UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos bioisostéricos da nitrofurazona: variações de anéis (pirrol e 4-dimetilaminobenzil) e cadeias laterais (semicarbazona, tiossemicarbazona e aminoguanidina)

Drielli Gomes Vital

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos bioisostéricos da nitrofurazona: variações de anéis (pirrol e 4-dimetilaminobenzil) e cadeias laterais (semicarbazona, tiossemicarbazona e aminoguanidina)

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Drielli Gomes Vital

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Vital, Drielli Gomes
V836p Planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos
 bioisostéricos da nitrofurazona : variações de anéis (pirrol e
 4-dimetilaminobenzil) e cadeias laterais (semicarbazona,
 tiossemicarbazona e aminoguanidina) / Drielli Gomes Vital. --
 São Paulo, 2013.
 100p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Trossini, Gustavo Henrique Goulart

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Química
medicinal 3. Modelagem molecular : Química farmacêutica I. T.
II. Trossini, Gustavo Henrique Goulart, orientador.

615.19 CDD

Drielli Gomes Vital

Planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos bioisostéricos da nitrofurazona: variações de anéis (pirrol e 4-dimetilaminobenzil) e cadeias laterais (semicarbazona, tiossemicarbazona e aminoguanidina)

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

São Paulo, 27 de Novembro de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, que é a minha força e a minha fortaleza.

Aos meus pais, Luiz Gomes Vital e Ivone dos Santos Vital que são a minha base, os meus maiores exemplos de caráter e honestidade, obrigada por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me dando forças para continuar.

Ao meu namorado, Marcell Luigi Fujii, por ser o meu maior exemplo de profissionalismo e dedicação, por ser companheiro, e estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus amigos que amo, Rogério Gomes Vital, Bianca Pereira Vital, Fernando Henrique de Sousa, Michele Aparecida Pereira de Sousa, por me acompanharem e me animarem naqueles momentos mais difíceis.

Às minhas amigas Marcela Siqueira e Elys Juliane Cardoso Lima, por estarem ao meu lado sempre, me direcionando e me ajudando nos momentos difíceis, nas horas de estudo e de descontração.

Ao meu orientador, Professor Doutor Gustavo Henrique Goulart Trossini, por confiar no meu trabalho, por me passar suas experiências e ensinamentos e pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/ USP) pela oportunidade.

Às agências de fomentos, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro.

À todos os colaboradores deste trabalho, sem eles o trabalho não estaria completo.

Aos professores da FCF/USP, que de uma maneira ou de outra contribuíram para o meu crescimento.

Aos meus colegas de laboratório que me ajudaram durante este período, me ensinaram o que sabiam, e de uma forma especial, agradeço à Andressa Polidoro, ao Doutor Marco Arribas, ao Natanael Segretti e ao Fernando de Moura Gatti.

“O temor de Javé é o princípio do saber, porém os insensatos desprezam a sabedoria e a disciplina.”

(Provérbios 1, 7)

RESUMO

VITAL, D. V. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos bioisostéricos da nitrofurazona: variações de anéis (pirrol e 4-dimetilaminobenzil) e cadeias laterais (semicarbazona, tiosemicarbazona e aminoguanidina).** 2013. 99f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi*. Atualmente 7 a 8 milhões de pessoas encontram-se infectadas, e há 25 milhões de pessoas em áreas de risco de contaminação. A cada ano ocorrem 56.000 novos casos e, aproximadamente, 12.000 mortes por complicações oriundas da doença. É endêmica em 21 países da América do Sul, e pode ser encontrada, também, na América do Norte e Europa devido a processos migratórios. Somente dois fármacos estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox e o benznidazol, que são ativos somente na fase aguda e causam sérios efeitos adversos. Diante deste panorama, é eminente a necessidade de novos antichagásicos. A enzima cruzaina é a principal cisteína-protease presente no *T. cruzi*, é importante para a sobrevivência, diferenciação e entrada do parasita no hospedeiro, se apresentando como um excelente alvo biológico na busca de novos quimioterápicos. Derivados de semicarbazona, tais como o nitrofural e o hidroximetilnitrofural demonstraram atividade inibitória da cruzaina, sendo considerados protótipos na busca de antichagásicos. Utilizando estratégias modernas de planejamento de fármacos por meio da integração entre técnicas computacionais, modelagem molecular e *docking*, e experimentais, síntese e ensaios biológicos, realizou-se neste trabalho o planejamento, síntese e avaliação biológica de bioisómeros do nitrofural como candidatos à antichagásicos. Aplicou-se estudos de modelagem molecular e *docking* para 10 compostos derivados de aminoguanidina, semi e tiosemicarbazona; observamos nesses estudos que os compostos contendo tiosemicarbazona apresentaram resultados mais favoráveis ao mecanismo de ação proposto, o qual sugere-se um ataque nucleofílico do resíduo de Cys25 presente no sítio catalítico da enzima cruzaina à tiocarbonila presente nesses compostos. Obtiveram-se através da síntese, 6 compostos caracterizados por RMN ^1H e ^{13}C . Tais compostos foram submetidos a ensaios de inibição da cruzaina, sendo que os derivados 6, 9 e 10, apresentaram um perfil de inibição favorável em dose de 100 μM , com valores entre 70 e 75% de inibição. Em ensaio de inibição de crescimento celular em formas epimastigotas do *T. cruzi* o composto 9 apresentou um IC_{50} de 19,8 μM , sendo o melhor protótipo para desenvolvimento de um novo agente antichagásico. De uma maneira geral os resultados obtidos nos ensaios biológicos corroboram com os dados apresentados na modelagem molecular, uma vez que os compostos contendo a cadeia lateral tiosemicarbazona mostraram melhores resultados em ambos os testes, demonstrando que a integração entre técnicas computacionais e experimentais se apresenta como uma excelente estratégia na busca de novos agentes antichagásicos.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, cruzaina, planejamento de fármacos, modelagem molecular, *docking*.

ABSTRACT

VITAL, D. V. **Design, synthesis and biological evaluation of analogues bioisosteric the nitrofurazone: semicarbazide derivatives, thiosemicarbazide and aminoguanidine.** 2013. 99f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Chagas disease is an infection caused by the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*. Currently 7 million to 8 million people are infected, and there are 25 million people in areas at risk of contamination, with 56,000 new cases each year and roughly 12,000 deaths are related to Chagas' complications. It is endemic in 21 countries in South America, and can also be found in North America and Europe due to migration processes. Only two drugs are available for treatment of Chagas disease, nifurtimox and benznidazole, which are active only in the acute phase and cause serious adverse effects. Against this background, it is imminent need for new antichagasic. The enzyme cruzain is the major cysteine protease present in the *T. cruzi*, is important for the survival, differentiation and entry of the parasite in the host, presenting itself as an excellent biological target in the search for new chemotherapeutic agents. Semicarbazone derivatives, such as nitrofurazone and hydroxymethylnitrofurazone showed inhibitory activity cruzain being considered prototypes in search antichagasic. Using modern drug design strategies through the integration of computational techniques, molecular modeling and docking, and experimental synthesis and biological assays. In this work were performed design, synthesis and biological evaluation of the bioisosters nitrofurazone as candidates for antichagasic. Were applied molecular modeling and docking studies for ten derivatives compounds of aminoguanidine, semi and thiosemicarbazone. In these studies thiosemicarbazone derivatives compounds showed more favorable for the mechanism of action proposed, that suggest a nucleophilic attack of the Cys25 residue present in the catalytic site of the enzyme cruzain in the thiocarbonyl group. Six compounds were synthesized and characterized by ¹H and ¹³C NMR. These compounds were tested for inhibition of cruzain, and derivatives 6, 9 and 10 showed favorable enzyme inhibition at single dose of 100 µM, with values between 70 and 75%. In the inhibition assay of cell growth in epimastigotes forms of *T. cruzi*, the compound 9 showed an IC₅₀ of 19.8 µM, the best prototype for the development of a new antichagasic agent. In general the results obtained by biological assay corroborate the data presented in molecular modeling, since compounds containing side chain thiosemicarbazone showed better results in both tests, showing that the integration of experimental and computational techniques is presented as a excellent strategy in the search for new agents antichagasic.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, cruzain, drug design, molecular modeling, docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Triatoma infestans</i>	19
Figura 2. Formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 3. Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	21
Figura 4. Estrutura dos fármacos nifurtimox e benznidazol.....	25
Figura 5. Mecanismo de ação proposto para os fármacos Benznidazol e Nifurtimox.....	26
Figura 6. Estrutura do nitrofural.....	30
Figura 7. Estrutura do hidroximetilnitrofural.....	31
Figura 8. Ataque nucleofílico do resíduo de Cys25 presente na cruzaina à tiocarbonila presente na tiossemicarbazona. Proposta de interação entre a tiocarbonila e a Cys25 da cruzaina.....	32
Figura 9. Estruturas obtidas por estudos de modelagem molecular do NF e do NFOH apresentando a distribuição pontual de cargas por átomo (eV) e distribuição de LUMO.....	33
Figura 10. Estruturas dos compostos propostos no estudo.....	41
Figura 11. Esquema geral dos análogos planejados e numerados de 1 a 10.....	51
Figura 12. Estruturas dos compostos 1-4 propostos no estudo, obtido por modelagem molecular. A) Composto de menor energia; B) MEP; C) LUMO. Escala de cores: região vermelha mais negativa; região azul mais positiva.....	53
Figura 13. Estruturas dos compostos 5-7 propostos no estudo, obtido por modelagem molecular. A) Composto de menor energia; B) MEP; C) LUMO. Escala de cores: região vermelha mais negativa; região azul mais positiva.....	55
Figura 14. Estruturas dos compostos 8-10 propostos no estudo, obtido por modelagem molecular. A) Composto de menor energia; B) MEP; C) LUMO. Escala de cores: região vermelha mais negativa; região azul mais positiva.....	56
Figura 15. Estrutura cristalizada da cruzaina contendo seus respectivos bolsos de interação.....	57
Figura 16. Proposta de interação entre o composto 3 e 4 e a cruzaina. Hidroxila presente nas moléculas fazendo ligação com a Gly66 e favorecendo a interação do grupo guanidina com a Cys25.....	58

Figura 17. Proposta de interação entre o composto 1 e 2 e a enzima cruzaina. Interação entre a porção hidrofóbica (anéis pirrol e imidazol e grupo nitro) do composto e o bolso S2 da enzima.....	59
Figura 18. Proposta de interação do composto 5 e 6 com a enzima cruzaina.....	60
Figura 19. Estrutura do bioisótero da semicarbazona (composto 7) no sítio de ligação da cruzaina. E, resíduo de Glu205 interagindo com amina terminal do composto.....	61
Figura 20. Estrutura dos compostos 8, 9 e 10 no sítio de ligação da cruzaina. Interações com os resíduos de Gly66 e Glu205.....	62
Figura 21. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 5 (derivado da aminoguanidina).....	64
Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 5 (derivado da aminoguanidina).....	65
Figura 23. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 6 (derivado da tiossemicarbazona).....	66
Figura 24. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 6 (derivado da tiossemicarbazona) ampliado.....	67
Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 6 (derivado da tiossemicarbazona).....	68
Figura 26. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 7 (derivado da semicarbazida).....	69
Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 7 (derivado da semicarbazida).....	70
Figura 28. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, MetOH- d_4 , δ ppm) do composto 8 (derivado da aminoguanidina).....	71
Figura 29. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 9 (derivado da tiossemicarbazida).....	72
Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 9 (derivado da tiossemicarbazida).....	73
Figura 31. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 10 (derivado da semicarbazida).....	74
Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 10 (derivado da semicarbazida).....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos compostos 5 a 10.....	63
Tabela 2 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 5 (derivado da aminoguanidina).....	64
Tabela 3 – Atribuições de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 5 (derivado da aminoguanidina).....	65
Tabela 4 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 6 (derivado da tiossemicarbazona).....	67
Tabela 5 – Atribuições de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 6 (derivado da tiossemicarbazona).....	68
Tabela 6 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 7 (derivado da semicarbazida).....	69
Tabela 7 – Atribuições de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 7 (derivado da semicarbazida).....	70
Tabela 8 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, MetOH- d_4 , δ ppm) do composto 8 (derivado da aminoguanidina).....	72
Tabela 9 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 9 (derivado da tiossemicarbazida).....	73
Tabela 10 – Atribuições de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 9 (derivado da tiossemicarbazida).....	73
Tabela 11 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 10 (derivado da semicarbazida).....	74
Tabela 12 – Atribuições de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 10 (derivado da semicarbazida).....	75
Tabela 13 - Resultados de inibição enzimática contra enzima cruzaina de <i>T. cruzi</i>	76
Tabela 14 - Resultados dos ensaios de inibição de crescimento celular.....	78

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Síntese do análogo da tiossemicarbazona.....	45
Esquema 2 - Síntese do análogo da aminoguanidina sem grupo nitro.....	45
Esquema 3 - Síntese do análogo da semicarbazona.....	46
Esquema 4 - Síntese dos análogos contendo anel 4-dimetilaminobenzaldeído e aminoguanidina.....	47
Esquema 5 - Síntese dos análogos contendo anel 4-dimetilaminobenzaldeído e tiossemicarbazida.....	48
Esquema 6 - Síntese dos análogos contendo anel 4-dimetilaminobenzaldeído e semitarbazida.....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	17
2.2 DOENÇA DE CHAGAS.....	17
2.2.1 <i>Transmissão</i>	18
2.2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
2.2.3 <i>Patologia e Diagnóstico</i>	22
2.2.4 <i>Quimioterapia</i>	24
2.3 ALVOS BIOQUÍMICOS.....	26
2.3.1 <i>Cruzaína</i>	26
2.3.2 <i>Nitrofurais e Hidroximetilnitrofurais</i>	29
2.4 GÊNESE DE FÁRMACOS	33
2.4.1 <i>Modificação Molecular</i>	33
2.4.2 <i>Planejamento racional de fármacos</i>	35
3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 MATERIAL	42
4.1.1 <i>Reagentes e solventes</i>	42
4.1.2 <i>Equipamentos</i>	42
4.1.3 <i>Softwares para modelagem molecular</i>	42
4.2 MÉTODOS	43
4.2.1 <i>Modelagem Molecular</i>	43
4.2.2 <i>Estudos de Docking</i>	43
4.2.3 <i>Sínteses</i>	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR.....	51
5.1.1 <i>Estudo de modelagem molecular dos derivados bioisósteros propostos</i>	51
5.2 ESTUDOS DE DOCKING	56
5.2.1 <i>Estudo de docking dos derivados bioisósteros propostos</i>	56
5.3 SÍNTESES.....	63
5.3.1 <i>Síntese dos compostos 5-10</i>	63
5.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS	75
5.4.1 <i>Ensaio de inibição e cinética enzimática com a cruzaína de T. cruzi</i>	75
5.4.2 <i>Ensaio de inibição de crescimento celular</i>	77
6. CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma endemia infecciosa causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Recebeu este nome em homenagem ao seu descobridor, o médico brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro Chagas em 1909 (ANDREOLLO; MALAFAIA, 2009; FIOCRUZ, 2013; PAHO, 2013; WHO, 2013).

A via de transmissão mais conhecida é a vetorial, que se dá pela picada de insetos triatomíneos conhecidos como “barbeiros”. Outras vias de transmissão também são reportadas, porém menos frequentes, tais como transfusão sanguínea, transmissão placentária, transfusão de órgãos, acidentes laboratoriais e por alimentos contaminados com as fezes dos insetos (ANDREOLLO; MALAFAIA, 2009; FIOCRUZ, 2013; PAHO, 2013; WHO, 2013).

Sendo uma doença endêmica em 21 países, estima-se que as 7 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* e que outros 25 milhões de indivíduos se encontrem em áreas de risco. Segundo dados epidemiológicos, a doença apresenta 56.000 novos casos por ano, causando cerca de 12.000 mortes anuais devido a complicações decorrentes da doença (PAHO, 2013; WHO, 2013; WILLYARD, 2013).

A doença de Chagas apresentou inicialmente um aspecto rural, devido às habitações na forma de casas de taipa, geralmente utilizadas pela população que vive nessas regiões. Essas casas são ambientes propícios ao alojamento e reprodução dos insetos vetores. Porém, a crescente migração da população rural para as zonas urbanas proporcionou o aumento do risco de transmissão pelas vias menos frequentes como, por exemplo, a transfusão sanguínea. Devido à mudança no perfil do doente, à transmissão e ao alto índice de migração, a doença de Chagas, que anteriormente era considerada um problema da América Latina, hoje se encontra em países da Europa e América do Norte, e se tornou um problema mundial de saúde pública (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; DIAS, 2007).

Desde a descoberta da Tripanossomíase americana, outro nome dado a doença de Chagas, compostos de diversas classes químicas foram testados na tentativa de encontrar fármacos para a doença, mas nenhum demonstrou eficácia para promover a cura dos indivíduos infectados (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; COURA; CASTRO, 2002; URBINA, 2010). Deste modo, os tratamentos

utilizados para esta parasitose ainda hoje se apresentam mais sintomáticos que etiológicos. Nesses tratamentos procura-se diminuir as manifestações da doença, principalmente os sintomas da insuficiência cardíaca congestiva (AGUIRRE et al., 2004; DOCAMPO; MORENO, 1985; DOCAMPO, 1990; GRINGAUZ, 1997; KOROKOLVAS, 2007; LA-SCALEA, 1998; URBINA, 2010).

Apesar de enormes esforços nas pesquisas de novos agentes antichagásicos, em sua maioria realizados academicamente, somente dois fármacos são utilizados especificamente para a doença, o Nifurtimox e o Benznidazol. Porém esses fármacos apesar de diminuírem a parasitologia, causam muitos efeitos adversos, atuam quase que exclusivamente na fase aguda, e por não serem eficazes em todos os tipos de cepa, não promovem a cura da doença, demonstrando a necessidade urgente da descoberta e desenvolvimento de novos agentes antichagásicos (AGUIRRE et al., 2004; DIAS et al., 2009; DOCAMPO; MORENO, 1985; DOCAMPO, 1990; GRINGAUZ, 1997; KOROKOLVAS, 2007; LA-SCALEA, 1998).

A pesquisa de novos agentes antiparasitários envolve a seleção e utilização de vias bioquímicas exclusivas de parasitas, tais como enzimas. Algumas enzimas são necessárias para a sobrevivência do *T. cruzi*, estas se apresentam como possíveis alvos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos seletivos (AGUIRRE et al., 2004; McGRATH et al., 1995; FERREIRA et al., 2011; SAJID, 2011). Dentre essas enzimas, as cisteíno-proteases se mostraram alvos de bastante interesse no desenvolvimento de novos quimioterápicos. A cruzaina é a principal cisteíno-protease presente no *T. cruzi*, essa enzima está envolvida em todos os estágios de desenvolvimento e diferenciação do parasita, além de promover modificações no sistema imune do hospedeiro, sendo assim um interessante alvo molecular para o planejamento de inibidores candidatos a novos fármacos (DEL NERY et al., 1997; DOYLE et al., 2011; FERREIRA et al., 2010; GEA et al., 2006; SAJID, 2011).

Em 1969, foi observado que o nitrofural, um agente antimicrobiano, destruía as formas intracelulares do *T. cruzi* em culturas de tecido. Mais tarde, constatou-se a inibição da enzima tripanotona redutase, enzima responsável pelo sistema de detoxificação presente no *T. cruzi*, por naftoquinonas e nitrofuranos, incluindo o nitrofural (ANDRADE; BRENER, 1969; HENDERSON, 1988). Em 1996, Chung observou que o derivado hidroximetilado do nitrofural, o hidroximetilnitrofural, era

mais ativo contra formas amastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*, e menos tóxico que seu precursor nitrofural (CHUNG et al., 2003; TROSSINI et al., 2010a).

Recentemente, foi demonstrada a atividade do nitrofural e do hidroximetilnitrofural frente à cruzaina. Sugeriu-se que esses compostos teriam ação pelo mecanismo proposto por Du e colaboradores (2002) a partir da interação com a Cys25, resíduo catalítico da cruzaina (TROSSINI, 2008; TROSSINI et al., 2010). Essa constatação despertou interesse no planejamento de novos agentes antichagásicos que atuem por esse mecanismo de ação. Deste modo, Trossini (2008), planejou e sintetizou uma série de análogos bioisotéricos do NF e NFOH, os quais apresentaram atividade inibitória da cruzaina (IC_{50} entre 2,7 e 22 μM).

No intuito de se planejar novos análogos, lançou-se mão da estratégia de modificação molecular, especificamente o bioisosterismo, que é uma técnica muito utilizada para o desenvolvimento de novos fármacos. Bioisósteros consistem em um grupo de moléculas as quais têm similaridade química e física e produzem efeitos biológicos similares ou antagônicos em um mesmo sítio receptor (BARREIRO; FRAGA, 2008; MEANWELL, 2011; PATANI; LAVOIE, 1996; WERMUTH, 2008).

O planejamento de fármacos consiste na aplicação das bases moleculares da ação de um composto com seu alvo bioquímico. Uma característica comum dessa estratégia é a utilização da química computacional, que aplica a química teórica, cálculos físicos e a computação gráfica em simulações que possibilitam a visualização tridimensional, o estudo de interações ligante-receptor, cálculo de propriedades estereoeletrônicas, entre outras, que favorecem o desenvolvimento de um novo fármaco de maneira mais rápida e com menor custo (WERMUTH, 2008).

Desta maneira, realizou-se neste estudo a integração da química computacional e a estratégia de bioisosterismo no planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos do nitrofural e do hidroximetilnitrofural, visando a obtenção de novos agentes antichagásicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças Negligenciadas

As doenças tropicais são, ainda hoje, as maiores responsáveis por incapacitar e levar milhões de indivíduos à morte em todo o mundo. Causadas por agentes infecciosos e parasitários como vírus, bactérias, protozoários e helmintos, essas doenças são prevalentes em populações de baixa renda que vivem em países em desenvolvimento. São conhecidas, também, como doenças negligenciadas, pois possuem grande relevância médica, sem ter a devida atenção dos governos e indústrias farmacêuticas (DNDi, 2013; INCT-IDN, 2013; WILLYARD, 2013). Esse fato se dá devido a essas doenças afetarem, em sua maioria, a população mais pobre e de países em desenvolvimento, diminuindo o retorno financeiro e inviabilizando a pesquisa por parte das indústrias farmacêuticas (WILLYARD, 2013). Prova disso é que somente 1,3% dos novos medicamentos introduzidos na terapêutica entre 1975 e 2004 foram direcionados a esse tipo de doença (DNDi, 2013).

Desta maneira, as doenças negligenciadas se apresentam como um sério problema de saúde pública, representando 11,4% das doenças mundiais. Dentre as doenças negligenciadas podem ser citadas, a malária, as leishmanioses, a filariose linfática, a dengue, a tuberculose e a esquistossomose (DNDi, 2013; INCT-IDN, 2013). Outras doenças ainda foram denominadas doenças extremamente negligenciadas, sendo elas a doença do Sono, também conhecida como tripanossomíase humana africana (THA), a leishmaniose visceral (LV), e a doença de Chagas ou tripanossomíase americana. Estas doenças, apesar de acometerem mais de 500 milhões de pessoas, receberam menos de 5% dos investimentos mundiais em inovação (DNDi, 2013).

2.2 Doença de Chagas

Em 1909, o médico brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, descobriu uma doença que acometia humanos, causada por um protozoário hemoflagelado, o qual denominou *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao seu companheiro de

trabalho Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, 2013; NETO; PASTERNAK, 2009). Posteriormente, essa doença recebeu o nome de Doença de Chagas, em homenagem a seu descobridor (URBINA, 2011). A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é endêmica em 21 países. Em 2013, estimou-se que 7 a 8 milhões de pessoas estivessem infectadas pelo parasita e que outros 25 milhões de indivíduos se encontrassem em áreas de risco. Segundo dados epidemiológicos, ocorrem 56.000 novos casos por ano. O número de mortes anuais por complicações decorrentes da doença é de aproximadamente 12.000 (PAHO, 2013; WHO, 2013).

A mudança no perfil epidemiológico da doença de Chagas teve grande influência dos processos migratórios da população, que se deslocou das zonas rurais para zonas urbanizadas. Quando a prevalência da doença era rural, relacionava-se o alto índice de contaminação à utilização de casas de taipa como moradia, o que propiciava o alojamento e a procriação dos insetos vetores. Com a chegada de pessoas infectadas às cidades, houve um espalhamento do número de infectados e o risco de transmissão pelas vias menos frequentes como transfusão sanguínea. Processos migratórios internacionais, promovidos em especial pela globalização, levaram focos da doença para outros continentes. Deste modo, a doença de Chagas que era considerada um problema da América Latina, hoje se encontra em vários países, tornando-se um problema de saúde pública mundial (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; DIAS, 2007; URBINA, 2010).

2.2.1 Transmissão

Apesar das mudanças no perfil da doença de Chagas, ainda hoje se considera como principal via de transmissão a vetorial, que se dá pela picada de insetos triatomíneos hematófagos, conhecidos como “barbeiros” (*Triatoma infestans* – Figura 1) devido o inseto picar os indivíduos na face. Esses insetos, durante a picada, depositam no local fezes contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*; a penetração dessas formas parasitárias causa infecção no indivíduo picado (FIOCRUZ, 2013; NETO; PASTERNAK, 2009; WHO, 2013). Apesar de o *Triatoma infestans* ser o principal vetor, há outras espécies de triatomíneos:

Pastronylus megistus, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* (URBINA; DO CAMPO, 2003).

Figura 1 – *Triatoma infestans*

Fonte: <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/Imagens/f-hemi11c.jpg>

As principais formas de controle da transmissão vetorial consistem na dedetização, por processos químicos aplicados nas moradias, com a finalidade de exterminar o inseto. Outra estratégia é a melhoria das moradias rudimentares, por meio da construção de casas de alvenaria, assim impedindo a instalação do vetor (ANDREOLLO; MALAFAIA, 2009; DIAS, 2007; NETO; PASTERNAK, 2009).

As duas segundas maiores vias de transmissão são transfusão sanguínea e congênita, pois estão relacionadas às zonas urbanas, onde o risco de infecção pelo vetor é menor ou nulo (RASSI; RASSI; REZENDE, 2012). Tal fator levou as autoridades de saúde a uma seleção mais apurada dos doadores nos bancos de sangue, uma vez que o risco de infecção é de 10 a 20% durante a transfusão de uma bolsa de sangue de um indivíduo infectado. Já a transmissão pela via congênita tem prevalência de aproximadamente 5% nos países endêmicos, e de 1-2% nos países menos afetados (DIAS, 2007; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

Outras vias de transmissão também são reportadas, porém menos frequentes, tais como transfusão de órgãos, acidentes laboratoriais, leite materno e ingestão de sucos (cana e açaí) contaminados com formas tripomastigotas. Esses alimentos tiveram o vetor triturado ou foram contaminados com suas fezes durante preparo do suco (ANDREOLLO; MALAFAIA, 2009; FIOCRUZ, 2013; NETO; PASTERNAK, 2009; PAHO, 2013; WHO, 2013).

Em 2006, o Brasil recebeu da OPS/OMS (Organização Pan- Americana da Saúde) uma certificação em que era considerado o primeiro país da América Latina

a erradicar a transmissão pelo barbeiro e pela transfusão sanguínea (GARCIA, 2009; DIAS, 2006).

2.2.2 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (Figura 2) é um parasito da ordem dos Kinetoplastida, pertencente à família Trypanosomatidae Kent. Essa família compreende vários gêneros importantes, porém o mais importante é o gênero *Trypanosoma*, causador de diversas doenças humanas, entre elas a doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e a doença do sono (*Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense*) (FIOCRUZ, 2013).

Figura 2 – Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=69>

O gênero *Trypanosoma* foi dividido em dois importantes grupos, o primeiro grupo conhecido como **Stercoraria** e o segundo grupo chamado de **Salivaria**. O *T. cruzi* se enquadra no grupo **Stercoraria**, por seus tripanossomos se desenvolverem no tubo digestivo do inseto vetor e serem liberados por suas fezes (FIOCRUZ, 2013).

São parasitos flagelados, os quais se originam de uma abertura chamada bolsa flagelar; também contém uma estrutura paraflagelar e uma proeminente. Essa estrutura chamada **cinetoplasto** é uma condensação do DNA, o qual está localizado no interior de uma única mitocôndria e ramificado por todo o corpo do parasito (FIOCRUZ, 2013).

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida (Figura 3) com alterações morfológicas e funcionais complexas, uma vez que seus vários estágios se alternam entre divisão

binária, formas que não se replicam e formas infectantes. Desenvolve-se em mamíferos, animais silvestres e domésticos, e nos vetores (invertebrados) (FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

Fonte: http://www.cdc.gov/parasites/images/chagas/amertryp_lifecycle.gif

O vetor triatomíneo ao picar e sugar o sangue de um indivíduo ou animal infectado pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, também se infecta. Essas formas se diferenciam nas formas multiplicativas (epimastigotas), que por fim se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (processo chamado metaciclogênese) no intestino do inseto. Este inseto infectado, ao picar a pele do indivíduo, deixa no local da lesão suas fezes que estão infectadas pelas formas tripomastigotas metacíclicas (formas infectantes). As quais não conseguem penetrar a pele intacta do hospedeiro, mas somente quando há lesão, ou pela mucosa (FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

As formas tripomastigotas metacíclicas (formas extremamente infectantes), invadem essa lesão e adentram células como macrófagos, epiteliais e fibroblastos. As tripomastigotas metacíclicas se proliferam e se transformam dentro das células hospedeiras em amastigotas (por divisão binária); nessa fase há o crescimento do flagelo e se transformam em tripomastigotas (FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

Essas formas, por sua vez, podem invadir novas células, ou causar a lise celular e invadir os tecidos adjacentes, se espalhando através do sistema linfático e sanguíneo para os órgãos mais distantes como músculos cardíacos, lisos e esqueléticos e células ganglionares, fazendo novamente a multiplicação celular. Assim, o ciclo evolutivo está completo (FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

O tipo de infecção e a rapidez com que acontece dependem do tipo de cepa de *T. cruzi* e do hospedeiro infectado (FIOCRUZ, 2013). O *T. cruzi* possui vários tipos de cepas (também chamadas populações); são protozoários muito heterogêneos com relação às suas propriedades biológicas e epidemiológicas. Essa heterogeneidade confere ao *T. cruzi* diferenças na virulência, cinética de crescimento, tropismo tissular, resistência aos fármacos e grau de transmissão via vetorial (FAMPA; SANTOS; RAMIREZ, 2010; FIOCRUZ, 2013).

Devido à grande variedade de populações de *T. cruzi*, alguns estudos com marcadores de RNA ribossômico e genes de mini-exon, classificaram a divisão das cepas em dois grandes grupos filogenéticos (*T. cruzi* I - TCI e *T. cruzi* II - TCII).

Alguns pesquisadores investigaram a distribuição epidemiológica desses grupos e verificaram que o grupo TCI predomina no ambiente silvestre, enquanto que o grupo TCII é mais frequente no ambiente doméstico (FAMPA; SANTOS; RAMIREZ, 2010; FIOCRUZ, 2013).

2.2.3 Patologia e Diagnóstico

A doença de Chagas se apresenta em duas fases: fase aguda ou inicial, e fase crônica (FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

Devido à baixa parasitemia durante a infecção por *T. cruzi*, a fase aguda é caracterizada por ser assintomática. Os sinais podem aparecer entre 8-10 dias e, no caso de infecção por transfusão sanguínea, os sinais levam 20-40 dias até o aparecimento (COURA, 2007; FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

Na infecção aguda ocorre o aparecimento de reações inflamatórias localizadas, no local de penetração do parasita. Nesta região, tem-se a presença de um edema subcutâneo caracterizado pelo sinal de Romaña ou chagoma cutâneo,

primeiro sinal para diagnóstico (COURA, 2007; FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

Ainda, pode ocorrer a disseminação do parasita pelos sistemas linfático e sanguíneo, levando a inflamação aos tecidos musculares, nos quais as células mononucleares e pseudocistos se rompem, causando granulomas. Isto ocorre, principalmente, nos tecidos cardíaco e ganglionares (COURA, 2007; FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

O tecido mais afetado é o miocárdio, com grande quantidade de células parasitadas. É na fase aguda que se iniciam os danos ao coração, começando com miocardite aguda, hipertrofia das fibras e aumento das cavidades cardíacas, além da redução no número de neurônios (COURA, 2007; FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

Para detecção da doença, na fase aguda, um eletrocardiograma (ECG), pode mostrar taquicardia e bloqueio atrioventricular. Já uma radiografia pode apresentar o aparecimento de cardiomegalia. Testes imuno-histológicos são utilizados para avaliar a carga parasitária em cada órgão (COURA, 2007; FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

A fase crônica se inicia 2-3 meses após a fase aguda. Uma fase chamada intermediária, que é assintomática, é apresentada por 60-70% dos indivíduos infectados. Já 30-40% dos pacientes desenvolvem a fase crônica cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva que pode abranger um período de 10-30 anos após a fase inicial (RASSI; RASSI; REZENDE, 2013).

Na fase cardíaca crônica, ocorre ampla destruição nos neurônios cardíacos, com formação de edema, e presença de trombos, fibrose e arritmia. No ventrículo esquerdo, ocorre uma lesão muito característica, uma atrofia das fibras miocárdias, com afunilamento da ponta do ventrículo. Dificilmente se encontram parasitas nessa fase pelos métodos histológicos (COURA, 2007; FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

A lesão no ventrículo esquerdo leva a uma alteração no estímulo elétrico, ocasionando arritmia. A dilatação nas cavidades cardíacas e a inflamação fazem com que os trombos formados gerem infartos (COURA, 2007; FIOCRUZ, 2013; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

Na fase crônica, têm-se, ainda, aparecimento do megaesôfago e do megacólon. Nessa fase há comprometimento do sistema nervoso autônomo,

levando à falta de coordenação motora; ocorre também a hipertrofia muscular e a dilatação desses órgãos. Pode haver o aparecimento de câncer, sendo a maior complicação dessa fase, principalmente no esôfago. Apenas, 10-15% dos infectados desenvolvem os “megas”, e esses ocorrem somente no Brasil, Argentina, Chile e Bolívia; isso se dá devido às diferentes cepas de *T. cruzi* (RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

As principais características do megaesôfago são disfagia, regurgitação, dor esofágica e má nutrição, que ocorre com a progressão da doença. Já no megacólon os principais sintomas são: constipação e cólica abdominal (RASSI; RASSI; REZENDE, 2012).

2.2.4 Quimioterapia

A partir do ano de 1962, alguns agentes quimioterápicos se destacaram como agentes antichagásicos, dentre eles antibióticos e nitrofuranos (COURA; CASTRO, 2002). Essa afirmação foi comprovada por Brener em 1968, que, ao avaliar biologicamente fármacos já testados contra o *T. cruzi*, concluiu que a maioria não era efetiva, porém verificou que os mesmos antibióticos e nitrofuranos apresentavam diminuição na parasitemia (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; COURA; CASTRO, 2002).

Entre os anos de 1952 e 1957, Packhanian em estudos com nitrofuranos, descobriu que o composto nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) quando administrado a camundongos infectados com *T. cruzi* na dose de 100 mg/kg/dia por 53 dias, causava a cura de mais de 90% desses animais (COURA; CASTRO, 2002; DIAS et al., 2009).

A partir de então, vários testes foram realizados em indivíduos infectados por *T. cruzi* que se encontravam na fase aguda da doença. Porém, na maioria dos casos, as pessoas apresentaram efeitos adversos graves e, alguns pacientes mesmo após o tratamento ainda mostravam sorologia positiva (COURA; CASTRO, 2002).

Desde 1970 até hoje, o tratamento utilizado é mais sintomático que etiológico. Do ponto de vista sintomático, procura-se amenizar as diversas manifestações da doença, por meio da administração de diuréticos para o tratamento da insuficiência

covalente entre o radical nitro formado e as macromoléculas de *T. cruzi* (DIAS et al., 2009; MORENO, 1983; LA-SCALEA, 2009).

Todavia, esses fármacos não são específicos, pois agem também no organismo do hospedeiro. Esse fato leva a efeitos adversos graves como mencionado acima.

Figura 5 – Mecanismo de ação proposto para os fármacos Benznidazol e Nifurtimox

Fonte: DIAS et al., 2009

2.3 Alvos Bioquímicos

A identificação e caracterização de vias metabólicas essenciais à sobrevivência de parasitas e a seleção de enzimas-chave são bases fundamentais para o planejamento de novos agentes quimioterápicos (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

Os conhecimentos sobre os aspectos biológicos, evolucionários, genéticos e o sequenciamento do genoma do *T. cruzi*, foram essenciais para a descoberta de diversos alvos biológicos presentes no parasita, em sua maioria enzimas, as quais estão sendo amplamente utilizadas para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos que atuem seletivamente no parasita (DIAS et al., 2009).

2.3.1 Cruzaína

As proteases presentes nos parasitas desempenham papel fundamental na relação parasita-hospedeiro, e são importantes para a replicação, metabolismo e

patologia. Com isso, a caracterização de vias metabólicas essenciais à sobrevivência de parasitas é fundamental para o planejamento racional de novos agentes quimioterápicos (CASTRO et al., 2011; DUSCHAK; COUTO, 2007; FERREIRA et al. 2011; McGRATH et al., 1995; McKERROW; McGRATH; ENGEL, 1995; O'BRIEN et al., 2008; SAJID et al., 2011; URBINA; DOCAMPO, 2003).

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo e várias enzimas são necessárias para a sua sobrevivência. Essas enzimas vêm sendo descobertas e estão se apresentando como promissores alvos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos potentes e seletivos, uma vez que não estão presentes no hospedeiro (AGUIRRE et al., 2004; McGRATH et al., 1995).

Dentre essas enzimas, as cisteíno-proteases se mostraram alvos de bastante interesse no desenvolvimento de novos quimioterápicos. Apresentam um resíduo de cisteína (Cys) em seu sítio catalítico e hidrolisam proteínas através do ataque nucleofílico ao carbono carbonílico de uma ligação peptídica (McKERROW; ENGEL; CAFFREY, 1999; VERMELHO et al., 2010; SAJID; McKERROW, 2002).

A cruzipaina (EC 3.4.22.51) é a mais importante cisteíno-protease presente no *T. cruzi*, pertence à superfamília de proteases parasitárias denominadas “*papaína-like*”, mas contém uma porção C-terminal que não é comum. A enzima é biossintetizada pelo parasita e, em seguida, é clivada na porção N-terminal do pró-domínio para gerar a enzima madura. Essa enzima madura contém uma porção catalítica altamente semelhante à Cathepsina L, que se situa no N-terminal (DEL NERY et al., 1997; GEA et al., 2006).

A cruzipaina também é conhecida como cruzaina, esta é a forma recombinante da enzima, a qual em estudos realizados por Alves em 2001, apresentou aspectos cinéticos idênticos a enzima original do parasita. Como nos estudos realizados neste trabalho foi utilizada a forma recombinante, cruzaina, adotaremos esse nome no decorrer do texto.

Encontrada em todos os estágios evolutivos e cepas do *T. cruzi*, porém em localizações diferentes e desempenha funções específicas em cada estágio; a cruzaina se mostra importante para a sobrevivência do parasita, principalmente, na entrada na célula do hospedeiro. Nas formas epimastigotas, essa enzima se encontra em reservossomas (estruturas semelhantes aos lisossomas) é altamente expressada; nas tripomastigotas, se encontra no bolso flagelar e nas amastigotas

intracelulares, está localizada na superfície da célula (GEA et al., 2006; SERVEAU et al., 1996; GILMOR et al., 1997).

Outra função da cruzaina está ligada a produção do peptídeo pró-inflamatório Lys-bradicinina, a partir da proteólise do cininogênio, ou pela ativação da pré-caliceína plasmática, ativando a cascata da caliceína. Essa capacidade de gerar cininas vasoativas pode diferenciar os diversos tipos de cisteíno-proteases do *T. cruzi*, o fator de virulência da doença de Chagas (CAZULLO; STOKA; TRUK, 2001; DEL NERY et al., 1997).

A cruzipaina é uma glicoproteína monomérica, com peso molecular de 60 kDa, ativada por β -mercaptoetanol ou glutatona reduzida (CAZZULO et al., 1990, CAZZULO; STOKA; TURK, 2001; DEL NERY et al., 1997; McGRATH et al., 1995).

Possui três sítios de glicosilação da asparagina, dois se encontram no domínio catalítico e um na porção do C-terminal, sendo que o sítio da porção C-terminal parece estar complexado com manose e oligossacarídeos (GEA et al., 2006). Sua tríade catalítica é preservada da família da papaína envolvendo os resíduos Cys25, His159 e Asn175; é composta por uma cadeia polipeptídica de 215 aminoácidos que ficam dentro de dois domínios constituídos por alfa-hélice e beta-folha. Entre os dois domínios, encontra-se uma fenda, na qual está localizado o sítio catalítico, contendo a tríade catalítica (CAZZULO; STOKA; TURK, 2001; DEL NERY et al., 1997; McGRATH et al., 1995; SAJID et al., 2011).

Por ser altamente expressa, há uma grande quantidade de isoformas da cruzaina, as quais apresentam massa molecular semelhante. Porém, estudos realizados com as isoformas Cz1 e Cz2 demonstraram que essas isoformas diferem quanto ao substrato (GEA et al., 2006).

Nas duas últimas décadas, com o aumento do conhecimento sobre a bioquímica e a estrutura da enzima, ela se tornou alvo de várias pesquisas com inibidores (SAJID et al., 2011).

Em 2001a, Alves e colaboradores, realizaram uma análise do subsítio S2 da cruzaina pois, como já descrito na literatura, esse subsítio é importante para a especificidade na enzima.

O subsítio S2 é capaz de fazer interação tanto com resíduos hidrofóbicos como com resíduos básicos na porção P2 do substrato ou do inibidor, devido à rotação do resíduo Glu205, presente no bolso S2. Esse resíduo Glu205 é capaz de se orientar em direção ao substrato quando o mesmo possui um resíduo básico, ou

em direção ao solvente quando o substrato possui um resíduo hidrofóbico (ALVES et al., 2001a). Já o subsítio S1, tem especificidade menos definida que o subsítio S2 e demonstrou preferência para substratos contendo grupos aromáticos e alifáticos com cadeia lateral curta, na porção P1 (ALVES et al., 2001b).

Jaishankar e colaboradores, (2008), a partir da técnica de modificação molecular, realizaram estudos de relação estrutura-atividade (SAR, *structure-activity relationships*) de compostos vinil-sulfônicos com atividade inibitória seletiva em cruzaina. As informações obtidas pelo grupo foram de grande importância para o planejamento de novos inibidores.

Problemas na biodisponibilidade oral de alguns inibidores levaram Du e colaboradores, (2002) a sintetizar derivados de tiossemicarbazonas com baixo IC₅₀, baixa toxicidade e propriedades físicas compatíveis com uma farmacocinética desejável como favorável Clog de P, baixo peso molecular, entre outras (DU et al., 2002).

Para o planejamento de inibidores seletivos de cruzaina, técnicas modernas de planejamento de fármacos estão sendo utilizadas, a fim de obter compostos mais ativos e menos tóxicos, utilizando a seletividade como fator crucial (JAISHANKAR et al., 2008). Entre as principais classes de compostos avaliados, as semi e tiossemicarbazonas, chalconas, isatinas, hidroximetilcetonas, acil-hidrazidas, tiazolil-hidrazonas, vinil-sulfonas, aril-uréias, macrociclos e complexos metálicos têm apresentado atividade inibitória frente a cruzaina (AGUIRRE et al., 2004, 2006; BORCHHARDT et al., 2009; BRAK et al., 2008; BRYANT et al., 2009; CHEN et al., 2008; DU et al., 2002; DUSCHAK; COUTO, 2007; HERNANDES et al., 2010; JAISHANKAR et al., 2008; SILES et al., 2006; TROSSINI et al., 2010b, CARVALHO et al. 2012, BLAU et al. 2013).

2.3.2 Nitrofural e Hidroximetilnitrofural

O nitrofural (NF - 5-nitro-2-furfurilidenossemicarbazona) (Figura 6) é um agente antimicrobiano, usado apenas em doenças infecciosas tópicas por causar muitos efeitos adversos. É um derivado de semicarbazona, sintetizado com base na atividade bacteriostática do ácido furóico e seus derivados, alquilados e mercuriais (DODD; STILLMAN, 1944).

Na II Guerra Mundial, esse composto foi utilizado por apresentar atividade antibacteriana e ter um amplo espectro, mas devido o aparecimento de resistência bacteriana, o espectro de atividade foi se modificando ao longo do tempo (CRENSHAW et al., 1976; KOROLKOVAS, 2007).

Andrade e Brener em 1969 observaram que o nitrofural destruía as formas intracelulares do *T. cruzi* em culturas de tecido. Em 1988, Henderson e colaboradores demonstraram a inibição da enzima tripanotona redutase por naftoquinonas e nitrofuranos, incluindo o nitrofural. Esses compostos demonstraram inibir irreversivelmente a enzima tripanotona redutase. São primeiramente reduzidos pela enzima e em seguida, oxidados através do oxigênio molecular, impedindo a enzima de reduzir o substrato natural, a partir da inibição enzimática (HENDERSON et al., 1988).

A partir do nitrofural, ocorre a formação de um intermediário tóxico – radical nitro aniônico que é responsável pelo mecanismo de ação tripanomicida do fármaco. Isto foi comprovado por meio de geração eletroquímica, com o uso de eletrodo de carbono vítreo e por espectroscopia de ressonância de spin de elétrons (LA-SCALEA; CHUNG; FERREIRA, 1999; LA-SCALEA et al., 2009; MORENO et al., 1983).

Em 1996, Chung e colaboradores desenvolveram a síntese de derivados peptídicos do nitrofural com a primaquina. Neste trabalho, foi verificado que o intermediário de síntese das bases de Mannich, o hidroximetilnitrofural (NFOH – Figura 7) (CHUNG et al., 2003), era mais ativo e menos tóxico do que o próprio nitrofural. Este se mostrou um composto promissor, pois além da atividade tripanomicida *in vitro*, teve a diminuição da toxicidade em quatro vezes, quando comparado ao seu precursor (CHUNG et al., 2003). Estes resultados despertaram grande interesse em estudos de mecanismo de ação e toxicidade desse composto (DAVIES et al., 2010; TROSSINI, 2008). De modo a ter uma melhor caracterização do hidroximetilnitrofural, determinou-se a estrutura cristalina deste derivado por

método de cristalografia de raios-X (DORIGUETTO et al., 2005). Outro estudo feito pelo mesmo grupo foi a otimização de síntese desse composto, buscando melhorar o rendimento de síntese do NFOH. Nesse estudo, utilizou-se técnicas quimiométricas, por meio de planejamento fatorial 3^2 , verificando-se o ponto de maior rendimento (88%) com 7,5 horas de reação (TROSSINI et al., 2010a).

Figura 7 - Estrutura do hidroximetilnitrofural

No ano de 2002, Du e colaboradores demonstraram a ação de derivados contendo semi e tiosemicarbazona na cruzaina. Nesse estudo foi sugerido o mecanismo de ação por meio de ligação covalente com a cruzaina a partir da interação da tiocarbonila presente nesses compostos com a Cys25 da cruzaina (Figura 8) (AGUIRRE et al., 2004; DU et al., 2002). Visto que o nitrofural e seu derivado hidroximetilnitrofural apresentam o grupo semicarbazona, o mesmo mecanismo foi proposto para eles (TROSSINI et al. 2010b).

Figura 8 – Proposta de mecanismo de ação dos derivados de tiossemicarbazona por meio do ataque nucleofílico do resíduo de Cys25 presente na cruzaina à tiocarbonila (DU et al. 2002).

Fonte: DU et al., 2002

A atividade inibitória da cruzaina pelo NF e NFOH foi demonstrada por Trossini e colaboradores em 2010b, obtendo valores de IC_{50} de $22,83 \pm 1,2 \mu M$ e $10,55 \pm 0,8 \mu M$, respectivamente. Foi sugerido que o NFOH apresentou uma maior atividade inibitória devido à sua maior deficiência eletrônica no carbono carbonílico, observada com estudos de modelagem molecular.

Na Figura 9, tem-se a carga pontual dos átomos e a distribuição de LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) do NF e do NFOH demonstrando a menor densidade eletrônica no carbono carbonílico do NFOH (0,58 para NF e 0,79 para o NFOH) e um maior lóbulo no NFOH. Essa maior deficiência eletrônica sugere um favorecimento no ataque da Cys25 ao carbono carbonílico (TROSSINI et al., 2010b).

Figura 9 - Estruturas obtidas por estudos de modelagem molecular do NF e do NFOH apresentando a distribuição pontual de cargas por átomo (eV) e distribuição de LUMO

Fonte: TROSSINI et al.,2010b

2.4 Gênese de Fármacos

O processo de introdução de fármacos na terapêutica foi se modificando ao longo das décadas principalmente devido a conhecimentos adquiridos e a inter e multidisciplinaridade. Antigamente, os fármacos eram introduzidos na terapêutica de uma forma empírica, como o uso de plantas medicinais, porém esse cenário foi se modificando e, cada vez mais, técnicas avançadas vêm sendo utilizadas como auxiliares no planejamento de fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2008; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

2.4.1 Modificação Molecular

A modificação molecular se apresenta como uma técnica promissora para o planejamento de novos fármacos (WERMUTH, 2008).

Os fármacos possuem, em sua estrutura, propriedades desejadas e indesejadas. Porém com técnicas de modificação molecular (por exemplo retirada, substituição ou introdução de grupos químicos) é possível fazer com que os protótipos tenham as propriedades indesejadas diminuídas e as desejadas destacadas. Assim, essas técnicas podem auxiliar na interação do fármaco com o receptor ou participar diretamente na atividade biológica (BARREIRO; FRAGA, 2008; RAUTIO et al.,2008).

2.4.1.1 Bioisosterismo

Bioisósteros são compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos que apresentam características topológicas, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes e têm a capacidade de apresentar propriedades biológicas análogas (agonistas ou antagonistas). Deste modo, o bioisosterismo é um método de modificação molecular muito utilizado no planejamento de novas moléculas biologicamente ativas (BARREIRO; FRAGA, 2008; LIMA; BARREIRO, 2005; MEANWELL, 2011; PATANI; LAVOIE, 1996; SILVERMAN, 2004; WERMUTH, 2008).

O desenvolvimento das teorias de Química Geral e propriedades dos elementos químicos deu origem ao conceito de isosterismo, de onde deriva o termo bioisosterismo. A fundamentação da teoria de isosterismo se iniciou com a verificação de que uma distribuição eletrônica periférica idêntica condicionava propriedades físico-químicas similares (PATANI; LAVOIE, 1996; WERMUTH, 2008).

O conceito de isosterismo se expandiu a partir da observação de que não apenas o número e os arranjos eletrônicos estavam relacionados às características e propriedades similares dos elementos químicos. Em 1932, Erlenmeyer e colaboradores consideraram como isósteros:

- Grupos de elementos presentes em uma mesma coluna da tabela periódica. Assim o silício torna-se isótero do carbono, o enxofre do oxigênio;
- Pseudoátomos, incluindo grupos que, à primeira vista, parecem totalmente diferentes, mas que na prática apresentam propriedades similares. Como exemplo, podem-se citar os pseudoalogênios ($\text{Cl} \cong \text{CN} \cong \text{SCN}$, entre outros);
- Anéis equivalentes. A equivalência entre $\text{CH}=\text{CH}-$ e $-\text{S}-$ expande o conceito para a analogia entre benzeno e tiofeno, por exemplo.

Friedman, em 1951, observou que os conceitos de isosterismo em fenômenos biológicos e de ação dos fármacos eram de grande utilidade, e criou o termo bioisosterismo. Por bioisosterismo entende-se grupo de moléculas que têm similaridade química e física e produzem efeitos biológicos similares ou antagônicos em um mesmo sítio receptor (BARREIRO; FRAGA, 2008; PATANI; LAVOIE, 1996; WERMUTH, 2008).

Posteriormente, em Burger's (2003), bioisosterismo foi dividido em:

- Bioisosterismo Clássico: que pode ser entendido pela definição de Erlenmeyer - átomos, íons ou moléculas que possuem camadas periféricas de elétrons idênticas, como exemplo os grupos da classificação periódica, univalentes, bivalentes e equivalentes anelares;
- Bioisoterismo não clássico: que tem, por definição, átomos ou grupos de átomos que apresentam disposição estérica e configuração eletrônica semelhante, por exemplo, $-\text{CO}-$ e $-\text{SO}_2-$, entre outros (SILVERMAN, 2004).

2.4.2 Planejamento de fármacos

O planejamento de fármacos consiste em um processo que integra métodos experimentais e computacionais, buscando a identificação e desenvolvimento de moléculas biologicamente ativas. Essa estratégia é baseada nas bases moleculares da terapêutica, utilizando modernas ferramentas estruturais, experimentais, sejam elas farmacológicas ou químicas, sendo elas bancos de dados contendo compostos reais ou virtuais, estruturas 3D dos alvos bioquímicos, química computacional, entre outros (BARREIRO; FRAGA, 2008; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

O planejamento de fármacos com base na estrutura do ligante ou do receptor é um processo utilizado para a obtenção de estruturas que tenham um efeito biológico esperado devido seu desenvolvimento "sob medida". Para isso, são utilizadas ferramentas computacionais, como o CADD – *Computer Assisted Drug Design*, que visa entender as relações entre estrutura química e atividade biológica com o auxílio de técnicas de modelagem molecular e *docking* (HOPFINGER, 1985).

2.4.2.1 Química computacional

Química computacional ou quimioinformática, é um conjunto de técnicas que utilizam métodos computacionais na resolução de problemas químicos. Essas técnicas se desenvolveram a partir dos anos de 1980 e têm se mostrado de grande importância em diversas áreas da química (GASTEIGER, 2006a).

Na química computacional, os métodos realizados são acompanhados por computadores para o processamento, visualização e tratamento de dados. Esses métodos utilizam recursos matemáticos, de mecânica clássica e de física quântica, e química teórica (GASTEIGER, 2006a, b; OLSSON; OPREA, 2001).

A partir de 1980, houve um grande avanço no desenvolvimento de programas e computadores, juntamente com avanços no conhecimento bioquímico sobre as bases moleculares das doenças, o que permitiu um avanço significativo na área de química medicinal computacional (ITAI et al., 1996). Novos programas foram desenvolvidos e isso aumentou a utilização da quimioinformática na academia e nas indústrias químicas e farmacêuticas (WERMUTH, 2008), auxiliando no desenho bi- e tridimensional de estruturas, na geração de banco de dados de compostos e de substâncias químicas, no armazenamento e recuperação dessas estruturas, no planejamento de síntese e na otimização de reações químicas, nos planejamentos por quimiometria, em métodos para estudo das relações quantitativas entre estrutura-propriedade e estrutura-atividade (QSPR e QSAR) ou não (SPR e SAR), na predição de atividade biológica de compostos, de reações químicas e de seus rendimentos, na simulação de espectros e na elucidação de estruturas, entre outros (GASTEIGER, 2006a, b).

Deste modo, a química computacional se mostra uma ótima ferramenta para a descoberta e planejamento de novos candidatos à fármacos.

Apesar desse enorme avanço, alguns problemas ainda são observados, tais como o valor agregado à aquisição de programas e de computadores suficientemente potentes. Por este motivo, a comunidade científica está unindo forças para a melhor utilização dos recursos em química computacional. Exemplo desse esforço é o *Virtual Computational Chemistry Laboratory (VCCLab* www.vcclab.org), projeto que envolve uma rede de laboratórios de informática em universidades europeias, que pode ser acessado pela Internet, disponibilizando ferramentas de química computacional sem custos, com o objetivo de calcular propriedades moleculares e descritores a serem utilizados em estudos SPR, SAR, QSPR e QSAR (TETKO et al., 2005).

2.4.2.1.1 Modelagem Molecular

Modelagem Molecular é um conjunto de ferramentas utilizadas para a construção, manipulação, visualização e análise de estruturas moleculares que são obtidas através de cálculos de propriedades físico-químicas por química computacional (BARREIRO et al., 1997; ITAI et al., 1996; SILVA, 2003).

A modelagem molecular permite o estudo de sistemas moleculares complexos, capazes de auxiliar no planejamento de novos fármacos, bem como de contribuir para a interpretação e a elucidação das relações entre estrutura química e atividade biológica (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Pode ser realizada de forma direta ou indireta. A forma direta é realizada quando se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico (receptor ou enzima), e se constroem ligantes com estruturas específicas, através do conceito chave-fechadura; essa estratégia também é conhecida como planejamento de fármaco baseado na estrutura do receptor (do inglês, *Structure-Based Drug Design - SBDD*). Já a abordagem indireta se dá quando a estrutura do alvo biológico não é conhecida, somente as estruturas químicas de compostos e suas atividades biológicas; tenta-se, então, obter parâmetros eletrônicos e estéricos, que elucidem as relações entre estrutura química e atividade biológica, em uma abordagem baseada no ligante, ou seja o planejamento de fármaco baseado na estrutura do ligante (do inglês, *Ligand-Based Drug Design*) (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008; GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2012; ITAI et al., 1996; SILVA, 2003).

Na modelagem molecular programas e algoritmos especializados são utilizados para calcular propriedades eletrônicas e topológicas de uma determinada molécula. Por meio desta técnica é possível calcular, por exemplo, conformação, carga, momento dipolo, entre outros. Os cálculos são realizados utilizando, basicamente, dois métodos físicos: a mecânica molecular e a mecânica quântica (PATRICK, 2013). Os resultados são apresentados no computador através de modelos moleculares, os quais são gerados por meio de equações matemáticas que sugerem posições e propriedades dos elétrons e dos núcleos, de acordo com o método usado (CARVALHO et al., 2003).

Na mecânica molecular, as equações são aplicadas ao núcleo sem considerar os elétrons. A molécula é vista como esferas (átomos) que são ligadas através de molas (ligações). As equações são derivadas da mecânica clássica e calculam as

interações e energias resultantes da deformação do comprimento, ângulo de ligação e energia torsional (PATRICK, 2013; RODRIGUES, 2001).

A mecânica molecular é um método rápido e exige menos tempo computacional quando comparado à mecânica quântica (PATRICK, 2013).

Diferentemente da mecânica molecular, na mecânica quântica as propriedades da molécula são calculadas considerando os elétrons e os núcleos, utilizam aproximações previamente estabelecidas experimentalmente (PATRICK, 2013). Os métodos na mecânica quântica são divididos em *ab initio* e semi-empírico, o primeiro método é mais rigoroso, porém necessita de maior tempo computacional e é utilizado apenas para pequenas moléculas. Já o segundo, é mais rápido e pode ser utilizado para moléculas maiores (PATRICK, 2013).

A escolha do método depende do problema a ser resolvido. A mecânica molecular é utilizada para minimização de energia, identificação de conformações mais estáveis entre outros. Já a mecânica quântica é utilizada para energia de orbital molecular, cálculos de cargas parciais, potencial eletrostático entre outros (PATRICK, 2013).

2.4.2.1.2 Docking (ancoramento)

Dentre os diversos métodos de modelagem molecular, a técnica de *docking* estuda a interação energética entre um ligante e um alvo biológico comparando as afinidades de ligação a partir de um cálculo de energia (LEACH, SHOICHET, PEISHOFF, 2006; WERMUTH, 2008).

Esta metodologia é amplamente utilizada no planejamento de novos candidatos à fármacos, tendo como função primária simular a posição correta e orientação do ligante na proteína alvo (SOTRIFER et al., 2000; KLEBE, 2006).

Os programas de *docking* são amplamente empregados na busca virtual (*virtual screening*) de novos ligantes, candidatos a fármacos. Atualmente, existem bancos de dados de moléculas químicas que possibilitam, através da busca virtual, a pesquisa e seleção rápida de ligantes para um determinado receptor. Como, em geral, os compostos com estruturas depositadas nesses bancos de dados estão disponíveis comercialmente, os compostos selecionados nessa estratégia podem

ser adquiridos e testados de modo a validar a busca realizada (FERREIRA et al. 2011; GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

Diversos programas de *docking* são utilizados atualmente, sendo esses capazes de gerar várias poses de encaixe para cada molécula estudada, com uma pontuação (*score*) respectivamente, com o intuito de avaliar qual a melhor pose encaixada no alvo, quantas ligações intermoleculares foram feitas, entre outros (PATRICK, 2013).

O algoritmo genético, método utilizado pelo programa GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) empregado nos estudos desse trabalho, utiliza o conceito de *crossover* (cruzamento) e mutações, nas quais as conformações “pais” são passadas para conformações “filhas”, e as melhores características são mantidas, deste modo a melhor pose/*score* é alcançada. No fim, obtém-se melhores resultados por passar características favoráveis de uma geração para a outra (SLIWOSKI et al., 2014).

O programa GOLD além do algoritmo genético faz o encaixe flexível de moléculas no sítio ativo do alvo, podendo ser utilizadas várias funções de *score*, escolhidas de acordo com a necessidade do cálculo (CCDC, 2011).

3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Face ao exposto e à escassez de alternativas quimioterápicas contra a doença de Chagas, é urgente a necessidade de novos antichagásicos.

O nitrofurais (NF), como já descrito, possui atividade antichagásica conhecida (ANDRADE; BRENNER, 1969). Primeiramente, sua ação foi relacionada com a enzima tripanotiona redutase (HENDERSON et al., 1988), a qual está envolvida no sistema antioxidante do parasita. Seu mecanismo de ação, por essa via, está relacionado à formação de radicais livres provenientes da presença de um grupo nitro-heterocíclico. Seu derivado hidroximetilado (NFOH) apresentou-se mais potente e menos tóxico (CHUNG et al., 2003). Dados que, foram recentemente comprovados pela ação destes compostos na inibição da cruzaina, principal cisteína-protease do *T. cruzi* envolvida em processos de desenvolvimento e diferenciação do parasito. (TROSSINI et al., 2010b).

Dentre as diversas técnicas de modificação molecular para a introdução de novos fármacos na terapêutica, o bioisosterismo tem se mostrado bastante promissor, visando à obtenção de moléculas com características físico-químicas semelhantes e propriedades biológicas iguais ou superiores (BARREIRO; FRAGA, 2008; LIMA; BARREIRO, 2005; MEANWELL, 2011; PATANI; LAVOIE, 1996; SILVERMAN, 2004; WERMUTH, 2008).

Com o objetivo de obter compostos candidatos a antichagásicos, o presente estudo utilizou a técnica de bioisosterismo no planejamento de derivados do NF e NFOH variando o heterocíclico (pirrol e imidazol) e a cadeia lateral (aminoguanidina, semi e tiossemicarbazona). De modo a avaliar a atividade inibitória da cruzaina e atividade contra o *Trypanosoma cruzi in vitro*, o presente estudo apresentou os seguintes objetivos gerais:

- Estudos de modelagem molecular e *docking* dos bioisósteros derivados do NF e NFOH;
- Síntese dos bioisósteros;
- Ensaios de inibição da cruzaina;
- Ensaios da atividade antichagásica *in vitro*.

Assim sendo, foram propostos, os seguintes derivados bioisostéricos:

Figura 10 – Estruturas dos compostos propostos no estudo

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1. Reagentes e solventes

ácido trifluoracético (Synth)	dimetilsulfóxido deuterado (Synth)
clorofórmio p.a. (Synth)	metanol deuterado (Synth)
hidróxido de potássio (Synth)	pirrol-2-carboxaldeído (Sigma)
acetona p.a. (Synth)	4-dimetilaminobenzaldeído (Sigma)
etanol p.a. e CLAE (Synth)	cloridrato de aminoguanidina (Sigma)
metanol p.a. e CLAE (Synth)	cloridrato de semicarbazida (Sigma)
acetato de sódio (Synth)	tiossemicarbazida (Sigma)

4.1.2 Equipamentos

Bomba de alto vácuo, modelo E2M5 EDWARDS
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz BUNKER (Advance DPX-300)
Rotaevaporador R-3 BUCHII
Workstations HP Z600 (Xeon X5650, HD 1Tb, NVIDIA Quadro 4000 1Gb)

4.1.3 Softwares para modelagem molecular

- GOLD (GOLD - *Protein-Ligand Docking*) V5.1 (CCDC Software Ltd.);
- Gaussian 03;
- GausView 4.0;
- PYMOL Viwer 1.5 (Delano Scientific LLC).

4.2 Métodos

4.2.1 Modelagem Molecular

Para os estudos de modelagem molecular foram utilizados os programas Gaussian 03 e GaussView 4.0 em computador PC Windows.

As estruturas dos compostos foram construídas no programa GaussView 4.0. Após a construção foram realizados passos de otimização por meio dos métodos semi-empírico PM3 e *ab initio* Hartree-Fock 3-21G, no programa Gaussian 03, a fim de otimizar tempo de cálculo. A segunda etapa foi a determinação de carga de ponto único (*single point*) pelo cálculo de energia para todos os modelos. A partir desses resultados, foram gerados os mapas de potencial eletrostático (MEPs – *Map Electrostatic Potential*) e a distribuição de LUMO (*The Lowest Unoccupied Molecular Orbitals*) para a análise das propriedades estereoeletrônicas dos compostos propostos.

4.2.2 Estudos de Docking

Os estudos de *docking* foram realizados no programa GOLD V5.1 (CCDC Software Ltd.) em computador PC Windows. Os seguintes passos foram seguidos:

A estrutura cristalográfica da cruzaina (pdb: 1ME4) foi extraída do banco de dados PDB (*Protein Data Bank*). Essa estrutura foi escolhida devido ter uma alta resolução 1,2 Å. A enzima foi preparada utilizando o módulo Hermes do programa GOLD V5.01 (CCDC Software Ltd.). Nessa etapa retirou-se o ligante co-cristalizado e as moléculas de água. Ressaltamos que todas as moléculas de água foram retiradas após análise e verificação que nenhuma delas estava envolvida na interação entre os resíduos catalíticos e o ligante co-cristalizado. Verificou-se também que não havia moléculas de água essenciais para manter a estrutura terciária da proteína.

Para realização dos estudos de *docking* foram utilizadas as estruturas dos bioisósteros propostos previamente otimizadas por método semi-empírico PM3 nos estudos de modelagem molecular.

A docagem foi realizada no programa GOLD V5.1 (CCDC Software Ltd.), utilizando como ponto central uma caixa de docagem de 10 Å a partir da Cys25. O procedimento foi realizado com 200% de eficiência, pelo algoritmo genético implementado no programa. A análise dos resultados foi realizada para as poses mais bem ranqueadas segundo a função de score GOLDScore, utilizando o programa Pymol Viwer 1.5. A análise foi feita buscando avaliar a interação dos ligantes com os bolsos do sítio ativo, suas características químicas e a proximidade do resíduo catalítico, que seria fundamental para o mecanismo de ação.

4.2.3 Sínteses

4.2.3.1 Síntese dos bioisómeros do NF sem grupo nitro

A síntese dos bioisómeros do NF, utilizando os anéis pirrol-2-carboxaldeído ou 4-dimetilaminobenzaldeído e as cadeias laterais tiossemicarbazida, aminoguanidina e semicarbazida foram realizadas de acordo com as metodologias descritas abaixo.

- Síntese do bioisómero do NF contendo anel pirrol e tiossemicarbazida

A reação do derivado foi realizada seguindo o esquema 1. Em um balão de 250 mL, foram adicionados 25 mL de etanol e 10 mmol de pirrol-2-carboxaldeído. Adicionaram-se 12 mmol de tiossemicarbazida e 0,1% de ácido trifluoracético (CF₃COOH – aproximadamente 1 gota) como catalisador. A reação foi mantida por 24 horas em temperatura ambiente e acompanhada por CCD utilizando sistema solvente CHCl₃. Após esse período, o produto foi filtrado a pressão reduzida, e lavado em pequena quantidade de água (10 mL) gelada. O produto obtido foi analisado por cromatografia em camada delgada e espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C.

Esquema 1 - Síntese do análogo da tiossemicarbazona

- Síntese do bioisótero do NF contendo anel pirrol e aminoguanidina

A reação com aminoguanidina foi realizada de acordo com o procedimento apresentado no esquema 2. A uma solução de etanol (25 mL) e pirrol-2-carboxaldeído (10 mmol), foram adicionados 12 mmol de cloridrato de aminoguanidina e 12 mmol de hidróxido de potássio (KOH). A reação permaneceu sob agitação magnética em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período foi adicionado 0,1% de CF_3COOH (1 gota) e a reação foi mantida nas condições já descritas, por 24 horas, e acompanhada por CCD utilizando sistema solvente CHCl_3 . O produto obtido foi filtrado a pressão reduzida e lavado utilizando água e metanol gelados. O produto obtido foi analisado por cromatografia em camada delgada e por análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C .

Esquema 2 - Síntese do análogo da aminoguanidina sem grupo nitro

- Síntese do bioisótero do NF contendo anel pirrol e semicarbazida

A síntese dos análogos da semicarbazona foi realizada, utilizando a metodologia descrita por Chandra; Kumar (2007) (esquema 3). Em um balão de 250 mL, foram adicionados 5 mmol de cloridrato de semicarbazida em 12 mL de água. Em seguida, foi adicionado o pirrol-2-carboxaldeído e CH_3COONa (5mmol) em 30 mL de etanol. A reação permaneceu sob agitação por 2 horas em temperatura ambiente. O experimento foi acompanhado por CCD utilizando sistema solvente CHCl_3 . O produto obtido foi filtrado a pressão reduzida e lavado utilizando água quente. Foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) e análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C .

Esquema 3 - Síntese do análogo da semicarbazona

- Síntese dos bioisósteros do NF contendo anel 4-dimetilaminobenzaldeído e aminoguanidina

A síntese foi realizada seguindo a metodologia descrita por Basu et al., 2011 (esquema 4). Em um balão de 250 mL, foram adicionados 5 mmol de cloridrato de aminoguanidina em 25 mL metanol e 5 mmol de acetato de sódio (CH_3COONa). Em seguida, foi adicionado o 4-dimetilaminobenzaldeído. A reação permaneceu sob refluxo por 6 horas, acompanhada por CCD utilizando sistema solvente CHCl_3 : Metanol (9 : 1). O produto obtido foi filtrado a pressão reduzida e lavado utilizando

etanol gelado. Foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) e por análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C .

Esquema 4 - Síntese dos análogos contendo anel 4-dimetilaminobenzaldeído e aminoguanidina

- Síntese dos bioisósteros do NF contendo anel 4-dimetilaminobenzaldeído e tiossemicabazida

A síntese foi realizada seguindo a metodologia descrita por Basu e colaboradores, 2011 (esquema 5). Em um balão de 250 mL, foram adicionados 5 mmol de tiossemicarbazida em 25 mL metanol. Em seguida, foram adicionados 5 mmol de 4-dimetilaminobenzaldeído. A reação permaneceu sob refluxo por 6 horas e foi acompanhada por CCD utilizando sistema solvente CHCl_3 . O produto obtido foi filtrado a pressão reduzida e lavado utilizando etanol gelado. O produto foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) e por análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C .

Esquema 5 - Síntese dos análogos contendo anel 4-dimetilaminobenzaldeído e tiossemicarbazida

- Síntese dos bioisósteros do NF contendo anel 4-dimetilaminobenzaldeído e semicabazida

A síntese foi realizada seguindo a metodologia descrita por Basu e colaboradores, 2011 (esquema 6). Em um balão de 250 mL, foram adicionados 5 mmol de cloridrato de semicarbazida em 25 mL metanol e 5 mmol de CH₃COONa. Em seguida, foram adicionados 5 mmol de 4-dimetilaminobenzaldeído. A reação permaneceu sob refluxo por 5 horas e foi acompanhada por CCD utilizando sistema solvente CHCl₃. O produto obtido foi filtrado a pressão reduzida e lavado utilizando etanol gelado. Foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) e por análise espectroscópica de RMN ¹H e ¹³C.

Esquema 6 - Síntese dos análogos contendo anel 4-dimetilaminobenzaldeído e semicarbazida

4.2.4 Ensaios Biológicos

4.2.4.1 Ensaios de inibição com a cruzaina de *T. cruzi*

Os compostos foram submetidos a ensaios de inibição seguindo metodologia descrita por Ferreira e colaboradores (2009), em colaboração com a Prof^a Dr. Rafaela Salgado Ferreira do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. A cruzaina (0,4 nM) previamente purificada, foi incubada em uma cubeta contendo tampão acetato de sódio (100 mM) em pH 5,5, 5 mM DTT e 0,01% ou 0,001% de Triton X-100 por 5 minutos em temperatura ambiente. O inibidor foi adicionado na cubeta, permanecendo por 5 minutos de incubação. Em seguida o substrato fluorescente 2,5 µM (cloridrato de Z-Phe-Arg-aminometilcumarina (Z-FR-AMC)) foi adicionado. A adição do substrato aumenta a fluorescência (355 nm excitação e 460 nm emissão) e esse aumento foi acompanhado por espectrofluorimetria por 5 min (espectrofluorímetro de microplaca, Molecular Devices, FlexStation). A atividade do inibidor foi medida pela fluorescência remanescente em relação ao controle.

4.2.4.2 Ensaios de inibição de crescimento celular

Os ensaios de inibição de crescimento celular foram feitos segundo metodologia descrita por Magdaleno e colaboradores (2009). E foi realizado em colaboração com o Prof^o Dr. Ariel Mariano Silber do Instituto de Ciências Biológicas/ USP.

O ensaio *in vitro* foi realizado contra as formas epimastigotas em fase de crescimento exponencial (aproximadamente 50×10^6 células/ mL). Essas células foram lavadas três vezes e ressuspensas em tampão fosfato por centrifugação. Em seguida, foram cultivadas em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*) contendo ou não os inibidores em diversas concentrações (0,1 a 1 mM) em 28°C. Em placas de 96 poços, foi inoculado $2,5 \times 10^6$ células/ mL em 200 µL de meio de cultura. O crescimento celular foi estimado por absorbância (leituras em 620 nm/ dia por dez dias) e esse valor foi transformado em densidade celular (células/ mL) em combinação com uma equação de calibração linear previamente obtida sob as mesmas condições ($R^2 = 0,9981$, $p < 0,05$). O IC_{50} foi determinado (concentração de inibidor que inibe o crescimento de 50% das células). Para controle da inibição de crescimento celular, foram adicionados 200 µM de rotenona e 0,5 µM de antimicina ao meio de cultura e foi realizado o crescimento em paralelo à todos os outros experimentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos de modelagem molecular

5.1.1 Estudo de modelagem molecular dos derivados bioisósteros propostos

O estudo de modelagem molecular foi realizado para os derivados propostos (Figura 11) em uma tentativa de avaliar, teoricamente, quais biosósteros estariam propícios a atuar como inibidores da cruzaina pelo mecanismo proposto por Du e colaboradores (2002). Esta avaliação foi realizada por meio da análise de mapa de potencial eletrostático e distribuição de LUMO.

Figura 11 – Esquema geral dos análogos planejados e numerados de 1 a 10.

X1	X2	Y	R1	R2	Composto
NH	C	NH	NO ₂	H	1
NH	N	NH	NO ₂	H	2
NH	C	NH	NO ₂	CH ₂ OH	3
NH	N	NH	NO ₂	CH ₂ OH	4
NH	C	NH	H	H	5
NH	C	S	H	H	6
NH	C	O	H	H	7

X	Composto
NH	8
S	9
O	10

O mecanismo de ação proposto para estes compostos é o ataque nucleofílico da Cys25, resíduo catalítico, da cruzaina ao carbono carbonílico da molécula (DU et al., 2002). A carbonila de derivados de semicarbazona se apresenta eletropositiva,

favorecendo esse mecanismo, como sugerido por Trossini e colaboradores, 2010b. Deste modo, avaliou-se a condição eletrônica dessa região para cada um dos análogos propostos.

5.1.1.1 Estudo de Modelagem Molecular realizado para os bioisósteros contendo nitro-heterocíclicos

Os MEPs demonstraram uma deficiência eletrônica na região do carbono ligado a guanidina (região azulada), indicando que seja uma região eletropositiva, como pode ser observado na Figura 12 b. Observa-se ainda que nos derivados não hidroximetilados a dimensão da região azulada é maior, sugerindo que esses derivados têm maior eletropositividade no grupo guanidina. Esse resultado sugere que essa porção dos compostos estaria disponível para o ataque nucleofílico da Cys25 da cruzaina.

Porém, ao analisarmos a distribuição de LUMO Figuras 12 c, observa-se que esta distribuição está deslocada para a região do grupo nitro-heterocíclico, se estendendo até a ligação dupla que está conjugada com o anel. Esses resultados sugerem que o carbono do grupamento guanidina não seria adequado para sofrer um ataque nucleofílico. Entretanto, os resultados teóricos obtidos são insuficientes para afirmar se os compostos terão ação ou não sobre a cruzaina, sendo necessária a realização de ensaios de inibição enzimática para validação.

A análise dos derivados se mostrou contrária ao que se esperava visto o deslocamento da distribuição de LUMO para a região do nitro-heterocíclo.

Figura 12 - Estrutura dos compostos 1-4 propostos no estudo, obtido por modelagem molecular. A) Composto de menor energia; B) MEP; C) LUMO. Escala de cores: região vermelha mais negativa; região azul mais positiva.

5.1.1.2 Estudos de Modelagem Molecular realizados para os bioisósteros pirrólicos

Esses estudos foram realizados para o grupo de derivados do NF planejados por bioisosterismo variando o anel e a cadeia lateral. Nesses compostos utilizaram-se o anel pirrólico e o anel 4-dimetilaminobenzaldeído ao invés de nitro-furano, oriundo no NF, e os grupos aminoguanidina, tiosemicarbazida e semicarbazida.

A análise dos MEPs mostrou que os bioisóteros da aminoguanidina, semi e tiosemicarbazona apresentaram uma coloração verde na região do carbono ligado aos bioisósteros da carbonila Figuras 13 b-14 b. Isto sugere um desfavorecimento do ataque nucleofílico e, conseqüentemente, do mecanismo de ação proposto. Essa coloração se mostra contínua por grande parte da molécula, indo do anel aromático até a cadeia lateral, o que pode ser interpretado como uma ressonância eletrônica.

Já a distribuição de LUMO calculada para esses compostos se apresentou bem distribuída por toda a estrutura. Ao analisar o carbono ligado aos bioisósteros da carbonila, verifica-se que o derivado de tiosemicarbazona apresenta uma intensidade maior, visto o tamanho do orbital representado nas Figuras 13 c-14 c, seguido de um orbital de intensidade média na semicarbazona, e a aminoguanidina com menor intensidade. Tal resultado sugere a possibilidade de um ataque nucleofílico nesse ponto.

Figura 13 - Estrutura dos compostos 5-7 propostos no estudo obtido por modelagem molecular. A) Composto de menor energia; B) MEP; C) LUMO. Escala de cores: região vermelha mais negativa; região azul mais positiva.

Figura 14 - Estrutura dos compostos 8-10 propostos no estudo obtido por modelagem molecular. A) Composto de menor energia; B) MEP; C) LUMO.

Ao comparar os resultados obtidos para as duas séries de compostos, derivados com grupo nitro e sem o grupo nitro no anel, verifica-se que os análogos não nitrados têm maior disponibilidade a um ataque nucleofílico na região proposta no mecanismo de ação de Du e colaboradores, 2002. Isto sugere um efeito eletrônico desfavorável do grupo nitro para este mecanismo de ação.

5.2 Estudos de *docking*

5.2.1 Estudo de docking dos derivados bioisósteros propostos

Os estudos de *docking* foram realizados para os derivados bioisósteros já descritos na Figura 11. Deste modo, pretende-se avaliar a possibilidade da interação entre os ligantes e o sítio ativo da cruzaina, visando o mecanismo de ação proposto.

A análise dos resultados foi baseada na interação dos ligantes e as

propriedades químicas do sítio ativo da enzima previamente reportadas, tais como afinidade por grupos hidrofóbicos e aromáticos no bolso S2, e por grupos que proporcionem ligações de hidrogênio no bolso S1 e S1' (LECAILLE et al., 2001; TROSSINI, 2008).

Na Figura 15 apresenta-se a estrutura da cruzaina em forma de superfície gerada no programa Pymol Viwer 1.5, e seus respectivos bolsos de interação.

Figura 15 – Estrutura cristalizada da cruzaina contendo seus respectivos bolsos de interação

A análise foi feita buscando avaliar a interação dos ligantes com os bolsos do sítio ativo, suas características químicas e a proximidade do resíduo catalítico, que seria fundamental para o mecanismo de ação.

Ao analisar os resultados de *docking*, os análogos hidroxilados (compostos 3 e 4) apresentaram um melhor perfil de interação com o sítio ativo da cruzaina. Essa melhor interação se dá devido à uma ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxil e o resíduo de Gly66, o que aproxima o grupo guanidina dos análogos da Cys25 da cruzaina (Figura 16).

Figura 16 – Interação entre o composto 3 e 4 e a cruzaina. Hidroxila presente nas moléculas fazendo ligação com a Gly66 e favorecendo a interação do grupo guanidina com a Cys25

Os resultados obtidos para os compostos 1 e 2 sugerem um encaixe entre o anel nitro-pirrol e nitro-imidazol no bolso S2 da enzima. Esse resultado corrobora com dados da literatura que sugerem que esse bolso é compatível com ligação de grupos hidrofóbicos e aromáticos (LECAILLE et al., 2001). A cadeia lateral dos análogos 1 e 2 se apresentaram voltadas para o solvente devido à características hidrofílicas do grupo guanidina presente nesses compostos. Essa orientação sugere uma distância de 5,0 e 5,1 Å, respectivamente para os compostos 1 e 2, entre o grupo guanidina e a Cys25, desfavorecendo o mecanismo de ação proposto inicialmente (Figura 17).

Figura 17 – Interação entre o composto 1 e 2 e a enzima cruzaina. Interação entre a porção hidrofóbica (anéis pirrol e imidazol e grupo nitro) do composto e o bolso S2 da enzima

Para os três derivados bioisotéricos sem a presença do grupo nitro, (compostos 5, 6 e 7) os estudos de *docking* foram realizados pela mesma metodologia utilizada anteriormente.

O análogo contendo o anel pirrólico e grupo aminoguanidina (composto 5), apresentou resultado bastante satisfatório. Para esse ligante foi observada, na pose melhor ranqueada, uma distância de 3,7Å entre o carbono do grupo guanidina e a Cys25. O anel pirrólico se posicionou em uma porção intermediária entre os bolsos S2 e S1 da enzima. Tal resultado pode ser subjetivo visto que a definição de uma região específica para cada bolso em um sítio ativo tão amplo é bastante difícil. Porém, por se tratar de um composto muito hidrofílico, é justificável que não apresente boa interação com o bolso S2, apesar de se tratar de um grupamento aromático. Sugere-se, então, que o derivado 5 possa ter atividade inibitória da cruzaina pelo mecanismo de ação proposto. No composto 6, bioisómero derivado da

tiossemicarbazona, o perfil de interação com a enzima apresentado sugere uma interação com o sítio ativo da enzima e de maneira coerente com o descrito na literatura. Isso pode ser verificado pelo anel aromático posicionado no bolso S2 e o grupo tiossemicarbazona próximo a Cys25 (3,4 Å). Esse resultado se mostra bastante interessante, visto os resultados já observados por modelagem molecular, que indicam o composto derivado de tiossemicarbazona favorável ao ataque nucleofílico da cruzaina (Figura 18).

Figura 18 – Interação do composto 5 e 6 com a enzima cruzaina

O composto 7 (derivado da semicarbazona) apresentou o anel pirrólico posicionado no bolso S1 da enzima. Esse resultado se apresenta em desacordo com a literatura, visto que Lecaille e colaboradores (2001) descrevem o bolso S2 com afinidade por grupos aromáticos e hidrofóbicos. Porém, o resultado de docking do composto 7 mostrou-se diferente do descrito na literatura, visto fo posicionamento da cadeia lateral no bolso S2 (Figura 19). Essa orientação do grupo semicarbazona pode estar relacionada a uma interação com o resíduo Glu205, que

é descrito como de grande flexibilidade podendo proporcionar uma maior abertura no bolso S2, quando o grupo ácido estiver voltado para o solvente, e ligações de hidrogênio ou iônicas quando voltados para o interior da estrutura da cruzaina (HUANG; BRINEN; ELLMAN, 2003). O que pode ser notado em outras estruturas cristalográficas, nas quais esses grupos ácidos estão voltados para o interior do bolso S2, favorecendo ligações de hidrogênio e iônicas.

Figura 19 – Estrutura do bioisótero da semicarbazona (composto 7) no sítio de ligação da cruzaina. E, resíduo de Glu205 interagindo com amina terminal do composto

Os composto 8, 9 e 10, contendo anel 4-dimetilaminobenzaldeído, apresentaram um perfil de interação com a enzima cruzaina bastante satisfatório, visto que ambos os compostos mostraram na melhor pose ranqueada (figura 20) um encaixe no sítio ativo da cruzaina com uma distância de interação de 3,3 Å (composto 8 e 9) e 3,4 Å (composto 10) entre o carbono bioisótero da carbonila e o resíduo de Cys25. Tal resultado nos sugere que possa acontecer o ataque

nucleofílico do resíduo de Cys25 e que estes compostos possam apresentar uma atividade inibitória frente à cruzaina. As poses também nos mostram uma interação com o resíduo de Gly66 e a amina terminal (composto 8), o grupo tionila (composto) e o oxigênio (composto 10), ambos com distância de interação de 2,8 Å. E o nitrogênio terciário presente nestes compostos apresenta uma interação com o resíduo de Glu205 da cruzaina com uma distância de interação de 3,2 Å (composto 8) e 3,5 Å (composto 9 e 10), fazendo com que os compostos se encaixem melhor no sítio ativo.

Figura 20 – Estrutura dos compostos 8, 9 e 10 no sítio de ligação da cruzaina. Interações com os resíduos de Gly66 e Glu205

Os resultados obtidos por estudos de *docking* sugerem que sete dos 10 compostos estudados (3-6 e 8-10) apresentaram uma interação adequada no sítio ativo da cruzaina para um ataque da Cys25, sugerindo um favorecimento para o mecanismo de ação proposto.

5.3 Sínteses

5.3.1 Síntese dos compostos 5-10

As sínteses de seis análogos foram realizadas com sucesso, sendo eles os compostos 5, 6 e 7 (anel pirrólico e cadeias laterais aminoguanidina, tiossemicarbazida e semicarbazida) e os compostos 8, 9 e 10 (anel 4-dimetilaminobenzaldeído e cadeias laterais aminoguanidina, tiossemicarbazida e semicarbazida) (Tabela 1). Os compostos 1-4 não foram sintetizados visto que os aldeídos dos anéis nitro-heterocíclicos, nitro-pirrol e nitro-imidazol não estão disponíveis comercialmente.

Tabela 1 – Características dos compostos 5 a 10

Compostos	Tempo de Reação	Rendimento	Aspecto	Ponto de Fusão (°C)	Rf
5	24 horas	17%	cristais levemente amarelados	160,4-160,8	0,16
6	24 horas	56%	cristais de coloração lilás	166-167	0,45
7	2 horas	62%	cristais de coloração roxa	163-163,4	0,33
8	6 horas	12%	pó levemente amarelado	165,5-165,7	0,8
9	6 horas	42%	pó de coloração amarela	163,1-163,7	0,53
10	5 horas	34%	cristais brancos	160,1-160,4	0,64

5.3.1.1 Síntese do composto derivado da aminoguanidina (composto 5)

A síntese do composto 5 foi realizada seguindo a metodologia descrita por Mikhaleva et al.(2008). Após 24 horas de reação, realizou-se o isolamento do produto por meio de filtração, obtendo-se cristais levemente amarelados, faixa de fusão 160,4-160,8°C e rendimento de 17%. A formação do produto foi confirmada por cromatografia em camada delgada com Rf 0,16, empregando-se clorofórmio como fase móvel e revelação em vanilina. Para a caracterização do produto, utilizou-se a técnica de RMN ^1H e ^{13}C , a formação do produto foi observada pelo deslocamento do hidrogênio 5 (C=N) em 7,03 ppm, esse deslocamento nos indica a formação do produto visto que o hidrogênio do aldeído no anel pirrol-2-carboxaldeído (reagente) encontra-se em um deslocamento de 9,5 ppm, e no produto formado é esperado um deslocamento para campo alto já que o hidrogênio estará mais

blindado. O deslocamento do hidrogênio 1 (NH) aparece em 12,31 ppm e do hidrogênio 7 (NH₂) em 5,55 ppm, o que nos indica a presença do anel pirrol e da cadeia lateral aminoguanidina, (Anexo 1).

Abaixo seguem os espectros de RMN ¹H (Figura 21 e Tabela 2) e ¹³C (Figura 22 e Tabela 3), respectivamente:

Figura 21 - Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δppm) do composto 5 (derivado da aminoguanidina)

Tabela 2 – Atribuições de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δppm) do composto 5 (derivado da aminoguanidina)

RMN ¹ H (DMSO), 300 MHz, δppm
3,38 (H ₂ O); 5,55 (2H, s, NH); 5,89 (1H, s, NH); 6,05 (1H, d, J= 2,49 Hz, H-4); 6,24 (1H, d, J= 2,49 Hz, H-3); 6,83 (1H, s, H-2); 7,03 (1H, s, H-5); 12,31 (1H, s, NH).

Figura 22 - Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d_6 , δppm) do composto 5 (derivado da aminoguanidina)

Tabela 3 – Atribuições de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d_6 , δppm) do composto 5 (derivado da aminoguanidina)

RMN ^{13}C (DMSO), ppm
40,34 (DMSO); 107,94 (C1); 110,64 (C2); 118,45 (C3); 129,77 (C4); 133,54 (C5); 159,71 (C6).

5.3.1.2 Síntese do composto derivado da tiossemicarbazona (composto 6)

A reação para obtenção do composto 6 foi realizada seguindo a mesma metodologia aplicada anteriormente. A reação foi acompanhada por CCD utilizando clorofórmio como sistema solvente, apresentando R_f 0,45. Após as 24 horas verificou-se apenas uma mancha, tempo no qual a reação foi interrompida. O produto formado foi isolado por filtração e lavado com água gelada. Obteve-se, na reação, cristais de coloração lilás, com um rendimento de 56% e faixa de fusão 166-167°C. O produto foi submetido a análises de RMN ^1H (Figuras 23, 24 e Tabela 4) e ^{13}C (Figura 25 e Tabela 5), confirmando a formação do produto planejado. A análise

de RMN ^1H nos indica a formação do produto pois, podemos observar o deslocamento do hidrogênio 5 (como descrito anteriormente) em 7,86 ppm. Apresenta ainda os deslocamentos dos hidrogênios 1, 7 e 8 em 8,03 ppm, 11,32 ppm e 11,24 ppm, respectivamente. Esses deslocamentos indicam a presença do anel pirrol (hidrogênio 1) e da cadeia lateral tiossemicarbazona (NH_2). O deslocamento do hidrogênio 5 como dito anteriormente, aparece em um campo mais alto quando comparado ao pirrol-2-carboxaldeído, já que o hidrogênio estará mais blindado quando ligado à cadeia lateral.

Figura 23 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do composto 6 (derivado da tiossemicarbazona)

Figura 24 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 6 (derivado da tiossemicarbazona) ampliado

Tabela 4 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 6 (derivado da tiossemicarbazona)

RMN ^1H (DMSO), 300 MHz, δ ppm
3,43(H_2O); 6,10 (1H, s, H-4); 6,39 (1H, s, H-3); 6,95 (1H, s, H-2); 7,86 (1H, s, H-5); 7,96 (1H, s, NH); 8,03 (1H, s, H-1); 11,24 (1H, s, NH); 11,32 (1H, s, NH).

Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 6 (derivado da tiossemicarbazona)

Tabela 5 – Atribuições de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 6 (derivado da tiossemicarbazona)

RMN ^{13}C (DMSO), ppm
40,26-38,59(DMSO); 109,26 (C1); 112,90 (C2); 121,75 (C3); 127,52 (C4); 133,84 (C5); 177,22 (C6).

5.3.1.3 Síntese do composto derivado da semicarbazona (composto 7)

A síntese do composto 7 (anel pirrol e cadeia lateral semicarbazida) foi realizada conforme metodologia descrita acima e acompanhada por CCD em sistema solvente clorofórmio, apresentando R_f 0,33. Após 2 horas observou-se a formação do produto que foi filtrado a pressão reduzida e lavado utilizando água quente. Obteve-se cristais de coloração roxa com rendimento de 62% e faixa de fusão 163-163,4°C. A formação do produto foi observada por análise espectroscópica de RMN ^1H (Figura 26 e Tabela 6) e ^{13}C (Figura 27 e Tabela 7). Os deslocamentos observados para esse produtos foram 6,78 ppm (hidrogênio 5), 11,23 ppm (hidrogênio 1) e 6,53 ppm (hidrogênio 7 – NH_2). Esses deslocamentos indicam a

presença do anel pirrol e da cadeia lateral semicarbazona, o deslocamento do hidrogênio 5 é de fundamental importância para verificarmos a formação do produto.

Figura 26 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 7 (derivado da semicarbazida)

Tabela 6 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 7 (derivado da semicarbazida)

RMN ^1H (DMSO), 300 MHz, δ ppm
3,49 (H_2O); 6,09-6,06 (1H, m, $J = 4,2$ Hz, H-4); 6,30-6,28 (1H, m, $J = 2,4$ Hz, H-2); 6,53 (1H, s, NH_2); 6,91-6,88 (1H, m, $J = 3,15$ Hz, H-3); 6,78 (1H, s, $\text{C}=\text{N}$); 10,01 (1H, s, NH_6); 11,23 (1H, s, NH_1).

Figura 27 - Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do composto 7 (derivado da semicarbazida)

Tabela 7 – Atribuições de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do composto 7 (derivado da semicarbazida)

RMN ^{13}C (DMSO), ppm
39,68 (DMSO); 108,76 (C1); 110,88 (C2); 120,71 (C3); 128,09 (C4); 131,71 (C5); 157,32 (C6).

5.3.1.4 Síntese dos compostos derivados do anel 4-dimetilaminobenzaldeído e cadeias laterais aminoguanidina, tiossemi e semicarbazida (composto 8, 9 e 10)

A síntese dos três produtos foram realizadas com sucesso, sendo o tempo de reação de 5 (semicarbazida) e 6 (aminoguanidina e tiossemicarbazida) horas, respectivamente. Ao final da reação, os produtos foram analisados por CCD utilizando como fase móvel clorofórmio : metanol (9:1) (compostos 8) e clorofórmio (composto 9 e 10), apresentando apenas uma mancha para cada produto com R_f 0,8 (composto 8), 0,53 (composto 9) e 0,64 (composto 10), sugerindo que os mesmos estavam puros. Os produtos formados foram isolados por filtração e

lavados com etanol gelado. O composto 8 apresentou um pó de coloração levemente amarelada, faixa de fusão 165,5-165,7°C e rendimento de 11,76%; para o composto 9 obteve-se um pó de coloração amarela, faixa de fusão 163,1-163,7°C e rendimento de 41,71%; e para o composto 10 observou-se cristais brancos com faixa de fusão 160,1-160,4°C e rendimento de 34,35%. Os produtos foram submetidos a análises de RMN ^1H e ^{13}C (espectros abaixo), indicando a formação dos produtos planejados. Para o composto 8 observou-se problemas de solubilidade (somente em metanol quente).

Na análise de RMN ^1H do composto 8, podemos verificar o deslocamento do hidrogênio 4 (C=N) em 7,99 ppm, esse deslocamento nos indica a formação do produto, pois o mesmo hidrogênio no reagente 4-dimetilaminobenzaldeído apresenta um deslocamento em 9,70 ppm. É esperado que durante a formação do produto, esse hidrogênio se desloque para um campo mais alto, já que no produto formado há a presença da cadeia lateral que blinda esse hidrogênio (Figura 28 e Tabela 8).

Figura 28 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, MetOH- d_4 , δ ppm) do composto 8 (derivado da aminoguanidina)

Tabela 8 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, MetOH-d_4 , δ ppm) do composto 8 (derivado da aminoguanidina)

RMN ^1H (Metanol), 300 MHz, δ ppm
4,87 (H_2O); 7,99 (1H, s, H-4); 7,62 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-3); 6,76 (1H, d, H-2); 3,02 (1H, s, $(\text{CH}_3)_2$).

A formação do composto 9 na análise de RMN ^1H , pode ser verificada através do deslocamento do hidrogênio 4 (7,74 ppm), do hidrogênio 6 (7,95 ppm) e do hidrogênio 1 (2,95 ppm). Como já dito anteriormente, esses deslocamentos nos indicam a presença do anel e da cadeia lateral, porém o deslocamento do hidrogênio 4 é de fundamental importância para verificarmos a formação do produto (Figura 29 e Tabela 9).

Figura 29 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do composto 9 (derivado da tiossemicarbazida)

Tabela 9 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do composto 9 (derivado da tiossemicarbazida)

RMN ^1H (DMSO), 300 MHz, δ ppm
3,35 (H_2O); 11,16 (1H, s, H-5); 7,95 (1H, s, H-6); 7,74 (1H, s, H-4); 7,58 (1H, d, J= 8,9 Hz, H-3); 6,70 (1H, d, J= 8,9 Hz, H-2); 2,95 (1H, s, H-1).

Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do composto 9 (derivado da tiossemicarbazida)

Tabela 10 – Atribuições de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do composto 9 (derivado da tiossemicarbazida)

RMN ^{13}C (DMSO), ppm
40,39-38,72 (DMSO); 39,83 (C1); 151,37 (C2); 111,67 (C3); 128,57 (C4); 121,40 (C5); 143,37 (C6); 177,06 (C7).

O composto 10 apresentou no espectro de RMN ^1H os deslocamentos 7,73 ppm (hidrogênio 4), 2,94 ppm (hidrogênio 1) e 6,32 ppm (hidrogênio 6). Que nos indicam a presença do anel 4-dimetilaminobenzaldeído e da cadeia lateral semicarbazona. O deslocamento do hidrogênio 4 nos indica que o produto está formado, uma vez que esse hidrogênio é deslocado de 9,70 ppm (aldeído livre) para 7,73 ppm no produto formado, tal deslocamento se deve à blindagem da cadeia lateral no hidrogênio, fazendo com que o mesmo se desloque para um campo mais alto (Figura 31 e Tabela 11).

Figura 31 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 10 (derivado da semicarbazida)

Tabela 11 – Atribuições de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 10 (derivado da semicarbazida)

RMN ^1H (DMSO), 300 MHz, δ ppm
3,33 (H ₂ O); 9,94 (1H, s, H-5); 7,73 (1H, s, H-4); 7,51 (1H, d, J= 8,8 Hz, H-3); 6,70 (1H, d, J= 8,9 Hz, H-2); 6,32 (1H, s, H-6); 2,94 (1H, s, H-1).

Figura 32 - Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 10 (derivado da semicarbazida)

Tabela 12 – Atribuições de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 10 (derivado da semicarbazida)

RMN ^{13}C (DMSO), ppm
40,38-38,71 (DMSO); 39,83 (C1); 140,29 (C2); 111,79 (C3); 127,68 (C4); 122,39 (C5); 150,87 (C6); 156,92 (C7).

5.4 Ensaios Biológicos

5.4.1 Ensaios de inibição enzimática com a cruzaina de *T. cruzi*

Os compostos foram submetidos a ensaios de inibição enzimática. Foi utilizada a cruzaina, previamente purificada, que foi incubada em cubeta com tampão por 5 minutos em temperatura ambiente. O inibidor foi adicionado

permanecendo por 5 minutos de incubação. O substrato fluorescente (cloridrato de Z-Phe-Arg-aminometilcumarina (Z-Phe-Arg-AMC)) foi adicionado. Foi medida a atividade do inibidor através da fluorescência remanescente em relação ao controle.

Os resultados da porcentagem de inibição dos compostos sintetizados estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 13 – Resultados de Inibição enzimática contra enzima cruzaina de *T. cruzi*

Composto	Estrutura	% de Inibição contra Cruzaina (100 µM)
5		10
6		70
7		25
8		55
9		70
10		75

Os resultados acima apresentados nos indicam que os compostos 6, 9 e 10 apresentaram porcentagem de inibição satisfatória, 70, 70 e 75% respectivamente. Tais resultados eram esperados para os compostos 6 e 9, segundo os estudos de modelagem molecular e *docking*, nos quais esses dois compostos apresentaram um perfil de encaixe melhor do que os outros compostos.

Para os compostos 8 e 10 os valores de IC₅₀ foram determinados, sendo eles >100 µM e 50 µM, respectivamente. Apesar destes valores serem aquém do esperado, os compostos se apresentam como um ponto de partida na busca de inibidores de cruzaina. Outro resultado positivo alcançado com essa classe de inibidores de cruzaina é que quatro dos seis compostos sintetizados apresentaram porcentagem de inibição maior que 50%, na concentração de 100 µM.

Entre os compostos aqui estudados, os derivados 6 e 9, já foram reportados pelo grupo da Prof^a Rafaela Ferreira (CRUZ, L. F. et al., 2013). Sendo que o composto 6 (IC₅₀ 10 µM) e o composto 9 (IC₅₀ 21 µM), tais resultados corroboram com os dados obtidos por estudos de modelagem molecular e *docking*. Esses resultados nos deixam otimistas de que nossos derivados possam apresentar valores de IC₅₀ satisfatório visto serem bioisósteros dos compostos já testados.

5.4.2 Ensaios de inibição de crescimento celular

A fim de investigar a atividade tripanocida dos compostos sintetizados, os mesmos foram testados contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*. As cepa CL14 de *T. cruzi* foram cultivadas em meio de cultura LIT contendo os inibidores em diversas concentrações (0,1 a 1 mM) e o crescimento foi acompanhado durante 10 dias pela leitura da absorbância (620 nm). Os controles foram feitos utilizando a adição de rotenona (200 µM) e antimicina (0,5 µM) no meio de cultura.

Os ensaios foram feitos em triplicatas e, após 10 dias de ensaio verificamos que o composto 9 apresentou um melhor perfil de inibição, pois foi observado um IC₅₀ de 19,8 µM com desvio padrão de ± 2,28. Os compostos 7 e 10, não inibiram o crescimento dos parasitas até a concentração de 2 mM. O composto 8 não foi suficientemente solúvel para realização dos ensaios. E, os compostos 5 e 6 apresentaram perfis de inibição diferenciados nos 3 ensaios, sendo necessário um quarto ensaio para determinação dos valores de IC₅₀.

Porém, o resultado de IC₅₀ obtido para o composto 9, nos indica que esse composto possa ser um bom candidato a tripanomicida, visto os resultados anteriormente reportados pelos estudos de modelagem molecular, *docking* e porcentagem de inibição. Tais resultados corroboram que os compostos contendo

tiocarbonila, apresentaram melhor perfil de interação com o sítio ativo da enzima e consequentemente um melhor resultado de inibição enzimática e de crescimento celular.

O composto 10 que apresentou uma inibição frente à cruzaína, não inibiu o crescimento celular, tal fato pode ser associado à falta de permeabilidade pela membrana celular. Este composto e os outros não apresentaram inibição do crescimento celular talvez devido apresentarem características mais hidrofílicas, dificultando a permeabilidade pela membrana celular.

Tabela 14 – Resultados dos ensaios de inibição de crescimento celular

Compostos	Estrutura	IC ₅₀ Inibição celular
5		valores distintos
6		valores distintos
7		>2 mM
8		Insolúvel
9		19,8 µM
10		>2 mM

6. CONCLUSÕES

- Os estudos de modelagem molecular dos compostos propostos foram realizados no intuito de verificar as propriedades estereoeletrônicas e sua influência no mecanismo de ação proposto;
- A modelagem molecular sugere, para os compostos contendo nitro-heterocíclicos (1 - 4), por meio da distribuição de LUMO, que o carbono do grupamento guanidina não seria favorável a um ataque nucleofílico pela Cys25;
- Os compostos contendo o anel pirrólico e 4-dimetilaminobenzaldeído sem grupo nitro apresentaram, nos estudos de modelagem molecular, um perfil eletrônico favorável ao mecanismo de ação proposto nesse trabalho, visto a distribuição de LUMO. Pela observação da dimensão dos orbitais LUMO na região do carbono carbonílico, sugere-se a seguinte ordem de atividade tiossemicarbazona > semicarbazona > aminoguanidina;
- Os estudos de *docking* realizados indicam que sete dos compostos estudados (3-6 e 8-10) obtiveram uma interação com a enzima favorável ao mecanismo proposto, visto o posicionamento da cadeia lateral próxima ao resíduo catalítico da cruzaina;
- Os derivados hidroximetilados (3 e 4) apresentaram um ponto de interação com o resíduo Gly66, sugerindo melhor afinidade pelo sítio ativo;.
- Os compostos 5 – 10 foram sintetizados com sucesso, visto resultados da análise de RMN de ^1H e ^{13}C .
- Os resultados de inibição enzimática, mostrou que os compostos 6, 9 e 10 apresentaram valores de porcentagem de inibição da cruzaina satisfatórios.

- O ensaio de inibição celular apresentou um resultado satisfatório para o composto 9 (19.8 μ M).

- Para dois compostos (5 e 6) foram observados valores distintos de inibição do crescimento do parasita, sendo necessário um quarto ensaio para confirmar os resultados. Os compostos 7 e 10 não foram ativos em até 2 mM de concentração, e o composto 8 não pode ser avaliado devido sua baixa solubilidade.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, D.J. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 6. ed. United States of America: Wiley, 2003.

AGUIRRE, G. et al. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.12, p. 4885-4893, 2004.

AGUIRRE, G. et al. New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. 3D-QSAR (CoMFA) studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 457-466, 2006.

ALVES, L.C. et al. Analysis of the S₂ subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of *Leishmania Mexicana*, and cruzain of *Trypanosoma cruzi*, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, p. 137-143, 2001a.

ALVES, L.C. et al. S₁ subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana* compared with cruzain, human cathepsin L and papain using substrates containing non-natural basic amino acids. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 1206-1212, 2001b.

ANDRADE, Z. A.; BRENNER, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 11, p. 222-228, 1969.

ANDREOLLO, N. A.; MALAFAIA, O. Os 100 anos da doença de chagas no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 22, p. 189-191, 2009.

BARREIRO, E. J. et al. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, p. 1-11, 1997.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da terapêutica**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BASU, A. et al. N-Hydroxi-N'-aminoguanidines as anti-cancer lead molecule: QSAR, synthesis and biological evaluation. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 3324-3328, 2011.

BORCHHARDT, D. M. et al. Biochemical Evaluation of a Series of Synthetic Chalcone and Hydrazide Derivatives as Novel Inhibitors of Cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 142-150, 2010.

BRAK, K. et al. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 6404-6410, 2008.

BRYANT, C. et al. Novel non-peptidic vinylsulfones targetin the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 6218-6221, 2009.

BUCKNER, F.S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2592-2597, 1996.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso no curso experimental de Química Farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, p. 428-438, 2003.

CASTRO, S. L. et al. Experimental chemotherapy for chagas disease: a morphological, biochemical and proteomic overview of potential *Trypanosoma cruzi* targets of amidines derivatives and naphthoquinones. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

CAZZULO, J. J. et al. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, p. 41-48, 1990.

CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 1143-1156, 2001.

CHEN, Y. T. et al. Synthesis of macrocyclic trypanosomal cysteine protease inhibitors. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 5860-5863, 2008.

CHUNG, M. C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofurazone e primaquina potencialmente antichagásicos**. 1996. 196 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

CHUNG, M. C. et al. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 4779-4783, 2003.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

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

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

CRENSHAW, C. A. et al. Nitrofurazone therapy in "middle burns": a review. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, v. 19, p. 487-492, 1976.

CRUZ, L. F. et al. Discovery and Structure-Activity Relationships for a Series of Thiosemicarbazones as Potent Cruzain and Rhodesain Inhibitors. In: XLII Reunião Anual da SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. XLII Reunião Anual da SBBq, 2013.

DAVIES, C. et al. Hydroxymethylnitrofurazone is active in a murine model of Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 3584-3589, 2010.

DEL NERY, E. et al. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 25713-25718, 1997.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 2020-2021, 2006.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. S13-S22, 2007.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DNDi – Drugs for Neglected Disease initiative. **Chagas**. Disponível em: <http://dndi.org/diseases/chagas.html>. Acesso em: 17 de Outubro de 2013.

DOYLE, P. S. et al. The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. **PLOS Pathogens**, v. 7, p. 1-11, 2011.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of American trypanosomes. **Reviews in Biochemical Toxicology**, v. 7, p. 159-204, 1985.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 73, p. 1-27, 1990.

DODD, M. C.; STILLMAN, W. B. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, p. 11-18, 1944.

DORIGUETTO, A.C. et al. 5-Nitro-2-furaldehyde N-hydroxymethyl)semicarbazone. **Acta Crystallographica Section E- Structure Reports**, v. 61, p. 2099-2101, 2005.

DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An Insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas Disease. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 2, p. 19-51, 2007.

ERLENMEYER, H.; LEO, H. On pseudo atoms. **Helvetica Chimica Acta**, v. 15, p. 1171-1186, 1932.

FAMPA, P.; SANTOS, A. L. S.; RAMIREZ, M. I. *Trypanosoma cruzi*: ubiquity expression of surface cruzipain molecules in TCI and TCII field isolates. **Parasitology Research**, v. 107, p. 443-447, 2010.

FERREIRA, L. G. et al. Comparative molecular field analysis of a series of inhibitors of HIV-1 protease, **Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 71-79, 2011.

FERREIRA, R.S. et al. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 4891-4905, 2010.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas'-disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 755-759, 1987.

FIOCRUZ. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=1>>. Acessado em: 16 de Outubro de 2013.

GARCIA, S. B. Doença de Chagas: os 100 anos da descoberta e a atualidade do pensamento do seu descobridor. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, p. 249-251, 2009.

GASTEIGER, J. Chemoinformatics: a new field with a long tradition. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 57-64, 2006a.

GASTEIGER, J. The central role of chemoinformatics. **Chemometrics Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, p. 200-209, 2006b.

GEA, S. et al. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* cystein protease in the host-parasite interplay. **Inmunología**, v. 25, p. 225-238, 2006.

GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, v. 6, p. 1603-1611, 1997.

GRINGAUZ, A. **Introduction to medicinal chemistry. How drugs act and why**. New York: Wiley-VCH, 1997. p. 265-230.

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 37-46, 2008.

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Planejamento de fármacos, biotecnologia, e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Química Nova**, v. 24, p. 81-98, 2010.

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Modern drug discovery technologies: opportunities and challenges in lead discovery. **Combinatorial Chemistry and High throughput screening**, v. 14, p. 830-839, 2011.

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Structure- and Ligand-based drug approaches for neglected tropical disease. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, p. 1857-1866, 2012.

HENDERSON, G. B. et al. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 5374-5378, 1988.

HERNANDES, M. Z. et al. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 7826-7835, 2010.

HOPFINGER, A. J. Computer-assisted drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 1133-1139, 1985.

HUANG, L.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J.A. Crystal structures of reversible ketone-based inhibitors of the cysteine protease cruzain. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 21-29, 2003.

INCT-IDN – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas. **Doenças Negligenciadas**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/inct-idn/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=101>. Acesso em: 23 de Outubro de 2013.

ITAI, A. et al. Computer-assisted new lead design In: COHEN, N. C. (ED.). **Guidebook on molecular modeling drug design**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 100-101.

JAISHANKAR, P. et al. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 624-628, 2008.

KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 580-594, 2006.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. 2007/2008 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KUBINYI, H. Structure-based design of enzyme inhibitors and receptor ligands. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 1, p. 4-15, 1998.

LA-SCALEA, M. A.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. Geração eletroquímica do nitro radical aniônico a partir do NF utilizando-se eletrodo de carbono vítreo. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA - QUÍMICA ANALÍTICA E QUALIDADE DAS ÁGUAS, 10., 1999, Santa Maria. **Livro de Resumos...** Santa Maria: res. EL-4.

LA-SCALEA, M. A. Comportamento voltamétrico e mecanismo de ação biológica de nitroimidazóis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 34, p. 59-75, 1998.

LA-SCALEA, M. A. et al. Electrochemical reduction using glassy carbon electrode in aqueous medium of a potential anti- Chagas drug: NFOH. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 156, p. F93-F97, 2009.

LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Docking and Scoring. Perspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 5851-5855, 2006.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23-49, 2005.

MAGDALENO, A.; AHN, I-Y.; PAES, S. L.; SILBER, A. M. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 4, p. e4534.

McGRATH, M. E. et al. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, p. 251-259, 1995.

McKERROW, J. H.; McGRATH, M. E.; ENGEL, J. C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. **Parasitology Today**, v. 11, p. 279-282, 1995.

McKERROW, J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 639-644, 1999.

MEANWELL, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 2529-2591, 2011

MIKHALEVA, A. I. et al. Directed synthesis of semicarbazones, thiosemicarbazones, and guanyldrazones of 1-vinyl-pyrrole-2-carbaldehydes. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 44, p. 1117-1122, 2008.

MORENO, S.N. J. et al. Generation of free radicals from metronidazole and other nitroimidazoles by *Trichomonas foetus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 4051-4054, 1983.

NETO, V. A.; PASTERNAK, J. Centenário da Doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 381-382, 2009.

O'BRIEN, T.C. O. et al. A parasite cysteine protease is key to host protein degradation and iron acquisition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 28934-28943, 2008.

OLSSON, T.; OPREA, T. I. Cheminformatics: a tool for decision-makers in drug discovery. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 4, p. 308-313, 2001.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis)**. Disponível em:
http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=3591&Itemid=392.
 Acesso em: 17 de Outubro de 2013.

PATANI, G. A.; LaVOIE, E.J. Bioisosterism: a rational approach in drug design. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 3147-3176, 1996.

PATRICK, G. L. Computer in medicinal chemistry. In: PATRICK, G. L. (Ed) **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2013. p. 337-357.

RANDO, D.G. et al. Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzyldene hydrazides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 6724-6731, 2008.

RASSI, A. J.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 275-291, 2012.

RAUTIO, J. et al. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 255-270, 2008.

RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: Modelagem molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, 2001.

SAJID, M. et al. Cruzain. The path from target validation to the clinic. In: ROBINSON, M. W.; DALTON, J. P. **Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms**. New York: Landes Bioscience and Spriger Science+Business Media, 2011. cap. 7, p. 100-115.

SAJID, M.; McKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SERVEAU, C. et al. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin- derived substrates and inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 313, p. 951-956, 1996.

SILES, R. et al. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potencial application in the treatment of chagas' disease. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4405-4409.

SILVA, T. H. A. Modelagem molecular. In: ANDREI, C. C.; FERREIRA, T. D.; FACCIONE, M.; FARIA, J. T. (EDS.). **Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular, um curso prático**. Barueri: Malone, 2003. p. 111-139.

SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of drug design and drug action**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004.

SLIWOSKI, G. et al. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, p. 334-395, 2014.

SOTRIFTER, C. A. et al. Automated docking of ligands to antibodies: methods and applications. **Methods**, v. 20, p. 280-291, 2000.

TETKO, I.V. et al. Virtual computational chemistry laboratory - design and description. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 19, p. 453-63, 2005.

The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC). **GOLD User Guide: Introduction**. Cambridge, 2011. 4 p.

_____. **GOLD User Guide: Fitness Function**. Cambridge, 2011. 68 p.

TROSSINI, G. H. G. **Antichagásicos potenciais**: síntese de bases de Mannich do hidroximetilnitrofural. 2004. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TROSSINI, G. H. G. **Antichagásicos potenciais**: busca racional de compostos com ação seletiva pela cruzaina. 2008. 321 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TROSSINI, G. H. G. et al. Synthesis optimization of hydroxymethylnitrofurazone, an antichagasic candidate, using 3(2) factorial design. **Letters in Organic Chemistry**, v. 7, p. 191-195, 2010a.

TROSSINI, G. H. G. et al. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 62-67, 2010b.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance current limitation and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, p. 55-68, 2010

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversis and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 495-501, 2003.

VERMELHO, A. B. et al. *Trypanosoma cruzi* peptidases: an overview. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 120-131, 2010.

VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

WERMUTH, C.G. **The practice of medicinal chemistry**. 3. ed. London: Academic Press, 2008.

WERMUTH, C.G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypothesis. In: WERMUTH, C. G. (Ed) **The practice of medicinal chemistry**. 3. ed. London: Academic Press, 2008. p. 67-91.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagasdisease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 17 de Outubro de 2013.

WILLYARD, C. Neglected diseases see few new drugs despite upped investment. **Nature Medicine**, v. 19, p. 2, 2013.

ANEXO I

Espectro de RMN ^1H do composto 5 contendo anel pirrol e cadeia lateral aminoguanidina (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm).

ANEXO II

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5 derivado do anel pirrol e da cadeia lateral aminoguanidina (300 MHz, DMSO-d_6 , δppm).

ANEXO III

Espectro de RMN ^1H do composto 6 derivado do anel pirrol e cadeia lateral tiossemicarbazida (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm).

ANEXO IV

Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δppm) do composto 6 derivado da tiossemicarbazida e anel pirrol.

ANEXO V

Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do composto 7 derivado da semicarbazida e do anel pirrol.

ANEXO VI

Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 7 derivado da semicarbazida e do anel pirrol.

ANEXO VII

Espectro de RMN ^1H (300 MHz, MetOH- d_4 , δ ppm) do composto 8 derivado da cadeia lateral aminoguanidina e anel 4-dimetilaminobenzaldeído.

ANEXO VIII

Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do composto 9 derivado do anel 4-dimetilaminobenzaldeído e da cadeia lateral tiossemicarbazida.

ANEXO IX

Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 9 derivado da cadeia lateral tiossemicarbazida e do anel 4-dimetilaminobenzaldeído.

ANEXO X

Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do composto 10 derivado da cadeia lateral semicarbazida e do anel 4-dimetilaminobenzaldeído.

ANEXO XI

Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do composto 10 derivado da cadeia lateral semicarbazida e do anel 4-dimetilaminobenzaldeído.