolhida partiu da Bn-Gly-Oet (**1**), na qual uma acilação levou à formação do composto (**1a**), utilizado na síntese dos precursores **2**, **3** e **4**. A reação está exemplificada na Figura 22.

Figura 22 - Exemplo de reação de acilação

Fonte: Autoria própria

Durante uma reação de acilação, ocorre o ataque nucleofílico ao carbono do cloreto de ácido pelo par de elétrons livres do átomo de nitrogênio da outra molécula participante da reação (1). Após o ataque nucleofílico, é feita a eliminação do cloreto, seguido da desprotonação do nitrogênio promovido pela base, como pode ser observado no mecanismo proposto na Figura 23.

Figura 23 - Mecanismo proposto para a reação de acilação

Fonte: Autoria própria

Para a formação de alguns dos precursores (2, 3 e 4), também foi realizada a reação de hidrólise alcalina de ésteres. Ésteres podem ser hidrolizados em soluções ácidas ou alcalinas, sendo a segunda opção utilizada nesse trabalho. O exemplo da reação de hidrólise alcalina de ésteres está apresentado na Figura 24.

Figura 24 - Exemplo de reação de hidrólise alcalina de ésteres

Fonte: Autoria própria

A reação consiste em um ataque nucleofílico ao carbono do éster pela hidroxila, gerando assim um intermediário tetraédrico, seguido de eliminação da etoxila correspondente, que é uma base forte e desprotona o ácido carboxílico, gerando carboxilato de sódio. Este é posteriormente protonado no tratamento do bruto reacional com solução ácida. O mecanismo proposto é observado na Figura 25.

Figura 25 - Mecanismo proposto para a reação de hidrólise alcalina de ésteres

Fonte: Autoria própria

Uma importante etapa na síntese dos peptídeos é a reação que leva à formação da ligação peptídica, que neste caso foi escolhida a reação de acoplamento promovida pelo HATU (2-(1-*H*-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniohexafluorofosfato). Esse reagente de acoplamento foi utilizado na síntese do odanacatib por O'Shea e colaboradores na Merck na

última etapa de reação que envolvia o acoplamento de um ácido carboxílico e uma amina que estava apresentando baixos rendimentos. Com o uso do HATU o rendimento foi elevado para 79% (DUNETZ; MAGANO; WEISENBURGER, 2016).

Agentes de acoplamento, tais como HATU, fornecem uma rápida formação de ligações peptídicas e podem ser bastante úteis no acoplamento de aminoácidos estericamente impedidos na síntese de peptídeos. No entanto, as aplicações ainda são limitadas devido ao alto peso molecular dos reagentes e a formação de um subproduto citotóxico (tetrametilureia). A aplicação desses compostos é justificada em situações onde grupos funcionais sensíveis estão presentes e são necessárias condições brandas de reação (DUNETZ; MAGANO; WEISENBURGER, 2016).

O HATU é análogo ao HBTU, mas apresenta como vantagens reações mais rápidas, menor epimerização dos compostos, e altos rendimentos de reação. Sua particular eficiência no acoplamento de estruturas estericamente impedidas torna-o um reagente de acoplamento amplamente utilizado na síntese de candidatos a fármacos (DUNETZ; MAGANO; WEISENBURGER, 2016). Um exemplo de reação de acoplamento na qual utilizou-se HATU é visto na Figura 26.

Figura 26 - Exemplo de reação de acoplamento

Fonte: Autoria própria

Essa reação tem início com a desprotonação do ácido carboxílico (2) promovido pela base DIPEA. O ânion carboxilato resultante realiza um ataque nucleofílico ao reagente de acoplamento HATU e o produto dessa reação reage com o carbono ativado levando à formação do éster. Esse éster ativa o carbono da carbonila para um posterior ataque nucleofílico da aminonitrila, formando a ligação peptídica. O mecanismo proposto para esse tipo de reação encontra-se ilustrado na Figura 27.

Figura 27 - Mecanismo proposto para a reação de acoplamento

Fonte: Adaptado de (DUNETZ; MAGANO; WEISENBURGER, 2016)

4.2.2. Reação multicomponente

Outra estratégia empregada para a síntese de peptídeos foi uma reação multicomponente, na qual três ou mais reagentes são colocados em um único balão para formar um novo produto, que contém todos ou a maior parte dos átomos dos reagentes de partida, como demonstrado na Figura 28. Esta estratégia diminui a quantidade de subprodutos da reação, e permite que o produto de interesse seja obtido com um número menor de etapas de reação (RUIJTER; ORRU, 2013). Os materiais de partida não reagem simultaneamente em uma única etapa, mas sim em uma sequência de etapas elementares e reações cuja etapa irreversível leva ao produto desejado (DÖMLING; UGI, 2000; ELDERS et al., 2009). Uma das maiores aplicações das reações multicomponentes é no descobrimento de novos candidatos a fármacos, em que a redução no número de etapas reacionais para gerar estruturas com elevada complexidade estrutural facilitam a síntese de um grande número de análogos (RUIJTER; ORRU, 2013). Em relação à síntese de inibidores de proteases, as reações multicomponentes fornecem sínteses rápidas de compostos que se assemelham a substratos que interagem com essas enzimas e podem ser utilizadas na inibição das mesmas (DÖMLING; WANG; WANG, 2012).

Figura 28 - Representação esquemática de uma reação multicomponentes

Fonte: Adaptado de (RUIJTER; ORRU, 2013)

A referência escolhida como base para a realização das reações multicomponentes desse trabalho apresenta o uso de isonitrilas, compostos com alta reatividade frente a nucleófilos e eletrófilos. No caso da utilização das 2-isocianoacetamidas, propõe-se que haja um rearranjo do grupo amida para a formação da nitrila, utilizados neste trabalho como grupo funcional dos peptoides.

Um exemplo de reação multicomponente utilizado nesse trabalho envolve o formaldeído, a 3-clorobenzilamina e a 2-isocianoacetamida (**5**), que levam à formação de (**6**) em apenas uma etapa reacional, apresentado na Figura 29.

Figura 29 - Exemplo de reação multicomponente usada no trabalho

Fonte: Autoria própria

A reação tem início com a formação do íon imínium a partir da condensação do formaldeído com a amina primária. Este intermediário sofre o ataque do carbono reativo da 2-isocianoacetoamida, seguido de uma ciclização intramolecular e da abstração do próton para

formar o intermediário cíclico de 5 membros. Uma segunda abstração de próton ocorre com posterior abertura do anel via rearranjo intramolecular, formando o composto de interesse. O mecanismo proposto encontra-se na Figura 30.

Figura 30 - Mecanismo proposto para a reação multicomponente

Fonte: Adaptado de (ELDERS et al., 2009)

A síntese da 2-isociano-2-benzilacetamida derivada da L-fenilalanina iniciou-se pela formação da formamida a partir da L-fenilalanina metil éster promovida pelo anidrido acético fórmico, exemplificada na Figura 31.

Figura 31 - Exemplo de reação de síntese da formamida

Fonte: Autoria própria

O mecanismo de reação se inicia com um ataque nucleofílico do nitrogênio ao anidrido acético fórmico, seguido de eliminação do carboxilato que desprotona o composto formado, levando à produção da formamida tendo o ácido acético como subproduto da reação, como observado na Figura 32.

Figura 32 - Mecanismo proposto para a reação de formação da formamida

Fonte: Autoria própria

As isonitrilas foram descobertas em 1867 por Gautier e Hofmann e são hoje uma classe muito útil na síntese de compostos orgânicos. O procedimento básico encontrado na literatura para a síntese de isonitrilas ocorre através da desidratação de *N*-alquil ou *N*-arilformamidas e muitos reagente e aminas terciárias têm sido usadas no desenvolvimento dessa reação. Em 1977 foi descrita por Ugi e colaboradores a síntese de diversos ácidos α -isocianocarboxílicos através do uso de fosgênio ou difosgênio e NMM (*N*-metilmorfolina). No entanto, essas condições levavam à altas racemizações dos *N*-formil amino ésteres (ZHU; WU; DANISHEFSKY, 2009).

Durante a síntese dos peptídeos, através da rota sintética multicomponentes, realizou-se a síntese de isonitrilas a partir da desidratação da formamida apresentada acima. A reação escolhida baseia-se no trabalho de Zhu e colaboradores (ZHU; WU; DANISHEFSKY, 2009), onde foi descrita a síntese de isonitrilas enantiomericamente puras a partir de aminoésteres e peptídeos *N*-terminais. O exemplo da síntese da isonitrila utilizada nesse trabalho é visto na Figura 33.

Figura 33 - Exemplo de reação de síntese da isonitrila

Fonte: Autoria própria

O mecanismo proposto inicia-se com o ataque nucleofílico ao carbono da carbonila do trifosgênio, liberando o triclorometanolato. A posterior desprotonação do nitrogênio pela base *N*-metilmorfolina e outra desprotonação feita pelo triclorometanolato levam à formação da isonitrila, como ilustrado na Figura 34. A formação de amidas foi outra reação usada na síntese dos precursores. Um exemplo dessa reação está apresentado na Figura 35.

Figura 34 - Mecanismo proposto para a síntese da isonitrila

Fonte: Autoria própria

Figura 35 - Exemplo de reação de formação de amida

Fonte: Autoria própria

O mecanismo se inicia com o ataque nucleofílico da amônia no carbono da carbonila, seguido de liberação do carboxilato que desprotona o nitrogênio levando à formação da amida e liberação de metanol, como pode ser visto na Figura 36 abaixo.

Figura 36 - Mecanismo proposto para a reação de formação da amida

Fonte: Autoria própria

4.3. Identificação dos compostos

Após a síntese dos peptoides foram realizadas diversas análises com o objetivo de comprovação da estrutura dos compostos: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono 13, Espectrometria de Massas, análise de pureza com HPLC e Espectroscopia no Infravermelho. Todos os compostos foram submetidos a essa caracterização e abaixo será exemplificado o composto Neq1033 (Figura 37). Os espectros dos demais compostos são mostrados no apêndice.

Figura 37 – Representação estrutural do composto codificado como Neq1033

Fonte: Autoria própria

4.3.1. Ressonância Magnética Nuclear ^1H

A ressonância magnética nuclear de hidrogênio apresenta grande utilidade porque diferentes prótons de uma mesma molécula apresentam deslocamentos químicos distintos devido ao ambiente químico em que esses prótons se encontram. Os elétrons próximos realizam uma blindagem aos prótons, justificando seus diferentes deslocamentos. Os prótons que se encontram em um ambiente químico exatamente igual são chamados de equivalentes e

geralmente apresentam o mesmo deslocamento químico (LAMPMAN et al., 1973). No entanto, não apenas diferentes prótons apresentam diferentes deslocamentos químicos, mas sim, cada tipo de próton apresenta um deslocamento químico característico, o que auxilia na caracterização da molécula. Na Figura 38 destaca-se o RMN ^1H do composto Neq1033 como exemplo.

Figura 38 - RMN ^1H (500 MHz) do composto Neq1033 em CDCl_3

Fonte: Autoria própria

No Quadro 1 a seguir vê-se os deslocamentos esperados para cada tipo de próton no espectro de RMN de ^1H .

Quadro 1 - Valores de referência para as regiões do espectro de RMN ^1H para átomos de hidrogênio ligados a carbono

Prótons em carbonos insaturados próximos a	Prótons em carbonos insaturados: benzeno,	Prótons em carbonos insaturados: alcenos	Prótons em carbonos saturados: CH_3 , CH_2 , CH	Prótons em carbonos saturados: CH_3 , CH_2 , CH
--	---	--	--	--

oxigênios: aldeídos	hidrocarbonetos aromáticos		próximos a oxigênio	distantes de oxigênio	
10,5	8,5	6,5	4,5	3,0	0,0

Fonte: Adaptado de (CLAYDEN et al., 1950)

No espectro de hidrogênio do composto Neq1033 (Figura 38), realizado em CDCl_3 , é possível observar a presença de 7 sinais em diferentes regiões do espectro.

Grupos metil ($-\text{CH}_3$) geralmente apresentam sinais de alta intensidade que são geralmente encontrados entre as regiões de 0,7 ppm a 1,3 ppm, sendo os mais blindados (LAMPMAN et al., 1973). Em 1,24 ppm, indicado com a letra (7) é possível observar um singlete cuja integração mostra a presença de 9 átomos de hidrogênio. Esse deslocamento é característico de prótons presentes em carbonos saturados, que, nesse caso, correspondem aos hidrogênios dos três grupos CH_3 terminais do grupo *terc*-butila presente no anel pirazol da molécula.

O sinal em 3,93 ppm (6) apresenta uma integração que aponta a presença de outros 3 hidrogênios. Esse deslocamento é esperado para grupos CH_3 localizados em carbonos saturados ou próximos a átomos eletronegativos, como é o caso da metila diretamente ligada ao nitrogênio substituído também no anel pirazol. A multiplicidade do sinal, um singlete, é justificado devido à ausência de outros hidrogênios adjacentes para acoplamento.

Em 4,06 ppm observa-se o sinal correspondente ao hidrogênio 2, no qual a integração mostra a presença de dois hidrogênios que indicam um grupo CH_2 . Hidrogênios localizados no carbono alfa de amidas apresentam um deslocamento em torno de 2,1-2,5 ppm, quando o hidrogênio encontra-se adjacente à carboxila, e entre 2,2-2,9 ppm, quando encontra-se adjacente ao nitrogênio (LAMPMAN et al., 1973). Uma vez que esse grupo CH_2 está localizado entre carboxila e nitrogênio, espera-se que o deslocamento encontrado seja um pouco maior, uma vez que existem duas amidas desblindando os hidrogênios.

Já em 4,16 ppm é possível observar um dubleto, cuja integração aponta a presença de outros dois hidrogênios que, segundo o Quadro 1 acima, também se localizam próximos a átomos eletronegativos. Como a multiplicidade do sinal é um dubleto, espera-se que os hidrogênios estejam acoplando com outro átomo de hidrogênio próximo, o que permite inferir que o sinal corresponde ao grupo CH_2 (1) localizado entre o grupo NH da amida e a nitrila, uma vez que o valor esperado para hidrogênios adjacentes ao grupo nitrila se localizam dentro dessa faixa encontrada (LAMPMAN et al., 1973). O valor da constante de acoplamento esperado para

o caso de acoplamentos é entre 0-7 Hz (LAMPMAN et al., 1973), o que se adequa ao valor de 5,2 Hz encontrado.

No deslocamento 4,78 ppm nota-se a presença de outro sinal, cuja integração indica a presença de dois hidrogênios. O sinal corresponde aos hidrogênios do grupo CH₂ (**3**) localizados entre o anel aromático substituído e a amida, portanto esse valor de deslocamento é condizente com o esperado, assim como a multiplicidade (singleto), devido à ausência de outros átomos de hidrogênio adjacentes.

Em 6,16 ppm observa-se a presença de outro hidrogênio que, como descrito no quadro, corresponde a hidrogênios presentes em carbonos insaturados e heterociclos aromáticos de 5 membros, podendo assim ser esse sinal atribuído ao hidrogênio do grupo CH do pirazol (**5**).

Hidrogênios ligados a um anel aromático apresentam maiores deslocamentos químicos, próximos a 7 ppm, devido aos elétrons π do anel (LAMPMAN et al., 1973). No espectro apresentado, na região entre 7,01 e 7,36 ppm foi observada a presença de todos os 4 hidrogênios do anel aromático meta-substituído (**4**) e, sobreposto a esses sinais, o sinal do hidrogênio do grupo NH, cuja faixa esperada de deslocamento é entre 5 e 9 ppm (LAMPMAN et al., 1973).

4.3.2. Ressonância Magnética Nuclear ¹³C

O carbono-12, o isótopo mais abundante de carbono, possui um spin zero e portanto é inativo para o RMN. No entanto, carbono-13 pode ser utilizado pois possui uma massa ímpar e spin nuclear. Sua abundância natural é baixa, e, quando o número total de átomos de carbono presentes na molécula é baixo, a probabilidade de conter um isótopo ¹³C é pequena, e um segundo átomo de ¹³C é ainda mais raro. Nesses casos, o espectro observado resulta de espectros formados através de uma coleção de moléculas (LAMPMAN et al., 1973).

A ressonância magnética nuclear de carbono pode ser usada na identificação dos tipos de carbono que estão presentes em um composto e apresenta informações sobre o esqueleto da molécula. O espectro de carbono apresenta uma faixa de valores de ppm muito superior ao de hidrogênio, o que significa que a grande maioria de átomos não equivalentes vão apresentar seu próprio deslocamento químico e os picos raramente se sobrepõe (LAMPMAN et al., 1973). A Figura 39 representa o espectro de carbono para o Neq1033 como exemplo, sendo que os demais compostos são mostrados no apêndice.

Figura 39 - RMN ^{13}C para o composto Neq1033

Fonte: Autoria própria

Diversos fatores devem ser levados em consideração durante a realização da atribuição dos sinais presentes nos espectros de RMN de hidrogênio e carbono pois existem diversas variáveis que podem influenciar no ambiente em que o átomo em questão se encontra, como por exemplo efeitos eletronegativos, efeitos de hibridização e a anisotropia magnética

A presença de átomos com alta eletronegatividade afetam o deslocamento químico devido ao seu efeito retirador de elétrons, reduzindo assim a densidade eletrônica ao redor do carbono, diminuindo a blindagem diamagnética local, desblindando o carbono. Quanto mais eletronegativo o substituinte, mais desblindado será o carbono ligado diretamente a ele (KALMAN, 2013; LAMPMAN et al., 1973).

A hibridização de carbonos próximos também influenciam no deslocamento químico: carbonos com maior caráter s (33 %) são mais “eletronegativos” pois os elétrons são mais fortemente atraídos para o núcleo (KALMAN, 2013; LAMPMAN et al., 1973) e por isso os carbonos são mais desblindados.

Alguns deslocamentos químicos de prótons e carbonos de grupos como alcenos, alcinos, anéis aromáticos e aldeídos não são fáceis de justificar levando em consideração apenas a

hibridização e a eletronegatividade de grupos próximos. Nesses casos, o deslocamento químico se deve a presença de um sistema insaturado (com elétrons π): quando esses elétrons se encontram sob um campo magnético, outro campo magnético é gerado e desblinda os átomos que se encontram dentro dele, elevando mais seu deslocamento químico. Esse fenômeno se chama anisotropia magnética e todos os grupos que possuem elétrons π em uma molécula geram campos anisotrópicos secundários e regiões de blindagem e desblindagem tem formas e direções características que variam de acordo com o grupo funcional presente (KALMAN, 2013; LAMPMAN et al., 1973).

No espectro de carbono do composto Neq1033 é possível observar a presença de 17 sinais.

O primeiro sinal, com um deslocamento químico de 27,57 ppm corresponde ao carbono do grupo CH_2 ligado à nitrila (**2**). Embora esse carbono esteja próximo à átomos eletronegativos (como o nitrogênio da amida) e também ao carbono sp da nitrila, esse grupo de encontra dentro do cone de blindagem causada pela anisotropia magnética das ligações triplas da nitrila (Figura 40), o que tornam o grupo o mais blindado da molécula (ERNO PRETSCH; PHILIPPE BUHLMANN; MARTIN BADERTSCHER, 2009; KALMAN, 2013; LAMPMAN et al., 1973).

Figura 40 - Cone de blindagem da nitrila

Fonte: Adaptado de (LAMPMAN et al., 1973)

Em seguida observa-se um sinal com deslocamento químico de 30,54 ppm. Nessa faixa do espectro esperam-se carbonos saturados (sp^3) que não estejam próximos à elementos eletronegativos. O sinal, corresponde portanto, aos grupos CH_3 (**18**) da *terc*-butila (ERNO PRETSCH; PHILIPPE BUHLMANN; MARTIN BADERTSCHER, 2009; KALMAN, 2013; LAMPMAN et al., 1973).

O carbono quaternário da *terc*-butila (**17**) aparece logo em seguida, com um sinal de baixa intensidade em 32,15 ppm, ainda na faixa esperada para carbonos saturados sem átomos eletronegativos próximos (LAMPMAN et al., 1973).

O quarto sinal, em 38,33 pode ser identificado como pertencendo ao grupo metil (**15**) substituído no nitrogênio do anel pirazol. Por ser um átomo eletronegativo, o nitrogênio desblinda o carbono, justificando seu deslocamento um pouco maior, dentro da faixa esperada para carbonos saturados sob influência de efeitos eletronegativos (KALMAN, 2013; LAMPMAN et al., 1973).

Os dois últimos sinais correspondem aos outros dois carbonos saturados: um deles encontrado entre os grupos amida e o outro ligado ao anel aromático. Nesse caso, o primeiro sinal corresponde ao grupo CH₂ localizado entre os dois grupos amida (**4**) em 49,73 ppm e, conseqüentemente, o sinal mais desblindado corresponde ao grupo CH₂ ligado ao anel aromático (**5**) (KALMAN, 2013; LAMPMAN et al., 1973).

Em 103,26 ppm é possível observar a presença de outro sinal, que corresponde à um carbono insaturado, que pode ser identificado como pertencente ao grupo CH (**14**) do anel pirazol e, logo após, o sinal característico do carbono (**1**) do grupo nitrila em 115,68 ppm (KALMAN, 2013; LAMPMAN et al., 1973).

Na área dos carbonos aromáticos, entre 125,19 ppm e 137,60 ppm existem 6 sinais que correspondem a sete carbonos diferentes, sendo eles os carbonos do anel aromático (carbonos **6, 7, 8, 9, 10 e 11**) e também o carbono sp² do anel pirazol ligado ao átomo de nitrogênio (**16**). Esses deslocamentos estão de acordo com os valores observados na literatura (KALMAN, 2013; LAMPMAN et al., 1973).

Por último é possível observar três sinais mais desblindados que correspondem, respectivamente, ao carbono quaternário (**13**) do anel pirazol ligado à carboxila da amida em 160,76 ppm, ao carbono da carboxila da amida di-substituída (**12**), em 164,65 ppm e, por fim, ao carbono da carboxila da amida mono-substituída (**3**) em 168,35 ppm (KALMAN, 2013; LAMPMAN et al., 1973).

As atribuições dos sinais foram feitas com base em informações existentes na literatura, e, para a confirmação dos mesmos existe a necessidade da realização de análises como HMBC (para observar a correlação entre átomos separados por até quatro ligações), HSQC (para observar a correlação direta entre os átomos) e também DEPT (com o objetivo de determinar a quantidade de hidrogênios ligados à cada carbono).

4.3.3. Caracterização por espectrometria de massas

Para esta análise foi preparada uma amostra com concentração de 1 mg.mL^{-1} que foi injetada no HPLC acoplado ao espectrômetro de massas, resultando no seguinte espectro do composto Neq0133, usado como exemplo (Figura 41). Os demais compostos são mostrados no apêndice.

Figura 41 - Espectrometria de massas do peptóide Neq1033

Fonte: Autoria própria

A massa exata calculada para o composto Neq1033 de fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{O}_2$ é igual a $401,16 \text{ g.mol}^{-1}$ e no espectro é possível observar uma massa correspondente ao íon $[\text{M} + \text{H}^+]$ em 402,24 e também ao íon desprotonado $[\text{M} - \text{H}^+]$ em 401,15, além de um sinal em 424,21, equivalente ao íon $[\text{M} + \text{Na}^+]$.

4.3.4. Pureza

Após a purificação por coluna cromatográfica com sílica flash como fase estacionária, os compostos são injetados no HPLC para comprovar uma pureza mínima de 95%. A Figura 42 mostra o cromatograma final do peptóide Neq1033 como exemplo.

Figura 42 - Cromatograma do composto Neq1033

Fonte: Autoria própria

Condições: gradiente linear de 5 -1 00% de B (A: H₂O/ B: Acetonitrila) em 30 minutos, sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 ° C com volume de injeção de 5µL.

A presença de uma única banda no cromatograma, em 23,3 min indica que o composto apresenta uma pureza superior a 99%, apontando que o composto pode ser utilizado para testes enzimáticos e celulares.

4.3.5. Análise por infravermelho

A região do espectro de infravermelho apresenta comprimentos de onda maiores do que as observadas no espectro visível e a grande maioria dos compostos que possuem ligações covalentes são capazes de absorver frequências nessa região. Embora o espectro de infravermelho seja característico de cada molécula, certos grupos funcionais apresentam absorções quase sempre na mesma região o que permite inferir informações estruturais do composto em questão (LAMPMAN et al., 1973; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Existem dois tipos de vibrações moleculares observadas no espectro de infravermelho: a deformação axial ν (*stretching*) e a deformação angular δ (*bending*), sendo a primeira relacionada a movimentos ao longo do eixo de ligação que causam uma aproximação ou afastamento da distância interatômica e a segunda relacionada a mudanças no ângulo das ligações (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005), como ilustrado na Figura 43.

Figura 43 - Tipos de vibrações moleculares analisadas no espectro de infravermelho

Fonte: Autoria própria

O espectro do composto Neq1033 é apresentado na Figura 44 como exemplo (veja o apêndice para os demais). As designações dos grupos funcionais e seus correspondentes número de onda na Tabela 4, onde é possível observar a visualização de todos os grupos que caracterizam a molécula: anel aromático, nitrila, grupos CH₂ e CH₃ e ligações C-N e C-Cl.

Figura 44 - Espectro de infravermelho para o composto Neq1033

Fonte: Autoria própria

Tabela 4 - Atribuições vibracionais do espectro de infravermelho do Neq1033

Atribuições vibracionais	Número de onda (cm⁻¹)
$\nu(\text{N-H})$	3524
$\nu(\text{C-H})$ aromático	3053
$\nu(\text{C-H})$ alifático	2956, 2871
$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$	2252
$\nu(\text{C=O})$ N-substituído	1696
$\nu(\text{C=O})$ N,N-substituído	1624
$\delta(\text{N-H})$	1530
$\delta(\text{C-H})$	1462
$\delta(\text{C-H})$ adjacente a carbonila	1429
$\delta(\text{CH}_3)$	1361
$\nu(\text{C-N})$	1148
$\delta(\text{C-H})$	958
$\delta(\text{C-H})$ anel aromático meta-substituído	846-774
$\delta(\text{C-Cl})$	681

Fonte: Autoria própria

Amidas primárias apresentam duas bandas de deformação axial (N-H) resultantes de deformações simétricas e assimétricas com valores em torno de 1650 cm⁻¹ – 1515 cm⁻¹ e 3350 cm⁻¹ - 3180 cm⁻¹, sendo essa última devido a ligações de hidrogênio. Vibrações axiais das ligações C=O das amidas ocorrem em frequências menores do que esperado para grupos carbonílicos. Amidas primárias apresentam bandas próximas a 1650 cm⁻¹ enquanto amidas secundárias possuem bandas ao redor de 1640 cm⁻¹. Já a ligação C-N das amidas tem bandas com valores próximos a 1400 cm⁻¹ (LAMPMAN et al., 1973; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

As nitrilas são caracterizadas por uma banda de fraca a média intensidade de absorção, reduzida pela conjugação de elétrons, na região de deformação axial que corresponde a uma ligação tripla no espectro: entre 2260 cm^{-1} – 2240 cm^{-1} (LAMPMAN et al., 1973; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Nos grupos metila (CH_3), duas deformações angulares podem ocorrer: a deformação simétrica (próxima de 1375 cm^{-1}) e a assimétrica (próxima a 1450 cm^{-1}), sendo que essa última pode se sobrepor às vibrações de grupos CH_2 (1350 cm^{-1} – 1150 cm^{-1}) (LAMPMAN et al., 1973; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

As maiores informações sobre os anéis aromáticos contidos nas moléculas aparecem em frequências mais baixas entre 900 cm^{-1} – 675 cm^{-1}) (LAMPMAN et al., 1973; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005)

A banda referente à ligação C-Cl varia de acordo com o padrão de substituição do anel aromático e heterociclos aromáticos possuem basicamente o mesmo padrão de absorção de compostos aromáticos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

4.4. Relação estrutura-atividade

Até o momento os peptóides sintetizados foram testados para duas enzimas: cruzaína e catepsina L, utilizando como inibidores controle as dipeptidil-nitrilas previamente sintetizadas pelo grupo: Neq409 e Neq570 (Figura 45).

Figura 45 - Estruturas dos compostos utilizados como controle nos ensaios enzimáticos do grupo NEQUIMED

Fonte: Autoria própria

A atividade enzimática foi avaliada de acordo com (CIANNI et al., 2018), por ensaios fluorimétricos (em equipamento Biotek Synergy HT), com monitoramento da taxa de hidrólise

do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarina (Z-FR-MCA, Sigma-Aldrich) com emissão de fluorescência a 460 nm (excitação a 355 nm) a 37 ° C.

Os ensaios cinéticos enzimáticos foram realizados em microplacas Corning de fundo preto com 96 poços pretos contendo 200 µL de uma solução constituída de tampão acetato 100 mM, pH 5,5, NaCl 300 mM, DTT 5 mM (ditiotretol), DMSO 5 mM a 5% v/v (dimetilsulfóxido)), Triton X-100 a 0,01% v / v e 0,15 nM de cruzipaína ou catepsina L.

A alíquota de estoque foi rapidamente descongelada a 37 ° C e mantida em gelo até a ativação, incubada por 20 minutos no tampão de ensaio (acetato 100 mM, pH 5,5, e 5 mM de DTT), seguida de 2 minutos adicionais com inibidores antes da adição do substrato. Foram feitas inspeções visuais e pré-leitura dos poços para verificar uma possível precipitação e fluorescência de fundo.

A análise dos dados foi realizada com o programa Sigma Plot 10, com cada experimento realizado em triplicata. As velocidades iniciais de hidrólise do substrato em reação foram calculadas usando o software Gen5 TM Biotek.

A constante de inibição aparente K_i' foi determinada por regressão não linear através do uso da Equação 1 abaixo na qual V_s é a taxa de estado estacionário, V_o é a taxa na ausência de inibidor e $[I]$ é a concentração do inibidor.

Equação 1 - Determinação da constante de inibição aparente K_i'

$$V_s = \frac{V_o}{1 + \frac{[I]}{K_i'}}$$

A constante de inibição verdadeira foi calculada pela correção de K_i' de acordo com a Equação 2, onde $[S]$ é a concentração do substrato e K_m é a constante de Michaelis.

Equação 2 - Determinação da constante de inibição verdadeira K_i

$$K_i = \frac{K_i'}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

4.4.1. Ensaios para a cruzaina

Na Tabela 5 abaixo é possível observar os valores de pK_i obtidos para cada um dos peptídeos testados até o momento.

Tabela 5 - Valores de pKi obtidos para a enzima cruzaina

Peptóide	pKi _{cruzaína} *
Neq0924	5,2 (± 0,04)
Neq0982	5,1 (± 0,98)
Neq0973	5,2 (± 0,08)
Neq0994	5,3 (± 0,91)
Neq0986	4,9 (± 0,02)
Neq0995	5,5 (± 0,01)
Neq1014	5,1 (± 0,01)
Neq1033	5,1 (± 0,05)
Neq1080	5,0 (± 0,09)

* compostos testados na concentração de 10 µM. Fonte: Autoria própria.

Com esses dados é possível criar a seguinte relação estrutura-atividade (Figura 46).

Figura 46 - Relação estrutura-atividade para os valores de pKi obtidos para a cruzaina

Fonte: Autoria própria

Com esse estudo de análise de pares moleculares (MMP) é possível observar que a adição de grupos mais volumosos feitas na posição P1 praticamente não altera a potência dos peptídeos, indicando que nesse caso não existe um problema de reconhecimento com a presença de substituintes mais volumosos. No caso de substituições mais volumosas na posição P3, há uma preferência por grupos menores nessa posição, uma vez que grupos mais volumosos podem alterar a flexibilidade da posição P1, dificultando o reconhecimento entre o composto e os sítios da enzima, tornando o *warhead* menos disponível para realização da ligação covalente reversível com a enzima. Este resultado é distinto do que foi previamente observado para os compostos peptídicos correspondentes que serão posteriormente discutidos.

Já com relação às modificações feitas na posição P3, observou-se que um aumento no volume da cadeia ligada a essa porção da molécula não causou mudanças substanciais na potência do derivado. Como exemplo, tem-se os compostos Neq0994 e Neq0995, que possuem um pKi na mesma ordem de grandeza do composto parental Neq0924. O sítio P3 é mais aberto (exposto ao solvente) o que permite grupos mais volumosos nesta posição. A pequena alteração nos valores de pKi nesta posição indica que os grupos químicos escolhidos não devem estar levando à formação de interações intermoleculares relevantes. As escolhas dos substituintes foram embasadas no conhecimento prévio de dipeptidil nitrilas, mas provavelmente o modo de interação deve ser distinto do que inicialmente foi pensado.

Até o momento não foram realizadas modificações na posição P2, portanto são necessários estudos complementares para entender a influência que essa porção da molécula exerce sobre a atividade do composto.

Com relação às dipeptidil nitrilas descritas pelo grupo NEQUIMED (DOS SANTOS et al., 2018) é possível fazer a comparação demonstrada na Figura 47.

Figura 47 - Comparação de valores de pKi para a cruzaina obtidos para peptídeos e dipeptidil nitrilas

Fonte: Autoria própria

É possível observar que a inserção da ciclopropila na posição P1 das dipeptidil nitrilas causa um aumento na potência inibitória do composto (vide Neq0409 e Neq0570), enquanto essa substituição não é bem aceita no caso dos peptídeos. A mudança na posição P3 com um anel pirazol causa um ganho na potência das dipeptidil nitrilas (vide Neq0409 e Neq0866), mas essa alteração não causou uma mudança substancial na potência dos peptídeos (vide Neq0924 e Neq1033).

É possível observar uma queda entre uma e duas unidades de pKi entre peptídeos e peptídeos. Esse fator se deve ao deslocamento da cadeia lateral para o nitrogênio da amida, alterando a flexibilidade dessa parte da molécula, impedindo uma interação adequada com o subsítio S3 da enzima.

4.4.2. Ensaios para a catepsina L

Na

Tabela **6** abaixo é possível observar os valores de pKi obtidos para cada um dos peptoides testados até o momento.

Tabela 6 - Valores de pKi obtidos para a catepsina - L

Peptóide	pKi_{catL}*
Neq0924	6,2 (± 0,30)
Neq0982	4,6 (± 0,04)
Neq0973	Sem atividade na concentração testada
Neq0994	4,8 (± 0,01)
Neq0986	4,0 (± 0,58)
Neq0995	5,0 (± 0,02)
Neq1014	4,9 (±0,97)
Neq1033	3,5 (+ 0,15)
Neq1080	6,6 (± 0,20)

* compostos testados na concentração de 10 µM. Fonte: Autoria própria.

Com esses dados é possível criar a seguinte relação estrutura-atividade (Figura 48).

Diferente do observado para as inibições da cruzaina, as mudanças realizadas nas posições P1, P2 e P3 têm forte influência na potência dos peptóides em relação à catepsina L. Além disto, observa-se que os compostos inicialmente concebidos apresentam maior potência para catepsina L em relação à cruzaina. Este resultado indica que há maior flexibilidade no sítio ativo da catepsina para que esta possa acomodar uma maior diversidade estrutural em termos da alteração de substituintes no esqueleto da molécula. No entanto, há um limite para tal, pois o aumento no volume dos grupos substituintes pode levar a uma grande perda na potência.

Figura 48 - Relação estrutura-atividade para os valores de pKi obtidos para a CatL

Fonte: Autoria própria

Foi possível observar que mudanças realizadas na posição P1 causaram uma considerável queda na potência das moléculas em relação à catepsina L em todos os casos, como por exemplo entre Neq0924, Neq0982 e Neq0873 (inativo). A adição de um halogênio na posição meta em P3 causou um considerável aumento na potência (Neq0924 versus Neq1080). Conforme visualizado na Figura 48, o iodo na posição meta leva a um grande aumento na potência para as dipeptidil nitrilas (Neq0804 em relação ao Neq0409) devido à formação de uma interação entre o halogênio e a proteína em uma ligação hidrogênio não convencional. Embora haja um aumento na potência para o peptídeo, a diferença acabou sendo bem menor, provavelmente devido ao distinto posicionamento do grupo funcional no sítio P3, como foi previamente hipotetizado para a cruzaina.

A adição de uma cadeia mais volumosa nessa mesma posição, no entanto, afetou negativamente a potência, diferente da cruzaina onde essa mudança não alterou consideravelmente os valores de pKi dos peptídeos.

Com relação às dipeptidil nitrilas é possível fazer a comparação demonstrada na Figura 49. Com essa relação observa-se que, no caso das dipeptidil nitrilas, a inserção da ciclopropila na posição P1 leva um aumento na potência (vide Neq0409 e Neq0570), fator não observado nos peptoides, assim como para a inibição da cruzafina. No caso das dipeptidil nitrilas, a inserção do halogênio em meta na posição P3 também eleva consideravelmente a potência inibitória do compostos ($\Delta pK_i = + 2,4$), enquanto que os peptoides não apresentam mudança no valor de inibição pelo composto.

Essas características se devem, mais uma vez, à falta de flexibilidade da posição P3 dos peptoides, fator causado pelo deslocamento da posição P2, mostrando que se deve realizar um estudo mais aprofundado sobre como um espaçador nessa região da molécula pode influenciar a atividade inibitória dos compostos.

Figura 49 - Comparação de pK_i para a catepsina L obtidos para peptoides e dipeptidil nitrilas

Fonte: Autoria própria

5. CONCLUSÃO

Uma série inédita de inibidores da cruzaína e catepsina L da classe de peptoides contendo nitrilas foi sintetizada e um estudo inicial das relações estrutura-atividade foi realizado a fim de compreender a interação entre os peptoides e as enzimas.

Foram utilizadas duas abordagens diferentes para as sínteses dos compostos, sendo a multicomponentes uma proposta nova no grupo NEQUIMED. Esse tipo de reação se mostrou eficiente assim como a abordagem já utilizada, permitindo a síntese de diversos tipos de esqueletos que podem ser utilizados no desenvolvimento de inibidores de cisteíno proteases.

A hipótese inicial, de que os peptoides seriam capazes de realizar a inibição de cisteíno proteases, foi provada. Foram realizados testes em duas enzimas diferentes: Com relação à inibição da cruzaína, mudanças na posição P1 e P3 dos peptoides não causaram uma alteração considerável na potência dos compostos. Quanto à inibição da catepsina L, os peptoides sintetizados no início da série se mostraram mais potentes. Alterações na posição P1 afetaram negativamente a atividade do composto para a catepsina L em maior proporção do que para a cruzaína. Modificações na posição P3 também apresentaram o mesmo efeito quando grupos volumosos foram adicionados, sendo a exceção observada para a adição de um halogênio na posição meta do anel em P3, que levou a um valor pK_i de $6,6 (\pm 0,20)$, indicando uma seletividade para inibição da catepsina L sobre a cruzaína.

Em relação aos resultados obtidos para a cruzaína, as substituições foram reconhecidas de modo similar pelos subsítios da enzima, justificando os valores de pK_i com baixas alterações. Já para a catepsina L, não foi observada uma relação direta entre os resultados previamente observados para as dipeptidil nitrilas e os peptoides, indicando que o reconhecimento das substituições nas diversas posições é feita de maneira diferente para as duas classes de compostos.

Estudos complementares e mais modificações estruturais são necessárias para entender as interações realizadas entre os peptoides e as cisteíno proteases de modo que novas moléculas sintetizadas sejam capazes de apresentar uma maior inibição das enzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMANN, E.; COWAN-JACOB, S. W.; MISSBACH, M. Novel purine nitrile derived inhibitors of the cysteine protease cathepsin K. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 24, p. 5833–5836, 2004.
- ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 195–206, 2012.
- ANN L COKER. HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2017.
- 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. 1–24, 2015.
- BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BURTOLOSO, A. C. B. et al. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2017.
- CAMARGO, E. P. Doenças tropicais. v. 22, n. 64, p. 95–110, 2008.
- CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human and Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471–479, 2006.
- CIANNI, L. et al. Leveraging the cruzain S3 subsite to increase affinity for reversible covalent inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 79, n. October 2017, p. 285–292, 2018.
- CLAYDEN, J. et al. Organic chemistry. **Journal of the Franklin Institute**, v. 250, n. 4, p. 374, 1950.
- COURA, J. R. et al. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 171–176, 2002.
- CRESPILLO-ANDÚJAR, C. et al. **Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail** *Clinical Microbiology and Infection*, 2018.
- DAFLON-TEIXEIRA, N. F. et al. Multiple approaches to address potential risk factors of chagas disease transmission in Northeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 2, p. 296–302, 2019.

DEATON, D. N. et al. Novel and potent cyclic cyanamide-based cathepsin K inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 7, p. 1815–1819, 2005.

DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: New estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, p. 151–185, 2003.

DÖMLING, A.; UGI, I. Multicomponent Reactions with Isocyanides. **Angewandte Chemie**, v. 39, n. 18, p. 3168–3210, 2000.

DÖMLING, A.; WANG, W.; WANG, K. Chemistry and biology of multicomponent reactions. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 6, p. 3083–3135, 2012.

DOS SANTOS, A. M. et al. Experimental study and computational modelling of cruzain cysteine protease inhibition by dipeptidyl nitriles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 37, p. 24317–24328, 2018.

DUNETZ, J. R.; MAGANO, J.; WEISENBURGER, G. A. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. **Organic Process Research and Development**, v. 20, n. 2, p. 140–177, 2016.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–416, 2005.

ELDERS, N. et al. A resource-efficient and highly flexible procedure for a three-component synthesis of 2-imidazolines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 16, p. 6135–6142, 2007.

ELDERS, N. et al. A multicomponent reaction towards N-(Cyanomethyl)amides. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, n. 25, p. 6096–6099, 2009.

FARUK KHAN, M. O.; DEIMLING, M. J.; PHILIP, A. Medicinal chemistry and the pharmacy curriculum. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 75, n. 8, 2011.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 180, p. 49–61, 2017.

FOWLER, S. A.; BLACKWELL, H. E. Structure-function relationships in peptoids: Recent advances toward deciphering the structural requirements for biological function. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 1508–1524, 2009.

FRIZLER, M. et al. Development of Nitrile-Based Peptidic Inhibitors of Cysteine Cathepsins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 294–322, 2010.

GANESH, S. D. et al. Peptoids and polypeptoids: biomimetic and bioinspired materials for biomedical applications. **Polymer Bulletin**, v. 74, n. 8, p. 3455–3466, 2017.

GRAUL, A. I.; PINA, P.; STRINGER, M. The year's new drugs & biologics 2018: Part i. **Drugs of Today**, v. 54, n. 1, p. 35–84, 2018.

KASHIWABARA¹, Y. B. et al. Doença De Chagas -Revisão De Literatura - the Chagas Disease -a Literature Review. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research -BJSCR**, v. 4, n. 3, p. 49–52, 2013.

KIRSHENBAUM, K. et al. Sequence-specific polypeptoids: A diverse family of heteropolymers with stable secondary structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 8, p. 4303–4308, 1998.

LAMPMAN, P. et al. **Introduction to Spectroscopy**.

LATEEF, S.; REDDY KRISHNA MOHAN, S.; REDDY JAYARAMA REDDY, S. Electroorganic synthesis of benzathine. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 1, p. 77–80, 2007.

LAU, K. H. A. Peptoids for biomaterials science. **Biomaterials Science**, v. 2, n. 5, p. 627–633, 2014.

LAUFER, S.; HOLZGRABE, U.; STEINHILBER, D. Drug discovery: A modern decathlon. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 15, p. 4072–4076, 2013.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 1996.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.

MÁNDITY, I. M.; FÜLÖP, F. An overview of peptide and peptoid foldamers in medicinal chemistry. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 11, p. 1163–1177, 2015.

MARTINEZ-MAYORGA, K. et al. Cruzain inhibitors: efforts made, current leads and a structural outlook of new hits. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 7, p. 890–898, 2015.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

MCKERROW, J. H. Parasite proteases. **Experimental Parasitology**, v. 68, n. 1, p. 111–115, 1989.

MEDICINES, W. H. O. WHO 20th EML. n. March, 2017.

MOTT, B. T. et al. Identification and optimization of inhibitors of trypanosomal cysteine proteases: Cruzain, rhodesain, and TbCatB. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 52–60, 2010.

NDAO, M. et al. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a chagas disease cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1167–1178, 2014.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. The history, evolution and importance of lipophilicity in medicinal chemistry: from Hippocrates and Galeno to Paracelsus and the contributions of Overton and Hansch. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 227–240, 2009.

NWAKA, S. et al. Advancing Drug Innovation for Neglected Diseases—Criteria for Lead Progression. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e440, 25 ago. 2009.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Seminar Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, p. 82–94, 2018.

POWERS, J. C. et al. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4639–4750, 2002.

RASSI JR, A.; MARIN-NETO, A. Seminar Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.

RUIJTER, E.; ORRU, R. V. A. Multicomponent reactions-opportunities for the pharmaceutical industry. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 1, p. e15–e20, 2013.

SALVESEN, GUY S, M. D. NIH Public Access Emerging principles in protease-based drug discovery Marcin. v. 9, n. 9, p. 690–701, 2010.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SCHWIETER, K. E.; JOHNSTON, J. N. On-Demand Complex Peptide Synthesis: An Aspirational (and Elusive?) Goal for Peptide Synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 43, p. 14160–14169, 2016.

SIKLOS, M.; BENAÏSSA, M.; THATCHER, G. R. J. Cysteine proteases as therapeutic targets: Does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 6, p. 506–519, 2015a.

SIKLOS, M.; BENAÏSSA, M.; THATCHER, G. R. J. Cysteine proteases as therapeutic targets: Does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 6, p. 506–519, 2015b.

SIKLOS, M.; BENAÏSSA, M.; THATCHER, G. R. J. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 6, p. 506–519, nov. 2015c.

SILVA, D. G. et al. A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 22, p. 5031–5035, 2017.

SILVA, R. A. DA; BARBOSA, G. L.; RODRIGUES, V. L. C. C. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas no estado de São Paulo no período de 2010 a 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 2, p. 259–267, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7 edition ed.

SOCHA, A. M. et al. Diversity-oriented synthesis of cyclic acyldepsipeptides leads to the discovery of a potent antibacterial agent. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 20, p. 7193–7202, 2010.

SONG, H. et al. Design, synthesis, and insecticidal activity of novel pyrazole derivatives containing α -hydroxymethyl-N-benzyl carboxamide, α -chloromethyl-N-benzyl carboxamide, and 4,5-dihydrooxazole moieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 1470–1479, 2012.

SUN, J.; ZUCKERMANN, R. N. Peptoid polymers: A highly designable bioinspired material. **ACS Nano**, v. 7, n. 6, p. 4715–4732, 2013.

TYLER, K. M.; OLSON, C. L.; ENGMAN, D. M. The Life Cycle Of Trypanosoma Cruzi. v. 31, p. 1–11, 2003.

TZIZIK, D. M.; BORCHARDT, R. A. Chagas disease. **Journal of the American Academy of Physician Assistants**, v. 31, n. 12, p. 30–33, 2018.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 55–68, 2010.

WILLIAMS, D. B. 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, 2010.

ZHU, J.; WU, X.; DANISHEFSKY, S. J. On the preparation of enantiomerically pure isonitriles from amino acid esters and peptides. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 5, p. 577–579, 2009.

ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, n. April 2017, p. 38–52, 2018.

ZUCKERMANN, R. N. Peptoid origins. **Biopolymers**, v. 96, n. 5, p. 545–555, 2011.

APÊNDICE

Espectro de RMN ¹H em para o peptóide Neq0924 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de RMN ¹³C para o peptóide Neq0924 em CDCl₃ - 100 (MHz)

Espectro de FT-IR para o peptoide Neq0924

Espectro de massas para o peptoide Neq0924

Cromatograma para o peptídeo Neq0924 Sistema Shimadzu Proeminence com coluna Chiralpak IC 5,0 μm (4,6 x 250 mm, Diacel Corporation, West Chester, PA). Gradiente linear de 5 – 100% de B (A: H₂O/ B: acetonitrila) em 30 minutos sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 °C com volume de injeção de 5 μL .

Espectro de RMN ¹H para o peptídeo Neq0982 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de RMN ¹³C para o peptídeo Neq0982 em CDCl₃ - 100 (MHz)

Espectro de FT-IR para o peptoide Neq0982

Espectro de massas de alta resolução para o peptoide Neq0924

Cromatograma para o peptídeo Neq0982. Sistema Shimadzu Proeminence com coluna Chiralpak IC 5,0 μm (4,6 x 250 mm, Diacel Corporation, West Chester, PA). Gradiente linear de 5 – 100% de B (A: H₂O/ B: acetonitrila) em 30 minutos sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 °C com volume de injeção de 5 μL .

Espectro de RMN ¹H para o peptídeo Neq0973 em CDCl_3 - 500 (MHz)

Espectro de RMN ¹³C para o peptídeo Neq0973 em CDCl_3 - 100 (MHz)

Espectro de FT-IR para o peptídeo Neq0973

Espectro de massas de alta resolução para o peptídeo Neq0973

Cromatograma para o peptídeo Neq0973. Sistema Shimadzu Proeminence com coluna Chiralpak IC 5,0 μm (4,6 x 250 mm, Diacel Corporation, West Chester, PA). Gradiente linear de 5 – 100% de B (A: H₂O/ B: acetonitrila) em 30 minutos sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 °C com volume de injeção de 5 μL .

Espectro de RMN ¹H para o peptóide Neq0994 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de RMN ¹³C para o peptóide Neq0994 em CDCl₃ - 100 (MHz)

Espectro de FT-IR para o peptídeo Neq0994

Espectro de massas de alta resolução para o peptídeo Neq0994

Cromatograma para o peptídeo Neq0994. Sistema Shimadzu Proeminence com coluna Chiralpak IC 5,0 μm (4,6 x 250 mm, Diacel Corporation, West Chester, PA). Gradiente linear de 5 – 100% de B (A: H₂O/ B: acetonitrila) em 30 minutos sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 $^{\circ}\text{C}$ com volume de injeção de 5 μL .

Espectro de RMN ¹H para o peptídeo Neq0986 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de RMN ¹³C para o peptídeo Neq0986 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de FT-IR para o peptóide Neq0986

Espectro de massas de alta resolução para o peptóide Neq0986

Cromatograma para o peptóide Neq0986. Sistema Shimatzu Proeminence com coluna Chiralpak IC 5,0 μm (4,6 x 250 mm, Diacel Corporation, West Chester, PA). Gradiente linear de 5 – 100% de B (A: H₂O/ B: acetonitrila) em 30 minutos sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 /] C com volume de injeção de 5 μL .

Espectro de RMN ¹H para o peptóide Neq0995 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de RMN ¹³C para o peptóide Neq0995 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de FT-IR para o peptídeo Neq0995

Espectro de massas de alta resolução para o peptídeo Neq0995

Cromatograma para o peptóide Neq0995. Sistema Shimatzu Proeminence com coluna Chiralpak IC 5,0 μm (4,6 x 250 mm, Diacel Corporation, West Chester, PA). Gradiente linear de 5 – 100% de B (A: H₂O/ B: acetonitrila) em 30 minutos sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 / C com volume de injeção de 5 μL .

Espectro de RMN ¹H para o peptóide Neq1014 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de RMN ¹³C para o peptóide Neq1014 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de FT-IR para o peptoide Neq1014

Espectro de massas de alta resolução para o peptoide Neq1014

Cromatograma para o peptídeo Neq1014. Sistema Shimadzu Proeminence com coluna Chiralpak IC 5,0 μm (4,6 x 250 mm, Diacel Corporation, West Chester, PA). Gradiente linear de 5 – 100% de B (A: H₂O/ B: acetonitrila) em 30 minutos sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 °C com volume de injeção de 5 μL .

Espectro de RMN ¹H para o peptídeo Neq1068 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de RMN ¹³C para o peptídeo Neq1068 em CDCl₃ - 100 (MHz)

Espectro de FT-IR para o peptídeo Neq1068

Espectro de massas para o peptídeo Neq1068

113

Espectro de RMN ¹H em para a dipeptidil-nitrila Neq1064 em DMSO-d₆ - 500 (MHz)

Espectro de RMN ¹³C para a dipeptidil-nitrila Neq1064 em DMSO-d₆ - 500 (MHz)

Espectro de FT-IR para a dipeptidil-nitrila Neq1064

Espectro de massas para a dipeptidil-nitrila Neq1064

Cromatograma para a dipeptidil-nitrila Neq1064. Sistema Shimatzu Proeminence com coluna Chiralpak IC 5,0 μm (4,6 x 250 mm, Diacel Corporation, West Chester, PA). Gradiente linear de 5 – 100% de B (A: H₂O/ B: acetonitrila) em 30 minutos sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 /] C com volume de injeção de 5 μL .

Espectro de RMN ¹H para a dipeptidil-nitrila Neq1076 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de RMN ¹³C para a dipeptidil-nitrila Neq1076 em CDCl₃ - 500 (MHz)

Espectro de FT-IR para a dipeptidil-nitrila Neq1076

Espectro de massas para a dipeptidil-nitrila Neq1076

Cromatograma para a dipeptidil-nitrila Neq1076. Sistema Shimatzu Proeminence com coluna Chiralpak IC 5,0 μm (4,6 x 250 mm, Diacel Corporation, West Chester, PA). Gradiente linear de 5 – 100% de B (A: H₂O/ B: acetonitrila) em 30 minutos sob fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e 35 /] C com volume de injeção de 5 μL .