

Lara Almida Zimmermann

**SÍNTESE DE COMPOSTOS POTENCIALMENTE  
ANTITRIPANOSSOMATÍDEOS E AVALIAÇÃO DA  
RELAÇÃO ESTRUTURA-AATIVIDADE COM BASE EM  
ENSAIOS *IN VITRO*, ACOPLADOS A ESTUDOS *IN  
SILICO***

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a obtenção  
do Grau de Doutora em Farmácia.

Orientador: Prof. Dra. Lílian Sibelle  
Campos Bernardes

Coorientador: Prof. Dr. Eloir Paulo  
Schenkel

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Zimmermann, Lara A.  
SÍNTESE DE COMPOSTOS POTENCIALMENTE  
ANTI-TRIPANOSSOMATÍDEOS E AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO  
ESTRUTURA-ACTIVIDADE COM BASE EM ENSAIOS IN VITRO,  
ACOPLADOS A ESTUDOS IN SILICO / Lara A. Zimmermann  
; orientadora, Lílian Sibelle Campos Bernardes,  
coorientador, Eloir Paulo Schenkel, 2018.  
245 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

I. Farmacologia. II. Tripanosoma rodgersi. III.  
Doença de Chagas. IV. Leishmaniose. V. Modelagem  
molecular. I. Bernardes, Lílian Sibelle Campos. II.  
Schenkel, Eloir Paulo. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia. IV. Título.

**“SÍNTESE DE COMPOSTOS POTENCIALMENTE  
ANTITRIPANOSSOMATÍDEOS E AVALIAÇÃO DA  
RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE COM BASE  
EM ENSAIOS in vitro, ACOPLADOS A ESTUDOS in  
silico”**

**POR**

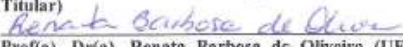
**Lara Almida Zimmermann**


Tese julgada e aprovada em sua  
forma final pelo(a) Orientador(a) e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores  
Doutores:


**Banca Examinadora:**

  
Prof(a). Dr(a). Miriam de Barcellos Falkenberg (UFSC – Membro  
Titular)

  
Prof(a). Dr(a). Antonio de Padua Carobrez (UFSC – Membro  
Titular)

  
Prof(a). Dr(a). Renata Barbosa de Oliveira (UFMG – Membro  
Titular)

  
Prof(a). Dr(a). Fernando Javier Duran (UBA/Argentina – Membro  
Titular)

  
Prof(a). Dr(a). Lillian Sibebe Campos Bernardes (UFSC –  
Orientador)

  
Prof(a). Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 02 de outubro de 2018.







Este trabalho é dedicado aos meus orientadores LÍlian Sibelle Campos Bernardes e Eloir Paulo Schenkel, os quais tornaram possível a realização deste trabalho. Gratidão e admiração para sempre.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia pela oportunidade proporcionada de realizar meu doutorado e à CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa concedida.

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos à minha orientadora profa. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes que apostou na realização deste trabalho e sempre esteve pronta para auxiliar orientando no que fosse preciso. Agradeço a amizade e inúmeras conversas de incentivo e apoio profissional.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, meu muito obrigada, pela confiança depositada em todos esses anos, pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

À professora Dra. Daniela Schuster pela oportunidade de me receber em seu grupo de pesquisa durante um ano de doutorado sanduíche, que contribuiu para minha evolução profissional e pessoal. Aos amigos de laboratório que fiz neste período e que sempre me apoiaram tornando este ano inesquecível, em especial Alexander e Alexia.

Aos colaboradores que contribuíram para os resultados deste trabalho, Prof. Mario Steindel, Prof. Eduardo B. de Melo e em especial a querida Dra. Milene Höehr de Moraes por toda paciência em sempre me receber e trocarmos informações sobre os ensaios biológicos.

Agradeço aos membros da banca, por terem aceitado avaliar este trabalho e estarem contribuindo para o melhoramento do mesmo.

Ao meu colega de laboratório e amigo Rafael da Rosa, por todos esses anos de parceria, amizade, paciência e pela troca de ensinamentos constantes, sempre que precisei e que tornaram esses quatro anos mais tranquilos.

À querida Maria Izabel por todos os ensinamentos e amizade ao longo desses nove anos. Com toda certeza aprendi muito e sou muito grata por ter conhecido e compartilhado tantos momentos inexplicáveis com você.

A todo o grupo de Química Farmacêutica, Marina, Alice, Lisandra, Stella, Roberto, Daniel, Lucas, Pamela, Suelen e Victor pela convivência e por todos os momentos de descontração tão agradáveis.

Às colegas Cintia, Adriana, Fernanda e Gabi pela parceria e boas conversas.

À Ana Claudia pelas palavras amigas e momentos compartilhados durante essa caminhada.

À Ana Luisa que sempre esteve pronta para auxiliar no que fosse necessário, incluindo realização de espectros. Ao amigo Paulo Sergio e aos técnicos Luis Otávio e Vinícius, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por auxiliarem nas análises espectroscópicas e espectrométricas. À Profa. Ivone Carvalho, pelo suporte sempre que precisei.

Aos colegas de pesquisa Carol, Layzon, Larissa, Louis Pergaut pelo auxílio e disposição sempre que precisei.

À minha família, por sempre me apoiarem em todas minhas escolhas e estarem presentes para o que fosse necessário. Obrigada pela paciência e motivação nesses últimos anos, vocês são incríveis.

A todos que não mencionei aqui e de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!



O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher. (Cora Coralina)





## RESUMO

Apesar dos impressionantes avanços científicos e tecnológicos nas últimas décadas, um número reduzido de novas entidades químicas foi identificado para combater de forma eficaz a doença de Chagas e as leishmanioses. O objetivo deste trabalho foi identificar novos inibidores da enzima tripanotona redutase por meio de estratégias clássicas de triagem em bibliotecas de compostos sintéticos, bem como utilizando ferramentas de modelagem molecular. Inicialmente, um conjunto de 42 compostos bis-heterociclos, obtido no grupo de trabalho, estruturalmente similar às neolignanas de origem natural (grandisina e veraguensina), foi avaliado *in vitro* quanto as atividades tripanocida e leishmanicida. Os resultados obtidos permitiram a identificação de 37 compostos ativos frente ao crescimento parasitário de amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Não foram observadas atividades leishmanicidas promissoras para esses mesmos compostos. O estudo de relação estrutura-atividade (REA) em relação à atividade tripanocida mostrou que a potência destes compostos está correlacionada com a presença de grupos substituintes volumosos e hidrofóbicos. O derivado 3-(3,4-dimetoxifenil)-5-((4-(4-pentilfenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)isoxazol foi o composto mais ativo desta biblioteca em estudo (CI<sub>50</sub> 12,2 µM), apresentando nos ensaios *in vitro* baixa toxicidade frente a linhagem celular monocítica (THP-1) e potência semelhante ao fármaco de referência benznidazol (CI<sub>50</sub> 10,2 µM). Os compostos foram avaliados frente à enzima tripanotona redutase, porém, nenhum apresentou atividade significativa. Em outra abordagem, foram realizados estudos guiados pela modelagem molecular, resultando em três modelos farmacofóricos, os quais foram elaborados e validados teoricamente e experimentalmente. Duas bibliotecas virtuais de compostos, uma formada por compostos contidos *in house* (laboratório “Computer-Aided Molecular Design Group”, na Universidade de Innsbruck) e outra biblioteca adquirida comercialmente (SPECS), foram triadas nos modelos e com o auxílio de filtros, como ancoramento molecular e propriedades físico-químicas, resultaram na seleção de 47 compostos potencialmente ativos, dos quais, 17 se mostraram ativos nos ensaios de inibição enzimática da tripanotona redutase. Os dois compostos mais ativos foram 4-amino-N-(2-((5-bromo-2-((2-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)-1,2,5-oxadiazol-3-carboxamida **S21** e N-(3-etoxi-4-((1-fenil-1H-tetrazol-5-il)oxi)benzil)-2-(4-fluorofenil)etanamina **S33**, os quais apresentaram CI<sub>50</sub> 42,3 µM e CI<sub>50</sub> 93,3 µM, respectivamente. Esses mesmos compostos também apresentaram ação tripanocida e leishmanicida *in vitro* e serviram de

protótipo para a síntese de duas séries de análogos. Um total de 25 análogos foram sintetizados, caracterizados e avaliados quanto à inibição enzimática frente à tripanotona redutase, bem como tiveram suas ações tripanocida e leishmanicida avaliadas *in vitro*. Os compostos da série análoga ao composto **S21**, compostos carbamatos e acetamidas, apresentaram inibição parasitária para ambos parasitos, porém, os análogos do composto **S33**, compostos aminas e ésteres, não demonstraram resultados promissores. Para os cinco compostos que demonstraram maior atividade de inibição enzimática, foram realizados estudos de ancoramento molecular a fim de investigar as interações no sítio da enzima. O composto terc-butil(2-((5-bromo-2-((2-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)carbamato (CI<sub>50</sub> 11,4 µM) demonstrou ser o mais ativo quanto à ação tripanocida. Assim, os resultados obtidos por ambas as estratégias utilizadas contribuíram para a identificação de novos esqueletos químicos considerados promissores para o planejamento de compostos antitripanossomatídeos.

**Palavras-chave:** Tripanotona redutase. Doença de Chagas. Leishmaniose. Modelagem molecular.

## ABSTRACT

Despite the impressive scientific and technological advances in the last decades, only a small number of new chemical substances have been developed to effectively treat Chagas disease and leishmaniasis. The objective of this research was to identify new inhibitors of the trypanothione reductase enzyme by using classical screening strategies in synthetic compound libraries, as well as molecular modeling tools. Initially, a synthetic library of 42 bis-heterocyclic compounds, previously synthesized, with similar structure of natural neolignans (veraguensin and grandisin) was screened for trypanocidal and leishmanicidal activity. The results contributed to identify 37 active compounds against the parasitic growth of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. The compounds did not seem to show promising leishmanicidal activity. The structure-activity relationship study showed that the potency of these compounds correlates with the presence of bulky hydrophobic groups. Derivative 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-((4-(4-pentylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)isoxazole (IC<sub>50</sub> 12.2 μM) was the most active compound of this library, showing, *in vitro*, low toxicity against THP-1 cells line and potency similar to benznidazole (IC<sub>50</sub> 10.2 μM). The compounds were evaluated for their ability to inhibit *T. cruzi* trypanothione reductase. None compound showed significant inhibition. Trypanothione reductase inhibition was not identified as the mechanism of action responsible for the trypanocidal activity. In addition, guided by molecular modeling studies, three pharmacophoric models were created, and theoretically and experimentally validated. Two virtual libraries (one comprised compounds available in house Computer-Aided Molecular Design Group Laboratory, University of Innsbruck) and another commercially acquired library (SPECS); were screened in the models with the aid of filters, such as molecular docking and physicochemical properties, resulting in the selection of 47 hits. The compounds were evaluated for enzymatic inhibition of trypanothione reductase and 17 compounds demonstrated to be active. Compounds 4-amino-N-(2-((5-bromo-2-((2-fluorobenzyl)oxy)benzyl)amino)ethyl)-1,2,5-oxadiazole-3-carboxamide **S21** and N-(3-ethoxy-4-((1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)oxy)benzyl)-2-(4-fluorophenyl)ethanamine **S33** showed CI<sub>50</sub> 42.3 μM and CI<sub>50</sub> 93.3 μM, respectively. The two compounds showed *in vitro* trypanocidal and leishmanicidal activity and they were selected as prototypes for the synthesis of two series of analogues. A total of 25 analogues were synthesized, characterized and evaluated for enzymatic inhibition of trypanothione reductase. Five compounds demonstrated promising

activity as inhibitors of the trypanothione reductase enzyme and interactions with the binding site were established by molecular docking. The 25 analogues had their trypanocidal and leishmanicidal actions evaluated. Compounds of the series analogous to compound **S21**, carbamate and acetamides, showed some degree of activity in both parasites, however, analogues of compound **S33** did not show promising results. The compound tert-butyl (2-((5-bromo-2-((2-fluorobenzyl)oxy)benzyl)amino)ethyl)carbamate **94** (IC<sub>50</sub> 11.4 μM) was the most active compound against *T. cruzi*, with results similar to benznidazole. The results obtained by both strategies for hit identification contributed to find new chemical scaffolds, which can be considered promising to design new anti-trypanosomatid compounds.

**Keywords:** Trypanothione reductase. Chagas disease. Leishmaniasis. Molecular modeling.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processos de planejamento e desenvolvimento racional de fármacos, adaptado de Paul e colaboradores, 2010.....	34
Figura 2: Estrutura química dos fármacos antiparasitários benznidazol (1) e nifurtimox (2).....	39
Figura 3: Estrutura química dos fármacos utilizados no Brasil para o tratamento das leishmanioses.....	40
Figura 4: Síntese e ciclo redox da tripanotona.....	42
Figura 5: Reações catalisadas pela enzima humana glutationa redutase e pela enzima do parasito tripanotona redutase.....	43
Figura 6: Organização do dímero da enzima tripanotona redutase de <i>T. cruzi</i> (adaptado de BOND et al., 1999).....	44
Figura 7: Comparação entre os dois sítios catalíticos: em verde, glutationa redutase (1GRE) e em ciano, tripanotona redutase (1BZL).....	45
Figura 8: Comparação entre as estruturas cristalográficas: glutationa redutase (1GRE) em verde e em ciano, tripanotona redutase (1BZL) mostrando os cinco aminoácidos não conservados na TR.....	46
Figura 9: Inibidores miméticos ao substrato tripanotona dissulfeto.....	50
Figura 10: Inibidores tricíclicos (20-22) da tripanotona redutase, incluindo mepacrina (23) e derivados (24 e 25).....	51
Figura 11: Estruturas de 2-aminnodifenilssulfeto inibidores da enzima tripanotona redutase.....	52
Figura 12: Estrutura química de inibidor irreversível (33) e substrato subversivos (34-37).....	52
Figura 13: Compostos em estudos clínicos para o tratamento da Doença de Chagas.....	55
Figura 14: Neolignanas naturais veraguensina (38), grandisina (39), and 6,6'-((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-3,4-dimetiltetrahidrofurano-2,5-diil)bis(4-metoxibenzo[d][1,3]dioxol) (40), isoxazol 3,5-disubstituído (41-43) e o esqueleto proposto para os derivados bis-heterociclos (44). T <sub>CTrypo</sub> : <i>T. cruzi</i> tripomastigotas; T <sub>CAma</sub> : <i>T. cruzi</i> amastigotas.....	106
Figura 15: Representação gráfica do modelo de REA obtido com descritores GRIND.....	114
Figura 16: Melhores descritores GRIND associados com 47 e 55.....	115
Figura 17: Estruturas cristalográficas 1BZL (A), 1GXF (B) utilizadas na elaboração dos modelos farmacofóricos.....	118
Figura 18: Estrutura química dos compostos inibidores (7a), (18a) e (10a) utilizados na elaboração do modelo farmacofórico com base na sobreposição de compostos e o composto 4NEW (27a) utilizado como coordenadas para a estratégia de elaboração do modelo.....	119

Figura 19: Gráficos de modelos farmacofóricos fundamentados em estruturas cristalográficas de complexo proteína-inibidores ( <b>1-2</b> ) e um modelo embasado somente em ligantes ( <b>3</b> ). .....	121
Figura 20: Compostos inativos detectados na triagem virtual pelos respectivos modelos. ....	124
Figura 21: Estrutura cristalográfica 1BZL utilizada na realização do ancoramento molecular, substrato original da enzima (triptanotona dissulfeto) e o substrato reancoramento no sítio ativo. ....	125
Figura 22: Porcentagem de inibição da enzima triptanotona redutase avaliada para os compostos na concentração de 100 $\mu$ M. ....	127
Figura 23: Taxa de compostos ativos e inativos selecionado por cada modelo farmacofórico em estudo. ....	127
Figura 24: Estrutura química dos compostos identificados como mais ativos, compostos <b>S21</b> e <b>S33</b> , quanto a inibição da enzima triptanotona redutase. ....	128
Figura 25: As conformações de ancoramento molecular para os inibidores <b>S21</b> e <b>S33</b> sugerindo as interações com o sítio de ligação da enzima triptanotona redutase. ....	129
Figura 26: Representação estrutural do composto <b>S21</b> e sinalização dos possíveis locais de modificações estruturais. ....	133
Figura 27: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>86</b> (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	135
Figura 28: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>86</b> (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	136
Figura 29: Estrutura química do composto <b>92</b> com representação dos principais sinais identificados nos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ , os quais permitiram a caracterização do composto. ....	137
Figura 30: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>93</b> (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	139
Figura 31: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>93</b> (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	140
Figura 32: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>105</b> (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	142
Figura 33: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto <b>105</b> (75MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	143
Figura 34: Representação estrutural do composto <b>S33</b> e setas sinalizam os possíveis locais de modificações estruturais, assim como os tracejados destacam os três principais locais de interação hidrofóbica (A-C). ....	144
Figura 35: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>122</b> (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	147
Figura 36: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>122</b> (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	148

Figura 37: Comparação entre os espectros de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>123</b> (A) e <b>135</b> (B) (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	149
Figura 38: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>135</b> (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	150
Figura 39: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>141</b> (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	152
Figura 40: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto <b>141</b> (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	152
Figura 41: Principais conformações de ancoramento molecular para a série 1 compostos <b>107</b> (A), composto <b>108</b> (B) e composto <b>109</b> (C) sugerindo as possíveis interações com o sítio de ligação da enzima tripanotiona redutase. ....	157
Figura 42: Exemplo hipotético obtido através do programa LS da ocupação do sítio ativo por duas moléculas do composto <b>107</b> .....	159
Figura 43: As principais famílias de poses obtidas através de ancoramento molecular para os compostos <b>118</b> (A) e para o composto <b>119</b> (B). ....	160





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura química dos compostos bis-heterocíclis sintetizados ( <b>44-85</b> ).....	108
Tabela 2: Atividade tripanocida dos compostos do primeiro conjunto a 100 µM frente a forma amastigota. ....	109
Tabela 3: Atividade tripanocida dos compostos do segundo conjunto a 100 µM frente a forma amastigota. ....	111
Tabela 4: Atividade tripanocida a 100 µM dos compostos do terceiro conjunto frente a forma amastigota. ....	112
Tabela 5: Atividade inibitória frente a tripanotona redutase de <i>T. cruzi</i> (TcTR) de <i>Trypanosoma cruzi</i> dos compostos <b>47, 49, 62,63,65-68</b> . ..	113
Tabela 6: Características dos seis descritores mais importantes do modelo.....	115
Tabela 8: Informações sobre a validação dos modelos farmacofóricos selecionados. ....	122
Tabela 8: Resultados do ensaio de porcentagem de inibição de crescimento parasitário, determinação do IC <sub>50</sub> em amastigotas de <i>T. cruzi</i> Tulahuen e toxicidade dos compostos <b>S21</b> e <b>S33</b> em células THP-1.....	131
Tabela 9: Resultados do ensaio de inibição de crescimento parasitário, determinação do CI <sub>50</sub> em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e toxicidade dos compostos <b>S21</b> e <b>S33</b> em células THP-1. ....	131
Tabela 11: Estrutura química dos compostos ( <b>93-98</b> ) e rendimentos da reação de formação dos derivados carbamatos. ....	138
Tabela 11: Estrutura química dos compostos ( <b>105-110</b> ) e rendimentos da reação de formação da acetamida.....	141
Tabela 12: Propriedades moleculares para a série 1 de derivados sintetizados com base no protótipo <b>S21</b> . ....	144
Tabela 13: Derivados aminas sintetizados ( <b>118-124</b> ) e rendimento....	146
Tabela 14: Derivados aminas sintetizados e seus rendimentos. ....	151
Tabela 15: Propriedades moleculares para a série 2 de compostos sintetizados com base no protótipo <b>S33</b> . ....	153
Tabela 16: Atividade inibitória frente a TR de <i>T. cruzi</i> dos 25 compostos sintetizados.....	154
Tabela 17: Atividade inibitória frente a TR de <i>T. cruzi</i> dos 5 análogos mais ativos e frente inibição GR. ....	156
Tabela 19: Atividade tripanocida dos compostos da série 1, a 50 µM, frente a forma amastigota de <i>T. cruzi</i> .....	161
Tabela 20: Atividade leishmanicida dos compostos da série 1 a 50 µM frente a forma amastigota de <i>L. amazonensis</i> .....	162

Tabela 21: Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida em amastigotas de *T. cruzi* e *L. amazonensis* para a série 2. .... 163

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Rota sintética para obtenção dos compostos bis-heterociclos. ....	107
Esquema 2: Diferentes etapas consecutivas para a geração e refinamento de um modelo farmacofórico e aplicação prospectiva; conforme esquema adaptado de KASERER e colaboradores, 2015.....	117
Esquema 3: Esquema da rota sintética para obtenção dos derivados ( <b>93-98, 105-110</b> ) com base no protótipo <b>S21</b> .....	134
Esquema 4: Mecanismo de reação de Williamson para a síntese dos intermediários éteres ( <b>86-91</b> ). <b>i</b> : IMO: 150W; 70 °C; 30min. ....	135
Esquema 5: Mecanismo de formação da base de <i>Schiff</i> . ....	137
Esquema 6: Mecanismo reacional formação derivado amida ( <b>g</b> ).....	141
Esquema 7: Rota sintética para obtenção dos análogos do composto <b>S33</b> .	146



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB: anfotericina B  
AR: agônio  
BOC: di-terc-butil-dicarbonato  
CC<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% das células.  
CDI: *N,N*-carbonil-di-imidazol  
CI<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos  
d: duplete  
DABCO: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano  
dd: duplo duplete  
DMF: dimetilformamida  
DMSO: dimetil-sulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DP: desvio padrão  
DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) ou reagente de Ellman  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético  
EF: fator de enriquecimento  
Et<sub>3</sub>N: trietilamina  
F.M: fórmula molecular  
GR: glutathione redutase  
GSSG: glutathione dissulfeto  
HBA: número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio  
HBD: número de átomos doadores de ligação de hidrogênio  
HEPES: ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazina)etanossulfônico  
HRMS: High-resolution mass spectrometry  
HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence  
HTS: High Throughput Screening (triagem de alta produtividade)  
IC: inibição de crescimento  
IS: índice de seletividade  
IMO: irradiação por micro-ondas  
KI: constante de inibição  
LS: LigandScout  
MW: micro-ondas  
NA: não ativo  
NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
NCS: *n*-clorosuccinimida  
ND: não determinado  
NADPH: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PAINS: Pain Assay Interference Compounds

PDB: Protein Data Bank  
P.F.: ponto de fusão  
PSA: área de superfície polar  
R: radical  
R.F.: fator de retenção  
RMN: Ressonância Magnética Nuclear  
RNA: ácido ribonucleico  
Ro5: regra dos cinco  
s: simpleto  
SAR: relação estrutura-atividade  
t: tripleto  
t.a.: temperatura ambiente  
TFA: ácido trifluoracético  
RB: ligações rotacionáveis  
Tc<sub>Trypo</sub>: *T. cruzi* tripomastigotas  
Tc<sub>Ama</sub>: *T. cruzi* amastigotas.  
TcTR: tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi*  
T(S)<sub>2</sub>: tripanotiona dissulfeto  
T(SH)<sub>2</sub>: tripanotiona ditiol  
TR: tripanotiona redutase  
TsCl: cloreto de 4-toluenossulfonila  
VS: triagem virtual

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>37</b>
2.1	DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE .....	37
2.2	ALVO MOLECULAR.....	40
2.3	IDENTIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE UM <i>HIT</i> .....	46
2.4	ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS .....	54
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>59</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	59
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
4.1	EQUIPAMENTOS.....	61
4.2	APARELHAGEM LABORATORIAL.....	61
4.3	OUTROS MATERIAIS .....	62
4.4	SÍNTESE.....	62
<b>4.4.1</b>	<b>Síntese dos compostos bis-heterociclos (44-85) .....</b>	<b>62</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Síntese dos compostos planejados a partir do composto S21. 63</b>	
4.4.2.1	Procedimento geral para a síntese dos intermediários éteres (86-91). 63	
4.4.2.2	Síntese do composto etilenodiamina monoprottegida (92). ... 66	
4.4.2.3	Procedimento geral para a síntese dos derivados carbamatos (93-98) 67	
4.4.2.4	Procedimento geral para a síntese de intermediários aminas (99-104) 71	
4.4.2.5	Procedimento geral para a síntese dos derivados amidas (105-110) 75	
<b>4.4.3</b>	<b>Síntese dos compostos planejados a partir do composto S33. 79</b>	
4.4.3.1	Procedimento geral para síntese de intermediários iminas (111-117)79	

4.4.3.2	Procedimento geral para síntese dos derivados aminas (118-124)	82
4.4.3.3	Procedimento geral para síntese dos intermediários aminas protegidos (125-130)	86
4.4.3.4	Procedimento geral para a síntese dos derivados ésteres com amina protegida (131-136)	88
4.4.3.5	Procedimento geral para a desproteção da amina e obtenção dos compostos ésteres (137-142)	92
4.5	MODELAGEM MOLECULAR	96
4.5.1	Elaboração e validação de modelo farmacofórico	96
4.5.2	Triagem virtual das bases de dados e seleção dos compostos	99
4.5.3	Estudos de ancoramento molecular	99
4.5.4	Estudo qualitativo de relação estrutura-atividade	100
4.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS	101
4.6.1	Avaliação da atividade tripanocida em amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	101
4.6.2	Avaliação da atividade leishmanicida em amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	102
4.6.3	Avaliação da citotoxicidade em células THP-1	103
4.6.4	Avaliação da atividade inibitória frente a enzima tripanotiona redutase	103
4.6.5	Avaliação da atividade inibitória frente a enzima Glutationa redutase	103
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
5.1	IDENTIFICAÇÃO DE UM <i>HIT</i> TENDO COMO PROTÓTIPO UM COMPOSTO DE ORIGEM NATURAL	105
5.1.1	Avaliação biológica e estudo de relação estrutura-atividade dos bis-heterociclos sintetizados	109
5.2	USO DE FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA O PLANEJAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE UM <i>HIT</i>	116
5.2.1	Síntese, caracterização e avaliação das propriedades moleculares dos análogos dos compostos S21 e S33	132



5.2.2	Avaliação da atividade biológica dos análogos dos protótipos S21 e S33.....	154
6	CONCLUSÕES.....	165
	REFERÊNCIAS.....	167
	APÊNDICE.....	185



## APRESENTAÇÃO

Com o intuito de facilitar a leitura e compreensão desta tese, alguns pontos da organização e realização do trabalho serão destacados.

A tese tem como tema central a investigação de compostos com potencial tripanocida e leishmanicida e foi delineada a partir de investigação anterior, realizada como base para o trabalho de conclusão do Mestrado, neste mesmo Programa de Pós-graduação da UFSC. Naquele trabalho foram obtidos 42 compostos, de estrutura com similaridade estrutural às neolignananas de origem natural, veraguensina e grandisina. Os processos de obtenção e dados físico-químicos desses compostos estão descritos na dissertação "Síntese de derivados heterocíclicos com potencial atividade antitripanossomatídeos" e também no trabalho "Synthesis and SAR of new isoxazole-triazole bis-heterocyclic compounds as analogues of natural lignans with antiparasitic activity" (ZIMMERMANN et al., 2018). Na primeira parte desta tese são apresentados os resultados da avaliação das atividades tripanocida e leishmanicida desses compostos, obtidos posteriormente à conclusão do mestrado, bem como um estudo de relação-estrutura-atividade com base nessa biblioteca de compostos bis-heterociclos. Adicionalmente, foram realizados estudos de relação estrutura-atividade (REA), por meio de uma parceria com o professor Dr. Eduardo B. de Melo, do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Na segunda parte deste trabalho, foi realizada uma abordagem com auxílio computacional, centrada na elaboração de modelos farmacofóricos e identificação de estruturas químicas potencialmente inibidoras da enzima tripanotiona redutase, que serviram de protótipos para síntese de derivados inibidores desta enzima, consequentemente compostos com atividade potencialmente tripanocida e leishmanicida. Os estudos computacionais foram realizados em um período de doutorado sanduíche com apoio da Capes, no laboratório "Computer-Aided Molecular Design Group", na Universidade de Innsbruck, sob a coordenação da Dra. Daniela Schuster. Nesse estudo, foram elaborados e validados, teoricamente e experimentalmente, três modelos farmacofóricos para a enzima tripanotiona redutase. Com base nesses modelos, foram planejados, sintetizados e caracterizados uma série de compostos potencialmente ativos, para os quais são descritos, na segunda parte deste trabalho, os processos de obtenção e dados físico-químicos, bem como uma discussão dos resultados de atividade biológica.

Os ensaios biológicos apresentados no trabalho foram realizados no Laboratório de Protozoologia da UFSC (MIP/CCB) sob coordenação do Prof. Dr. Mario Steindel. Os experimentos foram conduzidos pela Dra. Milene Höehr de Moraes e com participação da doutoranda em algumas etapas dos experimentos.

Na introdução ao tema, o planejamento racional de fármacos, bem como o estado da farmacoterapia das doenças de Chagas e Leishmanioses são abordados de forma sucinta. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos compostos obtidos, discutidos em Resultados e discussão, são apresentados em um apêndice.

## 1INTRODUÇÃO

O processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos é complexo, de longa duração (cerca de 12-15 anos) e oneroso (no mínimo 1 bilhão de dólares). A criação de um projeto de desenvolvimento de um fármaco é motivada pelo fato de que existem doenças ou condições clínicas que não possuem tratamento adequados disponíveis (HUGHES et al., 2011; PATRICK, 2017). Avanços significativos ligados a inovações científicas, envolvendo a química e biologia, levaram a uma melhor compreensão do mecanismo fisiológico dos organismos vivos à nível celular e molecular. Desenvolvimentos significativos nas técnicas de síntese orgânica, analítica, purificação, ensaios biológicos, ciência genômica e sistemas artificiais de inteligência, possibilitaram o início de projetos de pesquisas que objetivam o entendimento de um alvo molecular específico e planejamento de um inibidor seletivo e potente para o mesmo (BARREIRO; FRAGA, 2015; SCHNEIDER, 2017).

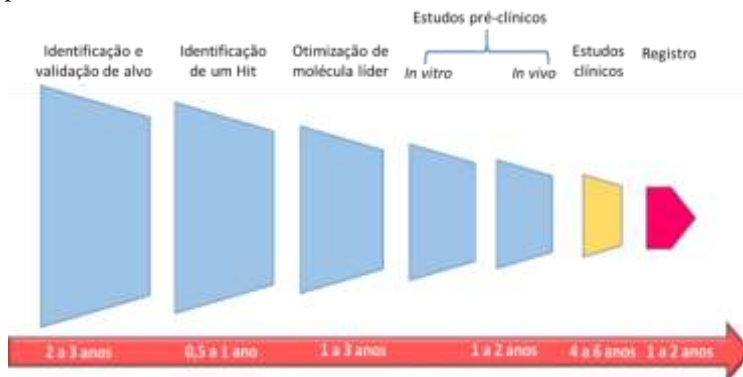
Antes mesmo de Galeno (129-199 a.C.), as doenças eram tratadas principalmente através de chás e poções que tinham como base o uso de plantas em suas formulações. Os princípios ativos responsáveis pela atividade biológica começaram a ser isolados a partir da primeira metade do século XIX, fato que contribuiu para o surgimento das indústrias farmacêuticas. Com a identificação estrutural destes compostos naturais, vários fármacos foram obtidos (morfina, quinina, penicilina) e surgiram análogos estruturais com o intuito de obter compostos mais potentes, seletivos e menos tóxicos (BARREIRO; FRAGA, 2015; DA ROSA et al., 2017; DREWS, 2000; KINCH; HOYER, 2015; WERMUTH, 2015).

A ação molecular destes compostos no organismo, começou a ser ilustrada por Emil Fisher (1894) quando formulou o modelo “chave-fechadura”, para explicar a especificidade da interação enzima-substrato. Esta ideia foi adaptada, para se tentar explicar a resposta farmacológica, a qual estaria relacionada com a interação entre as moléculas ativas (chaves) e os bioreceptores (fechaduras) (FISCHER, 1894). O avanço da genética molecular, o desenvolvimento da cristalografia por raio-X, da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e de *softwares* na área de modelagem molecular possibilitaram a identificação e melhor conhecimento do alvo molecular (bioreceptor), assim como melhor entendimento do processo de interação entre o alvo e o fármaco ou substratos. Desta forma, o planejamento racional de compostos bioativos começa a ser empregado,

utilizando ferramentas computacionais, as quais permitem a identificação de moléculas com tamanho e complementaridade química funcional adequadas, capazes de exercerem uma determinada atividade biológica (DREWS, 2000; PATRICK, 2015; VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

Diante dos avanços científicos, surgiu um novo modelo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, o qual é dividido em duas etapas distintas (Figura 1): (i) etapa de descoberta, que consiste na identificação de um alvo molecular, identificação e otimização de um *hit* e realização de ensaios pré-clínicos; (ii) etapa de desenvolvimento, a qual envolve os diferentes estágios de ensaios clínicos (Fase I, II, III, IV) e o lançamento do medicamento no mercado (PAUL et al., 2010).

Figura 1: Processos de planejamento e desenvolvimento racional de fármacos, adaptado de Paul e colaboradores, 2010.



Acompanhando a evolução científica da pesquisa e desenvolvimento de fármacos, é possível observar duas estratégias diferentes para identificação de um novo fármaco. A primeira inicia com a identificação de um composto farmacologicamente ativo, de origem natural ou sintética. A partir deste protótipo, obtêm-se diferentes análogos estruturais, com o intuito de melhorar a atividade biológica, propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e o entendimento do mecanismo de ação. A segunda estratégia consiste no planejamento racional, partindo do conhecimento de um alvo molecular definido, seguido da identificação de um composto específico “*hit*” para este alvo e otimização do mesmo. Na busca por um composto com atividade antitripanossomatídeo, o presente trabalho, foi desenvolvido seguindo as duas estratégias descritas acima. Porém, os tópicos a serem abordados

na fundamentação teórica serão dispostos com base no planejamento racional de fármacos. A seguir é apresentada uma breve revisão da literatura sobre a doença de Chagas e leishmanioses, os fármacos utilizados para tratamento destas parasitoses atualmente, os alvos moleculares considerados importantes para o planejamento e desenvolvimento de inibidores, considerando especialmente os potenciais inibidores da tripanotiona redutase, em vista do foco deste trabalho nesse alvo.





## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE

As estratégias modernas de planejamento de fármacos antes mesmo da seleção e identificação de um alvo molecular está fundamentada no conhecimento da fisiopatologia da doença e nos estudos das vias bioquímicas. Inicialmente uma doença é selecionada para se estabelecer uma terapêutica seja ela tratar, prevenir ou diagnosticar (LOMBARDINO; LOWE, 2004). As escolhas feitas pelas indústrias farmacêuticas, de modo geral, são com base em doenças que darão um maior retorno financeiro, negligenciando muitas vezes as doenças chamadas tropicais, tais como doenças parasitárias, doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e leishmanioses (*Leishmania* spp.) (FRIES; FAIRLAMB, 2003). Essas doenças representam uma ameaça para a saúde humana e para o desenvolvimento econômico, pois afetam um elevado percentual da população (WHO, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que existam aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas infectadas pela doença de Chagas no mundo, principalmente entre 21 países da América Latina, sendo que aproximadamente 75 milhões de pessoas estão sob risco de infecção. Nos últimos anos esta doença deixou de ter um caráter rural e passou a ter um caráter urbano. Devido a mobilidade populacional, a doença já foi detectada em países como Canadá, Estados Unidos e em 17 países europeus. No Brasil, estima-se que aproximadamente 1 milhão de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi*, sendo que em torno de 25,5 milhões de pessoas estão sob risco de serem infectadas (WHO, 2017).

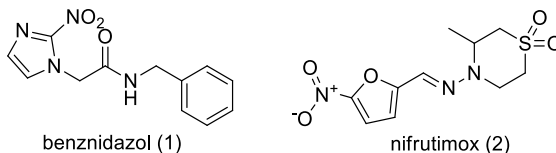
Conhecida há quase 110 anos, desde quando Carlos Chagas a descreveu em 1909, a doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Apresenta como vetor os triatomíneos hematófagos (família Reduviidae), insetos popularmente conhecidos como barbeiro. A principal via de contaminação é durante o repasto sanguíneo do inseto, quando ocorre o contato com fezes e urina do triatomíneo contaminadas com forma infectante tripomastigota de *T. cruzi*. Outros modos de transmissão compreendem via oral, por meio de alimentos contaminados com o parasito; transfusão de sangue infectado, transmissão vertical e transplante de órgãos (OPAS, 2009). O parasito é heteroxênico, apresenta um ciclo de vida dentro do hospedeiro e outro dentro do vetor. Após entrarem pelo orifício causado pela sucção, lesão na pele ou mucosas, a forma tripomastigota infecta as células do

hospedeiro. No interior destas, o parasito assume a forma amastigota, multiplicando-se por divisão binária. Adquirem a forma tripomastigota, rompem as células e voltam para a corrente sanguínea, podendo infectar novos tecidos e órgãos. Quando um triatomíneo pica o homem infectado, os parasitos no intestino do vetor na forma tripomastigota, transformam-se em epimastigota, multiplicam-se e se diferenciam novamente na forma tripomastigota, podendo via repasto sanguíneo infectar o homem, fechando o ciclo (ARGOLO et al., 2008; LEWIS et al., 2018).

Depois da infecção, há uma fase aguda inicial que dura cerca de dois meses. Nesta fase, existe uma alta parasitemia detectável no sangue, mas na maioria dos casos os sintomas estão ausentes ou se apresentam de forma leve (lesão cutânea ou uma pálpebra inchada, sinal de Romana) (DIAS, 2004). Uma fase indeterminada precede a fase crônica, com ausência de anomalias em certos órgãos. A fase crônica pode manifestar-se anos depois da infecção e suas consequências são graves devido à multiplicação do parasito principalmente no coração e nos músculos digestivos. Cerca de 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos e até 10% apresentam distúrbios digestivos e/ou neurológicos (BRASIL, 2017; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; WHO, 2017).

Os dois fármacos antiparasitários, benznidazol (1) e nifurtimox (2) (figura 2), utilizados para o tratamento de doença de Chagas apresentam quase 100% de eficácia na cura da infecção pelo *T. cruzi* se administrados no início da fase aguda da doença. Porém, a eficácia do tratamento diminui ao longo do processo evolutivo da infecção, deixando esses pacientes sem uma terapia eficaz (WHO, 2017). No Brasil, apenas o benznidazol é utilizado como terapia para a doença de Chagas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). O tratamento também é indicado para crianças, em caso de transmissão congênita (MURCIA et al., 2013). Em casos em que a medicação servirá como prevenção da transmissão da doença, o uso da medicação deve ser avaliado, visto que o tratamento é longo, cerca de três a oito semanas, e com possibilidade de efeitos adversos bastante frequentes (40% dos pacientes tratados). Devido a inexistência de vacinas para doença de Chagas, o controle dos vetores e da qualidade laboratorial em bancos de sangue tem sido a forma de prevenção da doença na América Latina (SÁEZ-ALQUEZAR et al., 2015; WHO, 2017).

Figura 2: Estrutura química dos fármacos antiparasitários benznidazol (1) e nifrutimox (2).



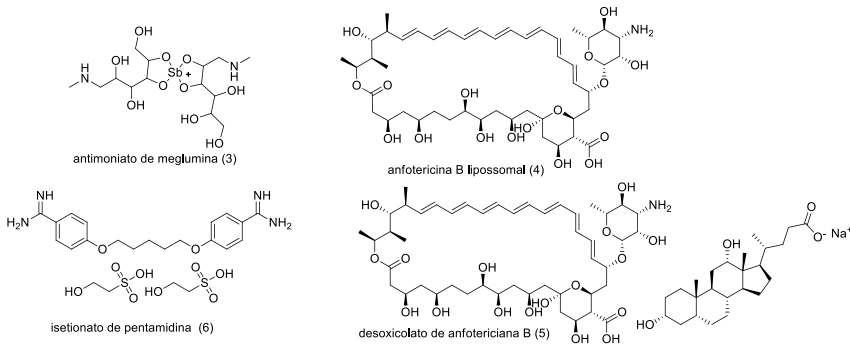
A leishmaniose trata-se de um grupo de doenças causada por um parasito protozoário de mais de 20 espécies de *Leishmania*. A transmissão do parasito pode ocorrer pela picada de 90 espécies de flebótomos fêmeas infectadas. Após a infecção, formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e dentro dessas células se transformam em amastigotas e multiplicam-se. Os parasitos podem se alojir em órgãos ou permanecer na pele caracterizando as três formas principais da doença: leishmaniose visceral (também conhecido como kala-azar), é a forma mais grave da doença, sendo fatal em cerca de 95% dos casos não tratados; leishmaniose cutânea, considerada a mais comum causando lesões na pele; e leishmaniose mucocutânea, a qual provoca a destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta (KAYE; SCOTT, 2011; WHO, 2017).

Os dados recentes correlacionados com a leishmaniose indicam que no ano de 2015, entre os 25 países com maior incidência de leishmanioses, foram notificados 21909 casos de leishmaniose visceral e 138575 casos de leishmaniose cutânea (WHO, 2017). No Brasil a leishmaniose é considerada uma doença endêmica: em 2014, foi o país que apresentou o maior número de casos reportados para ambas as formas da doença, 3453 casos para leishmania visceral e 19402 casos para leishmaniose cutânea (WHO, 2016). Estima-se que aproximadamente 30 mil pessoas morrem anualmente por conta desta enfermidade (MORILLO et al., 2017)

Atualmente, a escolha do tratamento para essa parasitose depende de alguns fatores, como o tipo da doença, patologias concomitantes, espécie do parasito e localização geográfica (HEFNAWY et al., 2018). No Brasil, a terapêutica disponível para o tratamento da leishmaniose consiste em antimoniato de meglumina (3), a anfotericina B (4) lipossomal e o desoxicolato de anfotericina B (5) e para leishmaniose cutânea, o isetionato de pentamidina (6) (Figura 3) (BRASIL, 2017). Em algumas regiões os fármacos disponíveis apresentam baixa eficácia, como consequência do aumento da resistência parasitária. Ainda, existe

uma baixa adesão ao tratamento pelos pacientes, devido aos efeitos adversos apresentado e vias de administração limitadas a parenteral (BAIOCCO et al., 2013; LEAL, 2013; NO, 2016).

Figura 3: Estrutura química dos fármacos utilizados no Brasil para o tratamento das leishmanioses.



Ademais, no que tange a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para essas parasitoses, os esforços pelas indústrias farmacêuticas são limitados. Portanto, é notável a iminente necessidade de identificar novos compostos ativos para o tratamento da doença de Chagas e leishmanioses, que sejam protótipos para o desenvolvimento de fármacos potentes, seletivos e que interfiram preferencialmente em vias essenciais e únicas dos parasitos e que apresentem uma taxa de efeitos colaterais reduzida (CATTAPRETA; MOTTRAM, 2018; CLAYTON, 2010; DE RYCKER et al., 2018; FIELD et al., 2017).

## 2.2 ALVO MOLECULAR

O projeto do sequenciamento genômico humano proporcionou uma revolução na química medicinal, pois levou à identificação de novos alvos moleculares úteis no processo de desenvolvimento de fármacos (PATRICK, 2013; ROBERTSON, 2005). Estes alvos englobam principalmente proteínas (enzimas, transportadores e receptor de superfície celular e nuclear) e ácidos nucleicos (DNA e RNA) (ROBERTSON, 2005). Dentre eles, as enzimas merecem destaque, considerando que vários fármacos comercializados atuam inibindo uma determinada enzima (IMMING; SINNING; MEYER, 2006; ROBERTSON, 2005). O desenvolvimento de compostos inibidores

enzimáticos tem contribuído não apenas para a descoberta de novos agentes terapêuticos, mas também para vários processos biológicos dependentes da ação de enzimas (ABRAHAM, 2003).

As enzimas estão localizadas dentro das células e atuam como catalisadores. Muitas necessitam de pequenas moléculas (cofatores), como NADH e NADPH, para desempenharem suas funções (PATRICK, 2017). O conhecimento do mecanismo catalítico da enzima é de extrema importância para garantir que a inibição desta trará benefício no tratamento de uma determinada doença. As regiões de interação com o substrato são chamadas de sítios ativos e os fármacos podem ser projetados para se ligarem neste local, impedindo a ligação do substrato, e assim, inibindo a ação da enzima (IMMING; SINNING; MEYER, 2006; PATRICK, 2015).

Para que o fármaco se ligue de forma adequada e eficaz, é necessário que apresente um certo grau de afinidade e especificidade com o alvo molecular, os quais serão determinados pelas interações intermoleculares como: ligações covalentes, interações eletrostáticas ou iônicas, interações de hidrogênio, van der Waals, dipolo-dipolo e hidrofóbicas. O tipo de interação estabelecida entre o complexo fármaco-alvo molecular depende do tipo de aminoácido presente no sítio ativo (BARREIRO; FRAGA, 2015; PATRICK, 2013).

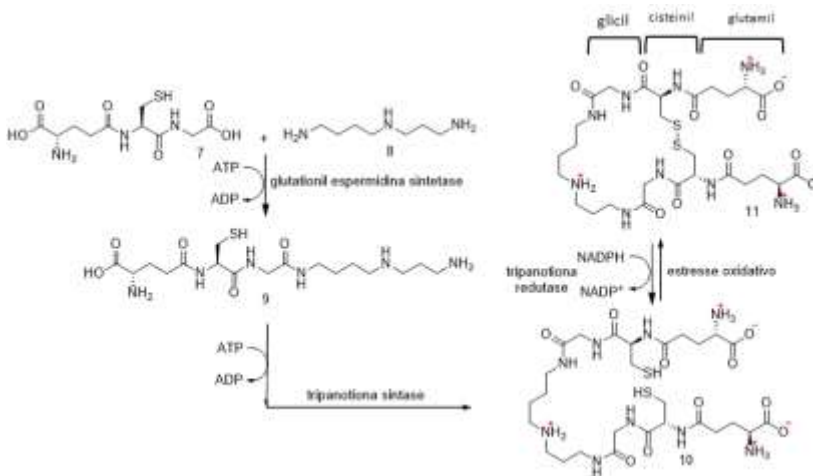
Existem 20 aminoácidos comumente encontrados em humanos, os quais são responsáveis pelas ligações peptídicas presentes nas proteínas. Estas ligações são planares, sendo a conformação adotada dependente dos radicais (R) de cada aminoácido. Eles podem ser classificados quanto à natureza química (ácido ou básico) e polaridade (polar e apolar) (NELSON; COX, 2012; OPHARDT, 2003; PATRICK, 2013).

Para planejar um inibidor promissor, a estrutura da macromolécula deve ser bem caracterizada, conhecendo quais os aminoácidos (grupos funcionais) estão presentes no sítio ativo (IMMING; SINNING; MEYER, 2006). A partir da descoberta do genoma e entendimento da bioquímica dos parasitos, foi possível identificar estruturalmente novos alvos exclusivamente parasitários. Como exemplo, as enzimas do metabolismo dependentes de grupo tiois (tripanotiona redutase, tripanotiona sintetase e triparedoxina peroxidase) e cruzaina (SUETH-SANTIAGO et al., 2017). Embora sejam considerados alvos importantes para o desenvolvimento de novos inibidores, existem poucos agentes antiparasitários inibidores enzimáticos (FAIRLAMB et al., 1985; FRIES; FAIRLAMB, 2003; ILARI et al., 2017; KRAUTH-SIEGEL et al., 1987; PATRICK, 2015).

Estudos comparativos entre *T. cruzi* e *Leishmania spp.* tem sido conduzidos com intuito de identificar um composto com amplo espectro parasitário que atue em ambos os parasitos (BERNARDES; ZANI; CARVALHO, 2013). Neste contexto, um alvo terapêutico promissor é a enzima tripanotona redutase (TR), a qual protege os tripanosomatídeos contra o estresse oxidativo, via uma cascata de eventos, mantendo os níveis de tripanotona reduzida em ambos os parasitos (FAIRLAMB et al., 1985; SCHMIDT; KRAUTH-SIEGEL, 2002). TR foi identificada em 1985 e atualmente é considerada um alvo molecular validado para o planejamento de inibidores antitripanosomatídeos (CAVALLI; BOLOGNESI, 2009; KRAUTH-SIEGEL; BAUER; SCHIRMER, 2005; KRAUTH-SIEGEL; INHOFF, 2003a; SCHMIDT; KRAUTH-SIEGEL, 2002). Esta flavoenzima NADPH dependente é responsável por reduzir a tripanotona dissulfeto (**11**) a tripanotona ditiol (**10**).

A síntese da tripanotona ditiol (**10**) ocorre a partir de dois precursorre:s a glutatona (**7**) e a espermidina (**8**) (poliamina), por ação de três enzimas específicas dos tripanossomatídeos (glutationil espermidina sintetase, tripanotona sintetase e tripanotona redutase) (Figura 4) (WOSTER, 2010).

Figura 4: Síntese e ciclo redox da tripanotona.



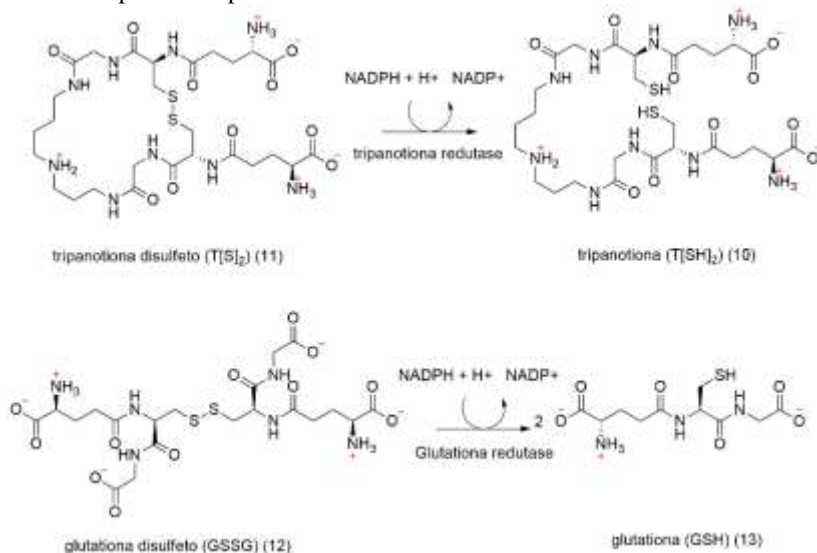
O parasito converte a glutatona (**7**) e uma molécula de espermidina (**8**) em glutatona espermidina (**9**), por ação da enzima glutatona espermidina sintetase. A enzima tripanotona sintetase

converte glutationil espermidina em tripanotona reduzida (**10**). Na presença de radicais livres tripanotona (**10**) é oxidada a tripanotona dissulfeto (**11**). A tripanotona oxidada é reduzida pela ação da enzima tripanotona redutase para formação de tripanotona reduzida (LANTWIN et al., 1994; WOSTER, 2010; ZHANG et al., 1996).

Em contraste com quase todos os eucariontes e procariontes, os tripanossomatídeos não apresentam a enzima glutatona redutase (GR), enzima que exibe a mesma função antioxidante nos humanos. Embora, TR e GR apresentem cerca de 40% de identidade entre seus aminoácidos, ambas as enzimas apresentam diferenças significativas em seus sítios ativos, o que corrobora a exclusividade e especificidade dos substratos (BAILEY et al., 1993; HUNTERL et al., 1992; SULLIVAN et al., 1991).

A molécula (**11**), substrato da TR, difere da glutatona dissulfeto (**12**), substrato da glutatona redutase, em tamanho, sendo maior e pela presença de uma porção espermidina e grupos amônios catiônicos no lugar dos grupos carboxilatos aniônicos. Este fato confere em pH fisiológico uma carga +1 à tripanotona dissulfeto, enquanto GSSG tem carga -2, justificando a seletividade dos substratos (Figura 5) (BAILEY et al., 1993; HUNTERL et al., 1992; SULLIVAN et al., 1991)

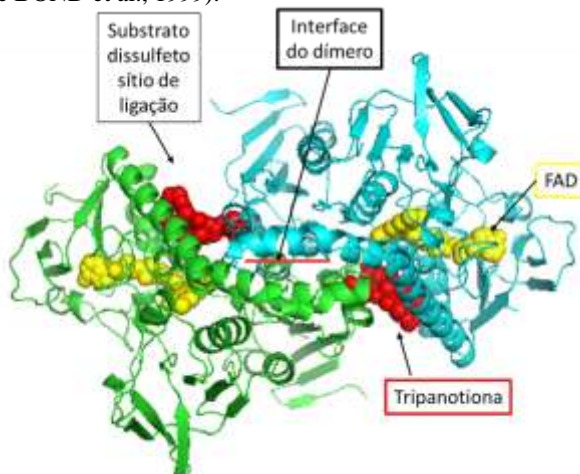
Figura 5: Reações catalisadas pela enzima humana glutatona redutase e pela enzima do parasito tripanotona redutase.



O conhecimento detalhado das diferenças presentes entre tripanotona redutase e glutatona redutase se faz necessário para o planejamento de um fármaco potente e seletivo, que atue contra os tripanossomatídeos (BAILEY et al., 1993; BOND et al., 1999). Sabe-se que as duas enzimas apresentam uma estrutura secundária e organização de domínio conservados, entretanto, quando comparados os sítios ativos entre si, a especificidade de ambos os substratos ocorre devido à combinação de fatores alostéricos e eletrostáticos (HUNTERL et al., 1992).

A tripanotona redutase é uma proteína homodimérica, onde cada monômero (A e B) é formado por três domínios: domínio de ligação FAD (aminoácidos 1-160 e 289-360), domínio de ligação NADPH (aminoácidos 161-289) e domínio de interface (aminoácidos 361-488) (ILARI et al., 2017) (Figura 6). A tripanotona redutase possui um sítio de ligação com 20 Å de comprimento, 15 Å de profundidade e 15 Å de largura. Os aminoácidos que compõe esse sítio de ligação estão correlacionados com o domínio de ligação FAD (15A–22A, 53A–62A, 103A–114A e 335A-343A) e domínio de interface entre as duas subunidades 396B-399B e 461B-470B (BOND et al., 1999).

Figura 6: Organização do dímero da enzima tripanotona redutase de *T. cruzi* (adaptado de BOND et al., 1999).

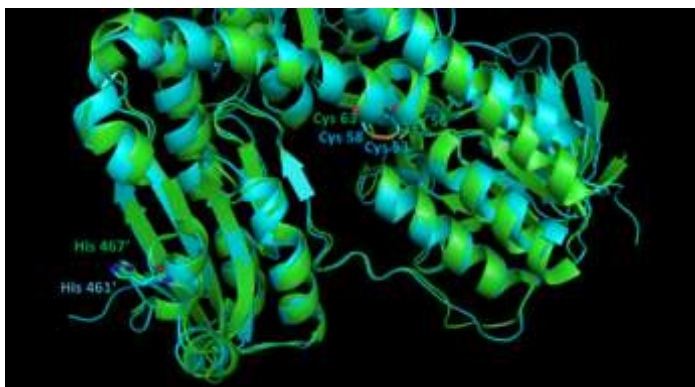


FAD esfera amarelo. Substrato (II) esfera vermelha. A interface do dímero está indicado por uma reta rosa. Representação do sítio de ligação difenilssulfeto. Dímero A verde e dímero B ciano. Fonte: Autoria própria, ilustrações obtidas através do PyMOLWin.



Ao todo 25 aminoácidos do sítio ativo da TR interagem com a tripanotiona dissulfeto, sendo a maioria por meio de interações hidrofóbicas. Observam-se ligações de hidrogênio entre a ligação peptídica nas porções glicina e espermidina da tripanotiona e os aminoácidos Glu19A e Tyr111A (BOND et al., 1999). A glutationa redutase apresenta 19 aminoácidos envolvidos na interação com o substrato, desses, 14 são conservados na TR, incluindo o sítio catalítico (aminoácidos Cys53, Cys58 e o resíduo básico His461') (Figura 7) (BOND et al., 1999; KARPLUS; SCHULZ, 1989).

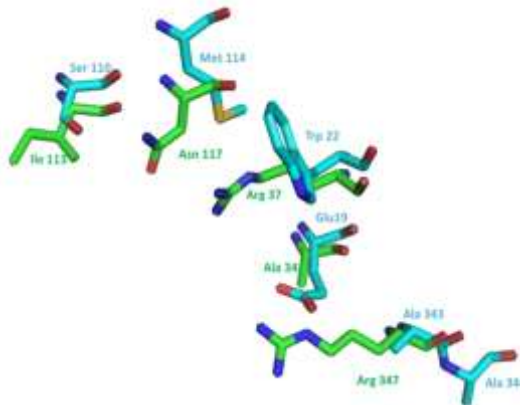
Figura 7: Comparação entre os dois sítios catalíticos: em verde, glutationa redutase (IGRE) e em ciano, tripanotiona redutase (1BZL).



Fonte: Autoria própria, ilustrações obtidas através do PyMOLWin.

A diferença significativa envolvendo o complexo humano GR-GSSG está na interação com o aminoácido Arg347, o qual no complexo TR-T[S]<sub>2</sub> de *T. cruzi* é substituído por Ala343, resultando na perda da interação eletrostática e fornecendo maior liberdade para T[S]<sub>2</sub> (BOND et al., 1999). Os cinco aminoácidos não conservados entre as duas enzimas são Glu19 (Ala34 em GR), Trp22 (Arg37), Ser110 (Ile113), Met114 (Asn117), e Ala344 (Arg347) (Figura 8) (BAILEY et al., 1993; HUNTERL et al., 1992; KARPLUS; SCHULZ, 1989; KURIYAN et al., 1991; SULLIVAN et al., 1991). Estas modificações tornam o sítio ativo da TR mais hidrofóbico e com uma carga negativa que interage com a carga positiva de tripanotiona dissulfeto e repele glutationa dissulfeto, enquanto o sítio ativo de GR é mais hidrofílico e possui carga positiva repelindo tripanotiona dissulfeto (BAILEY et al., 1993; CHAN et al., 1998; KARPLUS; SCHULZ, 1989; ZHANG et al., 1996).

Figura 8: Comparação entre as estruturas cristalográficas: glutatona redutase (1GRE) em verde e em ciano, tripanotona redutase (1BZL) mostrando os cinco aminoácidos não conservados na TR.



Fonte: Autoria própria, ilustrações obtidas através do PyMOLWin

Tendo em vista essas diferenças enzimáticas, moléculas orgânicas podem ser planejadas, utilizando ferramentas computacionais, de forma que possam interagir com o sítio ativo da tripanotona redutase e atuarem de forma específica contra os tripanossomatídeos.

### 2.3 IDENTIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE UM *HIT*

Ao longo do tempo, as abordagens e metodologias usadas no planejamento de fármacos mudaram. Além do emprego de produtos naturais como fontes de moléculas bioativas e de triagens biológicas automatizadas em alta escala (*high-throughput screening*, HTS), o uso de uma abordagem computacional vem sendo utilizada em vários estágios no processo de planejamento de fármacos, a fim de se reduzir custos e tempo no processo de descoberta de um novo *hit* (KALYAANAMOORTHY; PHOEBE CHEN, 2011).

Um composto é considerado um *hit* quando apresenta a atividade específica no alvo desejado na triagem virtual de bancos de dados de compostos naturais, sintéticos ou coleções combinatórias e tem sua atividade confirmada através de ensaios biológicos (HUGHES et al., 2011). Nas fases iniciais de planejamento de fármacos, são identificadas moléculas normalmente de baixa potência e afinidade que devem ser otimizadas em relação a uma série de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas (KATSUNO et al., 2015).

Muitas técnicas computacionais estão sendo empregadas para a identificação e otimização de moléculas para o tratamento das doenças negligenciadas, como exemplo dinâmica molecular, ancoramento molecular e triagem virtual através de modelos farmacofóricos. Estas técnicas *in silico* vêm sendo utilizadas muitas vezes de forma sequencial, com o uso de múltiplos protocolos, combinando resultados e assim, normalmente, conseguindo cobrir vários domínios tanto 2D como 3D. Como exemplo sequencial: triagem molecular, seguida de ancoramento molecular e de testes experimentais (KATSUNO et al., 2015; TANRIKULU; KRÜGER; PROSCHAK, 2013).

A triagem virtual (*virtual screening*, VS) é um método computacional empregado na seleção, identificação de *hits* e no auxílio da otimização de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com alvo molecular (VUORINEN; SCHUSTER, 2015). O *screening* virtual pode ser comparado a um funil, onde um grande número de moléculas, componentes de uma biblioteca, é reduzido por um algoritmo computacional para um número menor, que será testado experimentalmente (TANRIKULU; KRÜGER; PROSCHAK, 2013).

Um grande número de programas encontram-se disponíveis para criação de modelos farmacofóricos e triagem virtual, como exemplo *LigandScout*, DiscoveryStudio, MOE, Pharmagist e Pharmit e muitos são os algoritmos que estão sendo descritos nos últimos anos (BRAGA; ANDRADE, 2013; SUNSERI; KOES, 2016; VUORINEN; SCHUSTER, 2015). O papel do algoritmo empregado no *screening* virtual é selecionar o maior número possível de compostos ativos em uma triagem de compostos. Para esta seleção, vários filtros são empregados e, por fim, uma inspeção manual por especialistas determina os possíveis “*hits*”, através da visualização dos compostos que melhor interagem com o alvo. Não existe de fato uma garantia que o composto identificado na triagem como positivo seja experimentalmente ativo; o que se sabe é que a taxa de acerto, correlacionado com a identificação de um composto *hit*, em trabalhos elaborados até o momento encontra-se entre 5% - 40% (KASERER et al., 2015; PATRICK, 2013; TANRIKULU; KRÜGER; PROSCHAK, 2013).

As interações observadas dependem de funcionalidades químicas, ligações e orientações 3-D que tornam uma molécula ativa em relação ao seu alvo, e que podem ser descritos por modelos farmacofóricos (VUORINEN; SCHUSTER, 2015). Existem duas formas de criar um modelo farmacofórico: baseado na estrutura cristalográfica do alvo molecular (*structure-based drug design*, SBDD) ou com base na estrutura de ligantes (*ligand-based drug design*, LBDD). As duas

estratégias podem ser associadas, de forma a cobrir um maior espaço químico, gerando consequentemente uma lista de *hits* mais abrangente (KASERER et al., 2015; VUORINEN; SCHUSTER, 2015; WALTENBERGER et al., 2016; WOLBER; DORNHOFER; LANGER, 2007).

Os *hits* podem ser identificados através de uma análise de ancoramento molecular (*docking*) amplamente aplicados no planejamento virtual com base na estrutura cristalográfica. Consiste em definir a melhor orientação e conformação (pose) de uma pequena molécula (ligante) no sítio de ligação de uma macromolécula (alvo), através de uma classificação usando funções de pontuação (BRAGA et al., 2014a). Através do ancoramento molecular é possível identificar boas soluções para o modo de interação entre um ligante e uma proteína com rapidez e um custo computacional baixo (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Os resultados obtidos através do ancoramento molecular são dependentes dos algoritmos de busca e funções de pontuação empregados. Existem vários algoritmos de busca que podem ser utilizados nesta abordagem computacional. Eles são responsáveis por realizar movimentos translacionais, rotacionais e angulares para verificar o melhor encaixe do ligante no sítio de ligação (SPYRAKIS; COZZINI; EUGENE KELLOGG, 2016). Dentre os métodos de ancoramento encontram-se métodos sistemático, determinístico e estocástico. O método estocástico é o utilizado pelo programa GOLD. Neste método ocorre mudanças aleatórias para explorar o espaço de busca do ligante na proteína (JONES et al., 1997). Exemplos de busca são o método de Monte Carlo e os algoritmos genéticos ou evolucionistas. As funções de pontuação servem para avaliar a qualidade das conformações de acordo com a afinidade de interação com o receptor. As funções mais utilizadas podem ser classificadas de três formas: campo de força, empírica e análise estatística. A escolha da função utilizada dar-se-á pelo tipo de pesquisa a ser realizada. Assim, o ancoramento molecular surgiu para auxiliar no processo de desenvolvimento de fármacos, facilitando o entendimento da melhor orientação e conformação ligante-receptor e, consequentemente, na otimização de *hits* (BARREIRO; FRAGA, 2015; SPYRAKIS; COZZINI; KELLOGG, 2010).

A estratégia computacional envolvendo triagem virtual e ancoramento molecular no planejamento de fármacos vem sendo empregada para auxiliar a identificação de *hits* inibidores da enzima TR (DEVINE et al., 2015; DON; IOSET, 2014; HORVATH, 1997;

MACCARI et al., 2011; MARTYN et al., 2007; PANDEY et al., 2015, 2016; PEREZ-PINEIRO et al., 2009; PRIETO; TALEVI; BRUNO-BLANCH, 2006; SAHA; SHARMA, 2015). Desde a identificação da enzima TR, diferentes esqueletos químicos já foram descritos como inibidores da enzima, mas poucos passaram da fase de descoberta, o que leva a um interesse em desenvolver estudos que venham identificar inibidores frente a esse alvo (CARVALHO et al., 2010; FIELD et al., 2017; LEROUX; KRAUTH-SIEGEL, 2016).

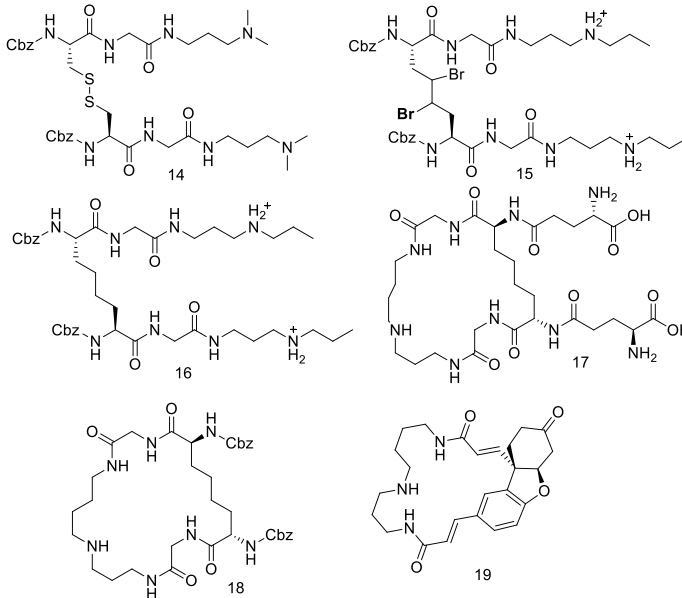
Dentre os inibidores da TR já identificados podemos citar os compostos tricíclicos, bicíclicos, heterociclos, poliaminas e peptídeos miméticos, diarilssulfetos e organometálicos. Estes podem estar atuando como inibidores competitivos, como inibidores irreversíveis ou como inibidores subversivos (BENSON et al., 1992; EBERLE et al., 2009; GARFORTH et al., 1994; ILARI et al., 2017; KRAUTH-SIEGEL; SCHÖNECK, 1995; LEROUX; KRAUTH-SIEGEL, 2016; MACCARI et al., 2011; OGUNGBE; ERWIN; SETZER, 2014; PATTERSON et al., 2011; TAYLOR et al., 2015; TRIBALLEAU et al., 2005).

Com a identificação da tripanotiona dissulfeto como substrato da enzima tripanotiona redutase, inibidores miméticos aos substratos começaram a ser explorados (Figura 9) (EL-WAER et al., 1991; EL-WAER; BENSON; DOUGLAS, 1993; FAIRLAMB et al., 1985; HENDERSON et al., 1988; PITA, 2006). São descritos os peptídeos miméticos com substituições na porção espermidina por N,N-dimetilaminopropilamida (DMAPA) (**14**), substituição na porção  $\gamma$ -glutamil onde foram adicionados grupos protetores como por exemplo o benziloxicarbonil (Cbz) (**15**) (DUYZEND et al., 2012; GARRARD et al., 2000). Com base na diferença estrutural entre tripanotiona dissulfeto e glutationa dissulfeto foram identificados inibidores poliaminas competitivos e seletivos frente TR, tais como (**16**) (BAILLET et al., 1996; JONES et al., 2013; O'SULLIVAN et al., 1997, 2015; O'SULLIVAN; DALRYMPLE; ZHOU, 1996; O'SULLIVAN; ZHOU, 1995; SULLIVAN et al., 1991; SULLIVAN; WALSH, 1991)

Derivados peptideomiméticos macrocíclicos também foram sintetizados (**17-18**) (EL-WAER et al., 1991). O uso de modelagem molecular auxiliou na identificação do produto natural lunarina (**19**) como inibidor da TR: a 500  $\mu$ M demonstrou 97% de inibição da enzima. Este composto foi selecionado virtualmente para a avaliação biológica tendo em vista três pontos chaves: a presença de um grupo espermidina ligado a um grupo amida; o fato de ser uma estrutura cíclica; e apresentar dimensão semelhante ao substrato T[S]<sub>2</sub>. Por apresentar este

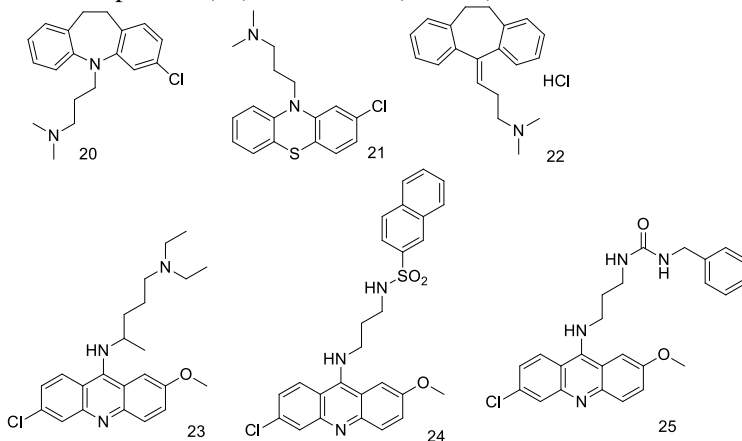
tamanho possivelmente não iria conseguir interagir com GR conferindo seletividade em TR (BOND et al., 1999).

Figura 9: Inibidores miméticos ao substrato tripanotona dissulfeto.



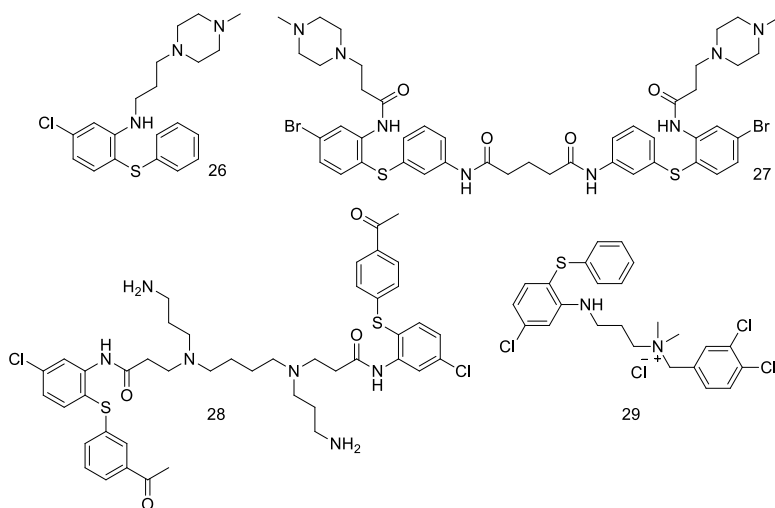
O substrato tripanotona dissulfeto, da enzima TR, é uma molécula grande, sendo este um fator limitante, muitas vezes, para servir como composto líder. A fim de identificar compostos com outro esqueleto estrutural que atuassem inibindo a enzima TR, Benson e colaboradores (1992) realizaram o primeiro estudo de modelagem molecular. A partir deste estudo, compostos antidepressivos tricíclicos foram identificados como sendo inibidores competitivos da enzima TR (clomipramina (**20**)  $K_i$  6,6  $\mu\text{M}$ , clorpromazina (**21**)  $K_i$  10,0  $\mu\text{M}$ , amitriptilina (**22**)  $K_i$  93,6  $\mu\text{M}$  e mepacrina (quinacrina) (**23**)  $CI_{50}$  133,0  $\mu\text{M}$  (Figura 10) (BENSON et al., 1992; JACOBY et al., 1996). A fim de melhorar as propriedades físico-químicas e a potência da quinacrina, derivados de quinacrina com porção sulfonamida (**24**)  $CI_{50}$  3,3  $\mu\text{M}$  e uréia (**25**)  $CI_{50}$  13,1  $\mu\text{M}$  foram sintetizados e demonstraram melhores atividades, porém menor seletividade que o protótipo (Figura 10) (CHIBALE et al., 2001).

Figura 10: Inibidores tricíclicos (**20-22**) da tripanotona redutase, incluindo mepacrina (**23**) e derivados (**24 e 25**).



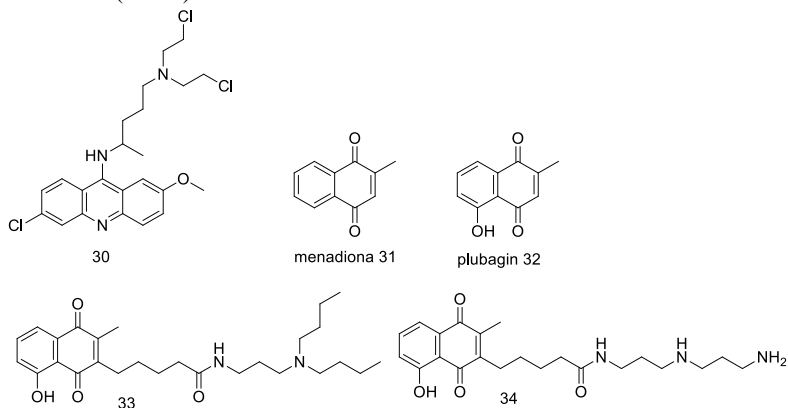
Com a abertura do anel fenotiazínico foi possível a obtenção de uma nova classe de inibidores 2-aminodifenilssulfetos (**26**)  $K_i$  25,0  $\mu\text{M}$ , ditos como “clorpromazinas de cadeia aberta” que mantiveram a seletividade frente a inibição da TR (Figura 11) (BAILLET et al., 1996; FERNANDEZ-GOMEZ et al., 1995; GIRAULT et al., 1998; PARVEEN et al., 2005). Análogos simétricos com um conector, espaçador de sete membros entre a posição meta do bisdifenilssulfetos e 2-N-metilpiperazina originaram inibidores ainda mais potentes (**27**)  $CI_{50}$  0,6  $\mu\text{M}$  (GIRAULT et al., 1997). Modificação na cadeia lateral pela troca no anel piperazina ou dimetilamina por cadeias lineares de amins incluindo espermina e espermidina mostraram também ser modificações promissoras (**28**)  $CI_{50}$  0,3  $\mu\text{M}$  (PARVEEN et al., 2005). No mesmo sentido, foram planejados compostos contendo grupo de amônio quaternário na cadeia lateral (**29**)  $K_i$  1,7  $\mu\text{M}$  (PARVEEN et al., 2005).

Figura 11: Estruturas de 2-aminodifenilssulfeto inibidores da enzima tripanotona redutase.



Inibidores irreversíveis e seletivos já foram descritos para esta enzima, um exemplo importante é o composto derivado de quinacrina, mostarda de quinacrina (**30**) (Figura 12) (SARAVANAMUTHU et al., 2004).

Figura 12: Estrutura química de inibidor irreversível (33) e substrato subversivos (34-37).





Os inibidores podem ser considerados ainda “substratos subversivos”, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio e subvertendo a função antioxidante da TR. A enzima tripanotona redutase, através de NADPH, reduz compostos como por exemplo os derivados de naftoquinonas ou nitrofuranos no lugar de tripanotona dissulfeto. A oxidação deste substrato subversivo leva à produção concomitante de peróxido como fonte de estresse oxidativo que perturba o sistema de defesa do parasito. Menadiona (**31**  $CI_{50}$  55,0  $\mu M$ ) e plumbagina (**32**  $CI_{50}$  28,0  $\mu M$ ) são exemplos de substratos subversivos. Através da síntese paralela e *high-throughput screening* foram identificados derivados de 1,4-naftoquinonas mais seletivos para TR (**33-34**) (SALMON-CHEMIN et al., 2000, 2001). É importante notar que, em princípio, a inibição da TR *in vitro* também deve correlacionar-se com a atividade antiparasitária *in vitro* contra os tripanossomatídeos, *T. cruzi* e *Leishmania spp.* A maioria destes substratos subversivos apresentaram correlação da potência como substrato subversivo *in vitro* e atividade tripanocida *in vivo*, sendo considerado um grande avanço na terapia antitripanossomatídeo (SALMON-CHEMIN et al., 2001).

Após a identificação de um *hit*, diferentes estratégias são utilizadas para otimizar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Um composto ativo só poderá ser um fármaco se atender estritamente os requisitos do perfil farmacológico. A otimização de um *hit* tem como objetivo a administração de fármacos por via oral, devido a conveniência na administração, maior adesão ao tratamento e facilidade de fabricação. Assim, muitos projetos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos estão direcionados a otimizar *hits* passíveis de serem administrados por via oral (LIPINSKI, 2004; LIPINSKI et al., 1997; VEBER et al., 2002).

Utilizam-se estratégias que visam otimizar a interação entre o composto e o alvo e, com isso, melhorar o efeito farmacológico, aumentar a capacidade deste composto atingir o alvo, assim como possuir um tempo de meia-vida aceitável. O composto líder (*lead*) deve ter boa seletividade, dessa forma proporcionando os mínimos efeitos adversos possíveis, deve ser facilmente sintetizado, quimicamente estável, não ser tóxico, ter propriedades farmacocinéticas e lipofilicidade aceitáveis (KATSUNO et al., 2015; PATRICK, 2013; TANRIKULU; KRÜGER; PROSCHAK, 2013).

Christopher A. Lipinski e colaboradores (1997), analisando mais de 2000 fármacos observaram que algumas propriedades físico-químicas necessárias para que os fármacos apresentassem boa biodisponibilidade por via oral, elaborando a regra dos cinco (Ro5). Essa regra propõe que

um composto terá uma probabilidade maior de ser bem absorvido por via oral se apresentar um  $\log P < 5$ , peso molecular  $< 500$  daltons, número de doadores de ligações de hidrogênio (HBD)  $< 5$ , número de aceptores de ligações de hidrogênio (HBA)  $< 10$  (LIPINSKI et al., 1997). Adicionalmente, a flexibilidade molecular reduzida, número de ligações rotacionáveis  $< 10$ , e a baixa área de superfície polar  $\leq 140 \text{ \AA}$  ou a contagem total de ligações de hidrogênio (soma de doadores e aceptores)  $< 12$ , também são consideradas propriedades importantes para a predição de uma biodisponibilidade oral (VEBER et al., 2002).

Com relação a doença de Chagas e leishmanioses, esse processo de otimização pode ser mais longo. Vários já foram os compostos avaliados frente a essas parasitoses, porém poucos foram os novos esqueletos químicos identificados. Diante disso, os critérios estabelecidos para a seleção de um *hit* se concentram na identificação de novas séries de compostos e mecanismos de ação, com atividade antiparasitária moderada frente às formas intracelulares de *Leishmania donovani* e *T. cruzi* ( $IC_{50} \leq 10,0 \mu M$ ), pois existe uma preocupação em não se descartar possíveis compostos ativos com novos esqueletos químicos (DON; IOSET, 2014). Um dos critérios importantes para seleção de um composto tripanocida líder é que o mesmo demonstre reduzir 80% da carga parasitária em órgãos ou tecidos, ou que resulte na não detecção dos parasitos no final do tratamento em ensaios *in vivo* e exiba um aumento da expectativa de vida em até 10 doses a 50 mg/Kg administradas por via oral em modelo agudo de camundongo. A literatura aponta como parâmetro para seleção de compostos líderes leishmanicidas, uma redução de mais de 70% da carga parasitária hepática após cinco doses de 50 mg/kg administradas por via oral, em modelo de rato (infectado com *L. donovani* ou *Leishmania infantum*) (KATSUNO et al., 2015).

## 2.4 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS

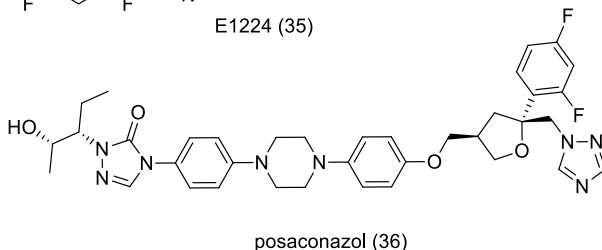
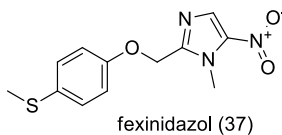
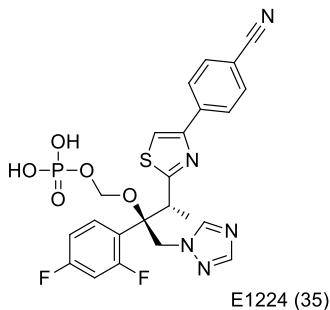
A escolha do ensaio biológico correto é crucial para o sucesso de um programa de pesquisa de fármacos, pois o resultado encaminhará a direção do projeto. O teste a ser empregado, por se tratar normalmente de um grande número de compostos a ser analisado, deve ser preferencialmente de baixo custo, rápido e simples. Primeiramente os testes são realizados *in vitro* (células, tecidos, enzimas e receptores) por serem mais baratos, fáceis de se executar e podem ser automatizados,

mas são com os ensaios *in vivo* que a atividade farmacológica desejada e a farmacocinética são monitoradas (PATRICK, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, um novo fármaco para doença de Chagas deve levar à cura parasitária durante a fase aguda e crônica da doença, apresentar eficácia em dose única ou em poucas doses, não induzir a resistência, ter baixo custo e ausência de efeitos adversos (WHO, 2017). O tratamento da doença de Chagas vem sendo explorado através de vacinas preventivas e fármacos efetivos. Hoje em dia, não há vacinas disponíveis ou submetidas a testes clínicos para doença de Chagas (CARNEIRO et al., 2017).

Recentemente, foi publicado por Torrico e colaboradores (2018) um estudo clínico correlacionando diferentes doses da nova entidade química E1224 (**35**) (pró-fármaco de ravuconazol) e benznidazol (Figura 13). Os ensaios mostraram ser promissores, podendo ser elaborado um novo esquema de terapia combinada entre esses dois compostos (TORRICO et al., 2018). Outros estudos clínicos foram realizados com diferentes doses de posaconazol (**36**), ou posaconazol em associação com o benznidazol, no entanto a terapia com o benznidazol foi mais eficiente (MOLINA et al., 2014; MORILLO et al., 2017). Um candidato ao tratamento da doença de Chagas é o fexinidazol (**37**), o qual está em estudo clínico de fase II, em que se pretende avaliar a eficácia e segurança de esquemas de curta duração e baixa dose de fexinidazol em adultos com doença de Chagas crônica (DNDI, 2018; MUÑOZ et al., 2009).

Figura 13: Compostos em estudos clínicos para o tratamento da Doença de Chagas.



Dentre as diferentes abordagens terapêuticas para o tratamento das leishmanioses, ainda não temos um tratamento satisfatório para esse conjunto de doenças que seja efetivo e seguro para levar à erradicação das mesmas. Apesar de estudos com vacinas já se encontrarem em fase de ensaios clínicos, a vacinação ainda não consegue extirpar a doença (GILLESPIE et al., 2016). Até o momento, nenhuma vacina ou medicamento foi fornecido para induzir proteção a longo prazo e garantir imunidade efetiva contra a leishmaniose. Porém, diante de um baixo investimento em desenvolver fármacos que façam frente a essa parasitose, alguns estudos clínicos foram realizados com pouco progresso. Acredita-se que um dos motivos seja a falta de padronização nos ensaios clínicos, o que dificulta um comparativo entre os resultados das pesquisas (OLLIARO et al., 2018). Estudos clínicos envolvendo a terapia combinada de fármacos já disponíveis comercialmente para o tratamento da leishmaniose estão sendo avaliados (CATTAPRETA; MOTTRAM, 2018; DNDI, 2018)

Portanto, um número reduzido de novas entidades químicas foram encontradas nas últimas décadas, dificultando a descoberta de um tratamento seguro, eficaz, de ação oral e com menos efeitos adversos do que os fármacos atualmente usados no tratamento da leishmaniose e da doença de Chagas (KATSUNO et al., 2015; ROMANHA et al., 2010).

Uma terapia eficiente contra doença de Chagas e leishmaniose é de suma importância visto o alarmante número de novos casos e óbitos anuais e o número de pessoas sob risco de infecção, além do grande

impacto econômico e social positivos que ocorreria nos locais acometidos pelas mesmas (HOTEZ et al., 2014; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Neste sentido, buscou-se com este trabalho planejar e identificar compostos que atuem seletivamente na enzima tripanotona redutase e que sejam simultaneamente eficazes contra os parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*. A identificação de uma nova entidade química será de extrema importância para futuras pesquisas correlacionadas com o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos antitripanossomatídeos.



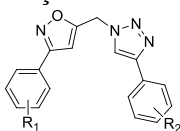
### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em ensaios *in vitro* a atividade tripanocida e leishmanicida dos derivados bis-heterociclos obtidos previamente, visando obter dados sobre a relação estrutura-atividade e avaliar atividade frente à inibição da enzima TR como possível mecanismo de ação desses compostos. Identificar novos inibidores da enzima tripanotiona redutase utilizando ferramentas de modelagem molecular.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade tripanocida e leishmanicida dos derivados bis-heterociclos obtidos previamente, assim como avaliar atividade frente à inibição da enzima TR e estabelecer um estudo de relação estrutura-atividade;



R<sub>1</sub> = H; 4-OCH<sub>3</sub>; 3,4,-OCH<sub>3</sub>; 3-OCH<sub>3</sub>O-4  
 R<sub>2</sub> = H; 4-CH<sub>3</sub>; 2,4,5-CH<sub>3</sub>; 2-CH<sub>3</sub>; 4-  
 OCH<sub>3</sub>; 2-OCH<sub>3</sub>; 4-OCH<sub>3</sub>; 3,5-OCH<sub>3</sub>; 4-  
 OCF<sub>3</sub>; 4-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>; 4-NH<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>OH; 4-  
 NO<sub>2</sub>; 4-F; 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 3-  
 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C(OCH<sub>3</sub>)CH-4

2. Elaborar farmacóforos 3-D com base em inibidores da tripanotiona redutase já descritos na literatura e em estruturas cristalográficas da enzima, para realizar uma triagem virtual e selecionar ligantes capazes de representar novos inibidores da enzima;
3. Avaliar os compostos selecionados frente à atividade inibitória da enzima TR;
4. Com base nos resultados obtidos, propor e sintetizar novos análogos, com base em estratégias clássicas de modificação molecular;
5. Avaliar os derivados sintetizados frente à atividade inibitória da enzima tripanotiona redutase e às atividades tripanocida e leishmanicida *in vitro*;
6. Realizar estudos de ancoramento molecular dos compostos que apresentarem maior atividade frente a enzima TR e verificar possíveis interações com o sítio ativo da enzima.





## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados métodos espectroscópicos como a ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ), carbono ( $^{13}\text{C}$ ) e bidimensionais (quando necessário) e análise infravermelho (IV), assim como análise espectrométrica de massas para a elucidação estrutural e caracterização dos compostos sintetizados.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^1\text{He}$  bidimensionais foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Fourier 300 MHz da Central de Análises do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC e nos equipamentos Varian Oxford AS-400 e Bruker Advance DPX 400 MHz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP). Para as análises de RMN foram utilizados como padrão interno TMS ( $\delta = 0,00$  ppm), salvo indicação contrária. dimetil sulfóxido-d6 (DMSO-d6), clorofórmio-d ( $\text{CDCl}_3$ ) e metanol-d4 (MeOD-d4) foram usados como solvente. Na ausência de TMS como padrão, são dados valores de deslocamento químicos ( $\delta$ ) em partes por milhão de sinais de solventes residuais (NMR  $^1\text{H}$ :  $\delta\text{H} = 7,26$  ppm para  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta\text{H} = 2,50$  ppm para DMSO-d6 e  $\delta\text{H} = 3,31$  ppm para MeOD-d4; NMR  $^{13}\text{C}$ :  $\delta\text{C} = 77,0$  ppm para  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta\text{C} = 39,4$  ppm para DMSO-d6 e  $\delta\text{C} = 49,0$  ppm para MeOD-d4) (GOTTLIEB; KOTLYAR; NUDELMAN, 1997). As multiplicidades dos sinais obtidos são reportadas seguindo as seguintes abreviações: s, simpleto; d, duplete; dd, duplo-duplete, t, tripleto; td, triplo-duplete e m, multiplete.

Os espectros de massas foram adquiridos através do LC-MS, LC Agilent 1100 series, MS Bruker MicrOTOF espectrômetro de massas DUNDEE e em um espectrômetro Waters Xevo G2-S QTOF no Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFSC.

As análises de absorvância por IV foram feitas através do Equipamento IR Prestige-21 FTIR-8400 Shimadzu.

Na avaliação das atividades biológicas foi utilizado o leitor automático de placas (Infinite M200 TECAN). Como substâncias de referência foram utilizados benznidazol (Sigma Aldrich), anfotericina B e clomipramina.

### 4.2 APARELHAGEM LABORATORIAL

Os pontos de fusão foram obtidos em um equipamento MICROQUÍMICA MQAFP-301, com visor digital e não são corrigidos.

As reações realizadas sob irradiação micro-ondas foram conduzidas em um reator Discovery - CEM Explorer com sistemas de controle de pressão, resfriamento e adição de gases em um tubo de vidro Pyrex de 10 mL.

Os evaporadores rotatórios utilizados foram os modelos R-210 da BUCHI com condensador dedo frio, Büchi V-700 e o IKA- RV 10 digital.

Também foram utilizados: balança analítica bioprecisa FA.2104N.; câmara reveladora de ultravioleta (UV) Dist modelo GRC03; agitadores magnéticos IKA-C MAG HS7 com placa de aquecimento.

### 4.3 OUTROS MATERIAIS

Os solventes são de grau P.A. e foram destilados previamente ao uso. Os reagentes foram tratados e purificados de acordo com métodos descritos na literatura (ARMAREGO, 2017).

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas em cromatoplasmas de gel de sílica G60 SILICYCLE®, com indicador de fluorescência F-254.

Agentes cromogênicos utilizados: ninidrina, vanilina fosfórica e vapor de iodo (WAGNER; BLADT, 1996).

As purificações dos compostos foram feitas por cromatografia em coluna, de modo geral utilizando sílica gel com tamanhos de partícula 40-63 e 63-200 µm (Sigma Aldrich); em casos específicos para purificação da derivados aminas foi utilizada e alumina neutra (Sigma Aldrich).

### 4.4 SÍNTESE

#### 4.4.1 Síntese dos compostos bis-heterociclos (44-85)

Os processos de obtenção e caracterização dos compostos bis-heterociclos estão descritos de forma mais detalhada nas publicações “Synthesis and SAR of new isoxazole-triazole bis-heterocyclic compounds as analogues of natural lignans with antiparasitic activity” na *Biorganic and Medicinal Chemistry* (ZIMMERMANN et al., 2018).

A rota de síntese utilizada para a obtenção dos bis-heterociclos, inicia com aldeídos comerciais (4-metoxibenzaldeído, 3,4-dimetoxibenzaldeído, benzaldeído e 1,3-benzodioxol-5-carbaldeído). Os respectivos derivados isoxazólicos 3,5-dissubstituídos foram preparados

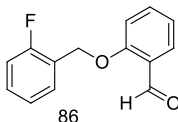
através da reação de cicloadição 1,3 dipolar entre um dipolo (óxido de nitrila) e um dipolarófilo (álcool propargílico), com rendimentos entre 55-76%.

A partir desses heterociclos foram preparados os derivados azidos como intermediários para a segunda reação de cicloadição. A seguir a descrição do procedimento geral para a síntese dos compostos bis-heterociclos: a uma solução do composto azido (1 eq.) em 0,2 mL de DMF, foi adicionado  $\text{CuSO}_4$  (0,5 eq.) diluído em 50,0  $\mu\text{L}$  de água, ascorbato de sódio (0,25 eq.) e alcino (2 eq.). A reação foi realizada sob a irradiação por micro-ondas a 150W, 70 °C, durante 10 minutos. Os compostos sintetizados foram purificados através de colunas cromatográficas e caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  ou HSQC e espectrometria de massas (LC-MS) e os dados encontram-se disponíveis nas publicações referenciadas (ZIMMERMANN, 2014; ZIMMERMANN et al., 2018).

#### 4.4.2 Síntese dos compostos planejados a partir do composto S21.

##### 4.4.2.1 Procedimento geral para a síntese dos intermediários éteres (86-91).

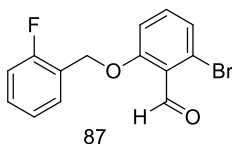
A uma mistura de salicilaldeído (18,3  $\mu\text{L}$  0,17 mmol) em DMF (345,8  $\mu\text{L}$ ) em um tubo de micro-ondas, foi adicionado  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (47,8 mg, 0,34 mmol) seguido do agente alquilante, cloreto de 2-fluorbenzila (20,5  $\mu\text{L}$ , 0,17 mmol) (BOGDAL; PIELICHOWSKI; JASKOT, 1998). A mistura foi submetida à irradiação por micro-ondas em um tubo selado, durante 30 minutos, 70 °C e 150 W, procedimento metodológico adaptado de BOGDAL e colaboradores, 1998. A reação foi monitorada por CCD e quando observado o desaparecimento do material de partida, a mesma foi diluída em AcOEt (15,0 mL) e extraída com solução saturada de NaCl (3 x 10,0 mL). A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e o solvente rota evaporado. O composto foi purificado por coluna de sílica gel [Hexano:AcOEt, 9:1 (v/v)].



O intermediário 2-((2-fluorobenzil)oxi)benzaldeído (**86**) foi obtido como óleo transparente (68,2 mg, 0,30 mmol, 87% de rendimento). **R.F.:** 0,6 [Hexano:AcOEt, 90:10 (v/v)]. **F.M.:**  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FO}_2$ . **P.M.:** 230,0743  $\text{g mol}^{-1}$ . **RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.47 (s, 1H, H-

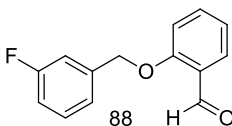
C=O), 7,79 (dd,  $J = 1,78, 7,67$  Hz, 2H, Ar), 7,52 – 7,42 (m, 2H), 7,28 (tdd,  $J = 1,73, 5,47, 7,47$  Hz, 1H), 7,13 (td,  $J = 0,88, 7,93$  Hz, 1H, Ar), 7,08 – 6,96 (m, 3H, Ar), 5,19 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  189,85, 160,91, 160,55 (d,  $^1J_{CF} = 248,00$  Hz), 136,10, 130,27 (d,  $^3J_{CF} = 8,15$  Hz), 129,68 (d,  $^3J_{CF} = 3,94$  Hz), 128,69, 125,35, 124,57 (d,  $^4J_{CF} = 3,61$  Hz), 123,36 (d,  $^2J_{CF} = 14,17$  Hz), 121,38, 115,65 (d,  $^2J_{CF} = 21,04$  Hz), 113,05, 64,46 (d,  $^3J_{CF} = 4,39$  Hz) (HELLWINKEL; GÖKE, 1995).

Composto **87** - 2-bromo-6-((2-fluorobenzil)oxi)benzaldeído



O intermediário **87** foi sintetizado de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese dos intermediários éteres, utilizando como materiais de partida o 5-bromosalicilaldeído e o agente alquilante, cloreto de 2-fluorbenzila. O composto foi obtido como sólido branco (81,2 mg, 0,26 mmol, 76 % de rendimento). **R.F.:** 0,4 [Hexano:AcOEt, 90:10 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrFO<sub>2</sub>. **P.M.:** 307,9848 g mol<sup>-1</sup>. **P.F.:** 105,0-107,4 °C. **RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10,35 (s, 1H, H-C=O), 7,89 – 7,84 (m, 1H, Ar), 7,58 – 7,51 (m, 1H, Ar), 7,40 (t,  $J = 7,36$  Hz, 1H, Ar), 7,29 (q,  $J = 7,12$  Hz, 1H, Ar), 7,22 – 6,98 (m, 2H, Ar), 6,92 (d,  $J = 8,85$  Hz, 1H, Ar), 5,17 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  187,18, 159,81 (d,  $^1J_{CF} = 246,00$  Hz), 158,58, 157,78, 130,07, 129,38 (d,  $^3J_{CF} = 8,26$  Hz), 128,59 (d,  $^3J_{CF} = 3,45$  Hz), 125,45, 123,46 (d,  $^3J_{CF} = 3,58$  Hz), 121,75, 114,58 (d,  $^2J_{CF} = 20,94$  Hz), 113,99, 113,03, 98,94, 63,70 (d,  $^3J_{CF} = 4,37$  Hz).

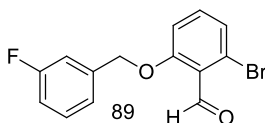
Composto **88** - 2-((3-fluorobenzil)oxi)benzaldeído



O intermediário **88** foi sintetizado de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese dos intermediários éteres, utilizando como materiais de partida o salicilaldeído e o agente alquilante, brometo de 3-fluorbenzila. O composto foi obtido como óleo transparente (45,6 mg, 0,20 mmol, 74 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt, 90:10 %

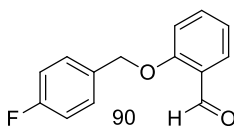
(v/v)]. **F.M.:** C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>FO<sub>2</sub>. **P.M.:** 230,0743 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,56 (d, *J* = 0,72 Hz, 1H, H-C=O), 7,86 (dd, *J* = 1,87, 7,66 Hz, 1H, Ar), 7,53 (ddd, *J* = 1,87, 7,39, 8,46 Hz, 1H, Ar), 7,37 (td, *J* = 5,84, 7,98 Hz, 1H, Ar), 7,21 (d, *J* = 7,63 Hz, 1H, Ar), 7,15 (d, *J* = 9,46 Hz, 1H, Ar), 7,09 – 6,98 (m, 3H, Ar), 5,18 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 189,62, 160,74, 138,71 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 7,30 Hz), 136,05, 130,44 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,16 Hz), 128,72, 125,21, 122,69 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,10 Hz), 121,32, 115,24 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 21,18 Hz), 114,16 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 22,10 Hz) 112,96, 69,66 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 1,84 Hz) (HELLWINKEL; GÖKE, 1995).

Composto **89** - 2-bromo-6-((3-fluorobenzil)oxi)benzaldeído



O intermediário **89** foi sintetizado de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese dos intermediários éteres, utilizando como materiais de partida o 5-bromosalicilaldeído e o agente alquilante, brometo de 3-fluorobenzila O composto foi obtido como sólido branco (65,2 mg, 0,21 mmol, 80% de rendimento). **R.F.:** 0,4 [Hexano:AcOEt, 90:10 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrFO<sub>2</sub>. **P.M.:** 307,9848 g mol<sup>-1</sup> **P.F.:** 94,2-96,3 °C. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,45 (s, 1H, H-C=O), 7,93 (d, *J* = 2,67 Hz, 1H, Ar), 7,60 (dd, *J* = 2,67, 8,84 Hz, 1H, Ar), 7,38 (dt, *J* = 5,86, 7,99 Hz, 1H, Ar), 7,20 (d, *J* = 8,18 Hz, 1H, Ar), 7,13 (d, *J* = 9,37 Hz, 1H, Ar), 7,05 (td, *J* = 2,17, 8,40 Hz, 1H, Ar), 6,92 (d, *J* = 8,84 Hz, 1H, Ar), 5,17 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 188,14, 163,06 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 247,62 Hz), 159,60, 138,36, 138,13 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> 7,14 Hz), 130,56 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,29 Hz), 122,75 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> 3,02 Hz), 115,48 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> 21,19 Hz), 115,04, 114,25 10 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> 17,96 Hz, H), 114,07, 70,03 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 1,95 Hz).

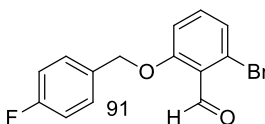
Composto **90** - 2-((4-fluorobenzil)oxi)benzaldeído



O intermediário **90** foi sintetizado de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese dos intermediários éteres, utilizando como materiais de partida o salicilaldeído e o agente alquilante, cloreto de 4-

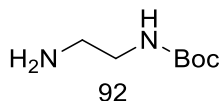
fluorbenzila. O composto foi obtido como óleo transparente (58,0 mg, 0,25 mmol, 62 % de rendimento). **R.F.:** 0,4 [Hexano:AcOEt, 90:10 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>FO<sub>2</sub>. **P.M.:** 230,0743 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,52 (d, *J* = 0,82 Hz, 1H, H-C=O), 7,85 (dd, *J* = 1,90, 7,84 Hz, 1H, Ar), 7,53 (ddd, *J* = 1,90, 7,42, 8,49 Hz, 1H, Ar), 7,41 (td, *J* = 2,04, 5,47 Hz, 2H, Ar), 7,13 – 7,00 (m, 4H, Ar), 5,14 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 189,67, 162,67 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 246,71 Hz), 160,89, 136,02, 131,91 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,37 Hz), 129,30 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,25 Hz), 128,62, 125,20, 121,21, 115,75 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 21,68 Hz, H), 113,02, 69,86 (HELLWINKEL; GÖKE, 1995).

Composto **91** - 2-bromo-6-((4-fluorobenzil)oxi)benzaldeído



O intermediário **91** foi sintetizado de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese dos intermediários éteres, utilizando como materiais de partida o 5-bromosalicilaldeído e o agente alquilante, cloreto de 4-fluorbenzila. O composto foi obtido como sólido branco (80,6 mg, 0,26 mmol, 75 % de rendimento). **R.F.:** 0,4 [Hexano:AcOEt, 90:10 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrFO<sub>2</sub>. **P.M.:** 307,9848 g mol<sup>-1</sup>. **P.F.:** 74,7-76,0 °C. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,41 (s, 1H, H-C=O), 7,92 (d, *J* = 2,66 Hz, 1H, Ar), 7,60 (dd, *J* = 2,66, 8,84 Hz, 1H, Ar), 7,45 – 7,36 (m, 2H, Ar), 7,13 – 7,04 (m, 2H, Ar), 6,94 (d, *J* = 8,84 Hz, 1H, Ar), 5,13 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 188,22, 162,79 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 247,41 Hz), 159,76, 138,34, 131,38 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,22 Hz, H), 131,18, 129,41 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,25 Hz), 126,47, 115,88 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 21,67 Hz, H), 115,12, 114,02, 70,28.

4.4.2.2 Síntese do composto etilenodiamina monoprotetida (**92**).

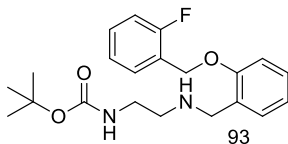


A uma solução de etilenodiamina (100,0 μL, 1,49 mmol) em MeOH (3,0 mL) à 0 °C, foi adicionado, mediante gotejamento, uma solução de ácido trifluoracético (TFA) (114,0 μL, 1,49 mmol) em MeOH (7,4 mL). Esta mistura ficou sob agitação durante 15 minutos,

em banho de gelo (0 °C), depois foi adicionado H<sub>2</sub>O (2,0 mL) à reação e a mistura ficou sob agitação por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi acrescentada, durante 10 minutos, solução de dicarbonato de di-terc-butila (BOC) (325,2 mg, 1,49 mmol) e iodo (37,88 mg, 0,15 mmol) em MeOH (6,0 mL). A reação foi monitorada por CCD e depois de 1 hora, o conteúdo do balão foi reduzido em evaporador rotatório. Foi adicionada a mistura reacional solução de tiosulfato de sódio 5% (5 mL) e feita a extração com éter etílico (2 x 15 mL). A fase aquosa teve o pH ajustado para 10 usando solução NaOH 50% e foi extraída com CHCl<sub>3</sub> (3 x 10 mL) (GAWARE; JORDIS, 2009). À fase orgânica por sua vez foi adicionada Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O composto **92** - terc-butil(2-aminoetil)carbamato, foi obtido como óleo amarelo-claro (129,8 mg, 0,81 mmol, 54% de rendimento). **R.F.:** 0,6 [AcOEt:MeOH, 80:20 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **P.M.:** 160.1212 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,10 (q, *J* = 5,65 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,72 (t, *J* = 5,65 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,45 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,30 (C=O), 79,06 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 43,28 (CH<sub>2</sub>), 41,78 (CH<sub>2</sub>), 28,38 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 161,1290, obtido 161,1293 (HOLLAND et al., 2010).

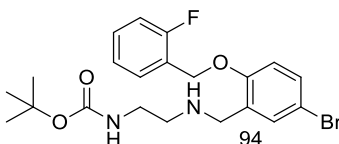
#### 4.4.2.3 Procedimento geral para a síntese dos derivados carbamatos (**93-98**)

A um balão de vidro de fundo redondo (20,0 mL), foi adicionado o intermediário éter (**86**) (40,0 mg, 0,17 mmol) em seguida CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200,0 µL), a amina (**92**) (41,8 mg, 0,26 mmol) e por fim peneira molecular (0,5g por mmol de aldeído). A reação foi mantida sob agitação durante 1 hora à temperatura ambiente e monitorada por CCD. Ao final da reação, quando não observado mais material de partida através da CCD, o solvente foi concentrado e em seguida foi adicionado NaBH<sub>4</sub> (13,16 mg, 0,35 mmol) e MeOH (100 µL) (WANG et al., 2011). A reação foi monitorada por CCD e, após 30 minutos, o solvente rotaevaporado e a mistura diluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5,0 mL) e filtrada em celite. O produto foi purificado por coluna de sílica gel [Hexano:AcOEt 20:80 (v/v) com 1 gota de solução saturada de hidróxido de amônia].



O composto **93** (terc-butil(2-((2-(2-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)carbamato (**93**) foi obtido como óleo transparente (39,0 mg, 0,10 mmol, 60% de rendimento). **R.F.:** 0,4 [Hexano:AcOEt 20:80% + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:**  $C_{21}H_{27}FN_2O_3$ . **P.M.:** 374,2006 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,47 (t,  $J = 7,44$  Hz, 1H, Ar), 7,37 – 7,21 (m, 3H, Ar), 7,19 (s, 1H, Ar), 7,10 (t,  $J = 9,22$  Hz, 3H, Ar), 6,98 – 6,88 (m, 3H, Ar), 5,17 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 4,08 (s, 1H, NH), 3,87 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 3,23 (d,  $J = 5,80$  Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,73 (t,  $J = 5,80$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1,41 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  160,53 (d,  $^1J_{CF} = 246,55$ ), 156,54, 156,17, 130,51, 129,92 (d,  $^3J_{CF}$  d,  $J = 8,17$  Hz), 129,61 (d,  $^3J_{CF} = 3,79$  Hz), 129,02, 126,39, 124,40 (d,  $^4J_{CF} = 3,55$  Hz), 123,92 (d,  $^2J_{CF} = 14,22$  Hz), 121,09, 115,48 (d,  $^2J_{CF} = 21,19$  Hz), 111,69, 79,13, 64,01 (d,  $^3J_{CF} = 4,21$  Hz), 48,23, 47,83, 39,49, 28,40. HRMS (ESI-TOF) m/z: [M+H]<sup>+</sup> calculado para  $C_{21}H_{28}FN_2O_3$  375,2084, obtido 375,2220.

Composto **94** – terc-butil(2-((5-bromo-2-(2-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)carbamato

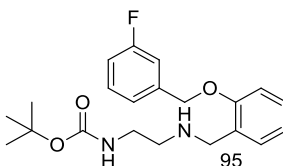


A metodologia utilizada para o preparo deste composto foi a mesma utilizada para a síntese do composto **93**, partindo do intermediário **87**. O derivado foi obtido como sólido branco (26,7 mg, 0,06 mmol, 26% de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt 20:80 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:**  $C_{21}H_{26}BrFN_2O_3$ . **P.M.:** 452,1111 g mol<sup>-1</sup>. **P.F.:** 70,2-72,5 °C **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,43 (t,  $J = 7,41$  Hz, 2H), 7,38 (d,  $J = 2,44$  Hz, 1H), 7,36 – 7,29 (m, 1H), 7,17 (t,  $J = 7,49$  Hz, 2H), 7,10 (t,  $J = 9,56$  Hz, 1H), 6,83 (d,  $J = 8,65$  Hz, 1H), 5,13 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 4,99 (s, 1H, NH), 3,77 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 3,20 (d,  $J = 5,48$  Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,68 (t,  $J = 5,77$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1,87 (s, 1H, NH), 1,43 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  158,15, 156,19, 155,60, 132,61, 131,08, 130,97, 130,16 (d,  $^3J_{CF} = 8,10$



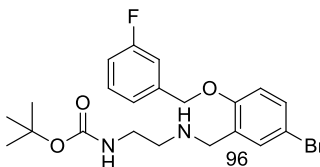
(Hz), 129,63 (d,  $^3J_{CF} = 3,91$  Hz, H), 124,52 (d,  $^4J_{CF} = 3,57$  Hz), 123,73 (d,  $^2J_{CF} = 14,24$  Hz), 115,65 (d,  $^2J_{CF} = 21,10$  Hz), 113,47, 79,24, 64,39 (d,  $^3J_{CF} = 4,29$  Hz), 48,42, 48,35, 40,31, 28,54. **HRMS (ESI-TOF) m/z:**  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{21}H_{27}BrFN_2O_3$  453,1189, obtido 453,1126.

Composto **95** – terc-butil(2-((2-((3-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)carbamato



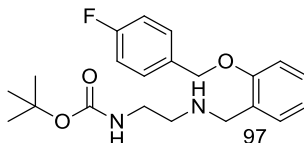
A metodologia utilizada para o preparo deste composto foi a mesma utilizada para a síntese do composto **93**, partindo do intermediário **88**. O derivado foi obtido como óleo amarelo-claro (166,6 mg, 0,44 mmol, 52 % de rendimento). **R.F.:** 0,3 [Hexano:AcOEt 20:80 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:**  $C_{21}H_{27}FN_2O_3$ . **P.M.:** 374,2006 g mol<sup>-1</sup>. **RMN  $^1H$**  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,40-7,31 (m, 2H, Ar), 7,30 – 7,23 (m, 1H, Ar), 7,21 (d,  $J = 7,69$  Hz, 1H, Ar), 7,14 (d,  $J = 9,44$  Hz, 1H, Ar), 7,03 (dt,  $J = 4,23, 8,38$  Hz, 1H, Ar), 6,96 (t,  $J = 7,46$  Hz, 1H, Ar), 6,89 (d,  $J = 8,25$  Hz, 1H, Ar), 5,69 (s, 1H, NH) 5,15 (s, 2H,  $H_2C-O$ ), 4,00 (s, 2H,  $N-CH_2-Ar$ ), 3,28 (d, 2H, 4,85,  $HN-CH_2$ ), 2,85 (t,  $J = 4,85$  Hz, 2H,  $CH_2-NH$ ), 1,95 (s, 1H, NH), 1,40 (s, 9H,  $(CH_3)_3$ ). **RMN  $^{13}C$**  (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  161.44, 156.70, 156.36, 139.33 (d,  $^3J_{CF} = 6.87$  Hz), 131,29, 130,53, 130,42, 130,06 (d,  $^3J_{CF} = 5,76$  Hz), 123,31, 122,81 (d,  $^4J_{CF} = 3,04$  Hz, H), 121,37, 115,14 (d,  $^2J_{CF} = 21,05$  Hz, H), 114,26 (d,  $^2J_{CF} = 22,01$  Hz), 111,96, 79,57, 69,50 (d,  $^4J_{CF} = 1,58$ ), 47,65, 38,64, 28,49. **HRMS (ESI-TOF) m/z:**  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{21}H_{28}FN_2O_3$  375,2084, obtido 371,2102

Composto **96** – terc-butil(2-((5-bromo-2-((3-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)carbamato



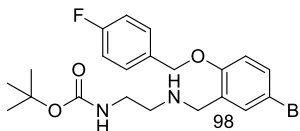
A metodologia utilizada para o preparo deste composto foi a mesma utilizada para a síntese do composto **93**, partindo do intermediário **89**. O derivado foi obtido como óleo transparente (170,6 mg, 0,38 mmol, 75% de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt 20:80 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia].  $C_{21}H_{26}BrFN_2O_3$ . **P.M.:** 452,1111 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,42 – 7,28 (m, 3H, Ar), 7,16 (d, *J* = 7,70 Hz, 1H, Ar), 7,11 (d, *J* = 9,47 Hz, 1H, Ar), 7,03 (dt, *J* = 4,13, 8,34 Hz, 1H, Ar), 6,76 (d, *J* = 8,65 Hz, 1H, Ar), 5,07 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,81 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 3,23 (q, *J* = 5,40 Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,72 (t, *J* = 5,40 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1,43 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161,32, 156,08, 155,36, 139,06 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 7,80), 132,45, 130,84 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 2,56 Hz), 130,37, 130,27, 122,46 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,16 Hz), 115,03 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 20,81), 113,96 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 22,21 Hz), 113,38, 113,33, 79,18, 69,40 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 2,12 Hz), 48,34, 48,16, 28,40. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>BrFN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 453,1189, obtido 453,1193.

Composto **97** – terc-butil(2-((2-((4-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)carbamato



A metodologia utilizada para o preparo deste composto foi a mesma utilizada para a síntese do composto **93**, partindo do intermediário **90**. O derivado foi obtido como óleo amarelo (142,0 mg, 0,34 mmol, 34 % de rendimento). **R.F.:** 0,3 [Hexano:AcOEt 20:80 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **P.M.:** 374,2006 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,41 – 7,36 (m, 2H, Ar), 7,26 – 7,23 (m, 2H, Ar), 7,09 (t, *J* = 8,58 Hz, 2H, Ar), 6,98 – 6,89 (m, 2H, Ar), 5,07 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,86 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,23 (q, *J* = 5,20 Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,73 (t, *J* = 5,20 Hz, 2H), 1,42 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161,03, 156,73, 156,29, 129,31, 129,20, 129,01, 121,18, 115,93, 115,65, 111,89, 100,15, 84,43, 69,53, 48,58, 47,93, 39,82, 28,53. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 375,2084, obtido 375,2102.

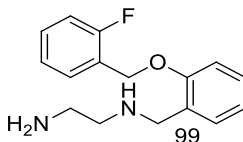
Composto **98** – terc-butil(2-((5-bromo-2-((4-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)carbamato



A metodologia utilizada para o preparo deste composto foi a mesma utilizada para a síntese do composto **93**, partindo do intermediário **91**. O derivado foi obtido como sólido branco (160,8 mg, 0,35 mmol, 40 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt 20:80 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>BrFN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **P.M.:** 452,1111 g mol<sup>-1</sup>. **P.F.:** 133-135°C. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,42 – 7,30 (m, 4H, Ar), 7,09 (t, *J* = 8,62 Hz, 2H, Ar), 6,79 (d, *J* = 8,67 Hz, 1H, Ar), 5,04 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,84 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 3,25 (q, *J* = 5,12 Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,75 (t, *J* = 5,12 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1,42 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,72 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 246,73 Hz), 156,32, 155,77, 133,19, 132,12 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,05 Hz), 131,75, 129,31 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,26 Hz), 115,87 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 21,58 Hz), 113,61, 113,44, 100,11, 79,43, 69,87, 47,90, 47,71, 39,51, 28,51. **HRMS** (ESI-TOF) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>BrFN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 453,1189, obtido 453,1193.

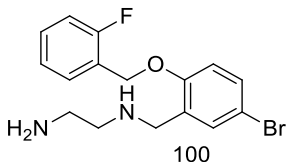
#### 4.4.2.4 Procedimento geral para a síntese de intermediários aminas (**99-104**)

A um balão de vidro de fundo redondo (20 mL), equipado com uma barra de agitação magnética, com um septo de borracha em atmosfera de argônio e com o intermediário carbamato **93** (120,0 mg, 0,32 mmol) foi adicionado CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (480,0 μL, anidro). Em banho de gelo (0 °C) foi adicionado ácido trifluoracético (TFA), com o auxílio de uma seringa (DAVIS; YANG; DENG, 2003). A mistura reacional ficou agitando por 1 hora a temperatura ambiente e a reação foi monitorada por CCD. Ao termino reacional foram adicionados a reação 500,0 μL solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> em banho de gelo. A reação ficou agitando por 15 minutos, depois a fase aquosa foi extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 15 mL), à fase orgânica foi adicionado Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada no evaporador rotatório.



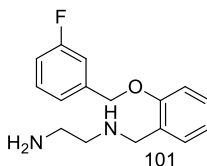
O produto obtido *N*1-(2-((2-fluorobenzil)oxi)benzil)etano-1,2-diamina (**99**) é um óleo amarelo (93,0 mg, 0,34 mmol, 95% de rendimento). **R.F.:** 0,2 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>O. **P.M.:** 274,1481 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,49 (t, *J* = 7,09 Hz, 1H, Ar), 7,35 – 7,03 (m, 5H, Ar), 6,99 – 6,88 (m, 2H, Ar), 5,14 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,82 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 2,76 (s, 2H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2,63 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160,52 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 247,02 Hz), 156,53, 130,07, 129,80 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,17 Hz), 129,58 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,99 Hz), 128,70, 128,30, 124,29 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,44), 124,07, 120,95, 115,41 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 21,09 Hz), 111,56, 63,90 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 4,23 Hz), 51,54, 49,11, 41,61.

Composto **100** - *N*1-(5-bromo-2-((2-fluorobenzil)oxi)benzil)etano-1,2-diamina.



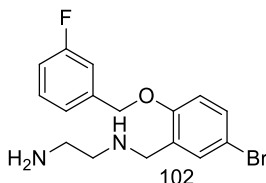
A metodologia utilizada para a síntese do intermediário **100** foi a mesma descrita para o intermediário **99**, utilizando o composto **94**. O composto foi obtido como óleo amarelo (113,0 mg, 0,34 mmol, 97 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>BrFN<sub>2</sub>O. **P.M.:** 352,0587 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,39 – 7,11 (m, 4H, Ar), 7,10 – 6,89 (m, 2H, Ar), 6,70 (d, *J* = 8,02 Hz, 1H, Ar), 4,99 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,66 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 2,65 (s, 2H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2,52 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160,51 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 247,37 Hz), 155,57, 132,54, 131,27, 130,80, 130,09 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,15 Hz), 129,64 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,99 Hz), 124,42 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,57 Hz), 123,72 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 14,19 Hz), 115,55 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 20,98 Hz), 113,38, 64,31 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 4,25 Hz), 51,51, 48,57, 41,60.

Composto **101** - *N*1-(2-((3-fluorobenzil)oxi)benzil)etano-1,2-diamina



A metodologia utilizada para a síntese do intermediário **101** foi a mesma descrita para o intermediário **99**, utilizando o composto **95**. O composto foi obtido como óleo amarelo (87,0 mg, 0,32 mmol, 79 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>O. **P.M.:** 274,1481 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,39 – 7,10 (m, 5H, Ar), 7,04 – 6,96 (m, 1H, Ar), 6,93 (t, *J* = 7,51 Hz, 1H, Ar), 6,88 (d, *J* = 8,16 Hz, 1H, Ar), 5,08 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,85 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 2,80 (t, *J* = 5,48 Hz, 2H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2,74 – 2,64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,07 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 246,32 Hz), 156,54, 139,70 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 7,31 Hz), 130,33 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 7,62 Hz), 128,63, 128,01, 127,32, 122,67 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 2,92 Hz), 121,17, 114,96 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 21,05 Hz), 114,13 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 22,00 Hz), 111,74, 69,25 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 1,37 Hz), 50,33, 48,85, 40,83.

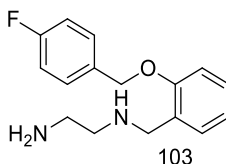
Composto **102** - N1-(5-bromo-2-((3-fluorobenzil)oxi)benzil)etano-1,2-diamina



A metodologia utilizada para a síntese do intermediário **102** foi a mesma descrita para o intermediário **99**, utilizando o composto **96**. O composto foi obtido como óleo amarelo (116,9 mg, 0,33 mmol, 100 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>BrFN<sub>2</sub>O. **P.M.:** 352,0587 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,43 (d, *J* = 2,24 Hz, 1H, Ar), 7,38 – 7,28 (m, 2H, Ar), 7,15 (t, *J* = 9,93 Hz, 2H, Ar), 7,03 (td, *J* = 2,27, 8,72 Hz, 1H, Ar), 6,76 (d, *J* = 8,67 Hz, 1H, Ar), 5,07 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,82 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 2,79 (q, *J* = 6,04, 6,53 Hz, 2H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2,67 (t, *J* = 5,03 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,98 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 247,31 Hz), 155,41, 139,11 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 7,53 Hz), 132,51, 130,76, 130,27 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,34 Hz), 122,53 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 2,79 Hz), 115,02 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 21,02

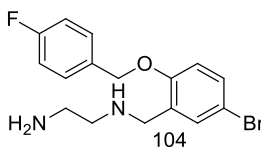
Hz), 114,03 (d,  $^2J_{CF} = 21,95$  Hz), 113,38, 113,28, 69,39 (d,  $^4J_{CF} = 1,74$  Hz), 51,65, 48,50, 41,54, 29,69.

Composto **103** - N1-(2-((4-fluorobenzil)oxi)benzil)etano-1,2-diamina



A metodologia utilizada para a síntese do intermediário **103** foi a mesma descrita para o intermediário **99**, utilizando o composto **97**. O composto foi obtido como óleo marrom (69,5 mg, 0,25 mmol, 73% de rendimento). **R.F.:** 0,4 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>O. **P.M.:** 274,1481 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,39 (s, 2H, Ar), 7,24 (dd,  $J = 5,29, 12,94$  Hz, 2H, Ar), 7,06 (t,  $J = 7,76$  Hz, 2H, Ar), 6,91 (d,  $J = 7,55$  Hz, 2H, Ar), 5,04 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,81 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 2,75 (s, 2H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2,65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,46 (d,  $^1J_{CF} = 246,15$  Hz), 156,59, 132,77 (d,  $^4J_{CF} = 3,03$  Hz), 130,09, 129,18 (d,  $^3J_{CF} = 7,98$  Hz), 128,37, 120,92, 115,54 (d,  $^2J_{CF} = 21,51$  Hz), 111,64, 69,31, 48,98, 41,27, 29,72.

Composto **104** - N1-(5-bromo-2-((4-fluorobenzil)oxi)benzil)etano-1,2-diamina

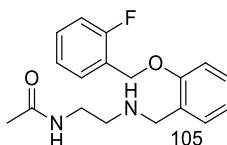


A metodologia utilizada para a síntese do intermediário **104** foi a mesma descrita para o intermediário **99**, utilizando o composto **98**. O composto foi obtido como óleo amarelo claro (116,9 mg, 0,33 mmol, 100 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>BrFN<sub>2</sub>O. **P.M.:** 352,0587 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,47 – 7,20 (m, 4H, Ar), 7,07 (t,  $J = 8,50$  Hz, 2H, Ar), 6,77 (d,  $J = 8,63$  Hz, 1H, Ar), 5,02 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,78 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 2,78 (s, 2H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2,64 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,59 (d,  $^1J_{CF} = 246,89$  Hz), 155,62, 132,47, 132,37 (d,  $^4J_{CF} = 3,09$  Hz), 131,24, 130,76, 129,22 (d,  $^3J_{CF} =$

8,17 Hz), 115,69 (d,  $^2J_{CF} = 21,50$  Hz), 113,40, 113,34, 69,66, 51,54, 48,53, 41,59.

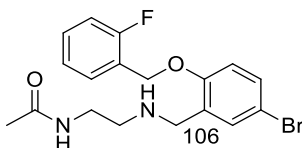
#### 4.4.2.5 Procedimento geral para a síntese dos derivados amidas (**105-110**)

A um balão de vidro de fundo redondo (10,0 mL), contendo uma barra magnética, foram adicionado o *N,N'*-carbonil-di-imidazol (CDI) (1,30 mg, 0,08 mmol) e 500  $\mu$ L de THF, seguido de ácido acético (4,17  $\mu$ L, 0,07 mmol). A mistura ficou agitando por 20 minutos e em seguida foi adicionada a amina **99** (20,0 mg, 0,07 mmol) diluída em THF (LAFRANCE et al., 2011). A mistura ficou sob agitação a temperatura ambiente durante uma hora e foi monitorada por CCD. Ao término reacional foram adicionados 10,0 mL de solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  e lavou-se com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 15 mL). À fase orgânica foi adicionado  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrou-se e concentrou-se no evaporador rotatório. O produto foi purificado em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e AcOEt:MeOH (9:1 com 1 gota de solução de hidróxido de amônia) como fase móvel.



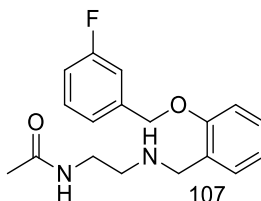
O derivado N-(2-((2-(2-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil acetamida (**105**) é um óleo amarelo (12,3 mg, 0,039 mmol, 53% de rendimento). **R.F.:** 0,3 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:**  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O}_2$ . **P.M.:** 316,1587  $\text{g mol}^{-1}$ . **RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,49 – 7,41 (m, 1H, Ar), 7,40 – 7,27 (m, 3H, Ar), 7,25 – 7,13 (m, 1H, Ar), 7,12 (t,  $J = 9,26$  Hz, 1H, Ar), 7,03 – 6,94 (m, 2H, Ar), 5,18 (s, 2H,  $\text{H}_2\text{C-O}$ ), 3,94 (s, 2H,  $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$ ), 3,38 (q,  $J = 5,46$  Hz, 2H,  $\text{HN-CH}_2$ ), 2,81 (t,  $J = 5,46$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 1,92 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,03, 162,15, 156,74, 131,23, 130,42, 130,11, 129,89 (d,  $^3J_{CF} = 3,87$  Hz), 124,68, 124,63 (d,  $^3J_{CF} = 3,54$  Hz), 123,82 (d,  $^4J_{CF} = 3,07$  Hz), 121,48, 115,79 (d,  $^2J_{CF} = 21,91$  Hz), 111,95, 64,53, 48,00, 47,03, 37,61, 23,12. **HRMS (ESI-TOF) m/z:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{FN}_2\text{O}_2$  317,1665 observado 317,1712.

Composto **106** - N-(2-((5-bromo-2-((2-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)acetamida



A metodologia utilizada para síntese do intermediário **106** foi a descrita para a obtenção do intermediário **105**, partindo da amina **100**. O derivado foi obtido como óleo transparente (6,5 mg, 0,016 mmol, 23 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>BrFN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **P.M.:** 394,0692 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,47 – 7,43 (m, 1H, Ar), 7,43 – 7,31 (m, 3H, Ar), 7,22 – 7,18 (m, 1H, Ar), 7,13 – 7,07 (m, 1H, Ar), 6,87 (d, *J* = 8,57 Hz, 1H, Ar), 5,15 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,83 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 3,34 (q, *J* = 5,47 Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,77 (t, *J* = 5,47 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1,95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170,64, 155,63, 131,74, 130,31 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,30 Hz), 129,81, 129,71 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 4,17 Hz), 128,52, 124,47 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,72 Hz), 115,63 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 20,91 Hz), 113,5, 113,44 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 9,41 Hz), 103,74, 64,51 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 4,55 Hz), 47,96, 47,73, 38,34, 23,20. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>BrFN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 395,0770 observado 395,0892.

Composto **107** - N-(2-((3-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)acetamida

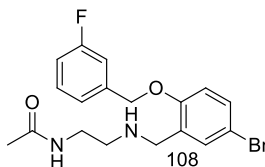


A metodologia utilizada para síntese do intermediário **107** foi a descrita para a obtenção do intermediário **105**, partindo da amina **101**. O derivado foi obtido como óleo amarelo escuro (8,3 mg, 0,026 mmol, 36 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **P.M.:** 316,1587 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,37 (td, *J* = 5,93, 7,87 Hz, 1H, Ar), 7,30 – 7,23 (m, 2H, Ar), 7,18 (d, *J* = 7,66 Hz, 1H, Ar),



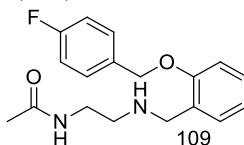
7,16 – 7,10 (m, 1H, Ar), 7,04 (td,  $J = 2,21, 8,40$  Hz, 1H, Ar), 6,97 (t,  $J = 7,52$  Hz, 1H, Ar), 6,92 (d,  $J = 8,34$  Hz, 1H, Ar), 5,11 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,89 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 3,35 (q,  $J = 5,55$  Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,77 (t,  $J = 5,55$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1,92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170,52, 162,98 (d,  $^1J_{CF} = 246,62$  Hz), 156,47, 139,31 (d,  $^3J_{CF} = 7,31$  Hz), 130,54, 130,36 (d,  $^3J_{CF} = 8,18$  Hz), 129,14, 126,28, 122,49 (d,  $^4J_{CF} = 2,89$  Hz), 121,20, 115,02 (d,  $^2J_{CF} = 21,20$  Hz), 113,98 (d,  $^2J_{CF} = 22,00$  Hz), 111,77, 69,21 (d,  $^4J_{CF} = 1,80$  Hz), 48,48, 47,29, 38,38, 23,13. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 317.,1665 observado 317,1748.

Composto **108** - N-(2-((5-bromo-2-((3-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)acetamida



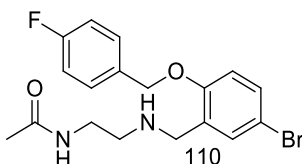
A metodologia utilizada para síntese do intermediário **108** foi a descrita para a obtenção do intermediário **105**, partindo da amina **102**. O derivado foi obtido como óleo amarelo (5,3 mg, 0,01 mmol, 19 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>BrFN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **P.M.:** 394,0692 g mol<sup>-1</sup>. **RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,41 (d,  $J = 2,39$  Hz, 1H, Ar), 7,35 (td,  $J = 2,20, 8,23, 8,83$  Hz, 2H, Ar) 7,16 (d,  $J = 7,73$  Hz, 1H, Ar), 7,11 (d,  $J = 9,31$  Hz, 1H, Ar), 7,04 (td,  $J = 2,29, 8,47$  Hz, 1H, Ar), 6,78 (d,  $J = 8,70$  Hz, 1H, Ar), 5,09 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,84 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 3,34 (q,  $J = 5,50$  Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,78 (t,  $J = 5,60$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1,94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170,57, 162,98 (d,  $^1J_{CF} = 247,49$  Hz), 155,50, 138,90 (d,  $^3J_{CF} = 7,34$  Hz), 132,82, 131,45, 130,41 (d,  $^3J_{CF} = 8,09$  Hz), 129,26, 122,55 (d,  $^4J_{CF} = 2,97$  Hz), 115,17 (d,  $^2J_{CF} = 20,27$  Hz), 114,02 (d,  $^2J_{CF} = 22,00$  Hz), 113,48, 113,40, 69,51 (d,  $^4J_{CF} = 1,64$  Hz), 48,05, 47,87, 38,63, 23,22. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>BrFN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 395,0770 observado 395,0791.

Composto **109** - N-(2-((2-(4-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)acetamida



A metodologia utilizada para síntese do intermediário **109** foi a descrita para a obtenção do intermediário **105**, partindo da amina **103**. O derivado foi obtido como óleo transparente (6,0 mg, 0,02 mmol, 26 % de rendimento). **R.F.:** 0,3 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **P.M.:** 316,1587 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,39 (dd, *J* = 5,42, 8,30 Hz, 2H, Ar), 7,30 – 7,21 (m, 2H, Ar), 7,09 (t, *J* = 8,57 Hz, 2H, Ar), 6,95 (t, *J* = 8,36 Hz, 1H, Ar), 5,07 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,82 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 3,31 (q, *J* = 5,55 Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,71 (t, *J* = 5,55 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1,92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170,26, 162,49 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 246,80 Hz), 156,59, 132,62 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,17 Hz), 130,19, 129,03 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,21 Hz), 128,68, 127,70, 121,00, 115,65 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 21,54 Hz), 111,77, 69,35, 48,78, 47,45, 38,81, 23,23. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 317,1665 observado 317,748.

Composto **110** - N-(2-((5-bromo-2-(4-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)acetamida



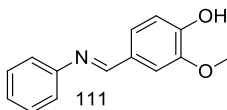
A metodologia utilizada para síntese do intermediário **110** foi a descrita para a obtenção do intermediário **105**, partindo da amina **104**. O derivado foi obtido como óleo amarelo (3,5 mg, 0,01 mmol, 13% de rendimento). **R.F.:** 0,6 [AcOEt:MeOH, 90:10 (v/v) + 1 gota sol. hidróxido de amônia]. **F.M.:** C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>BrFN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **P.M.:** 394,0692 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,41 – 7,31 (m, 3H, Ar), 7,14 – 7,05 (m, 3H, Ar), 6,80 (d, *J* = 8,57 Hz, 1H, Ar), 5,04 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 3,80 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-Ar), 3,32 (q, *J* = 5,65 Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,74 (t, *J* = 5,65 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1,94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170,48, 162,58 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 247,74 Hz), 155,61, 132,71, 132,06 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,4 Hz),

131,33, 129,51, 129,13 (d,  $^3J_{CF} = 8,06$  Hz), 115,74 (d,  $^2J_{CF} = 21,65$  Hz), 113,50, 113,30, 69,70, 48,06, 47,69, 38,70, 23,23. **HRMS (ESI-TOF) m/z:**  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{18}H_{21}BrFN_2O_2$  395,0770 observado 395,0781.

#### 4.4.3 Síntese dos compostos planejados a partir do composto S33.

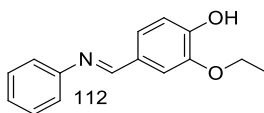
##### 4.4.3.1 Procedimento geral para síntese de intermediários iminas (**111-117**)

A um balão de vidro de fundo redondo, contendo uma barra magnética (20,0 mL), foi adicionado aldeído, vanilina (59,6 mg, 0,40 mmol), em seguida peneira molecular (0,5 g por mmol de aldeído) e por fim, foram adicionados anilina (30,0  $\mu$ L, 0,40 mmol) e 200  $\mu$ L  $CH_2Cl_2$  (WANG et al., 2011). A reação foi mantida sob agitação durante 1 hora à temperatura ambiente e monitorada por CCD. Ao final da reação, foram adicionados 5,0 mL de  $CH_2Cl_2$  e em seguida a reação foi filtrado em celite. À fase orgânica foi adicionado  $Na_2SO_4$  anidro e o solvente foi rota-evaporado.



O composto 2-metoxi-4-((fenilimino) metil)fenol (**111**) foi obtido como óleo amarelo-claro (65.7 mg, 0,29 mmol, 74% de rendimento). **R.F.:** 0,8 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:**  $C_{13}H_{13}NO_2$ . **P.M.:** 227,0946 g mol<sup>-1</sup>. **RMN  $^1H$**  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,37 (s, 1H, HC=N), 7,73 (s, 1H, Ar), 7,47 – 7,35 (m, 2H, Ar), 7,31 – 7,21 (m, 4H, Ar), 7,00 (d,  $J = 8,09$  Hz, 1H, Ar), 3,98 – 3,89 (m, 3H, O- $CH_3$ ). **RMN  $^{13}C$**  (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  160,52, 147,40, 129,31, 127,66, 126,04, 121,00, 114,46, 108,90, 56,19.

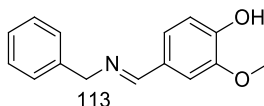
##### Composto **112** - 2-etoxi-4-((fenilimino)metil)fenol



O produto foi obtido de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese de iminas, tendo como materiais de partida 4-hidroxi-3-etoxibenzaldeído e anilina. O intermediário foi obtido como óleo

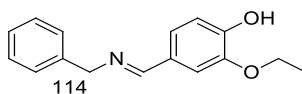
amarelo (131,0 mg, 0,55 mmol, 100% de rendimento). **R.F.:** 0,9 [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>. **P.M.:** 241,1103 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,35 (s, 1H, N=CH), 7,67 (s, 1H, Ar), 7,40 (t, *J* = 7,41 Hz, 2H, Ar), 7,25 (d, *J* = 7,68 Hz, 4H, Ar), 7,01 (d, *J* = 8,05 Hz, 1H, Ar), 4,14 (q, *J* = 6,95 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 1,40 (t, *J* = 6,95 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160,53, 149,65, 146,67, 129,21, 128,52, 125,81, 125,54, 120,97, 114,43, 109,55, 64,56, 14,74.

Composto **113** - 4-((benzilimino)metil)-2-metoxifenol



O produto foi obtido de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese de iminas, tendo como materiais de partida vanilina e benzilamina. O intermediário foi obtido como óleo amarelo (107,1 mg, 0,45 mmol, 97 % de rendimento). **R.F.:** 0,7 [Hexano:AcOEt, 60:40 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>. **P.M.:** 241,1103 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,28 (s, 1H, N=CH), 7,52 (d, *J* = 1,93 Hz, 1H, Ar), 7,36 (d, *J* = 4,36 Hz, 4H, Ar), 7,33 – 7,25 (m, 1H, Ar), 7,11 (dd, *J* = 1,67, 8,09 Hz, 1H, Ar), 6,88 (d, *J* = 8,09 Hz, 1H, Ar), 4,82 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-NH), 3,77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,44, 149,20, 147,50, 139,02, 128,54, 128,15, 128,06, 127,11, 124,55, 114,39, 108,55, 64,55, 55,70.

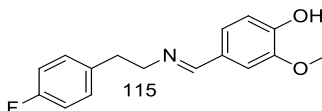
Composto **114** - 4-((benzilimino)metil)-2-etoxifenol



O produto foi obtido de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese de iminas, tendo como materiais de partida 4-hidroxi-3-etoxibenzaldeído e bezilamina. O intermediário foi obtido como óleo amarelo claro (116,8 mg, 0,46 mmol, 100% de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v)] **F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>. **P.M.:** 255,1259 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,21 (s, 1H, N=CH), 7,44 (d, *J* = 1,42 Hz, 1H, Ar), 7,32 – 7,21 (m, 5H, Ar), 7,06 (dd, *J* = 1,54, 8,07 Hz, 1H, Ar), 6,85 (d, *J* = 8,07 Hz, 1H, Ar), 4,75 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-NH), 3,99 (q, *J* = 6,97 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 1,29 (t, *J* = 6,98 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75

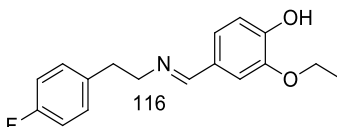
MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,22, 149,17, 146,82, 139,24, 128,63, 128,46, 128,21, 128,09, 127,17, 126,99, 124,14, 114,51, 109,44, 64,71, 64,25, 14,71.

Composto **115**- 4-(((4-fluorofenil)imino)metil)-2-metoxifenol



O produto foi obtido de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese de iminas, tendo como materiais de partida vanilina e 4-fluorofenetilamina. O intermediário foi obtido como óleo amarelo (61,0 mg, 0,22 mmol, 97% de rendimento). **R.F.:** 0,4 [Hexano:AcOEt, 60:40 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FNO<sub>2</sub>. **P.M.:** 273,1165 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,00 (s, 1H, HC=N), 7,41 (d, *J* = 1,68 Hz, 1H, Ar), 7,19 – 7,10 (m, 2H, Ar), 7,03 – 6,98 (m, 1H, Ar), 6,98 – 6,90 (m, 2H, Ar), 6,89 – 6,84 (m, 1H, Ar), 3,81 (m, 2H, Ar), 3,80 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 3,78 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2,97 (t, *J* = 7,39 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,54 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 244,03 Hz), 162,04, 149,13, 147,57, 135,41 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,24 Hz), 130,41 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 7,77 Hz), 128,04, 124,17, 115,08 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 21,07 Hz), 114,49, 108,55, 62,72, 55,69, 36,61.

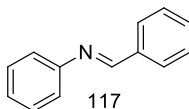
Composto **116** - 2-etoxi-4-(((4-fluorofenil)imino)metil)fenol



O produto foi obtido de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese de iminas, tendo como materiais de partida 4-hidroxi-3-etoxibenzaldeído e 4-fluorofenetilamina. O intermediário foi obtido como óleo amarelo (90,6mg, 0,31 mmol, 88% de rendimento). **R.F.:** 0,6 [Hexano:AcOEt, 50:50 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>FNO<sub>2</sub>. **P.M.:** 287,1322 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,99 (s, 1H, HC=N), 7,39 (d, *J* = 1,86 Hz, 1H, Ar), 7,15 (dd, *J* = 5,67, 8,43 Hz, 2H, Ar), 7,04 – 6,99 (m, 1H, Ar), 6,98 – 6,92 (m, 2H, Ar), 6,92 – 6,86 (m, 1H, Ar), 6,67 (s, 1H, Ar), 4,06 (q, *J* = 6,98 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3,79 (t, *J* = 7,27 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2,96 (t, *J* = 7,38 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,36 (t, *J* = 6,98 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161,87, 161,39 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 243,60 Hz), 149,03, 146,68, 135,44 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,26 Hz), 130,38 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 7,74 Hz), 128,11,

123,96, 115,05 (d,  $^2J_{CF} = 21,06$  Hz), 114,38, 109,30, 64,34, 62,72, 36,63, 14,71.

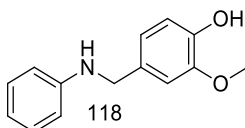
#### Composto **117**- N-benzilideneanilina



O produto foi obtido de acordo com a metodologia geral descrita para a síntese de iminas, tendo como materiais de partida benzaldeído e anilina. O intermediário foi obtido como um óleo amarelo (54,0 mg, 0,29 mmol, 100 % de rendimento). **F.M.:**  $C_{13}H_{11}N$  **P.M.:** 181,0891 g mol<sup>-1</sup>. **R.F.:** 0,6 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,46 (s, 1H, HC=N), 7,91 (dd,  $J = 6,82, 2,92$  Hz, 2H, Ar), 7,51-7,46 (m, 3H, Ar), 7,44 – 7,36 (m, 2H, Ar), 7,22 (d,  $J = 8,3$  Hz, 3H, Ar). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  160,52, 152,07, 136,19, 131,45, 129,20, 128,85, 128,82, 126,00, 120,92.

#### 4.4.3.2 Procedimento geral para síntese dos derivados aminas (**118-124**)

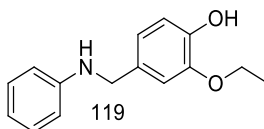
A um balão de vidro (20,0 mL) foram adicionados a imina (**111**) (65,0 mg 0,29 mmol), NaBH<sub>4</sub> (10,8 mg, 0,29 mmol) e MeOH (200  $\mu$ L) (WANG et al., 2011). A reação foi mantida sob agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente e monitorada por CCD. Após o consumo do material de partida, uma hora, a mesma foi concentrada no rotaevaporador. Em seguida, foram adicionados 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e extraiu-se com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 20,0 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna de sílica gel [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v) em ordem crescente de polaridade].



O derivado 2-metoxi-4-((fenilamino)metil)fenol (**118**) foi obtido como óleo amarelo claro (22,5 mg, 0,10 mmol, 34% de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v)]. **F.M.:**  $C_{14}H_{15}NO_2$ . **P.M.:**

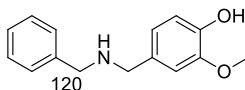
229,1103 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,21 – 7,10 (m, 2H, Ar), 6,91 (s, 1H, Ar), 6,85 – 6,68 (m, 5H, Ar), 4,18 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 3,80 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 148,33, 146,77, 144,93, 131,38, 129,39, 120,61, 117,73, 114,45, 113,00, 110,29, 56,04, 48,50. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub> 230,1181; observado 230,1183 (CHIGURUPATI, 2015).

Composto **119**- 2-etoxi-4-((fenilamino)metil)fenol



O derivado **119** foi sintetizado utilizando metodologia geral descrita para síntese de aminas, partindo do intermediário imina **112**. O composto foi obtido como sólido amarelo claro (126 mg, 0,52 mmol, 93% de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt, 70:30 % (v/v)] **F.M.:** C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>. **P.M.:** 243.1259 g mol<sup>-1</sup>. **P.F.:** 68,1 – 69,4 °C. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,26 (t, *J* = 7,88 Hz, 2H, Ar), 7,00 – 6,88 (m, 3H, Ar), 6,81 (t, *J* = 7,32 Hz, 1H, Ar), 6,72 (d, *J* = 7,76 Hz, 2H, Ar), 4,27 (s, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 4,13 (q, *J* = 6,98 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 1,48 (t, *J* = 6,98 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 148,09, 145,97, 144,92, 131,10, 129,26, 120,40, 117,69, 114,36, 113,05, 111,14, 64,43, 48,42, 14,87. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub> 244,1338; observado 244,1336.

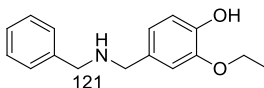
Composto **120** - 4-((benzilamino)metil)-2-metoxifenol



O derivado **120** foi sintetizado metodologia geral descrita para síntese de aminas, partindo do intermediário imina **113**. O composto foi obtido como óleo amarelo claro (65,0 mg, 0,28 mmol, 58 % de rendimento). **R.F.:** 0,7 [Hexano:AcOEt, 60:40 (v/v)] **F.M.:** C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>. **P.M.:** 243,1259 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,34 (d, *J* = 4,23 Hz, 4H, Ar), 7,29-7,23 (m, 1H, Ar), 6,90 – 6,77 (m, 3H, Ar), 3,88 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3,81 (s, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 3,73 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-NH). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 146,71, 144,79, 140,25, 132,17, 128,56, 128,34, 127,13, 121,16, 114,29, 110,93, 56,02, 53,18, 53,12. **HRMS (ESI-**

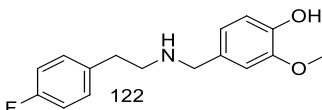
**TOF) m/z:**  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{15}H_{18}NO_2$  244,1338; observado 244,1336 (SCIPIONI et al., 2018).

Composto **121** - 4 - ((benzilamino) metil) -2-etoxifenol



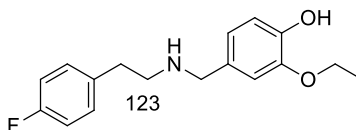
O derivado **121** foi sintetizado o utilizando metodologia geral descrita para síntese de aminas, partindo do intermediário imina **114**. O composto foi obtido como óleo amarelo (87,9 mg, 0,34 mmol, 75 % de rendimento). **R.F.:** 0,2 [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v)]. **F.M.:**  $C_{16}H_{19}NO_2$ . **P.M.:** 257,1416 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,31 (d,  $J = 4,33$  Hz, 4H, Ar), 7,28 – 7,21 (m, 1H, Ar), 6,85 (d,  $J = 1,57$  Hz, 1H, Ar), 6,84 – 6,77 (m, 1H, Ar), 6,77 – 6,72 (m, 1H, Ar), 4,01 (q,  $J = 6,92$  Hz, 2H, O- $CH_2$ ), 3,78 (s, 2H, HN- $CH_2$ ), 3,70 (s, 2H, HN- $CH_2$ ), 1,36 (t,  $J = 6,92$  Hz, 3H,  $CH_3$ ). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  146,15, 145,02, 139,84, 131,49, 129,75, 128,89, 128,49, 128,34, 127,10, 121,04, 114,51, 112,06, 64,31, 52,90, 52,87, 14,94. **HRMS (ESI-TOF) m/z:**  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{16}H_{20}NO_2$  258,1494; observado 258,1512.

Composto **122** - 4 - (((4-fluorofenil) amino) metil) -2-metoxifenol

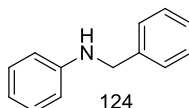


O derivado **122** foi sintetizado utilizando metodologia geral descrita para síntese de aminas, partindo do intermediário imina **115**. O composto foi obtido como óleo amarelo claro (70,0 mg, 0,25 mmol, 66 % de rendimento). **R.F.:** 0,2 [Hexano:AcOEt, 60:40 (v/v)]. **F.M.:**  $C_{16}H_{18}FNO_2$ . **P.M.:** 275,1322 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,14 (dd,  $J = 5,80, 7,91$  Hz, 2H, Ar), 6,96 (t,  $J = 8,65$  Hz, 2H, Ar), 6,83 – 6,78 (m, 2H, Ar), 6,74 – 6,69 (m, 1H), 3,80 (s, 3H, O- $CH_3$ ), 3,71 (s, 2H,  $H_2C-NH$ ), 2,91 – 2,84 (m, 2H, HN- $CH_2$ ), 2,84 – 2,75 (m, 2H,  $CH_2$ ). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  146,78, 144,85, 135,47 (d,  $^4J_{CF} = 3,05$  Hz), 131,56, 130,08 (d,  $^3J_{CF} = 7,62$  Hz), 120,99, 115,21 (d,  $^2J_{CF} = 21,28$  Hz), 114,38, 110,83, 55,74, 53,67, 50,33, 35,26. **HRMS (ESI-TOF) m/z:**  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{16}H_{19}FNO_2$  276,1400; observado 276,1402.



Composto **123** - 2-etoxi-4-(((4-fluorofenil)amino)metil)fenol

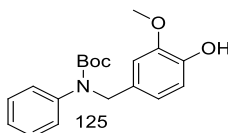
O derivado **123** foi sintetizado utilizando metodologia geral descrita para síntese de aminas, partindo do intermediário imina **116**. O composto foi obtido como sólido amarelo (61,8 mg, 0,21 mmol, 68 % de rendimento). **R.F.:** 0,1 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>2</sub>. **P.M.:** 289,1478 g mol<sup>-1</sup>. **P.F.:** 68-70 °C. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,13 (dd, *J* = 8,4, 5,5 Hz, 2H, Ar), 6,96 (t, *J* = 8,7 Hz, 2H, Ar), 6,82 (d, *J* = 7,90 Hz, 1H, Ar), 6,7 (d, *J* = 1,57 Hz, 1H, Ar), 6,73 (dd, *J* = 7,90, 1,57 Hz, 1H, Ar), 4,04 (q, *J* = 6,97 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3,72 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-NH), 2,91 – 2,83 (m, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,83 – 2,74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,40 (t, *J* = 6,96 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,19, 159,96, 146,09, 145,09, 135,43, 135,39, 131,09, 130,20 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 7,81 Hz), 121,13, 115,34 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 21,09 Hz), 114,36, 111,81, 64,42, 53,60, 50,27, 35,18, 14,99. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> calculado para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>FNO<sub>2</sub>Na 312,1376; observado 312,1350.

Composto **124** - *N*-benzililina

O derivado **124** foi sintetizado utilizando metodologia geral descrita para síntese de aminas, partindo do intermediário imina **117**. O composto foi obtido como um sólido amarelo (12,4 mg, 0,07 mmol, 23 % de rendimento). **F.M.:** C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N. **P.M.:** 183,1048 g mol<sup>-1</sup>. **P.F.:** 33,2 – 34,1 °C. **R.F.:** 0,8 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,47 – 7,31 (m, 5H, Ar), 7,25 (t, *J* = 7,79 Hz, 2H, Ar), 6,81 (t, *J* = 7,28 Hz, 1H, Ar), 6,72 (d, *J* = 8,02 Hz, 2H, Ar), 4,39 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147,91, 139,29, 129,36, 128,72, 127,66, 127,36, 117,88, 113,15, 48,53. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N 184,1126; observado 184,1195 (XU et al., 2016).

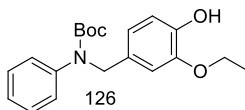
#### 4.4.3.3 Procedimento geral para síntese dos intermediários aminas protegidos (**125-130**).

A um balão bitubulado de vidro (20,0 mL) de fundo redondo, foram adicionados a amina **118** (22,0 mg, 0,10 mmol) e di-terc-butil-dicarbonato (BOC) (20,9 mg, 0,10 mmol). A mistura foi aquecida à 80 °C durante uma hora e o término reacional foi verificado por CCD (VISWANADHAM et al., 2017). A purificação do produto foi realizada por coluna de sílica gel [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)].



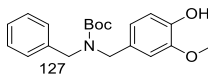
O intermediário 4-hidroxi-3metoxibenzil(fenil)carbamato de terc-butila (**125**) foi obtido como um óleo amarelo-claro (16,0 mg, 0,05 mmol, 51% de rendimento). **R.F.:** 0,6 [Hexano:AcOEt, 80:20 % (v/v)]. **F.M.:** C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>. **P.M.:** 329,1627 g mol<sup>-1</sup>. **RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,30-7,24 (m, 2H, Ar), 7,19 – 7,14 (m, 1H, Ar), 7,16 – 7,05 (m, 1H, Ar), 6,84 – 6,74 (m, 3H, Ar), 6,67 (d, *J* = 8,00 Hz, 1H, Ar), 4,73 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 3,82 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 1,43 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,01, 146,54, 144,79, 142,75, 130,70, 128,74, 126,97, 126,08, 120,83, 114,19, 110,39, 80,53, 55,94, 53,84, 28,44.

Composto **126**- 3-etoxi-4-hidroxibenzil(fenil)carbamato de terc-butila



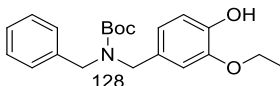
A metodologia utilizada para síntese do intermediário **126** foi a descrita para a obtenção do intermediário **125**, empregando a amina **119**. O composto foi obtido como óleo amarelo claro (147,0 mg, 0,43 mmol, 83 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v)] **F.M.:** C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>. **P.M.:** 343,1784 g mol<sup>-1</sup>. **RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,75 – 7,67 (m, 2H, Ar), 7,63 – 7,51 (m, 3H, Ar), 7,26 (d, *J* = 8,06, 1H, Ar), 7,23 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, Ar), 7,11 (dd, *J* = 1,7, 8,06 Hz, 1H, Ar), 5,19 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 4,47 (q, *J* = 6,98 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 1,90 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,41 (t, *J* = 6,98 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154,83, 145,70, 144,88, 142,55, 130,31, 128,54, 126,82, 125,90, 120,57, 114,14, 111,30, 80,30, 64,23, 53,67, 28,26, 14,75.

Composto **127**- benzil(4-hidroxi-3-metoxibenzil)carbamato de terc-butila



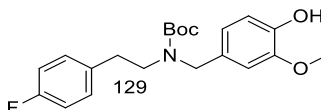
A metodologia utilizada para síntese do intermediário **127** foi a descrita para a obtenção do intermediário **125**, empregando a amina **120**. O composto foi obtido como óleo transparente (77,8 mg, 0,23 mmol, 44 % de rendimento). **R.F.:** 0,7 [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v)]. **J.F.M.:** C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>. **P.M.:** 343,1784 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,40 – 7,17 (m, 5H), 6,88 (d, *J* = 7,97 Hz, 1H), 6,84 – 6,65 (m, 3H), 4,43-4,28 (m, 4H, H<sub>2</sub>C-N-CH<sub>2</sub>), 3,84 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 1,53 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,08, 146,81, 145,00, 138,18, 129,80, 128,54, 128,07, 127,47, 127,23, 121,20, 114,22, 110,89, 80,09, 55,83, 49,12, 48,93, 28,51

Composto **128**- benzil (3-etoxi-4-hidroxibenzil) carbamato de terc-butila



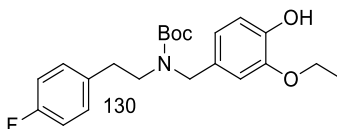
A metodologia utilizada para síntese do intermediário **128** foi a descrita para a obtenção do intermediário **125**, empregando a amina **121**. O composto foi obtido como óleo amarelo (55,5 mg, 0,15 mmol, 44 % de rendimento). **R.F.:** 0,6 [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v)] **F.M.:** C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>. **P.M.:** 357,1940 g mol<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,39 – 7,14 (m, 5H, Ar), 6,86 (d, *J* = 8,08 Hz, 1H, Ar), 6,82 – 6,63 (m, 2H, Ar), 4,40-4,25 (m, 4H, H<sub>2</sub>C-N-CH<sub>2</sub>), 4,05 (q, *J* = 6,96 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 1,50 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,43 (t, *J* = 6,96 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,08, 146,01, 145,07, 138,23, 129,83, 128,57, 127,50, 127,25, 121,18, 114,14, 80,07, 77,16, 64,44, 49,13, 48,91, 28,55, 14,96.

Composto **129** - 4-fluorofenil(4-hidroxi-3-metoxibenzil)carbamato de terc-butila



A metodologia utilizada para síntese do intermediário **129** foi a descrita para a obtenção do intermediário **125**, empregando a amina **122**. O composto foi obtido como óleo amarelo claro (23,0 mg, 0,06 mmol, 24 % de rendimento). **R.F.:** 0,4 [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>FNO<sub>4</sub>. **P.M.:** 375,1846 g mol<sup>-1</sup>. **RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,16 – 7,00 (m, 2H, Ar), 6,95 (t, *J* = 8,67 Hz, 2H, Ar), 6,85 (d, *J* = 7,95 Hz, 1H, Ar), 6,82 – 6,64 (m, 2H, Ar), 5,65 (s, 1H, OH), 4,27 (d, *J* = 16,79 Hz, 2H, H<sub>2</sub>C-N), 3,85 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3,47 – 3,20 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2,84 – 2,63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,47 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159,87, 146,69, 144,89, 134,94 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,20 Hz), 130,28, 130,18 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 7,87 Hz), 115,18 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 20,68 Hz), 114,07, 110,48, 79,71, 55,81, 49,98, 48,32, 48,23, 28,43.

Composto **130**- 4-etoxi-4-hidroxibenzil(4-fluorofenil)carbamato de terc-butila

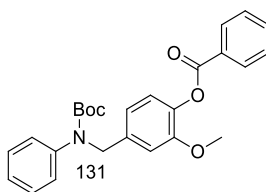


A metodologia utilizada para síntese do intermediário **130** foi a descrita para a obtenção do intermediário **125**, empregando a amina **123**. O composto foi obtido como óleo transparente (51,9 mg, 0,13 mmol, 63 % de rendimento). **R.F.:** 0,4 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>FNO<sub>4</sub>. **P.M.:** 389,2002 g mol<sup>-1</sup>. **RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,13 – 7,00 (m, 2H, Ar), 6,94 (t, *J* = 8,70 Hz, 2H, Ar), 6,85 (d, *J* = 8,01 Hz, 1H, Ar), 6,81 – 6,63 (m, 2H, Ar), 4,36 – 4,19 (m, 2H, H<sub>2</sub>C-N), 4,07 (q, *J* = 6,97 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3,44 – 3,22 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2,83 – 2,62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,47 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,43 (t, *J* = 7,11 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,10, 159,87, 145,95, 145,01, 134,95 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub> = 3,27 Hz), 130,19 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub> = 8,42), 130,19, 120,80, 115,17 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 20,88 Hz), 113,99, 111,38, 79,67, 64,36, 48,23, 48,18, 34,04, 28,43, 14,86.

4.4.3.4 Procedimento geral para a síntese dos derivados ésteres com amina protegida (**131-136**).

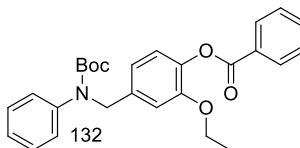
A um balão de vidro de fundo redondo (20 mL) contendo uma barra magnética, foi adicionado o intermediário carbamato de terc-butil **125** (15,0 mg, 0,04 mmol), em seguida, foram adicionados 150 μL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e trietilamina (6,26 μL, 0,04). Por fim, o cloreto de benzoíla

(10,4  $\mu\text{L}$ , 0,09 mmol) foi acrescentado e a mistura foi mantida sob agitação durante 2 horas (DHIMITRUKA; SANTALUCIA, 2006). A reação foi monitorada por CCD e ao término reacional foi acrescentado solução de HCl 5% (10mL) e extraído com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 20,0 mL). À fase orgânica foi adicionado  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna de sílica gel [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v) em ordem crescente de polaridade].



O intermediário benzoato de 4-(((terc-butoxicarbonil)(fenil)amino)metil)-2-metoxifenila (**131**) foi obtido como óleo transparente (14,2 mg, 0,03 mmol, 79 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:**  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ . **P.M.:** 433,1889  $\text{g mol}^{-1}$ . **RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,22 (d,  $J = 7,87$  Hz, 2H, Ar), 7,68 – 7,60 (m, 2H, Ar), 7,56 – 7,47 (m, 2H, Ar), 7,35 – 7,28 (m, 2H, Ar), 7,19 (t,  $J = 7,13$  Hz, 3H, Ar), 7,08 (dd,  $J = 1,56, 7,97$  Hz, 1H, Ar), 6,94 (s, 1H, Ar), 6,84 (d,  $J = 8,01$  Hz, 1H, Ar), 4,84 (s, 2H,  $\text{N-CH}_2$ ), 3,77 (s, 3H,  $\text{O-CH}_3$ ), 1,45 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164,92, 151,33, 147,86, 142,79, 139,03, 137,83, 133,61, 130,41, 129,51, 128,85, 128,65, 126,72, 126,14, 122,82, 80,77, 55,99, 53,93, 28,43.

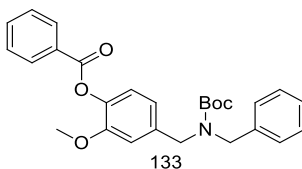
Composto **132** - Benzoato de 4-(((terc-butoxicarbonil)(fenil)amino)metil)-2-etoxifenila.



O intermediário **132** foi obtido através da metodologia descrita para obtenção do intermediário **131**, utilizando o intermediário carbamato de terc-butil **126**. O composto foi adquirido como óleo

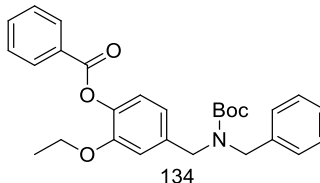
transparente (30,0 mg, 0,07 mmol, 34 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub>. **P.M.:** 447,2046 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,25 – 8,17 (m, 2H, Ar), 7,67 – 7,57 (m, 1H, Ar), 7,54 – 7,43 (m, 2H, Ar), 7,33 – 7,26 (m, 2H, Ar), 7,17 (t, *J* = 6,81 Hz, 3H, Ar), 7,07 (d, *J* = 8,04 Hz, 1H, Ar), 6,93 (s, 1H, Ar), 6,82 (d, *J* = 8,07 Hz, 1H, Ar), 4,00 (q, *J* = 6,94 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 1,44 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,27 (t, *J* = 6,94 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164,96, 154,93, 150,61, 142,75, 139,40, 137,65, 133,49, 130,30, 129,64, 128,82, 128,60, 126,70, 126,11, 122,74, 119,84, 113,02, 80,74, 64,50, 53,89, 28,40, 14,79.

Composto **133** – benzoato de 4-((benzo(terc-butoxicarbonil)amino)metil)-2-metoxifenila.



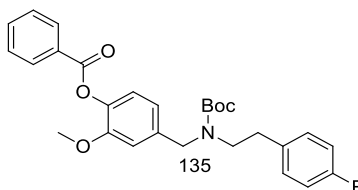
O intermediário **133** foi obtido através da metodologia descrita para obtenção do intermediário **131**, utilizando o intermediário carbamato de terc-butil **127**. O composto foi adquirido como óleo amarelo claro (47,0 mg, 0,10 mmol, 63 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub>. **P.M.:** 447,2046 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,22 (d, *J* = 7,77 Hz, 2H, Ar), 7,71 – 7,59 (m, 1H, Ar), 7,56 – 7,46 (m, 2H, Ar), 7,40 – 7,19 (m, 5H, Ar), 7,10 (dd, *J* = 1,38, 7,96 Hz, 1H, Ar), 6,97 – 6,76 (m, 2H, Ar), 4,47 – 4,38 (m, 4H, H<sub>2</sub>C-N-CH<sub>2</sub>), 3,77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,51 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164,90, 156,08, 151,46, 139,20, 138,00, 134,65, 133,59, 130,66, 130,39, 129,45, 128,98, 128,67, 128,61, 128,15, 127,40, 122,81, 80,30, 55,95, 49,34, 49,01, 28,55.

Composto **134** – benzoato de 4-((benzil(terc-butoxicarbonil)amino)metil)-2-etoxifenila.



O intermediário **134** foi obtido através da metodologia descrita para obtenção do intermediário **131**, utilizando o intermediário carbamato de terc-butil **128**. O composto foi adquirido como óleo amarelo (24,9 mg, 0,05 mmol, 64 % de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>5</sub>. **P.M.:** 461,2202 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,24 – 8,19 (m, 2H, Ar), 7,63 (t, *J* = 7,36 Hz, 1H, Ar), 7,54 – 7,47 (m, 2H, Ar), 7,39 – 7,17 (m, 5H, Ar), 7,10 (d, *J* = 8,02 Hz, 1H, Ar), 6,95 – 6,74 (m, 2H, Ar), 4,49 – 4,30 (m, 4H, H<sub>2</sub>C-N-CH<sub>2</sub>), 4,00 (q, *J* = 6,97 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 1,51 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,28 (t, *J* = 6,97 Hz, 3H CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165,00, 156,13, 150,83, 146,85, 133,52, 130,70, 130,34, 129,66, 129,01, 128,69, 128,62, 127,41, 122,80, 80,30, 64,55, 49,43, 49,38, 28,58, 14,83.

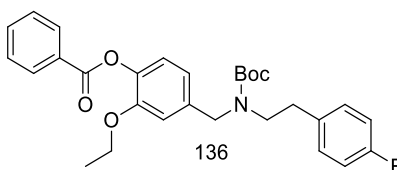
Composto **135** – benzoato de 4-(((terc-butoxicarbonil)(4-fluorofeniletil)amino)metil)-2-metoxifenila.



O intermediário **135** foi obtido através da metodologia descrita para obtenção do intermediário **131**, utilizando o intermediário carbamato de terc-butil **129**. O composto foi adquirido como óleo amarelo (19,3 mg, 0,04 mmol, 66 % de rendimento). **R.F.:** 0,4 [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>FNO<sub>5</sub>. **P.M.:** 479,2178 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,24 – 8,17 (m, 2H, Ar), 7,63 (t, *J* = 7,40 Hz, 1H, Ar), 7,50 (t, *J* = 7,55 Hz, 2H, Ar), 7,09 (d, *J* = 8,01 Hz, 3H, Ar), 6,97 (t, *J* = 8,70 Hz, 2H, Ar), 6,94 – 6,75 (m, 2H, Ar), 4,35 (d,

$J = 16,86$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>C-N), 3,78 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3,50 – 3,29 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2,87 – 2,69 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1,47 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  164,78, 151,40, 139,13, 137,44, 134,83 (d, <sup>4</sup> $J_{CF} = 3,18$  Hz), 133,48, 130,28, 130,18, 129,34, 128,51, 122,73, 119,95, 119,90, 115,23 (d, <sup>2</sup> $J_{CF} = 21,63$  Hz), 79,86, 55,85, 48,62, 48,55, 28,41.

Composto **136** – benzoato de 4-(((terc-butoxicarbonil)(4-fluorofenil)etil)amino)metil)-2-etoxifenila



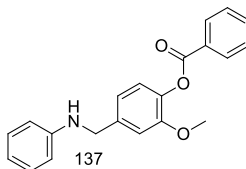
O intermediário **136** foi obtido através da metodologia descrita para obtenção do intermediário **131**, utilizando o intermediário carbamato de terc-butil **130**. O composto foi adquirido como óleo transparente (16,2 mg, 0,03 mmol, 64 % de rendimento). **R.F.:** 0,6 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>FNO<sub>5</sub>. **P.M.:** 493,2265 g mol<sup>-1</sup>. **RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,16 – 8,11 (m, 2H, Ar), 7,60 – 7,53 (m, 1H, Ar), 7,48 – 7,40 (m, 2H, Ar), 7,02 (d,  $J = 8,02$  Hz, 3H, Ar), 6,90 (t,  $J = 8,70$  Hz, 2H, Ar), 6,86 – 6,68 (m, 2H, Ar), 4,26 (d,  $J = 16,95$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>C-N), 3,94 (q,  $J = 6,96$  Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3,40 – 3,21 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2,79 – 2,60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,40 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,21 (t,  $J = 6,97$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  150,86, 139,66, 137,61, 135,08, 133,60, 130,41, 128,70, 122,86, 115,56, 115,28, 80,03, 64,63, 53,61, 51,14, 48,63, 28,56, 14,84.

#### 4.4.3.5 Procedimento geral para a desproteção da amina e obtenção dos compostos ésteres (**137-142**).

A um balão de vidro de fundo redondo (20 mL), equipado com uma barra de agitação magnética, com um septo de borracha em atmosfera de argônio e o intermediário **131** (10,0 mg, 0,02 mmol) foi adicionado CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro (383,0  $\mu$ L). À reação foi mantida em banho de gelo a 0 °C, em seguida, foi adicionado ácido trifluoracético (TFA) (3,83  $\mu$ L 0,44) (DAVIS; YANG; DENG, 2003). A mistura reacional ficou sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente e foi monitorada por CCD. Ao término reacional foram acrescentados a reação 500,0  $\mu$ L

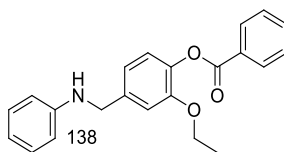


solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  em banho de gelo  $0\text{ }^\circ\text{C}$ . A reação ficou sob agitação por 15 minutos, depois a fase aquosa foi extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 15 mL), à fase orgânica foi adicionado  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrou-se e concentrou-se em evaporador rotatório. O produto foi obtido após realização de uma purificação em coluna de sílica gel [Hexano:AcOEt, 9:1 (v/v)].



O derivado benzoato de 2-metoxi-4-((fenilamina)metil)fenila (**137**) foi obtido como um sólido amarelo-claro (6,3 mg, 0,02mmol, 82% de rendimento). **R.F.:** 0,6 [Hexano:AcOEt, 70:30 (v/v)]. **F.M.:**  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ . **P.M.:** 333,1365  $\text{g mol}^{-1}$ . **P.F.:** 67,4 – 68,2  $^\circ\text{C}$ . **RMN  $^1\text{H}$**  8,22 (d,  $J = 7,16$  Hz, 2H, Ar), 7,69 – 7,61 (m, 1H, Ar), 7,52 (t,  $J = 7,52$  Hz, 2H, Ar), 7,29 – 7,21 (m, 2H, Ar), 7,14 (s, 1H, Ar), 7,10 (d,  $J = 8,02$  Hz, 1H, Ar), 7,00 – 6,82 (m, 4H, Ar), 4,37 (s, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 3,81 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164,89, 151,55, 148,93, 142,23, 133,65, 130,43, 129,57, 129,41, 128,66, 127,42, 123,06, 120,69, 56,16. **HRMS (ESI-TOF) m/z:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{NO}_3$  334,1443; observado 334,1458.

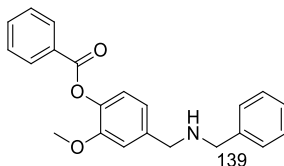
Composto **138** - benzoato de 2-etoxi-4-((fenilamina)metil)fenila



Composto sintetizado através da metodologia descrita para obtenção do derivado **137**, utilizando o intermediário **132**. O derivado foi obtido como sólido amarelo (16,6 mg, 0,05 mmol, 83% de rendimento). **R.F.:** 0,4 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:**  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ . **P.M.:** 347,1521  $\text{g mol}^{-1}$ . **P.F.:** 56,6 – 59,0  $^\circ\text{C}$ . **RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,29 – 8,19 (m, 2H, Ar), 7,71 – 7,61 (m, 1H, Ar), 7,53 (t,  $J = 7,46$  Hz, 2H, Ar), 7,28 – 7,18 (m, 2H, Ar), 7,13 (dd,  $J = 1,28, 8,02$  Hz, 1H, Ar), 7,07 (s, 1H, Ar), 7,00 (d,  $J = 8,05$  Hz, 1H, Ar), 6,78 (t,  $J = 6,98$  Hz, 1H, Ar), 6,70 (d,  $J = 7,75$  Hz, 2H, Ar), 4,34 (s, 2H, HN- $\text{CH}_2$ ), 4,05 (q,  $J = 6,98$  Hz, 2H, O- $\text{CH}_2$ ), 1,29 (q,  $J = 6,98$  Hz, 3H,

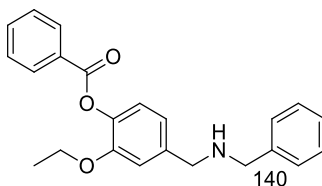
CH<sub>3</sub>). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165,02, 150,86, 139,50, 138,06, 133,52, 130,33, 129,62, 129,42, 128,61, 122,98, 119,83, 118,24, 113,40, 113,07, 64,60, 48,67, 14,82. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> calculado para C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>Na 370,1419; observado 370,1368.

Composto **139** - benzoato de 4-((benzilamina)metil)-2-metoxifenila



Composto sintetizado através da metodologia descrita para obtenção do derivado **137**, utilizando o intermediário **133**. O derivado foi obtido como óleo amarelo claro (10,0 mg, 0,03mmol, 64% de rendimento). **R.F.:** 0,5 [Hexano:AcOEt, 60:40 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>. **P.M.:** 347,1521 g mol<sup>-1</sup>. **RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,24 – 8,18 (m, 2H, Ar), 7,67 – 7,60 (m, 1H, Ar), 7,50 (t, *J* = 7,53 Hz, 2H, Ar), 7,41 – 7,32 (m, 4H, Ar), 7,32 – 7,27 (m, 1H, Ar), 7,14 – 7,05 (m, 2H, Ar), 6,98 – 6,92 (m, 1H, Ar), 3,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,85 (s, 3H, HN-CH<sub>2</sub>), 3,82 (s, 3H, H<sub>2</sub>C-NH). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164,81, 151,31, 139,07, 138,47, 137,61, 133,46, 130,29, 129,35, 128,55, 128,51, 128,50, 127,42, 122,71, 120,62, 112,59, 55,98, 52,50, 52,28. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub> 348,1600; observado 348,1635.

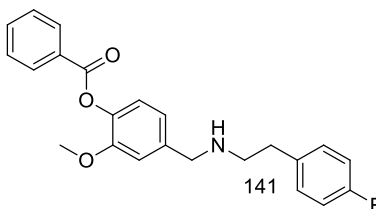
Composto **140**- benzoato de 4-((benzilamina)metil)-2-etoxifenila



Composto sintetizado através da metodologia descrita para obtenção do derivado **137**, utilizando o intermediário **133**. O derivado foi obtido como óleo amarelo (14,5 mg, 0,04 mmol, 93% de rendimento). **R.F.:** 0,9 [Hexano:AcOEt, 70:30 % (v/v)]. **F.M.:**

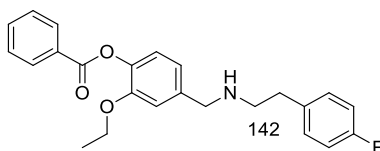
$C_{28}H_{23}NO_3$ . **P.M.:** 361,1678 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,22 (d, *J* = 7,60 Hz, 2H, Ar), 7,67 – 7,59 (m, 1H, Ar), 7,51 (t, *J* = 7,65 Hz, 2H, Ar), 7,35 (d, *J* = 4,26 Hz, 4H, Ar), 7,30 – 7,23 (m, 1H, Ar), 7,10(d, *J* = 7,98 Hz, 1H, Ar), 7,04 (s, 1H, Ar), 6,94 (d, *J* = 7,98 Hz, 1H, Ar), 4,06 (q, *J* = 6,96 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3,83 (s, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 3,81 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-NH), 1,29 (t, *J* = 6,96 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** 164,9, 150,6, 140,1, 139,2, 139,1, 133,3, 130,2, 129,6, 128,5, 128,4, 128,2, 127,0, 122,6, 120,2, 113,5, 64,5, 53,1, 52,9, 14,8. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub> 362,1756; observado 362,1731.

Composto **141** - benzoato de 4-(((4-fluorfenil)etil)amino)metil)-2-metoxifenila.



Composto sintetizado através da metodologia descrita para obtenção do derivado **137**, utilizando o intermediário **134**. O derivado foi obtido como sólido amarelo (8,0 mg, 0,02 mmol, 53% de rendimento). **R.F.:** 0,1 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:** C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>FNO<sub>3</sub>. **P.M.:** 379,1584 g mol<sup>-1</sup>. **P.F.:** 130-132°C. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,24 – 8,16 (m, 2H, Ar), 7,69 – 7,58 (m, 1H, Ar), 7,51 (t, *J* = 7,55 Hz, 2H, Ar), 7,17 (dd, *J* = 5,46, 8,46 Hz, 2H, Ar), 7,08 (d, *J* = 8,00 Hz, 1H, Ar), 7,03 – 6,94 (m, 3H, Ar), 6,90 (dd, *J* = 1,58, 7,91 Hz, 2H, Ar), 3,85 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-NH), 3,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,92 (dd, *J* = 1,96, 7,38 Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,88 – 2,81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164,82, 151,31, 139,09, 137,62, 133,49, 130,28, 130,17, 130,07, 129,31, 128,50, 122,73, 120,54, 115,44, 115,16, 112,49, 55,93, 53,23, 50,09, 34,84. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>FNO<sub>3</sub> 380,1668; observado 380,1624.

Composto **142** - benzoato de 2-etoxi-4-(((4-fluorofenil)etil)amino)metil)fenila



Composto sintetizado através da metodologia descrita para obtenção do derivado **137**, utilizando o intermediário **135**. O derivado foi obtido como óleo amarelo (11,0 mg, 0,03 mmol, 93% de rendimento). **R.F.:** 0,1 [Hexano:AcOEt, 80:20 (v/v)]. **F.M.:**  $C_{24}H_{24}FNO_3$ . **P.M.:** 393,1740 g mol<sup>-1</sup>. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,28 – 8,16 (m, 2H, Ar), 7,68 – 7,59 (m, 1H, Ar), 7,51 (t,  $J = 7,55$  Hz, 2H, Ar), 7,17 (td,  $J = 1,95, 5,53$  Hz, 2H, Ar), 7,08 (d,  $J = 8,00$  Hz, 1H, Ar), 7,02 – 6,92 (m, 3H, Ar), 6,87 (dd,  $J = 1,56, 8,04$  Hz, 1H, Ar), 4,02 (q,  $J = 6,99$  Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3,80 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-NH), 2,94 – 2,85 (m, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 2,85 – 2,74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,28 (t,  $J = 6,99$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  165,04, 150,71, 139,30, 139,13, 135,71, 133,48, 130,33, 130,28, 130,18, 129,71, 128,61, 122,69, 120,29, 115,35 (d,  $^2J_{CF} = 20,92$  Hz), 113,51, 64,58, 53,73, 50,59, 35,62, 14,88. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]<sup>+</sup> calculado para  $C_{24}H_{25}FNO_3$  394,1818; observado 394,1780.

#### 4.5 MODELAGEM MOLECULAR.

Os estudos computacionais correlacionados à elaboração do farmacóforo, triagem virtual e seleção dos possíveis inibidores da enzima tripanotona redutase foram realizados no laboratório “Computer-Aided Molecular Design Group”, na Universidade de Innsbruck, durante período de doutorado-sanduíche sob a coordenação da Dra. Daniela Schuster, que possui licença para todos os *softwares* utilizados.

##### 4.5.1 Elaboração e validação de modelo farmacofórico

Hardware e especificações de software: O estudo de modelagem molecular foi realizado em um processador Intel Pentium Core 8 com Windows 7.

Preparação de banco de dados para validação do modelo farmacofórico: A construção dos bancos de dados foi feita através de uma busca na literatura usando como palavras-chave “trypanothione reductase” e foram selecionados principalmente artigos, publicados no período de 2010-2015, que apresentassem resultados positivos ou negativos de ensaios *in vitro* como inibidores de tripanotiona redutase. Foram considerados apenas estudos em que constassem informações sobre o alvo em estudo, tipo de inibição e valores da atividade biológica mensurada. A partir destes artigos, o banco de dados foi construído utilizando dois grupos de compostos: (i) inibidores da enzima tripanotiona redutase (ativos) (compostos a1-a136) e (ii) os inativos, considerados não-inibidores da enzima (inativos) (compostos i1-i189) (Apêndice, Figuras S2 e S3). Os compostos foram separados de acordo com a natureza da enzima utilizada no ensaio, TR de *T. cruzi* ou TR de *Leishmania*. Os conjuntos de estruturas adquiridas foram elaborados separadamente e desenhados no formato 2D através do programa ChemBio Draw® Ultra. A partir deles, foram criadas estruturas 3-D multi-conformacionais (500 confôrmeros) e as mesmas foram salvas no formato .ldb aplicando omega-iconbest como algoritmo. Foram considerados “inativos” compostos inativos frente à enzima ou que apresentaram IC<sub>50</sub> e Ki acima de 40 µM. Foram considerados ativos os compostos com IC<sub>50</sub> e Ki menor ou igual a 15 µM. Essas duas bases de dados (compostos ativos e inativos) foram utilizadas para validação teórica dos modelos farmacofóricos.

Geração de modelo farmacofórico: Os modelos farmacofóricos foram criados no programa *LigandScout* LS 4.08 (WOLBER; LANGER, 2005), usando as configurações padrões do *software* nos modelos farmacofóricos tanto com base na estrutura cristalográfica (SBDD, *Structure-based Drug Design*), quanto com base nos inibidores da tripanotiona redutase (LBDD, *Ligand-based Drug Design*) já descritos na literatura.

Os modelos farmacofóricos criados baseados no complexo cristalográfico, ou seja, no complexo proteína-inibidor ou proteína-substrato, foram retirados do Protein Data Bank (PDB) (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB,” 2015). O programa *LigandScout* proporciona uma análise automática, através de todas as características químicas, entre interação dos aminoácidos do sítio ativo do receptor e o ligante (WOLBER; LANGER, 2005).

Os modelos farmacofóricos com base nos inibidores já descritos foram elaborados de forma automática, através do alinhamento 3-D das

estruturas de um conjunto de 31 inibidores (1a-31a) (Figura S1, Apêndice). Para isso, foram utilizados dois modos diferentes: o primeiro modo consiste na elaboração do modelo através do compartilhamento de características funcionais (*shared feature mode*), em que somente as características em comum às estruturas são representadas; e o segundo modo, ocorreu através da fusão entre todas as características estruturais dos compostos (*merged feature mode*) (VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

Refinamento do modelo farmacofórico e validação teórica: os modelos farmacofóricos gerados automaticamente tiveram características (*features*) excluídas e/ou adicionadas, seus tamanhos aumentados e/ou diminuídos; e esferas de exclusões adicionadas. Foram calculados a sensibilidade (Equação 1), a especificidade (Equação 2) e o fator de enriquecimento (EF), como critério classificatório para os melhores modelos (BRAGA; ANDRADE, 2013). O EF é a relação entre o número de moléculas ativas encontradas entre todos os *hits* encontrados (rendimento de ativos), dividido pela participação de ativos no banco de dados (Equação 3) (GUNDERTOFTE; JORGENSEN, 2000). Na triagem virtual da validação teórica, os compostos ativos detectados são chamados de verdadeiros-positivos (VP) e os ativos não detectados são os falsos-negativos (FN). Já os compostos inativos não detectados são verdadeiros-negativos (VN) e os compostos inativos detectados pelo programa são denominados falsos-positivo (FP).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{(VP)}{(VP + FN)}$$

Equação 1: Cálculo da sensibilidade dos modelos farmacofóricos desenvolvidos. VP: verdadeiros-positivos encontrados / FN: falsos-negativos

$$\text{Especificidade} = \frac{(VN)}{(VN + FP)}$$

Equação 2: Cálculo da especificidade dos modelos farmacofóricos desenvolvidos. VN: verdadeiros-negativos. FP: falsos-positivos.

$$EF = \frac{(VP)/(TPN)}{(TP)/(TDB)}$$

Equação 3: Cálculo do fator de enriquecimento EF. VP: número total de compostos ativos encontrados; TPN: número total de ativos e inativos encontrados; TP: número total de ativos no banco de dados de ativos. TDB: número total de compostos nos bancos de dados.

#### 4.5.2 Triagem virtual das bases de dados e seleção dos compostos

Para a triagem virtual dos compostos, foram utilizadas duas bases de dados. Uma base de dados já disponível *in-house* (base de dados elaborados virtualmente, através dos compostos já adquiridos pelo Departamento de Farmácia da Universidade de Innsbruck-Áustria com 4277 compostos). A outra base de dados *SPECS* foi adquirida através de download do site de vendas [www.specs.net](http://www.specs.net), contendo 210256 estruturas 3-D (versão de 04/2015). As bibliotecas de compostos foram preparadas através do programa LS 4.08 aplicando-se omega-iconbest, de modo a obter 100 conformações para cada estrutura da base de dados *SPECS* e 200 conformações de cada estrutura da base de dados *in-house*. As triagens virtuais da base de dados *SPECS* e da base de dados *in-house* foram realizadas de forma separada, nas restrições farmacofóricas e estudos de interação de ligação de acordo com as configurações padrões do programa, a fim de identificar compostos possivelmente inibidores da enzima tripanotona redutase.

Os compostos identificados como promissores passaram por um filtro PAINS (*Pan Assay Interference Compounds*), no qual foram eliminados os compostos com maior probabilidade de interferirem em ensaios colorimétricos (NÉRON et al., 2009). Em seguida, foram filtrados de acordo com o peso molecular na faixa entre 200 e 500 Dalton. Estes compostos foram ancorados no sítio ativo da enzima tripanotona redutase e a inspeção visual a respeito das interações e conformações no sítio de ligação foram analisadas no programa *LigandScout* 4.08.

#### 4.5.3 Estudos de ancoramento molecular

O programa GOLD (versão 5.02) (JONES et al., 1997) foi utilizado para o ancoramento molecular. O complexo cristalográfico da enzima tripanotona redutase com substrato tripanotona dissulfeto (T[S]2) (1BZL)(BOND et al., 1999) com resolução de 2.4 Å, foi retirado do banco de dados PDB (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB,” 2015). Os compostos tiveram suas estruturas otimizadas através do programa *DiscoveryStudio* – DS (versão 4.0) e suas primeiras conformações adquiridas através do programa OMEGA (HAWKINS et al., 2010). A preparação da proteína ocorreu através da verificação do

sítio ativo, conservação dos aminoácidos, eliminação do substrato do sítio ativo e eliminação das moléculas de água ([http://lorentz.immstr.pasteur.fr/pdb\\_hydro.php](http://lorentz.immstr.pasteur.fr/pdb_hydro.php)). As simulações foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: o sítio ativo foi definido em 9 Å em volta do ligante original na cadeia [A] da proteína. Como função de pontuação foi aplicado CHEMPLP. A reancoramento do substrato da enzima serviu para validar o método utilizado com um RMSD de 0,9656.

#### 4.5.4 Estudo qualitativo de relação estrutura-atividade

O estudo de relação estrutura-atividade (REA) foi realizado através de uma parceria com o professor Dr. Eduardo B. de Melo, do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, o qual conduziu a análise, usando uma abordagem tridimensional.

As estruturas tridimensionais dos compostos foram construídas em HyperChem 7 (Hyper Co.) e calculado o campo de força MM<sup>+</sup>, seguido pelo nível de teoria semi-empírica AM1 através do mesmo *software*. Descritores de campo foram obtidos utilizando o *software Pentacle* (Molecular Discovery Ltd). Este *software* usa a abordagem GRIND, que calcula os descritores de força 3D de maneira independente de alinhamento. Os descritores foram calculados usando uma combinação de algoritmos de ALOMOND e CLACC (PASTOR et al., 2000).

Com base no que foi descrito por Ermondi et al. (2011) foi realizado um estudo de REA binário. Os compostos com inibição de crescimento menor que 40%, ou inativo (24 compostos) foram definidos como -1, enquanto que com inibição maior ou igual a 40% (18 compostos) foram definidos como 1 (ERMONDI et al., 2011). O programa *Pentacle* gerou descritores DRY-DRY (grupos hidrofóbicos-hidrofóbicos), O-O (grupos aceptores de interação de hidrogênio-grupos aceptores de interação de hidrogênio), N1-N1 (grupos doadores de ligação de hidrogênio-grupos doadores de ligação de hidrogênio), TIP-TIP (grupos estéricos relevantes) e a combinação entre eles (DRY-O, DRY-N1, DRY-TIP, O-N1, O-TIP e N1-TIP). Este conjunto inicial foi minimizado usando o método de seleção de variáveis do Planejamento Fatorial Fracionado (FDD - *Fractional Factorial Design*) (PASTOR et al., 2000) e o modelo foi construído pelo *Partial Least Squares* (PLS) (ERIKSSON et al., 2003; TEÓFILO; MARTINS; FERREIRA, 2009). Nesta etapa e na etapa subsequente os descritores foram autoescalados, a



abordagem de pré-processamento de dados mais adequada para o estudo de SAR (MARTINS; FERREIRA, 2013). Assim, a qualidade do modelo foi avaliada baseada no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), a raiz do erro quadrático médio da calibração (RMSEC – *root mean square error of calibration*), o F-test, o coeficiente de determinação de validação cruzada ( $Q^2_{\text{LOO}}$ ) e a raiz do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV – *root mean square error of cross-validation*) (ROY; ROY, 2008).

#### 4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/CCB) sob coordenação do Prof. Dr. Mario Steindel. Os experimentos foram conduzidos pela Dra. Milene Höehr de Moraes e com participação da doutoranda em algumas etapas dos experimentos.

##### 4.6.1 Avaliação da atividade tripanocida em amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

De forma sucinta, as células THP-1 (ATCC TIB202) foram cultivadas em placas de 96 cavidades ( $4.0 \times 10^4$  células/poço) em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, CO. St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% SBF (Life Technologies, USA), 12,5 mM de HEPES, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e Glutamax (2 mM) (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ).

*T. cruzi* Tulahuen obtidos através de células da linhagem L929, expressando  $\beta$ -galactosidase, foram cedidos pelo Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte. Estas cepas foram usadas para infectar as células THP-1.

As células THP-1 que foram cultivadas em placas de 96 cavidades foram tratadas com 100 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 72 h (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ) para que ocorresse diferenciação a macrófagos (SCHWENDE et al., 1996). Em seguida, foram incubadas com os parasitos a uma proporção de 2:1 (parasito/células) *overnight*. O meio contendo parasito não internalizado foi removido e substituído por 180  $\mu\text{L}$  de meio novo. As células infectadas foram tratadas com 20  $\mu\text{L}$  dos compostos a serem avaliados (dissolvidos em DMSO e, posteriormente, diluídos em RPMI-1640) em triplicata, a uma diluição de 100  $\mu\text{M}$ , seguido por incubação de 48 h (37

°C e 5% CO<sub>2</sub>). Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 16 h (37 °C e 5% CO<sub>2</sub>) com 250 µL de vermelho-β-D-Galactopiranosídeo de clorofenol (CPRG) (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) a 100 µM e Nonidet P-40 (Amresco Inc, Solon, Ohio, USA) (NP-40) 0,1%. A absorbância foi mensurada a 570/630 nm em um leitor automático de placas (Infinite M200 TECAN, Áustria). Benznidazol (Sigma Aldrich) foi usado como controle positivo e DMSO 1% como controle negativo. Compostos que apresentaram inibição de crescimento superior a 50% tiveram seus valores de IC<sub>50</sub> calculadas através de uma curva analítica obtida após a realização do teste com os compostos em diferentes concentrações (0,78 µM – 100 µM).

#### **4.6.2 Avaliação da atividade leishmanicida em amastigotas de *Leishmania amazonensis***

A atividade leishmanicida, frente a *L. amazonensis*, foi avaliada utilizando um ensaio colorimétrico. As células THP-1 (ATCC TIB202) foram cultivadas conforme metodologia descrita 4.6.1. Promastigotas de *L. amazonensis* MHOM/BR/77/LTB0016, expressando a enzima β-galactosidase, foram cultivadas em meio Schneider's (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 5% de SBF inativado com calor e 2% de urina humana (26 °C, 5% CO<sub>2</sub>). No quarto dia de cultura, as promastigotas (4,0 × 10<sup>6</sup> parasitos/mL) foram lavadas com PBS, em pH 7,4 e incubadas em RPMI-1640 suplementado com 10% de soro sanguíneo humano B+ inativado por calor, por 1 h (34 °C) para que os parasitos fossem opsonizados. As células THP-1 foram incubadas com os parasitos em uma proporção parasitos/célula de 10:1 por 3 h (34 °C, 5% CO<sub>2</sub>) para *L. amazonensis*. Em seguida, os parasitos não aderidos foram removidos através de uma lavagem com PBS e as células infectadas foram incubadas com 180 µL de RPMI-1640 suplementado por um período de 24h (34 °C, 5% CO<sub>2</sub>) para que os parasitos multiplicassem em sua forma intracelular, amastigota. As células infectadas foram tratadas com 20 µL dos compostos a serem avaliados (diluídos em DMSO e, posteriormente, em RPMI-1640) em triplicata, a uma concentração final de 100 µM, seguida de incubação de 48 h (34 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 16 h (34°C e 5% CO<sub>2</sub>) com 250 µL de vermelho-β-D-galactopiranosídeo de clorofenol (CPRG) (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) a 100 µM e Nonidet P-40 (Amresco Inc, Solon, Ohio, USA) (NP-40) 0.1%. A absorbância foi mensurada a 570/630 nm em um

leitor automático de placas (Infinite M200 TECAN, Áustria). Anfotericina B (Bristol-Myers, Squibb) foi usada como controle positivo e DMSO 1% como controle negativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição.

#### **4.6.3 Avaliação da citotoxicidade em células THP-1**

As células THP-1 (linhagem monocítica humana) foram cultivadas em placas de 96 cavidades ( $4,0 \times 10^6$  células/poço), como descrito no item 4.6.1. Em seguida, as mesmas foram tratadas com os compostos de interesse (diluídos em DMSO e, posteriormente, em RPMI-1640) em concentrações que variaram entre  $15,6 \mu\text{M}$  a  $500 \mu\text{M}$  e incubadas por 72 h ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico do MTT, o qual quantifica o formazana (sal roxo e insolúvel em água) formado através da redução do MTT (um sal amarelo e solúvel em água) através de enzimas mitocondriais de células viáveis (SIEUWERTS et al., 1995; VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991).

#### **4.6.4 Avaliação da atividade inibitória frente a enzima tripanotiona redutase**

A enzima recombinante tripanotiona redutase de *T. cruzi* foi expressa em *Escherichia coli* BL21DE3 e purificada por cromatografia de afinidade. Os ensaios foram realizados em placas de 96 cavidades de acordo com a metodologia descrita por Hamilton e colaboradores (HAMILTON et al., 2003). O volume final utilizado foi de  $240 \mu\text{L}$ , incluindo tripanotiona redutase de *T. cruzi* (1 m-unidade), HEPES (40 mM, pH 7.5), NADPH (0,15 mM), DTNB ( $25 \mu\text{M}$ ) e EDTA (1 mM). Esta mistura foi incubada por 5 minutos ( $27^\circ\text{C}$ ), depois tripanotiona dissulfeto ( $\text{T(S)}_2$ ) ( $1 \mu\text{M}$ ) e os compostos (diluídos em DMSO) foram adicionados em triplicata. Em seguida, a mistura reacional foi incubada a  $27^\circ\text{C}$  por 30 minutos e  $10 \mu\text{L}$  de DTNB foram adicionados. A absorbância em 412 nm foi acompanhada por 30 minutos para determinar a atividade enzimática, comparando os compostos testados com DMSO 1% (controle negativo) e clomipramina (controle positivo).

#### **4.6.5 Avaliação da atividade inibitória frente a enzima Glutathiona redutase.**

O método empregado foi o descrito por Carlberg e Mannervik (1985). O teste é colorimétrico e mede a absorbância de NADPH  $\lambda$ 340 nm. A atividade enzimática, da enzima glutationa redutase de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, Saint Louis) é representada pela diminuição da absorbância na medida em que o NADPH vai sendo consumido. O ensaio foi realizado em placas de 96 cavidades com um volume final de 250  $\mu$ L contendo: 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 1 mM de EDTA, 400  $\mu$ M de NADPH, 10 mU da enzima (GR – Sigma-Aldrich, Saint Louis) e diferentes concentrações dos compostos testados (12,5 a 100  $\mu$ M) em uma concentração máxima de 1% de DMSO (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A mistura foi pré-incubada a 30 °C durante 30 minutos e a leitura iniciada após a adição de 1 mM de glutationa oxidada (Sigma-Aldrich, Saint Louis) em 340 nm, medindo-se a absorbância da inclinação da curva durante cinco minutos ( $\delta$ Abs/ $\delta$ t). Este valor foi comparado com o controle sem composto (amostra) para fornecer o percentual de inibição da enzima. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DE UM *HIT* TENDO COMO PROTÓTIPO UM COMPOSTO DE ORIGEM NATURAL

Considerando a abordagem de planejamento de fármacos, esta etapa do trabalho identificou um novo esqueleto químico com ação tripanocida, baseada em compostos de origem natural, as neolignanas naturais, grandisina (**38**) e veraguensina (**39**), as quais têm sido relatadas como promissoras, na busca de compostos tripanocidas, apresentando  $IC_{50}$  2,3 e 3,7  $\mu$ M (LOPES et al., 1998). Trabalhos prévios realizados pelo grupo proporcionaram o planejamento e síntese de análogos das lignanas **38** e **39**, utilizando diferentes estratégias de modificação molecular, com o objetivo de identificar um novo *hit* que apresentasse propriedades químicas e biológicas adequadas (BERNARDES et al., 2006; DA ROSA et al., 2017; HARTMANN et al., 2017). Recentemente, o grupo descreveu uma série de derivados contendo o anel isoxazol, como um substituinte bioisótero ao anel tetrahydrofurano central dos produtos naturais citados, sendo identificados compostos promissores (compostos **41-43**) (DA ROSA et al., 2017).

Nesta parte da tese, será abordada a continuação do trabalho iniciado durante o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC. Durante o mestrado, foi sintetizada uma quimioteca de compostos bis-heterociclos, contendo o núcleo isoxazol e um anel triazol como grupo espaçador entre as unidades aromáticas (Figura 14). O processo de obtenção e dados físico-químicos desses compostos estão descritos na dissertação de ZIMMERMANN (2014).

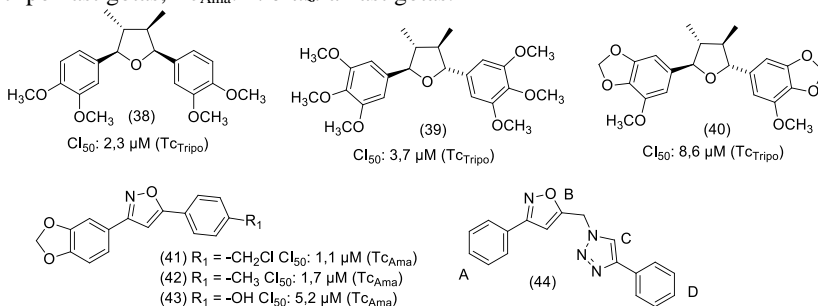
Esses sistemas heterocíclicos são encontrados em vários fármacos e apresentam propriedades interessantes devido às suas características químicas, biológicas e farmacológicas (DUA et al., 2011; SYSAK; OBMIŃSKA-MRUKOWICZ, 2017). O anel heterociclo triazol, de cinco membros, foi selecionado devido à sua capacidade de atuar como aceptor (HBA) e como doador (HBD) de ligação de hidrogênio, e também por conter uma estrutura rígida e estável sob condições oxidativas e redutoras (BONANDI et al., 2017). Estes aspectos, em conjunto, contribuíram para os estudos de REA dos derivados tripanocidas de lignanas e para o planejamento de compostos quimicamente diferentes e com propriedade *druglikeness* adequadas.

Os compostos planejados no mestrado apresentavam variações nos anéis **A** e **D** representados pela estrutura química do composto **44**, com base nos diferentes padrões de substituição dos derivados naturais

(lignanas **38-40**), os quais contêm grupos metoxilas e metilenodióxi e também variando os grupos substituintes no anel **D**, considerando a possibilidade de diversidade eletrônica e estrutural destes grupos. Ademais, a presente tese descreve o estudo sde relação estrutura-atividade que foram baseados nos resultados dos ensaios biológicos contra formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A discussão dos resultados considera três conjuntos de compostos; o primeiro conjunto, se encontram os derivados bis-heterociclos contendo um anel **A** sem substituintes e grupos substituintes diversos no anel **D** (compostos **44-59**); com base na estrutura química dos compostos mais ativos da primeira série (compostos **47** e **49**), foi estabelecido um segundo conjunto, os derivados que contêm substituintes metoxila e metilenodióxi no anel **A** e metila e metoxila no anel **D**; a partir dos resultados biológicos obtidos para esta série, foi estabelecido um terceiro conjunto, os derivados contendo grupo 3,4-dimetóxi no anel **A** e diferentes grupos substituintes no anel **D** (compostos **66-79**).

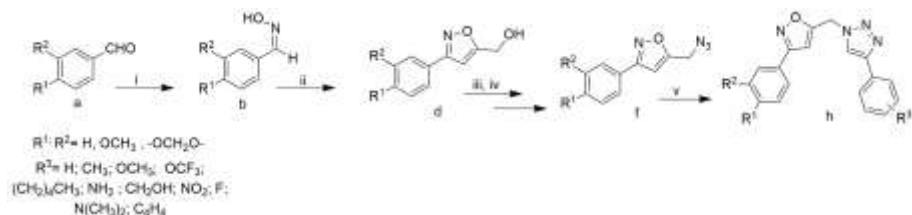
Adicionalmente, os compostos que se motraram mais promissores foram avaliados contra a enzima tripanotiona redutase, considerando que esse é um alvo tripanocida específico envolvido no metabolismo redox do parasito e essencial para a sobrevivência do mesmo (CAVALLI; BOLOGNESI, 2009; FIELD et al., 2017; KRAUTH-SIEGEL; BAUER; SCHIRMER, 2005; KRAUTH-SIEGEL; INHOFF, 2003a; LO PRESTI et al., 2015; SCHMIDT; KRAUTH-SIEGEL, 2002).

Figura 14: Neolignanas naturais veraguensina (**38**), grandisina (**39**), and 6,6'-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-dimetiltetrahydrofurano-2,5-diil)bis(4-metoxibenzo[d][1,3]dioxol) (**40**), isoxazol 3,5-disubstituído (**41-43**) e o esqueleto proposto para os derivados bis-heterociclos (**44**).  $TC_{Trio}$ : *T. cruzi* tripomastigotas;  $TC_{Ama}$ : *T. cruzi* amastigotas.



Os resultados obtidos foram publicados na *Biorganic and Medicinal Chemistry* (ZIMMERMANN et al., 2018).

A rota sintética proposta para a obtenção dos compostos bis-heterociclos foi planejada de forma economicamente viável, reprodutível e que permitisse a preparação de uma biblioteca de compostos estruturalmente diversos de forma rápida e em bons rendimentos (Esquema 1). Inicialmente, uma aldoxima (**b**) foi sintetizada sob irradiação por micro-ondas a partir de um aldeído comercial (**a**) e cloridrato de hidroxilamina (60-98% rendimento) (HAJIPOUR; RAFIEE; RUOHO, 2010). Na sequência, a aldoxima (**b**) foi submetida à reação com *N*-clorosuccinimida, gerando, *in situ*, cloreto de aril-carboximidoila correspondente, o qual reagiu com álcool propargílico na presença de sulfato de cobre formando o derivado isoxazol 3,5-dissubstituído (**d**) (HANSEN; WU; FOKIN, 2005). Esse composto foi tosilado e submetido à reação com azida de sódio sob irradiação de micro-ondas originando o intermediário azida (**f**) com rendimento de 80-89% (HIMO et al., 2005; MORITA et al., 2005). Finalmente, os compostos bis-heterociclos (**h**) foram obtidos por meio de cicloadição entre um alcino e uma azida catalisada por cobre (CuAAC) sob irradiação por micro-ondas, com rendimentos variando entre 38-99%. Os compostos **44-85** (Tabelas 1) foram caracterizados por RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) e espectrometria de massas e estes dados espectrais encontram-se descritos em trabalho anterior (ZIMMERMANN, 2014). A *druglikeness* dos compostos foi avaliada e a maioria deles atendem as regras de Lipinski (Ro5), apresentando características adequadas para uma boa biodisponibilidade por via oral (LIPINSKI, 2000).

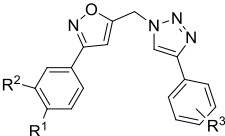


Esquema 1: Rota sintética para obtenção dos compostos bis-heterociclos.

- (i)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ , DABCO, MW: 70 °C, 100 W, 1 min (60-98%); (ii) NCS, DMF, ascorbato de sódio,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , t-BuOH:H<sub>2</sub>O, álcool propargílico, r.t., 4 h (82%) ou NCS, DMF, ascorbato de sódio,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , DMF, álcool propargílico, MW: 35 °C, 150 W, 11 min (54-76%); (iii) TsCl, Et<sub>3</sub>N,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :H<sub>2</sub>O, 1 h (49-76%); (iv)  $\text{NaN}_3$ , DMF, MW: 70 °C, 150 W, 10 min (80-89%); (v)  $\text{CuSO}_4$ , ascorbato de sódio, alcino, DMF, 70 °C, 100 W, 10 min (38-99%).

(ii)

Tabela 1: Estrutura química dos compostos bis-heterocíclis sintetizados (44-85).



Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Rend. (%) <sup>a</sup>
44	H	H	H	76
45	H	H	4-OCH <sub>3</sub>	38
46	H	H	2-OCH <sub>3</sub>	88
47	H	H	3,5-OCH <sub>3</sub>	76
48	H	H	4-CH <sub>3</sub>	84
49	H	H	2,4,5-CH <sub>3</sub>	49
50	H	H	2-CH <sub>3</sub> ,4-OCH <sub>3</sub>	92
51	H	H	2,5-CH <sub>3</sub>	88
52	H	H	3-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> C(OCH <sub>3</sub> )CH-4	99
53	H	H	4-NO <sub>2</sub>	89
54	H	H	4-OCF <sub>3</sub>	77
55	H	H	4-F	68
56	H	H	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	87
57	H	H	4-NH <sub>2</sub>	47
58	H	H	4-CH <sub>2</sub> OH	42
59	H	H	4-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	97
60	OCH <sub>3</sub>	H	2,4,5-CH <sub>3</sub>	89
61	OCH <sub>3</sub>	H	3,5-OCH <sub>3</sub>	82
62	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	2,4,5-CH <sub>3</sub>	94
63	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	3,5-OCH <sub>3</sub>	96
64		OCH <sub>2</sub> O	2,4,5-CH <sub>3</sub>	88
65		OCH <sub>2</sub> O	3,5-OCH <sub>3</sub>	60
66	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	62
67	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-OCF <sub>3</sub>	89
68	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	94
69	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-NH <sub>2</sub>	50
70	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>2</sub> OH	87
71	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	92
72	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub>	93
73	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	2-OCH <sub>3</sub>	95
74	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	2-CH <sub>3</sub> ,4-OCH <sub>3</sub>	82
75	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	2,5-CH <sub>3</sub>	97
76	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-NO <sub>2</sub>	78
77	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-F	88
78	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	65
79	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	3-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> C(OCH <sub>3</sub> )CH-4	92
80	OCH <sub>3</sub>	H	4-OCH <sub>3</sub>	89
81		OCH <sub>2</sub> O	4-OCH <sub>3</sub>	85
82	OCH <sub>3</sub>	H	4-OCF <sub>3</sub>	94
83		OCH <sub>2</sub> O	4-OCF <sub>3</sub>	99
84	OCH <sub>3</sub>	H	4-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	96
85		OCH <sub>2</sub> O	4-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	91

<sup>a</sup>Rend: Rendimento da reação CuAAC;



### 5.1.1 Avaliação biológica e estudo de relação estrutura-atividade dos bis-heterociclos sintetizados.

Os compostos tiveram a ação tripanocida avaliada *in vitro*, através de ensaios em células THP-1 infectadas com amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em células THP-1. Os resultados são apresentados nas tabelas 2-4. Todos os compostos também foram avaliados frente às formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, porém, nenhum composto apresentou atividade promissora a 100  $\mu\text{M}$ . Os ensaios biológicos foram feitos em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Mario Steindel, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Os experimentos foram realizados pela Dra. Milene Höehr de Moraes.

Tabela 2: Atividade tripanocida dos compostos do primeiro conjunto a 100  $\mu\text{M}$  frente a forma amastigota.

Composto	R <sub>3</sub>	%IC <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	IS
44	H	33,7 $\pm$ 0,8	>100	ND	-
45	4-OCH <sub>3</sub>	43,3 $\pm$ 6,3	>100	ND	-
46	2-OCH <sub>3</sub>	12,4 $\pm$ 1,7	>100	ND	-
47	3,5-OCH <sub>3</sub>	95,3 $\pm$ 0,7	54,5 $\pm$ 2,1	142,8 $\pm$ 10,9	2,6
48	4-CH <sub>3</sub>	45,2 $\pm$ 4,4	>100	ND	-
49	2,4,5-CH <sub>3</sub>	89,5 $\pm$ 0,9	88,4 $\pm$ 4,8	200,5 $\pm$ 60,0	2,3
50	2-CH <sub>3</sub> ,4-OCH <sub>3</sub>	18,6 $\pm$ 2,5	>100	ND	-
51	2,5-CH <sub>3</sub>	0,0 $\pm$ 0,0	NA	ND	-
52	3-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> C(OCH <sub>3</sub> )CH-4	43,1 $\pm$ 2,5	>100	ND	-
53	4-NO <sub>2</sub>	46,9 $\pm$ 4,5	>100	ND	-
54	4-OCF <sub>3</sub>	28,7 $\pm$ 2,4	>100	ND	-
55	4-F	0,00 $\pm$ 0,0	NA	ND	-
56	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	32,6 $\pm$ 6,9	>100	ND	-
57	4-NH <sub>2</sub>	0,0 $\pm$ 0,0	NA	ND	-
58	4-CH <sub>2</sub> OH	0,0 $\pm$ 0,0	NA	ND	-
59	4-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	0,0 $\pm$ 0,0	NA	ND	-
<b>Bnz</b>		93,0 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	10,2 $\pm$ 0,1	>500	>49,02

<sup>a</sup> Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de um ensaio em triplicata; <sup>b</sup>Bnz: porcentagem de inibição do crescimento parasitário de amastigota de *T. cruzi* a 20  $\mu\text{M}$ ; %IC: porcentagem de inibição do crescimento parasitário a 100  $\mu\text{M}$ ; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos; CC<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% das células THP-1; IS: índice de seletividade; NA, não ativo na concentração testada; ND: não determinada.

O primeiro conjunto de moléculas sintetizadas, possui o anel **A** não substituído, variando os grupos substituintes no anel **D**. O composto **44** por apresentar o esqueleto químico mais simples entre os derivados bis-heterociclos, foi considerado como base para comparação e discussão de REA, com uma porcentagem de inibição de crescimento (IC) parasitário de 33,7%. Os dados obtidos com os ensaios biológicos sugerem que a substituição de hidrogênio por grupamentos metoxila (-OMe) parece exercer influência na atividade, a qual varia de acordo com a posição. A presença de 4-OMe contribui para um ligeiro aumento da atividade (composto **45**, IC 43,3%) enquanto a presença de 2-OMe leva a uma diminuição da atividade (composto **46**, IC 12,4%). A presença de 3,5-OMe (composto **47**) levou a um aumento na atividade (95,3% de inibição de crescimento parasitário; IC<sub>50</sub> 54,5 µM; IS 2,6). Além da influência da posição dos grupos metoxila, foi investigada a importância de grupamentos metila no anel **D** frente a atividade tripanocida. A adição de um substituinte 4-metil também levou a um ligeiro aumento na atividade (composto **48**, IC 45,2%), assim como ocorreu com o derivado 4-OMe (composto **45**). O composto **49**, contendo substituição 2,4,5-trimetil teve sua atividade aumentada (IC 89,5%; CI<sub>50</sub> 88,0 µM; IS 2,3). A combinação de um grupamento metila na posição 2 e uma metoxila na posição 4 (composto **50**) diminuiu a atividade (18,6 % de inibição de crescimento parasitário). Esses resultados apontam para a contribuição dos grupos metoxila e metila para a atividade, principalmente quando se tem anéis dissubstituídos nas posições 3,5 ou 4,5, provavelmente por ocuparem uma região hidrofóbica no alvo molecular onde estes compostos supostamente estariam atuando. Também é possível observar uma pequena diminuição da atividade na presença de um grupo metila na posição 2, o que pode estar relacionado com a restrição conformacional causada pela presença de substituintes *orto*- em compostos bis-aromáticos, alterando a conformação bioativa e, conseqüentemente, influenciando possivelmente o modo de ligação. A atividade apresentada para os compostos **46**, **50** e **51** reforça a ideia de que, embora o substituinte em 2 possa diminuir a atividade, a combinação de grupos substituintes hidrofóbicos nas posições 3,5 ou 4,5 terá influência direta na ação do composto. Ademais, o grupo naftaleno, presente no composto **52** (IC 43,1%), também parece não ser favorável para a atividade, possivelmente por ser uma estrutura mais rígida, isso também pode exercer influência sobre a conformação adequada para interação no alvo molecular, embora seja capaz de realizar interações hidrofóbicas. Por fim, com os resultados obtidos para os compostos contendo grupos doadores ou retiradores de elétrons na posição *-para* do

anel **D** é possível observar para os compostos **53**, **54**, **55** um aumento da atividade biológica diretamente proporcional ao aumento da capacidade retiradora de elétrons do substituinte. Já considerando os compostos contendo grupos doadores de elétrons (compostos **45**, **48**, e **56**) a maioria é capaz de inibir o crescimento parasitário, com exceção daqueles com substituintes na posição *orto* (compostos **46** e **51**) e compostos **57** (4-NH<sub>2</sub>) e **58** (4-CH<sub>2</sub>OH), os quais apresentam substituintes polares que dificultariam possíveis interações hidrofóbicas.

Baseado na estrutura química dos compostos mais ativos da primeira série (compostos **47** e **49**) e considerando que as diferentes lignanas naturais ativas (compostos **38-40**) apresentam grupos metoxilas ou metilenodióxi como substituintes no anel **A** (DA SILVA FILHO et al., 2008; FELIPPE et al., 2008), um segundo conjunto de moléculas foi sintetizado e avaliado frente às formas amastigotas de *T. cruzi* (compostos **60-65**) (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade tripanocida dos compostos do segundo conjunto a 100 µM frente a forma amastigota.

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	%IC <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> (µM) <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> (µM)	IS
<b>60</b>	OCH <sub>3</sub>	H	2,4,5-CH <sub>3</sub>	33,4 ± 2,8	>100	ND	-
<b>61</b>	OCH <sub>3</sub>	H	3,5-OCH <sub>3</sub>	3,6 ± 0,7	>100	ND	-
<b>62</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	2,4,5-CH <sub>3</sub>	89,6 ± 0,3	55,2 ± 5,0	> 500	> 9,0
<b>63</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	3,5-OCH <sub>3</sub>	74,8 ± 3,7	30,3 ± 4,3	> 500	> 16,5
<b>64</b>	OCH <sub>2</sub> O		2,4,5-CH <sub>3</sub>	13,4 ± 0,4	>100	ND	-
<b>65</b>	OCH <sub>2</sub> O		3,5-OCH <sub>3</sub>	87,9 ± 1,1	49,9 ± 8,9	207,6 ± 9,3	4,2
<b>Bnz</b>				93,0 ± 0,6 <sup>c</sup>	10,2 ± 0,1	>500	>49,0

<sup>a</sup> Os resultados são expressos como média ± DP de um ensaio em triplicata; <sup>b</sup>Bnz: porcentagem de inibição do crescimento parasitário de amastigotas de *T. cruzi* a 20 µM; %IC: porcentagem de inibição do crescimento parasitário a 100 µM; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos; CC<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% das células THP-1; IS: índice de seletividade; ND: não determinada.

Entre os análogos contendo o anel 2,4,5-trimetilfenil, observamos que a substituição 3,4-OMe no anel **A** foi capaz de levar a um aumento da potência tripanocida, assim como na seletividade. Situação semelhante foi observada nos resultados apresentados pelos derivados contendo o anel 3,5-dimetoxifenil, sendo que os compostos **63** e **65** foram mais potentes e mais seletivos que o composto **47**. Considerando esses resultados, sugere-se que a presença de substituintes nas posições *-meta* e *-para* do anel **A**, são importantes para a atividade biológica.

Com base nestas observações, uma terceira série de compostos (**66-79**) (Tabela 4) foi sintetizada. Na nova série, o padrão de

substituição 3,4-dimetoxi no anel **A** foi mantido enquanto outros grupos substituintes no anel **D** foram avaliados. A comparação entre os compostos **66**, **67**, **68**, contendo, respectivamente, os substituintes 4-OCH<sub>3</sub>, 4-OCF<sub>3</sub> e 4-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub> no anel **D**, e seus análogos **45**, **54** e **59** (Tabela 1) permite observar que a inserção de metoxilas no anel **A** favorece a atividade tripanocida. Porém, nenhuma alteração de atividade significativa é observada para os análogos **80-85** (Tabela 4), contendo os substituintes 4-metoxi ou 3,4-metileno dioxi no anel **A**, corroborando a ideia de que para estes derivados bis-heterociclos, aqui apresentados, a presença do anel A 3,4-dimetoxifenila é importante para a atividade biológica.

Tabela 4: Atividade tripanocida a 100 µM dos compostos do terceiro conjunto frente a forma amastigota.

Comp.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	%IC <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>	SI
<b>66</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	81,9 ± 2,0	22,7 ± 3,5	> 500	> 22,0
<b>67</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-OCF <sub>3</sub>	78,5 ± 1,8	40,1 ± 3,5	227,2 ± 56,3	5,7
<b>68</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	80,2 ± 0,2	12,2 ± 1,9	> 500	> 41,0
<b>69</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-NH <sub>2</sub>	42,8 ± 1,1	>100	ND	-
<b>70</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>2</sub> OH	43,4 ± 3,3	>100	ND	-
<b>71</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	12,2 ± 3,3	>100	ND	-
<b>72</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub>	7,6 ± 0,3	>100	ND	-
<b>73</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	2-OCH <sub>3</sub>	43,7 ± 3,8	>100	ND	-
<b>74</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	2-CH <sub>3</sub> ,4-OCH <sub>3</sub>	13,6 ± 1,2	>100	ND	-
<b>75</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	2,5-CH <sub>3</sub>	4,0 ± 0,7	>100	ND	-
<b>76</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-NO <sub>2</sub>	37,8 ± 4,4	>100	ND	-
<b>77</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-F	32,0 ± 1,6	>100	ND	-
<b>78</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	33,9 ± 3,5	>100	ND	-
<b>79</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	3-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> C(OCH <sub>3</sub> )CH- 4	26,2 ± 0,8	>100	ND	-
<b>80</b>	OCH <sub>3</sub>	H	4-OCH <sub>3</sub>	43,2 ± 3,6	>100	ND	-
<b>81</b>	OCH <sub>2</sub> O	H	4-OCH <sub>3</sub>	9,9 ± 0,0	>100	ND	-
<b>82</b>	OCH <sub>3</sub>	H	4-OCF <sub>3</sub>	26,0 ± 2,8	>100	ND	-
<b>83</b>	OCH <sub>2</sub> O	H	4-OCF <sub>3</sub>	26,8 ± 1,4	>100	ND	-
<b>84</b>	OCH <sub>3</sub>	H	4-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	13,4 ± 0,4	>100	ND	-
<b>85</b>	OCH <sub>2</sub> O	H	4-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	48,9 ± 0,9	>100	ND	-
<b>Bnz</b>				93,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	10,2 ± 0,1	>500	>49,0

<sup>a</sup>Os resultados são expressos como média ± DP de um ensaio em triplicata; <sup>b</sup>Bnz: porcentagem de inibição do crescimento parasitário de amastigota de *T. cruzi* a 20 µM; %IC: porcentagem de inibição do crescimento parasitário a 100 µM; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos; CC<sub>50</sub>: concentração

inibitória do crescimento de 50% das células THP-1; IS: índice de seletividade; NA, não ativo na concentração testada; ND: não determinada.

Dentre esses derivados (Tabela 4), os compostos **66**, **67** e **68** apresentaram porcentagem de inibição de crescimento parasitário semelhante à atividade apresentada pelos derivados **62** e **63**. Porém, a comparação entre os valores de IC<sub>50</sub>, mostraram que os derivados **66** e **68** são os mais ativos da série e apresentam bons índices de seletividade (**66**: CI<sub>50</sub> 22,7 µM; IS= >22,0 e **68**: CI<sub>50</sub> 12,2 µM; IS= >41,0). Cabe ressaltar que para o ensaio realizado o composto **68** apresenta atividade semelhante ao fármaco disponível comercialmente, benznidazol (CI<sub>50</sub> 10,2 µM). A presença do substituinte 4-pentil no derivado **68** pode ter sido determinante para o aumento da atividade, pois, sendo um grupo hidrofóbico e altamente flexível, é possível que adote uma conformação que favoreça o encaixe em uma região hidrofóbica, conforme sugerido anteriormente.

Considerando o interesse em encontrar compostos de amplo espectro de ação contra os tripanossomatídeos (*T. cruzi* e leishmanias), os 42 compostos bis-heterociclos sintetizados foram avaliados contra formas amastigota de *Leishmania amazonensis*, em concentração fixa de 100 µM, porém os compostos não apresentaram atividade promissora na concentração avaliada.

De forma a investigar um dos possíveis mecanismos de ação dos compostos bis-heterociclos, os derivados identificados como mais ativos nos ensaios de ação tripanocida (**47**, **49**, **62**, **63**, **65**, **66**, **67** e **68**) foram avaliados quanto à capacidade de inibição da enzima tripanotiona redutase de *T. cruzi*. Esses ensaios também foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa de Protozoologia da UFSC, Professor Mario Stendeil. Os compostos avaliados não apresentaram uma inibição significativa a 100 µM (Tabela 5), sugerindo que a atividade tripanocida não ocorra como consequência da inibição desta enzima e que estudos complementares devem ser realizados a fim de esclarecer o mecanismo de ação desta classe de compostos.

Tabela 5: Atividade inibitória frente a tripanotiona redutase de *T. cruzi* (TcTR) de *Trypanosoma cruzi* dos compostos **47**, **49**, **62**, **63**, **65-68**.

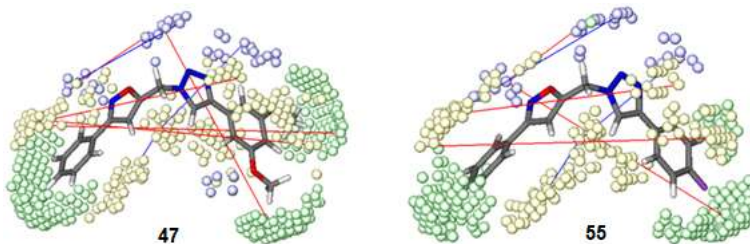
Compostos	% inibição <i>T. cruzi</i> TcTR[100 µM] <sup>a</sup>
<b>47</b>	0,00 (±0,00)
<b>49</b>	0,00 (±0,00)
<b>62</b>	8,97 (±0,96)
<b>63</b>	8,88 (±2,50)
<b>65</b>	0,00 (±0,00)
<b>66</b>	9,63 (±3,85)
<b>67</b>	0,00 (±0,00)
<b>68</b>	0,00 (±0,00)

<sup>a</sup>Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de triplicatas. Controle positivo clomipramina  $CI_{50}$  14,0  $\pm$  2,6  $\mu$ M

De forma a complementar os dados de relação estrutura-atividade observados para os compostos sintetizados, um estudo qualitativo usando descritores tridimensionais foi realizado em parceria com o professor Dr. Eduardo B. de Melo, de acordo com metodologia descrita no item 4.5.4. (PASTOR et al., 2000).

Utilizando o método *Fractional Factorial Design* (FDD), foi obtido um modelo formado por 95 descritores MIF que, através do método de regressão PLS, deram origem a duas variáveis latentes. Os resultados obtidos para o ajuste ( $R^2= 0,74$ ;  $RMSEC= 0,50$ ;  $F_{2,39}=55,50$ ; critical  $F$ : 3,24) e capacidade de predição interna ( $Q^2_{LOO}= 0,52$ ;  $RMSECV= 0,68$ ) indicam que o modelo explica e prediz informações em níveis recomendados pela literatura ( $R^2 > 0,6$ ;  $Q^2_{LOO} > 0,5$ ) (ROY; ROY, 2008). O modelo é graficamente apresentado na Figura 15, utilizando como base os compostos **47** (ativo) e **55** (inativo). As distâncias entre as sondas que favorecem a atividade são apresentadas como linhas vermelhas, enquanto aquelas que desfavorecem são apresentadas como linhas azuis. É possível observar que a maior parte dos descritores que favorecem a atividade correspondem a distâncias que englobam exatamente os anéis **A** e **D**, onde são realizadas as variações de grupos substituintes.

Figura 15: Representação gráfica do modelo de REA obtido com descritores GRIND.



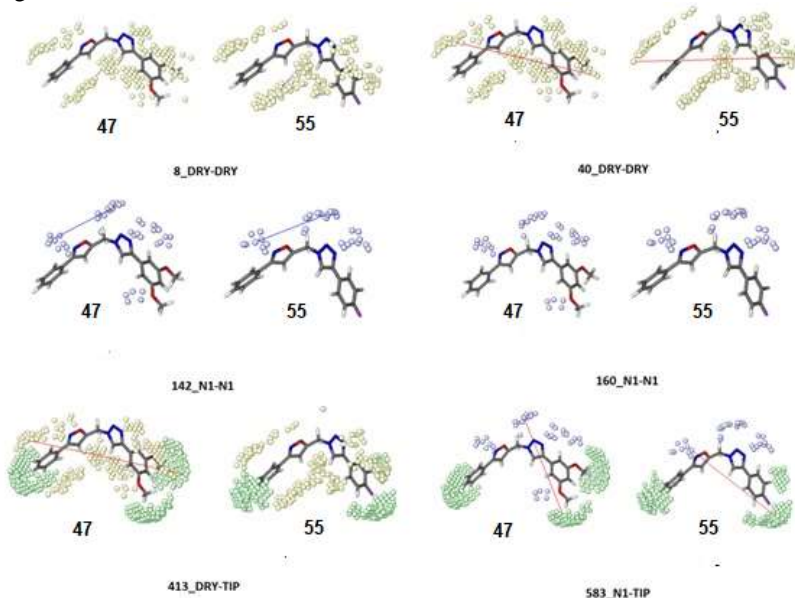
Esferas verdes: TIP fields; esferas amarelas: DRY fields; esfera azul: N1 fields; linhas azuis: distância entre os campos (em angstroms) que tem um impacto negativo na atividade. Linhas vermelhas: distância entre os campos que tem impacto positivo para atividade. **47**: composto classificado como 1; **55**: composto classificado como -1.

A interpretação mecanística foi baseada nos seis descritores mais relevantes (Tabela 6 e Figura 16).

Tabela 6: Características dos seis descritores mais importantes do modelo

Sinal	Descritores	Campo	Faixa de distância (Å)
-	8	DRY-DRY	3,2–3,6
+	40	DRY-DRY	16,0–16,4
-	142	N1-N1	8,0–8,4
-	160	N1-N1	5,2–15,6
+	413	DRY-TIP	18,8–19,2
+	583	N1-TIP	13,6–14,0

As características estéricas e de hidrofobicidade estão presentes em quatro descritores, sendo que nos três descritores relacionados ao favorecimento da presença de atividade (40\_DRY-DRY, 413\_DRY-TIP, e 583\_N1-TIP) correspondem aos grupos hidrofóbicos e estéricos localizados exatamente nos anéis **A** e **D** (Figura 15).

Figura 16: Melhores descritores GRIND associados com **47** e **55**.

Estes resultados corroboram aqueles observados na etapa experimental do estudo, mostrando que a presença de atividade é altamente dependente de grupamentos hidrofóbicos e volumosos localizados nas extremidades dos anéis **A** e **D**. Em 413\_DRY-TIP, por

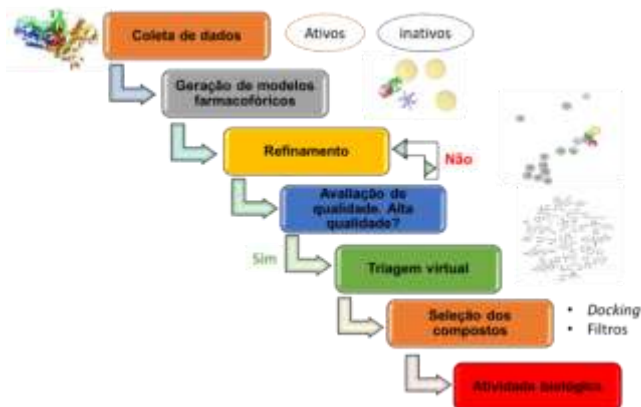
exemplo, o intervalo de distância de 18,8 a 19,2 angstroms não se encontra presente no composto **55**. Deste modo, considerando que o modelo não contradiz os resultados experimentais, este pode auxiliar na obtenção de novos derivados que se encontrem sempre na faixa de maior potência inibitória contra o crescimento de *T. cruzi*.

## 5.2 USO DE FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA O PLANEJAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE UM *HIT*

Tendo em vista que as técnicas de triagem virtual são ferramentas bem estabelecidas no processo de descoberta de um *hit* (VUORINEN; SCHUSTER, 2015), esta parte do trabalho teve como ponto de partida a aquisição e ampliação de conhecimento na área de modelagem molecular através de um doutorado-sanduíche no Instituto de Farmácia da Universidade de Innsbruck (Áustria –Institute of Pharmacy, Unit of Pharmaceutical Chemistry - Leopold-Franzens-University Innsbruck) sob a orientação da professora Dra. Daniela Schuster. O objetivo foi a identificação de um novo *hit*, inibidor da enzima tripanotiona redutase.

Com base no que foi proposto por KASERER e colaboradores (2015), foram desenvolvidos modelos farmacofóricos seguindo as etapas propostas no Esquema 2 (KASERER et al., 2015). Dois tipos de modelos farmacofóricos foram elaborados através do programa *LigandScout* versão 4.08 (LS), um com base na estrutura cristalográfica e outro com base em inibidores (WOLBER; LANGER, 2005). Os modelos foram gerados preferencialmente com base em estruturas cristalográficas já disponíveis para a enzima, pois estas conferem maior confiabilidade quanto ao modo de interação da enzima com o substratos e inibidores. De forma complementar, a fim de se obter uma maior cobertura química estrutural, foram elaborados modelos com base em inibidores da tripanotiona redutase já descritos na literatura.





Esquema 2: Diferentes etapas consecutivas para a geração e refinamento de um modelo farmacofórico e aplicação prospectiva; conforme esquema adaptado de KASERER e colaboradores, 2015.

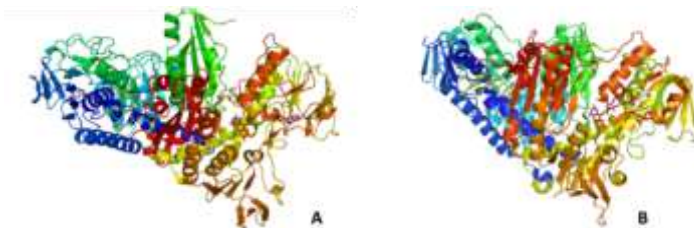
A coleta de dados com relação às estruturas cristalográficas teve início através de uma pesquisa no PDB (*Protein Data Bank*), um portal de informações a respeito de estruturas 3-D de macromoléculas, contendo 141415 estruturas macromoleculares biológicas (<https://www.rcsb.org/>). Para a pesquisa foi utilizado o descritor “trypanothione reductase” durante o mês de fevereiro de 2015 e 21 estruturas cristalográficas para a enzima tripanotiona redutase (TR) foram obtidas. Estas estruturas estavam cristalografadas com solvente ou na forma livre (KRAUTH-SIEGEL et al., 1993), em complexo com tripanotiona dissulfeto e NADPH [PDB 1BZL] (BOND et al., 1999), FAD [PDB 1AOG; 1NDA] (LANTWIN et al., 1994; ZHANG et al., 1996), com inibidores competitivos mepacrina (JACOBY et al., 1996)(JACOBY et al., 1996) e 5-{5-[1-(pirrolidin-1-il)ciclohexil]-1,3-tiazol-2-il}1H-indol [PDB 1NEW] (PERSCH et al., 2014) e em complexo com inibidor irreversível mostarda quinacrina [PDB 1GXF] (SARAVANAMUTHU et al., 2004) (Tabela S1, Apêndice).

A resolução da densidade eletrônica foi um dos critérios de análise para seleção das estruturas cristalográficas a serem utilizadas na elaboração deste trabalho. Uma boa resolução é muito importante para obtenção de informações precisas sobre a proteína; através das localizações 3-D de átomos e dobramentos da proteína são determinados os mapas de densidade eletrônica. Quanto melhor a resolução mais confiável e bem resolvida é a estrutura. Assim, é importante que se escolham estruturas cristalográficas com resolução preferencialmente

menor que 3,0 Å, pois apresentaram boa qualidade de resolução (VUORINEN; SCHUSTER, 2015). Optou-se por trabalhar com dois complexos cristalográficos da enzima TR, oriundas da espécie parasitaria *Trypanosoma cruzi*. As estruturas cristalográficas foram selecionadas por apresentarem boa resolução, bem como a possibilidade de fazer a validação experimental dos farmacóforos elaborados, tendo em vista a possibilidade dos ensaios de inibição enzimática da TR serem realizados pelo grupo parceiro.

A geração do modelo farmacofórico ocorreu através do programa *LigandScout* (LS). Um modelo farmacofórico foi gerado automaticamente para cada estrutura cristalográfica selecionada e esses foram posteriormente refinados manualmente com o intuito de otimizar a capacidade preditiva. Os modelos farmacofóricos escolhidos foram criados com base nas estruturas cristalográficas complexadas com o substrato da enzima (PDB: 1BZL) (BOND et al., 1999) e com inibidor derivado da quinacrina (PDB:1GXF) (SARAVANAMUTHU et al., 2004) retiradas do site PDB (<https://www.rcsb.org/>) e inspecionadas através do programa PyMOLWin (Figura 17).

Figura 17: Estruturas cristalográficas 1BZL (A), 1GXF (B) utilizadas na elaboração dos modelos farmacofóricos.

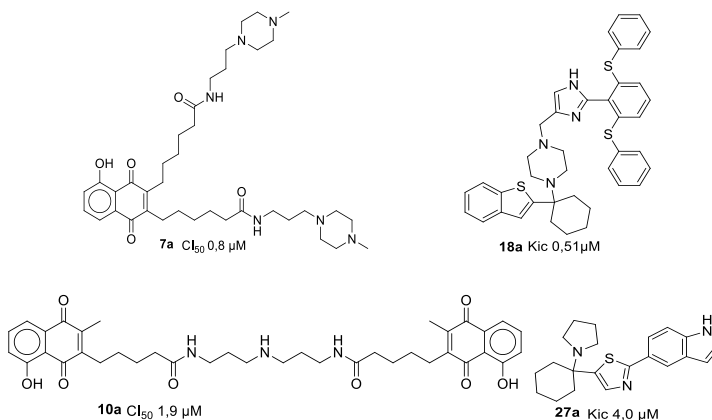


Fonte: Autoria própria, ilustrações obtidas através do PyMOLWin.

Com o objetivo de complementar a identificação do conjunto de compostos ativos, vários outros modelos farmacofóricos fundamentados nos inibidores (Figura S1, 1a-31a, Apêndice) já descritos para TR foram elaborados. Dentre os modelos farmacofóricos gerados, o mais promissor foi o modelo obtido através de características comuns entre si (*shared features*) e com as estruturas dos inibidores (6,6'-(5-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidronaftaleno-2,3-diil)bis(*N*-(3-(4-metilpiperazin-1-il)propil)hexanamida (**7a**) (SALMON-CHEMIN et al., 2001), 1-(1-(benzo[*b*]tiofen-2-yl)ciclohexil)-4-((2-(2,6-bis(feniltio)fenil)-1H-

imidazol-4-yl)metil)piperazina (**18a**) (EBERLE et al., 2011), N,N'-(azanedilbis(propano-3,1-diil))bis(5-(8-hidroxi-3-metil-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftaleno-2-il)pentanamida (**10a**) (SALMON-CHEMIN et al., 2001) (Figura 18) através de sobreposição dos compostos, usando como coordenada o composto 5-{1-[1-(pirrolidin-1-il)ciclohexil]-1,3-tiazol-2-il}-1H-indol (**27a**) do complexo cristalográfico 4NEW.

Figura 18: Estrutura química dos compostos inibidores (**7a**), (**18a**) e (**10a**) utilizados na elaboração do modelo farmacofórico com base na sobreposição de compostos e o composto 4NEW (**27a**) utilizado como coordenadas para a estratégia de elaboração do modelo.



A validação teórica é um dos passos mais importantes no processo de elaboração do modelo farmacofórico, independentemente do método de escolha para geração do mesmo. A validação dos modelos são dependentes da qualidade dos bancos de dados estruturais (ativos e inativos) elaborados (VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

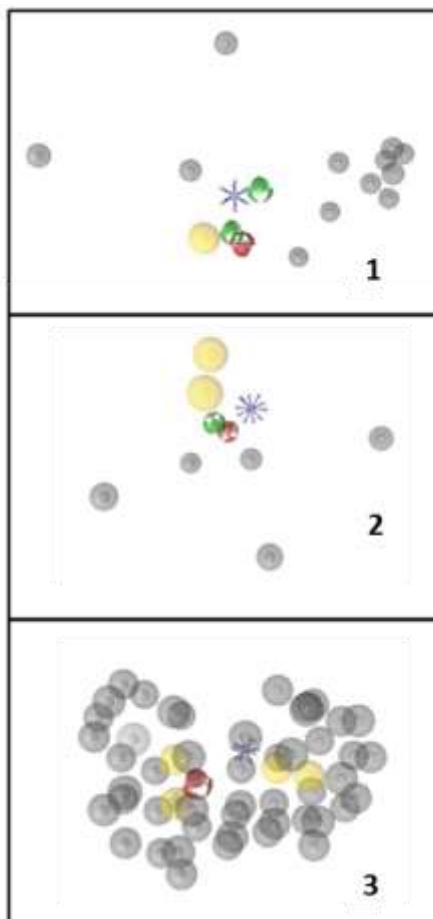
Para a construção dos conjuntos de dados estruturais foram compilados o maior número de dados encontrados no SCIFINDER e ChEMBL, com a palavra-chave “trypanothione reductase”. Foram selecionados, preferencialmente, artigos publicados compreendidos no período de 2010 a 2015, que apresentassem descrição dos ensaios *in vitro* de inibição de tripanotona redutase, que constassem informações sobre o alvo em estudo, tipo de inibição (competitiva ou não, quando possível), e valores da atividade biológica mensurada  $CI_{50}$  e/ou Ki. A partir do grande volume de informação reunida e inspeção manual minuciosa, foi possível a construção de forma confiável de dois

conjuntos de dados com os compostos considerados inibidores da enzima tripanotona redutase “os ativos” ( $CI_{50}$  e  $K_i < 15 \mu M$ ) (Figura S2, Apêndice) e os compostos considerados não inibidores da enzima “os inativos” ( $CI_{50}$  e  $K_i > 40 \mu M$ ) (Figura S3, Apêndice). Tanto os compostos encontrados como ativos quanto inativos foram separados de acordo com a origem da enzima parasitária testada: tripanotona redutase de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.* e *Trypanosoma brucei*. Ao todo foram coletados aproximadamente 512 compostos ativos frente à enzima TR, sendo que os ensaios com TR proveniente de *Trypanosoma cruzi* foram os de maior frequência, o que tornou possível a elaboração de um conjunto de dados somente com esta espécie. Os bancos de dados de compostos ativos (136 compostos, a1-a136) e dos compostos considerados inativos (189 compostos, i1-i189) quanto a capacidade de inibição da enzima tripanotona redutase de *T. cruzi* foram elaborados com um total de 37 bibliografias. Este volume de informação é responsável por uma variedade estrutural no banco de dados de compostos ativos que apresentam anéis quinolínicos, 4,5-dihidro-1H-benzo[b]azepino, piperidina, cicloheptanfuran2-ona, oxazol, indol, 1,3,4-tiadiazol, imidazol, tiofeno, oxadiazol, tiazina, naftoquinona, naftaleno1 e 4-diamina.

Os modelos criados passaram por refinamento constituído de duas etapas. Inicialmente, os compostos presentes na estrutura cristalográfica foram avaliados quanto às suas interações com o sítio ativo e características farmacofóricas (*features*) foram adicionadas ou excluídas, dependendo da presença ou ausência de grupos funcionais relevantes nas estruturas, com base na literatura avaliada, na tentativa de evitar a identificação de compostos inativos e aumentar a probabilidade de encontrar compostos ativos. As características farmacofóricas com interações de hidrogênio com os aminoácidos Glu19 e Try111 foram mantidas, devido à importância para seletividade frente à enzima glutatona redutase (BOND et al., 1999). O segundo passo foi adicionar volumes de exclusões aos modelos farmacofóricos, a fim de prevenir interação do inibidor nesses locais e a identificação de compostos inativos. De forma semelhante, o processo de refinamento com os farmacóforos baseados nos inibidores levou a características aumentadas e/ou diminuídas e adicionadas ou retiradas, a fim de melhorar o farmacóforo e aumentar a qualidade dos mesmos (VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

Ao todo foram selecionados três farmacóforos para realização da triagem virtual; dois com base em estruturas cristalográficas e um com base em inibidores (Figura 19).

Figura 19: Gráficos de modelos farmacofóricos fundamentados em estruturas cristalográficas de complexo proteína-inibidores (1-2) e um modelo embasado somente em ligantes (3).



As interações foram visualizadas por meio do programa LS da seguinte forma: aceptor de ligação de hidrogênio (esfera vermelha), doador de ligação de hidrogênio (esfera verde), característica hidrofóbica (esfera amarela), ionização positiva (asterisco roxo) e as esferas de exclusão (esfera cinza). (1) modelo 1BZL3, (2) modelo 1GXF9, (3) modeloloalignment. Fonte: Autoria própria, ilustrações obtidas através do *LigandScout*.

Os três farmacóforos apresentam características de ionização positiva (asterisco roxo), aceptor de ligação de hidrogênio (esfera vermelha) e de interação hidrofóbica (esfera amarela), variando entre a quantidade de interações hidrofóbicas, doadores de ligação de

hidrogênio (esfera verde) e esferas de exclusão (esferas cinzas). O modelo 1 apresenta um acceptor e um doador de ligação de hidrogênio referente às interações com os aminoácidos Glu19A e Try111A, respectivamente, além dos *features* adicionados durante o refinamento considerados relevantes: a presença um doador de hidrogênio, uma característica hidrofóbica, um *feature* de ionização positiva e esferas de exclusão. O modelo 2 difere do primeiro quanto ao número de características hidrofóbicas e doador de hidrogênio. As regiões hidrofóbicas estabelecidas são locais de interações que ocorrem entre os aminoácidos Met114 e Trp22, região detalhada como região de ligação da mepacrina, inibidor da TR (PERSCH et al., 2014; SARAVANAMUTHU et al., 2004). Este modelo ainda apresenta um acceptor de ligação de hidrogênio, o *feature* de ionização positiva e as esferas de exclusões. O modelo 3, elaborado com a sobreposição dos confôrmeros dos inibidores já descritos, apresenta quatro características hidrofóbicas, um acceptor de ligação de hidrogênio e um *feature* de ionização positiva. Os modelos escolhidos em conjunto foram capazes de identificar 31 dos 136 compostos ativos da quimioteca elaborada e 6 dos 189 compostos inativos (Tabela 7).

Tabela 7: Informações sobre a validação dos modelos farmacofóricos selecionados.

Modelo	1	2	3	Total
PDB	1BZL	1GXF	Modelo com base em inibidor	
Ativos encontrados (136)	10 (7%)	14 (10%)	12 (9%)	31 (23%)
Inativos encontrados (189)	4 (2%)	3 (1%)	0 (0%)	6 (3%)
EF (% max EF)*	1,7 (71%)	2,0 (83%)	2,4 (100%)	2,0 (83,33%)
Sensibilidade	0,71	0,82	1	0,83
Especificidade	0,59	0,58	0,60	0,63
AUC-ROC	0,53	0,54	0,54	0,60

\* EF: fator de enriquecimento; % max EF: porcentagem em relação ao valor máximo do fator de enriquecimento.

Os modelos foram selecionados através de análises de parâmetros descritivos como sensibilidade, especificidade, fator de enriquecimento (EF) e a área sob a curva (AUC) (*area under the curve*). O EF e a AUC foram obtidos através da curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*), a qual mostra a fração de compostos ativos *versus* a fração de compostos inativos para um dado valor de escore (valor que representa o ajuste do composto ao modelo farmacofórico), partindo-se dos compostos com melhor classificação (PICCIRILLO; AMARAL, 2018). Os três modelos farmacofóricos selecionados apresentam um

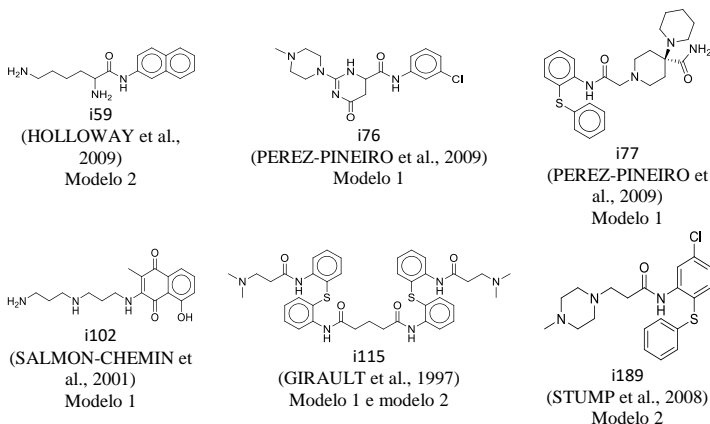
fator de enriquecimento alto, o que supõem uma boa qualidade dos mesmos.

A área sob a curva ROC fornece uma pontuação para a qualidade do modelo e representa a probabilidade de um composto ativo escolhido aleatoriamente estar melhor colocado na lista ordenada do que um composto inativo também escolhido aleatoriamente (BRAGA; ANDRADE, 2013; TRIBALLEAU et al., 2005). Esta pontuação encontra-se entre 0 e 1, assim, uma AUC-ROC de 0,5 refere-se a uma seleção aleatória (VUORINEN; SCHUSTER, 2015). Portanto, com os resultados obtidos através dos cálculos de AUC-ROC os modelos quando utilizados de forma conjunta apresentam um melhor desempenho 0,60 em encontrar um possível composto inibidor da TR.

Através de um modelo é muito difícil identificar um grande número de compostos ativos sem encontrar um grande número de inativos, ou seja aumentando a sensibilidade, conseqüentemente perde-se especificidade (VUORINEN; SCHUSTER, 2015). Assim, optou-se por utilizar três modelos, mais restritivos e que cobrem diferentes classes químicas. Os três modelos em conjuntos foram capazes de identificar mais compostos que os modelos de forma individual e de serem mais específicos (Tabela S2, Apêndice). Os 31 compostos encontrados no conjunto de ativos apresentam uma variedade estrutural contendo estruturalmente difenilsulfeto, indol, imidazol, naftoquinona e quinolina. Estes esqueletos químicos são bastante discutidos na literatura como classes de inibidores de tripanotiona redutase (BERNARDES; ZANI; CARVALHO, 2013; GALARRETA et al., 2008; PALIWAL; NARAYAN; PALIWAL, 2009; SALMON-CHEMIN et al., 2000).

Os seis compostos inativos encontrados pelos modelos (Figura 20) apresentam esqueleto químico muito semelhante aos compostos encontrados no conjunto de ativos, podendo ser este um dos motivos pelos quais se tornou difícil aumentar a sensibilidade dos modelos sem perder a especificidade.

Figura 20: Compostos inativos detectados na triagem virtual pelos respectivos modelos.



A triagem virtual foi realizada com duas quimiotecas. Uma contendo 210256 compostos comerciais (SPECS) e outra contendo 4277 compostos já obtidos pelo grupo (*inhouse*). O preparo da base de dados comercial iniciou através do *download* da base de dados SPECS (SPECS, 2015) e em seguida, elaboração da quimioteca 3-D multiconformacional no programa LS4.08. Este processo de elaboração de compostos 3D e confôrmeros também foi aplicado para a quimioteca adquirida *inhouse* (WOLBER; LANGER, 2005). O programa *LigandScout* foi implementado com OMEGA para a realização deste processo de obtenção de confôrmeros (HAWKINS et al., 2010). Foi realizada uma triagem virtual nos três farmacóforos selecionados, a partir das bases de dados preparadas, a fim de se obter uma lista de possíveis inibidores da TR *hit-list*.

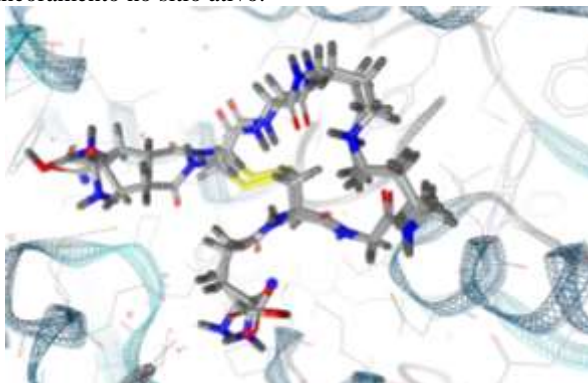
Ao final foram identificados 644 *hits* e, considerando fatores como custos e tempo para a realização dos ensaios biológicos, alguns desses *hits* foram selecionados. Os 621 compostos encontrados utilizando a base de dados SPECS, passaram por um filtro *in silico* PAINS (*Pan Assay Interference Compounds*) (NÉRON et al., 2009), pelo qual foram descartados os compostos que apresentaram estrutura química com alta probabilidade de interferirem nos ensaios biológicos e levarem a resultados falso-positivo (BAELL; HOLLOWAY, 2010). Após aplicação do filtro, 590 moléculas foram selecionadas e foram submetidas a outros critérios de seleção tais como, peso molecular (compostos com peso molecular maior que 200 Da e menor que 500 Da), números de doadores de ligação de hidrogênio (HBD) menor que 5



e número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) menor que 10. Foram descartados 28 compostos dos 590 compostos, originando uma lista de 562 compostos.

Outro filtro utilizado para a seleção dos compostos foi o ancoramento molecular. Utilizando o complexo enzima-substrato 1BZL, foi realizado estudo de ancoramento molecular dos 562 compostos no sítio ativo da enzima através do programa GOLD (versão 5.02). O método para o ancoramento molecular foi validado, considerando como resultado da reancoramento um RMSD 0,9656 (Figura 21).

Figura 21: Estrutura cristalográfica 1BZL utilizada na realização do ancoramento molecular, substrato original da enzima (tripanotiona dissulfeto) e o substrato reancoramento no sítio ativo.



Fonte: Autoria própria, ilustrações obtidas através do *LigandScout*

As estruturas selecionadas como *hits* até o momento (562 moléculas), tiveram uma primeira conformação criada através do programa “OMEGA” (HAWKINS et al., 2010), sendo assim ancoradas. Os compostos que apresentaram as melhores pontuações no ancoramento, tiveram as poses avaliadas através de uma inspeção visual no programa LS4.08.

Os compostos obtidos através da triagem virtual realizada com o banco de dados *inhouse*, também passaram pelo filtro PAINS. De 4277 compostos existentes no banco de dados virtual inicial, 23 foram selecionados pelos modelos farmacofóricos e desses, 21 compostos resistiram ao filtro PAINS. Como a quimioteca *inhouse* é composta principalmente por fármacos já conhecidos, não foi aplicado outro tipo de filtro, assim evitando descartes de compostos e gastos com a aquisição de novos, pois esses já estavam disponíveis no laboratório,

tendo assim a oportunidade de se avaliar um possível reposicionamento de fármacos. Estes 21 compostos também foram avaliados quanto a acomodação no sítio ativo da enzima, através do ancoramento molecular.

A partir das triagens virtuais com os bancos de dados *inhouse* e comercial, os compostos com melhor interação com os modelos farmacofóricos (melhor escore) foram selecionados para os ensaios enzimáticos, considerando também a avaliação visual da melhor interação no sítio ativo da enzima e a diversidade estrutural entre os compostos. O substrato e a maioria dos compostos descritos na literatura apresentam algum tipo de interação com os aminoácidos Glu19 e Tyr111 (DA ROCHA PITA et al., 2012; STUMP et al., 2008). Sendo assim, foram selecionados compostos que as melhores poses obtidas com o ancoramento molecular interagissem com um ou com os dois aminoácidos citados. Essa seleção criteriosa é necessária para tentar elevar a taxa de sucesso no processo de triagem virtual.

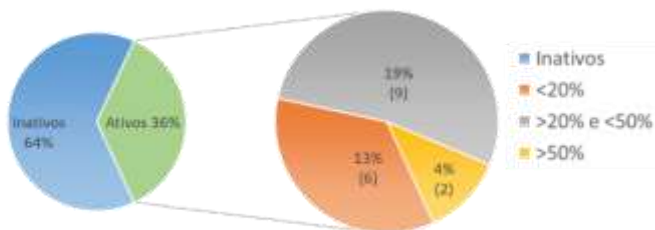
Dentre os 644 possíveis inibidores identificados pelo processo de triagem virtual para ambas as quimiotecas analisadas, um total de 47 compostos (nomeados **S1-S47**) foram selecionados para análise *in vitro*, após a aplicação dos filtros descritos. A seleção destes compostos foi feita da seguinte forma: primeiramente foi dada preferência para os compostos com melhor posicionamento e interação com o sítio ativo dentre os compostos disponíveis *inhouse*. Desta quimioteca, 14 compostos foram selecionados. Em seguida, foram selecionados mais 33 compostos da quimioteca SPECS, tendo em vista a diversidade estrutural dos compostos melhor ranqueados e a predição dos possíveis efeitos mutagênicos, tumorgênicos e irritantes dos compostos através do OSIRIS (ACTELION PHARMACEUTICALS LTD., 2014), assim como as propriedades 9. Ao todo foram selecionados 16 compostos do modelo farmacofórico 1, 22 compostos do modelo 2 (o composto **S11** foi identificado pelos modelos 1 e 2) e 10 compostos pelo modelo 3.

Uma vez selecionados, os compostos foram enviados para avaliação da atividade inibitória frente à enzima TR.

Os 47 compostos foram avaliados na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (Tabela S3, Apêndice pág 177) e, destes, 36% demonstraram interagir com a enzima tripanotiana redutase. Os compostos foram identificados sequencialmente como **S1** a **S47**. Como mostrado na figura 22 dois compostos (4%; **S21** e **S33**) demonstraram uma inibição enzimática maior que 50%. Nove compostos (19%, **S2**; **S12**; **S13**; **S1**; **S27**; **S30**; **S32**; **S37** e **S39**) foram classificados com uma atividade de inibição maior que 20% e menor que 50% (>20 e <50%) e seis compostos (13%,

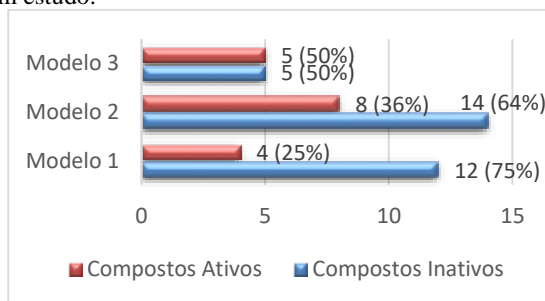
S4; S5; S15; S17; S18; S31) apresentaram uma percentagem de inibição enzimática <20%.

Figura 22: Percentagem de inibição da enzima tripanotona redutase avaliada para os compostos na concentração de 100  $\mu$ M.



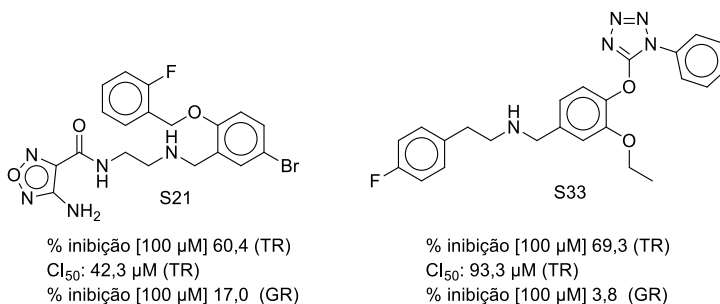
Comparando a percentagem de compostos ativos identificados para cada modelo de forma individual, o modelo 3 detectou mais compostos ativos que os demais modelos, 50% dos compostos selecionados por este modelo demonstraram inibir a enzima tripanotona redutase, seguido do modelo 2 (36% dos compostos foram ativos) e do modelo 1, com 4 compostos ativos (25%) (Figura 23). Este resultado foi obtido possivelmente pelo fato do modelo 3 ter sido o único modelo escolhido desenvolvido com base em ligantes. Os compostos utilizados para elaboração deste farmacóforo, modelo 3 (Figura 19), são potentes inibidores da enzima tripanotona redutase. Assim, possivelmente os compostos selecionados por este modelo apresentam um perfil farmacodinâmico e farmacocinético bastante semelhante aos compostos usados para a elaboração do modelo, o que pode estar justificando os bons resultados obtidos por este modelo.

Figura 23: Taxa de compostos ativos e inativos selecionado por cada modelo farmacofórico em estudo.



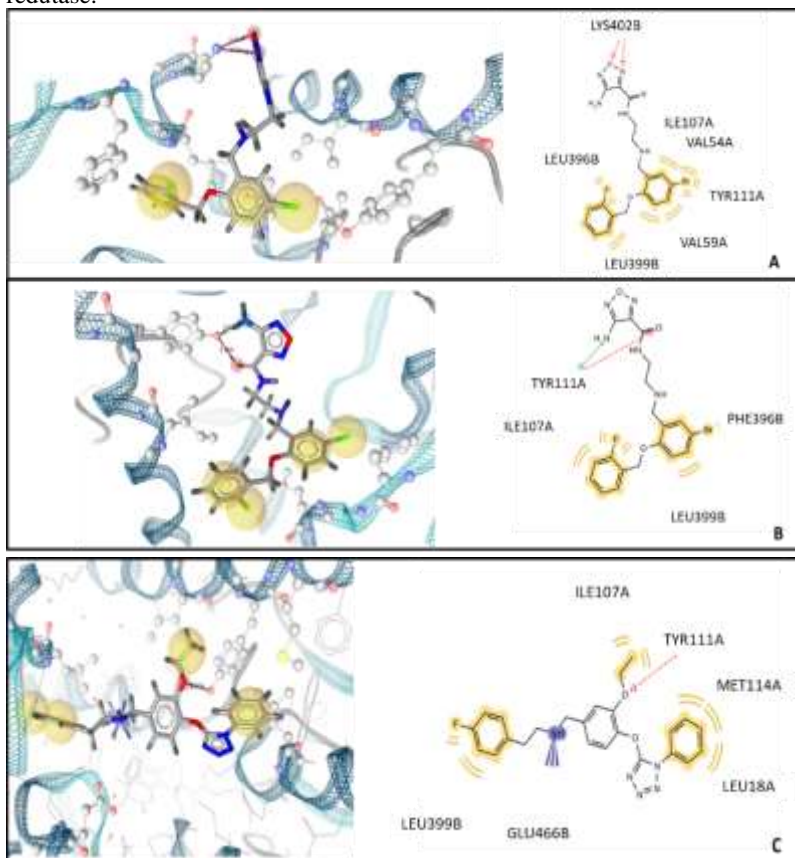
Os dois compostos mais ativos **S21** e **S33** (Figura 24), tiveram  $CI_{50}$  determinados: 42,3  $\mu\text{M}$  e 93,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A fim de se verificar a seletividade entre as duas enzimas, os compostos foram avaliados quanto à capacidade de inibição enzimática, frente à enzima glutationa redutase (GR), em concentração de 100  $\mu\text{M}$ . O composto **S21** apresentou uma porcentagem de inibição de 17,04% e o compostos **S33** 3,77%. Pode-se inferir que os compostos **S21** e **S33** são mais ativos frente a enzima parasitária do que para a enzima humana nas concentrações avaliadas.

Figura 24: Estrutura química dos compostos identificados como mais ativos, compostos **S21** e **S33**, quanto a inibição da enzima tripanotiona redutase.



Uma análise dos resultados obtidos no ancoramento molecular para os compostos, através do programa GOLD (versão 5.02) (JONES et al., 1997), forneceu a melhor conformação (pose) para esses compostos e as possíveis interações com o sítio ativo da enzima tripanotiona redutase. O composto **S21** apresentou dois presumíveis conjuntos de poses, já o composto **S33** um conjunto de poses de maior frequência. As interações observadas são provavelmente responsáveis pela atividade inibitória verificada para esses dois compostos (Figura 25).

Figura 25: As conformações de ancoramento molecular para os inibidores **S21** e **S33** sugerindo as interações com o sítio de ligação da enzima tripanotona redutase.



(A) Interações entre o primeiro conjunto de poses do composto **S21** com o sítio ativo da enzima. (B) Interação entre o segundo conjunto de pose do composto **S21** com o sítio ativo da enzima. (C). Interações entre o conjunto de pose mais representativa do composto **S33** com o sítio ativo da enzima. As interações foram visualizadas por meio do programa LS da seguinte forma: receptor de ligação de hidrogênio (HBA) (seta vermelha), doador de ligação de hidrogênio (HBD) (seta verde), característica hidrofóbica (esfera amarela) e ionização positiva (asterisco roxo). Fonte: Autoria própria, ilustrações obtidas através do *LigandScout*.

Um dos conjuntos de pose do composto **S21** parece interagir através de interações hidrofóbicas com os aminoácidos Ile107A, Val54A, Tyr111A, Val59A, Leu399B e Phe396B e com Lys402B através de ligações de hidrogênio entre oxigênio e o nitrogênio do anel oxadiazol a uma distância de 3,07 Å e 3,02 Å, respectivamente, distâncias

essas consideradas coerentes para que se ocorra esse tipo de interação (2,5Å-3,5Å) (PATRICK, 2017). A segunda família de pose, para o mesmo composto, parece ser promissora por cobrir uma parte hidrofóbica do sítio ativo, interagindo possivelmente com os aminoácidos Ile107A, Phe396B, Leu399B e através de ligação de hidrogênio entre o oxigênio da carbonila da amida e Tyr111A e entre a amina primária e Tyr111A, aminoácido que também interage com o substrato. O ancoramento do composto **S33** sugere que a conformação ativa esteja realizando interações hidrofóbicas com os aminoácidos Leu399B, Leu18A, Met114A, Tyr111A e Ile107A além de uma possível ligação de hidrogênio entre o oxigênio da etoxila e Tyr111A a uma distância de 2,63 Å. A interação iônica observada, provavelmente não ocorre, devido a distância encontrada (maior que 4 Å) entre o átomo de nitrogênio (carregado positivamente) do inibidor com a porção ácida (carregada negativamente) do aminoácido glutamato. As possíveis interações encontradas, teoricamente, abrangem aminoácidos que interagem com o substrato (Val54A, Val59A, Tyr111A e Ile107) (BOND et al., 1999), com a área conhecida por local de ligação com a mepacrina ou parede hidrofóbica (Leu18A, Met114A, Tyr111A) (JACOBY et al., 1996) e com o local Z, um bolsão hidrofóbico (Phe396B, Leu399B) (CHAN et al., 1998), o que proporciona subsídio à proposta de interação dos inibidores com a enzima. A presença da interação do compostos S33 com um dos cinco aminoácidos (Met114), presente na TR e ausente na GR, sugere a maior seletividade de ação frente à TR, uma vez que os compostos se mostraram pouco ativos para GR. Os dois compostos não demonstram interagir com o sítio catalítico da enzima, sendo uma vantagem em termos de seletividade, visto que o sítio catalítico tanto para TR como para GR são iguais (BOND et al., 1999).

Na sequência, os dois compostos mais ativos frente à inibição da enzima TR foram avaliados quanto a ação tripanocida e leishmanicida *in vitro*.

Os ensaios tripanocidas foram realizados através de método colorimétrico com formas amastigotas de *T. cruzi* Tulahuen (SCHWENDE et al., 1996). Ambos compostos foram ativos, apresentando CI<sub>50</sub> de 8,9 µM e 48,2 µM, respectivamente (Tabela 8). Uma análise de toxicidade em células THP-1 também foi realizada e verificou-se que os compostos **S21** e **S33** apresentaram índice de seletividade (IS) de 5,3 e <0,3, respectivamente, indicando a maior citotoxicidade de **S33**.

Tabela 8: Resultados do ensaio de porcentagem de inibição de crescimento parasitário, determinação do IC<sub>50</sub> em amastigotas de *T. cruzi* Tulahuen e toxicidade dos compostos **S21** e **S33** em células THP-1.

Composto	% IC <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	IS
S21	98,1 ±0,4	8,9 ±0,7	47,2 ±6,0	5,3
S33	98,5 ±0,1	48,2 ±1,5	<15,6	<0,3
Bnz	97,8 ±0,2 <sup>b</sup>	10,2 ±0,1	>500	>49,0

<sup>a</sup>Os resultados são expressos como média ± DP de um ensaio em triplicata. <sup>b</sup>Bnz: porcentagem de inibição do crescimento parasitário de amastigotas de *T. cruzi* a 20 μM. %IC: porcentagem de inibição do crescimento parasitário a 50 μM; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos; CC<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% das células THP-1; IS: índice de seletividade.

Considerando identidade (66-100%) e homologia (80-100%) entre as enzimas tripanotona redutase de *T. cruzi* e do conjunto de leishmania, (ILARI et al., 2017; KRAUTH-SIEGEL; SCHÖNECK, 1995; TAYLOR et al., 1994), os compostos **S21** e **S33** foram avaliados frente a amastigotas de *L. amazonenses*. Ambos compostos apresentaram atividade leishmanicida, com CI<sub>50</sub> de 33,1 μM (**S21**) e 54,8 μM (**S33**), sugerindo que estes compostos podem estar atuando por inibição enzimática da tripanotona redutase de *L. amazonenses* (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados do ensaio de inibição de crescimento parasitário, determinação do CI<sub>50</sub> em amastigotas de *L. amazonensis* e toxicidade dos compostos **S21** e **S33** em células THP-1.

Composto	% IC <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	IS
S21	78,3 ±0,6	33,1 ±5,3	47,2 ±6,0	1,4
S33	79,6 ±2,2	54,8 ±16,9	<15,6	<0,3
AB	96,5 ±0,6 <sup>b</sup>	0,1 ±0,0	27,9 ±1,0	279

<sup>a</sup>Os resultados são expressos como média ± DP de um ensaio em triplicata. <sup>b</sup>AB: porcentagem de inibição do crescimento parasitário de amastigotas de *L. amazonensis* a 2 μM. %IC: porcentagem de inibição do crescimento parasitário para amastigota de *L. amazonense* a 50 μM; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos; CC<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% das células THP-1; IS: índice de seletividade.

Algumas especificações como pureza e caracterização a respeito da estrutura química dos dois compostos foram adquiridas através do fornecedor SPECS. Os espectros de massas de alta resolução, para esses dois compostos, foram realizados para garantir a integridade das amostras antes dos ensaios serem realizados. O composto **S21** apresentou para o espectro de massas de alta resolução um sinal referente ao íon molecular ([M+H]<sup>+</sup>) de m/z 464,0806 para a fórmula C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>BrFN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>, indicando a fórmula molecular do composto ser C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>BrFN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>. O composto **S33** também foi analisado tendo um íon positivo ([M+H]<sup>+</sup>) de m/z 434,2064 para a fórmula C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Estes

resultados sugerem que os dados do fornecedor condizem com as amostras adquiridas e avaliadas.

Os dois compostos identificados como inibidores da enzima TR estão tendo esta atividade reportada pela primeira vez, assim como suas ações tripanocidas e leishmanicidas. Estes resultados junto à predição do possível modo de interação com a enzima TR instigaram o planejamento e a elaboração de duas séries de compostos, tendo como protótipos os compostos **S21** e **S33**. A síntese de derivados modificados se fez necessária para se tentar melhorar a ação tripanocida e leishmanicida observada, diminuir a toxicidade e aumentar a seletividade dos mesmos, permitindo assim estabelecer estudos de REA destas classes de compostos.

Durante o processo de planejamento, existe a etapa de otimização do composto líder para que se tenha um bom candidato a fármaco, esta otimização envolve algumas variáveis como potência do composto, seletividade, atividade celular, solubilidade, estabilidade metabólica, biodisponibilidade e toxicidade aceitável (MIGNANI et al., 2018). Alguns critérios devem ser considerados a fim de auxiliar a otimização do número de estruturas propostas, bem como favorecer a síntese, análise da REA e otimização dos inibidores identificados como líderes: planejar pequenas modificações, de forma que o análogo seja o mais semelhante possível ao protótipo; nos estágios iniciais do processo, considerar as propriedades químicas, físico-químicas e estruturais da molécula; variar grupos substituintes de forma a explorar a influência de parâmetros lipofílicos, eletrônicos e estéricos. Por fim, se faz necessário estabelecer metodologias de síntese orgânica simples e com tempo e custo de processo menores (MANLY et al., 2008; WERMUTH, 2015).

Neste sentido, tendo os compostos **S21** e **S33** selecionados como protótipos, a otimização molecular destes foi planejada com base nas diferentes estratégias de modificação molecular como variação de substituintes, contração de cadeias, substituição por bioisósteros, simplificação molecular, rigidez e flexibilidade da molécula. Para o planejamento dos análogos foi levada em consideração a disponibilidade de reagentes.

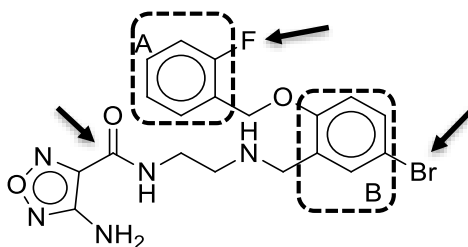
### **5.2.1 Síntese, caracterização e avaliação das propriedades moleculares dos análogos dos compostos S21 e S33**

O composto **S21** apresenta teoricamente duas possíveis conformações ativas, como observado através do ancoramento molecular descrito anteriormente. Ambas as poses apresentam os dois



anéis fenila interagindo de forma hidrofóbica com o sítio ativo da enzima. Esta porção possivelmente pode ser comparada aos compostos difenilsulfetos, já descritos como inibidores da enzima tripanotona redutase (BAILLET et al., 1996). Portanto, uma das estratégias de modificações propostas para este composto foi manter esta porção da estrutura e variar os substituintes dos anéis denominados A e B (Figura 26).

Figura 26: Representação estrutural do composto **S21** e sinalização dos possíveis locais de modificações estruturais.

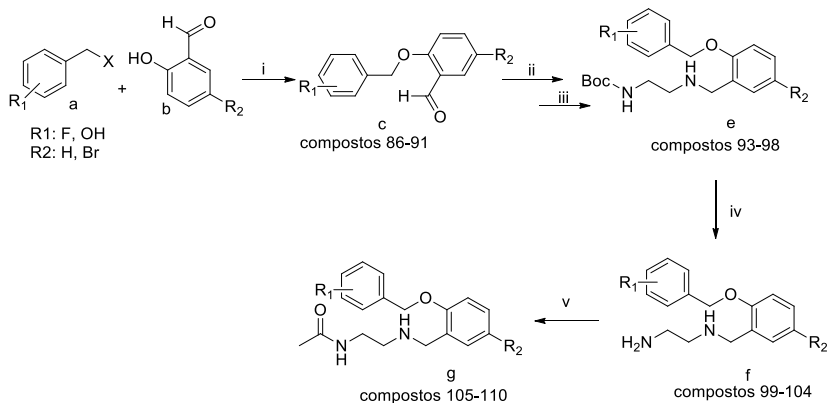


A partir do composto **S21**, foram planejados e sintetizados 12 novos derivados (compostos **93-98** Tabela 10; compostos **105-110** Tabela 11), designados derivados da **série 1**. Utilizando-se de bioesterismo como estratégia de modificação estrutural, a qual permite avaliar o efeito biológico de grupos funcionais (LIMA; BARREIRO, 2005), foram realizadas variação de posição do grupo substituinte flúor, posições *orto*, *meta* e *para* do anel A. E, no anel B, as modificações foram feitas considerando ausência ou presença de um átomo de bromo na posição *para*.

Outras modificações foram realizadas na estrutura do composto **S21**. Os resultados provenientes do ancoramento molecular para esse inibidor mostram uma possível interação entre o anel oxadiazol com a enzima TR. A fim de avaliar a importância da presença desse anel na estrutura, foram propostas alterações na cadeia lateral do esqueleto principal. A estratégia de modificação molecular aplicada consistiu na simplificação molecular desta porção do composto, sintetizando derivados carbamatos (**93-98**) e derivados acetamidas (**105-110**).

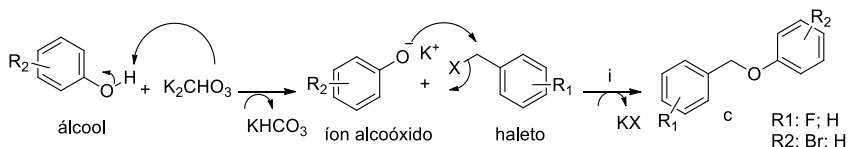
A rota sintética estabelecida para a síntese dos derivados da série 1 (Esquema 3), consistiu de cinco etapas reacionais. Inicialmente foi sintetizado um intermediário éter (**c**) a partir de produtos comercialmente adquiridos. Em seguida, foi realizada a síntese dos

compostos carbamatos **e**) e a preparação do intermediário chave com grupamento amina (**f**) para obtenção dos compostos com a presença do grupamento amida (**g**) (BOGDAL; PIELICHOWSKI; JASKOT, 1998; DAVIS; YANG; DENG, 2003; LAFRANCE et al., 2011; WANG et al., 2011).



Esquema 3: Esquema da rota sintética para obtenção dos derivados (**93-98**, **105-110**) com base no protótipo **S21**. i:  $K_2CO_3$ , MW (30 min, 70 °C e 150 W). ii: terc-butil (2-aminoetil)carbamato (d),  $CH_2Cl_2$ , peneira molecular, 30 min. iii:  $NaBH_4$ , MeOH, 30 min; iv: TFA;  $CH_2Cl_2$ , Ar, lh; v: CDI, THF, AcOH.

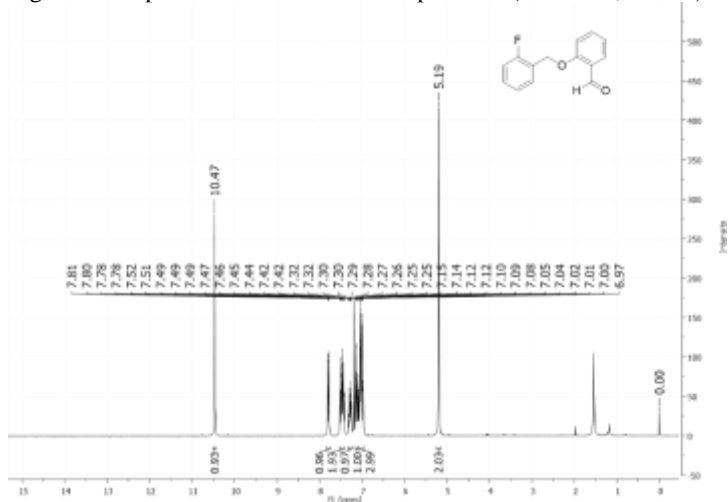
O intermediário **c** foi obtido através de uma síntese clássica para a formação de éteres simétricos e assimétricos, a reação de Williamson (BOGDAL; PIELICHOWSKI; JASKOT, 1998). A síntese de éteres de Williamson é uma reação que vem sendo empregada desde 1850, quando recebeu esse nome por seu descobridor o professor inglês Alexander Williamson (WILLIAMSON, 1850). A reação ocorre entre um halogênio e um íon alcóxido, via reação  $SN_2$  (Esquema 4) (BOGDAL; PIELICHOWSKI; JASKOT, 1998). Dentre as metodologias existentes optou-se por adaptar a metodologia já descrita por Bodgal e colaboradores (1998), a qual se fez uso do reator de micro-ondas, a fim de acelerar o tempo reacional e obter bons rendimentos. Como o íon alcóxido é bastante reativo, optou-se por sua formação *in situ*, com o uso de carbonato de potássio, e em seguida foi adicionado o haleto ao tubo de micro-ondas. A reação ocorreu sob irradiação de micro-ondas (IMO) 150 W, a 70 °C e durante 30 minutos, sendo monitorada por CCD. Ao término do tempo reacional foi realizada a purificação do composto obtido através de coluna cromatográfica.



Esquema 4: Mecanismo de reação de Williamson para a síntese dos intermediários éteres (**86-91**). i: IMO: 150W; 70 °C; 30min.

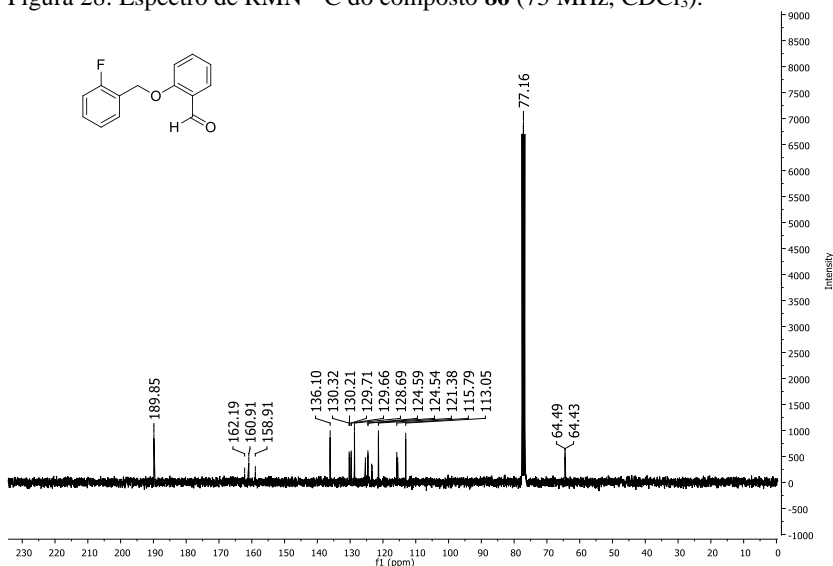
Foram sintetizados 6 intermediários éteres (compostos **86-91**) com rendimentos que variaram de 62-87%. Destes compostos, 3 compostos já são reportados na literatura (**86**, **88**, **90**) (HELLWINKEL; GÖKE, 1995). Os intermediários **87**, **89**, **91** estão sendo relatados pela primeira vez. O composto **86** foi selecionado para a descrição da caracterização destes intermediários. Este éter apresentou aspecto oleoso a temperatura ambiente e foi obtido com rendimento de 87%. A caracterização do composto **86** sintetizado foi possível por meio do espectro de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$ . No espectro de RMN  $^1H$  foi observado a presença de um simpleto em  $\delta$ 10,47 integrando para um hidrogênio, sinal esse referente ao hidrogênio do grupamento aldeído. Observou-se também, um simpleto  $\delta$  5,19 integrando para dois hidrogênios referente ao  $CH_2$  (Figura 27). Também foi verificada a presença de cinco sinais na região de hidrogênios aromáticos correspondentes aos oito hidrogênios dos anéis A e B.

Figura 27: Espectro de RMN  $^1H$  do composto **86** (300 MHz,  $CDCl_3$ )



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram observados 14 sinais de carbonos. Dois foram importantes na caracterização da estrutura: o sinal referente ao carbono do metileno que aparece como um duplete em  $\delta$  64,46 com uma constante de acoplamento  $^3J_{\text{CF}} = 4,39$  Hz (Figura 28) e o sinal em  $\delta$  189,85, referente ao carbono da carbonila do aldeído. Os dados encontrados estão de acordo com a literatura (HELLWINKEL; GÖKE, 1995).

Figura 28: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **86** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

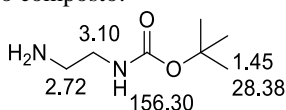


Para dar continuidade a rota de síntese proposta, para obtenção do derivado contendo a cadeia lateral diamina, foi necessário o preparo do intermediário reacional etilenodiamina monoprotetido (**92**). Dentre algumas condições reacionais aplicadas (CHADWICK et al., 2010; SCHULTE; SAITO; WÜNSCH, 2014), a de melhor rendimento foi a descrita por Gaware e Jordis, 2009 (GAWARE; JORDIS, 2009). Nesta metodologia foi utilizado iodo como catalisador e ácido trifluoracético para bloquear uma posição.

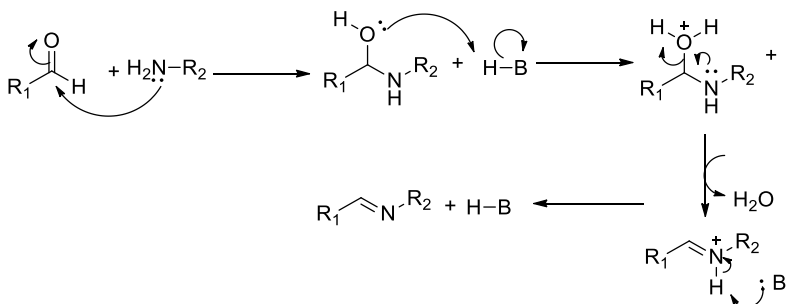
O composto **92** foi obtido com um rendimento de 54% e a estrutura confirmada por RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas de alta resolução. Observou-se a presença de um simpleto no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **92** em  $\delta$  1,45, integrando para 9 hidrogênios

correspondentes às três metilas do grupamento terc-butil do grupo protetor e a presença de dois sinais em  $\delta$  3,10 e 2,72, correspondentes aos hidrogênios metilênicos. Assim como, foi possível observar no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  um sinal em  $\delta$  156,30 referente ao carbono da carbonila e em  $\delta$  28,38 referente às metilas. As presenças desses sinais indicam que houve a proteção seletiva de uma das aminas da etilenodiamina (Figura 29). O espectro de massas de alta resolução no modo positivo de ionização, apresentou um íon molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$   $m/z$  161,1293 para fórmula  $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ , caracterizando assim a síntese do composto de fórmula molecular  $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$  estando as informações encontrados de acordo como as descritas na literatura (HOLLAND et al., 2010).

Figura 29: Estrutura química do composto **92** com representação dos principais sinais identificados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$ , os quais permitiram a caracterização do composto.



Prosseguindo a rota reacional proposta (Esquema 3), foi realizada a reação de acoplamento da cadeia lateral ao intermediário éter para a obtenção do derivado (**d**). Essa síntese ocorreu através da formação de uma base de Schiff (imina ou azometina) *in situ*, seguida de redução. O mecanismo de formação da base de Schiff consiste em um ataque nucleofílico da amina ao carbono da carbonila do aldeído, com a formação de um intermediário carbinolamina. Em seguida, ocorre a eliminação de uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  e a formação de uma ligação  $\text{N}=\text{C}$  (Esquema 5) (CIACCIA; DI STEFANO, 2015; SCHIFF, 1864).



Esquema 5: Mecanismo de formação da base de Schiff.

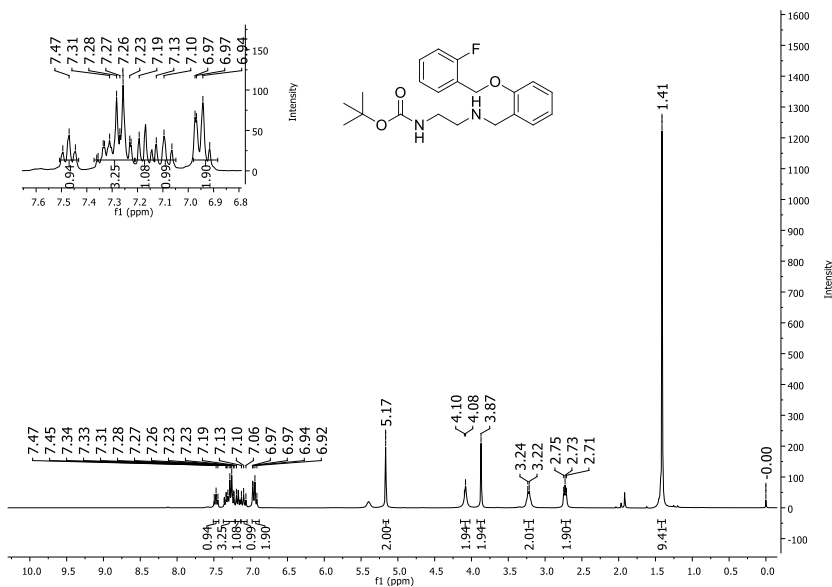
A imina foi sintetizada utilizando peneira molecular para evitar a hidrólise da ligação N=C formada e, em seguida, este intermediário passou pela aminação reductiva, utilizando como agente redutor NaBH<sub>4</sub> (WANG et al., 2011). A mistura reacional foi monitorada por CCD e o composto obtido ao final da reação foi purificado por cromatografia em coluna. Os seis compostos obtidos (**93-98**) (Tabela 10), apresentaram rendimentos variando entre 26-75%. Todos os compostos foram caracterizados através da análise de seus espectros de RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C e espectrometria de massas de alta resolução. Até o momento, não há dados publicados referentes a síntese dessas estruturas, que estão assim sendo descritos pela primeira vez.

Tabela 10: Estrutura química dos compostos (**93-98**) e rendimentos da reação de formação dos derivados carbamatos.

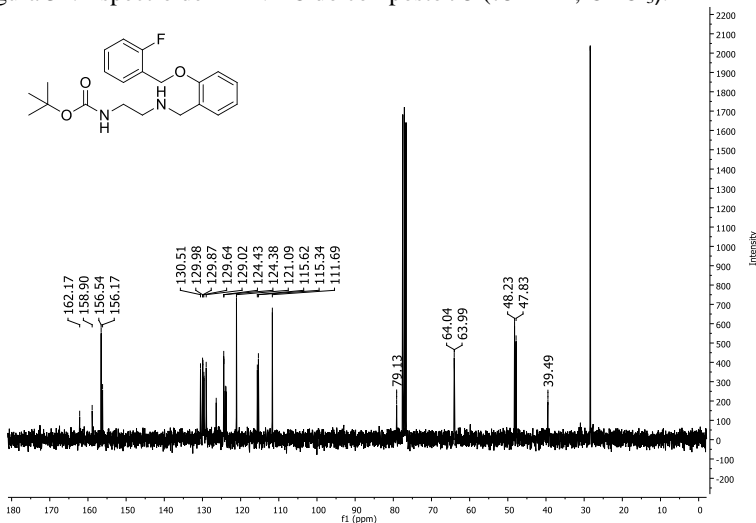
Composto	Estrutura	Rendimento
93		60%
94		26%
95		52%
96		75%
97		34%
98		40%

A fim de facilitar a leitura deste trabalho, procurou-se manter uma linha de raciocínio, selecionando o composto **93** como exemplo da caracterização estrutural destes derivados. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30) é possível notar a presença de um simpleto integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  3,87 referente ao metileno entre o anel aromático e a amina, assim como os demais sinais referentes ao acoplamento da etilenodiamina monoprotetida, como descrito anteriormente, as metilas ( $\delta$  1,41) e os metilenos entre as aminas ( $\delta$  3,23 e  $\delta$  2,73). Outro indicativo do sucesso do acoplamento é a ausência do simpleto em  $\delta$  10,47 referente ao hidrogênio do grupamento aldeído.

Figura 30: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **93** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 31) foi possível perceber a ausência do sinal referente ao carbono da carbonila do aldeído, assim como a presença de um sinal em  $\delta$  48,23, em região característica de metileno, referente ao carbono  $\text{CH}_2$  entre o anel aromático e a amina.

Figura 31: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **93** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

O espectro de massas de alta resolução em modo positivo mostrou um pico  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  375,2220 para  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{FN}_2\text{O}_3$  caracterizando o composto de fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{FN}_2\text{O}_3$ .

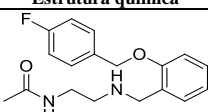
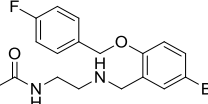
Seguindo o Esquema 3 proposto para a obtenção final do derivado amida (**g**). As aminas protegidas com o grupamento carbamato (**93-98**), foram desprotegidas em meio ácido (ácido trifluoracético), obtendo-se os compostos **99-104** (DAVIS; YANG; DENG, 2003). Estes intermediários foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e seus dados espectrais encontram-se descritos no item 4.4.2.4. A desproteção ocorreu de maneira rápida (1 hora) e com bons rendimentos (73-100%).

A ausência dos sinais correspondentes ao grupamento carbamato nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e a presença dos demais sinais correspondentes a estrutura desprotegida do composto requerido auxiliaram na caracterização das aminas (**99-104**). Os seis intermediários adquiridos estão sendo descritos pela primeira vez na literatura.

A partir dos intermediários **99-104** foram obtidos os compostos **105-110**. Primeiramente, utilizou-se para a síntese *N,N'*-carbonil-diimidazol (CDI) e ácido acético para a formação da imidazolamida. Nesta etapa houve a eliminação de imidazol e  $\text{CO}_2$  (Esquema 6). A amina (**99-104**) atua como nucleófilo atacando o carbono referente a carbonila da imidazolamida, formando o composto amida (**105-110**) e eliminando imidazol (LAFRANCE et al., 2011; WOODMAN et al., 2009).

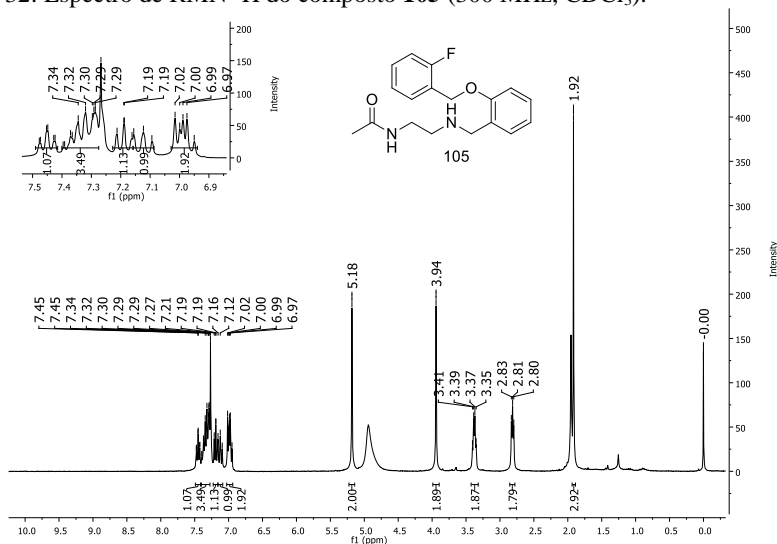




Composto	Estrutura química	Rendimento reacional
109		26%
110		13%

Todos os compostos amidas sintetizados foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas de alta resolução. Mantendo a ideia inicial, o composto **105** servirá de exemplo para a explicação de como foram caracterizados estes compostos. Através dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  do composto **105** (Figura 32) é possível identificar um simpleto em  $\delta$  1,92 integrando para 3H, referente a metila do grupo acetamida, um tripleto em  $\delta$  2,81 e um quarteto  $\delta$  3,38, ambos integrando para 2H, referentes aos metilenos da porção etilenodiamina.

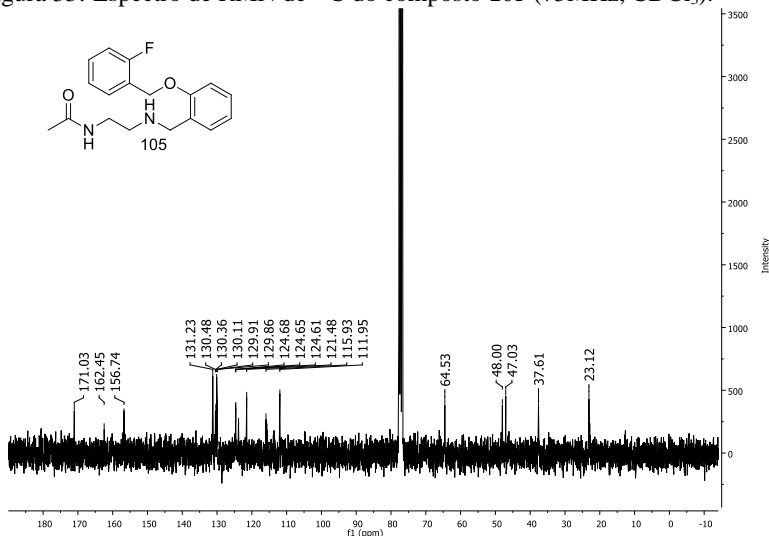
Figura 32: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **105** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **105** (Figura 33), constata-se a presença de dois sinais de carbonos não observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **99**, um sinal em  $\delta$  171,03 referente

ao carbono da carbonila da amida e outro em  $\delta$  23,12 correspondente ao carbono metílico do grupo acetamido.

Figura 33: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **105** (75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



O espectro de massas em modo positivo mostrou um pico  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  317,1712 para fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{FN}_2\text{O}_2$ . Estas informações junta às obtidas através dos espectros de RMN sugerem a síntese do composto amida de fórmula  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O}_2$ . Os demais dados referentes a caracterização dos compostos **106-110** encontram-se descritos na parte experimental (item 4.4.2.5).

Portanto, da série 1, tendo como protótipo o composto **S21**, 12 derivados foram sintetizados. As propriedades moleculares destes derivados foram calculadas através do programa *OSIRIS Datawarrior* (Tabela 12). Todos os compostos sintetizados estão dentro das regras propostas por Lipinski e Veber. A solubilidade  $\text{clogS}$ , é descritor que afeta significativamente as características *druglike* de um composto. Este parâmetro foi calculado e a maioria dos compostos estão dentro da faixa de maior frequência de fármacos que se encontram disponíveis no mercado  $\text{logS} > -5$ . Estes dados em conjunto são importantes, pois afetam significativamente o perfil de biodisponibilidade por via oral, que estão associados às características de absorção por via oral e distribuição destes compostos.

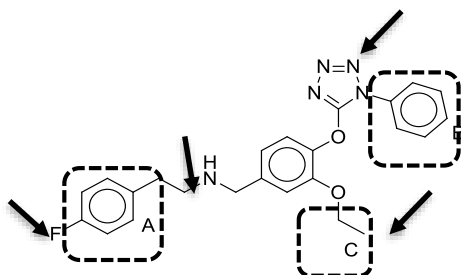
Tabela 12: Propriedades moleculares para a série 1 de derivados sintetizados com base no protótipo **S21**.

Composto	Peso molecular	cLogP	cLogS	HBA <sup>1</sup>	HBD <sup>2</sup>	PSA <sup>3</sup>	RB <sup>4</sup>
S21	464,294	2,3633	-4,086	8	3	115,3	9
93	374,454	3,3043	-4,316	5	2	59,59	10
94	453,350	4,0295	-5,15	5	2	59,59	10
95	374,454	3,3043	-4,316	5	2	59,59	10
96	453,350	4,0295	-5,15	5	2	59,59	10
97	374,454	3,3043	-4,316	5	2	59,59	10
98	453,350	4,0295	-5,15	5	2	59,59	10
105	316,375	1,9549	-3,214	4	2	50,36	8
106	395,271	2,6801	-4,048	4	2	50,36	8
107	316,375	1,9549	-3,214	4	2	50,36	8
108	395,271	2,6801	-4,048	4	2	50,36	8
109	316,375	1,9549	-3,214	4	2	50,36	8
110	395,271	2,6801	-4,048	4	2	50,36	8

<sup>1</sup>HBA: número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio. <sup>2</sup>HBD: número de átomos doadores de ligação de hidrogênio. <sup>3</sup>PSA: área de superfície polar. <sup>4</sup>RB: ligações rotacionáveis.

A série 2 teve como protótipo a estrutura do composto **S33** (Figura 33). De acordo com os dados obtidos teoricamente, este composto interage através de interações do tipo hidrofóbicas em três locais da estrutura. Com o intuito de se obter maiores informações a respeito das possíveis interações com o sítio de ligação, análogos foram planejados através de estratégias de simplificação molecular e bioisosterismo (PATRICK, 2017). As posições que passaram por variações estruturais estão destacadas na Figura 34.

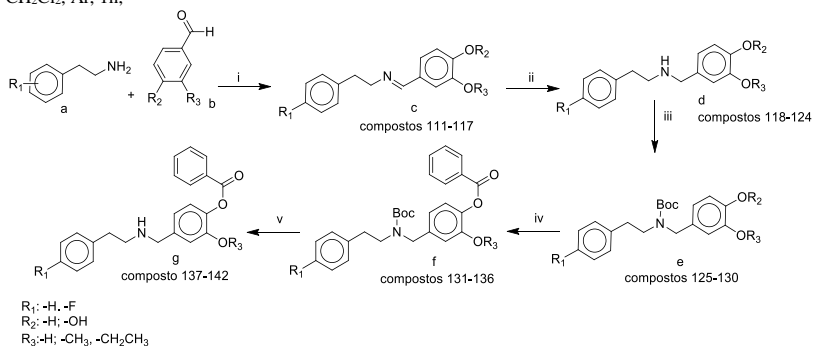
Figura 34: Representação estrutural do composto **S33** e setas sinalizam os possíveis locais de modificações estruturais, assim como os tracejados destacam os três principais locais de interação hidrofóbica (A-C).



O anel fenila designado **A** apresenta como substituinte na posição *para* um átomo de flúor que, em conformidade com dados teóricos, pode estar envolvido em interações com o sítio ativo da tripanotona redutase. A substituição deste átomo por um bioisómero, um átomo de hidrogênio, resulta em uma pequena alteração estérica, sendo uma possibilidade de novos derivados do composto **S33**. Modificações no anel tetrazol também foram planejadas. Conforme os resultados obtidos com o *docking* molecular; este anel serve possivelmente como um espaçador para a estrutura, pois não apresentou interação com o sítio ativo da enzima, sugerindo que este poderia ser alterado por um grupo rígido nessa posição que garantisse a distância necessária para a interação do anel aromático, como por exemplo um éster. O protótipo em questão (Figura 32) apresenta dois pontos racionáveis entre o anel **A** e o grupamento amina, os quais conferem flexibilidade à molécula e aumentam a possibilidade de conformações não ativas e possíveis efeitos tóxicos. Uma estratégia de simplificação molecular foi sugerida para alguns derivados deste composto, sendo diminuído o número de -CH<sub>2</sub> dessa estrutura, em uma tentativa de aumentar a probabilidade de se ter uma conformação ativa e mais seletividade.

Nesta série 2, 13 derivados (compostos **118-124**, Tabela 13; compostos **137-142**, Tabela 14) foram planejados e sintetizados. A rota sintética proposta para obtenção destes compostos, assim como para a obtenção dos derivados do composto **S21**, envolveu a formação de uma base de Schiff (**c**), seguida da aminaçã redutiva (**d**) (Esquema 7) (WANG et al., 2011). Essa amina foi protegida com o grupo protetor Boc (**e**) e, em seguida, a porção fenólica livre foi esterificada (**g**), finalizando com a desproteção do grupo carbamato (**e**) (DAVIS; YANG; DENG, 2003; DHIMITRUKA; SANTALUCIA, 2006; VISWANADHAM et al., 2017)

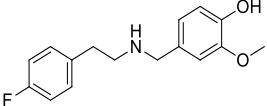
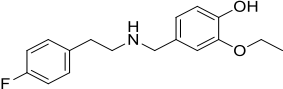
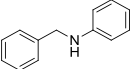
Esquema 7: Rota sintética para obtenção dos análogos do composto **S33**. i:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, peneira molecular, 1h; ii: NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 1h; iii: Boc, 80°C; iv: Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cloreto de benzoíla; v: TFA; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Ar, 1h;



A fim de se obter os compostos planejados, referidos acima, foram sintetizadas 7 aminas (Tabela 13), de complexidades diferentes através da metodologia descrita previamente (WANG et al., 2011). Estes compostos apresentaram variações estruturais dependendo da amina inicial utilizada na reação (a) e do aldeído de partida (b). Foram utilizadas três aminas como material de partida (anilina, benzilamina e 4- fluorofenetilamina) e três aldeídos (benzaldeído, vanilina e 4-hidroxi-3-etoxibenzaldeído). Os compostos (**118-124**) foram purificados através de cromatografia em coluna de sílica e obtidos com rendimentos variando de 23-93%. As estruturas químicas dos compostos foram confirmadas através de análises dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C e espectrometria de massas de alta resolução.

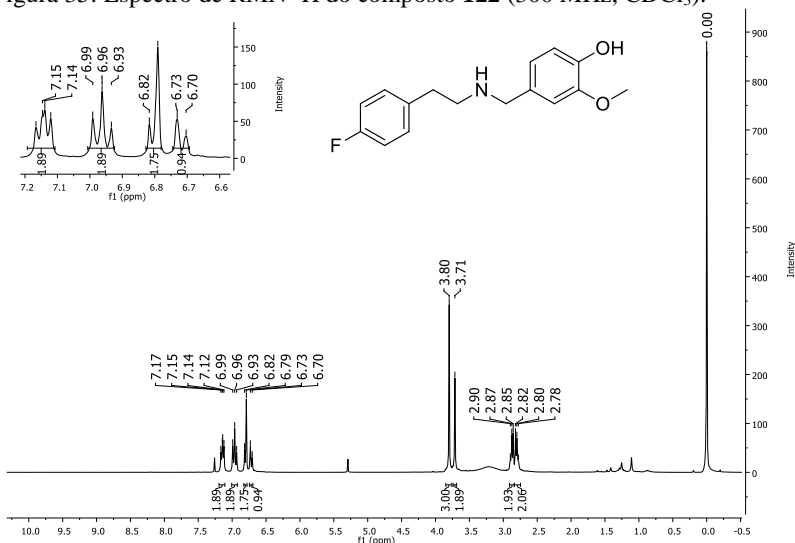
Tabela 13: Derivados aminas sintetizados (**118-124**) e rendimento.

Composto	Estrutura	Rendimento
118		34%
119		93%
120		58%
121		75%

Composto	Estrutura	Rendimento
122		66%
123		68%
124		23%

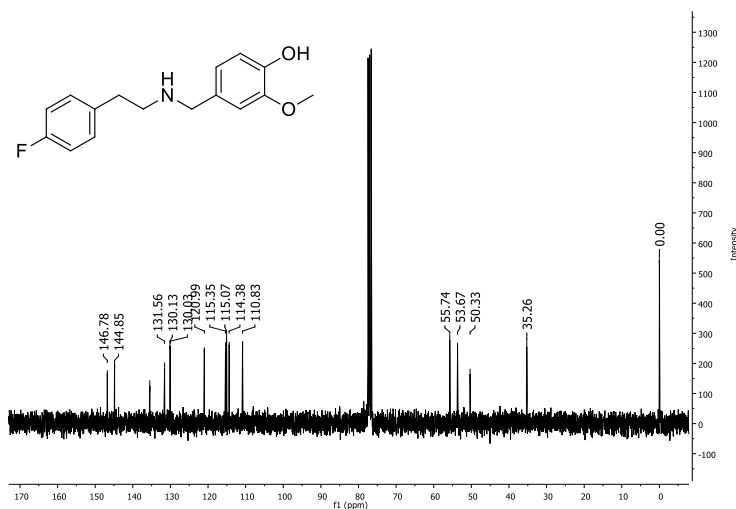
A elucidação estrutural será exemplificada, através dos dados obtidos para o composto **122**. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 35) é possível observar um simpleto integrando para 2H em  $\delta$  3,71 referente ao metileno ( $\text{H}_2\text{C-NH}$ ), formado através da ligação entre a amina e o aldeído. A presença de sete hidrogênios aromáticos, dois multipletos integrando cada um para 2H referente a porção etilamina próximos a 3 ppm e um simpleto integrando para 3H em  $\delta$  3,80 referente a metoxila.

Figura 35: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **122** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Com relação ao espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  podem ser identificados 4 sinais na região de carbonos saturados referente aos três  $\text{CH}_2$  da estrutura e à metoxila em  $\delta$  55,74 (Figura 34).

Figura 36: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **122** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



A análise do espectro de massas de alta resolução mostrou um sinal referente a molécula ionizada  $[\text{M}+\text{H}]^+$  276,1402; esse dado em associação com as informações obtidas através dos espectros de RMN permitiram a confirmação da estrutura química de fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FNO}_2$ . Dentre os derivados sintetizados 5 dos compostos encontram-se reportados na literatura (CHIGURUPATI, 2015; SCIPIONI et al., 2018; XU et al., 2016), sendo os compostos **122** e **123** descritos pela primeira vez. Os dados espectroscópicos e espectrométricos de todos os derivados sintetizados encontram-se descritos no item 4.4.3.2.

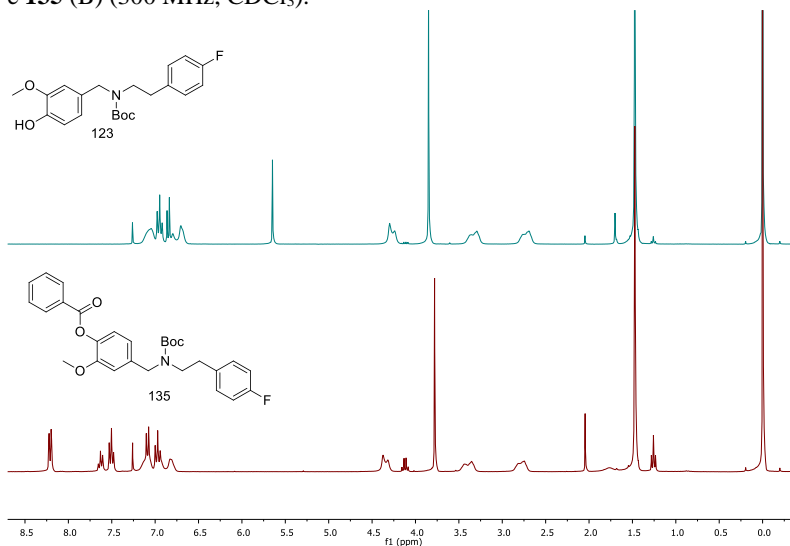
A obtenção dos intermediários N protegidos ocorreu através de uma metodologia adaptada de Viswanadham e colaboradores (2017), uma “síntese verde”, sem o uso de solventes ou catalisador. As aminas previamente sintetizadas (**118-124**), em presença de anidrido di-terc-butil ( $(\text{Boc})_2\text{O}$ ) sob aquecimento  $80\text{ }^\circ\text{C}$  durante uma hora, originaram os 6 compostos (**125-130**) sem extensas purificações e com rendimentos variando de 24-83%. Os compostos foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . No espectro RMN de  $^1\text{H}$  foi observado a presença de um simpleto integrando para 9 hidrogênios na região de átomos de hidrogênio ligados a carbono saturado ( $\delta$  0-2,0). Quanto ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , a presença de um sinal de carbono na região de carbonos



insaturados ligados a oxigênio ( $\delta$  150-200) sugere a presença da carbonila do grupamento carbamato, assim como sinais na região de carbono saturado caracterizam a presença das três metilas e em  $\delta$  80,00 um sinal sugerindo a presença de carbono quaternário, caracterizando a presença do grupamento terc-butil da estrutura. Os intermediários (**125-130**) não foram descritos na literatura até o momento e seus dados espectrais encontram-se descritos no item 4.4.3.3.

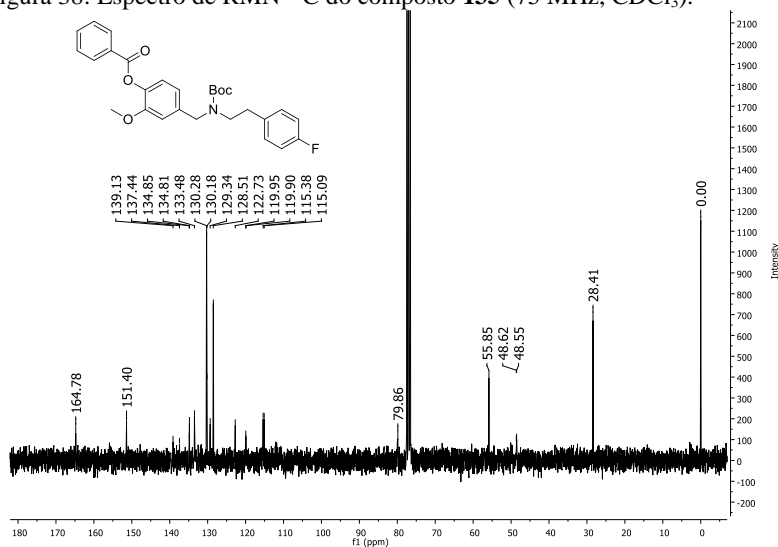
Depois da proteção da amina, realizou-se a esterificação da hidroxila fenólica. (CAREY, FRANCIS A.; SUNDBERG, 2007). Na sequência, os compostos (**125-130**) reagem com o cloreto de benzoíla na presença de trietilamina, formando os intermediários ésteres (**131-136**) que foram purificados por coluna de sílica com rendimentos que variaram de 34-79%. Tomando como exemplo a caracterização estrutural do composto **135**, quando comparado o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto de partida **123** com o do composto sintetizado **135**, pode ser observado o aparecimento de três sinais, um multipletto em 8,24 – 8,17 ppm integrando para 2H e dois tripletos um em 7,63 ppm integrando para 1H e outro em 7,50 ppm integrando para 2H, sinais esses referentes aos cinco hidrogênios do anel aromático da porção do éster inserida na estrutura do composto **123** (Figura 37).

Figura 37: Comparação entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **123** (A) e **135** (B) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **135** foi observado um novo sinal referente ao carbono  $\text{sp}^2$  do grupamento éster em  $\delta$  164,78, assim como sinais referentes aos carbonos aromáticos (Figura 38).

Figura 38: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **135** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Os intermediários (**131-136**) foram caracterizados estruturalmente através da análise de espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e os dados espectrais obtidos encontram-se descritos no item 4.4.3.4. De acordo com as pesquisas realizadas, estes seis intermediários ainda não tinham sido reportados na literatura.

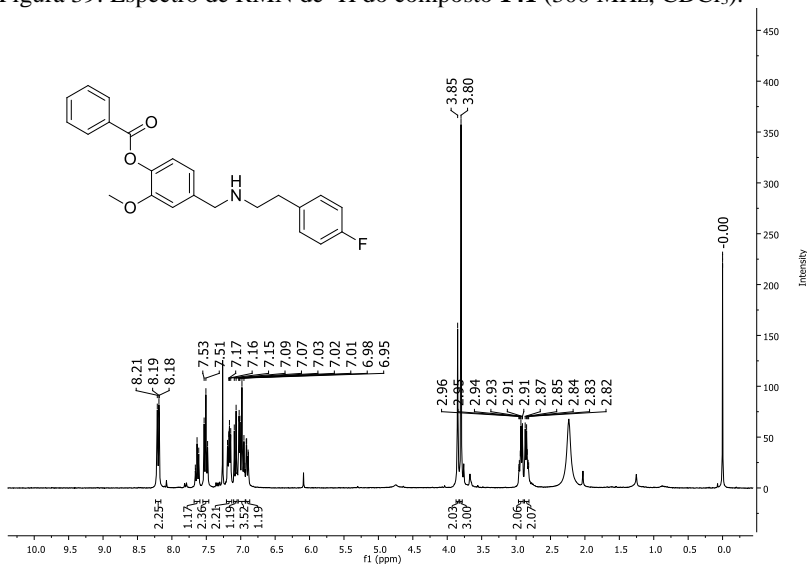
A última etapa reacional consiste na desproteção do grupamento Boc, a metodologia utilizada já foi descrita anteriormente; através de ácido trifluoroacético (DAVIS; YANG; DENG, 2003). Os produtos adquiridos após purificação por coluna de sílica gel tiveram um rendimento variando entre 53-93% (Tabela 14). Todos os 6 compostos (**137-142**) sintetizados foram caracterizados estruturalmente através de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas de alta resolução (item 4.4.3.5) e estão sendo pela primeira vez citados na literatura.

Tabela 14: Derivados aminas sintetizados e seus rendimentos.

Composto	Estrutura	Rendimento
137		82%
138		83%
139		64%
140		93%
141		53%
142		93%

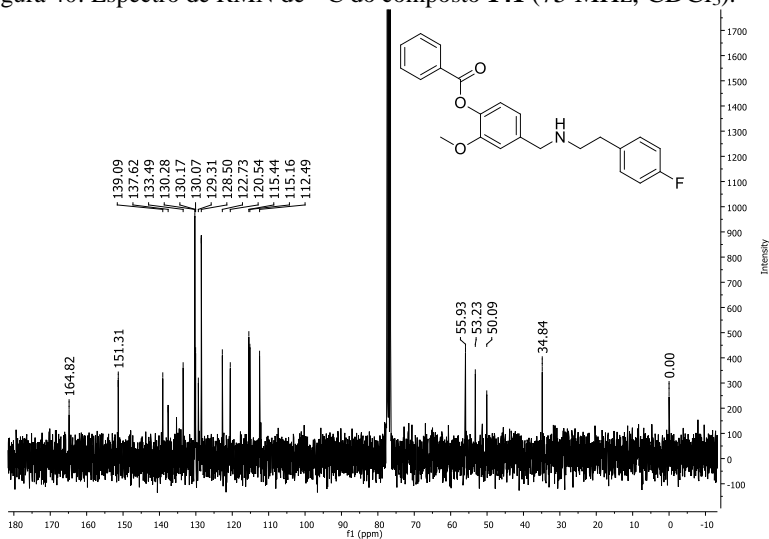
A seguir são mostrados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 39 e 40) do composto **141**, afim de se ilustrar como foi feita a caracterização estrutural destes derivados sintetizados.

Figura 39: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **141** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  pode ser observada a ausência do simpleto referente às três metilas do grupamento terc-butil.

Figura 40: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **141** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Adicionalmente, no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  nota-se a ausência do sinal referente ao carbono  $\text{sp}^2$  da carbonila do grupamento carbamato. Estes dados, junto ao pico  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  380,1668 adquirido através do espectro de massas de alta resolução caracterizam o composto de fórmula molecular  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{FNO}_3$ .

Os 13 compostos adquiridos para a série 2, tendo como protótipo o composto **S33**, também tiveram suas propriedades moleculares analisadas através do programa OSIRIS *datawarrior* (Tabela 15) (ACTELION PHARMACEUTICALS LTD., 2014). Através da avaliação dessas propriedades pode-se prever o perfil de biodisponibilidade por via oral destes compostos.

Tabela 15: Propriedades moleculares para a série 2 de compostos sintetizados com base no protótipo **S33**.

Composto	Peso molecular	cLogP	cLogS	HBA <sup>1</sup>	HBD <sup>2</sup>	PSA <sup>3</sup>	RB <sup>4</sup>
<b>S33</b>	433,486	3,965	-6,426	7	1	74,09	10
<b>118</b>	229,278	1,9216	-2,447	3	1	41,82	3
<b>119</b>	243,305	2,3279	-2,747	3	1	41,82	4
<b>120</b>	243,305	2,0184	-2,537	3	2	41,49	5
<b>121</b>	257,332	2,4247	-2,837	3	2	41,49	6
<b>122</b>	275,322	2,5493	-2,963	3	2	41,49	6
<b>123</b>	289,349	2,9556	-3,263	3	2	41,49	7
<b>124</b>	183,253	2,3373	-2,725	1	0	12,36	2
<b>137</b>	333,386	3,6978	-4,213	4	0	47,89	6
<b>138</b>	347,413	4,1041	-4,513	4	0	47,89	7
<b>139</b>	347,413	3,7946	-4,303	4	1	47,56	8
<b>140</b>	361,440	4,2009	-4,603	4	1	47,56	9
<b>141</b>	379,430	4,3255	-4,729	4	1	47,56	9
<b>142</b>	393,457	4,7318	-5,029	4	1	47,56	10

<sup>1</sup>HBA: número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio. <sup>2</sup>HBD: número de átomos doadores de ligação de hidrogênio. <sup>3</sup>PSA: área de superfície polar. <sup>4</sup>RB: ligações rotacionáveis.

Os compostos não violaram nenhuma das regras propostas por Lipinski ou por Veber (LIPINSKI, 2000; VEBER et al., 2002), o que sugere que esses compostos possivelmente terão um bom perfil de absorção e permeabilidade se administrados por via oral.

### 5.2.2 Avaliação da atividade biológica dos análogos dos protótipos S21 e S33.

Realizadas a síntese e caracterização das duas séries de análogos dos protótipos **S21** e **S33**, todos os compostos foram avaliados quanto à inibição da enzima TR de *T. cruzi*. Os compostos que apresentaram uma inibição maior que 50% foram avaliados frente à enzima glutatona redutase, a fim de conferir a seletividade frente a enzima parasitária. Visto que os protótipos **S21** e **S33** apresentaram ação tripanocida e leishmanicida, os 25 compostos foram avaliados quanto à inibição de crescimento das formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e *L. amazonenses*.

Inicialmente, os compostos foram submetidos à triagem de inibição frente à enzima tripanotona redutase, em concentração de 100µM (Tabela 16).

Tabela 16: Atividade inibitória frente a TR de *T. cruzi* dos 25 compostos sintetizados.

	Composto	% inibição [100 µM] <sup>a</sup>
Serie 1	S21	60,4 ±6,5
	93	12,7 ±1,0
	94	28,8 ±2,4
	95	45,8 ±0,7
	96	39,8 ±1,4
	97	16,2 ±2,3
	98	19,5 ±1,8
	105	21,9 ±3,6
	106	43,6 ±0,3
	107	55,7 ±4,1
	108	72,4 ±5,1
	109	55,4 ±3,4
	110	35,3 ±3,2
Serie 2	S33	69,3 ±1,9
	118	99,9 ±0,1
	119	98,9 ±0,2
	120	NA
	121	NA
	122	NA
	123	NA
	124	NA
	137	NA
	138	NA
	139	NA
	140	NA
	141	NA
142	NA	
CP	Clomipramina	73,9 ± 0,5

<sup>a</sup>Os resultados são expressos como média ± DP de triplicatas. %IC: porcentagem de inibição da enzima tripanotona redutase; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória de 50% da atividade da enzima tripanotona redutase. CP: Controle positivo clomipramina CI<sub>50</sub> 14,0 ±2,6 µM.NA: não ativo

Dos 25 compostos, 11 foram inativos, cinco compostos apresentaram valores acima de 50% de inibição da enzima tripanotona redutase, seis demonstraram valores de inibição >20% e < 50 e três tiveram uma porcentagem de inibição inferior a 20%. Destes compostos com maior porcentagem de inibição, três são análogos do composto **S21** e dois do composto **S33**.

Com relação à série 1, todos os derivados sintetizados demonstraram algum grau de interação com a enzima tripanotona redutase. É possível observar que os compostos acetamidas (**105-110**) apresentaram, de maneira geral, uma porcentagem de inibição enzimática maior do que os compostos carbamatos (**93-98**). Estes dados sugerem que o grupamento apolar terc-butil da estrutura dos carbamatos esteja impedindo estericamente a interação com o sítio de ligação da enzima TR. Outro dado observado nos resultados biológicos para essa série de compostos está relacionado aos compostos carbamatos **95** e **96**, os quais apresentaram maior porcentagem de inibição enzimática quando comparado aos demais derivados carbamatos (compostos **93**, **94**, **97** e **98**). Esses resultados sugerem que a presença de um átomo de flúor na posição *meta* do anel **A** possa estar sendo responsável por uma melhor atividade nestes dois compostos. O mesmo fato pode ser observado entre os derivados amidas da série 1. Os compostos mais ativos (compostos **107** e **108**), também apresentam um átomo de flúor na posição *meta* do anel **A**, sugerindo então que para essa nova série de compostos um átomo de flúor como substituinte nesta posição tenha uma maior influência para a atividade inibitória da enzima TR. Com relação a presença ou ausência do átomo de bromo na posição 4 do anel **B**, pode-se verificar que a maioria dos compostos com o átomo de bromo nesta posição (**94**, **98**, **106** e **108**) apresentaram uma maior porcentagem de inibição enzimática quando comparados com os derivados de mesmo esqueleto químico, porém sem a substituição no anel **B** (**93**, **97**, **105** e **107**). O composto mais ativo para esta série 1 (composto **108**) apresenta em sua estrutura um átomo de flúor na posição *meta* do anel **A** e um átomo de bromo na posição *para* do anel **B**.

No que concerne à série 2, os compostos em sua maioria foram inativos frente a inibição da enzima TR, sendo os compostos **118** e **119** os mais ativos da série. Estes dois compostos, junto ao composto **124**, são estruturalmente os mais simples da série. Ambos são formados a partir da reação da anilina com os respectivos aldeídos, benzaldeído (**124**), vanilina (**118**) e 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (**119**). A partir dessa observação pode-se sugerir que as presenças de um grupo fenol e

de um éter como substituintes no anel proveniente do aldeído se fazem necessárias para uma boa atividade de inibição enzimática.

Os cinco compostos que apresentaram uma ação inibitória maior que 50% (**107-109**, **118** e **119**) tiveram a  $CI_{50}$  determinada e foram avaliados quanto à inibição da enzima GR (Tabela 17).

Tabela 17: Atividade inibitória frente a TR de *T. cruzi* dos 5 análogos mais ativos e frente inibição GR.

	Tripanotona redutase			Glutationa redutase
	Composto	% inibição [100 $\mu$ M] <sup>a</sup>	$CI_{50}$ [ $\mu$ M] <sup>a</sup>	% inibição [100 $\mu$ M] <sup>a</sup>
Série 1	<b>S21</b>	60,4 $\pm$ 6,5	42,3 $\pm$ 8,9	17,0 $\pm$ 1,0
	<b>107</b>	55,7 $\pm$ 4,1	99,5 $\pm$ 1,1	NA
	<b>108</b>	72,4 $\pm$ 5,1	75,8 $\pm$ 9,5	NA
	<b>109</b>	55,4 $\pm$ 3,4	100,3 $\pm$ 2,5	NA
Série 2	<b>S33</b>	69,3 $\pm$ 1,9	93,3 $\pm$ 18,1	3,8 $\pm$ 1,3
	<b>118</b>	99,9 $\pm$ 0,1	14,9 $\pm$ 1,8	48,9 $\pm$ 1,2
	<b>119</b>	98,9 $\pm$ 0,2	48,1 $\pm$ 15,0	28,0 $\pm$ 0,8

<sup>a</sup>Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de triplicatase. % inibição: porcentagem de inibição da enzima a 100  $\mu$ M.  $CI_{50}$ : concentração inibitória de 50% da atividade da enzima tripanotona redutase. CP: Controle positivo clomipramina  $CI_{50}$  14,0  $\pm$  2,6  $\mu$ M. NA: não ativo.

Os compostos **107**, **108** e **109**, da série 1, apresentaram valores de  $CI_{50}$  de 99,5  $\mu$ M, 75,8  $\mu$ M e 100,3  $\mu$ M, respectivamente, porém não apresentaram potência superior à doo composto protótipo **S21**  $CI_{50}$  42,3  $\mu$ M. Todavia, os análogos **107-109** não apresentaram atividade frente à enzima glutatona redutase, diferentemente do protótipo que apresentou uma porcentagem de inibição de 17%. Esses resultados indicam que embora menos potentes que o protótipo, os compostos obtidos são mais seletivos para a enzima parasitária nas concentrações avaliadas, o que sugere diminuição de possíveis efeitos adversos.

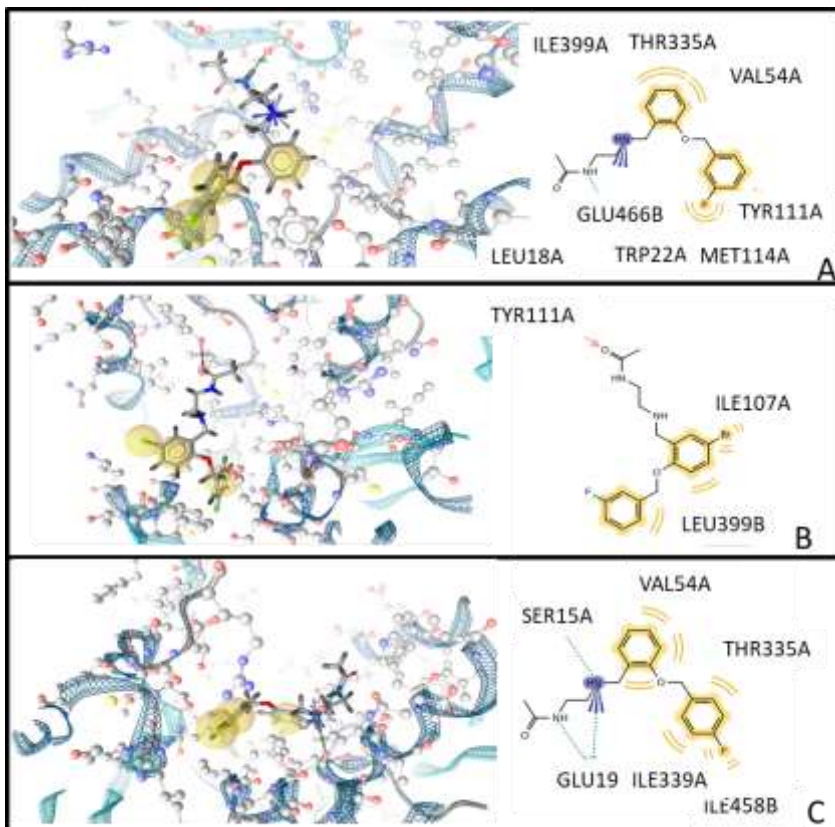
Os compostos **118** e **119** apresentaram  $CI_{50}$  14,9  $\mu$ M e 48,1  $\mu$ M, respectivamente, frente a TR. Estes dados indicam que foram os compostos mais ativos entre todos os compostos sintetizados, inclusive mais ativo que o protótipo **S33**  $CI_{50}$  93,3  $\mu$ M e o compostos **118** apresentou potência semelhante ao controle positivo clomipramina  $CI_{50}$  14,0  $\mu$ M. Embora mais ativos, os compostos **118** e **119** apresentaram respectivamente, inibição 48,9% e 28,0% para GR, indicando menor seletividade quando comparados ao protótipo **S33** (porcentagem de inibição glutatona redutase 3,8%).

Uma verificação teórica no programa GOLD (JONES et al., 1997), foi realizada a fim de se analisar as supostas interações dos compostos sintetizados que demonstraram inibir mais que 50% a enzima



tripanotiona redutase a 100  $\mu\text{M}$  (**107-109**, **118** e **119**). Os resultados obtidos através do ancoramento molecular para os compostos sintetizados da série 1 estão representados na Figura 41.

Figura 41: Principais conformações de ancoramento molecular para a série 1 compostos **107** (A), composto **108** (B) e composto **109** (C) sugerindo as possíveis interações com o sítio de ligação da enzima tripanotiona redutase.



As interações foram visualizadas por meio do programa LS da seguinte forma: receptor de ligação de hidrogênio (HBA) (seta vermelha), doador de ligação de hidrogênio (HBD) (seta verde), característica hidrofóbica (esfera amarela) e ionização positiva (asterisco roxo). Fonte: Autoria própria, ilustrações obtidas através do *LigandScout*.

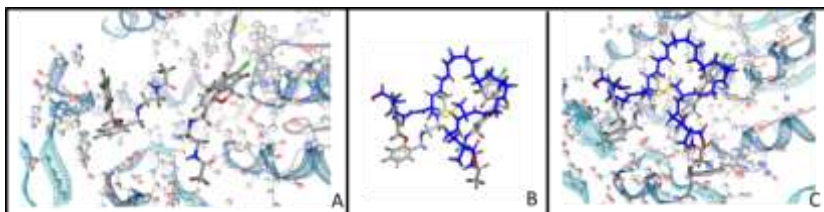
As interações observadas para o composto **107** consistem em interações hidrofóbicas com os aminoácidos Leu18A, Trp22A, Val54A, Tyr111A, Met114A, Thr335A e Ile339A e ligação de hidrogênio entre o

nitrogênio do grupamento amida com Glu466B a uma distância de 1,78 Å. O composto **108**, diferentemente do composto **107**, possivelmente interage de forma hidrofóbica com os aminoácidos Ile107A e Leu399B e através de uma interação de hidrogênio entre a carbonila da amida e o aminoácido Tyr111A a 2,65 Å. Esta diferença em locais de interação pode estar associada com a presença de um átomo de bromo na estrutura inexistente para o composto **107**. Esta hipótese é corroborada quando comparado o possível sítio de ação proposto teoricamente para o composto **109**. Pode-se notar que a pose de maior *score* para esse composto, apresenta as mesmas interações com aminoácidos que interagem com a melhor pose obtida para o composto **107**. Nenhum dos compostos apresenta em suas estruturas o átomo de bromo. Todavia, observa-se que a família de poses que mais se repete para o composto **109** (Figura 31 (C)) apresenta outra conformação no sítio ativo da enzima, interagindo de forma hidrofóbica com os aminoácidos Val54A, Thr335A, Ile339A, Ile458B, estabelecendo interação de hidrogênio com o nitrogênio da amida e o aminoácido Glu19A a uma distância de 2,08 Å e entre o nitrogênio da amina e o aminoácido Ser15A, a 2,37 Å.

Os dois locais propostos como locais de interação para estes compostos, são os mesmos observados para as duas melhores poses propostas para o composto protótipo **S21**, assim como com porções do sítio ativo já descrito por interagirem com diferentes inibidores e substrato (EBERLE et al., 2009; SARAVANAMUTHU et al., 2004; STUMP et al., 2008). Com relação aos resultados expostos, foram observados dois locais de ação para os compostos amidas, e tendo em vista que a enzima TR apresenta um sítio ativo muito grande, amplo e que seu substrato tripanotona tem um peso molecular de quase duas vezes dos compostos propostos (PM= 721,854) (PERSCH et al., 2014), os compostos da série 1 podem estar atuando simultaneamente com duas moléculas no sítio ativo da enzima. Fato semelhante acontece com inibidores da enzima TR derivados de quinacrina. A estrutura cristalográfica (PDB 1GXF) mostra a presença de duas moléculas de quinacrina mostarda no sítio ativo da enzima tripanotona redutase (SARAVANAMUTHU et al., 2004). Quando elaborado um exemplo hipotético, com base nas conformações teóricas de maior score obtidas para **107** (Figura 40), utilizando duas estruturas no mesmo sítio ativo, observa-se que esses compostos interagem com os aminoácidos Leu18A, Trp22A, Val54A, Tyr111A, Met114A, Thr335A e Ile339A, Leu399B e Glu466B, interagindo com a maioria dos aminoácidos propostos para os dois inibidores derivados de quinacrina (Leu18A,

Ser15A, Glu19A, Trp22A, Ser110A, Tyr111A, Glu113A, Met114A, Ile339A) (SARAVANAMUTHU et al., 2004). Nota-se ainda que, quando sobreposto o substrato da enzima, tripanotona dissulfeto, a esse exemplo hipotético, os espaços ocupados são muito semelhantes, incluindo semelhança estrutural, grupos funcionais amidas (Figura 42). Dos nove aminoácidos do sítio ativo da enzima que supostamente interagiriam com o exemplo hipotético mencionado, 8 deles coincidem com aminoácidos que interagem com o substrato natural da enzima (Leu18A, Ser15A, Glu19A, Trp22A, Ser110A, Tyr111A, Glu113A, Ile339A), informações essas que defendem a hipótese proposta da possível existência de duas moléculas atuantes no sítio ativo da enzima. Adicionalmente, os estudos *in silico* mostraram que os compostos da série 1 apresentam interação com o aminoácido Glu19, Trp22 e Met114, as quais podem estar conferindo maior seletividade para a inibição da enzima TR, visto que são alguns dos aminoácidos presentes em TR e ausentes em GR.

Figura 42: Exemplo hipotético obtido através do programa LS da ocupação do sítio ativo por duas moléculas do composto **107**.

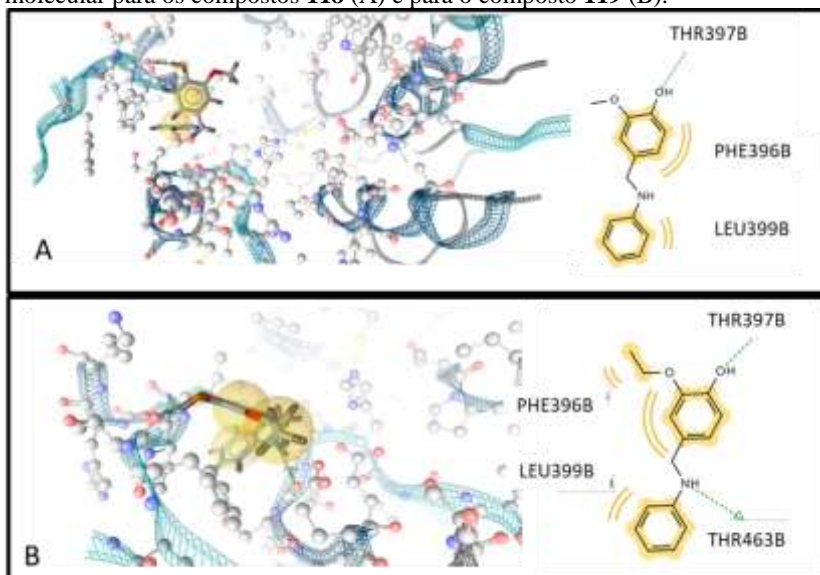


(A) Duas estruturas do composto **107** ocupando o sítio ativo da enzima tripanotona reductase. (B) Sobreposição do substrato da enzima às duas estruturas do composto **107**. (C) Sobreposição do substrato da enzima às duas estruturas do composto **107** no sítio ativo da enzima. Fonte: Autoria própria, ilustrações obtidas através do *LigandScout*.

Com relação aos compostos da série 2, os resultados obtidos para as supostas interações dos compostos **118** e **119** com o sítio ativo da TR estão mostrados na Figura 43. O composto **118** realiza interações do tipo hidrofóbica com os aminoácidos Phe396B, Leu399B e através de ligações de hidrogênio entre a hidroxila fenólica e o aminoácido Thr397B a 2,08 Å. Assim como **118**, o composto **119** parece interagir de forma hidrofóbica com os aminoácidos Phe396B e Leu399B e através de interação de hidrogênio com Thr397B (1,78 Å) e com Thr463B (2,18 Å). Este suposto local de interação para estes derivados é conhecido como local Z (Phe396B, Pro398B e Leu399B), uma região hidrofóbica,

que acomoda inibidores tricíclicos, já descritos como inibidores para esta enzima parasitária. Analisado as estruturas dos compostos tricíclicos inibidores de TR e dos derivados sintetizados, ambos grupos compartilham uma grande porção hidrofóbica o que possivelmente justifica seu suposto local de ação (KRAUTH-SIEGEL; INHOFF, 2003b; PERSCH et al., 2014).

Figura 43: As principais famílias de poses obtidas através de ancoramento molecular para os compostos **118** (A) e para o composto **119** (B).



As interações foram visualizadas por meio do programa LS da seguinte forma: aceptor de ligação de hidrogênio (HBA) (seta vermelha), doador de ligação de hidrogênio (HBD) (seta verde) e característica hidrofóbica (esfera amarela). Fonte: Autoria própria, ilustrações obtidas através do *LigandScout*.

Considerando que os protótipos **S21** e **S33** apresentaram atividades tripanocida e leishmanicida, os 25 análogos foram submetidos à triagem biológica em amastigotas de *T. cruzi* e *Leishmania amazonensis*, na concentração de 50  $\mu\text{M}$ .

Os resultados obtidos para os ensaios são descritos separadamente para cada série (série 1 e série 2).

Com relação aos resultados obtidos para a triagem da série 1, com exceção dos compostos **105**, **107** e **109**, os compostos inibiram o crescimento de *T. cruzi* acima de 70% e tiveram o  $\text{CI}_{50}$  determinado (Tabela 18). Dentre os análogos, o composto **94** demonstrou ser o mais ativo, apresentando  $\text{CI}_{50}$  11,4  $\mu\text{M}$ , próximo ao benznidazol ( $\text{CI}_{50}$  10,2

$\mu\text{M}$ ). Os compostos também foram avaliados quanto à toxicidade frente às células THP1. Nota-se que os compostos carbamatos (**93-98**) demonstraram valores de  $\text{CC}_{50}$  inferiores aos derivados amidas (**105-110**). Pode-se dizer ainda que, comparando os análogos que possuem variação na presença de bromo, a ausência deste grupo diminui a toxicidade (ex. composto **93**;  $\text{CC}_{50}$  45,5  $\mu\text{M}$  e **94**;  $\text{CC}_{50}$  30,3  $\mu\text{M}$ ). Embora tenham obtido índices de seletividade inferiores ao composto **S21**, os derivados planejados, na grande maioria demonstraram ser menos tóxicos que o composto protótipo.

Não foi possível estabelecer uma correlação dos resultados obtidos quanto à inibição da enzima tripanotona redutase com a atividade *in vitro* nas formas amastigotas, o que sugere que esses compostos possam estar atuando, além da inibição enzimática, por outro mecanismo de ação.

Tabela 18: Atividade tripanocida dos compostos da série 1, a 50  $\mu\text{M}$ , frente a forma amastigota de *T. cruzi*

Compostos	Ensaio <i>T. cruzi</i>		Ensaio THP1	IS
	% IC [50 $\mu\text{M}$ ]	CI <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	CC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	
<b>S21</b>	98,1 $\pm$ 0,4	8,9 $\pm$ 0,7	47,2 $\pm$ 6,0	5,3
<b>93</b>	98,9 $\pm$ 0,4	48,5 $\pm$ 0,3	45,5 $\pm$ 7,8	0,9
<b>94</b>	97,8 $\pm$ 0,2	11,4 $\pm$ 0,3	30,3 $\pm$ 0,5	2,6
<b>95</b>	98,4 $\pm$ 0,1	32,4 $\pm$ 2,2	62,7 $\pm$ 5,7	1,9
<b>96</b>	98,8 $\pm$ 0,0	47,3 $\pm$ 1,9	30,9 $\pm$ 0,7	0,6
<b>97</b>	99,3 $\pm$ 0,1	27,2 $\pm$ 0,7	54,4 $\pm$ 6,3	2,00
<b>98</b>	99,5 $\pm$ 0,2	40,3 $\pm$ 2,0	43,3 $\pm$ 6,0	1,1
<b>105</b>	17,8 $\pm$ 0,9	ND	>500	-
<b>106</b>	96,2 $\pm$ 1,8	23,0 $\pm$ 1,5	69,8 $\pm$ 4,8	3,0
<b>107</b>	5,8 $\pm$ 0,9	ND	159,5 $\pm$ 8,5	-
<b>108</b>	99,2 $\pm$ 0,3	45,8	73,2 $\pm$ 7,1	1,6
<b>109</b>	49,3 $\pm$ 4,7	ND	285,4 $\pm$ 12,6	-
<b>110</b>	92,73 $\pm$ 0,1	34,6 $\pm$ 3,1	89,5 $\pm$ 12,7	2,6
Benznidazol	97,8 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	10,2 $\pm$ 0,1	>500	>49,0

<sup>a</sup>Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de um ensaio em triplicata. <sup>b</sup>Benznidazol: porcentagem de inibição do crescimento parasitário de amastigotas de *T. cruzi* a 20  $\mu\text{M}$ . %IC: porcentagem de inibição do crescimento parasitário a 50  $\mu\text{M}$ ; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos; CC<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% das células THP-1; IS: índice de seletividade. ND: não determinado.

Todos os compostos da série 1, quando avaliados frente à porcentagem de inibição de crescimento parasitário para amastigotas de *L. amazonensis* a 50  $\mu\text{M}$ , demonstraram estar inibindo em algum grau o crescimento parasitário (Tabela 19). Observa-se que para essa espécie parasitária os compostos carbamatos (**93-98**) são mais ativos que os derivados amidas (**105-110**). Pode-se notar ainda que a maioria dos compostos apresentaram porcentagem de inibição de crescimento parasitário equivalente ou maior que o composto **S21**. Os compostos

com porcentagem de inibição superiores a 50% tiveram seus valores de  $CI_{50}$  determinados. Os derivados **93**, **94**, **96**, **98**, **106** e **108** com  $CI_{50}$  12,2  $\mu$ M, 23,7  $\mu$ M, 19,7  $\mu$ M, 15,2 $\mu$ M, 30,9  $\mu$ M e 19,7  $\mu$ M respectivamente, demonstraram ser mais ativos que o protótipo **S21** ( $CI_{50}$  33,1  $\mu$ M) e a maioria foram mais seletivos. Dentre os derivados amidas os compostos **106** e **108**, possuidores de um átomo de flúor no anel A na posição 2 e na posição 3 respectivamente, foram os que apresentaram melhor atividade leishmanicida. O carbamato **93** foi o composto mais potente desta série 1 quanto à ação leishmanicida, com um  $CI_{50}$  de 12,2  $\mu$ M.

Tabela 19: Atividade leishmanicida dos compostos da série 1 a 50  $\mu$ M frente a forma amastigota de *L. amazonensis*.

Compostos	Ensaio <i>L. amazonensis</i>		Ensaio THP1	IS
	% IC [50 $\mu$ M] <sup>a</sup>	$CI_{50}$ [ $\mu$ M] <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] <sup>a</sup>	
<b>S21</b>	78,3 $\pm$ 0,6	33,1 $\pm$ 5,3	47,2 $\pm$ 6,0	1,4
<b>93</b>	79,4 $\pm$ 2,2	12,2 $\pm$ 2,3	45,5 $\pm$ 7,8	3,7
<b>94</b>	77,0 $\pm$ 0,7	23,7 $\pm$ 5,8	30,3 $\pm$ 0,5	1,3
<b>95</b>	83,3 $\pm$ 0,7	44,1 $\pm$ 5,0	62,7 $\pm$ 5,7	1,4
<b>96</b>	78,9 $\pm$ 2,0	19,7 $\pm$ 2,3	30,9 $\pm$ 0,7	1,6
<b>97</b>	84,2 $\pm$ 1,7	41,4 $\pm$ 1,2	54,4 $\pm$ 6,3	1,3
<b>98</b>	83,5 $\pm$ 0,7	15,2 $\pm$ 3,7	43,3 $\pm$ 6,0	2,9
<b>105</b>	8,6 $\pm$ 1,3	ND	>500	-
<b>106</b>	78,5 $\pm$ 3,5	30,9 $\pm$ 3,9	69,8 $\pm$ 4,8	2,3
<b>107</b>	4,1 $\pm$ 0,9	ND	159,5 $\pm$ 8,5	-
<b>108</b>	76,7 $\pm$ 2,5	23,9 $\pm$ 5,8	73,2 $\pm$ 7,1	3,1
<b>109</b>	24,2 $\pm$ 2,5	ND	285,4 $\pm$ 12,6	-
<b>110</b>	20,4 $\pm$ 1,5	ND	89,5 $\pm$ 12,7	-
<b>AB</b>	97,0 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	0,1 $\pm$ 0,0	27,9 $\pm$ 1,0	279

<sup>a</sup>Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de um ensaio em triplicata. <sup>b</sup>AB: porcentagem de inibição do crescimento parasitário de amastigotas de *L. amazonensis* a 2  $\mu$ M. %IC: porcentagem de inibição do crescimento parasitário a 50  $\mu$ M;  $CI_{50}$ : concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos; CC<sub>50</sub>: concentração inibitória do crescimento de 50% das células THP-1; IS: índice de seletividade; ND: não determinado.

Por outro lado, os análogos da série 2 não apresentaram atividades promissoras, o que pode ser observado na Tabela 20. A maioria dos compostos apresentaram baixa inibição do crescimento parasitário, tanto para atividade tripanocida quanto leishmanicida, já que seus valores de  $CI_{50}$  foram superiores a 50  $\mu$ M em todos os casos. O composto protótipo **S33** demonstrou ser mais ativo do que os derivados avaliados, ainda que os compostos **118** e **119** terem sido mais potentes frente a inibição TR.

Tabela 20: Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida em amastigotas de *T. cruzi* e *L. amazonensis* para a série 2.

Compostos	Ensaio <i>T. cruzi</i> % IC [50 $\mu$ M] <sup>a</sup>	Ensaio <i>L. amazonensis</i> % IC [50 $\mu$ M] <sup>a</sup>
<b>S33</b>	98,5 $\pm$ 0,1	79,7 $\pm$ 2,2
<b>118</b>	2,1 $\pm$ 0,2	6,8 $\pm$ 0,1
<b>119</b>	3,3 $\pm$ 0,1	NA
<b>120</b>	1,3 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 0,8
<b>121</b>	8,9 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 0,3
<b>122</b>	NA	7,1 $\pm$ 0,5
<b>123</b>	NA	5,7 $\pm$ 0,5
<b>124</b>	2,1 $\pm$ 0,8	4,7 $\pm$ 1,0
<b>137</b>	NA	NA
<b>138</b>	1,4 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,6
<b>139</b>	2,8 $\pm$ 0,6	NA
<b>140</b>	16,6 $\pm$ 1,2	6,8 $\pm$ 1,6
<b>141</b>	46,0 $\pm$ 4,2	15,5 $\pm$ 1,4
<b>142</b>	4,5 $\pm$ 0,29	4,6 $\pm$ 0,1
<b>Benznidazol</b>	98,3 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	-
<b>Anfotericina</b>	-	97,0 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de um ensaio em triplicata. <sup>b</sup>Benznidazol: porcentagem de inibição do crescimento parasitário de amastigotas de *T. cruzi* a 20  $\mu$ M. <sup>c</sup>Anfotericina: porcentagem de inibição do crescimento parasitário de amastigotas de *L. amazonensis* a 2  $\mu$ M. %IC: porcentagem de inibição de crescimento parasitário. NA: não ativo.





## 6 CONCLUSÕES

- Um conjunto de 42 compostos bis-heterociclos, obtidos no grupo de trabalho, estruturalmente similar às neolignananas de origem natural (grandisina **38** veraguensina **39**), foi avaliado *in vitro* quanto às atividades tripanocida e leishmanicida. Foi observada a atividade tripanocida promissora para oito deles (compostos **47**, **49**, **62**, **63**, **65**, **66**, **67** e **68**) com  $CI_{50}$  ente 88,4 $\mu$ M a 12,2 $\mu$ M;

- O 3-(3,4-dimetoxifenil)-5-((4-(4-pentilfenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)isoxazol **68** ( $CI_{50}$  12,2  $\mu$ M) foi o mais ativo da série, apresentando nos ensaios *in vitro* potência semelhante ao benznidazol e baixa toxicidade;

- Com os resultados obtidos, foi possível estabelecer uma relação entre a estrutura e atividade tripanocida, reforçada pelo modelo gerado utilizando descritores GRIND, indicando a importância da presença de grupos volumosos e hidrofóbicos nos anéis **A** e **D**.

- Na abordagem visando o planejamento e a obtenção de novos inibidores da TR, através de modelagem molecular foram elaborados três modelos e validados, teoricamente e experimentalmente;

- Através do acoplamento de técnicas computacionais (triagem virtual e ancoramento molecular) duas bibliotecas virtuais de compostos foram utilizadas para a triagem virtual, resultando na seleção de 47 compostos potencialmente ativos, dos quais 17 mostraram inibir a enzima experimentalmente. Destes, os compostos 4-amino-N-(2-((5-bromo-2-((2-fluorobenzil)oxi)benzil)amino)etil)-1,2,5-oxadiazol-3-carboxamida (**S21**) e N-(3-etoxi-4-((1-fenil-1H-tetrazol-5-il)oxi)benzil)-2-(4-fluorofenil)etanamina (**S33**) apresentaram atividade inibitória da TR, bem como atividades tripanocida e leishmanicida *in vitro*, atividades essas não descritas na literatura;

- Com base na estrutura dos protótipos (**S21** e **S33**), 25 compostos foram planejados, sintetizados e caracterizados, 19 dos quais estão sendo descritos na literatura pela primeira vez;

- Os 12 compostos da série análoga ao composto **S21** (série **1**) apresentaram algum grau de atividade de inibição da TR, enquanto entre análogos do composto **S33** (série **2**), foi observado atividade para dois compostos (**118** e **119**);

- Os análogos da série **1**, **107**, **108** e **109**, inibiram a enzima TR. Embora não tenham sido mais potentes que o protótipo **S21**, não apresentaram atividade frente à GR, demonstrando maior seletividade.

Por meio de estudos de ancoramento molecular, foi possível propor uma hipótese de interação entre esses derivados amidas e o sítio ativo da enzima, a qual parece envolver duas unidades estruturais destes derivados no sítio ativo da enzima;

- Os análogos da série 2, **118** e **119**, agem provavelmente em uma porção hidrofóbica da enzima tripanotiona redutase e, embora sejam bons inibidores da mesma, demonstraram inibir também a glutationa redutase. De forma geral, de acordo com o ancoramento molecular, esses análogos atuam supostamente em regiões do sítio ativo da enzima já bem estabelecidas, em s que também interagem o substrato natural da enzima ou inibidores, como inibidores tricíclicos;

- Os compostos provenientes da série 1 apresentaram maior atividade tripanocida e leishmanicida, nos ensaios *in vitro*, maiores que os compostos da série 2, ainda que os análogos **118** e **119** tenham sido os melhores inibidores da enzima TR;

- Para os compostos avaliados não foi possível estabelecer uma correlação entre a atividade enzimática e a inibição de crescimento parasitário, o que indica que a TR provavelmente não é o único alvo de ação destes derivados;

- O composto **94** demonstrou ser o mais ativo tripanocida, com  $CI_{50}$  11,4  $\mu M$ , resultado semelhante ao fármaco disponível comercialmente, benznidazol ( $CI_{50}$  10,2  $\mu M$ );

- Os derivados **93**, **94**, **96**, **98**, **106** e **108** com  $CI_{50}$  12,2  $\mu M$ , 23,7  $\mu M$ , 19,7  $\mu M$ , 15,2  $\mu M$ , 30,9  $\mu M$  e 19,7  $\mu M$  respectivamente, apresentaram melhor atividade leishmanicida que o protótipo **S21** ( $IC_{50}$  33,1  $\mu M$ ) e, de modo geral, menor citotoxicidade frente às células THP1.

- Os resultados obtidos por ambas as estratégias de identificação de compostos ativos contribuíram para a identificação de novos esqueletos químicos considerados promissores para o planejamento de compostos antitripanossomatídeos.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, D. J. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. Sixth Edit ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

ACTELION PHARMACEUTICALS LTD. **Organic Chemistry Portal. OSIRIS Property Explorer**. Disponível em: <<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>>.

ARGOLO, A. M. et al. **A Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

ARMAREGO, W. L. F. Purification of Laboratory Chemicals. In: ARMAREGO, W. L. F. (Ed.). **Purification of Laboratory Chemicals**. Eighth Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 1198.

BAELL, J. B.; HOLLOWAY, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2719–2740, 2010.

BAILEY, S. et al. Substrate interactions between trypanothione reductase and N1-glutathionylspermidine disulphide at 0.28-nm resolution. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 213, n. 1, p. 67–75, 1993.

BAILLET, S. et al. 2-Amino diphenylsulfides as inhibitors of trypanothione reductase: Modification of the side chain. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 891–899, 1996.

BAIOCCO, P. et al. Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2603–2612, 2009.

BAIOCCO, P. et al. Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase. **Molecular Biology**, p. 230–233, 2011.

BAIOCCO, P. et al. Inhibition of Leishmania infantum trypanothione reductase by azole-based compounds: A comparative analysis with its physiological substrate by x-ray crystallography. **ChemMedChem**, v. 8, n. 7, p. 1175–1183, 2013.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª Edição ed. São Paulo: Artmed, 2015.

BEIG, M. et al. Trypanothione reductase: A target protein for a combined in vitro and in silico screening approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, 2015.

BENSON, T. J. et al. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. **The Biochemical journal**, v. 286, p. 9–11, 15 ago. 1992.

BERNARDES, L. S. C. et al. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 21, p. 7075–7082, 2006.

BERNARDES, L. S. C.; ZANI, C. L.; CARVALHO, I. Trypanosomatidae diseases: from the current therapy to the efficacious role of trypanothione reductase in drug discovery. **Curr. Med. Chem.**, v. 20, n. 21, p. 2673–96, 2013.

BOGDAL, D.; PIELICHOWSKI, J.; JASKOT, K. A RAPID WILLIAMSON SYNTHESIS UNDER MICROWAVE IRRADIATION IN DRY MEDIUM. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 30, n. 4, p. 427–432, ago. 1998.

BONANDI, E. et al. The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1572–1581, out. 2017.

BOND, C. S. et al. Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, v. 7, n. 1, p. 81–89, 1999.

BONNET, B. et al. New spermine and spermidine derivatives as potent inhibitors of trypanosoma cruzi trypanothione reductase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 1249–1256, 1997.

BONSE, S. et al. (2,2':6',2'-Terpyridine)platinum(II) complexes are irreversible inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase but not of human glutathione reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 25, p. 4812–4821, 2000.

BRAGA, R. et al. Virtual Screening Strategies in Medicinal Chemistry: The State of the Art and Current Challenges. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1899–1912, 15 out. 2014a.

BRAGA, R. C.; ANDRADE, C. H. Assessing the performance of 3D pharmacophore models in virtual screening: how good are they? **Current topics in medicinal chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1127–38, 2013.

BRAGA, S. F. P. et al. Synthesis and evaluation of the antiparasitic activity of bis-(arylmethylidene) cycloalkanones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, p. 282–289, 2014b.

BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2017**. Ministério ed. Brasília: Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos., 2017.

CAREY, FRANCIS A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry**. Fifth edit ed. Boston, MA: Springer US, 2007.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione Reductase (GSR). In: **Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics and Proteomics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1985. v. 113p. 484–490.

CARNEIRO, C. M. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 8 nov. 2017.

CARVALHO, I. et al. “Click chemistry” synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2412–2427, 2010.

CATTA-PRETA, C. M. C.; MOTTRAM, J. C. Drug candidate and target for leishmaniasis. **Nature**, v. 560, n. 7717, p. 171–172, 25 ago. 2018.

CAVALLI, A. et al. Privileged structure-guided synthesis of quinazoline derivatives as inhibitors of trypanothione reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 3031–3035, 2009.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 7339–7359, 10 dez. 2009.

CHADWICK, J. et al. Design, synthesis and antimalarial/anticancer evaluation of spermidine linked artemisinin conjugates designed to exploit polyamine transporters in *Plasmodium falciparum* and HL-60 cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2586–2597, abr. 2010.

CHAN, C. et al. Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 148–156, 1998.

CHIBALE, K. et al. Antiprotozoal and cytotoxicity evaluation of sulfonamide and urea analogues of quinacrine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 19, p. 2655–2657, 2001.

CHIGURUPATI, S. Designing New Vanillin Schiff Bases and their Antibacterial Studies. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 4, n. 5, p. 363–366, 2015.

CIACCIA, M.; DI STEFANO, S. Mechanisms of imine exchange reactions in organic solvents. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 646–654, 2015.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. n7301\_supp, p. S4–S5, 24 jun. 2010.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, jul. 2010.

DA ROCHA PITA, S. S. et al. Receptor-Dependent 4D-QSAR Analysis of Peptidemimetic Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase with Receptor-Based Alignment. v. 79, n. 5, p. 740–748, maio 2012.

DA ROSA, R. et al. Design and synthesis of a new series of 3,5-

disubstituted isoxazoles active against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 25–35, mar. 2017.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 10, p. 1307–1310, out. 2008.

DAVIOUD-CHARVET, E. et al. Synthesis of polyamine derivatives for the preparation of affinity chromatography columns for the search of new *Trypanosoma cruzi* targets. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 11, p. 1567–1572, jun. 1999.

DAVIS, F. A.; YANG, B.; DENG, J. Asymmetric Synthesis of cis -5- tert -Butylproline with Metal Carbenoid NH Insertion. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 5147–5152, jun. 2003.

DE RYCKER, M. et al. Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 498–506, 25 jul. 2018.

DEVINE, W. et al. Protozoan Parasite Growth Inhibitors Discovered by Cross-Screening Yield Potent Scaffolds for Lead Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 5522–5537, 2015.

DHIMITRUKA, I.; SANTALUCIA, J. Investigation of the Yamaguchi Esterification Mechanism. Synthesis of a Lux-S Enzyme Inhibitor Using an Improved Esterification Method. **Organic Letters**, v. 8, n. 1, p. 47–50, jan. 2006.

DIAS, J. C. P. **Doença de Chagas Aguda. Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN**. Ministério ed. Brasil: [s.n.].

DNDI. **Fexinidazole (Chagas) – DNDi**. Disponível em: <<https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole-chagas/>>. Acesso em: 15 set. 2018.

DON, R.; IOSET, J.-R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 01, p. 140–146, 28 jan. 2014.

DREWS, J. Drug discovery: A historical perspective. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1960–1964, 2000.

DUA, R. et al. Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review. **Advances in Biological Research**, v. 5, n. 3, p. 120–144, 2011.

DUYZEND, M. H. et al. Synthesis and evaluation of substrate analogue inhibitors of trypanothione reductase. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 27, n. 6, p. 784–94, 2012.

EBERLE, C. et al. Synthesis, inhibition potency, binding mode, and antiprotozoal activities of fluorescent inhibitors of trypanothione reductase

based on mepacrine-conjugated diaryl sulfide scaffolds. **ChemMedChem**, v. 4, n. 12, p. 2034–2044, 2009.

EBERLE, C. et al. Improved Inhibitors of Trypanothione Reductase by Combination of Motifs: Synthesis, Inhibitory Potency, Binding Mode, and Antiprotozoal Activities. **ChemMedChem**, v. 6, n. 2, p. 292–301, 2011.

EL-WAER, A. et al. Synthesis of N-benzyloxycarbonyl-L-cysteinylglycine 3-dimethylaminopropylamide disulfide: A cheap and convenient new assay for trypanothione reductase. **Analytical Biochemistry**, v. 198, n. 1, p. 212–216, 1991.

EL-WAER, A. F.; BENSON, T.; DOUGLAS, K. T. Synthesis of substrate analogues for trypanothione reductase. **International journal of peptide and protein research**, v. 41, n. 2, p. 141–6, fev. 1993.

ERIKSSON, L. et al. Methods for Reliability and Uncertainty Assessment and for Applicability Evaluations of Classification- and Regression-Based QSARs. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 10, p. 1361–1375, 5 fev. 2003.

ERMONDI, G. et al. An application of two MIFs-based tools (Volsurf+ and Pentacle) to binary QSAR: The case of a palinurin-related data set of non-ATP competitive Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 860–869, mar. 2011.

FAIRLAMB, A. H. et al. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science (New York, N.Y.)**, v. 227, n. 4693, p. 1485–1487, 1985.

FELIPPE, L. G. et al. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 445–450, jan. 2008.

FERNANDEZ-GOMEZ, R. et al. 2-Amino diphenylsulfides as new inhibitors of trypanothione reductase. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 6, n. 2, p. 111–118, 1995.

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 217–231, 27 abr. 2017.

FISCHER, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 27, n. 3, p. 2985–2993, 1894.

FRIES, D. S.; FAIRLAMB, A. H. Antiprotozoal/Antiparasitic Agents. In: ABRAHAM, D. J. (Ed.). **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003. p. 1033–1087.

FUELLER, F. et al. High throughput screening against the peroxidase cascade of African trypanosomes identifies antiparasitic

compounds that inactivate trypanothione. **The Journal of biological chemistry**, 2012.

GALARRETA, B. C. et al. The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 2008.

GARFORTH, J. et al. Rational design of peptide-based inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal drugs. **Amino Acids**, v. 6, n. 3, p. 295–299, 1994.

GARRARD, E. A. et al. Inhibition of trypanothione reductase by substrate analogues. **Organic Letters**, v. 2, n. 23, p. 3639–3642, 2000.

GAWARE, R.; JORDIS, U. Selective Mono-Boc-Protection of Bispiridine. **Ecsoc-13**, n. 3, p. 29–31, 2009.

GILLESPIE, P. M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, p. 2992–2995, 2016.

GIRAULT, S. et al. New potent inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* in the 2-aminodiphenylsulfide series. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 39–52, 1997.

GIRAULT, S. et al. Structure-activity relationships in 2-aminodiphenylsulfides against trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 10, p. 1175–1180, 1998.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7512–7515, out. 1997.

GUNDERTOFTE, K.; JORGENSEN, F. S. **Molecular Modeling and Prediction of Bioactivity**. Copenhagen: Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000.

HAIPOUR, A. R.; RAFIEE, F.; RUOHO, A. E. A rapid and convenient method for the synthesis of aldoximes under microwave irradiation using in situ generated ionic liquids. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 7, n. 1, p. 114–118, mar. 2010.

HAMILTON, C. J. et al. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. **The Biochemical journal**, v. 369, p. 529–537, 2003.

HANSEN, T. V.; WU, P.; FOKIN, V. V. One-pot copper(I)-catalyzed synthesis of 3,5-disubstituted isoxazoles. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 19, p. 7761–7764, 2005.

HARTMANN, A. P. et al. Synthesis and 2D-QSAR studies of neolignan-based diaryl-tetrahydrofuran and -furan analogues with remarkable activity against *Trypanosoma cruzi* and assessment of the trypanothione reductase activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 140, p. 187–199, nov. 2017.



HAWKINS, P. C. D. et al. Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the protein databank and cambridge structural database. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 4, p. 572–584, 2010.

HEFNAWY, A. et al. Importance of secondary screening with clinical isolates for anti-leishmania drug discovery. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11765, 6 dez. 2018.

HELLWINKEL, D.; GÖKE, K. Heterocyclensynthesen mit MF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Basensystemen: 2-Arylbenzofurane and 2,3-Diarylisochoinolin-1(2H)-one. **Synthesis**, v. 1995, n. 09, p. 1135–1141, set. 1995.

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 of the United States of America**, v. 85, n. August, p. 5374–5378, 1988.

HIMO, F. et al. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 1, p. 210–216, 2005.

HOLLAND, J. P. et al. Pyrene-Functionalised Copper Complexes as Potential Dual-Modality Imaging Agents. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2010, n. 1, p. 48–58, jan. 2010.

HOLLOWAY, G. A. et al. Trypanothione reductase high-throughput screening campaign identifies novel classes of inhibitors with antiparasitic activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 2824–2833, 2009.

HORVATH, D. A Virtual Screening Approach Applied to the Search for Trypanothione Reductase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 15, p. 2412–2423, jul. 1997.

HOTEZ, P. J. et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2865, 24 jul. 2014.

HUGHES, J. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, mar. 2011.

HUNTERL, W. N. et al. Active Site of Trypanothione A Target for Rational Reductase Drug Design. **J. Mol. Biol.**, v. 227, p. 322–333, 1992.

ILARI, A. et al. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: The X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. **Amino Acids**, v. 42, n. 2–3, p. 803–811, 2012.

ILARI, A. et al. Polyamine-trypanothione pathway: an update. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 61–77, jan. 2017.

IMMING, P.; SINNING, C.; MEYER, A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 10, p. 821–834, out. 2006.

JACOBY, E. M. et al. Crystal structure of the Trypanosoma cruzi trypanothione reductase-mepacrine complex. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 24, n. 1, p. 73–80, 1996.

JONES, A. J. et al. Trypanocidal activity of marine natural products. **Marine Drugs**, v. 11, n. 10, p. 4058–4082, 2013.

JONES, D. C. et al. Comparative structural, kinetic and inhibitor studies of Trypanosoma brucei trypanothione reductase with T. cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 169, n. 1, p. 12–19, 2010.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 | Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 7 abr. 1997.

KALYAANAMOORTHY, S.; PHOEBE CHEN, Y.-P. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 17, p. 831–839, 2011.

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Substrate Binding and Catalysis By Glutathione-Reductase As Derived From Refined Enzyme - Substrate Crystal-Structures At 2a Resolution. **Journal Of Molecular Biology**, v. 210, n. 1, p. 163–180, 1989.

KASERER, T. et al. Pharmacophore models and pharmacophore-based virtual screening: Concepts and applications exemplified on hydroxysteroid dehydrogenases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22799–22832, 2015.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 5 nov. 2015.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 11 ago. 2011.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KINCH, M. S.; HOYER, D. A history of drug development in four acts. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 10, p. 1163–1168, out. 2015.

KRAUTH-SIEGEL, R. L. et al. Trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi. Purification and characterization of the crystalline enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 164, n. 1, p. 123–128, 1987.

KRAUTH-SIEGEL, R. L. et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas' disease. **FEBS**, v. 317, n. 1, p. 105–108, 1993.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; BAUER, H.; SCHIRMER, R. H. Dithiol Proteins as Guardians of the Intracellular Redox Milieu in Parasites: Old

and New Drug Targets in Trypanosomes and Malaria-Causing Plasmodia. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 5, p. 690–715, 21 jan. 2005.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; INHOFF, O. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. **Parasitology Research**, v. 90, n. SUPPL. 2, p. S77–S85, 1 jun. 2003a.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; INHOFF, O. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. **Parasitology Research**, v. 90, n. SUPPL. 2, p. S77–S85, 1 jun. 2003b.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; SCHÖNECK, R. Flavoprotein structure and mechanism. Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, p. 1138–1146, 1995.

KURIYAN, J. et al. X-ray structure of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.4-Å resolution (glutathione reductase/oxidative stress/trypanosomiasis/protein crystallography/drug design). **Biochemistry**, v. 88, p. 8764–8768, 1991.

LAFRANCE, D. et al. Mild decarboxylative activation of malonic acid derivatives by 1,1'-carbonyldiimidazole. **Organic Letters**, v. 13, n. 9, p. 2322–2325, 2011.

LANTWIN, C. B. et al. The Structure of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase in the Oxidized and NADPH Reduced State. **PROTEINS Structure, Function, and Genetics**, v. 18, p. 161–173, 1994.

LEAL, S. M. In vitro Antileishmanial, Trypanocidal and Mammalian Cell Activities of Diverse N,N'-Dihetaryl Substituted Diamines and Related Compounds. **Scientia Pharmaceutica**, v. 81, n. 1, p. 43–55, 2013.

LEROUX, A. E.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 206, n. 1–2, p. 67–74, mar. 2016.

LEWIS, M. D. et al. Imaging the development of chronic Chagas disease after oral transmission. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11292, 26 dez. 2018.

LIMA, L.; BARREIRO, E. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23–49, 2005.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 235–249, 2000.

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

LO PRESTI, M. S. et al. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 145, p. 79–87, maio 2015.

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

LOPES, N. P. et al. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta medica**, v. 64, n. 7, p. 667–8, out. 1998.

LU, J. et al. Ebsulfur is a benzisothiazolone cytotoxic inhibitor targeting the trypanothione reductase of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 38, p. 27456–27468, 2013.

MACCARI, G. et al. A fast virtual screening approach to identify structurally diverse inhibitors of trypanothione reductase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 18, p. 5255–5258, 2011.

MANLY, C. et al. Strategies and tactics for optimizing the Hit-to-Lead process and beyond—A computational chemistry perspective. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3–4, p. 99–109, fev. 2008.

MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. QSAR modeling: um novo pacote computacional open source para gerar e validar modelos QSAR. **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 554–560, 2013.

MARTYN, D. C. et al. High-throughput screening affords novel and selective trypanothione reductase inhibitors with anti-trypanosomal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 5, p. 1280–1283, mar. 2007.

MCKIE, J. H. et al. Specific peptide inhibitors of trypanothione reductase with backbone structures unrelated to that of substrate: potential rational drug design lead frameworks. **Amino Acids**, v. 20, p. 145–153, 2001.

MEIERING, S. et al. Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase Revealed by Virtual Screening and Parallel Synthesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 15, p. 4793–4802, jul. 2005.

MIGNANI, S. et al. Present drug-likeness filters in medicinal chemistry during the hit and lead optimization process: how far can they be simplified? **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 3, p. 605–615, mar. 2018.

MILLET, R. et al. Antitrypanosomal activities and cytotoxicity of 5-nitro-2-furancarbohydrazides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 24, p. 3601–3604, 2002.

MOLINA, I. et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **The New England journal of**

**medicine**, v. 370, p. 1899–908, 2014.

MORILLO, C. A. et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

MORITA, J.-I. et al. Water-solvent method for tosylation and mesylation of primary alcohols promoted by KOH and catalytic amines. **Green Chemistry**, v. 7, p. 711, 2005.

MUÑOZ, J. et al. Clinical profile of Trypanosoma cruzi infection in a non-endemic setting: Immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). **Acta Tropica**, v. 111, n. 1, p. 51–55, jul. 2009.

MURCIA, L. et al. Risk Factors and Primary Prevention of Congenital Chagas Disease in a Nonendemic Country. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 4, p. 496–502, 15 fev. 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6. ed. [s.l.: s.n.].

NÉRON, B. et al. Mobylye: a new full web bioinformatics framework. **BIOINFORMATICS ORIGINAL PAPER**, v. 25, n. 22, p. 3005–301110, 2009.

NIBRET, E. et al. Biological activities of xanthatin from Xanthium strumarium leaves. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 12, p. 1883–1890, 2011.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, mar. 2016.

O'SULLIVAN, M. C. et al. Polyamine derivatives as inhibitors of trypanothione reductase and assessment of their trypanocidal activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 12, p. 2145–2155, 1997.

O'SULLIVAN, M. C. et al. Dibenzosuberyl substituted polyamines and analogs of clomipramine as effective inhibitors of trypanothione reductase; Molecular docking, and assessment of trypanocidal activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 996–1010, 2015.

O'SULLIVAN, M. C.; DALRYMPLE, D. M.; ZHOU, Q. Inhibiting Effects of Spermidine Derivatives on Trypanosoma Cruzz Trypanothione Reductase. **Journal of Enzyme Inhibition**, v. 11, n. 2, p. 97–114, 27 jan. 1996.

O'SULLIVAN, M. C.; ZHOU, Q. Novel polyamine derivatives as potent competitive inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 17, p. 1957–1960, set. 1995.

OGUNGBE, I. V.; ERWIN, W. R.; SETZER, W. N. Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 48, p. 105–117, 2014.

OLLIARO, P. et al. Harmonized clinical trial methodologies for localized cutaneous leishmaniasis and potential for extensive network with capacities for clinical evaluation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006141, 12 jan. 2018.

OPAS. Doença de Chagas. **Guia para vigilância , prevenção, controle e manejo clínico da doença e chagas aguda transmitida por alimentos**, p. 92, 2009.

OPHARDT, C. **Amino Acids**. Disponível em: <<http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/561aminostructure.html>>. Acesso em: 21 dez. 2016.

PALIWAL, S.; NARAYAN, A.; PALIWAL, S. Quantitative structure activity relationship analysis of dicationic diphenylisoxazole as potent anti-trypanosomal agents. **QSAR and Combinatorial Science**, v. 28, n. 11–12, p. 1367–1375, 2009.

PANDEY, R. K. et al. Developing imidazole analogues as potential inhibitor for *Leishmania donovani* trypanothione reductase: virtual screening, molecular docking, dynamics and ADMET approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 33, n. 12, p. 2541–2553, 2 dez. 2015.

PANDEY, R. K. et al. Structure-based virtual screening, molecular docking, ADMET and molecular simulations to develop benzoxaborole analogs as potential inhibitor against *Leishmania donovani* trypanothione reductase. **Journal of receptor and signal transduction research**, v. 9893, n. May, p. 1–11, 2016.

PARVEEN, S. et al. Antitrypanosomal, antileishmanial, and antimalarial activities of quaternary arylalkylammonium 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfides, a new class of trypanothione reductase inhibitor, and of N-acyl derivatives of 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfide. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 25, p. 8087–8097, 2005.

PASTOR, M. et al. GRid-INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-Dimensional Molecular Descriptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 17, p. 3233–3243, ago. 2000.

PATRICK, G. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Sixth Edit ed. Oxford: Oxford, 2017.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. v. Fifth Editp. 1–30.

PATRICK, L. G. **An Introduction to Drug Synthesis**. First Edit ed. [s.l.] Oxford, 2015.

PATTERSON, S. et al. Dihydroquinazolines as a novel class of

Trypanosoma brucei trypanothione reductase inhibitors: Discovery, synthesis, and characterization of their binding mode by protein crystallography. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 6514–6530, 2011.

PAUL, S. M. et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 3, p. 203–14, 2010.

PEREZ-PINEIRO, R. et al. Development of a novel virtual screening cascade protocol to identify potential trypanothione reductase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1670–1680, 2009.

PERSCH, E. et al. Binding to large enzyme pockets: Small-molecule inhibitors of trypanothione reductase. **ChemMedChem**, v. 9, n. 8, p. 1880–1891, 2014.

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. BUSCA VIRTUAL DE COMPOSTOS BIOATIVOS: CONCEITOS E APLICAÇÕES. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 662–677, 2018.

PITA, S. S. DA R. Modelos de QSAR-4D Dependente do Receptor de Inibidores Peptídicos da Tripanotona Redutase. p. 110, 2006.

PLANO, M. F. et al. Syntheses of a new class of phenyl butyraldehyde-derived amines with in vitro trypanocide activities. **Med. Chem. Commun.**, v. 3, n. 2, p. 225–228, 2012.

PORCAL, W. et al. In vivo anti-chagas vinylthio-, vinylsulfinyl-, and vinylsulfonylbenzofuroxan derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 6004–6015, 2007.

PRIETO, J. J.; TALEVI, A.; BRUNO-BLANCH, L. E. Application of linear discriminant analysis in the virtual screening of antichagasic drugs through trypanothione reductase inhibition. **Molecular Diversity**, v. 10, n. 3, p. 361–375, 2006.

**RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB**. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>.

RICHARDSON, J. L. et al. Improved tricyclic inhibitors of trypanothione reductase by screening and chemical synthesis. **ChemMedChem**, v. 4, n. 8, p. 1333–1340, 2009.

ROBERTSON, J. G. Mechanistic Basis of Enzyme-Targeted Drugs. **Biochemistry**, v. 44, n. 15, p. 5561–5571, abr. 2005.

RODRIGUES, R. F. et al. Investigation of trypanothione reductase inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 1760–1766, 2012.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233–238, mar. 2010.

ROY, P. P.; ROY, K. On Some Aspects of Variable Selection for

Partial Least Squares Regression Models. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 27, n. 3, p. 302–313, mar. 2008.

SÁEZ-ALQUEZAR, A. et al. Quality Control in Screening for Infectious Diseases at Blood Banks. Rationale and Methodology. **EJIFCC**, v. 26, n. 4, p. 278–85, nov. 2015.

SAHA, D.; SHARMA, A. Docking-based screening of natural product database in quest for dual site inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase (TcTR). **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 1, p. 316–333, 2015.

SALMON-CHEMIN, L. et al. Parallel synthesis of a library of 1,4-Naphthoquinones and automated screening of potential inhibitors of trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 7, p. 631–635, 2000.

SALMON-CHEMIN, L. et al. 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from Trypanosoma cruzi: Synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 548–565, 2001.

SARAVANAMUTHU, A. et al. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: A template for drug design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 28, p. 29493–29500, 9 jul. 2004.

SCHIFF, H. Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen. **Annalen der Chemie und Pharmacie**, v. 131, n. 1, p. 118–119, 1864.

SCHMIDT, A.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 11, p. 1239–1259, 2002.

SCHNEIDER, G. Automating drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 2, p. 97–113, 15 dez. 2017.

SCHULTE, A.; SAITO, S.; WÜNSCH, B. Stereoselective Synthesis of cis, cis-Configured Vicinal Triamines. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2014, n. 26, p. 5749–5756, set. 2014.

SCHWENDE, H. et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, 1996.

SCIPIONI, M. et al. Novel vanillin derivatives: Synthesis, anti-oxidant, DNA and cellular protection properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 745–754, jan. 2018.

SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC



50 -Values and Cell Survival. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, v. 33, p. 813–823, 1995.

SPYRAKIS, F.; COZZINI, P.; EUGENE KELLOGG, G. Applying Computational Scoring Functions to Assess Biomolecular Interactions in Food Science: Applications to the Estrogen Receptors. **Nuclear Receptor Research**, v. 3, p. 1–29, 2016.

SPYRAKIS, F.; COZZINI, P.; KELLOGG, G. E. Docking and Scoring in Drug Discovery. In: **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 601–684.

STUMP, B. et al. Diaryl sulfide-based inhibitors of trypanothione reductase: inhibition potency, revised binding mode and antiprotozoal activities. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 6, n. 21, p. 3935–3947, 2008.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 57, 2017.

SULLIVAN, F. X. et al. Mutational Analysis of Parasite Trypanothione Reductase: Acquisition of Glutathione Reductase Activity in a Triple Mutant? **Biochemistry**, v. 30, p. 2761–2767, 1991.

SULLIVAN, F. X.; WALSH, C. T. Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 145–147, 1991.

SUNSERI, J.; KOES, D. R. Pharmit: interactive exploration of chemical space. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W442–W448, 8 jul. 2016.

SYSAK, A.; OBMÍŃSKA-MRUKOWICZ, B. Isoxazole ring as a useful scaffold in a search for new therapeutic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 137, p. 292–309, set. 2017.

TANRIKULU, Y.; KRÜGER, B.; PROSCHAK, E. The holistic integration of virtual screening in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 7–8, p. 358–364, 2013.

TAYLOR, M. C. et al. The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, n. 293, 1994.

TAYLOR, P. et al. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics Developing Imidazole analogues as potential inhibitor for *Leishmania donovani* Trypanothione reductase : Virtual Screening , Molecular Docking , Dynamics and ADMET approach. n. August, 2015.

TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. **Journal of Chemometrics**, v. 23, n. 1,

p. 32–48, jan. 2009.

TORRICO, F. et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 419–430, abr. 2018.

TRIBALLEAU, N. et al. Virtual screening workflow development guided by the “receiver operating characteristic” curve approach. Application to high-throughput docking on metabotropic glutamate receptor subtype 4. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2534–2547, 2005.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A. et al. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric A methodological study. **Journal of Immunological Methods**, v. 141, p. 15–22, 1991.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, jun. 2002.

VISWANADHAM, B. et al. Efficient and expeditious chemoselective BOC protection of amines in catalyst and solvent-free media. **Research on Chemical Intermediates**, v. 43, n. 3, p. 1355–1363, 26 mar. 2017.

VUORINEN, A.; SCHUSTER, D. Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling. **Methods**, v. 71, n. C, p. 113–134, 2015.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. Second Edi ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996.

WALTENBERGER, B. et al. Discovery of Potent Soluble Epoxide Hydrolase (sEH) Inhibitors by Pharmacophore-Based Virtual Screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 4, p. 747–762, 2016.

WALTON, J. G. A. et al. Synthesis and Evaluation of Indatraline-Based Inhibitors for Trypanothione Reductase. **ChemMedChem**, v. 6, n. 2, p. 321–328, 2011.

WANG, Y.-X. et al. Synthesis, structure–activity relationship and in vitro biological evaluation of N-arylethyl isoquinoline derivatives as Cocksackievirus B3 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 19, p. 5787–5790, out. 2011.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 4th Editio ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2015.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Releve epidemiologique hebdomadaire**, v. 91, n. 22, p. 287–96, 3 jun. 2016.

WHO. **Integrating neglected tropical diseases into global health**

**and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases.IV WHO Report on Neglected Tropical Diseases.** Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf>>.

WILLIAMSON, A. XLV. Theory of ætherification. **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, v. 37, n. 251, p. 350–356, 30 nov. 1850.

WOLBER, G.; DORNHOFER, A. A.; LANGER, T. Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 20, n. 12, p. 773–788, 7 fev. 2007.

WOLBER, G.; LANGER, T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, n. 1, p. 160–169, jan. 2005.

WOODMAN, E. K. et al. N,N '-Carbonyldiimidazole-Mediated Amide Coupling: Significant Rate Enhancement Achieved by Acid Catalysis with Imidazole-HCl. **Organic Process Research & Development**, v. 13, n. 1, p. 106–113, 16 jan. 2009.

WOSTER, P. M. Antiprotozoal/Antiparasitic Agents. In: **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 565–602.

XU, Q. et al. Selective catalytic Hofmann N-alkylation of poor nucleophilic amines and amides with catalytic amounts of alkyl halides. **Green Chemistry**, v. 18, n. 14, p. 3940–3944, 2016.

ZHANG, Y. et al. The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. **Protein science**, v. 5, n. 1, p. 52–61, 1996.

ZIMMERMANN, L. A. **Síntese de derivados heterocíclicos com potencial atividade antitripanossomatídeos**. 2014. 255 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciência Farmacêutica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

ZIMMERMANN, L. A. et al. Synthesis and SAR of new isoxazole-triazole bis-heterocyclic compounds as analogues of natural lignans with antiparasitic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 17, p. 4850–4862, set. 2018.



## APÊNDICE

Tabela S1: Lista de estruturas cristalográficas encontradas PDB (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB,” 2015).

<b>PDB</b>	<b>Resolution[Å]</b>	<b>Parasito</b>	<b>Referencia</b>
4NEW	2.80	<i>Trypanosoma cruzi</i>	(PERSCH et al., 2014)
1GXF	2.70	<i>Trypanosoma cruzi</i>	(SARAVANAMUTHU et al., 2004)
1BLZ	2.40	<i>Trypanosoma cruzi</i>	(BOND et al., 1999)
1AOG	2.30	<i>Trypanosoma cruzi</i>	(ZHANG et al., 1996)
1NDA	3.30	<i>Trypanosoma cruzi</i>	(LANTWIN et al., 1994)
4APN	3.20	<i>Leishmania infantum</i>	(BAIOCCO et al., 2013)
4ADW	3.61	<i>Leishmania infantum</i>	(BAIOCCO et al., 2013)
2YAU	3.50	<i>Leishmania infantum</i>	(ILARI et al., 2012)
2X50	3.50	<i>Leishmania infantum</i>	(BAIOCCO et al., 2011)
2JK6	2.95	<i>Leishmania infantum</i>	(BAIOCCO et al., 2009)
2W0H	3.0	<i>Leishmania infantum</i>	(BAIOCCO et al., 2009)
2WOI	2.10	<i>Trypanosoma brucei</i>	(PATTERSON et al., 2011)
2WOV	2.50	<i>Trypanosoma brucei</i>	(PATTERSON et al., 2011)
2WOW	2.20	<i>Trypanosoma brucei</i>	(PATTERSON et al., 2011)
2WP5	2.80	<i>Trypanosoma brucei</i>	(PATTERSON et al., 2011)
2WP6	2.50	<i>Trypanosoma brucei</i>	(PATTERSON et al., 2011)
2WPC	2.10	<i>Trypanosoma brucei</i>	(PATTERSON et al., 2011)
2WPE	2.10	<i>Trypanosoma brucei</i>	(PATTERSON et al., 2011)
2WPF	1.90	<i>Trypanosoma brucei</i>	(PATTERSON et al., 2011)
2WBA	2.30	<i>Trypanosoma brucei</i>	(JONES et al., 2010)
4NEV	2.50	<i>Trypanosoma brucei</i>	(PERSCH et al., 2014)

Tabela S2: Triagem dos compostos ativos (inibidores) identificados pelos modelos farmacofóricos.

Inibidores	Atividade	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Referências
a1	Ki 0,3 µM				(O'SULLIVAN et al., 2015)
a2	IC <sub>50</sub> 0,8 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a3	Kic 0,9 µM		X		(EBERLE et al., 2009)
a4	IC <sub>50</sub> 0,6 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2000)
a5	IC <sub>50</sub> 0,3 µM	X	X		(SALMON-CHEMIN et al., 2000)
a6	IC <sub>50</sub> 1,6 µM				(RODRIGUES et al., 2012)
a7	IC <sub>50</sub> 0,8 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a8	IC <sub>50</sub> 0,6 µM				(JONES et al., 2010)
a9	Kic 0,5 µM				(EBERLE et al., 2011)
a10	IC <sub>50</sub> 0,5 µM	X			(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a11	IC <sub>50</sub> 0,5 µM				(GIRAULT et al., 1997)
a12	IC <sub>50</sub> 0,9 µM				(GIRAULT et al., 1997)
a13	IC <sub>50</sub> 1,9 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a14	Kic 1,4 µM		X		(RICHARDSON et al., 2009)
a15	IC <sub>50</sub> 1,1 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2000)
a16	IC <sub>50</sub> 1,0 µM				(HOLLOWAY et al., 2009)
a17	Kic 1,5 µM				(PERSCH et al., 2014)
a18	Kic 1,1 µM				(EBERLE et al., 2011)
a19	IC <sub>50</sub> 1,9 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a20	IC <sub>50</sub> 1,6 µM	X			(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a21	IC <sub>50</sub> 1,7 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a22	IC <sub>50</sub> 1,4 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a23	IC <sub>50</sub> 1,7 µM	X			(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a24	IC <sub>50</sub> 1,6 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a25	IC <sub>50</sub> 1,1 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a26	IC <sub>50</sub> 1,8 µM				(GIRAULT et al., 1997)
a27	Kic 4,0 µM				(PERSCH et al., 2014)
a28	IC <sub>50</sub> 0,3 µM				(BONNET et al., 1997)
a29	IC <sub>50</sub> 0,3 µM				(BEIG et al., 2015)
a30	IC <sub>50</sub> 0,6 µM				(BEIG et al., 2015)
a31	IC <sub>50</sub> 0,6 µM				(BEIG et al., 2015)
a32	IC <sub>50</sub> 8,4 µM				(O'SULLIVAN et al., 2015)
a33	IC <sub>50</sub> 27,9 µM				O'Sullivan et al. 2015)
a34	IC <sub>50</sub> 7,6 µM				O'Sullivan et al. 2015)
a35	IC <sub>50</sub> 4,0 µM				O'Sullivan et al. 2015)
a36	IC <sub>50</sub> 10,0 µM				(GALARRETA et al., 2008)
a37	IC <sub>50</sub> 1,7 µM			X	(PARVEEN et al., 2005)
a38	IC <sub>50</sub> 7,6 µM				(GALARRETA et al., 2008)
a39	IC <sub>50</sub> 2,0 µM		X		(MEIERING et al., 2005)
a40	IC <sub>50</sub> 6,0 µM				(MEIERING et al., 2005)
a41	IC <sub>50</sub> 2,0 µM				(Meiering et al. 2005)
a42	IC <sub>50</sub> 2,0 µM				(Meiering et al. 2005)
a43	IC <sub>50</sub> 5,0 µM				(Meiering et al. 2005)
a44	IC <sub>50</sub> 7,5 µM				(CAVALLI et al., 2009)
a45	IC <sub>50</sub> 0,1 µM				(BONSE et al., 2000)
a46	IC <sub>50</sub> 0,1 µM				(BONSE et al., 2000)
a47	IC <sub>50</sub> 9,0 µM				(HOLLOWAY et al., 2009)
a48	IC <sub>50</sub> 7,0 µM				(HOLLOWAY et al., 2009)
a49	IC <sub>50</sub> 9,0 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a50	IC <sub>50</sub> 6,5 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a51	IC <sub>50</sub> 9,0 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a52	IC <sub>50</sub> 10,0 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a53	IC <sub>50</sub> 6,2 µM	X			(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a54	IC <sub>50</sub> 5,9 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a55	IC <sub>50</sub> 2,9 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)

a56	IC <sub>50</sub> 5,0 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a57	IC <sub>50</sub> 2,5 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a58	IC <sub>50</sub> 2,0 µM	X			(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a59	IC <sub>50</sub> 4,0 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a60	IC <sub>50</sub> 2,3 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a61	IC <sub>50</sub> 2,0 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a62	IC <sub>50</sub> 2,9 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a63	IC <sub>50</sub> 2,7 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a64	IC <sub>50</sub> 2,3 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a65	IC <sub>50</sub> 4,5 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a66	IC <sub>50</sub> 2,6 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a67	IC <sub>50</sub> 3,7 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a68	IC <sub>50</sub> 3,5 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a69	IC <sub>50</sub> 2,5 µM				(SALMON-CHEMIN et al., 2001)
a70	IC <sub>50</sub> 6,9 µM				(GIRAULT et al., 1997)
a71	IC <sub>50</sub> 2,5 µM				(GIRAULT et al., 1997)
a72	IC <sub>50</sub> 7,0 µM				(GIRAULT et al., 1997)
a73	IC <sub>50</sub> 8,0 µM				(GIRAULT et al., 1997)
a74	IC <sub>50</sub> 3,3 µM				(GIRAULT et al., 1998)
a75	IC <sub>50</sub> 5,0 µM				(CHIBALE et al., 2001)
a76	IC <sub>50</sub> 3,3 µM				(CHIBALE et al., 2001)
a77	IC <sub>50</sub> 5,9 µM				(CHIBALE et al., 2001)
a78	Kic 4,0 µM				(PERSCH et al., 2014)
a79	Kic 6,0 µM				(PERSCH et al., 2014)
a80	Kic 6,0 µM				(PERSCH et al., 2014)
a81	Kic 3,0 µM				(PERSCH et al., 2014)
a82	Kic 7,0 µM				(PERSCH et al., 2014)
a83	Kic 5,0 µM				(PERSCH et al., 2014)
a84	Kic 4,0 µM				(PERSCH et al., 2014)
a85	Ki 10,4 µM				(LU et al., 2013)
a86	Ki 2,0 µM				(DUYZEND et al., 2012)
a87	Ki 8,9 µM				(DUYZEND et al., 2012)
a88	Ki 5,7 µM				(MACCARI et al., 2011)
a89	Ki 9,3 µM				(MACCARI et al., 2011)
a90	Ki 10,6 µM				(MACCARI et al., 2011)
a91	Kic 9,0 µM			X	(STUMP et al., 2008)
a92	Kic 9,0 µM			X	(STUMP et al., 2008)
a93	Kic 5,0 µM			X	(STUMP et al., 2008)
a94	Kic 8,0 µM			X	(STUMP et al., 2008)
a95	Kic 10,0 µM			X	(STUMP et al., 2008)
a96	Kic 8,0 µM			X	(STUMP et al., 2008)
a97	Kic 6,0 µM			X	(STUMP et al., 2008)
a98	IC <sub>50</sub> 10,4 µM	X			(MCKIE et al., 2001)
a99	IC <sub>50</sub> 4,0 µM				(NIBRET et al., 2011)
a100	Kic 5,0 µM		X	X	(EBERLE et al., 2011)
a101	Kic 2,0 µM	X			(EBERLE et al., 2011)
a102	Kic 4,0 µM				(EBERLE et al., 2011)
a103	Kic 6,0 µM				(EBERLE et al., 2011)
a104	Kic 4,0 µM				(EBERLE et al., 2011)
a105	IC <sub>50</sub> 0,3 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a106	IC <sub>50</sub> 2,2 µM	X			(RICHARDSON et al., 2009)
a107	IC <sub>50</sub> 3,7 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a108	IC <sub>50</sub> 4,9 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a109	IC <sub>50</sub> 4,9 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a110	IC <sub>50</sub> 6,9 µM	X			(RICHARDSON et al., 2009)
a111	IC <sub>50</sub> 7,3 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a112	IC <sub>50</sub> 7,5 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a113	IC <sub>50</sub> 7,5 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a114	IC <sub>50</sub> 10,9 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a115	IC <sub>50</sub> 4,9 µM				(RICHARDSON et al., 2009)
a116	IC <sub>50</sub> 7,2 µM				(WALTON et al., 2011)

a117	IC <sub>50</sub> 4,0 µM			(WALTON et al., 2011)
a118	IC <sub>50</sub> 7,9 µM			(WALTON et al., 2011)
a119	IC <sub>50</sub> 5,5 µM			(WALTON et al., 2011)
a120	IC <sub>50</sub> 8,0 µM			(WALTON et al., 2011)
a121	IC <sub>50</sub> 4,1 µM			(WALTON et al., 2011)
a122	IC <sub>50</sub> 7,4 µM			(WALTON et al., 2011)
a123	IC <sub>50</sub> 4,9 µM			(WALTON et al., 2011)
a124	IC <sub>50</sub> 2,2µM			(WALTON et al., 2011)
a125	IC <sub>50</sub> 3,1 µM			(WALTON et al., 2011)
a126	IC <sub>50</sub> 3,1 µM			(WALTON et al., 2011)
a127	Kic 3,0 µM	X	X	(EBERLE et al., 2009)
a128	Kic 7,0 µM	X	X	(EBERLE et al., 2009)
a129	Kic 6,0 µM	X	X	(EBERLE et al., 2009)
a130	Kic 3,9 µM	X		(EBERLE et al., 2009)
a131	Kic 3,0 µM	X		(EBERLE et al., 2009)
a132	Kic 4,0 µM	X		(EBERLE et al., 2009)
a133	Kic 10,0 µM	X		(EBERLE et al., 2009)
a134	Kic 6,0 µM			(EBERLE et al., 2009)
a135	Kic 3,0 µM	X		(EBERLE et al., 2009)
a136	Kic 5,0 µM	X		(EBERLE et al., 2009)

---



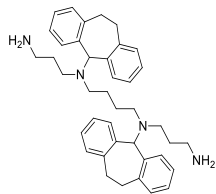
Tabela S3: Resultado da triagem realizado com os bancos de dados.

	Name	Model	Score	%inhibition at 100 $\mu$ M	IC <sub>50</sub>
S1	AQ-405/42300456	model1	56,2394	NA	
S2	AT-057/43314358	model1	56,5206	20,2 ( $\pm$ 1,0)	
S3	AJ-333/09218058	model1	56,4215	NA	
S4	AG-205/36565053	model1	56,5303	19,8 ( $\pm$ 4,9)	
S5	AE-641/30114058	model1	56,2669	16,2 ( $\pm$ 0,0)	
S6	AJ-292/41694677	model1	56,6968	NA	
S7	AK-968/15605657	model1	56,2975	NA	
S8	AG-670/12382021	model1	56,5021	NA	
S9	AG-690/15436897	model1	56,4383	NA	
S10	AP-064/42208105	model1	56,4455	NA	
S11	AG-205/13547043	model1/modelo2	56,3882	NA	
S12	AG-670/15096100	model2	56,8717	21,5 ( $\pm$ 6,0)	
S13	AQ-750/42051116	model2	56,9507	23,7 ( $\pm$ 2,8)	
S14	AG-670/14929200	model2	56,8779	NA	
S15	AS-871/43477808	model2	57,115	10,8 ( $\pm$ 2,0)	
S16	AG-205/36917049	model2	56,8085	NA	
S17	AM-814/41092275	model2	56,7057	12,2 ( $\pm$ 5,5)	
S18	AN-698/41690269	model2	56,7292	7,2 ( $\pm$ 3,6)	
S19	AP-970/42898257	model2	56,9609	41,8 ( $\pm$ 2,8)	
S20	AG-205/36957213	model2	56,6552	NA	
S21	AN-465/42784333	model2	56,7595	60,4 ( $\pm$ 6,5)	42,3 ( $\pm$ 8,9)
S22	AG-205/33676040	model2	56,8918	NA	
S23	AP-064/41129084	model2	56,8346	NA	
S24	AK-968/11368992	model2	56,9937	NA	
S25	AG-219/36042014	model2	56,7617	NA	
S26	AI-204/31696040	model3	66,7172	NA	
S27	AP-970/42837049	model3	65,4583	20,3 ( $\pm$ 4,0)	
S28	AJ-292/40763199	model3	66,3573	NA	
S29	AK-968/11841436	model3	65,5659	NA	
S30	AI-204/43489654	model3	65,7803	39,1 ( $\pm$ 9,3)	
S31	AP-845/41670212	model3	65,7888	7,1 ( $\pm$ 1,4)	
S32	AN-465/42834692	model3	66,0546	44,3 ( $\pm$ 0,1)	
S33	AN-465/43421576	model3	65,3861	69,3 ( $\pm$ 1,9)	93,3 ( $\pm$ 18,1)
S34	dihidroestreptomina	model1	57,1938	NA	
S35	doxiciclina	model1	56,5578	NA	
S36	indinavir	model1	56,1093	NA	
S37	oxitetraclina	model1	56,7462	21,3 ( $\pm$ 1,4)	
S38	vinblastina	model1	56,9581	NA	
S39	AG-670/11880028	model2	56,3992	NA	
S40	astemizol	model2	55,86	43,7 ( $\pm$ 4,0)	
S41	bupivacaina	model2	55,6828	NA	
S42	clindamina	model2	55,9215	NA	
S43	flecainida	model2	56,0255	NA	

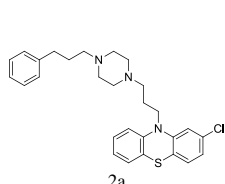
S44	fominoben	model2	56,2359	NA
S45	lidoflazina	model2	55,8906	NA
S46	AG-19	model3	65,5775	NA
S47	BM-400	model3	65,5809	NA
clomipramina				14,6 ( $\pm 2,6$ )

<sup>a</sup>Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP de triplicatase. %inibição: porcentagem de inibição da enzima Tripanotiona redutase a 100  $\mu$ M. IC<sub>50</sub>: concentração inibitória de 50% da atividade da enzima tripanotiona redutase. CP: Controle positivo clomipramina IC<sub>50</sub> 14,0  $\pm$  2,6  $\mu$ M. NA: não ativo.

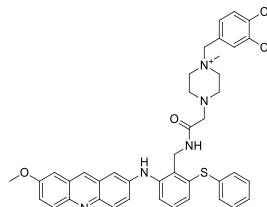
**Figura S1:** Conjunto de compostos comprovados experimentalmente como inibidores da enzima tripanotona redutase de *Trypanosoma cruzi* utilizados para elaboração de modelos farmacofóricos.



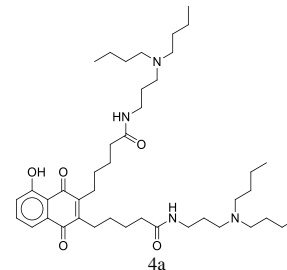
1a  
(O'SULLIVAN et al., 2015)



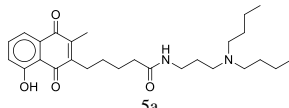
2a  
(RICHARDSON et al., 2009)



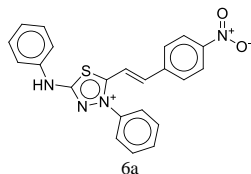
3a  
(EBERLE et al., 2009)



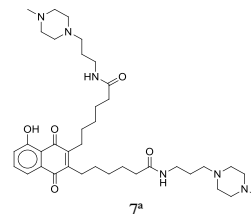
4a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2000)



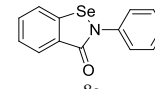
5a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2000)



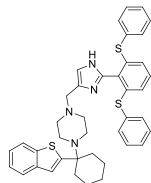
6a  
(RODRIGUES et al., 2012)



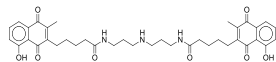
7a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



8a  
(JONES et al., 2010)



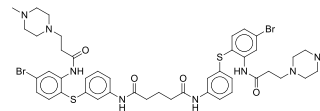
9a  
(EBERLE et al., 2011)



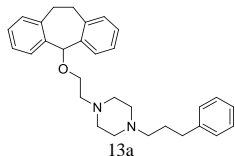
10a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



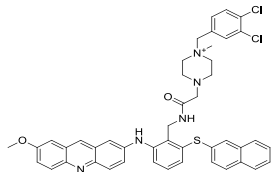
11a  
(GIRAULT et al., 1997)



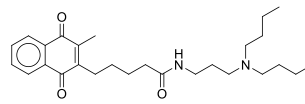
12a  
(GIRAULT et al., 1997)



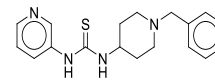
13a  
(RICHARDSON et al., 2009)



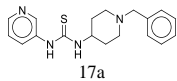
14a  
(RICHARDSON et al., 2009)



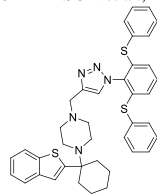
15a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2000)



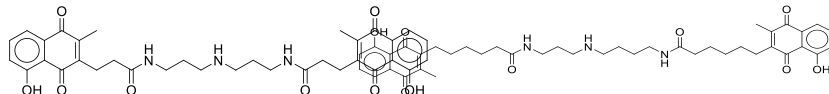
16a  
(HOLLOWAY et al., 2009)



17a  
(HOLLOWAY et al., 2009)

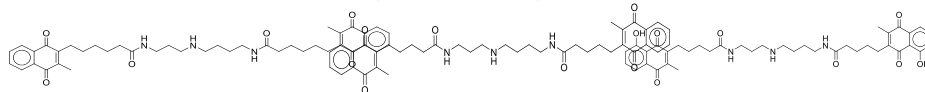


18a  
(EBERLE et al., 2011)

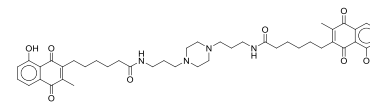


19a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)

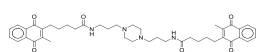
20a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



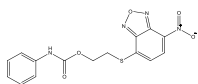
23a



21a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)

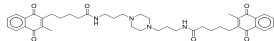


25a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)

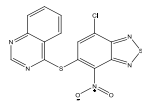


39a  
(BEIG et al., 2015)

22a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)

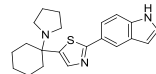


26a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)

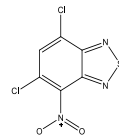


30a  
(BEIG et al., 2015)

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)

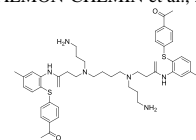


27a  
(PERSCH et al., 2014)



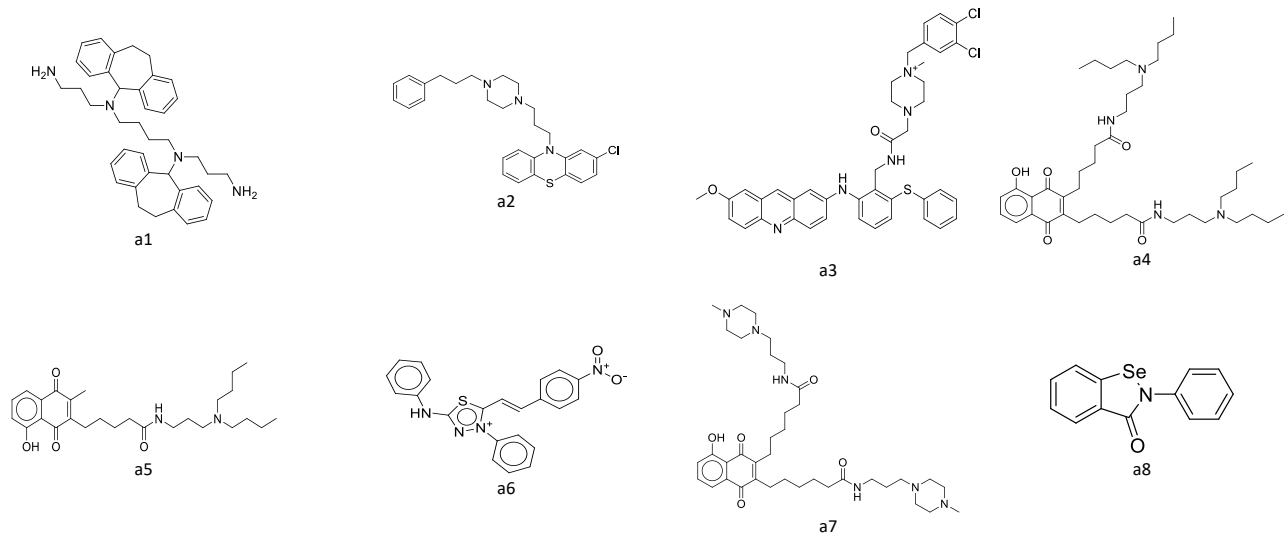
31a  
(BEIG et al., 2015)

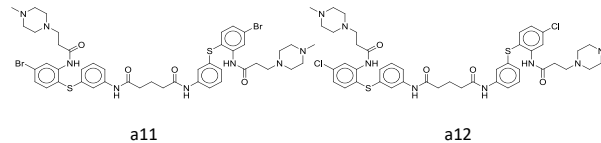
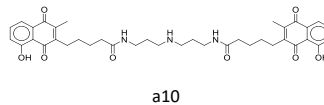
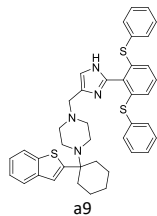
24a  
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



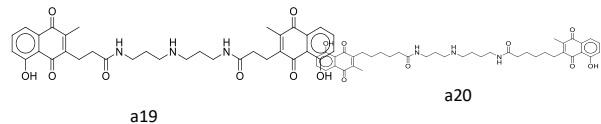
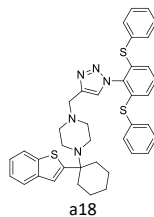
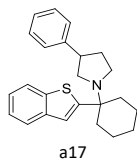
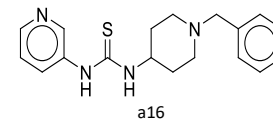
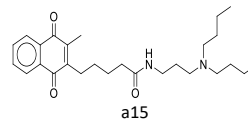
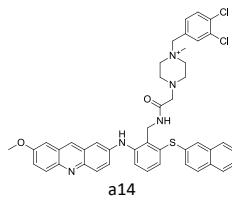
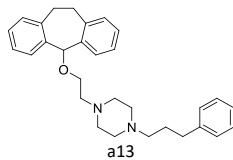
28a  
(BONNET et al., 1997)

Figura S2: Conjunto de compostos designados ativos para validação do modelo farmacofórico.

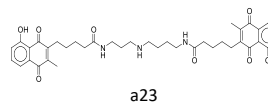
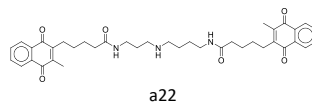
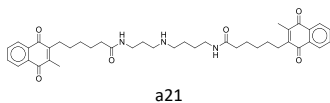




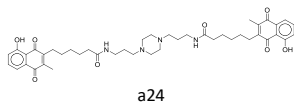
a12

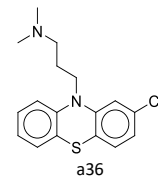
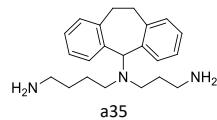
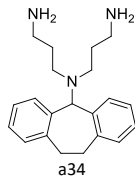
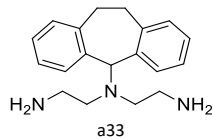
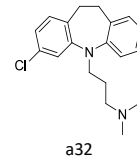
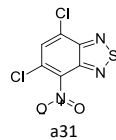
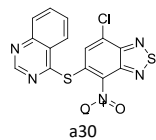
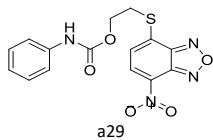
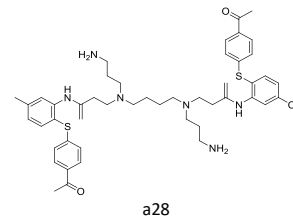
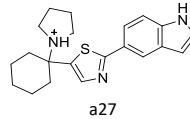
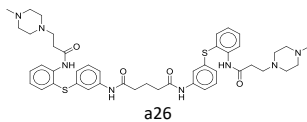
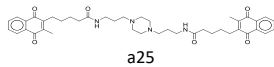


a20

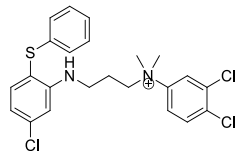


a24

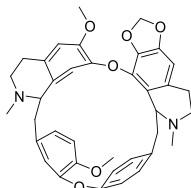




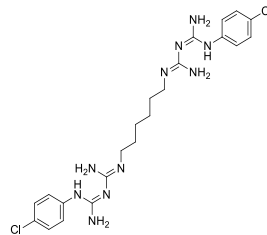




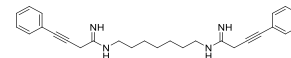
a37



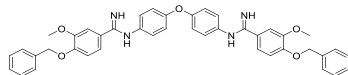
a38



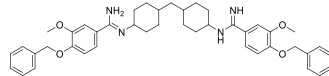
a39



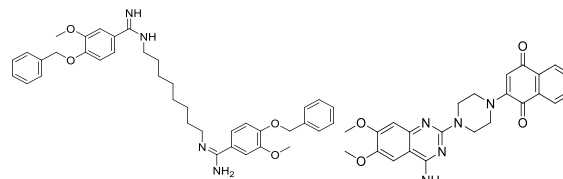
a40



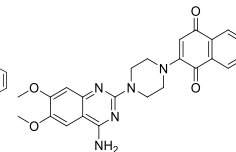
a41



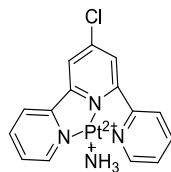
a42



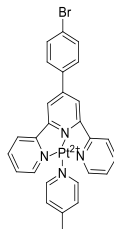
a43



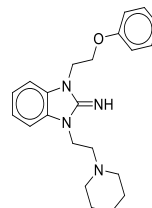
a44



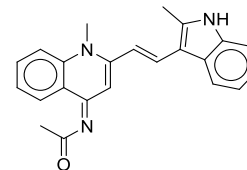
a45



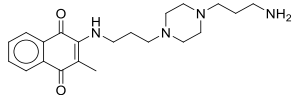
a46



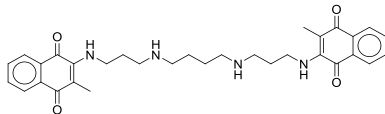
a47



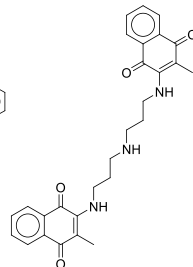
a48



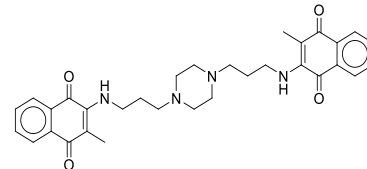
a49



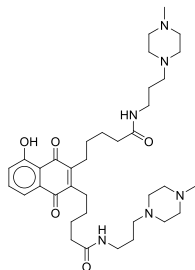
a50



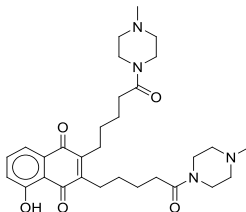
a51



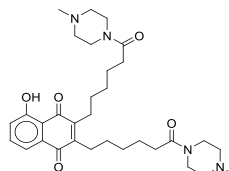
a52



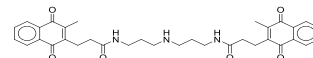
a53



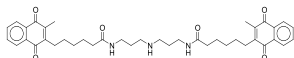
a54



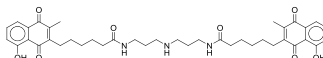
a55



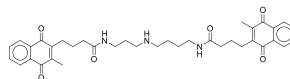
a56



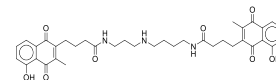
a57



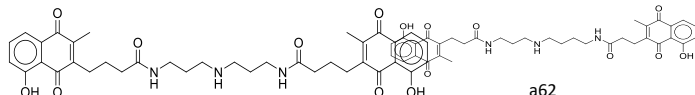
a58



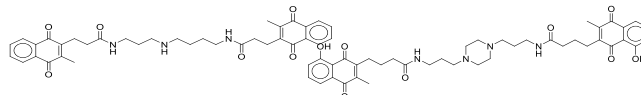
a59



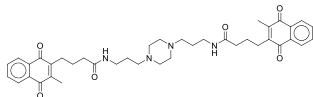
a60



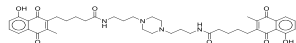
a62



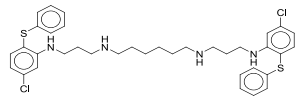
a61



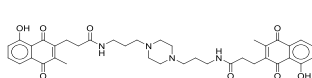
a65



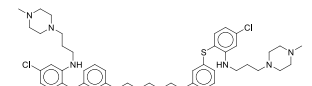
a69



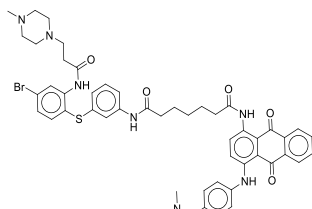
a73



a66

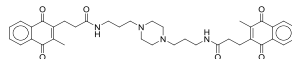


a70

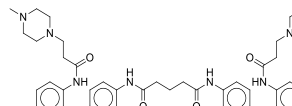


a74

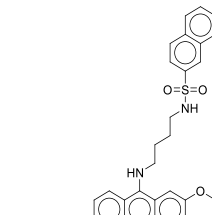
a63



a67

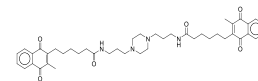


a71

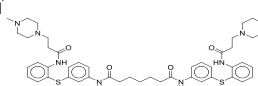


a75

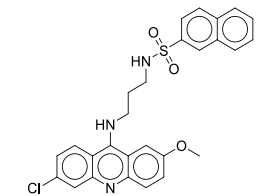
a64



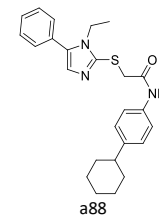
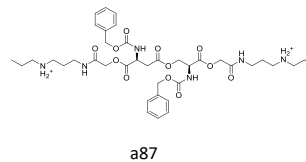
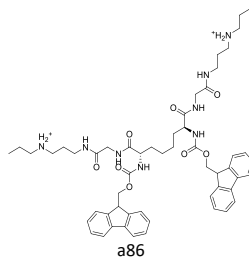
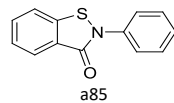
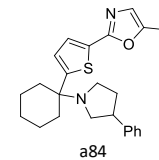
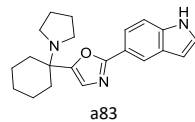
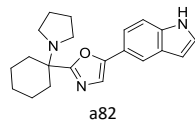
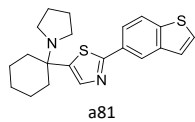
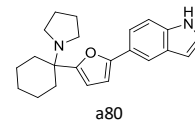
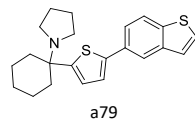
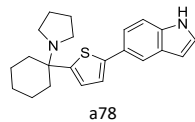
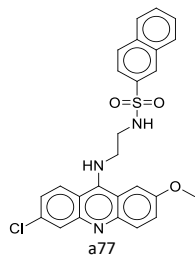
a68

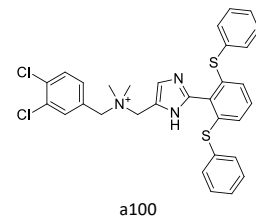
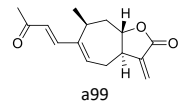
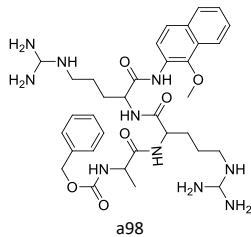
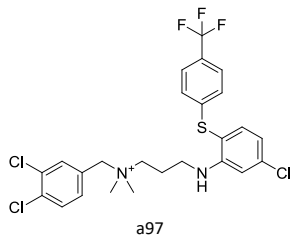
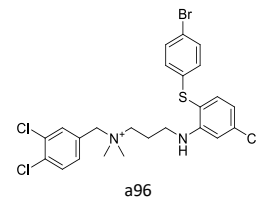
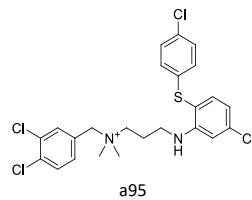
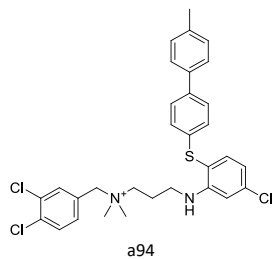
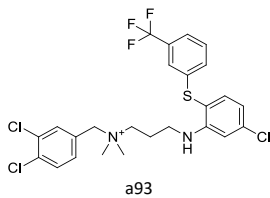
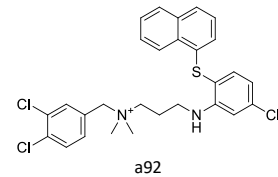
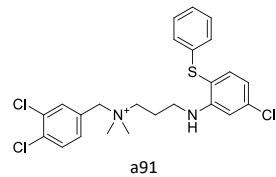
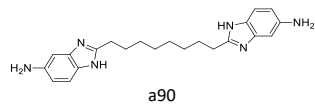
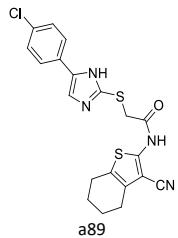


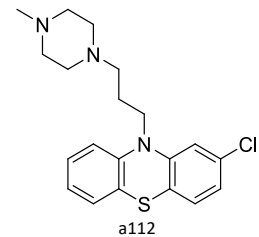
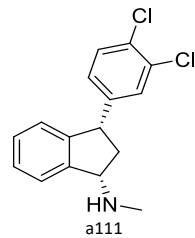
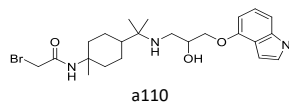
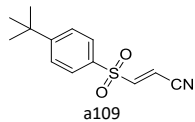
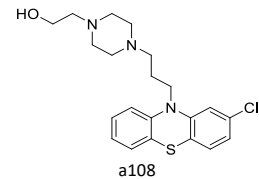
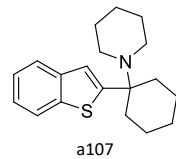
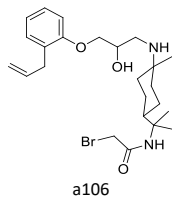
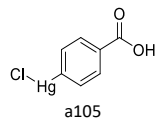
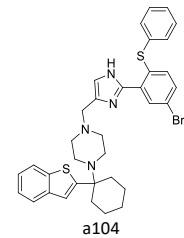
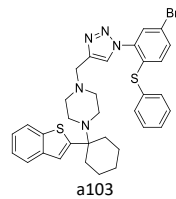
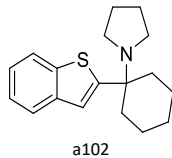
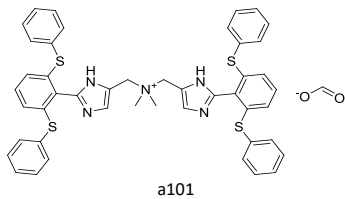
a72

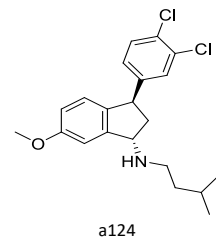
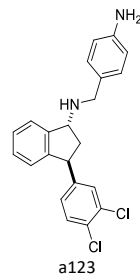
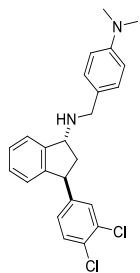
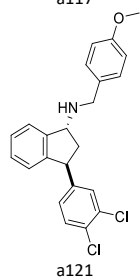
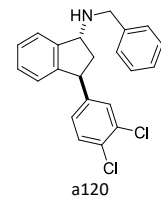
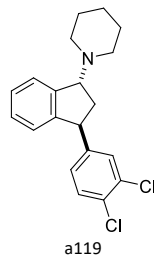
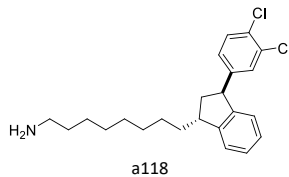
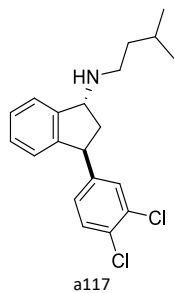
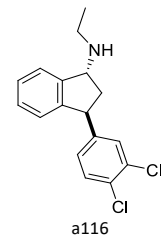
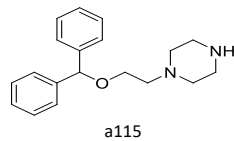
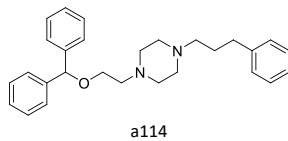
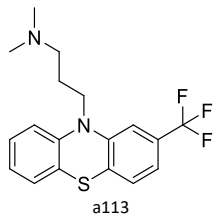


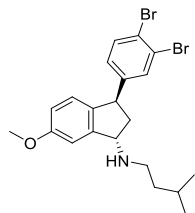
a76



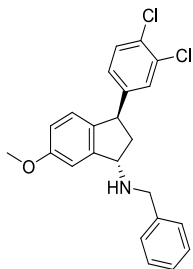




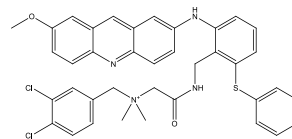




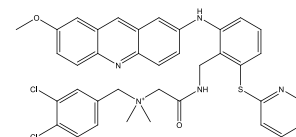
a125



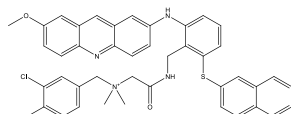
a126



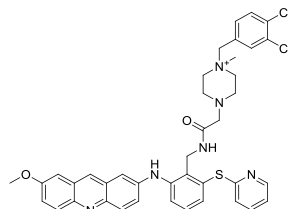
a127



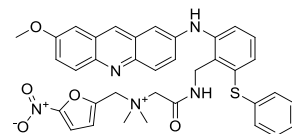
a128



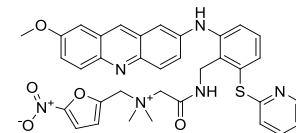
a129



a130

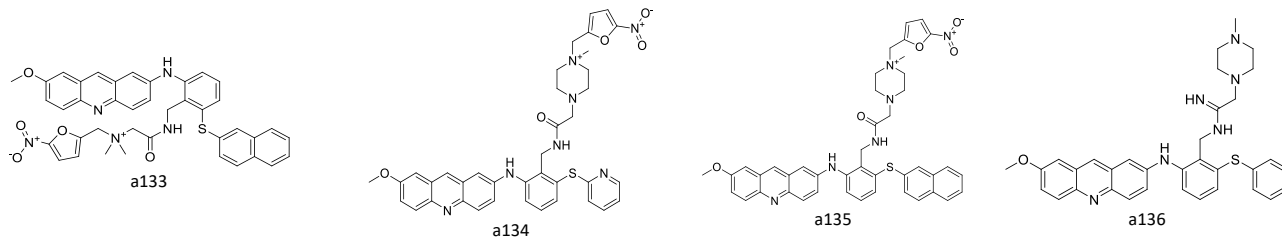


a131

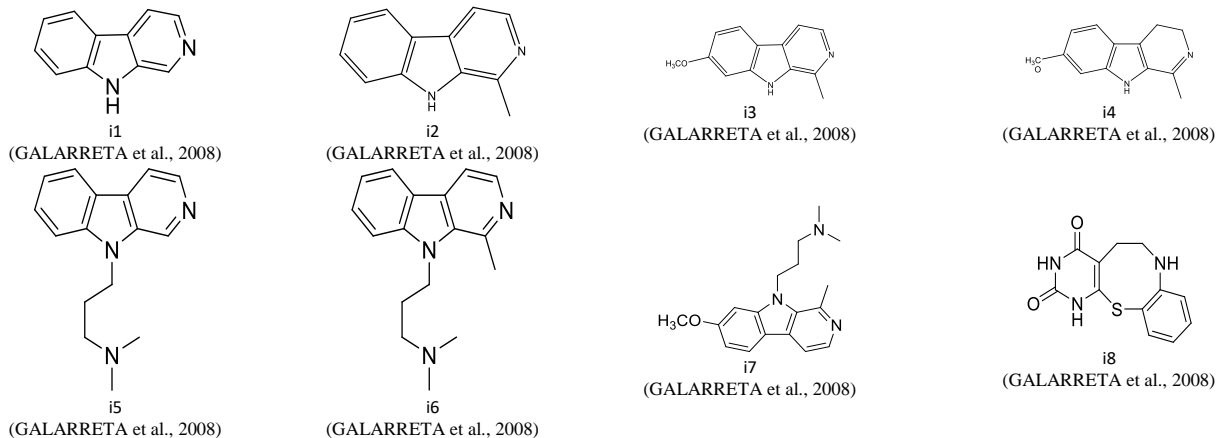


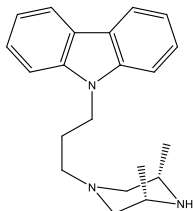
a132





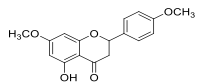
**Figura S3:** Conjuntos de compostos designados inativos segundo dados experimentais da literatura.





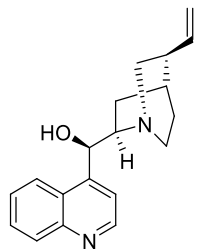
i9

(GALARRETA et al., 2008)



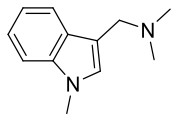
i13

(GALARRETA et al., 2008)



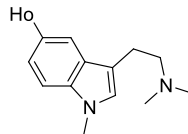
i17

(GALARRETA et al., 2008)



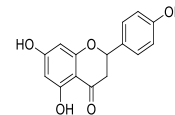
i10

(GALARRETA et al., 2008)



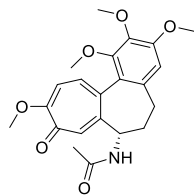
i11

(GALARRETA et al., 2008)



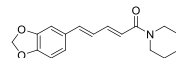
i12

(GALARRETA et al., 2008)



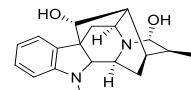
i14

(GALARRETA et al., 2008)



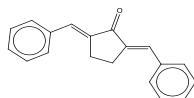
i15

(GALARRETA et al., 2008)



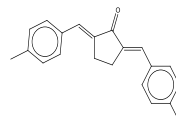
i16

(GALARRETA et al., 2008)



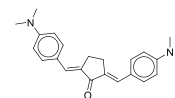
i18

(BRAGA et al., 2014b)



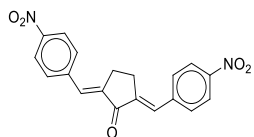
i19

(BRAGA et al., 2014b)



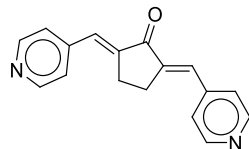
i20

(BRAGA et al., 2014b)



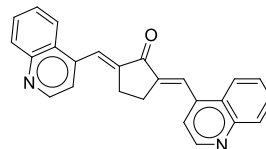
i21

(BRAGA et al., 2014b)



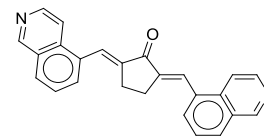
i22

(BRAGA et al., 2014b)



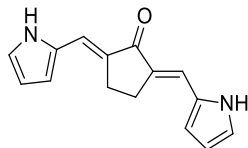
i23

(BRAGA et al., 2014b)



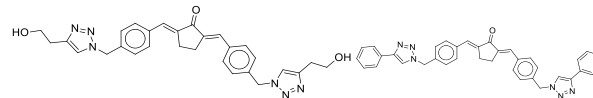
i24

(BRAGA et al., 2014b)



i25

(BRAGA et al., 2014b)

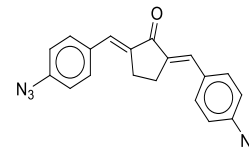


i26

(BRAGA et al., 2014b)

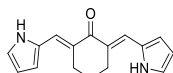
i27

(BRAGA et al., 2014b)



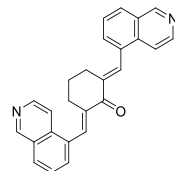
i28

(BRAGA et al., 2014b)



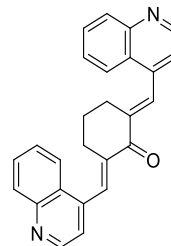
i29

(BRAGA et al., 2014b)



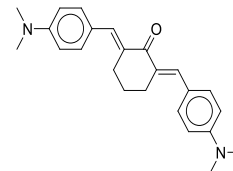
i30

(BRAGA et al., 2014b)



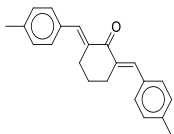
i31

(BRAGA et al., 2014b)

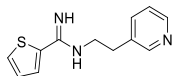


i32

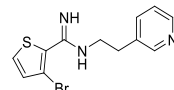
(BRAGA et al., 2014b)



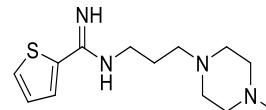
i33  
(BRAGA et al., 2014b)



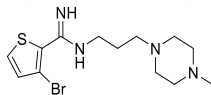
i34  
(MEIERING et al., 2005)



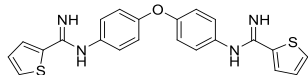
i35  
(MEIERING et al., 2005)



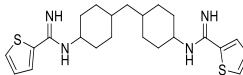
i36  
(MEIERING et al., 2005)



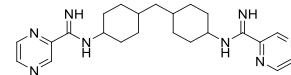
i37  
(MEIERING et al., 2005)



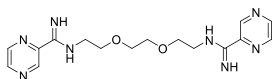
i38  
(MEIERING et al., 2005)



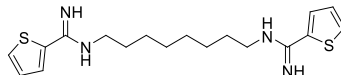
i39  
(MEIERING et al., 2005)



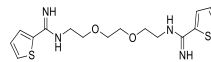
i40  
(MEIERING et al., 2005)



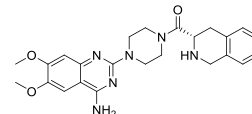
i41  
(MEIERING et al., 2005)



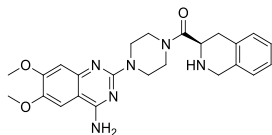
i42  
(MEIERING et al., 2005)



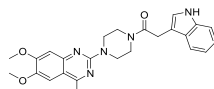
i43  
(MEIERING et al., 2005)



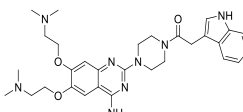
i44  
(CAVALLI et al., 2009)



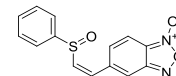
i45  
(CAVALLI et al., 2009)



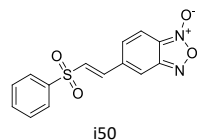
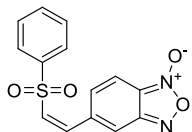
i46  
(CAVALLI et al., 2009)



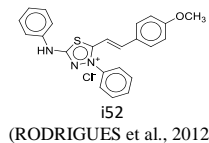
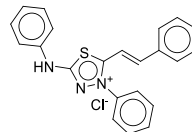
i47  
(CAVALLI et al., 2009)



i48  
(PORCAL et al., 2007)

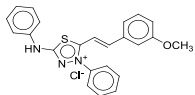


i50

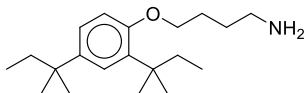


i52  
(RODRIGUES et al., 2012)

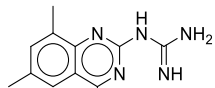
i49  
(PORCAL et al., 2007)



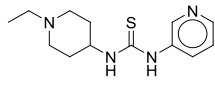
i53  
(RODRIGUES et al., 2012)



i57  
(HORVATH, 1997)

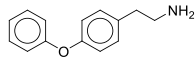


i61  
(HOLLOWAY et al., 2009)

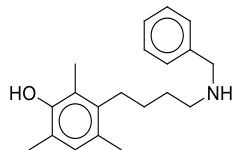


i65  
(HOLLOWAY et al., 2009)

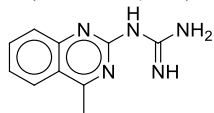
(PORCAL et al., 2007)



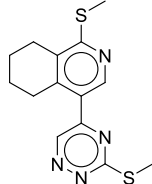
i54  
(HORVATH, 1997)



i58  
(PLANO et al., 2012)

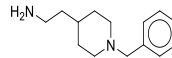


i62  
(HOLLOWAY et al., 2009)

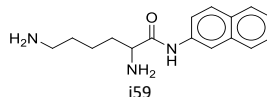


i66

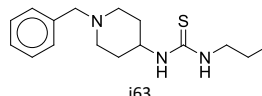
i51  
(RODRIGUES et al., 2012)



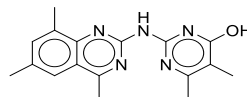
i55  
(HORVATH, 1997)



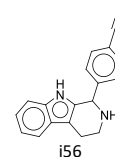
i59  
(HOLLOWAY et al., 2009)



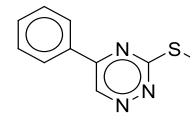
i63  
(HOLLOWAY et al., 2009)



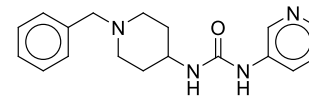
i67  
(HOLLOWAY et al., 2009)



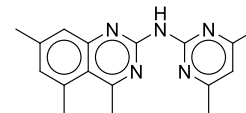
i56  
(HORVATH, 1997)



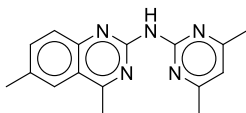
i60  
(HOLLOWAY et al., 2009)



i64  
(HOLLOWAY et al., 2009)



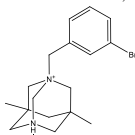
i68  
(HOLLOWAY et al., 2009)



i69

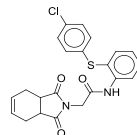
(HOLLOWAY et al., 2009)

(HOLLOWAY et al., 2009)



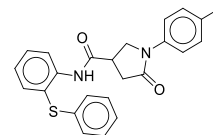
i70

(PEREZ-PINEIRO et al., 2009)



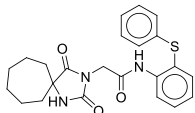
i71

(PEREZ-PINEIRO et al., 2009)



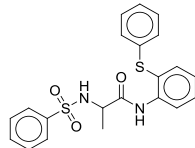
i72

(PEREZ-PINEIRO et al., 2009)



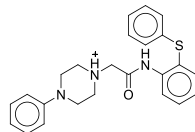
i73

(PEREZ-PINEIRO et al., 2009)



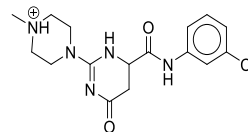
i74

(PEREZ-PINEIRO et al., 2009)



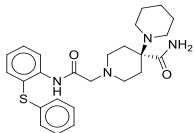
i75

(PEREZ-PINEIRO et al., 2009)



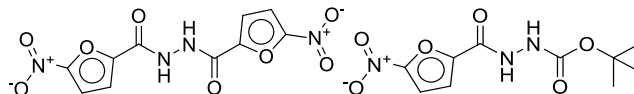
i76

(PEREZ-PINEIRO et al., 2009)



i77

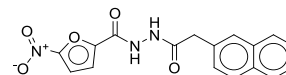
(PEREZ-PINEIRO et al., 2009)



i78

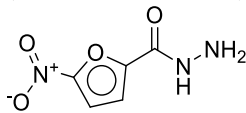
(MILLET et al., 2002)

(MILLET et al., 2002)



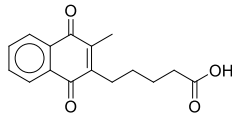
i80

(MILLET et al., 2002)



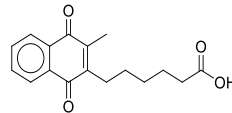
i81

(MILLET et al., 2002)



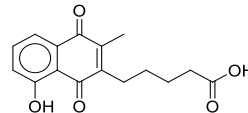
i82

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



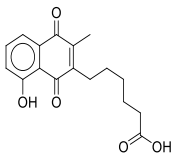
i83

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



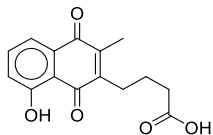
i84

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



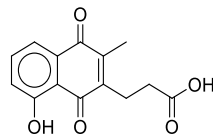
i85

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



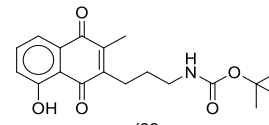
i86

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



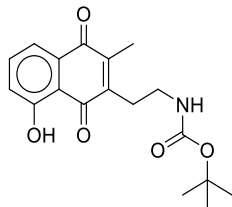
i87

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



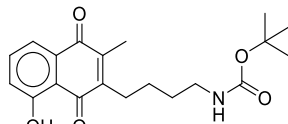
i88

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



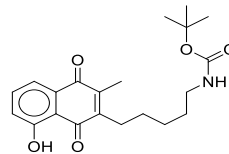
i89

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



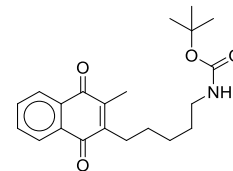
i90

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



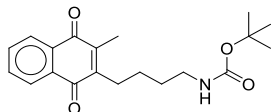
i91

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



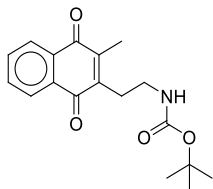
i92

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



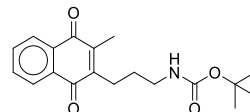
i93

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



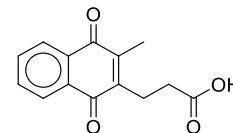
i94

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



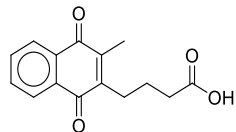
i95

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



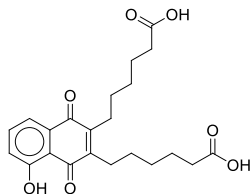
i96

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



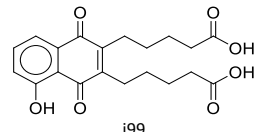
i97

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



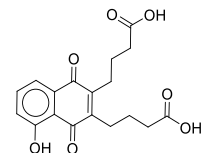
i98

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



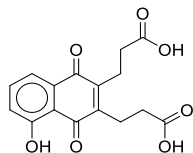
i99

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



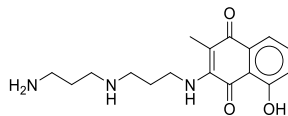
i100

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



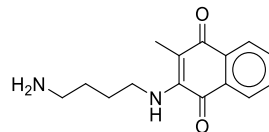
i101

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



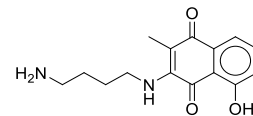
i102

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



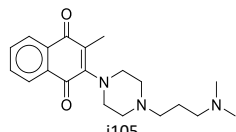
i103

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



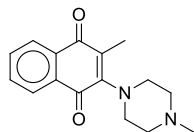
i104

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



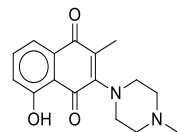
i105

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



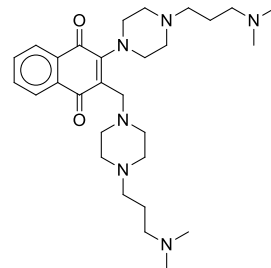
i106

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



i107

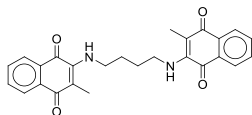
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



i108

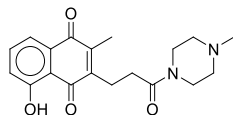
(SALMON-CHEMIN et al., 2001)





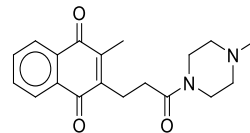
i109

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



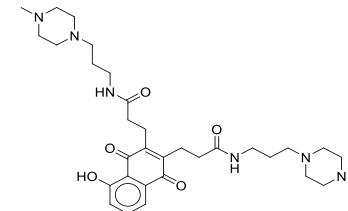
i110

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



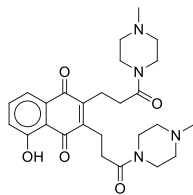
i111

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



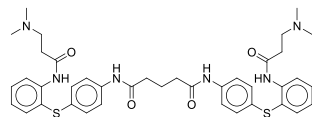
i112

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



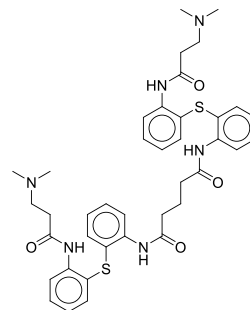
i113

(SALMON-CHEMIN et al., 2001)



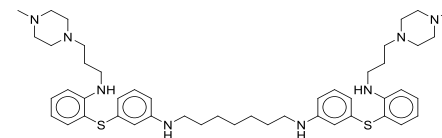
i114

(GIRAULT et al., 1997)



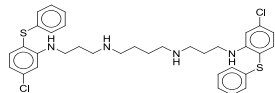
i115

(GIRAULT et al., 1997)

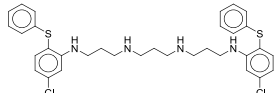


i116

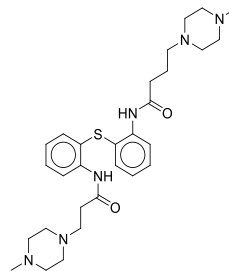
(GIRAULT et al., 1997)



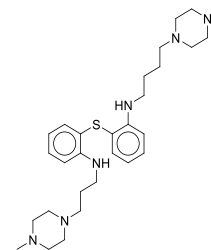
i117  
(GIRAULT et al., 1997)



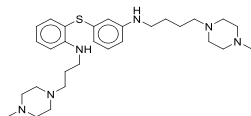
i118  
(GIRAULT et al., 1997)



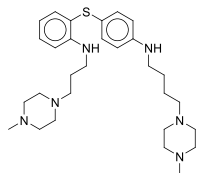
i119  
(GIRAULT et al., 1997)



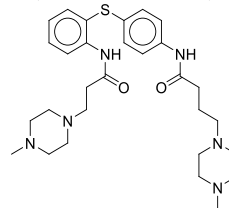
i120  
(GIRAULT et al., 1997)



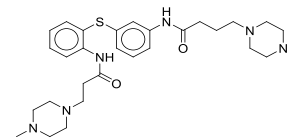
i121  
(GIRAULT et al., 1997)



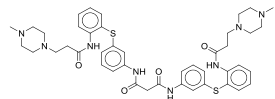
i122  
(GIRAULT et al., 1997)



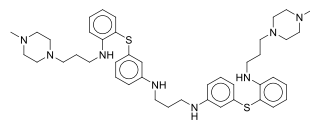
i123  
(GIRAULT et al., 1997)



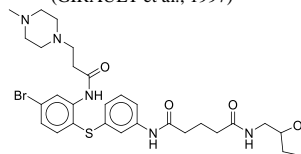
i124  
(GIRAULT et al., 1997)



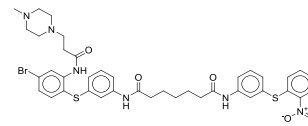
i125  
(GIRAULT et al., 1997)



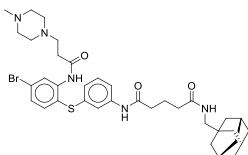
i126  
(GIRAULT et al., 1997)



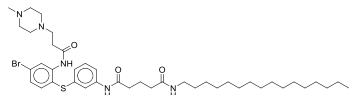
i127  
(GIRAULT et al., 1998)



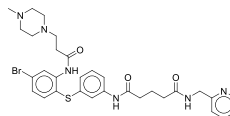
i128  
(GIRAULT et al., 1998)



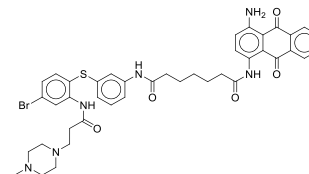
i129  
i(GIRAULT et al., 1998)



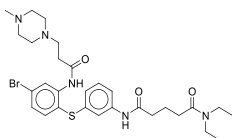
i130  
(GIRAULT et al., 1998)



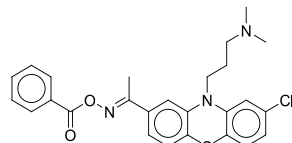
i131  
(GIRAULT et al., 1998)



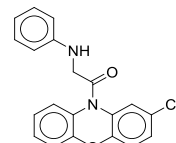
i132  
(GIRAULT et al., 1998)



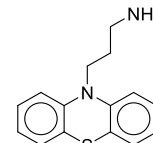
i133  
(GIRAULT et al., 1998)



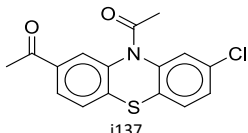
i134  
(CHAN et al., 1998)



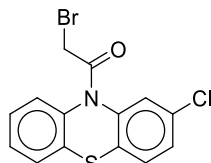
i135  
(CHAN et al., 1998)



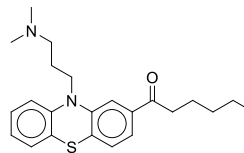
i136  
(CHAN et al., 1998)



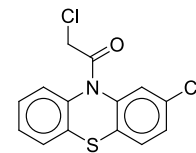
i137  
(CHAN et al., 1998)



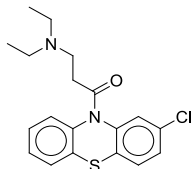
i138  
(CHAN et al., 1998)



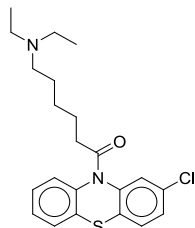
i139  
(CHAN et al., 1998)



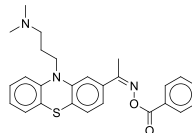
i140  
(CHAN et al., 1998)



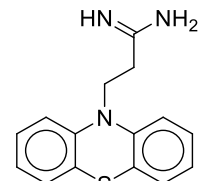
i141  
(CHAN et al., 1998)



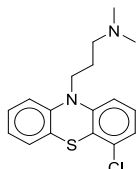
i142  
(CHAN et al., 1998)



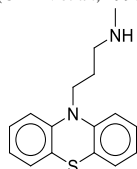
i143  
(CHAN et al., 1998)



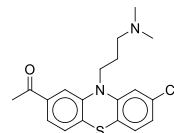
i144  
(CHAN et al., 1998)



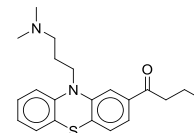
i145  
(CHAN et al., 1998)



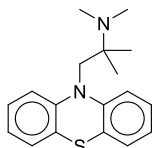
i146  
(CHAN et al., 1998)



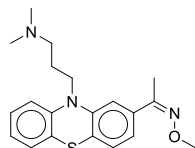
i147  
(CHAN et al., 1998)



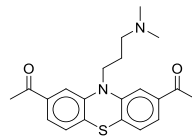
i148  
(CHAN et al., 1998)



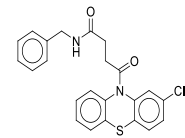
i149  
(CHAN et al., 1998)



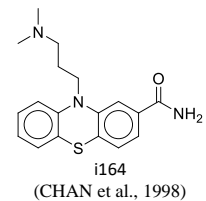
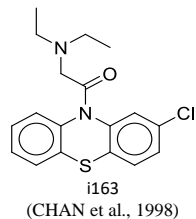
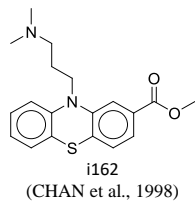
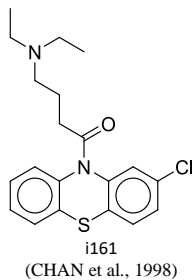
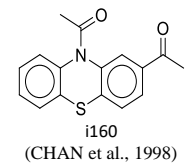
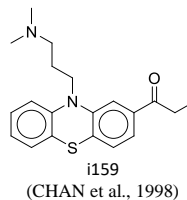
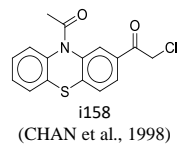
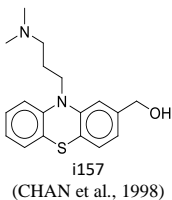
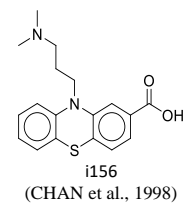
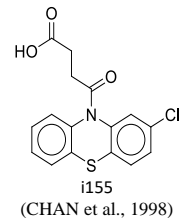
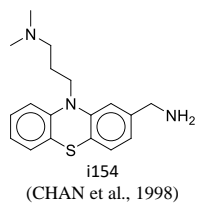
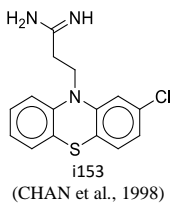
i150  
(CHAN et al., 1998)

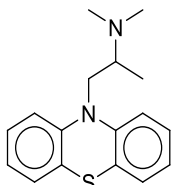


i151  
(CHAN et al., 1998)

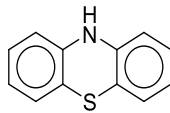


i152  
(CHAN et al., 1998)

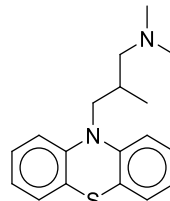




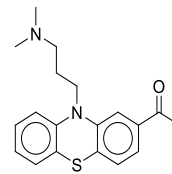
i165  
(CHAN et al., 1998)



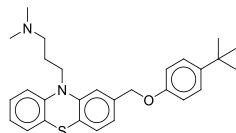
i166  
(CHAN et al., 1998)



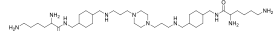
i167  
(CHAN et al., 1998)



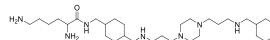
i168  
(CHAN et al., 1998)



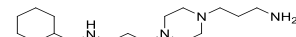
i169  
(CHAN et al., 1998)



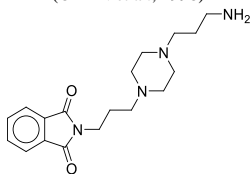
i170  
(DAVIOUD-CHARVET et al., 1999)



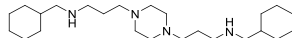
i171  
(DAVIOUD-CHARVET et al., 1999)



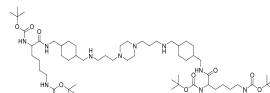
i172  
(DAVIOUD-CHARVET et al., 1999)



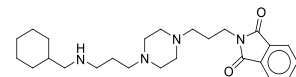
i173  
(DAVIOUD-CHARVET et al., 1999)



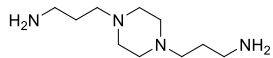
i174  
(DAVIOUD-CHARVET et al., 1999)



i175  
(DAVIOUD-CHARVET et al., 1999)

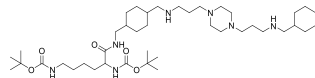


i176  
(DAVIOUD-CHARVET et al., 1999)



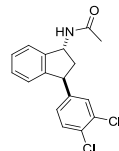
i177

(DAVIOUD-CHARVET et al., 1999)



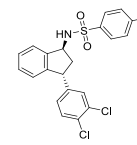
i178

iDAVIOUD-CHARVET et al., 1999)



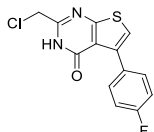
i179

(WALTON et al., 2011)



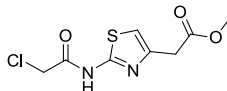
i180

(WALTON et al., 2011)



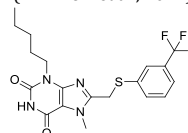
i181

(FUELLER et al., 2012)



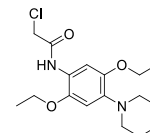
i182

(FUELLER et al., 2012)



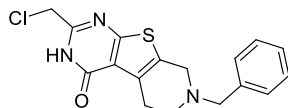
i183

(FUELLER et al., 2012)



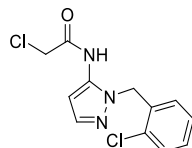
i184

(FUELLER et al., 2012)



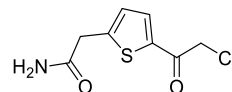
i185

(FUELLER et al., 2012)



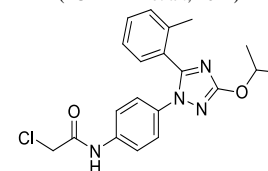
i186

(FUELLER et al., 2012)



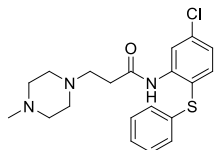
i187

(FUELLER et al., 2012)



i188

(FUELLER et al., 2012)



I189

(STUMP et al., 2008)





## Espectros análogos S21

Figura S4: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **93** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

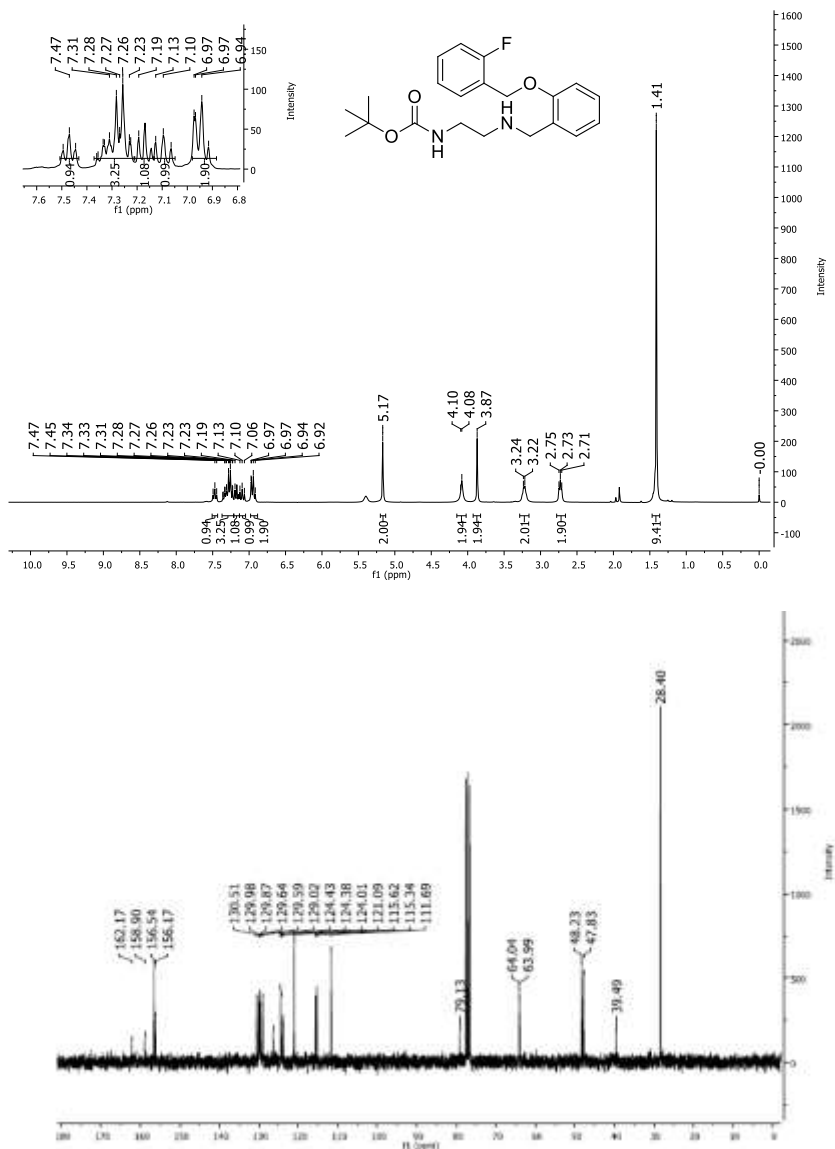


Figura S5: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **94** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

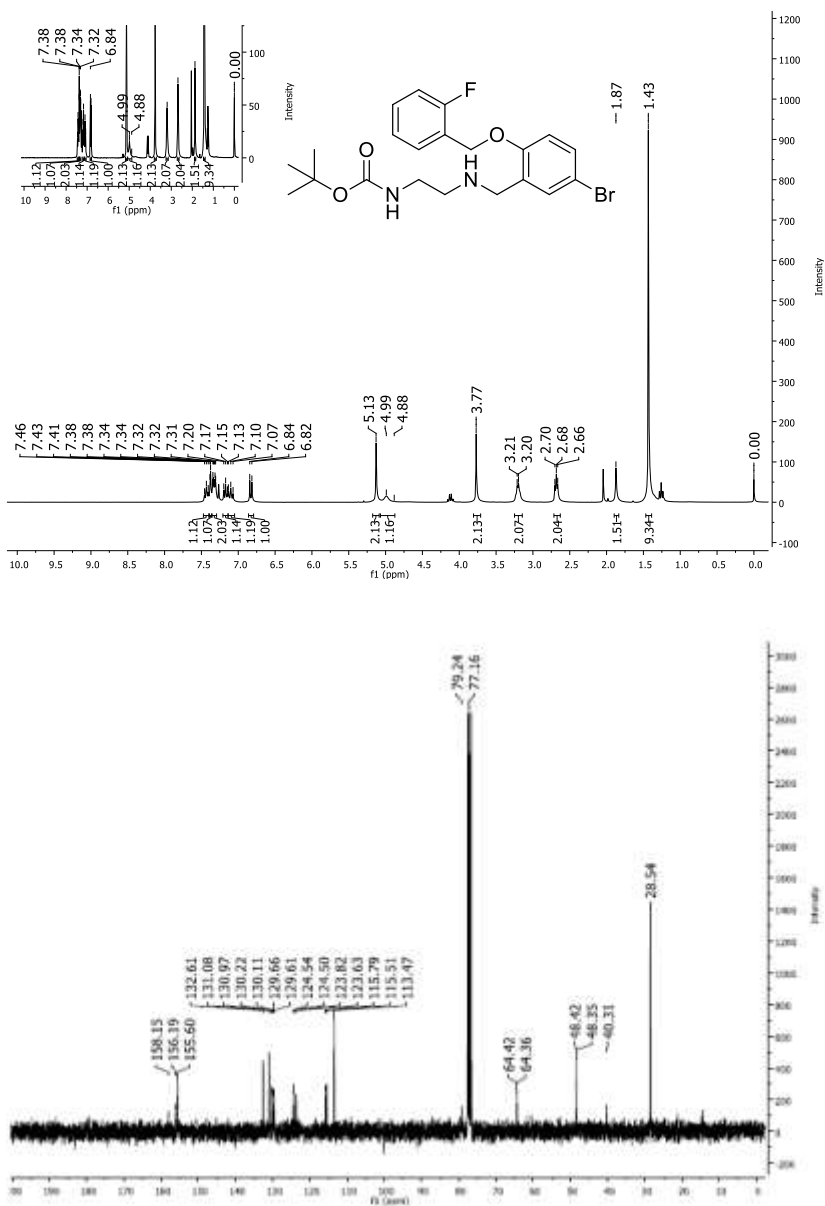


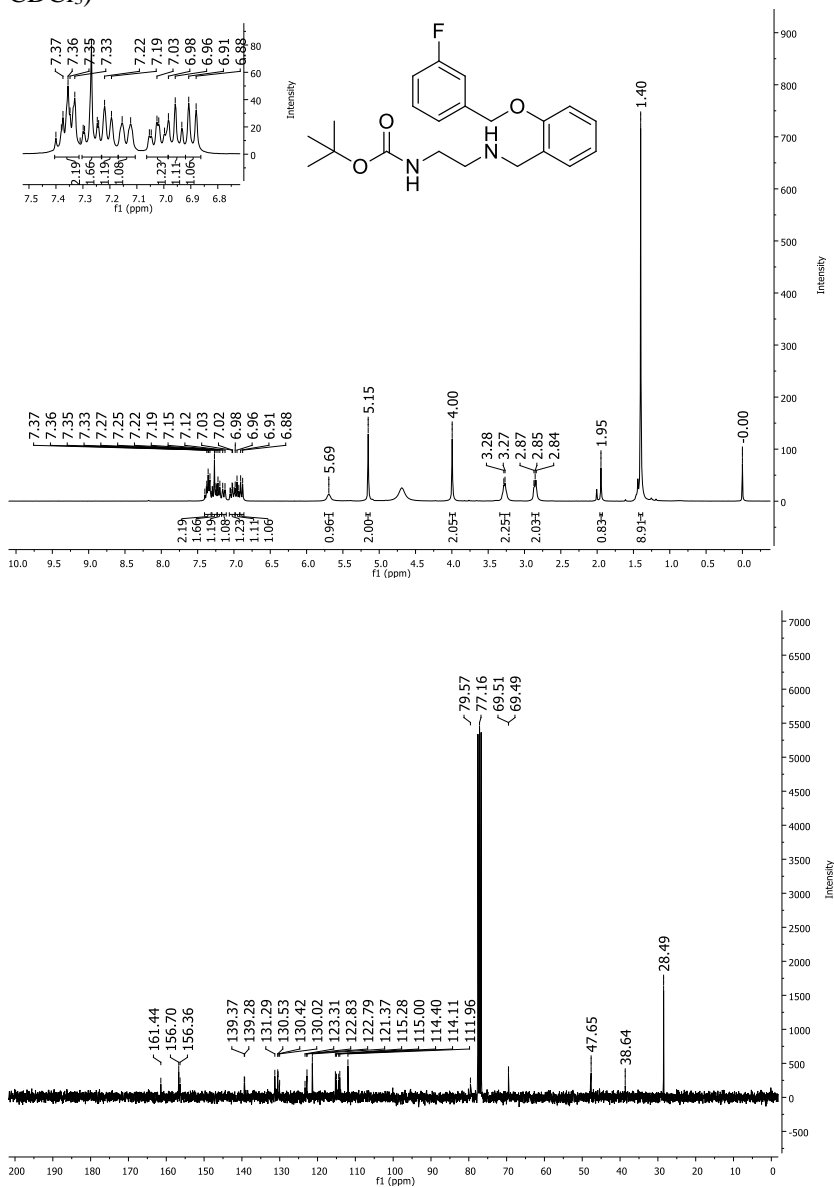
Figura S6: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **95** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Figura S7: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **96** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

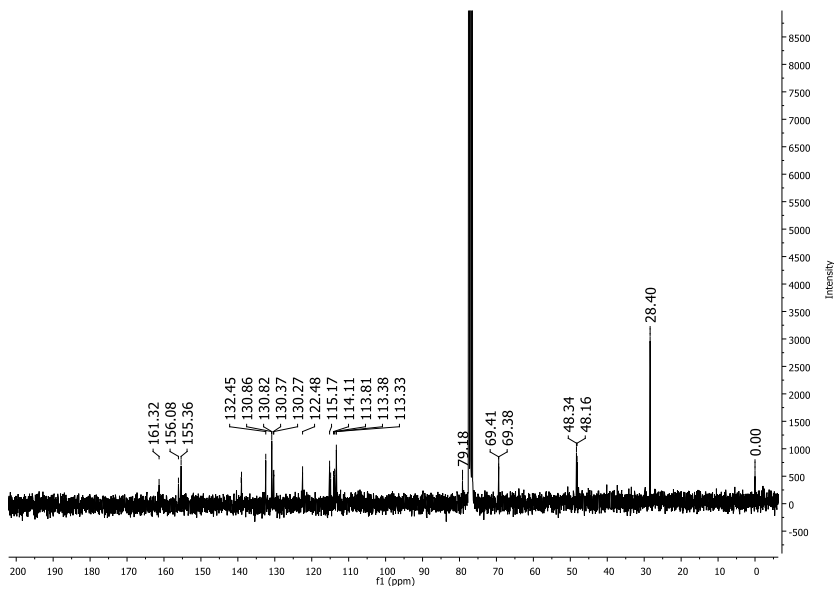


Figura S8: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **97** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

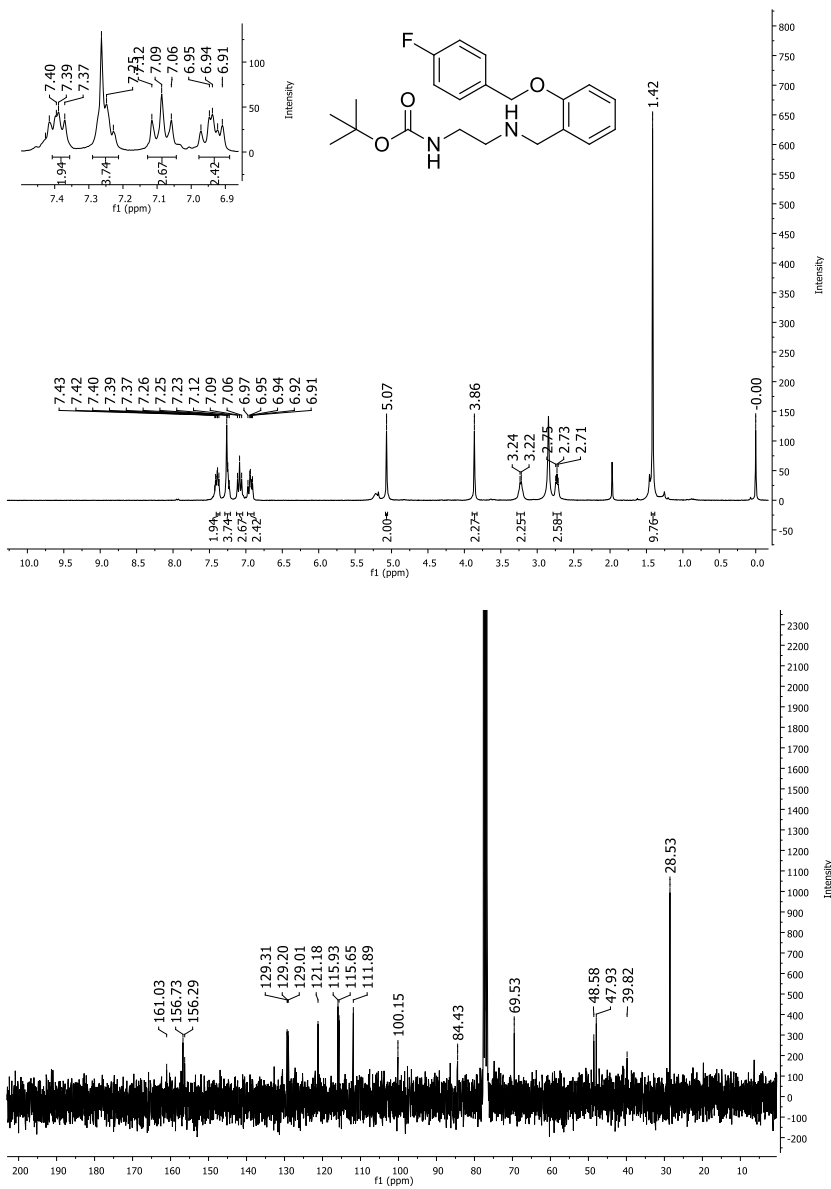


Figura S9: Espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR do composto **98** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

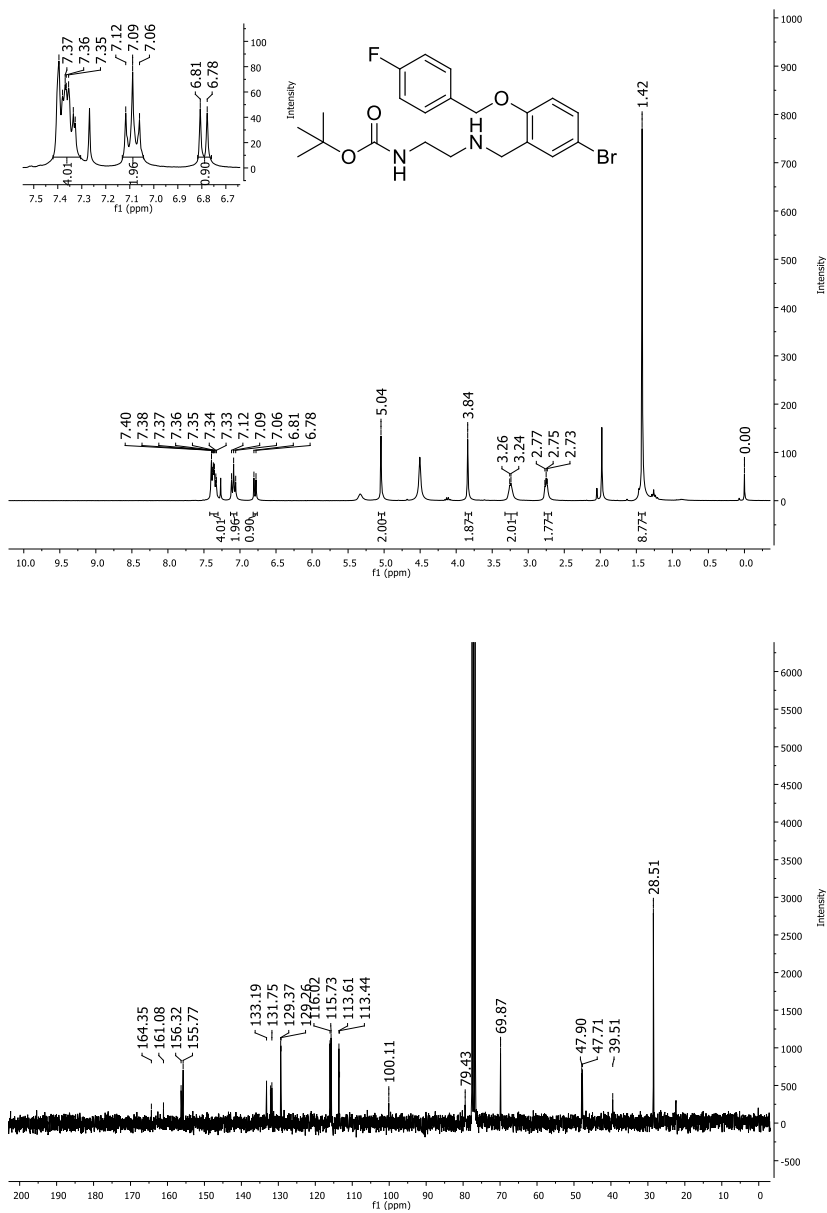


Figura S10: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **105** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

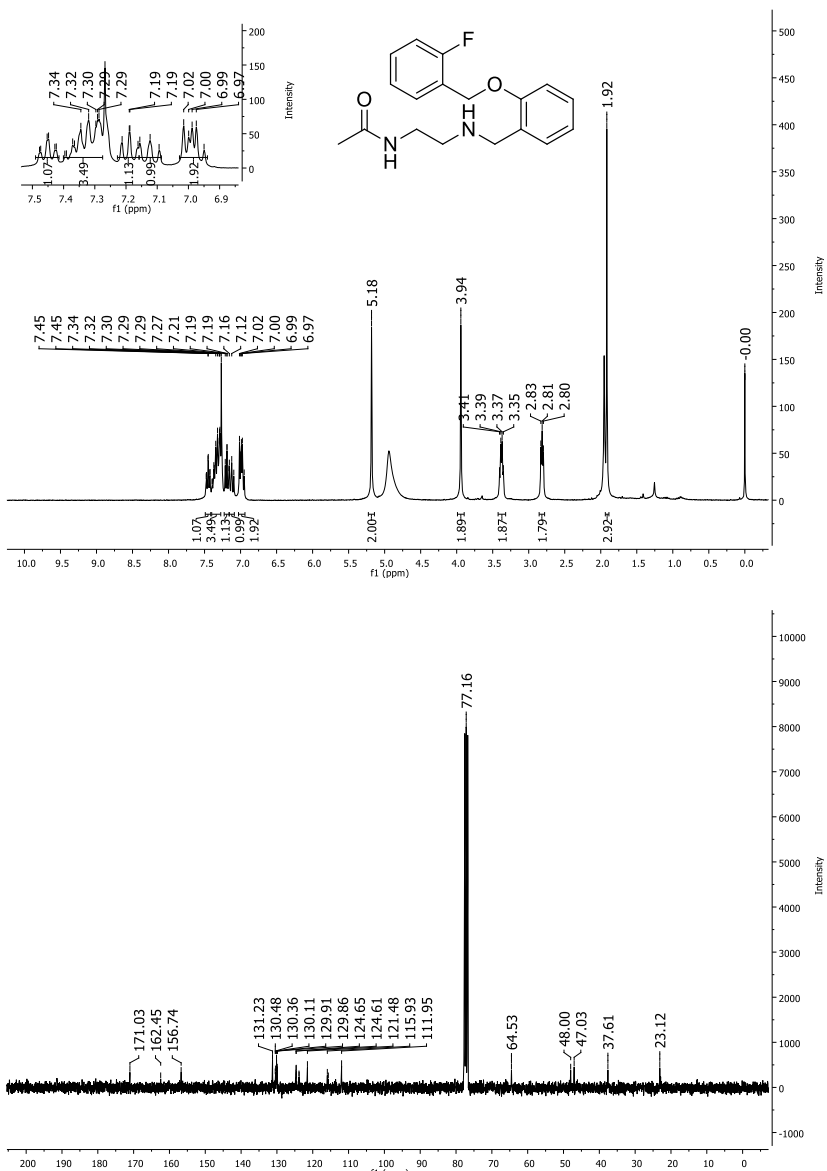


Figura S11: Espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR do composto **106** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



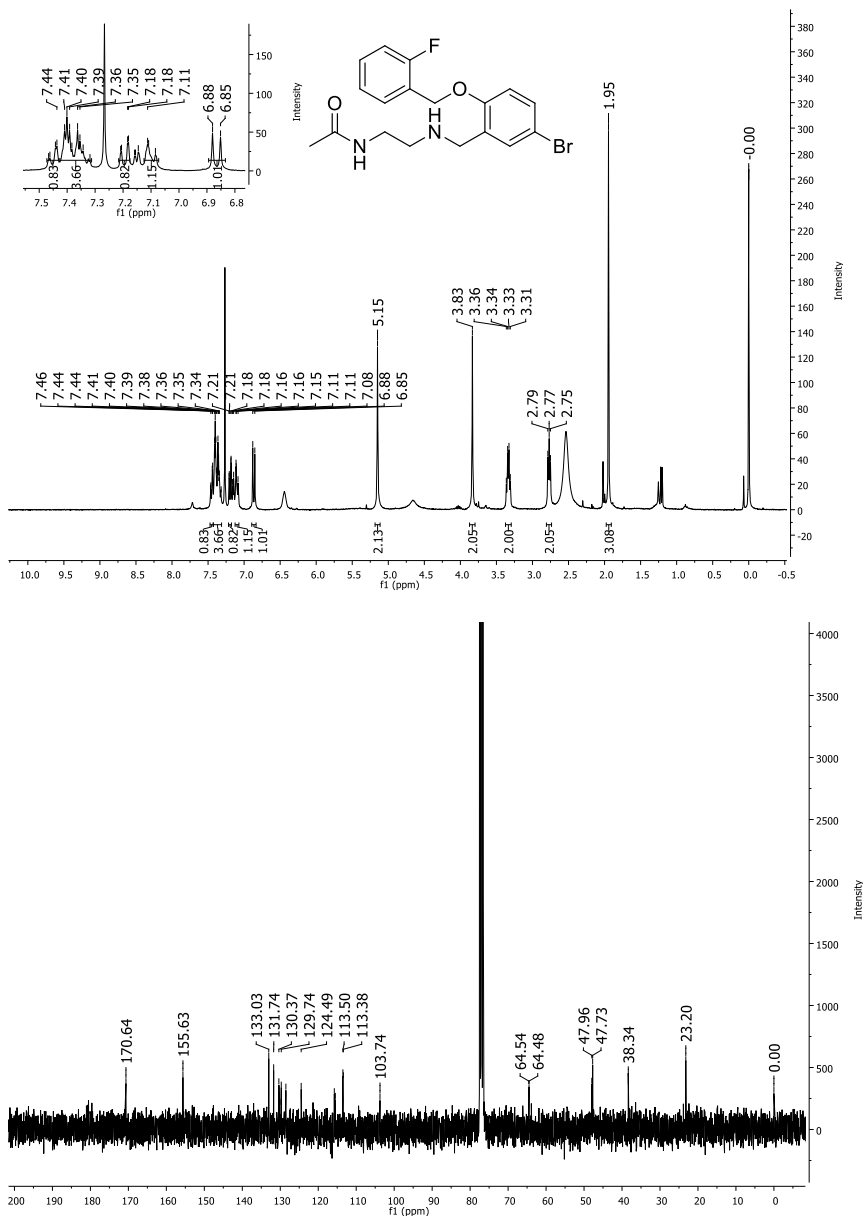
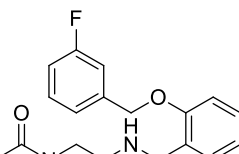


Figura S12: Espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR do composto **107** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



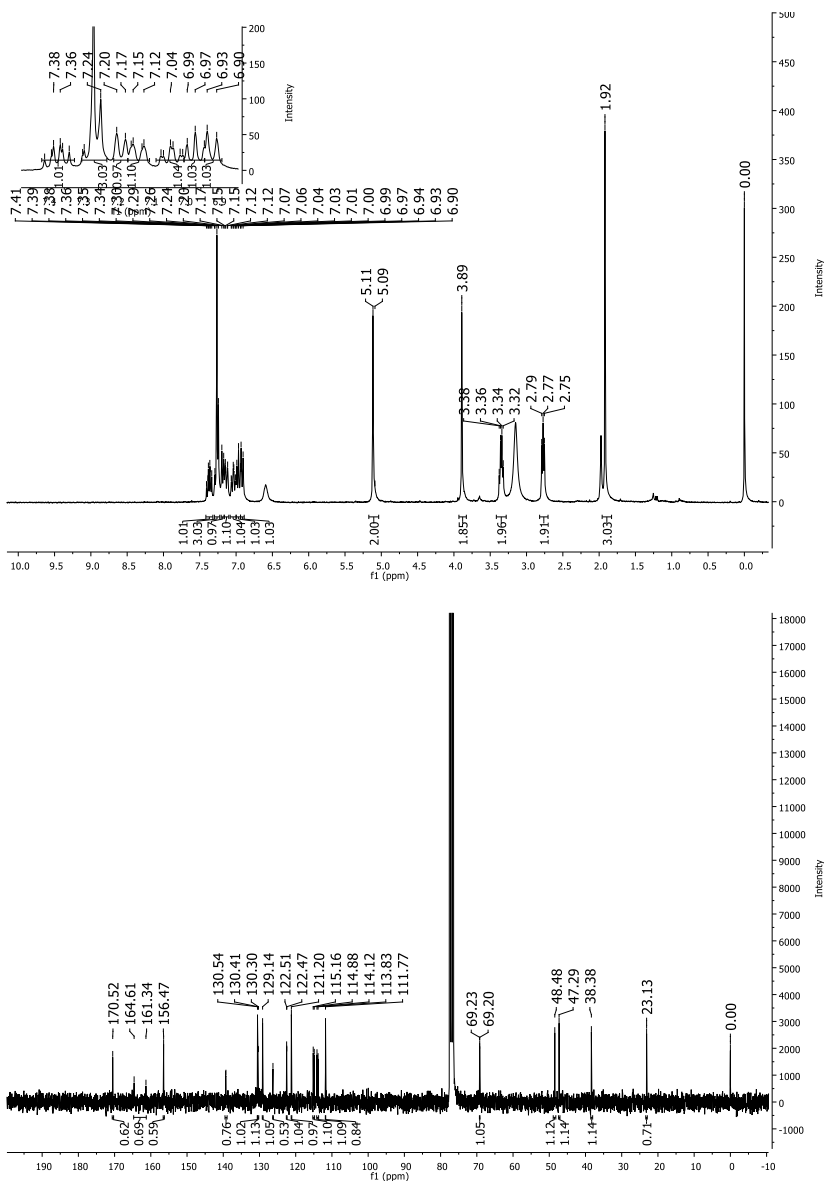


Figura S13: Espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR do composto **108** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

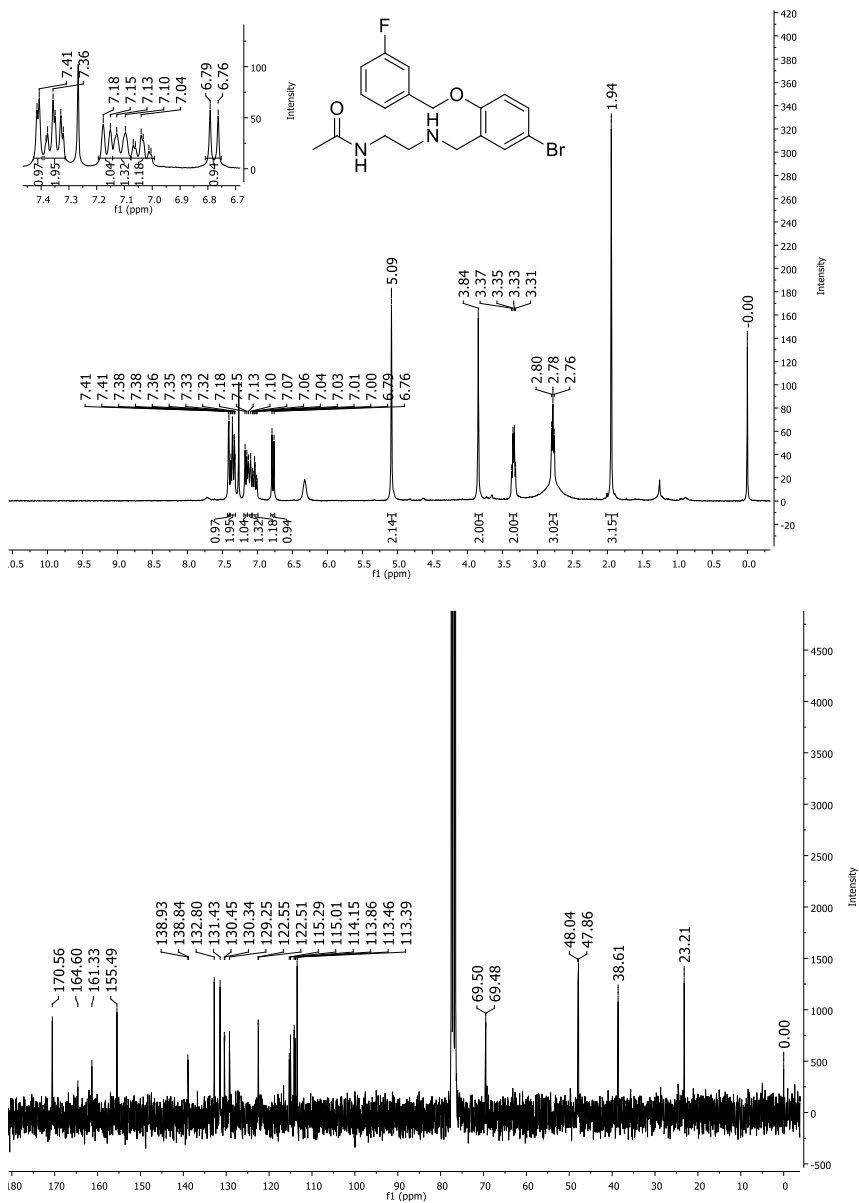


Figura S14: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **109** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

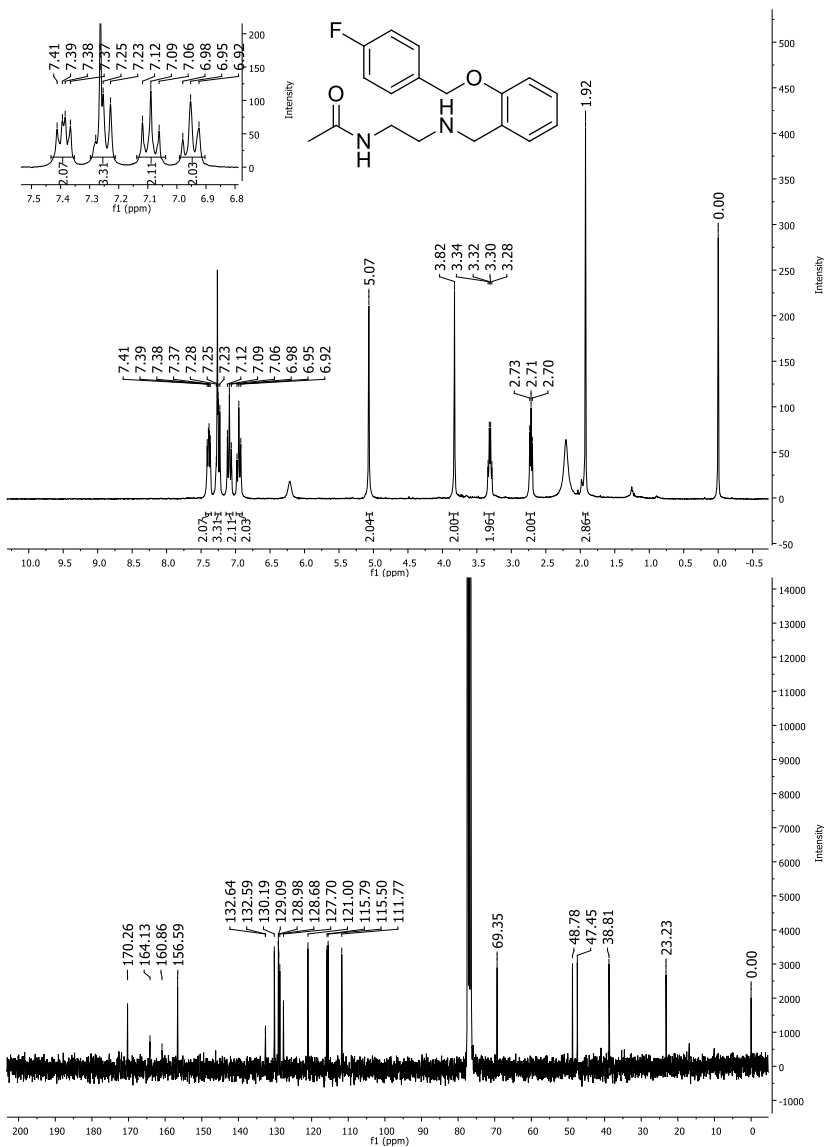
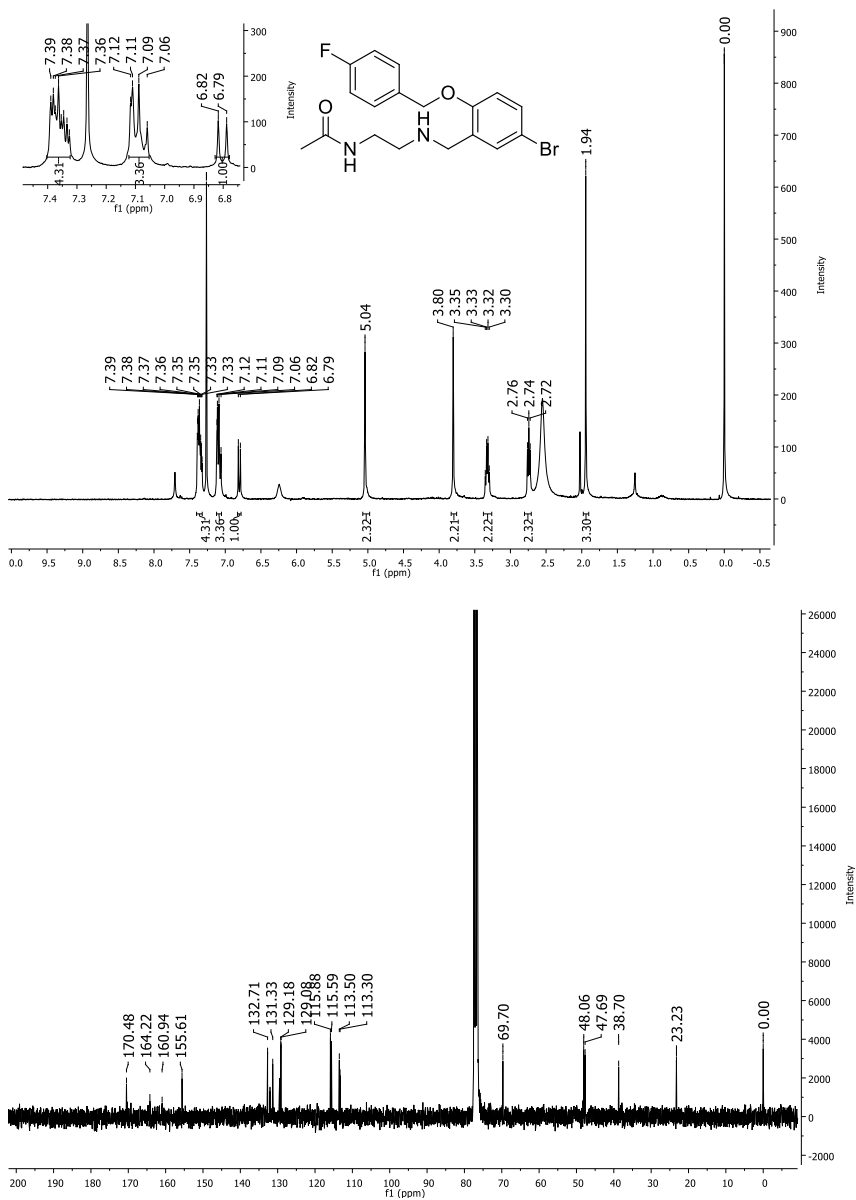


Figura S15: Espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR do composto **110** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



## Espectros análogos S33

Figura S16: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **118** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

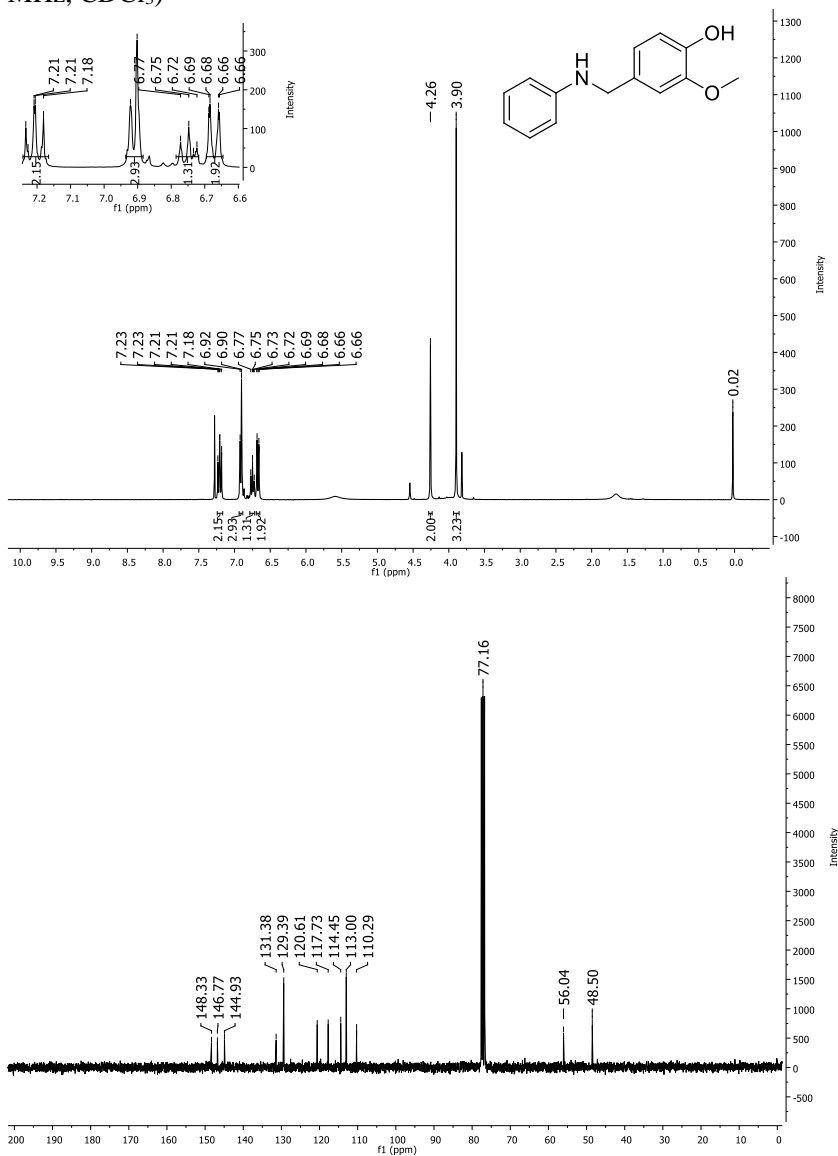


Figura S17: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **119** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

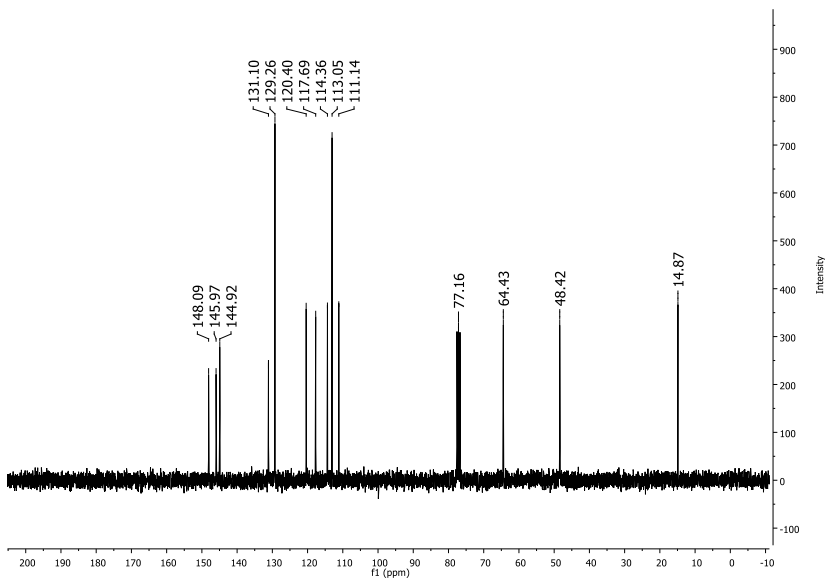
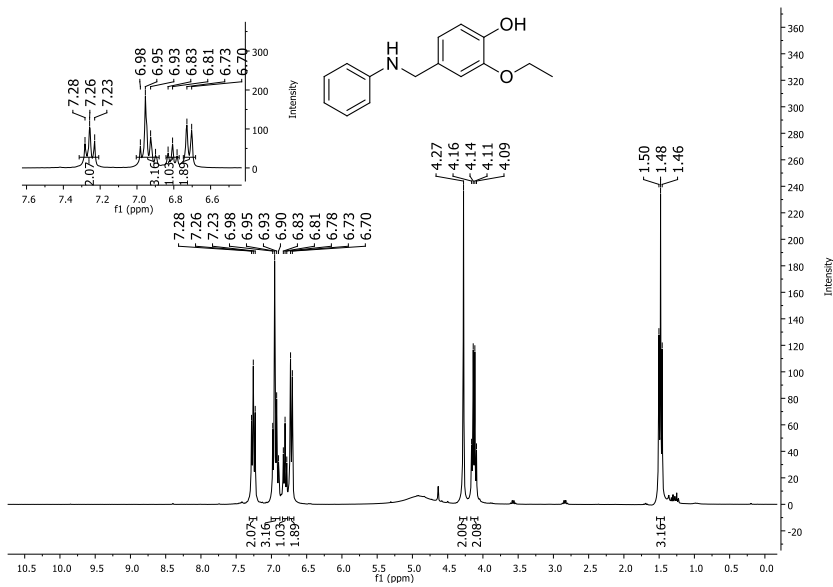
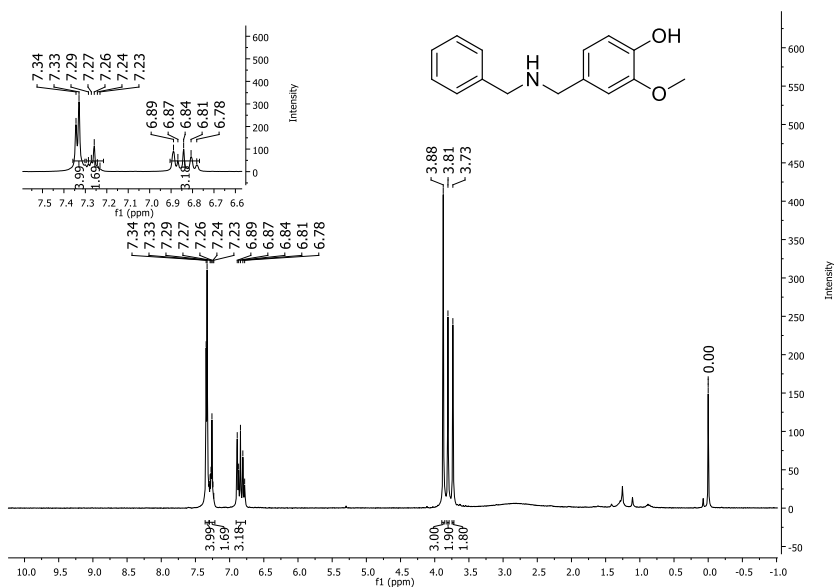


Figura S18: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **120** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



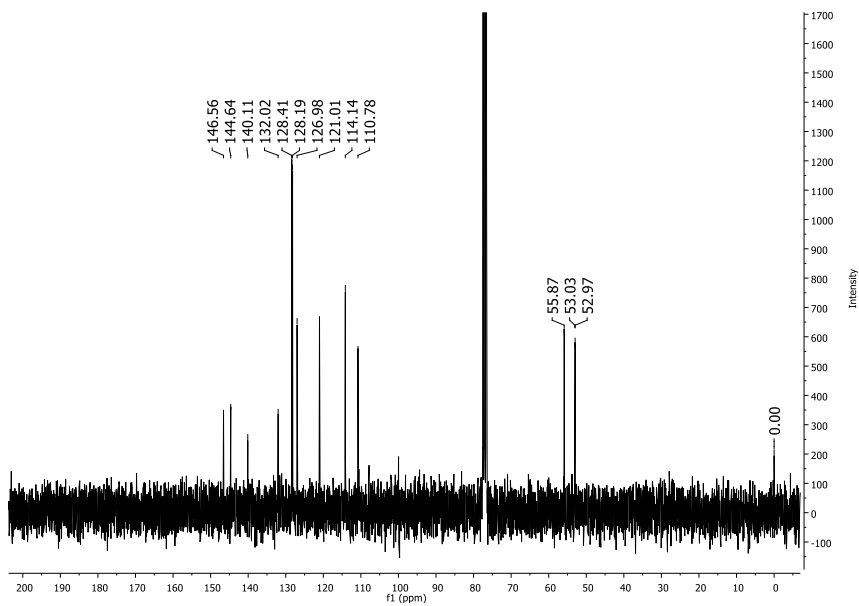
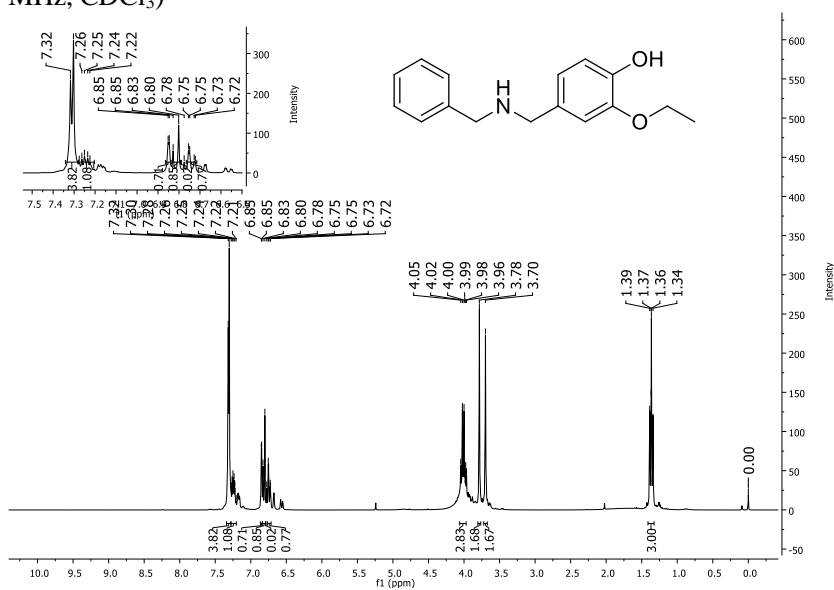


Figura S19: Espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR do composto **121** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



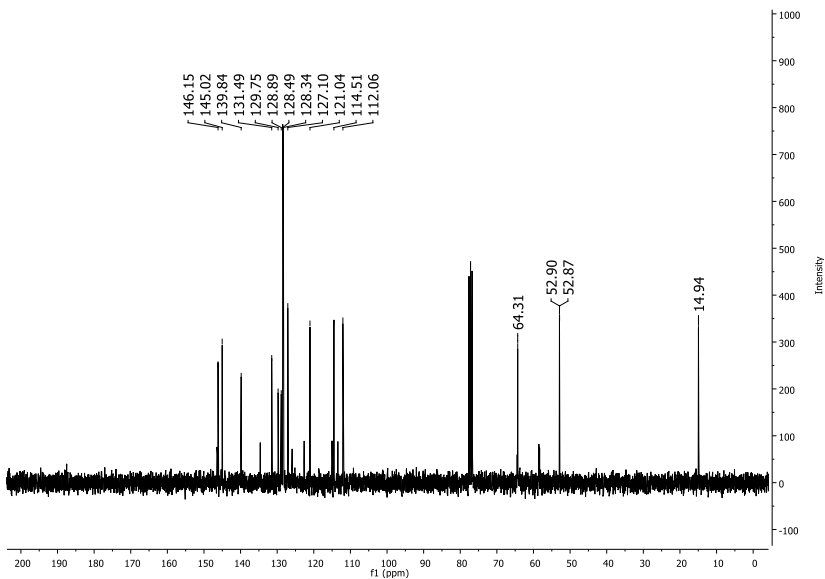
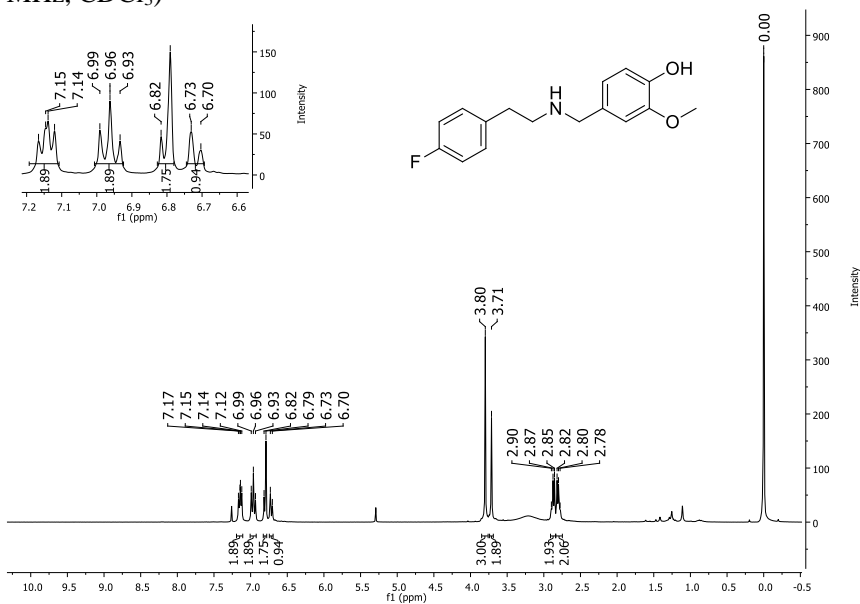


Figura S20: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **122** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



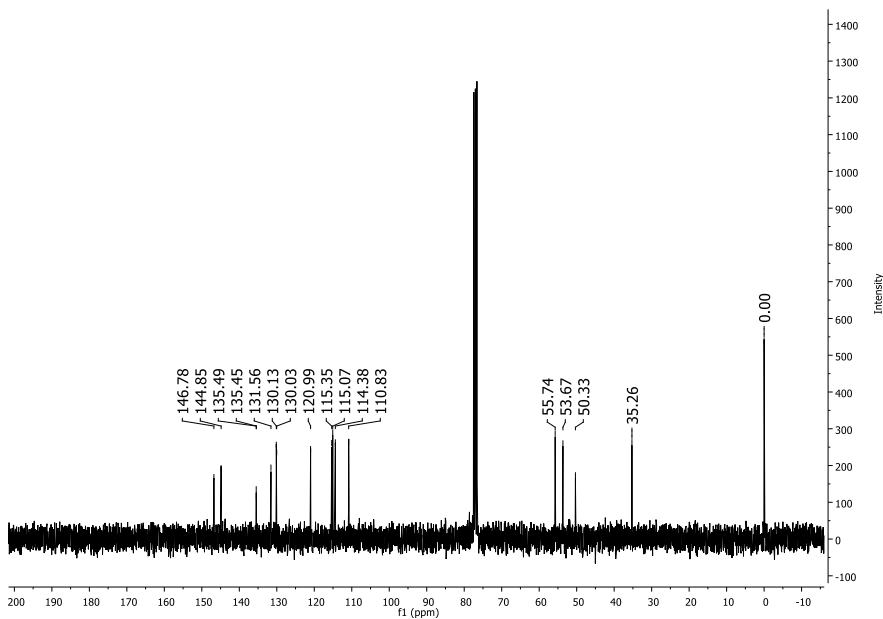
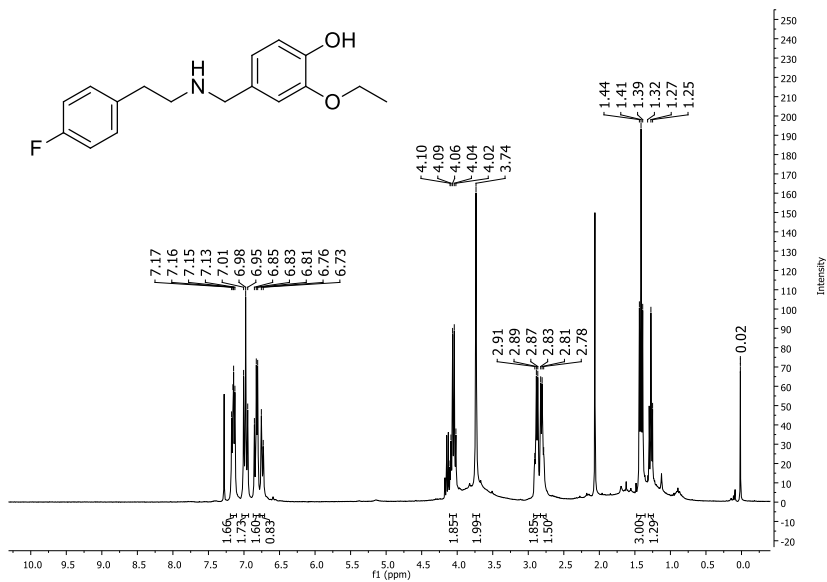


Figura S21: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **123** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



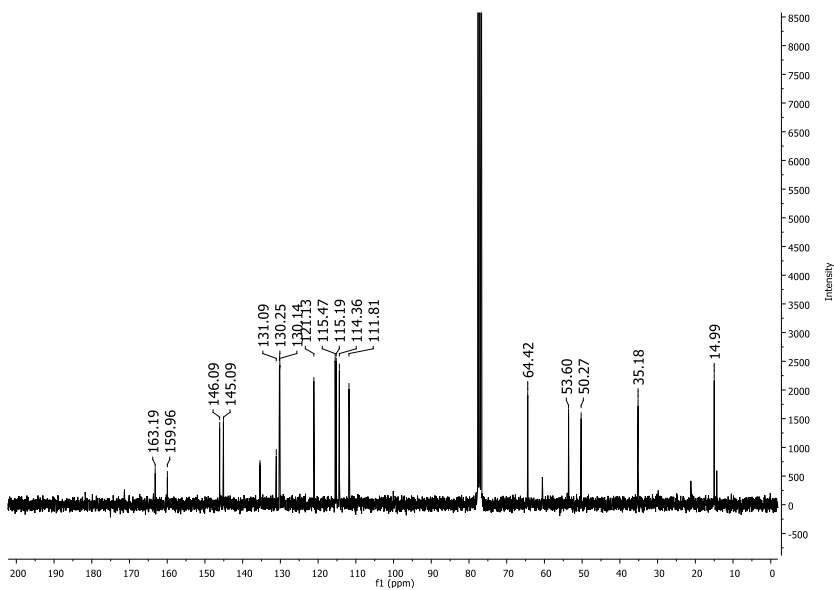
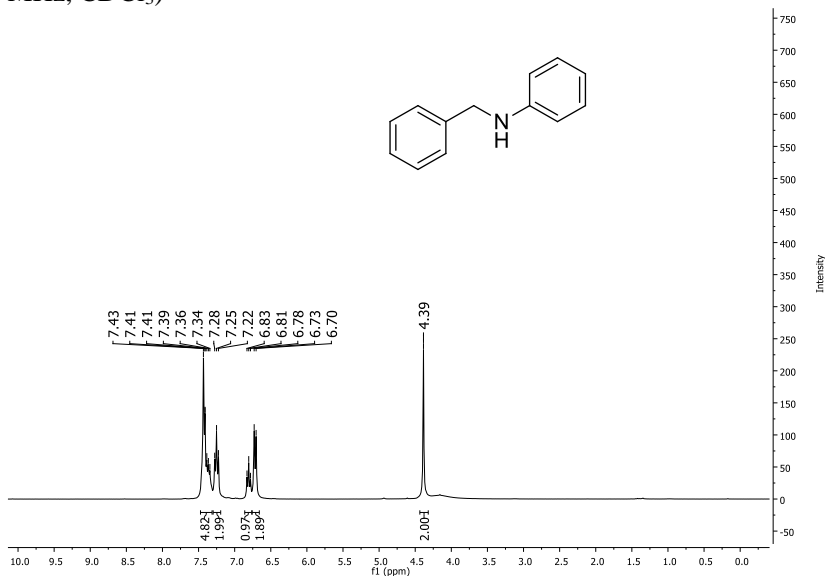


Figura S22: Espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR do composto **124** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



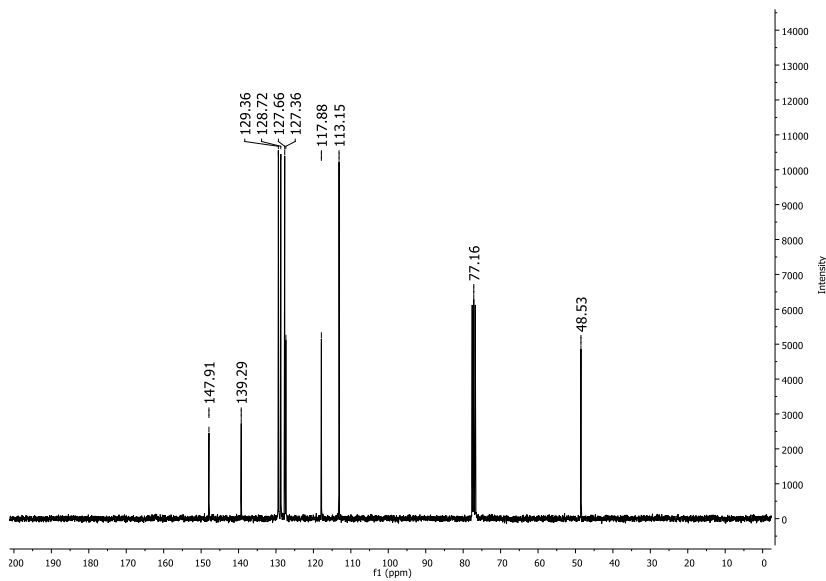
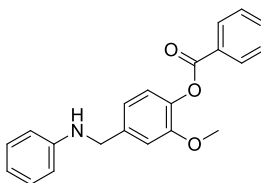


Figura S23: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **137** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



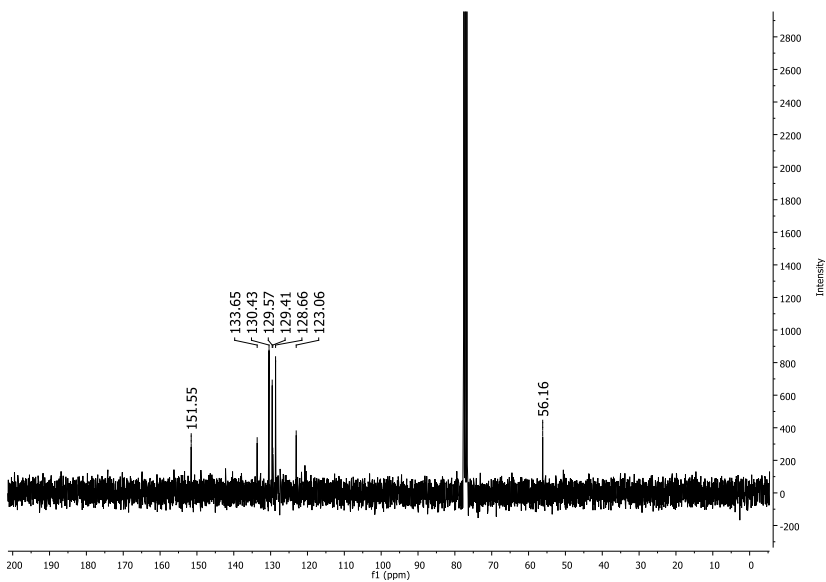
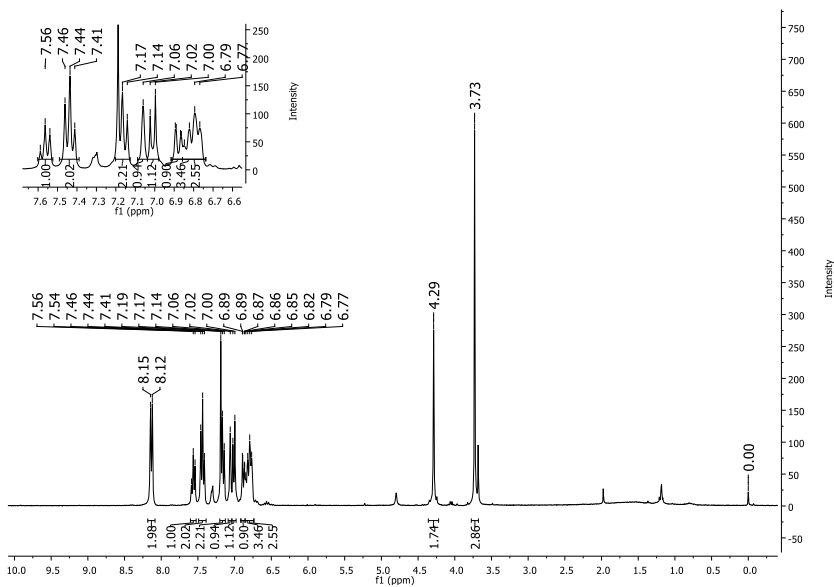


Figura S24: Espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR do composto **138** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

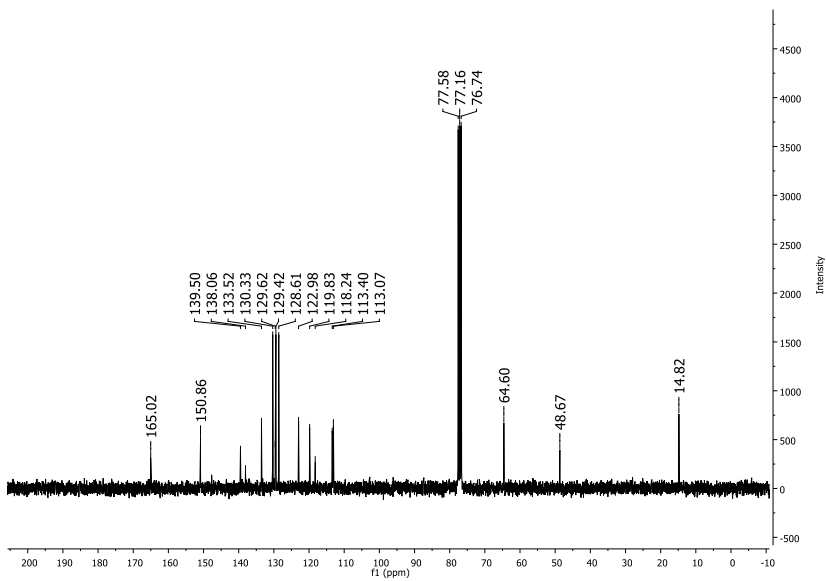
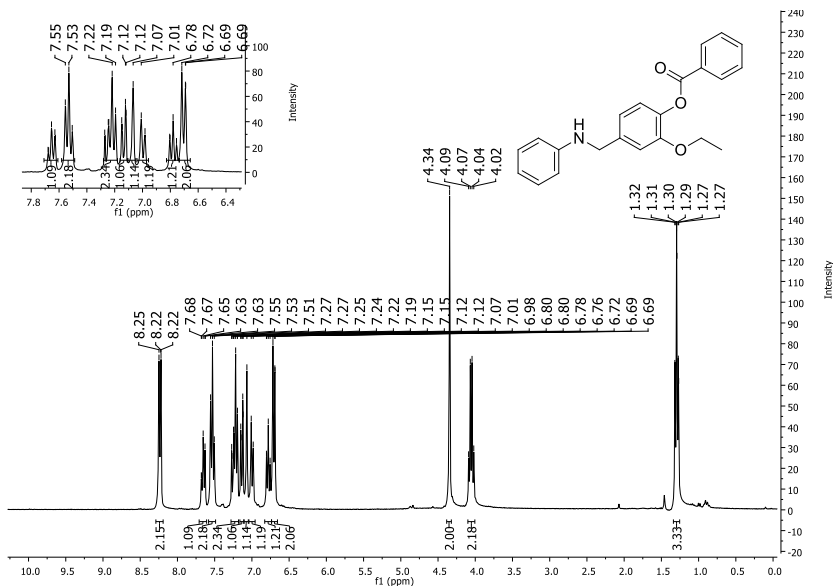


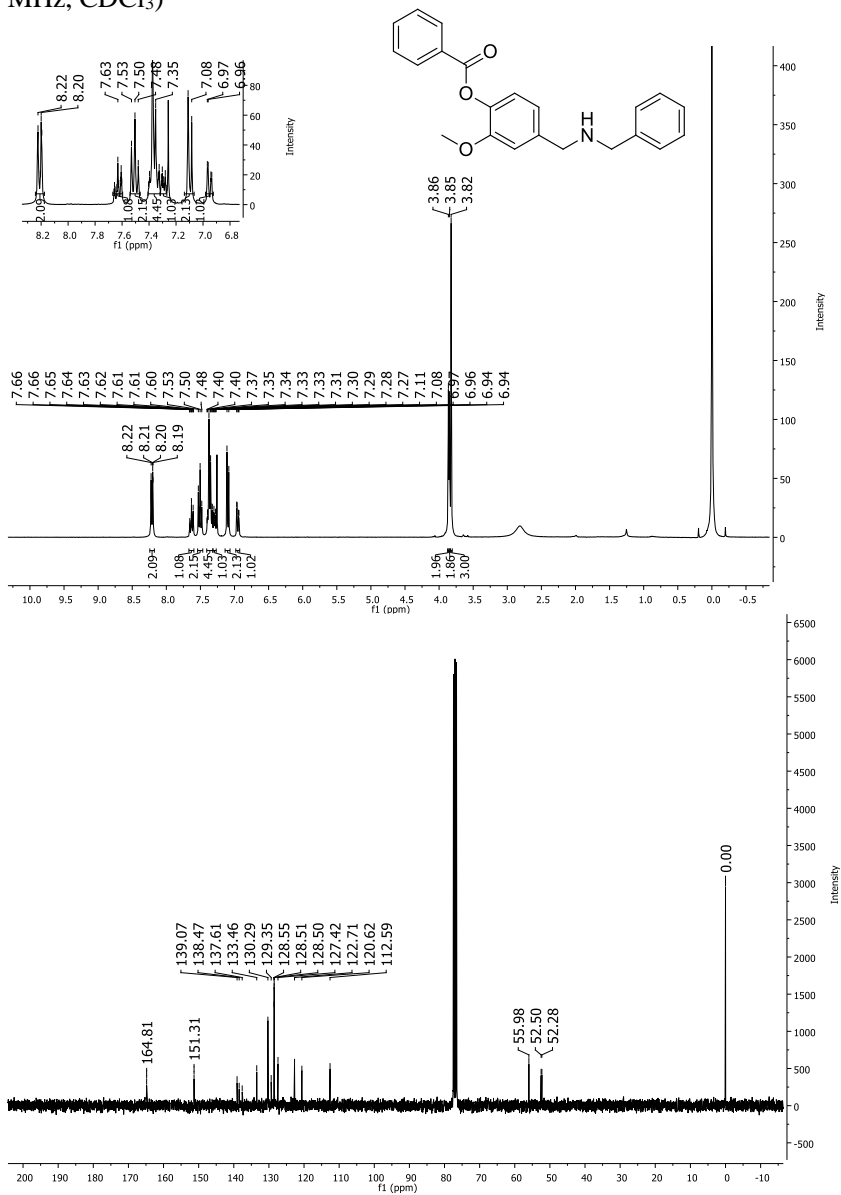
Figura S25: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **139** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



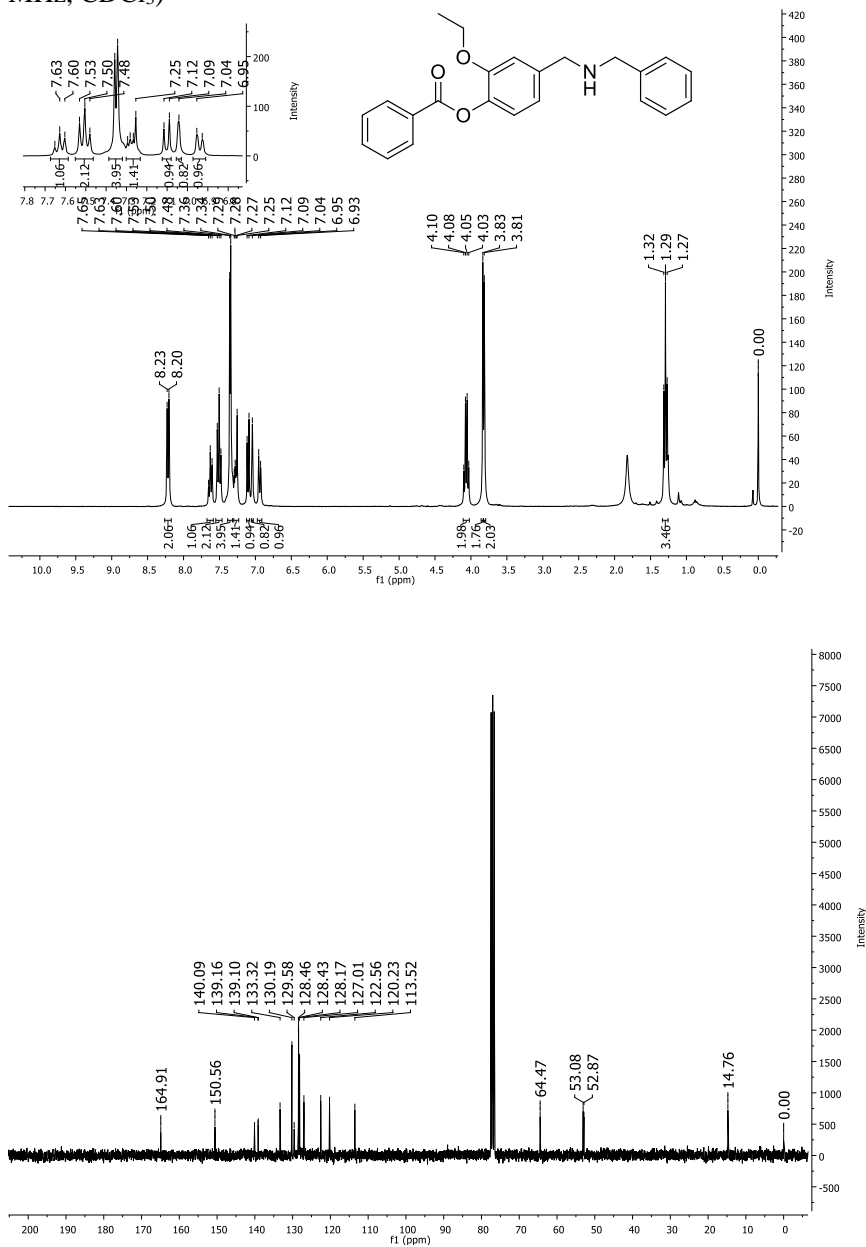
Figura S26: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **140** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

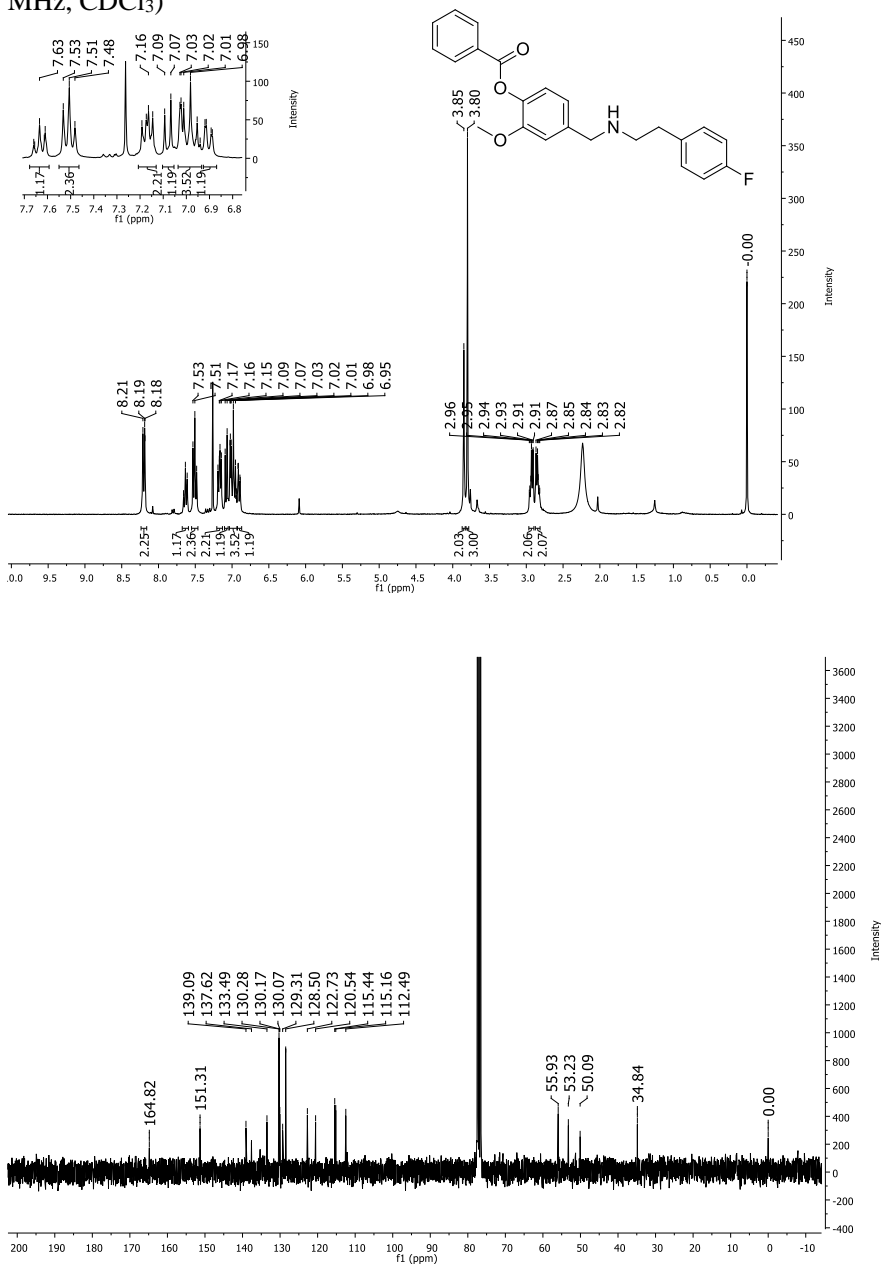
Figura S27: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **141** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Figura S28: Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **142** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )