



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Estudos *in silico*, síntese e avaliação de atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro* de novos potenciais inibidores de proteassoma.

Suzane Quintana Gomes

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2023



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Estudos *in silico*, síntese e avaliação de atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro* de novos potenciais inibidores de proteassoma.

Aluna: Suzane Quintana Gomes

Orientador: Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2023

RESUMO

Gomes, S. Q. **Estudos *in silico*, síntese e avaliação de atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro* de novos potenciais inibidores de proteassoma.** 2023. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

As Doenças Tropicais Negligenciadas, leishmaniose e a doença de Chagas, possuem uma defasagem em relação aos seus tratamentos e apresentam efeitos colaterais indesejáveis, toxicológicos, bem como resistência a algumas linhagens dos parasitos. As formas farmacêuticas e posologia desses fármacos contribuem para a sua baixa aderência, implicando num tratamento inadequado e contribuindo ainda mais com a resistência dos protozoários. Diante deste cenário, na tentativa de explorar novos alvos biológicos, iniciou-se a busca por novos inibidores dos proteassomas de *L. braziliensis* e de *T. cruzi*, via estudos *in silico* e síntese orgânica. Neste trabalho, como alternativa ao que vem sendo estudado, explorou-se o proteassoma de *L. braziliensis* e *T. cruzi* como alvo biológico a partir de diferentes metodologias computacionais, além da síntese de potenciais inibidores/bloqueadores desse alvo bem como ensaios de atividade biológica. Os estudos computacionais incluíram a modelagem por homologia estrutural das subunidades $\beta 4/\beta 5$ dos proteassomas de *L. braziliensis* e de *T. cruzi* que foram validados usando o servidor SAVES e dinâmica molecular. Também, aplicou-se a estratégia de reposicionamento de fármacos por meio da triagem virtual baseada em ligantes, seguida de simulações de *docking* para complementar esse estudo, permitindo a análise das interações intermoleculares entre o receptor-ligante, assim preditas. A partir dessa estratégia, foram selecionados 5 candidatos a fármacos para a *L. braziliensis* e 3 para o *T. cruzi*. Ademais, foram realizados estudos de dinâmica molecular dos candidatos a fármacos, além da predição de seus valores de energia de ligação. Na etapa sintética foram obtidas sete moléculas contendo a imidazo[1,2-a]-pirimidina núcleo principal em sua estrutura, cujas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas preditas foram satisfatórias. Por fim, foram realizados ensaios *in vitro* dos fármacos reposicionados e sintetizados contra as formas amastigotas de *L. braziliensis* e de *T. cruzi* que indicam diversos composto com atividade promissora.

Palavras-chave: proteassoma, modelagem por homologia de proteínas, reposicionamento de fármacos, dinâmica molecular, síntese.

ABSTRACT

Gomes, S. Q. ***In silico* studies, synthesis, and evaluation of *in vitro* leishmanicidal and tripanocidal activity of new potential proteasome inhibitors.** 2023. Thesis (Ph.D. in Chemistry) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Neglected Tropical Diseases, leishmaniasis and Chagas disease, have a delay in their treatments and have undesirable side effects, toxicological, as well as resistance to some strains of the parasites. The pharmaceutical forms and dosage of these drugs contribute to its low adherence, implying inadequate treatment and further contributing to the resistance of protozoa. In view of this scenario, in an attempt to explore new biological targets, the search for new inhibitors of *L. braziliensis* and *T. cruzi* proteasomes began, via *in silico* studies and organic synthesis. In this work, as an alternative to what has been studied, the proteasome of *L. braziliensis* and *T. cruzi* was explored as a biological target from different computational methodologies, in addition to the synthesis of potential inhibitors/blockers of this target as well as biological activity assays. The computational studies included structural homology modeling of the $\beta 4/\beta 5$ subunits of the *L. braziliensis* and *T. cruzi* proteasomes that were validated using the SAVES server and molecular dynamics. Also, the drug repositioning strategy was applied through ligand-based virtual screening, followed by docking simulations to complement this study, allowing the analysis of intermolecular interactions between the receptor-ligand, thus predicted. Based on this strategy, 5 drug candidates were selected for *L. braziliensis* and 3 for *T. cruzi*. Furthermore, molecular dynamics studies of drug candidates were carried out, in addition to the prediction of their binding energy values. In the synthetic step, seven molecules containing the imidazo[1,2-a]-pyrimidine main nucleus in its structure were obtained, whose predicted pharmacokinetic and toxicological properties were satisfactory. Finally, *in vitro* assays of the repositioned and synthesized drugs against the amastigote forms of *L. braziliensis* and *T. cruzi* were performed, which indicate several compounds with promising activity.

Keywords: proteasome, protein homology modeling, drug repurposing, molecular dynamics, synthesis.

1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um subconjunto de doenças infecciosas conhecidas por serem prevalentes entre as populações mais pobres.¹ Essas doenças são predominantes nos trópicos, principalmente nas regiões mais quentes, afetando comunidades rurais remotas, favelas urbanas e populações próximas ao equador.^{1,2} Dentre as doenças tropicais negligenciadas destaca-se o grupo cujos agentes etiológicos pertencem à família dos tripanossomatídeos, responsáveis pelas doenças de Chagas, tripanossomíase africana e leishmaniose.² Nas últimas décadas, o financiamento de pesquisas para as doenças tropicais negligenciadas tem recebido pouca atenção, principalmente quando comparado a doenças como a AIDS, a malária e a tuberculose.^{1,3}

A tripanossomíase africana, conhecida como Doença do Sono, é causada pelo protozoário *Trypanosoma brucei* e atinge 36 países subsaarianos^{1,4}. Com uma média de 20 mil casos de infecção registrados, estima-se que 65 milhões de pessoas correm o risco de serem infectadas por esse protozoário⁴.

A doença de Chagas, também chamada de tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que está presente em cerca de 44 países com aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas infectadas no mundo⁵, de modo que a maioria dos infectados se encontra na América Latina⁴.

A transmissão do *Trypanosoma cruzi* se dá por duas principais vias: transmissão vetorial na qual o bicho-barbeiro após picar o ser humano defeca as formas infectantes que podem entrar em contato com a lesão; e a transmissão por via oral que se dá pela ingestão de alimentos contaminados com o vetor triturado ou suas fezes, que está associada a casos de surtos de Doença de Chagas Aguda (DCA). Além disso, a doença de Chagas ainda pode ser transmitida a partir de transfusão sanguínea, via placentária durante a gravidez e, até mesmo, por via acidental em virtude do contato da pele ferida com material contaminado em laboratório ou na manipulação de caça. Aproximadamente 30% dos casos de doença de Chagas podem evoluir para a doença crônica, provocando sérios danos ao coração e ao intestino.¹

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* envolve tanto os hospedeiros vertebrados (mamíferos) quanto os invertebrados (triatomíneos), de modo que o protozoário se apresenta de duas principais formas tanto no homem quanto no vetor: amastigota e tripomastigota.

As formas replicativas não infectantes do *Trypanosoma cruzi* são chamadas de epimastigotas e estão presentes no tubo digestivo dos insetos vetores triatomíneos, também conhecidos como bicho-barbeiros, que são encontrados em todas as regiões do Brasil. Quando a forma epimastigota do *T. cruzi* chega no intestino posterior do vetor se diferencia na forma tripomastigota metacíclica através da metaciclogênese, que é a forma infectante do parasito, e são eliminadas pelas fezes e urina do inseto vetor durante o repasto sanguíneo. A contaminação do hospedeiro vertebrado se dá nessa etapa, e as formas tripomastigotas do *T. cruzi* podem penetrar a pele do hospedeiro via mucosa ou ferimentos. As formas tripomastigotas são capazes de infectar células como macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre outras. Nas células, o *T. cruzi* perde seu único flagelo e muda sua forma para amastigota que permanece no espaço intercelular, de modo que quando o citoplasma da célula hospedeira está saturada da forma amastigota, elas começam a se diferenciar para a forma tripomastigota. Neste momento, a célula se rompe eliminando a forma infecciosa na corrente sanguínea que pode infectar novos tecidos dos hospedeiros.⁶

São considerados reservatórios naturais os animais que carregam o *T. cruzi* na circulação sanguínea e nos órgãos. Tanto animais silvestres quanto animais domésticos podem ser reservatórios naturais de *T. cruzi*, como: gambá, tatu, cães, gatos, macaco, preguiça, rato, entre outros.⁶

Ainda dentro da família dos tripanossomatídeos, encontra-se o protozoário do gênero *Leishmania*, causador das leishmanioses. Com aproximadamente 20 espécies conhecidas, todas são capazes de infectar mamíferos, sendo a maioria responsável pelo desenvolvimento da doença nos seres humanos. A leishmaniose pode se apresentar de dois modos distintos: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT).¹ A leishmaniose visceral, também chamada de calazar, acomete os órgãos internos como fígado e baço, além dos gânglios linfáticos e medula óssea, e é conhecida por ser a forma mais grave dessa doença. A leishmania tegumentar, ou cutânea, é a forma mais comum de leishmaniose, causando ulcerações na pele e, em alguns casos, podendo afetar as mucosas do nariz e da boca (forma mucocutânea).⁷ Mundialmente, a leishmania tegumentar é um problema de saúde pública em 88 países e está entre as seis doenças infecciosas mais importantes segundo a Organização Mundial da Saúde.⁸

Embora somente uma fração das pessoas infectadas pelo protozoário do gênero *Leishmania* desenvolvam a doença, estima-se que anualmente haja a ocorrência de 700 mil a 1 milhão de novos casos e 20 a 30 mil mortes no mundo,⁴ atestando sua reputação entre os grandes causadores de morbidade e mortalidade entre os parasitos humanos.^{1,9} Dentre esses dados

citados, a LV – causada pelas espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* – é responsável pela maior parte das estatísticas de infecção e morte por leishmaniose no mundo.¹⁰

A *Leishmania spp.* é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear. Vale ressaltar que quando o parasito está no intestino de seus insetos vetores, eles estão aderidos em sua parede na forma promastigota procíclica não infectante, e somente após passar pela metaciclogênese se tornam a forma promastigota metacíclica infectante. Nesta etapa, as formas infectantes migram para a faringe e cavidade bucal do inseto e são transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Os mosquitos são os principais vetores da leishmaniose, pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, também conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira e birigui.^{11, 12}

Subsequentemente à picada da fêmea do mosquito flebotomíneo infectada pelos parasitos da *Leishmania*, os promastigotos inoculados na pele são fagocitados e se aderem à superfície dos macrófagos e células de Langerhans, perdendo seu único flagelo e tomando a forma de amastigotos.⁸ Os parasitos que entram nos macrófagos, instalam-se nos fagolisossomos, local onde sobrevivem e se multiplicam podendo se espalhar pelo organismo via o sistema linfático.¹⁰ Aqueles que entram nas células de Langerhans são levados aos linfonodos de drenagem e são apresentadas às células do sistema imune, resultando em um processo inflamatório.

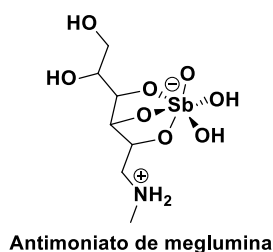
Além do ser humano, mamíferos silvestres como a preguiça, o gambá, roedores e canídeos somados aos mamíferos domésticos como cães e cavalos, também são infectados com os parasitos da *Leishmania* a partir da picada do mosquito flebotomíneo fêmea infectada pelo protozoário⁷, de modo que tais mamíferos podem estar envolvidos secundariamente nas etapas de transmissão de leishmaniose para humanos.

1.1 Tratamentos atuais para leishmanioses e tripanossomíases.

Mesmo com dados tão impressionantes, o investimento em descobertas de novos fármacos para o tratamento das tripanossomíases e leishmaniose têm sido pouco significativo^{10,13}. Os antimoniais pentavalentes antimoniato de meglumina (*N*-metilglucamina) ou estibogluconato de sódio (Figura 1), utilizados como fármacos de primeira linha para o tratamento de LV e LT, foram descoberto há mais de 50 anos^{10,13}. Além desses fármacos apresentarem efeitos colaterais indesejáveis e toxicológicos, algumas populações têm

apresentado resistência aos mesmos^{9,10,13}. Dentre os fármacos de segunda linha, destacam-se a pentamidina, bactericida utilizado no tratamento da pneumonia, a anfotericina B que é um antifúngico e a miltefosina desenvolvida como fármaco anticâncer (Figura 1)^{9,10,13}.

Primeira linha



Segunda linha

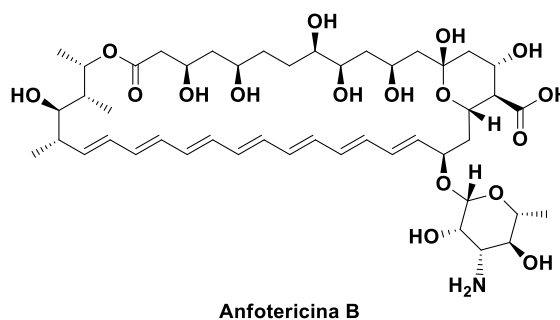
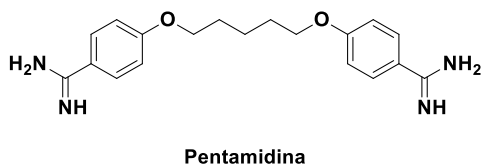
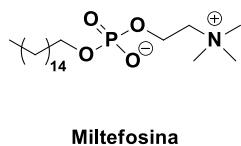


Figura 1. Estruturas químicas dos fármacos de primeira e segunda linha utilizados no tratamento de leishmaniose.

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes está relacionado com a interferência bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania spp.*, ou seja, na transformação de energia das células em trabalho biológico. Neste caso, os processos de glicólise e oxidação dos ácidos graxos nos parasitos são inibidos, resultando na redução da produção de ATP e GTP.⁸

Os antimoniais pentavalentes são administrados por via parental e atingem concentrações plasmáticas elevadas, contudo, as injeções endovenosas apresentam resultados ligeiramente melhores do que as injeções intramusculares em relação às concentrações sanguíneas. Portanto, são necessárias injeções repetidas de antimonial pentavalente para manter os níveis de retenção do fármaco, resultando nos efeitos terapêuticos desejados.⁸ No organismo, uma parte do fármaco é reduzido para a sua forma trivalente (Sb^{3+}) que possui maior afinidade com os tecidos, sendo a forma responsável pela toxicidade, pois, o antimônio na forma

pentavalente é eliminado mais rapidamente pela urina.² Dentre os efeitos adversos causados pelo antimonial pentavalente, estão: dores nas articulações, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda (IRA). Em doses mais elevadas, pode ocasionar problemas cardíacos devido o bloqueio do canal hERG K⁺.⁸

O fármaco anfotericina B é considerado de primeira escolha para o tratamento de gestantes e de segunda escolha para os casos em que não há resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente.⁸ Para que a administração desse fármaco seja de baixo risco para nefrotoxicidade, são preparadas formulações lipídicas e coloidais, resultando na elevação do custo do fármaco.¹⁴ Seu mecanismo de ação envolve a toxicidade seletiva no ergosterol da membrana citoplasmática de *Leishmania spp.*^{8,14}

No caso das pentamidinas, sua administração ocorre via intramuscular profunda de dois em dois dias. Seu mecanismo de ação envolve o metabolismo da glicose, podendo levar à quadros de hipoglicemia seguido de hiperglicemia durante seu uso. Como efeitos adversos são observados: dor, náuseas, vômitos, tontura, cefaleia, hipoglicemia e hiperglicemia, taquicardia, e pancreatite que pode levar à manifestação da *diabetes mellitus*.⁸

Por fim, a miltefosina é um derivado fosfolipídico que está sendo usado no Programa de Eliminação de Leishmania Visceral no Subcontinente Indiano. No entanto, o potencial teratogênico do fármaco, unido a necessidade de um tratamento oral prolongado e a possibilidade de resistência do parasito em relação a esse fármaco tornam o seu uso inapropriado a longo prazo.^{9,10,13}

Os fármacos nifurtimox, benznidazol e fexinidazol são utilizados como tripanocidas (Figura 2). O nifurtimox e o benznidazol são recomendados para o tratamento da doença de Chagas e o fexinidazol é utilizado no tratamento da tripanossomíase africana, também conhecida como a doença do Sono^{15,16}.

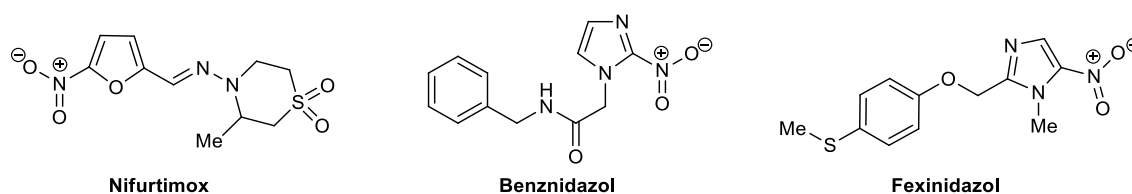
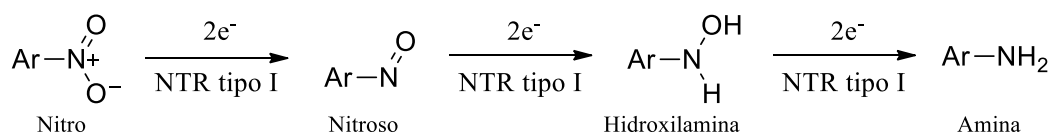


Figura 2. Estruturas químicas dos fármacos nifurtimox, fexinidazol e benznidazol.

Descoberto na década de 70 pela Bayer a partir da triagem *in vitro* contra o *T. cruzi*, o nifurtimox foi utilizado como o principal fármaco contra a fase aguda da doença de Chagas, entretanto, ainda hoje se discute a eficácia do nifurtimox nos diferentes estágios da doença de Chagas, além de seus diversos efeitos colaterais^{16,17}. Somente no ano de 2017 esse fármaco foi aprovado pela agência FDA (*Food and Drug Administration*), embora antes já estivesse disponível nos centros de controle e tratamento dessas doenças.¹⁸ O benznidazol é considerado um fármaco mais bem tolerado quando comparado com o nifurtimox, entretanto, apresenta uma série de efeitos adversos como: reações dermatológicas, agranulocitose (baixa quantidade ou ausência de granulócitos no sangue) e polineuropatia (disfunção dos nervos periféricos).¹⁹

Os fármacos nifurtimox, fexinidazol e benznidazol são considerados pró-fármacos, ou seja, são fármacos cuja forma administrada é inativa e somente após a passagem pelo processo metabólico assumem sua forma/estrutura ativa. A bioativação ocorre no grupo nitro, o grupo pró-fármaco, através das enzimas nitroredutase (NTR) tipo I responsáveis pela catálise da redução de compostos nitroaromáticos para grupos amina. A enzima NTR tipo I é insensível à presença de oxigênio e possui um mecanismo de redução com dois elétrons, sendo a primeira etapa a redução do grupo nitro em nitroso, seguido pela redução em hidroxilamina e, por fim, a redução da hidroxilamina em amina¹⁹ (Esquema 1).



Esquema 1. Mecanismo de redução de grupos nitroaromáticos com 2 elétrons da NTR tipo I.

Apesar do conhecimento do mecanismo de redução do grupo nitroaromático para amina, para os fármacos nifurtimox e fexinidazol, é desconhecido o processo que desencadeia a morte dos parasitos, seja pela interrupção das funções mitocondriais ou pela ação dos metabólitos tóxicos que atingem alvos fora das mitocôndrias.²⁰ No caso do benznidazol, as etapas da NTR tipo I são as mesmas, porém, estudos apontam que a hidroxilamina formada nesta etapa é convertida em um dialdeído glicoxal altamente reativo capaz de formar complexos com proteínas, DNA e RNA, resultando em um efeito tóxico tripanocida tanto contra as formas intra-quanto extracelulares do parasito^{21,22}. Outra proposição de mecanismo de ação é a ligação covalente entre diferentes metabólitos reativos de baixo peso molecular como os tióis, importantes para a ação antioxidante da glutatona e tripanotona, considerado o principal modo de ação do benznidazol^{21,22}.

É importante ressaltar que a NTR tipo I é uma enzima incomum encontrada nos tripanossomatídeos, pois é característica de bactérias e não existe uma enzima homóloga nos mamíferos, o que torna essa enzima ainda mais interessante dada a toxicidade seletividade do processo^{19,23}. Além disso, quando o teste de Ames – usado para detectar a mutagenicidade de um composto – é aplicado em bactérias na presença de nitroaromáticos, esses compostos são ativados seletivamente resultando em um teste positivo.¹⁹ Particularmente, os ensaios de Ames utilizados para avaliar a mutagenicidade em mamíferos geralmente são feitos utilizando a *Salmonella typhimurium*, uma bactéria que obviamente dará positivo para o teste, não refletindo a realidade sobre a toxicidade sobre as células mamíferas^{19,20}.

Ainda neste contexto, diversos alvos e vias biológicas associadas ao *T. cruzi* têm sido investigados quanto à sua farmacologia. Para citar alguns: via de Biossíntese de Ergosterol, Tripanotiona Redutase (TR), Enolase, Cruzaína ou Cruzipaína (Cz), Enzima Ribose 5-Fosfato Isomerase (Rpi), Isocitrato Desidrogenase 2 (IDH2), Dihidrofolato Redutase–Timidilato Sintase (DHFR-TS), Pteridina Redutase, Farnesil Difosfato Sintase (FPPS) e Sirtuínas.¹⁴ Entretanto, a busca por novos alvos biológicos seletivos para o *Trypanosoma cruzi* continua.

1.2 A Leishmaniose no Brasil

No Brasil estão presentes as duas formas de leishmaniose. A espécie responsável pela LV é a *Leishmania infantum*¹⁰, e as principais espécies causadoras da LT são a *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e a *Leishmania braziliensis*¹¹. Ademais, vale ressaltar que novas espécies de *Leishmania spp.* foram descobertas nos últimos anos nas regiões Norte e Nordeste, que são: *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) lindenberg* e *Leishmania (V.) shawi*.⁸ A *Leishmania braziliensis* foi a primeira espécie descrita como agente etiológico da leishmaniose tegumentar em 1911, e hoje está presente não somente em todo o Brasil, mas em parte da América Central e do Norte e em toda a América Latina, com exceção do Chile e Uruguai.¹¹

A leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa, porém não contagiosa, que acomete a pele e a mucosa. No Brasil, a classificação clínica da LT é dada por: (1) infecção inaparente; (2) leishmaniose linfonodal; e (c) leishmaniose cutânea. O tratamento de leishmaniose tegumentar no Brasil é feito através do uso de antimoniatos de *N*-metilglucamina – um antimonial pentavalente – com a aplicação de injeções intralesionais desse fármaco em

menores doses, segundo o protocolo desenvolvido pelo Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI).²⁴ Esse tratamento é recomendado para todos os tipos de LT, embora possa apresentar respostas mais lentas e recidivas para as formas mucosas.⁸ Como citado anteriormente, os antiomoniais pentavalentes são acompanhados de efeitos adversos, que forçam a suspensão do tratamento. No Brasil, esse fármaco é distribuído gratuitamente na rede pública de saúde. No caso das pentamidinas, elas têm sido utilizadas como fármacos de segunda escolha no tratamento da LT no Brasil. Para a leishmaniose visceral, o tratamento é realizado com o uso de antimoniato de *N*-metilglucamina, anfotericina B lipossomal (fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol) e o desoxicolato de anfotericina B. O Ministério da Saúde do Brasil deixa claro em sua página na internet que esses tratamentos de LV não são capazes de eliminar por completo a presença do protozoário no corpo humano e de reservatórios animais como cães.²⁴ Além do mais, a anfotericina B lipossomal está registrada na Anvisa apenas para o uso no tratamento da LV, de tal forma que quando seu uso é prescrito para o tratamento de LT ela passa a ser considerada um fármaco *off label* (uso fora da bula).

1.3 A Doença de Chagas no Brasil

Segundo os dados do Boletim Epidemiológico de 2021 do Ministério da Saúde, estima-se que pelo menos um milhão de brasileiros estão infectados pelo *Trypanosoma cruzi* por todo o país. No ano de 2020, a taxa de incidência da Doença de Chagas Aguda foi de 95% na região Norte com 146 casos confirmados, sendo que 88,36% desses casos ocorreram somente no Pará e com óbitos presentes apenas neste estado (2% de letalidade). Com dados alarmantes, a maioria dos casos ocorreu em jovens adultos do sexo masculino, e dentre as pessoas infectadas do sexo feminino, cerca de 6% eram mulheres gestantes. Ademais, 85% dos casos declararam-se como pertencentes à cor parda.²⁵

De 2014 a 2018, os principais triatomíneos encontrados intradomicílio foram: *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Triatoma brasiliensis*. Enquanto em peridomicílio foram encontrados principalmente o *Triatoma sordida*, além das espécies *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma brasiliensis*.⁶

No Brasil, o tratamento da doença de Chagas se faz por meio do fármaco benznidazol. Em casos de intolerância ou falta de resposta ao tratamento, o Ministério da Saúde disponibiliza

o nifurtimox como alternativa.⁶ No período de 2016 a 2020, foram distribuídos quase 1,5 milhão de comprimidos de benznidazol 100 mg, com um total de R\$ 591.975,33. Como esperado, a região Norte recebeu o maior quantitativo médio. É importante ressaltar que apesar de a taxa de incidência na região Sudeste ser relativamente baixa em relação à região Norte, os estados de Minas Gerais e São Paulo estão entre os que receberam as maiores médias de comprimidos de benznidazol durante o período de 2016-2020.²⁵

O fármaco benznidazol é produzido pelo Laboratório Federal de Pernambuco (LAFEPE) e distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS) após prescrição médica, seja em casos agudos ou crônicos. Vale ressaltar que a própria Fiocruz alerta sobre a falta de garantia de eficácia total desse tratamento.²⁶

O benznidazol possui forma farmacêutica de comprimidos que são administrados por via oral. A dose diária para adultos deve ser de 5 a 7 mg/kg de peso corporal, com esse total dividido em duas doses com um intervalo de 12 horas entre elas e o tratamento deve ser mantido durante 30 a 60 dias consecutivos.²⁷ Recomenda-se ainda administrar uma dose após o café da manhã e outra após o jantar. No caso de crianças com menos de 12 anos de idade, em especial as que se encontram na fase aguda da doença, a recomendação é de 5 a 10 mg/kg de peso corporal durante 60 dias consecutivos.²⁷

1.4 O proteassoma como alvo biológico para a leishmaniose e as tripanossomíases

Em um contexto geral, os avanços do conhecimento científico e o aperfeiçoamento dos métodos computacionais têm contribuído na busca e otimização de novos fármacos. A busca racional por novos fármacos com ação anti-tripanosomatídeo é favorecida pelo fato de que a organização celular desses protozoários não é a mesma em relação aos mamíferos e, consequentemente, os caminhos biológicos de ambos são diferentes.² Essa vantagem pode ser explorada para a descoberta de novos alvos biológicos dos protozoários, como por exemplo: mecanismo de replicação de DNA dos kinetoplastídeos, transportadores de proteínas, ciclo celular, proteassoma e proteases.² Desde que o proteassoma foi descoberto, ele tem sido utilizado como um alvo terapêutico essencial, principalmente no tratamento do câncer. No entanto, devido ao papel do proteassoma nas células, ele também se mostra um alvo promissor para outros distúrbios e doenças diferentes.

O proteassoma é um complexo proteico responsável pela degradação intracelular de proteínas, constituído por dois subcomplexos: a partícula central catalítica (CP ou 20S) e da partícula regulatória (RP ou 19S). O subcomplexo 20S é responsável pelas atividades proteolíticas do proteassoma, enquanto que o 19S é responsável pelo reconhecimento, desnaturação e transferência da proteína para o interior do subcomplexo 20S.^{28,29} Consequentemente, a inibição do proteassoma interfere na degradação ordenada das proteínas do ciclo celular, resultando na morte celular programada (apoptose).^{28,29} A estrutura da partícula catalítica 20S presente no proteassoma pode ser observada na Figura 3.

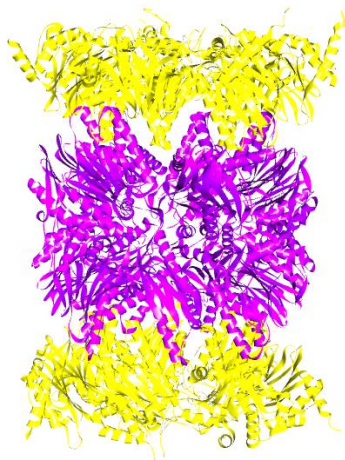


Figura 3. Estrutura da partícula catalítica 20S do proteassoma. As subunidades α estão representadas em amarelo e as subunidades β em roxo. (representação em *Ribbons* da estrutura de código PDB:5LF3).

O sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) é responsável pela regulação inicial da depuração de proteínas dobradas e desnecessárias nas células.³⁰ O processo de depuração começa com a adição de ubiquitina nas proteínas que serão degradadas, resultando em uma proteína poliubiquitinada.³¹ Em seguida, o proteassoma do complexo proteolítico reconhece esta proteína e inicia sua degradação em pequenos peptídeos que variam de 2 a 24 resíduos de comprimento. O reconhecimento da proteína poliubiquitinada ocorre na partícula reguladora (RP ou 19S), que também é responsável pela desnaturação e transferência da proteína marcada para o centro catalítico da partícula (CP ou 20S).^{28,29} Consequentemente, a proteína é degradada na partícula catalítica 20S, que é constituída por uma partícula central cilíndrica com uma cavidade formada por um anel externo contendo sete subunidades α homólogas e um anel interno com sete subunidades β homólogas. As subunidades β_1 , β_2 e β_5 que compõem o anel interno e o sítio catalítico são responsáveis pelas atividades proteolíticas do tipo caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente, atuando de maneira sinérgica para degradar resíduos ácidos, básicos e hidrofóbicos. O anel externo constitui uma barreira protetora do sítio catalítico

do proteassoma, e é responsável por impedir que qualquer proteína presente no ambiente biológico entre no local³².

O potencial do proteassoma como alvo provém do seu papel no ciclo celular. Estudos demonstraram que o proteassoma está envolvido em alguma progressão do ciclo celular, como na regulação das ciclinas, proteína p53, caspases, atividade BCL-2 e fator nuclear de κ B (NF- κ B)³³. Em uma célula saudável, durante sua fase de crescimento, as ciclinas são rapidamente degradadas pelo proteassoma após sua ativação no ciclo celular, bem como pelos inibidores dos complexos dependente de ciclina quinase (CDK)³⁴⁻³⁶. Por esse motivo, quando o proteassoma é inibido, uma falha ocorre no mecanismo de regulação de ciclinas e CDKs, levando a um atraso ou interrupção do ciclo celular.

A proteína de curta duração p53 pode ser acumulada nas células eucarióticas quando a mesma está sob condições de estresse, induzindo respostas celulares como parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose³⁷. A regulação do excesso de p53 no organismo é realizada pela ubiquitina ligase MDM2, sinalizando que a p53 deve ser degradada pelo proteassoma, a fim de retornar às concentrações normais da célula^{38,39}. Vale ressaltar que algumas células cancerígenas superexpressam a MDM2, evitando o acúmulo de p53 e, portanto, suprimindo as respostas celulares⁴⁰. Nesse caso, o tratamento de inibição do proteassoma permite o acúmulo de p53, o que proporciona uma condição celular capaz de induzir apoptose nessas células tumorais.

Diferentemente da proteína p53, o fator nuclear κ B (NF- κ B), quando livre no citoplasma, é capaz de evitar o processo apoptótico na célula. Para regular o NF- κ B, a proteína I κ B se liga ao fator nuclear que o inativa, permitindo que ocorra apoptose⁴¹. Curiosamente, quando uma célula é estimulada por quimioterapia, I κ B é fosforilada e ubiquilada, seguida pela degradação do proteassoma⁴², já que em uma célula tumoral não é desejável encontrar o NF- κ B ativado. Portanto, a inibição do proteassoma é uma maneira de manter o I κ B no citoplasma para regular o fator nuclear κ B.

Em 2016 foi publicado o primeiro estudo envolvendo o proteassoma de kinetoplastídeos como alvo biológico pelo *Genomics Institute of the Novartis Research Foundation* (GNF)⁴³. A triagem inicial envolveu a utilização de *High-throughput screening* (HTS) a fim de selecionar compostos com baixo peso molecular que apresentassem um efeito inibidor de crescimento (EC₅₀) nas espécies de *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. Para tanto, foram testados cerca de 3 milhões de compostos em todos os três parasitos, seguido de triagem dos ativos com EC₅₀ < 10 μ M e com uma janela de seletividade de cinco vezes ou mais em relação à inibição do crescimento de células de mamífero. Da triagem foi selecionado um

composto azabenzoxazol, chamado de **GNF5343** (Figura 4), identificado primeiramente como *hit* para a *L. donovani* e *T. brucei* e, posteriormente, para *T. cruzi*. A partir desse *hit*, realizaram modificações em sua estrutura visando à melhoria da biodisponibilidade e da potência de inibição do crescimento do parasito dentro dos macrófagos, chegando ao composto **GNF6702** (Figura 4).

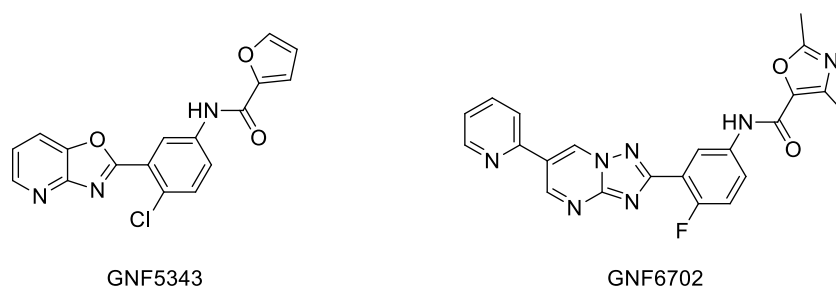


Figura 4. Estruturas do *hit* **GNF5343** e do composto final otimizado **GNF6702**.

O composto **GNF6702** foi, então, testado em camundongos infectados com *L. donovani* usando como padrão uma dose oral próxima à concentração da miltefosina no plasma, resultando em uma redução de 90% da carga parasitária. Os resultados obtidos para cada espécie foram: *L. donovani* $EC_{50} = 18 \pm 1,8$ nM, *T. brucei* $EC_{50} = 70 \pm 1,5$ nM, *T. cruzi* $EC_{50} = 120 \pm 2,6$ nM; e a citotoxicidade para as células humanas 3T3 com $CC_{50} > 20 \mu\text{M}$ e para os macrófagos $CC_{50} > 50 \mu\text{M}$. Ainda que o composto **GNF6702** tenha apresentado um ótimo resultado contra as cepas selvagens, quando testado em cepas resistentes apresentou pouco ou nenhum efeito. No artigo, os autores descrevem uma série de estudos para elucidar a região em que o inibidor se encontrava, pois não havia nenhuma estrutura cristalográfica do proteossoma de nenhum tripanossomatídeo até então. De acordo com seus estudos, o inibidor se encontraria em um sítio alostérico dentro da subunidade $\beta 4$, mas interagindo na interface das subunidades $\beta 4/\beta 5$, uma suposição que futuramente se mostraria equivocada.

Em 2019, Wyllie e colaboradores publicaram um estudo de novos inibidores de proteossoma para o tratamento de leishmanias visceral⁴⁴. Neste estudo, o composto *hit* **GSK1** (Figura 5) encontrado foi identificado a partir da triagem fenotípica de uma biblioteca com 15.659 compostos contra o parasito *Trypanosoma cruzi* que apresentou um valor de $EC_{50} = 0,22 \mu\text{M}$. Esse mesmo *hit* foi testado contra a *L. donovani* e apresentou um valor de $EC_{50} = 5,7 \mu\text{M}$. Para melhorar tanto a estabilidade metabólica *in vitro* quanto a potência do inibidor, o composto *hit* **GSK1** passou por modificações estruturais chegando no composto final **GSK3494245** (Figura 5) com um $EC_{50} = 1,6 \mu\text{M}$, com uma solubilidade de $180 \mu\text{g/mL}$ e estabilidade metabólica *in vitro* de $CL_{int} = 0,8 \text{ mL/min}$ por grama, além de seletividade sobre as

células de mamíferos. Ademais, os autores publicaram a estrutura cristalográfica do proteassoma da *Leishmania tarentolae* complexada com o inibidor **GSK3494245** utilizando a técnica de microscopia crio-eletrônica (cryo-EM) com uma resolução de 2,8 Å. A partir da estrutura cristalográfica, os autores puderam constatar que o inibidor **GSK3494245** está localizado na interface $\beta 4/ \beta 5$ do proteassoma. Embora Kare e Nagle já tivessem previsto que esse tipo de inibidor se encontraria na interface das subunidades $\beta 4/ \beta 5$ do proteassoma, com a estrutura cristalográfica foi possível afirmar que o inibidor se encontra na subunidade $\beta 5$ do proteassoma, ou seja, região na qual se encontra o sítio ativo responsável pela atividade do tipo quimotripsina. Vale ressaltar que no ano de 2021, Thomas e colaboradores⁴⁵ publicaram um artigo no qual relatam a estratégia de química medicinal utilizada na identificação do composto **GSK3494245**.

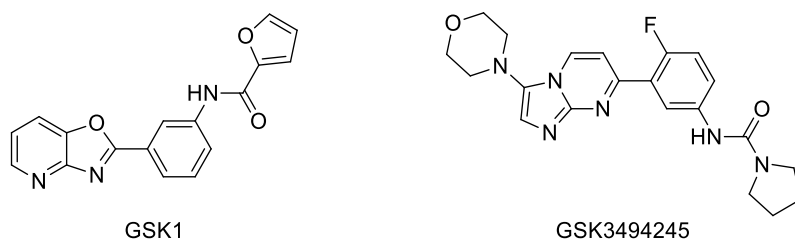


Figura 5. Estrutura do *hit* **GSK1** e do composto final otimizado **GSK3494245**.

Por fim, em 2020, Nagle e colaboradores publicaram a descoberta e caracterização do composto **LXE408** (Figura 6) de $EC_{50} = 40$ nM, uma versão otimizada do composto **GNF6702**, por meio da adição de uma metila no anel pirimidínico. Nesse artigo, eles também apresentam a estrutura crio-EM de alta resolução da *Leishmania tarentolae* complexada com o inibidor **LXE408** (PDB 6TD5). Em agosto de 2022 o composto **LXE408** teve seus ensaios clínicos de Fase I finalizados para o tratamento de leishmaniose visceral, com previsão para continuação com ensaios clínicos de Fase II.⁴⁶

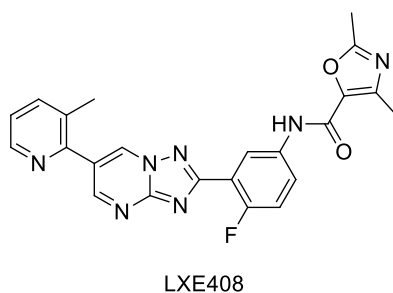


Figura 6. Estrutura do inibidor de proteassoma de *L. donovani* **LXE408**.

1.5 Estratégias in silico utilizadas na Química Medicinal

Um dos grandes desafios na área de descoberta de novos candidatos a fármacos está diretamente relacionado a eficiência desse processo no qual estão envolvidos o tempo de seleção do alvo biológico, a identificação de moléculas químicas bioativas que atuem no determinado alvo e a otimização dessas estruturas químicas para que possam prosseguir para as etapas de ensaios clínicos. Somente para a etapa de descoberta de novos candidatos a fármacos estima-se que haja um gasto de tempo de aproximadamente 6 anos, nos quais são acrescidos aproximadamente mais 7 anos das etapas de ensaios clínicos, além dos altos custos financeiros despendidos durante todo o processo.^{47,48}

Por esse motivo, a busca por novas estratégias aplicadas à descoberta de novos candidatos a fármacos tem crescido nas últimas décadas. Entre elas destaca-se o uso de ferramentas computacionais que tem se tornado cada vez mais presente no processo moderno de descoberta de novos fármacos, pois são capazes de aumentar a eficiência da descoberta de compostos bioativos específicos para determinados alvos biológicos juntamente com a redução de tempo e gastos financeiros. Com o advento do planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD, *computer-aided drug discovery*) novas ferramentas têm sido desenvolvidas e refinadas tanto para descoberta e validação de novos alvos biológicos quanto para a triagem e seleção dos compostos bioativos mais promissores.⁴⁸

Nas últimas décadas, os avanços na biologia molecular e técnicas cristalográficas, somados ao poder computacional, foram capazes de fornecer informações estruturais de alta qualidade para uma vasta gama de alvos biológicos, beneficiando desde a seleção de novos alvos biológicos até a otimização de compostos bioativos. Usualmente, as proteínas são os alvos biológicos de relevância no processo de descoberta de fármacos, portanto, o conhecimento de suas estruturas tridimensionais (3D) é de extrema importância, pois estão diretamente relacionadas à função da proteína no organismo. Embora a elucidação experimental das estruturas tridimensionais de proteínas utilizando técnicas como cristalografia por raios-x e espectroscopia por RMN tenha aumentado rapidamente nas últimas décadas⁴⁹, as dificuldades nas etapas de isolamento e na cristalização de proteínas ainda são um problema na determinação estrutural de proteínas. Dados apontam que até o ano de 2020 mais de 185 milhões de sequências de proteínas tenham sido depositadas na base de dados pública UniProtKB, entretanto, apenas 151.504 estruturas 3D de proteínas estão disponíveis no PDB (*Protein Data Bank*). Devido às dificuldades encontradas na elucidação estrutural das proteínas,

o uso das metodologias computacionais na modelagem de proteínas tem ganhado cada vez mais atenção nos últimos anos, sendo os métodos computacionais mais comuns: (a) baseada em modelo de proteínas que já possuam estruturas 3D resolvidas (modelagem por homologia); (b) baseada no método *ab initio* que não necessita de proteínas com estruturas tridimensionalmente resolvidas.^{50,51}

A metodologia de modelagem por homologia estrutural de proteínas se baseia no fato de que proteínas que estão evolutivamente relacionadas compartilham estruturas tridimensionais que foram conservadas durante a evolução e, assim, podem ser classificadas como pertencentes à mesma família (proteínas homólogas).⁵² Desse modo, conhecendo-se a estrutura de apenas uma proteína, é possível descrever a estrutura tridimensional de todas as proteínas pertencentes à mesma família.⁵⁰

O interesse pelas estruturas tridimensionais das proteínas é proveniente dos avanços nos estudos de descoberta de fármacos baseados na estrutura (SBDD, *Structure-Based Drug Design*) e planejamento de fármacos (*drug design*). A SBDD trabalha com a busca de novas moléculas que tenham a capacidade de interagir com uma proteína específica e, assim, exercer um efeito biológico desejado através de suas interações físico-químicas como ligante-inibidor ou ligante-ativador.⁵³ Com a estrutura do alvo biológico em mãos, é possível aplicar a metodologia de descoberta de candidatos a fármacos baseada na estrutura. Nesta etapa são testados de milhares a milhões de compostos a fim de selecionar moléculas com potencial para se tornarem fármacos, chamados de *Hits*, que pode ser feito a partir de procedimentos experimentais *in vitro* ou através de metodologias computacionais.

Uma das estratégias mais aplicadas nas indústrias farmacêuticas é a chamada *High Throughput Screening* (HTS) ou *Triagem de Alto Desempenho*, que consiste em um processo automatizado de ensaio *in vitro* capaz de testar grandes bibliotecas de compostos contendo milhares ou milhões de moléculas contra um determinado alvo biológico.⁵⁴ Embora o uso do HTS seja vantajoso em relação à capacidade de gerar um grande número de resultados em pouco tempo, é necessário que haja um balanço no investimento desta tecnologia, pois uma escolha ruim pode refletir em fracassos na utilização do HTS como a geração de vários falsos positivos ou falsos negativos provenientes de interferências no sinal que mascaram a verdadeira atividade dos compostos.

No campo do CADD, a metodologia empregada para realizar a SBDD é feita através do *docking* molecular, no qual é possível prever a estrutura do complexo receptor-ligante e as interações químicas que ocorrem entre os resíduos de aminoácido do sítio de ligação e o ligante. Desse modo, por meio do algoritmo do programa de *docking*, calcula-se a energia de interação

entre as duas moléculas com base em suas estruturas tridimensionais que são classificadas de acordo com uma função de pontuação. Portanto, a partir do *docking* molecular pode-se fazer uma triagem virtual com bibliotecas contendo milhões de compostos e com grande variedade de estruturas químicas semelhante com o que é feito com o HTS, porém de forma virtual. Essa técnica é chamada de Triagem Virtual Baseada na Estrutura (SBVS, *Structure-Based Virtual Screening*), na qual seleciona-se um alvo biológico validado e com estrutura 3D resolvida e aplica-se *docking* molecular para filtrar e selecionar compostos promissores de acordo com o modo de ligação que deve se aproximar de resultados experimentais.⁵⁵

Quando a estrutura do alvo biológico não é conhecida, mas existe uma molécula conhecida capaz de se ligar e ativar um receptor para induzir uma reação biológica (agonista) ou capaz de se ligar a um receptor e inibir sua resposta biológica (antagonista), pode-se aplicar a metodologia chamada de descoberta de fármacos baseada no ligante (LBDD, *Ligand-Based Drug Design*), ou seja, um composto já conhecido por sua atividade é usado para identificar novos potenciais compostos baseados em suas características farmacofóricas em comum. Ainda dentro da metodologia pode-se aplicar a Triagem Virtual Baseada em Ligantes (LBVS, *Ligand-Based Virtual Screening*)⁵⁶, que se baseia no mesmo princípio de que a SBVS: realizar a triagem de bibliotecas contendo milhões de compostos, porém baseada na semelhança das estruturas químicas entre as moléculas. No caso da LBVS, faz-se uma filtragem sistemática dos compostos de acordo com fluxo de trabalho desejado. Por exemplo, o primeiro e mais comum filtro aplicado na LBVS é o de semelhança estrutural entre a molécula de referência e as moléculas da base de dados. Para aumentar as chances de selecionar moléculas promissoras, pode-se aplicar outros diferentes filtros como: semelhança eletrostática, predição de toxicidade dos compostos, predição das propriedades do tipo ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e predição de propriedades do tipo fármaco (*drug-likeness*) que avalia qualitativamente a biodisponibilidade de uma molécula e sua capacidade de se tornar um fármaco oral.⁵⁵

É importante ressaltar que os filtros aplicados tanto em estudos de SBDD e LBDD não seguem uma regra fixa e podem ser aplicados de maneiras diferentes de acordo com o estudo desenvolvido, o objetivo dos pesquisadores, os dados de pesquisa disponíveis, a capacidade computacional e os programas disponíveis.

Outra metodologia computacional importante e muito utilizada é a simulação de dinâmica molecular (DM). A simulação de DM utiliza ferramentas numéricas baseada nas equações de movimentos de Newton, de modo que durante as simulações contendo n corpos as forças das partículas e as energias potenciais do sistema são atualizadas.⁵⁷ Como resultado

obtem-se um conjunto de quadros referentes à trajetória completa simulada, de modo que cada passo de tempo da DM é um quadro que representa o sistema em um ponto específico do tempo (um estado microscópico específico).^{57,58}

Diferentemente do *docking* molecular que prediz a pose de ligação e auxilia na proposição da afinidade de ligação de um complexo proteína-ligante, a dinâmica molecular permite simular o comportamento dinâmico das moléculas ao longo do tempo, levando em conta as flutuações térmicas e os movimentos das partículas. Nos estudos de dinâmica molecular de um complexo proteína-ligante é possível observar os movimentos de todos os átomos em um ambiente contendo solvente simulando um ambiente fisiológico por meio das trajetórias, assim como observar o comportamento e fazer previsões sobre a afinidade de ligação dos ligantes ao receptor.^{57,58} Ou seja, é possível obter interações e conformações mais realistas, especialmente em sistemas biológicos complexos. Além disso, através da simulação de DM é possível realizar cálculos de energia livre de ligação, número de ligações de hidrogênio que ocorrem durante a trajetória e quais os principais resíduos de aminoácidos que estão envolvidos na interação receptor-ligante.

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Na busca por tratamentos mais eficazes ou alternativos contra as leishmanioses e a Doença de Chagas, tanto a exploração, bem como a continuidade do estudo de novos alvos biológicos e seus inibidores é fundamental para alcançar os resultados almejados. Assim, os estudos computacionais, a modelagem por homologia das subunidades $\beta 4/\beta 5$ dos proteassomas de *L. braziliensis* e *T. cruzi* foram satisfatórias de acordo com a sua validação usando os programas PROCHECK, Verify 3D, ERRAT, PROVE e WHAT IF, e baseados nos resultados obtidos com a dinâmica molecular quando comparados com os resultados obtidos para a estrutura cristalográfica do proteassoma de *L. tarentolae*.

Na validação das coordenadas do sítio ligante, o melhor resultado obtido foi X:146,1752; Y:-15,1932 e Z:-8,3950, com uma esfera de raio de 11Å e com os resíduos TYR26 e TYR323 flexíveis para a *L. braziliensis*, confirmado pelo resultado do valor AUC de 0,702 proveniente da curva ROC. A mesma coordenada foi utilizada para o *T. cruzi*, porém com os resíduos PHE24 e TYR319 flexíveis e validada pelo resultado do valor AUC de 0,635.

A validação da estratégia LBVS juntamente com a predição da toxicidade dos compostos permitiu um reposicionamento de fármacos para atuarem como potenciais inibidores do proteassoma da *Leishmania braziliensis* e do *Trypanosoma cruzi*. Além disso, o acesso à estrutura do sítio ativo do proteassoma dessas espécies por meio da modelagem por homologia foi bem-sucedido, bem como seu uso em simulações de *docking*, o que permitiu a análise das interações químicas do complexo estrutura-ligante para selecionar fármacos com estruturas diferentes. Os três fármacos reposicionados e os compostos sintetizados foram testados contra as formas amastigotas de *T. cruzi*. Os resultados dos ensaios biológicos mostraram que o melhor resultado de inibição foi para o fármaco Sorafenibe, porém com uma alta toxicidade.

Com relação aos compostos sintetizados e sua rota sintética inicial proposta, foi necessário alterar as etapas de síntese para se obter os produtos de interesse. A nova proposta apresentou o composto 1-(5-amino-2-fluorofenil)etanona como o intermediário em comum entre os compostos, a partir do qual foi possível inserir diversos grupos funcionais através de reações de formação de amida e a produção de sete moléculas finais (**1**, **34**, **35**, **36**, **37**, **38** e **39**) contendo o núcleo imidazo[1,2-a]-pirimidina. Todos os compostos sintetizados tiveram suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas preditas com resultados satisfatórios.

Por fim, os ensaios *in vitro* contra o *Trypanosoma cruzi* mostraram que nenhum dos fármacos reposicionados foi capaz de inibir o parasito e que o composto sintetizado **35** apresentou o melhor resultado de inibição, embora esse resultado não pareça promissor/adequado para prosseguir com outros ensaios biológicos. No caso dos ensaios *in vitro* contra a *Leishmania braziliensis*, o composto sintetizado **38** apresentou o melhor resultado de inibição, porém com alta toxicidade.

Portanto, os próximos passos incluem a continuação dos estudos computacionais na busca de novos inibidores de proteassoma de *L. braziliensis* e *T. cruzi* através da triagem virtual utilizando diferentes bases de compostos, adicionando outras metodologias computacionais como, por exemplo, a SBVS. Como relação aos compostos sintetizados, deve-se estudar as possíveis modificações na estrutura o composto **38** e propor novos análogos que sejam capazes de melhorar a sua eficácia e reduzir sua citotoxicidade com o auxílio de ferramentas de estudos *in silico*.

3. REFERÊNCIAS

1. Feasey, N., Wansbrough-Jones, M., Mabey, D. C. W. & Solomon, A. W. Neglected tropical diseases. *Br. Med. Bull.* **93**, 179–200 (2010).
2. Cavalli, A. & Bolognesi, M. L. Neglected tropical diseases: Multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against Trypanosoma and Leishmania. *J. Med. Chem.* **52**, 7339–7359 (2009).
3. World Health Organization. Global report for research on infectious diseases of poverty. 184 (2012).
4. World Health Organization.
5. Médicos Sem Fronteiras. Available at: https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas/?utm_source=adwords_msf&utm_medium=&utm_campaign=doencas_geral_comunicacao&utm_content=_exclusao-saude_brasil_39923&gclid=Cj0KCQiAorKfBhC0ARIsAHDzslvY3HjfUuflIYU8IrCfM1SDIcUXVY9cNPtT.
6. Doença de Chagas - Ministério da Saúde do Brasil. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>.
7. Fiocruz.
8. Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. atual. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde* (2010).
9. Hotez, P. J. *et al.* Control of Neglected Tropical Diseases. *N. Engl. J. Med.* **357**, 1018–1027 (2007).
10. Ready, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin. Epidemiol.* **6**, 147–154 (2014).
11. Leishmania Tegumentar - Ministério da Saude do Brasil. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica>.
12. Leishmania Visceral - Ministério da Saude do Brasil. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>.
13. Barrett, M. P. & Croft, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Br. Med. Bull.* **104**, 175–196 (2012).
14. Kourbeli, V. *et al.* An overview on target-based drug design against kinetoplastid protozoan infections: Human african trypanosomiasis, chagas disease and

- leishmaniasis. *Molecules* **26**, (2021).
15. Drugs for Neglected Diseases initiative - DNDi. Available at: <https://www.dndial.org/2018/comunicacao-e-informacao/press-releases/a-agencia-europeia-de-medicamentos-recomenda-o-uso-do-fexinidazol-o-primeiro-tratamento-exclusivamente-oral-para-a-doenca-do-sono>.
 16. Jackson, Y. *et al.* Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic Chagas disease. *Clin. Infect. Dis.* **51**, 6–12 (2010).
 17. Dias, L. C. *et al.* Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim. Nova* **32**, 2444–2457 (2009).
 18. Drugs for Neglected Diseases initiative - DNDi. Available at: <https://dndi.org/press-releases/2017/fda-approves-benznidazole-chagas-children/>.
 19. Patterson, S. & Wyllie, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.* **30**, 289–298 (2014).
 20. Thomas, J. *et al.* Insights into antitrypanosomal drug mode-of-action from cytology-based profiling. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, 1–19 (2018).
 21. Müller Kratz, J., Garcia Bournissen, F., Forsyth, C. J. & Sosa-Estani, S. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **11**, 943–957 (2018).
 22. Caldas, I. S., Santos, E. G. & Novaes, R. D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. *Expert Opin. Pharmacother.* **20**, 1797–1807 (2019).
 23. Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M. & Cheeseman, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5022–5027 (2008).
 24. Ministério da Saúde. Available at: <http://www.blog.saude.gov.br/index.php/52842-sus-oferece-diagnostico-e-tratamento-gratuitos-contr-a-leishmaniose>.
 25. Saúde, B. M. da S. S. de V. em. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas. *MINISTÉRIO DA SAÚDE Secr. Vigilância em Saúde* 1–38 (2021).
 26. Fiocruz - Doença de Chagas. Available at: <https://agencia.fiocruz.br/doenca-de-chagas>.
 27. LAFEPE. doi:https://www.lafepe.pe.gov.br/wp-content/uploads/2018/08/benznidazol_bula_profissional_bilingue.pdf
 28. Tanaka, K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **85**, 12–36 (2009).
 29. ADAMS, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.* **29**, 3–9 (2003).

30. Wong, E. & Cuervo, A. M. Integration of Clearance Mechanisms : The Proteasome and Autophagy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a006734 (2010).
31. Pevzner, Y., Metcalf, R., Kantor, M., Sagaro, D. & Daniel, K. Recent advances in proteasome inhibitor discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **8**, 537–568 (2013).
32. Goldberg, A. L. *Bortezomib in the Treatment of Multiple Myeloma*. (Springer Basel, 2011). doi:10.1007/978-3-7643-8948-2
33. Adams, J. The proteasome: A suitable antineoplastic target. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 349–360 (2004).
34. Clurman, B. E., Sheaff, R. J., Thress, K., Groudine, M. & Roberts, J. M. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev.* **10**, 1979–1990 (1996).
35. Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132–138 (1991).
36. Murray, A. W. Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell* **116**, 221–234 (2004).
37. Chène, P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: An important target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 102–109 (2003).
38. Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* **420**, 25–27 (1997).
39. Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H. & Weissman, A. M. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* **275**, 8945–8951 (2000).
40. Momand, J., Wu, H. H. & Dasgupta, G. MDM2 - Master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **242**, 15–29 (2000).
41. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. & Li, Z. W. NF- κ B in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 301–310 (2002).
42. Li, C.-C. H., Dai, R.-M. & Longo, D. L. Inactivation of NF- κ B Inhibitor I κ B: Ubiquitin-Dependent Proteolysis and its Degredation Product. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **215**, 292–301 (1995).
43. Khare, S. *et al.* Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature* **537**, 229–233 (2016).
44. Wyllie, S. *et al.* Preclinical candidate for the treatment of visceral leishmaniasis that acts through proteasome inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 9318–9323 (2019).
45. Thomas, M. *et al.* Scaffold-Hopping Strategy on a Series of Proteasome Inhibitors Led

- to a Preclinical Candidate for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **64**, 5905–5930 (2021).
46. LXE408 Novartis. Available at: <https://dndi.org/research-development/portfolio/novartis-lxe408/>.
 47. Kaitin, K. I. Deconstructing the Drug Development Process: The New Face of Innovation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **87**, 356–361 (2010).
 48. Rocha-Roa, C., Molina, D. & Cardona, N. A Perspective on Thiazolidinone Scaffold Development as a New Therapeutic Strategy for Toxoplasmosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, (2018).
 49. Wang, R., Fang, X., Lu, Y. & Wang, S. The PDBbind database: Collection of binding affinities for protein-ligand complexes with known three-dimensional structures. *J. Med. Chem.* **47**, 2977–2980 (2004).
 50. Xiang, Z. Advances in Homology Protein Structure Modeling. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**, 217–227 (2006).
 51. Pan, A., Pranavathiyani, G. & Chakraborty, S. Sen. Computational Modeling of Protein Three-Dimensional Structure: Methods and Resources. in *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design* 155–178 (Elsevier, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-822312-3.00023-0
 52. Liu, X., Fan, K. & Wang, W. The Number of Protein Folds and Their Distribution over Families in Nature. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **54**, 491–499 (2004).
 53. Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J. & Jr, E. W. L. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol. Rev.* **66**, 334–395 (2014).
 54. Wingfield, J. Bioassays | high-throughput screening. *Encycl. Anal. Sci.* **d**, 278–282 (2019).
 55. Aier, I. & Varadwaj, P. K. Drug Repositioning: Principles, Resources, and Application of Structure-Based Virtual Screening for the Identification of Anticancer Agents. in *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design* 313–336 (Elsevier, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-822312-3.00006-0
 56. Lill, M. Virtual screening in drug design. *Methods Mol. Biol.* **993**, 1–12 (2013).
 57. Zheng, L., Alhossary, A. A., Kwoh, C.-K. & Mu, Y. Molecular Dynamics and Simulation. in *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* 550–566 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20284-7
 58. Choi, S.-B., Yap, B. K., Choong, Y. S. & Wahab, H. Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery. in *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*

- 652–665 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20154-4
59. Cavasotto, C. N. & Phatak, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov. Today* **14**, 676–683 (2009).
 60. Vyas, V. K., Ukawala, R. D., Ghate, M. & Chintha, C. Homology modeling a fast tool for drug discovery: Current perspectives. *Indian J. Pharm. Sci.* **74**, 1–17 (2012).
 61. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).
 62. Clustal Omega.
 63. Šali, A. & Blundell, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815 (1993).
 64. UCLA-DOE Institute 2019.
 65. Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst* **26**, 283–291 (1993).
 66. Kabsch, W. & Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–2637 (1983).
 67. Bowie, J. U., Lüthy, R. & Eisenberg, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science (80-.)*. **253**, 164–170 (1991).
 68. Liithy, R., Bowiet, J. U. & Eisenbergt, D. With Three-Dimensional Profiles. *Nature* **356**, 83–85 (1992).
 69. Colovos, C. & Yeates, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* **2**, 1511–1519 (1993).
 70. Voroni, G. F. Nouvelles applications des paramètres continus à la théorie des formes quadratiques. *J. Reine Angew. Math.* **134**, 198–287 (1908).
 71. Pontius, J., Richelle, J. & Wodak, S. J. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *J. Mol. Biol.* **264**, 121–136 (1996).
 72. Vriend, G. & Sander, C. Quality control of protein models: Directional atomic contact analysis. *J. Appl. Cryst* **26**, 47–60 (1993).
 73. Torres, P. H. M., Sodero, A. C. R., Jofily, P. & Silva-Jr, F. P. Key topics in molecular docking for drug design. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–29 (2019).
 74. Guedes, I. A., de Magalhães, C. S. & Dardenne, L. E. Receptor-ligand molecular docking. *Biophys. Rev.* **6**, 75–87 (2014).
 75. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R. & Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **267**, 727–48 (1997).
 76. Jones, G., Willett, P. & Glen, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a

- genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* **245**, 43–53 (1995).
77. Jones, G., Willett, P. & Glen, R. C. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **9**, 532–549 (1995).
 78. Gold User Guide.
 79. Korb, O., Stütze, T. & Exner, T. E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein–Ligand Docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **49**, 84–96 (2009).
 80. Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. & Sherman, W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27**, 221–234 (2013).
 81. Maestro Schrodinger L. Schrodinger release 2020–4. (2020). Available at: <https://www.schrodinger.com/products/maestro>.
 82. Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W. & Taylor, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **52**, 609–623 (2003).
 83. Mysinger, M. M., Carchia, M., Irwin, J. J. & Shoichet, B. K. Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): Better ligands and decoys for better benchmarking. *J. Med. Chem.* **55**, 6582–6594 (2012).
 84. Hawkins, P. C. D., Skillman, A. G. & Nicholls, A. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. *J. Med. Chem.* **50**, 74–82 (2007).
 85. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* **34**, 668–672 (2006).
 86. Sterling, T. & Irwin, J. J. ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 2324–2337 (2015).
 87. Douguet, D. Data Sets Representative of the Structures and Experimental Properties of FDA-Approved Drugs. *ACS Med. Chem. Lett.* **9**, 204–209 (2018).
 88. Liu, T., Lin, Y., Wen, X., Jorissen, R. N. & Gilson, M. K. BindingDB: A web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. *Nucleic Acids Res.* **35**, 198–201 (2007).
 89. O’Boyle, N. M. *et al.* Open Babel. *J. Cheminform.* **3**, 1–14 (2011).
 90. OpenEye. Scientific Software. (2020).
 91. OpenEye. Scientific Software. OMEGA 4.0.0.4. www.eyesopen.com (2020).
 92. Hawkins, P. C. D., Skillman, A. G., Warren, G. L., Ellingson, B. A. & Stahl, M. T. Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the protein databank and cambridge structural database. *J. Chem. Inf.*

- Model.* **50**, 572–584 (2010).
93. OpenEye Scientific Software. ROCS 3.2.1.4. <https://www.eyesopen.com>
 94. OpenEye Scientific Software. EON 2.2.0.5. <https://www.eyesopen.com>
 95. Greene, N., Judson, P. N., Langowski, J. J. & Marchant, C. A. Knowledge-based expert systems for toxicity and metabolism prediction: DEREK, StAR and METEOR. *SAR QSAR Environ. Res.* **10**, 299–314 (1999).
 96. Marchant, C. A., Briggs, K. A. & Long, A. In silico tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism: Derek for windows, meteor, and vitic. *Toxicol. Mech. Methods* **18**, 177–187 (2008).
 97. Schrödinger Release 2021-4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
 98. Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **44**, 235–249 (2000).
 99. Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **1**, 337–341 (2004).
 100. Veber, D. F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **45**, 2615–2623 (2002).
 101. Adcock, S. A. & McCammon, J. A. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical Reviews* **106**, 1589–1615 (2006).
 102. Chávez Thielemann, H. *et al.* From GROMACS to LAMMPS: GRO2LAM: A converter for molecular dynamics software. *J. Mol. Model.* **25**, (2019).
 103. Van Der Spoel, D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **26**, 1701–1718 (2005).
 104. Huang, J. *et al.* CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat. Methods* **14**, 71–73 (2016).
 105. Vanommeslaeghe, K. & MacKerell, A. D. Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) I: Bond perception and atom typing. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 3144–3154 (2012).
 106. Born, M. & Oppenheimer, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Ann. Phys.* **389**, 457–484 (1927).
 107. Meza, J. C. Steepest descent. *WIREs Comput. Stat.* **2**, 719–722 (2010).
 108. Verlet, L. Computer “experiments” on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys Rev.* **159**, 98–103 (1967).
 109. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **18**, 1463–1472 (1997).

110. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327–341 (1977).
111. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).
112. Mahoney, M. W. & Jorgensen, W. L. A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. *J. Chem. Phys.* **112**, 8910–8922 (2000).
113. Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R. & Straatsma, T. P. The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.* **91**, 6269–6271 (1987).
114. Lemkul, J. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. *Living J. Comput. Mol. Sci.* **1**, (2019).
115. Kollman, P. A. *et al.* Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* **33**, 889–897 (2000).
116. Kumari, R., Kumar, R. & Lynn, A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 1951–1962 (2014).
117. Srinivasan, J., Miller, J., Kollman, P. A. & Case, D. A. Continuum solvent studies of the stability of RNA hairpin loops and helices. *J. Biomol Struct Dyn.* 671–682 (1998).
118. Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. & Sherman, W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27**, 221–234 (2013).
119. What If.
120. Hawkins, P. C. D. & Nicholls, A. Conformer Generation with OMEGA: Learning from the Data Set and the Analysis of Failures. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 2919–2936 (2012).
121. Greene, N., Judson, P., Langowski, J. & Marchant, C. Knowledge-based expert systems for toxicity and metabolism prediction: DEREK, StAR and METEOR. *SAR QSAR Env. Res.* **10**, 299–314 (1999).
122. Miyaura, N., Yanagi, T. & Suzuki, A. The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synth. Commun.* **11**, 513–519 (1981).
123. Miyaura, N. & Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of

- Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **95**, 2457–2483 (1995).
124. Smith, G. B., Dezeny, G. C., Hughes, D. L., King, A. O. & Verhoeven, T. R. Mechanistic Studies of the Suzuki Cross-Coupling Reaction. *J. Org. Chem.* **59**, 8151–8156 (1994).
125. Aydiner, B. & Seferoğlu, Z. Proton Sensitive Functional Organic Fluorescent Dyes Based on Coumarin-imidazo[1,2-a]pyrimidine; Syntheses, Photophysical Properties, and Investigation of Protonation Ability. *European J. Org. Chem.* **2018**, 5921–5934 (2018).
126. Lohse, O., Thevenin, P. & Waldvogel, E. The palladium catalysed Suzuki coupling of 2- and 4-chloropyridines. *Synlett* 45–48 (1999). doi:10.1055/s-1999-2533
127. Carroll, T. X., Thomas, T. D., Bergersen, H., Børve, K. J. & Leif J. Sæthre. Fluorine as a π Donor. Carbon 1s Photoelectron Spectroscopy and Proton Affinities of Fluorobenzenes. *J. Org. Chem.* **71**, 1961–1968 (2006).
128. Blau, L. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. *Eur. J. Med. Chem.* **67**, 142–151 (2013).
129. Vyas, V. K. & Bhanage, B. M. Catalytic asymmetric synthesis of β -triazolyl amino alcohols by asymmetric transfer hydrogenation of α -triazolyl amino alkanones. *Tetrahedron Asymmetry* **28**, 974–982 (2017).
130. Ponnala, S., Kumar, S. T. V. S. K., Bhat, B. A. & Sahu, D. P. Synthesis of bridgehead nitrogen heterocycles on a solid surface. *Synth. Commun.* **35**, 901–906 (2005).
131. Kamal, A. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridine/imidazopyrimidine-benzimidazole conjugates as potential anticancer agents. *Medchemcomm* **6**, 606–612 (2015).
132. Mazur, I. A., Mandrichenko, B. E. & Katkevich, R. I. Methods of Synthesis of Imidazopyrimidines with a Bridgehead Nitrogen Atom and Their Benzo-analogues. *Russ. Chem. Rev.* **46**, 634–642 (1977).
133. Matsumoto, T., Urano, Y., Shoda, T., Kojima, H. & Nagano, T. A thiol-reactive fluorescence probe based on donor-excited photoinduced electron transfer: Key role of ortho substitution. *Org. Lett.* **9**, 3375–3377 (2007).
134. Pattabiraman, V. R. & Bode, J. W. Rethinking amide bond synthesis. *Nature* **480**, 471–479 (2011).
135. Montalbetti, C. A. G. N. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).
136. Singh, R. K., Mandal, T., Balasubramanian, N., Cook, G. & Srivastava, D. K.

- Coumarin-suberoylanilide hydroxamic acid as a fluorescent probe for determining binding affinities and off-rates of histone deacetylase inhibitors. *Anal. Biochem.* **408**, 309–315 (2011).
137. Kovacic, P. & Somanathan, R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *J. Appl. Toxicol.* **34**, 810–824 (2014).
138. Valko, K., Nunhuck, S., Bevan, C., Abraham, M. H. & Reynolds, D. P. Fast Gradient HPLC Method to Determine Compounds Binding to Human Serum Albumin. Relationships with Octanol/Water and Immobilized Artificial Membrane Lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* **92**, 2236–2248 (2003).
139. Keating, G. M. Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Target. Oncol.* **12**, 243–253 (2017).