



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**PLANEJAMENTO RACIONAL DE NOVAS CUMARINAS COMO POTENCIAIS
INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES DO *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma brucei***

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

JÉSSICA ALVES NUNES

**PLANEJAMENTO RACIONAL DE NOVAS CUMARINAS COMO POTENCIAIS
INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES DO *Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma
brucei***

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sílvia Helena Cardoso

MACEIÓ - AL

2023

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

N972p Nunes, Jéssica Alves.

Planejamento racional de novas cumarinas como potenciais inibidores de cisteíno proteases do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* / Jéssica Alves Nunes. – 2023.

125 f. : il. color.

Orientador: Edeildo Ferreira da Silva Júnior.

Coorientadora: Sílvia Helena Cardoso.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 83-95.

Apêndices: f. 96-104.

Anexos: f. 105-125.

1. Doença de Chagas. 2. Tripanossomiase africana. 3. Fármacos. 4. Cruzaina. 5. Catepsina. 6. Cisteíno proteases L. 7. *Docking* molecular. I. Título.

CDU: 54 : 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA**



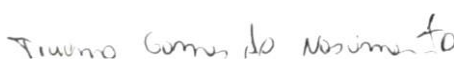
BR 104 Km14, Campus A. C.
SimõesCidade Universitária, Tabuleiro
dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestranda **Jéssica Alves Nunes** intitulada: “*Planejamento Racional de Novas Cumarinas como Potenciais Inibidores de Cisteíno Proteases do Trypanosoma cruzi e Trypanosoma brucei*”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 20 de junho de 2023, às 9h, na sala da Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia/IQB.

Maceió, 20 de junho de 2023.

Comissão Examinadora:


Dr. TICIANO GOMES DO NASCIMENTO,
UFAL
Examinador Externo

Documento assinado digitalmente
 JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS
Data: 20/06/2023 19:12:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>
Dr. JOSUÉ CARINHANHA CALDAS SANTOS,
UFAL
Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
 SILVIA HELENA CARDOSO
Data: 20/06/2023 21:50:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>
Dra. SILVIA HELENA CARDOSO, UFAL
Coorientadora

Documento assinado digitalmente
 EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR
Data: 21/06/2023 13:58:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>
Dr. EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR,
UFAL
Presidente

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar condições para enfrentar todos os desafios, bem como capacidade para persistir no processo e alcançar meus propósitos.

Aos meus pais e irmão, pelo amor, amparo e por sempre acreditarem e incentivarem meus sonhos. Sou imensamente grata pela vida de vocês e por tudo que fizeram/fazem pela minha formação pessoal e profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior, pelo direcionamento, dedicação e suporte na execução do projeto desta dissertação. Ainda, agradeço-o por compartilhar comigo seus valiosos ensinamentos ao longo deste percurso, bem como pelas oportunidades dedicadas à minha formação. A sua orientação contribuiu significativamente na minha formação acadêmica e no meu crescimento profissional.

À minha coorientadora Prof.^a Dr.^a. Sílvia Helena Cardoso pelas orientações acerca do trabalho desenvolvido, bem como por sua colaboração que foi essencial para esta pesquisa.

Aos membros examinadores da banca: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos e Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, por aceitarem o convite, disponibilizarem seu tempo e pelas enriquecedoras considerações a serem feitas ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Júnior, da Universidade Federal da Paraíba, pelo apoio destinado ao desenvolvimento desta pesquisa.

À equipe dos Professores James H. McKerrow e Jair Lage de Siqueira-Neto, da Universidade da Califórnia, Escola Skaggs de Farmácia, pela realização dos ensaios biológicos.

Ao grupo LQM/GPQBioMol, em especial Wadja Feitosa, Paulo Fernando, Manuele Figueiredo e Samuel Rodrigues, por proporcionarem um ambiente agradável de trabalho, bem como pelo conhecimento compartilhado e coleguismo.

À minha amiga Adrielle Firmino que esteve bastante próxima a mim durante esta jornada, compartilhando sonhos, momentos de alegria e aflições. Muito obrigada por todo o seu apoio e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida ao decorrer do desenvolvimento do meu Mestrado.

“Estou entre aqueles que pensam que a ciência tem
uma grande beleza.”

Marie Curie

RESUMO

As doenças negligenciadas são responsáveis por causar morbidade e mortalidade em todo o mundo, sendo prevalentes em países tropicais e subtropicais. Dentre essas enfermidades, a doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e a tripanossomíase humana africana, causada por *T. brucei gambiense* ou *T. brucei rhodesiense*, configuram problemas de saúde pública, principalmente em países da América Latina e da África Subsariana, respectivamente. As terapias farmacológicas atualmente empregadas no tratamento de tais doenças apresentam problemas de eficácia, toxicidade e/ou resistência. Nesse contexto, torna-se necessário investir na descoberta de fármacos mais eficazes contra essas enfermidades. A cruzaina (CRZ) do *T. cruzi* e uma enzima tipo catepsina L (*TbrCATL*) do *T. brucei* são cisteíno proteases consideradas como alvos promissores para o desenvolvimento de novos compostos com atividade tripanocida, uma vez que desempenham funções vitais nestes parasitos. Análogos cumarínicos têm sido reportados como agentes tripanocidas potentes. Diante disso, este estudo teve como objetivo desenvolver cumarinas racionalmente planejadas visando a inibição dessas cisteíno proteases dos protozoários *T. cruzi* e *T. brucei*. Assim, com o intuito de descobrir potenciais inibidores de tais alvos, foi aplicada inicialmente a técnica de *fragment-based drug design* (vFBDD), que possibilitou a identificação de um derivado cumarina-tiossemicarbazona (**FN-27**), como a molécula mais ativa frente a tais proteases, CRZ (IC₅₀: 14,4 ± 0,02 µM) e *TbrCATL* (IC₅₀: 2,0 ± 0,6 µM), além de exibir atividade efetiva contra células infectadas por formas amastigotas de *T. cruzi* (EC₅₀: 5,5 µM). Paralelamente, identificou-se ainda um análogo cumarina-chalcona (**FN-10**) com atividade promissora contra tripomastigotas de *T. brucei* (EC₅₀: 4,8 ± 0,1 µM), porém este não demonstrou atividade contra CRZ ou *TbrCATL*. Adicionalmente, dos estudos de *docking* molecular, em que se considerou a **FN-27** como sendo um controle positivo, uma série de 14 novas cumarinas foi planejada e sintetizada para posterior avaliação biológica. Por fim, com a conclusão deste trabalho, espera-se produzir moléculas potencialmente ativas contra os parasitos *T. cruzi* e *T. brucei*, mediante inibição enzimática desses alvos, bem como contribuir no desenvolvimento de futuros protótipos de fármacos.

Palavras-chaves: Doença de Chagas; Tripanossomíase humana africana; Cruzaina; catepsina L *TbrCATL*; *Docking*.

ABSTRACT

Neglected diseases are responsible for causing morbidity and mortality worldwide, being prevalent in tropical and subtropical countries. Among these diseases, Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, and Human African Trypanosomiasis, caused by *T. brucei gambiense* or *T. brucei rhodesiense*, constitute public health problems, mainly in countries in Latin America and sub-Saharan Africa, respectively. Pharmacological therapies currently employed in the treatment of such diseases have problems of efficacy, toxicity, and/or resistance. In this context, it is necessary to invest in the discovery of more effective drugs against these diseases. Cruzain (CRZ) from *T. cruzi* and a cathepsin L-like enzyme (*Tbr*CATL) from *T. brucei* are cysteine proteases considered promising targets for the development of new compounds with trypanocidal activity since they play vital roles in these parasites. Coumarin analogs have been reported as promising trypanocidal agents. Therefore, this study aims to develop rationally designed coumarins aimed at inhibiting these cysteine proteases from the *T. cruzi* and *T. brucei* protozoa. Thus, to discover potential inhibitors of such targets, the *fragment-based drug design* (vFBDD) technique was initially applied, which made it possible to identify a coumarin-thiosemicarbazone derivative (**FN-27**), as the most active molecule against such proteases, CRZ (IC₅₀: 14.4 μM ± 0.02) and *Tbr*CATL (IC₅₀: 2.0 μM ± 0.6), in addition to exhibiting effective activity against cells infected by *T. cruzi* amastigotes (EC₅₀: 5.5 μM). At the same time, a coumarin-chalcone analog (**FN-10**) with promising activity against *T. brucei* trypomastigotes (EC₅₀: 4.8 μM ± 0.1) was also identified, but it did not demonstrate activity against CRZ or *Tbr*CATL. Additionally, from molecular *docking* studies, in which FN-27 was considered a positive control, a series of 14 new coumarins was planned and synthesized for further biological evaluation. Finally, it is expected to produce potentially active molecules against the *T. cruzi* and *T. brucei* parasites, through enzymatic inhibition, as well as to help in the development of future drug prototypes.

Keywords: Chagas disease; African human trypanosomiasis; Cruzain; Cathepsin L (*Tbr*CATL); *Docking*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição das espécies de triatomíneos nas regiões endêmicas da América Latina.....	18
Figura 2 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 3 - Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro	19
Figura 4 - Manifestações clínicas da doença de Chagas de acordo com cada fase.	20
Figura 5 - Proposta de mecanismo de ação para Nfx (1) e Bzn (4).	22
Figura 6 - Vetor responsável pela transmissão do <i>Trypanosoma brucei</i> (mosca tsé-tsé, <i>Glossina</i> spp.).....	22
Figura 7 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma brucei</i>	23
Figura 8 - Forma evolutiva do <i>Trypanosoma brucei</i> no hospedeiro.	23
Figura 9 - Manifestações clínicas relacionadas ao estágio I da doença do sono.....	24
Figura 10 - Medicamentos atualmente utilizados para tratar a tripanossomíase humana africana (HAT).	26
Figura 11 - Mecanismo catalítico de cisteíno proteases.....	27
Figura 12 – Estrutura química do composto 2 <i>H</i> -1-benzopirran-2-ona.....	29
Figura 13 - Diversidade estrutural de cumarinas.	30
Figura 14 - Compostos cumarínicos com atividade tripanocida.	32
Figura 15 - Estrutura química das cumarinas cedidas e avaliadas.....	40
Figura 16 - Compostos contendo os grupos piperazina e indol com atividade tripanocida.....	42
Figura 17 - Estruturas químicas dos compostos cumarínicos selecionados por <i>docking</i> molecular para síntese e avaliação biológica.	42
Figura 18 - Curvas dose-resposta para determinação de IC ₅₀ do inibidor RW-03 e FN-27 sobre as proteases cruzaina e <i>Tbr</i> CATL.....	55
Figura 19 - Curvas dose-resposta para determinação de EC ₅₀ dos compostos FN-10 (A) e FN-27 (B) sobre tripomastigotas de <i>Trypanosoma brucei</i> e células infectadas por <i>T. cruzi</i>	60
Figura 20 - Composto FN-27 em complexo com a protease CRZ.	61
Figura 21 - Interações observadas para os resíduos do sítio de ligação FN-27 e CRZ....	61
Figura 22 - Composto FN-27 em complexo com a protease <i>Tbr</i> CATL.....	61
Figura 23 - Interações de FN-27 e resíduos do sítio de ligação <i>Tbr</i> CATL.....	62
Figura 24 - Interações entre o composto JAN56 e as enzimas cruzaina e <i>Tbr</i> CATL.	65
Figura 25 - Mecanismo reacional proposto para a obtenção das cumarinas-3-ácido carboxílico.....	66
Figura 26 - Mecanismo reacional para a obtenção dos derivados cumarínicos-3-ácido carboxílico acoplados as correspondentes aminas.....	68
Figura 27 - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO) do 2-Oxo- <i>N</i> -fenil-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxamida (JAN10).....	70
Figura 28 - Espectro de RMN de ¹³ C – DEPTQ 2-Oxo- <i>N</i> -fenil-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxamida (JAN10).....	71

Figura 29 - Espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO) do <i>N</i>-Benzil-2-oxo-2<i>H</i>-cromeno-3-carboxamida (JAN11).....	73
Figura 30 - Espectro de RMN de ¹³C – DEPTQ <i>N</i>-Benzil-2-oxo-2<i>H</i>-cromeno-3-carboxamida (JAN11).....	74
Figura 31 - Espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO) do do 3-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-2<i>H</i>-cromen-2-ona (JAN17).....	75
Figura 32 - Espectro de RMN de ¹³C – DEPTQ do 3-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-2<i>H</i>-cromen-2-ona (JAN17).	77
Figura 33 - Espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO) do <i>N</i>-(2-(1<i>H</i>-indol-3-il)etil)-2-oxo-2<i>H</i>-cromeno-3-carboxamida (JAN54).....	78
Figura 34 - Espectro de RMN de ¹³C – DEPTQ <i>N</i>-(2-(1<i>H</i>-indol-3-il)etil)-2-oxo-2<i>H</i>-cromeno-3-carboxamida (JAN54).	80
Figura 35 - Avaliação dos Descritores da Regra de Lipinski para os compostos sintetizados.....	81

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Reação de Perkin para a síntese de cumarinas.	30
Esquema 2 - Reação de Pechmann para a síntese de cumarinas.....	30
Esquema 3 - Síntese de diferentes cumarinas via reação de Knoevenagel.	31
Esquema 4 - Rotas sintéticas para obtenção dos compostos planejados po vFBDD.	40
Esquema 5 - Procedimento geral para a obtenção das cumarinas-3-ácido carboxílico. .	43
Esquema 6 – Procedimento geral para a obtenção das amidas.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade inibitória de compostos cumarínicos em relação às proteases CRZ e <i>Tbr</i> CATL.....	54
Tabela 2 - Atividade <i>in vitro</i> de análogos cumarínicos contra células infectadas por formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , tripomastigotas de <i>Trypanosoma brucei</i> e células HEK293.	59
Tabela 3 - Valores de FitScore obtidos a partir da formação dos complexos ligante/proteína com as enzimas CRZ e <i>Tbr</i> CATL.....	63
Tabela 4 - Rendimento dos intermediários sintetizados.....	65
Tabela 5 - Rendimento dos compostos finais sintetizados.....	67
Tabela 6 - Dados do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO _d ₆) do 2-Oxo- <i>N</i> -fenil-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxamida (JAN10).	70
Tabela 7 - Atribuição dos sinais de RMN de ¹³ C do 2-Oxo- <i>N</i> -fenil-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxamida (JAN10).....	71
Tabela 8 - Dados do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO _d ₆) do <i>N</i> -Benzil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxamida (JAN11).	72
Tabela 9 - Atribuição dos sinais de RMN de ¹³ C do <i>N</i> -Benzil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxamida (JAN11).....	73
Tabela 10 - Dados do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO _d ₆) do 3-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (JAN17).	75
Tabela 11 - Atribuição dos sinais de RMN de ¹³ C do do 3-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (JAN17).	76
Tabela 12 - Dados do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO _d ₆) do <i>N</i> -(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)-2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxamida (JAN54).	78
Tabela 13 - Atribuição dos sinais de RMN de ¹³ C do <i>N</i> -(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)-2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxamida (JAN54).	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bzn - benznidazol

CC₅₀ - Concentração citotóxica para 50% de uma resposta

CCD - Cromatografia em camada delgada

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CRZ – Cruzaína

DC - Doença de Chagas

DIPEA - *N, N'*-Di-isopropiletilamina

DMSO-*d*₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas

E64 - *Trans*-Epoxissuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano

EC₅₀ – Concentração efetiva para 50% de uma resposta

FBDD - *Fragment-based drug design*

HAT - Tripanossomíase humana africana

IC₅₀ - Concentração inibitória para 50% de uma resposta

Nfx - nifurtimox

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAINS - *Pan-Assay Interference*

PF – Ponto de Fusão

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

R_T – Tempo de retenção

TbrCATL - Catepsina L do *T. brucei*

TBTU – 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamino tetrafluoroborato

Z-FRAMC – Z-Phe-Arg-aminometilcumarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Tripanossomíases: Doença de Chagas e Doença do Sono	17
2.2 Doenças de Chagas: Características do Parasita, Vetor e Mecanismos de Transmissão	17
2.3 Manifestações Clínicas	20
2.4 Tratamento da Doença de Chagas	21
2.5 Doença do Sono: Ciclo Biológico e Aspectos Relacionados à Transmissão do <i>Trypanosoma brucei</i>	22
2.6 Manifestações Clínicas	24
2.7 Tratamento da Doença do Sono	25
2.8 CRZ e <i>TbrCATL</i>: Alvos Moleculares no Planejamento de Fármacos Contra <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	26
2.8.1 Enzima cruzaina (CRZ).....	27
2.8.2 Enzima tipo catepsina L do <i>Trypanosoma brucei</i> (<i>TbrCATL</i>)	28
2.9 Cumarinas	28
2.9.1 Métodos de síntese de derivados cumarínicos.....	30
2.9.2 Cumarinas promissoras frente ao <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	31
2.10 Planejamento de compostos por meio de <i>docking</i> molecular	33
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Cromatografias	35
4.2 Análise do grau de pureza relativo	35
4.3 Pontos de fusão (PF)	35
4.4 Caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (¹H) e carbono treze (¹³C)	36
4.5 Estudos de <i>docking</i> molecular	36
4.6 Ensaio Enzimático Sobre a Cruzaina (CRZ) e Catepsina Tipo L (<i>TbrCATL</i>) ...	37
4.7 Avaliação da Atividade Contra Amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
4.8 Avaliação <i>in vitro</i> da Atividade Contra <i>Trypanosoma brucei</i>	38

4.9 Ensaio de Resazurina Para Determinação da Viabilidade Celular	39
4.10 Síntese dos núcleos cumarínicos e seus análogos planejados por vFBDD.	39
4.11 Planejamento Racional de Novos Inibidores das Enzimas CRZ e <i>TbrCATL</i> com Base na FN-27	41
4.12 Síntese dos intermediários cumarinas-3-ácidos carboxílicos	43
4.13 Acoplamento de aminas aromáticas aos intermediários cumarinas ácidas.....	45
4.14 Determinação de parâmetros físico-químicos.....	51
5 RESULTADOS	53
5.1 Planejamento dos Inibidores por vFBDD	53
5.2 Atividade Inibitória Enzimática de Cumarinas Sobre Proteases CRZ e <i>TbrCATL</i> e Relação Estrutura-Atividade (REA)	53
5.3 Atividade Tripanocida <i>in vitro</i> de Análogos Cumarínicos em Células Infectadas por Formas Amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e Tripomastigotas de <i>Trypanosoma brucei</i>	58
5.4 Investigação <i>in silico</i> do FN-27 e Suas Interações Com as Proteases CRZ e <i>TbrCATL</i>	60
5.4.1 Simulações de <i>docking</i> molecular	60
5.5 Resultados de <i>Docking</i> Molecular das Novas Cumarinas Planejadas com Base na FN-27	62
5.6 Síntese dos Ácidos cumarinas-3-carboxílico	65
5.7 Síntese dos Derivados cumarínicos-3-ácido carboxílico Acoplados às Aminas.....	66
5.8 Caracterização Estrutural dos Compostos Sintetizados.....	69
5.9 Análise dos parâmetros de Lipinski para os Compostos Sintetizados	80
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE A - Planejamento dos Inibidores por vFBDD.....	96
APÊNDICE B - Tabela 1A. Todas as proteínas/enzimas de <i>Trypanosoma brucei</i> investigadas como alvos potenciais para FN-10.	99
APÊNDICE C - Artigos publicados ao decorrer do mestrado	101
ANEXO A - Caracterização estrutural dos compostos sintetizados	105

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças prevalentes em diversos países tropicais e subtropicais, afetando geralmente as populações mais pobres e marginalizadas (BURGOS *et al.*, 2020). Estima-se que as DTNs acometam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo (OMS, 2023). As tripanossomíases, como doença de Chagas (DC) e tripanossomíase humana africana (HAT, conhecida também como doença do sono) são DTNs listadas como sendo de alta prioridade pela OMS (PARTHASARATHY; KALESH, 2020).

A DC é prevalente principalmente nas Américas do Sul e Central, tendo sido estimado cerca de 8 milhões de pessoas infectadas com *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da DC (ECHAVARRÍA *et al.*, 2021). No Brasil, no período de 2000 a 2019, a DC foi responsável por 122.291 óbitos, sendo 94.788 como causa básica e os outros 27.503, causa associada. A região Nordeste, nesse mesmo período, reportou 24.191 mortes relacionadas à DC (MARTINS-MELO; CASTRO; WERNECK, 2021). No caso da HAT, causada por *T. brucei gambiense* ou *T. brucei rhodesiense*, esta é endêmica apenas no continente Africano, onde atinge principalmente a população da África Ocidental/Central (95% dos casos) e da África Oriental (5% dos casos) (ORTIZ *et al.*, 2020).

Apesar de mais de cem anos da descoberta dessas doenças, as terapias farmacológicas disponíveis ainda são limitadas, com problemas de eficácia, toxicidade e/ou resistência (MANSOLDO *et al.*, 2020). O tratamento clínico da DC consiste em apenas dois fármacos, benznidazol e nifurtimox, que apresentam eficácia comprovada somente quando administrados na fase aguda da doença (KRATZ, 2019). Por outro lado, o tratamento da HAT compreende cinco medicamentos, sendo pentamidina e suramina utilizados no primeiro estágio da doença, enquanto o melarsoprol e uma combinação de nifurtimox-eflornitina, empregados no estágio crônico da doença. Tais medicamentos demonstram significantes efeitos colaterais severos em pacientes (VARIKUTI *et al.*, 2018).

A cruzaina (CRZ) do *T. cruzi* e uma enzima tipo catepsina L (*TbrCATL*) do *T. brucei* são consideradas as principais cisteíno proteases desses protozoários e representam alvos terapêuticos para a DC e HAT, pois são responsáveis por diversos processos biológicos importantes para a sobrevivência desses parasitas. Ademais, essas cisteíno proteases compartilham um alto grau de homologia, o que possibilita o planejamento de um fármaco útil contra ambos os protozoários (SILVA *et al.*, 2021a; ROCHA *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o potencial de diferentes classes de compostos contra essas tripanossomíases tem sido continuamente investigado (NUNES; SILVA-JÚNIOR, 2022). As cumarinas são tidas como *scaffolds* promissores, no campo da Química Medicinal, em virtude da sua alta versatilidade química, que resulta em uma vasta gama de propriedades biológicas observadas, incluindo o seu potencial como agentes antiprotozoários contra DTNs (GONÇALVES *et al.*, 2020, 2021; SIERRA *et al.*, 2021). Em particular, diversos estudos têm relatado o desenvolvimento de análogos cumarínicos como agentes tripanocidas ativos contra diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* e *T. brucei* (BELLUTI *et al.*, 2014; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2021b).

Dessa forma, tendo em vista a elevada incidência na América do Sul e Central e na África dessas doenças e a ineficiente farmacoterapia atual, torna-se necessário desenvolver novos fármacos mais eficientes para o tratamento dessas tripanossomíases. Logo, este trabalho abordou as cisteino proteases como alvos importantes para o tratamento da DC e HAT, com o intuito de desenvolver potenciais inibidores. Para tanto, derivados de cumarina foram planejados racionalmente mediante a aplicação de técnicas computacionais envolvendo *docking* molecular. Assim, espera-se desenvolver cumarinas potencialmente ativas contra *T. cruzi* e *T. brucei*, mediante inibição enzimática dos alvos CRZ e *Tbr*CATL.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

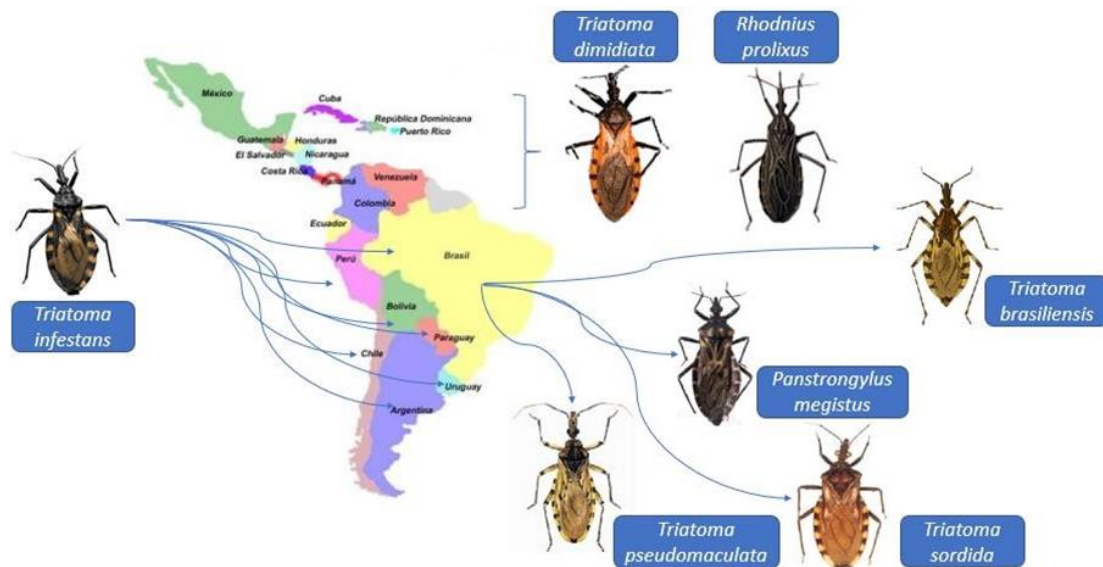
2.1 Tripanossomíases: Doença de Chagas e Doença do Sono

A ordem *Kinetoplastidae* compreende protozoários flagelados responsáveis por causar graves doenças humanas, que são transmitidas por vetores a mamíferos, bem como impactos econômicos. Nesta ordem, encontra-se a família *Trypanosomatidae*, a qual inclui os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Em particular, no gênero *Trypanosoma*, existem dois parasitas principais: o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC, também conhecida como tripanossomíase americana) e o *T. brucei*, que causa a tripanossomíase humana africana (ou doença do sono). Adicionalmente, essas doenças são consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) pela Organização Mundial da Saúde (OMS), afetando milhares de pessoas, principalmente em países em desenvolvimento. Os medicamentos administrados para ambas as doenças apresentam eficácia limitada, logo torna-se uma tarefa essencial investir em estratégias que fomentem a descoberta de fármacos contra tais protozoários (FERSING *et al.*, 2019; FILARDY *et al.*, 2018; FRANCO; SCARONE; COMINI, 2018; SCARIM *et al.*, 2019).

2.2 Doenças de Chagas: Características do Parasita, Vetor e Mecanismos de Transmissão

A transmissão do *T. cruzi* ocorre principalmente através do contato com as fezes/urina de insetos triatomíneos infectados, durante o repasto sanguíneo (OMS, 2022a). Dentre os triatomíneos, pertencentes à subfamília *Triatominae* (*Hemiptera: Reduviidae*), que possuem importância epidemiológica, destaca-se o *Triatoma infestans* na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Peru, Paraguai e Uruguai; *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius prolixus* na América Central e Norte da América do Sul (Figura 1). No Brasil, além de *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasiliensis* apresentam também alta relevância vetorial (LÓPEZ-VÉLEZ; NORMAN; BERN, 2020).

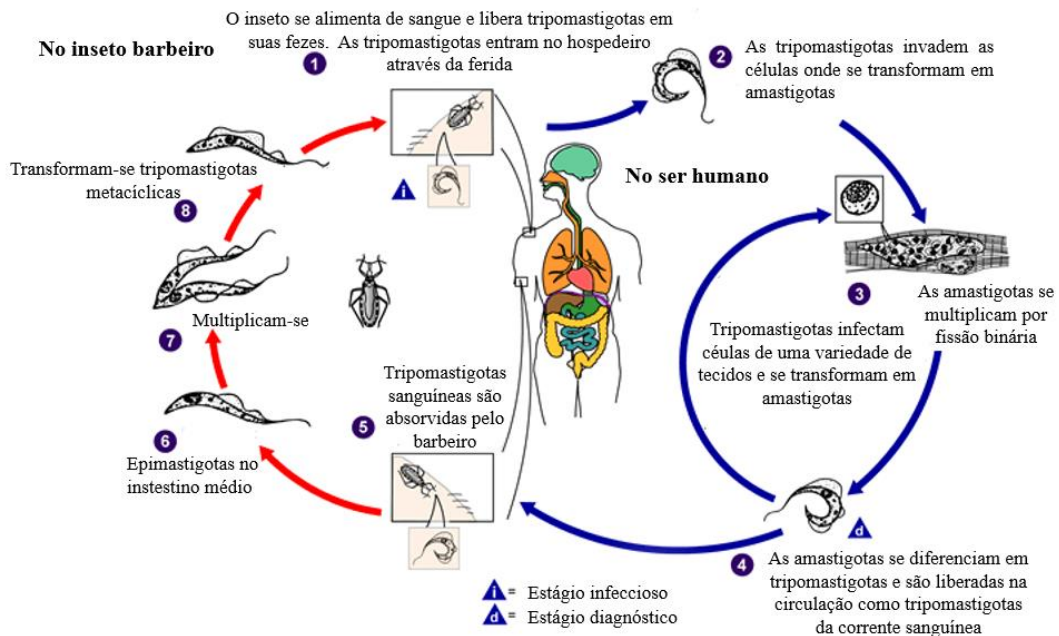
Figura 1 - Mapa de distribuição das espécies de triatomíneos nas regiões endêmicas da América Latina.



Fonte: SANTOS-JUNIOR, 2022.

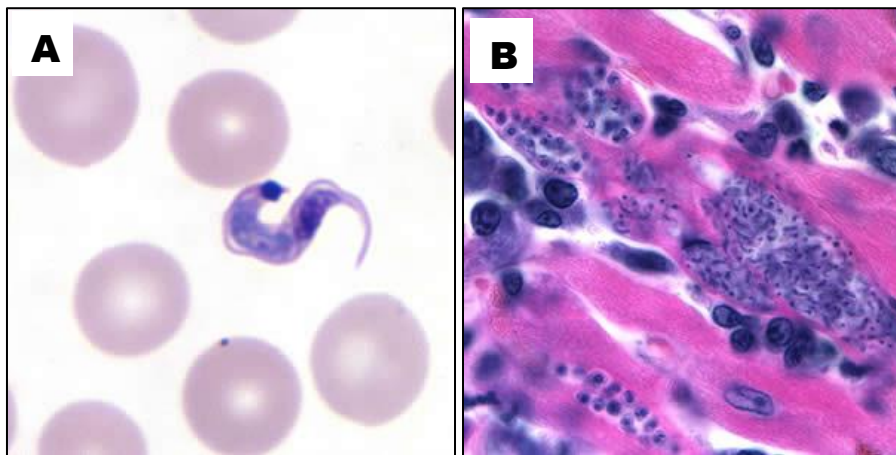
O ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 2) envolve diferentes estágios de desenvolvimento em insetos vetores e hospedeiros mamíferos (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Na corrente sanguínea dos hospedeiros mamíferos são encontradas as formas tripomastigotas, enquanto as amastigotas intracelulares estão presentes no citosol de células infectadas (Figura 3). Em paralelo, os estágios presentes no inseto vetor incluem epimastigotas (forma encontrada no intestino médio) e tripomastigotas metacíclicas (forma encontrada no intestino posterior). Os estágios replicativos do parasito correspondem às epimastigotas e amastigotas, enquanto que suas formas infectantes equivalem as tripomastigotas metacíclicas e as tripomastigotas da corrente sanguínea (ALCOLEA; PÉREZ-SILANES, 2020; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Figura 2 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de CDC, 2019

Figura 3 - Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro



Fonte: Adaptada de CDC, 2021. Em A, tripomastigotas de *T. cruzi* em esfregaço de sangue corado com Giemsa. Em B, amastigotas de *T. cruzi* em tecido cardíaco.

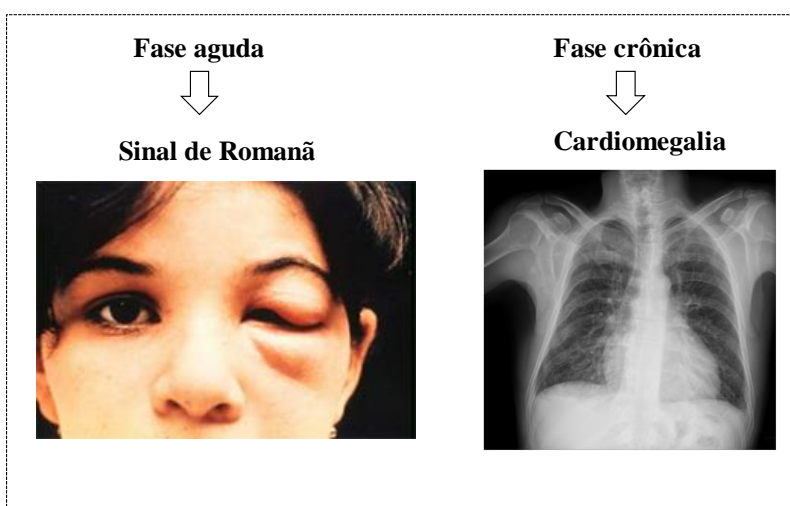
Além da transmissão vetorial, existem outras diferentes formas do *T. cruzi* ser transmitido, tais como consumo de alimentos contaminados, transfusão de sangue contaminado, transplantes com órgãos infectados, transmissão de uma mãe infectada para o feto ao decorrer da gravidez ou parto e acidentes de laboratório (GUHL; RAMÍREZ, 2021). No Brasil, no ano de 2020, a forma de transmissão mais frequente registrada foi a oral (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL; SAÚDE, 2021).

2.3 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da DC estão relacionadas às suas duas fases, aguda e crônica. A fase aguda, com uma duração de aproximadamente dois meses após a infecção, é caracterizada por apresentar uma elevada carga parasitária, mais especificamente tripomastigotas encontradas no sangue circulante, que podem ser detectadas microscopicamente. Neste estágio inicial, a infecção geralmente é assintomática; porém, quando sintomática, sintomas de febre, miocardite, diarreia, dor abdominal, erupção cutânea, apatia, além de um nódulo cutâneo (chagoma) ou edema palpebral indolor-sinal de Romana (Figura 4) podem ser observados (BERN, 2015; CRISTOVÃO-SILVA *et al.*, 2021; GUARNER, 2019).

Após a fase aguda, os pacientes podem progredir para uma fase crônica sintomática, depois de 10 a 30 anos. Contudo, a maior parte das pessoas infectadas permanece assintomática, sendo essa forma chamada de “indeterminada crônica”, na qual os pacientes apresentam soropositividade para *T. cruzi*. Com relação aos pacientes que desenvolvem a forma crônica sintomática, a maioria terá complicações cardíacas, como insuficiência cardíaca, morte súbita, alterações no ritmo cardíaco e cardiomegalia (Figura 4). Além disso, outros sintomas relacionados a problemas gastrointestinais podem estar presentes, tais como megacólon ou megaesôfago (BERN, 2015; CRISTOVÃO-SILVA *et al.*, 2021; ECHAVARRÍA *et al.*, 2021; GUARNER, 2019; MARTINEZ *et al.*, 2019).

Figura 4 - Manifestações clínicas da doença de Chagas de acordo com cada fase.



Fonte: Adaptada de CDC, 2022 e SANTOS; MENEZES FALCÃO, 2020.

2.4 Tratamento da Doença de Chagas

No intuito de descobrir agentes terapêuticos para o tratamento da DC, desde a sua descoberta em 1909, diferentes compostos foram testados, tais como cloreto de mercúrio, tartarato emético, arsênico e fucsina. Atualmente, as terapias farmacológicas disponíveis para a DC estão limitadas a dois medicamentos, benznidazol - Bzn (Lampit[®], Bayer) e nifurtimox - Nfx (Rochagan[®], Roche), que foram introduzidos há mais de 50 anos (RIBEIRO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2019).

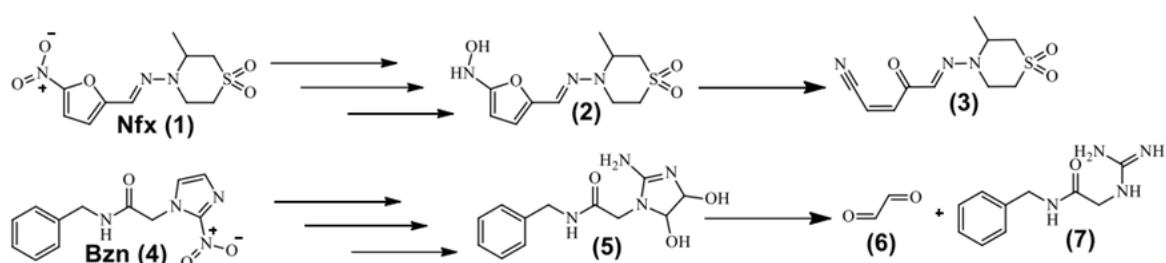
Esses medicamentos são utilizados desde a década de 1970, sendo Nfx administrado na dose de 8-10 mg kg⁻¹ em 3 doses durante 1-4 meses; enquanto Bzn, duas doses de 5-10 mg kg⁻¹ durante 1-2 meses. No entanto, tais fármacos apresentam eficácia apenas nas fases aguda ou precoce da doença, a qual se caracteriza como de difícil diagnóstico em razão de geralmente ser assintomática. Ademais, essas drogas são conhecidas por causar diversos efeitos adversos, dificultando a adesão do paciente a terapia. Dentre esses efeitos, pode-se destacar dor abdominal, vômitos, anorexia, dermatite e polineuropatias periféricas (BERENSTEIN *et al.*, 2021; GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021).

Vale ressaltar também que, além dos diversos efeitos deletérios, existe o fator relacionado à resistência de diferentes cepas do parasita a esses fármacos (GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021). Na maior parte dos países latino-americanos, incluindo o Brasil, o Bzn é tido como o medicamento de primeira linha para o tratamento da DC. Tal fato se dá em razão do Nfx apresentar uma maior toxicidade e efeitos adversos do que o Bzn (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2020). Ainda, além das limitações supracitadas, esses fármacos são contraindicados em determinadas ocasiões, tais como em casos de insuficiência renal e gravidez (KRATZ, 2019).

Os mecanismos de ação do Bzn e Nfx não são totalmente esclarecidos; contudo, estudos apontam que esses compostos nitro-heterocíclicos (Figura 5) são pró-fármacos que necessitam da ativação de nitroredutases para desempenharem a sua atividade citotóxica. Com relação ao mecanismo de ativação do Nfx (**1**), este envolve a formação de um grupo nitroso e hidroxilamina (**2**) e, posteriormente, ocorre uma fragmentação que resulta na geração de uma nitrila insaturada de cadeia aberta (**3**) (Figura 5). Tal grupo pode interagir com diversos componentes celulares e ser tóxico para o parasita (BOIANI *et al.*, 2010; FRANCO; SCARONE; COMINI, 2018).

No caso do Bzn (4), a sua ativação envolve a formação de uma hidroxilamina e hidroxila em que, a partir de um rearranjo, forma-se o intermediário dihidroxidiidro (5). Após uma série de transformações não enzimáticas, ocorre a liberação do dialdeído glicoxal (6), um metabólito altamente reativo, e a formação da guanidinoacetamida (7) (Figura 5). Os metabólitos reativos gerados são tóxicos, acarretando em uma rápida ação tripanocida frente as formas evolutivas do parasita (FRANCO; SCARONE; COMINI, 2018; KRATZ *et al.*, 2018).

Figura 5 - Proposta de mecanismo de ação para Nfx (1) e Bzn (4).



Fonte: SANTOS-JUNIOR, 2022.

2.5 Doença do Sono: Ciclo Biológico e Aspectos Relacionados à Transmissão do *Trypanosoma brucei*

A forma de transmissão da HAT se dá, principalmente, pela picada da mosca *tsé-tsé* infectada (Figura 6). As moscas *tsé-tsé*, pertencentes ao gênero *Glossina*, representam os vetores do *T. brucei*. Dentre as espécies que esse gênero compreende, *G. morsitans*, *G. fuscipes* e *G. palpalis* representam os vetores mais relevantes da HAT (KRISHNA; KLEINE; STICH, 2020; MATETOVICI; VOOGHT; ABBEELE, 2019).

Figura 6 - Vetor responsável pela transmissão do *Trypanosoma brucei* (mosca tsé-tsé, *Glossina* spp.).

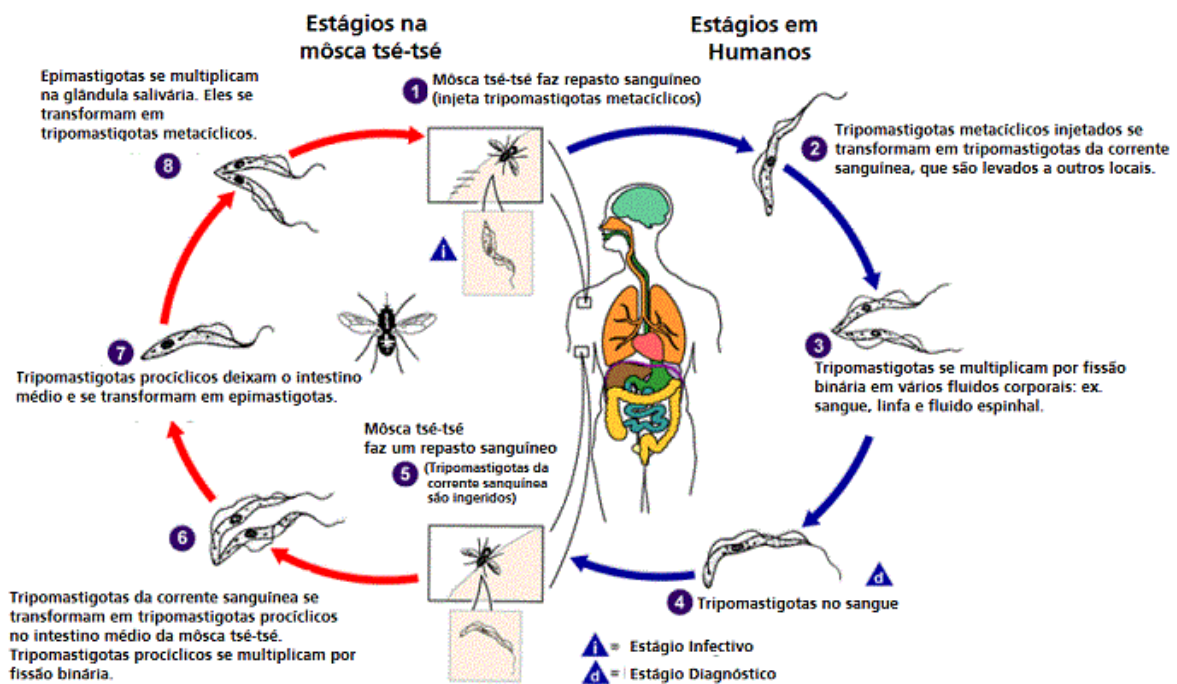


Fonte: SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2019.

O ciclo de vida do *T. brucei* (Figura 7) inicia-se quando a mosca *tsé-tsé* injeta as formas tripomastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro. Assim, dentro do hospedeiro, estas se

transformam em tripomastigotas da corrente sanguínea (Figura 8), que se multiplicam e são transportadas para diferentes locais do corpo, de forma a estabelecer a infecção. Vale ressaltar que, diferentemente do *T. cruzi*, o ciclo de vida do *T. brucei* ocorre exclusivamente por estágios extracelulares. A mosca *tsé-tsé* é infectada ao se alimentar do sangue do hospedeiro infectado. Dessa forma, no intestino médio da mosca, os parasitas se transformam em tripomastigotas procíclicas, dando continuidade ao ciclo biológico (CDC, 2020a; MCDONALD; STONE, 2017).

Figura 7 - Ciclo biológico do *Trypanosoma brucei*.



Fonte: Adaptado de CDC, 2020.

Figura 8 - Forma evolutiva do *Trypanosoma brucei* no hospedeiro.



Fonte: KENNEDY, 2013. Tripomastigotas de *T. brucei* em esfregaço de sangue de paciente com tripanossomíase africana.

Outras formas de transmissão da doença do sono, além da supracitada, incluem a picada de insetos hematófagos em um hospedeiro infectado (transmissão mecânica); infecção de mãe para filho durante a gestação (transmissão vertical); acidentes com agulhas contaminadas; e a transmissão por fluídos sexuais (OMS, 2022b; PONTE-SUCRE, 2016).

2.6 Manifestações Clínicas

A doença do sono compreende dois estágios: hemolinfático (estágio I) e o neurológico ou meningoencefálico (estágio II). No estágio I pode ser observado, inicialmente, um cancro (Figura 9) que ocorre comumente em pacientes infectados com *T. b. rhodesiense*. Os tripanossomas são encontrados na corrente sanguínea e sistemas linfáticos, sendo possível observar, durante essa fase, tripomastigotas em esfregaço de sangue. Os principais sinais e sintomas observados no primeiro estágio são cefaleia, febre, dores articulares, linfadenopatia (Figura 9), fadiga e anemia (BAKER; WELBURN, 2018; CORREIA; BARBOZA; ESPÍNDOLA, 2021; MALVY; CHAPPUIS, 2011; MASOCHA; KRISTENSSON, 2019; TESORIERO; DEL GALLO; BENTIVOGLIO, 2019).

Figura 9 - Manifestações clínicas relacionadas ao estágio I da doença do sono.



Fonte: Adaptada de KRISHNA; KLEINE; STICH, 2020.

No segundo estágio, os parasitas atravessam a barreira hematoencefálica, de modo a infectar o sistema nervoso central. Assim, durante esse estágio, o paciente apresenta uma reversão do ciclo sono-vigília, o que estabelece o nome “doença do sono”, tremores, confusão, distúrbios sensoriais e falta de coordenação, por exemplo. A doença é considerada fatal se não houver tratamento (BAKER; WELBURN, 2018; CORREIA; BARBOZA; ESPÍNDOLA,

2021; MALVY; CHAPPUIS, 2011; MASOCHA; KRISTENSSON, 2019; TESORIERO; DEL GALLO; BENTIVOGLIO, 2019).

2.7 Tratamento da Doença do Sono

A farmacoterapia para HAT consiste em seis medicamentos, sendo pentamidina, eflornitina, melarsoprol, suramina, uma combinação nifurtimox-eflornitina e fexinidazol (Figura 10). Os medicamentos utilizados no tratamento da HAT dependem da subespécie e estágio da doença. No segundo estágio, os medicamentos devem ter a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica para atingir o parasita. Ainda, os medicamentos utilizados no estágio avançado tendem a ter um maior grau de toxicidade do que os de primeiro estágio (BÜSCHER *et al.*, 2017; KENNEDY; RODGERS, 2019).

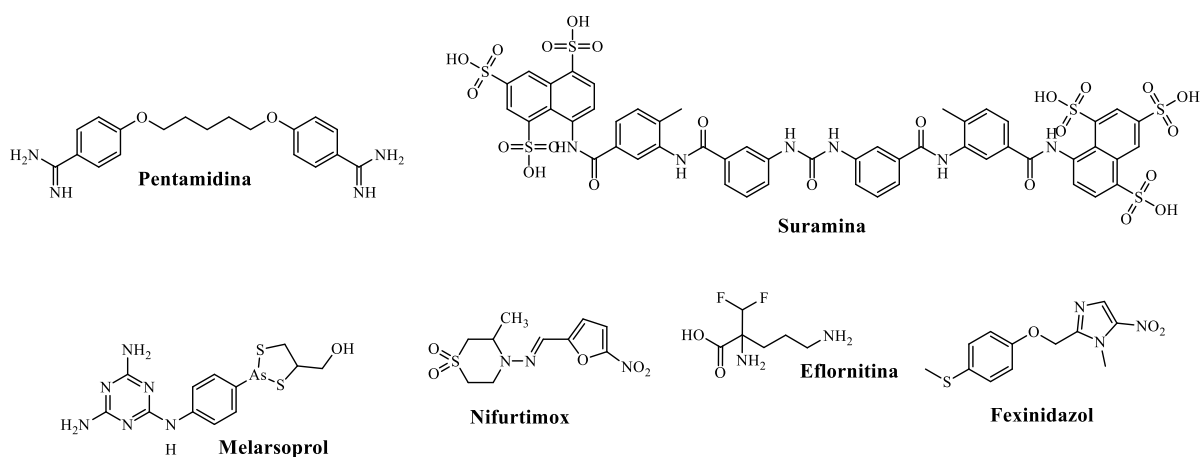
A pentamidina, usada pela primeira vez em 1940, corresponde ao medicamento de primeira linha utilizado para tratar a doença por *T. b. gambiense* em estágio inicial, sendo geralmente administrado por via intravenosa. Esse medicamento normalmente é bem tolerado pelos pacientes, tendo uma taxa de eficácia entre 95-98%. Eventos adversos relacionados à pentamidina incluem hiperglicemia ou hipoglicemia, problemas gastrointestinais e hipotensão. Outro medicamento também usado na primeira fase da doença, porém empregado frente à forma *rhodesiense*, é a suramina intravenosa, descoberta em 1920. As potenciais reações adversas são, por exemplo, nefrotoxicidade e lesões cutâneas; contudo, frequentemente se caracterizam como leves e reversíveis (BOTTIEAU; CLERINX, 2019; SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2019; KENNEDY, 2013; KENNEDY, 2019).

Para o segundo estágio, melarsoprol é o fármaco de primeira linha para *T. b. rhodesiense*, enquanto uma combinação de nifurtimox-eflornitina é usada contra *T. b. gambiense*. O melarsoprol, um derivado do arsênico, empregado pela primeira vez em 1949, possui uma administração dolorosa, que se dá de forma intravenosa, e é considerado como sendo uma droga bastante tóxica. Dentre os efeitos colaterais causados, destaca-se a encefalopatia reativa, que pode levar a morte (3 a 10%). No que concerne a terapia combinada com nifurtimox-eflornitina, esta é tida como mais eficaz e menos tóxica se comparado à monoterapia com eflornitina, tendo sido incluída na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS em 2009 (BOTTIEAU; CLERINX, 2019; SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2019; KENNEDY, 2013; KENNEDY, 2019).

Adicionalmente, foi aprovado recentemente, em 2018, o uso do fexinidazol, o único medicamento oral disponível para tratar ambas as fases de *T. b. gambiense*, que se encontra

atualmente em ensaios clínicos para aprovação de uso contra *T. b. rhodesiense*. Ademais, pode-se destacar também um outro candidato a medicamento oral, o acoziborol, um derivado do benzoxaborol, que está atualmente em fase II/III de ensaios clínicos. Espera-se que esse medicamento seja administrado como dose única, facilitando, dessa forma, o acesso a saúde para os pacientes que vivem em áreas remotas (KUMESO *et al.*, 2022; LINDNER *et al.*, 2020).

Figura 10 - Medicamentos atualmente utilizados para tratar a tripanossomíase humana africana (HAT).



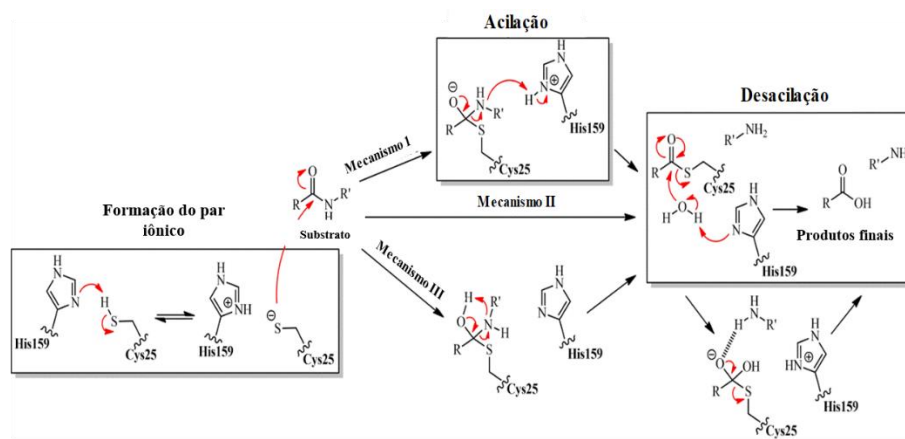
Fonte: Autora, 2023.

2.8 CRZ e *TbrCATL*: Alvos Moleculares no Planejamento de Fármacos Contra *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*

As cisteíno proteases têm sido amplamente utilizadas como alvos moleculares no planejamento de estratégias terapêuticas contra doenças parasitárias associadas às DTNs. As cisteíno proteases são consideradas alvos atraentes em razão de serem enzimas sem homólogas em humanos, mediadoras de processos metabólicos cruciais, e por sua alta capacidade de drogabilidade, por exemplo (MCKERROW, 2018; RAWAT *et al.*, 2021). A CRZ do *T. cruzi* e a *TbrCATL* do *T. brucei* são cisteíno proteases consideradas como alvos promissores para o desenvolvimento de novos compostos com atividade tripanocida frente à DC e HAT, uma vez que desempenham funções vitais nestes parasitos. Essas enzimas compartilham 70% de identidade entre elas, o que possibilita o desenvolvimento de inibidores duplos, com utilidade contra mais de uma doença (BRAGA *et al.*, 2017; NASCIMENTO; AQUINO; SILVA-JÚNIOR, 2021).

Adicionalmente, a nomeação cisteíno proteases se dá em decorrência da importância de um grupo tiol de cisteína, que funciona como o nucleófilo chave no sítio ativo da enzima (MCKERROW, 2018). No mecanismo catalítico dessas proteases (Figura 11), ocorre a transferência de prótons entre os resíduos de Cys²⁵ e His¹⁵⁹, possibilitando, assim, a formação de um par iônico reativo. Posteriormente, ocorre o ataque nucleofílico do resíduo Cys(S⁻) ao carbono da carbonila a partir de uma ligação peptídica (ETTARI *et al.*, 2016; VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016).

Figura 11 - Mecanismo catalítico de cisteíno proteases.



Fonte: Adaptado de Nascimento *et al.*, 2020.

2.8.1 Enzima cruzaina (CRZ)

A CRZ é uma protease do tipo cathepsina L pertencente à família da papaína, considerada a maior e principal cisteíno protease do *T. cruzi*, sendo expressa em todos os estágios do ciclo de vida do parasito. Na forma tripomastigota, a CRZ está localizada na bolsa flagelar, enquanto que nas amastigotas intracelulares, a enzima é encontrada na superfície celular (SIQUEIRANETO *et al.*, 2018). Essa enzima está envolvida no desempenho de diferentes funções estritamente relacionadas à sobrevivência e propagação desse protozoário, como evasão da resposta imune e invasão de células hospedeiras, metaciclogênese, bem como é um dos principais antígenos do *T. cruzi* (CAZZULO; STOKA; TURK, 2001; DOYLE *et al.*, 2011; SAJID *et al.*, 2011).

A CRZ corresponde a um alvo validado para a descoberta de compostos com potencial aplicação no tratamento da DC. Tal protease apresenta dois domínios, um composto principalmente por α -hélices e o outro por folhas- β antiparalelas. Na interface entre os dois

domínios, encontra-se o sítio ativo, com uma tríade catalítica formada pelos resíduos Cys²⁵, His¹⁵⁹ e Asn¹⁷⁵, além de quatro subsítios importantes para a ligação do ligante (S1, S1', S2 e S3) (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2017). Esses diferentes subsítios possuem as seguintes especificidades: S3 comporta melhor grupos aromáticos volumosos e resíduos carregados positivamente; S2 pode se ligar a compostos com anéis aromáticos, hidrofóbicos e também básicos; S1 abrange idealmente resíduos carregados positivamente e pequenos grupos aromáticos; e S1' demonstra alta especificidade para resíduos aromáticos, o que é conferido ao resíduo Trp¹⁷⁸ (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2018; FABIAN *et al.*, 2019a; SANTOS; FERREIRA, 2022a).

2.8.2 Enzima tipo catepsina L do *Trypanosoma brucei* (*TbrCATL*)

A *TbrCATL* (anteriormente chamada de rodesaína) (STEVERDING; CAFFREY, 2021) representa a maior cisteína protease do *T. brucei* e pertence à subfamília semelhante à papaína, família C1 do clã CA (ETTARI *et al.*, 2013). A *TbrCATL* é essencial para a sobrevivência do parasito e progressão da doença, estando associada à capacidade do protozoário em atravessar a barreira hematoencefálica e na homeostase do ferro do parasita. Ainda, essa enzima está relacionada à evasão da defesa imunológica do hospedeiro mediante realização do *turnover* de glicoproteínas de superfície variantes e pela degradação das imunoglobulinas do hospedeiro. Vale destacar também que a *TbrCATL* está associada ao processo de transporte intracelular de proteínas entre o inseto e as células do hospedeiro, bem como a degradação de proteínas do parasita (DI CHIO *et al.*, 2022; NIKOLSKAIA, 2006; STEVERDING *et al.*, 2012).

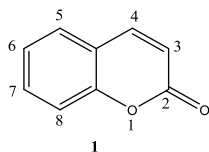
A *TbrCATL* é constituída por uma única cadeia polipeptídica de 215 aminoácidos, sendo dividida em domínios, esquerdo (L) e direito (D). De modo similar à CRZ, a *TbrCATL* apresenta quatro subsítios principais para ligantes (S1', S1, S2 e S3) e uma tríade catalítica formada pelos resíduos Cys²⁵, His¹⁶² e Asn¹⁸² (ETTARI *et al.*, 2013).

2.9 Cumarinas

As cumarinas, pertencentes à família de benzopirona, são estruturalmente constituídas por um anel benzeno fundido ao anel α -pirona. Este sistema conjugado apresenta propriedades ricas em elétrons e de transporte de carga, o que desempenha um importante papel na interação deste com moléculas e íons (MATOS *et al.*, 2015). A cumarina **1** (2*H*-1-benzopiran-2-ona) foi

encontrada inicialmente na fava *tonka* (*Dipteryx odorata* Aubl Willd; família *Fabaceae*) e isolada pela primeira vez em 1820 (STEFANACHI *et al.*, 2018).

Figura 12 – Estrutura química do composto 2H-1-benzopiran-2-ona.

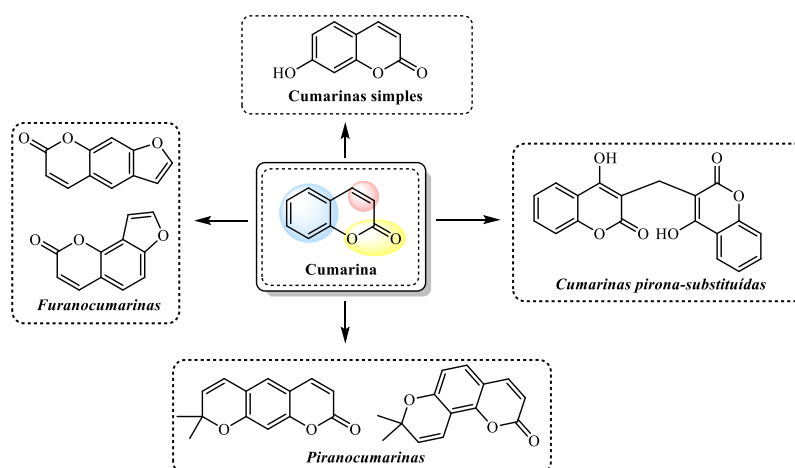


Fonte: Autora, 2023.

Essas substâncias apresentam uma ampla distribuição na natureza, tendo sido identificado mais de 1.300 cumarinas como metabólitos secundários presentes em plantas, fungos e bactérias. Estima-se que as cumarinas são encontradas em mais de 150 espécies de plantas, distribuídas em aproximadamente 30 famílias, incluindo *Umbelliferae*, *Rutaceae*, *Clusiaceae*, *Guttiferae*, *Caprifoliaceae*, *Oleaceae*, *Nyctaginaceae* e *Apiaceae* (SHARIFI-RAD *et al.*, 2021; VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013).

Com base em sua estrutura, as cumarinas podem ser categorizadas em quatro tipos: cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas e cumarinas pirona-substituídas (Figura 13). As cumarinas simples, como a 7-hidroxicumarina (umbeliferona), abrangem derivados hidroxilados, alcoxilados e alquilados, contendo substituições apenas no anel benzeno da cumarina. As furanocumarinas apresentam o anel furano ligado ao anel benzeno, por exemplo, o psoraleno. As piranocumarinas, como a xantiletina, consistem em um anel pirano de 6 membros fundido com o anel benzeno. Destaca-se ainda que tanto as furanocumarinas quanto as piranocumarinas podem ser do tipo linear ou angular. Por fim, as cumarinas pirona-substituídas possuem substituições no anel pirona, como o dicumarol (KÜPELI AKKOL *et al.*, 2020; PENTA, 2016; WU *et al.*, 2020).

Figura 13 - Diversidade estrutural de cumarinas.

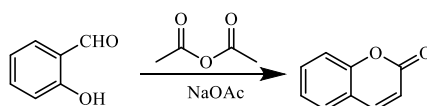


Fonte: Autora, 2023.

2.9.1 Métodos de síntese de derivados cumarínicos

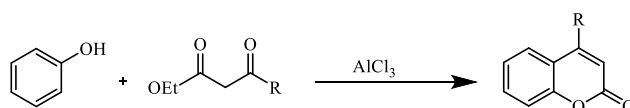
Em razão de suas várias atividades farmacológicas e versatilidade estrutural, a síntese de cumarinas representa um campo ativamente estudado. Dentre os diferentes métodos de síntese desenvolvidos para a obtenção desses compostos, pode-se mencionar as reações de Pechmann, Perkin e Knoevenagel (BORGES *et al.*, 2005; BOUHAOUI *et al.*, 2021; FRANCISCO *et al.*, 2020). Na reação de Perkin, a cumarina é formada mediante a condensação aldólica, na qual utiliza-se o salicilaldeído com anidridos ácidos, na presença de um sal alcalino do ácido (Esquema 1) (BORGES *et al.*, 2005). Por outro lado, a condensação de Pechmann possibilita a obtenção de cumarinas mediante a reação de fenóis com β -ceto ésteres, mediante o uso de catalisadores ácidos, como o cloreto de alumínio (Esquema 2) (JUMAL; NORHANIS SAKINAH, 2021).

Esquema 1 - Reação de Perkin para a síntese de cumarinas.



Fonte: Autora, 2023

Esquema 2 - Reação de Pechmann para a síntese de cumarinas.

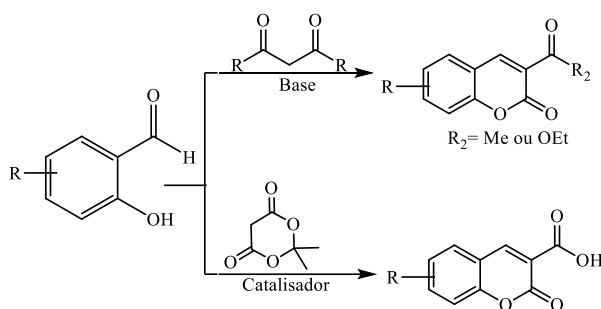


Fonte: Autora, 2023

Contudo, devido a simplicidade de reação e bom rendimento dos produtos, as reações de Pechmann e Knoevenagel são mais vantajosas para a síntese de cumarinas. De modo específico, a condensação de Knoevenagel é amplamente utilizada na química orgânica sintética e química medicinal, possibilitando a síntese de vários esqueletos de cumarinas. Ademais, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de novas abordagens sintéticas, envolvendo a condensação de Knoevenagel, que sejam ecologicamente corretas, eficientes e de baixo custo (VEKARIYA; PATEL, 2014).

A condensação de Knoevenagel para a síntese de cumarinas pode ocorrer por meio da reação envolvendo salicilaldeídos e malonato de dietila ou acetoacetato de etila, os quais apresentam um grupo metileno ativo na presença de meio básico. Neste caso, o núcleo cumarínico será construído via uma ciclização intramolecular. Além disso, um outro método, via condensação de Knoevenagel, consiste na obtenção de cumarinas-3-ácido carboxílicos a partir do uso do ácido de Meldrum, um derivado cíclico do ácido malônico, e salicilaldeídos (Esquema 3) (LONČARIĆ *et al.*, 2020; SALEM *et al.*, 2018).

Esquema 3 - Síntese de diferentes cumarinas via reação de Knoevenagel.



Fonte: Autora, 2023.

2.9.2 Cumarinas promissoras frente ao *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*

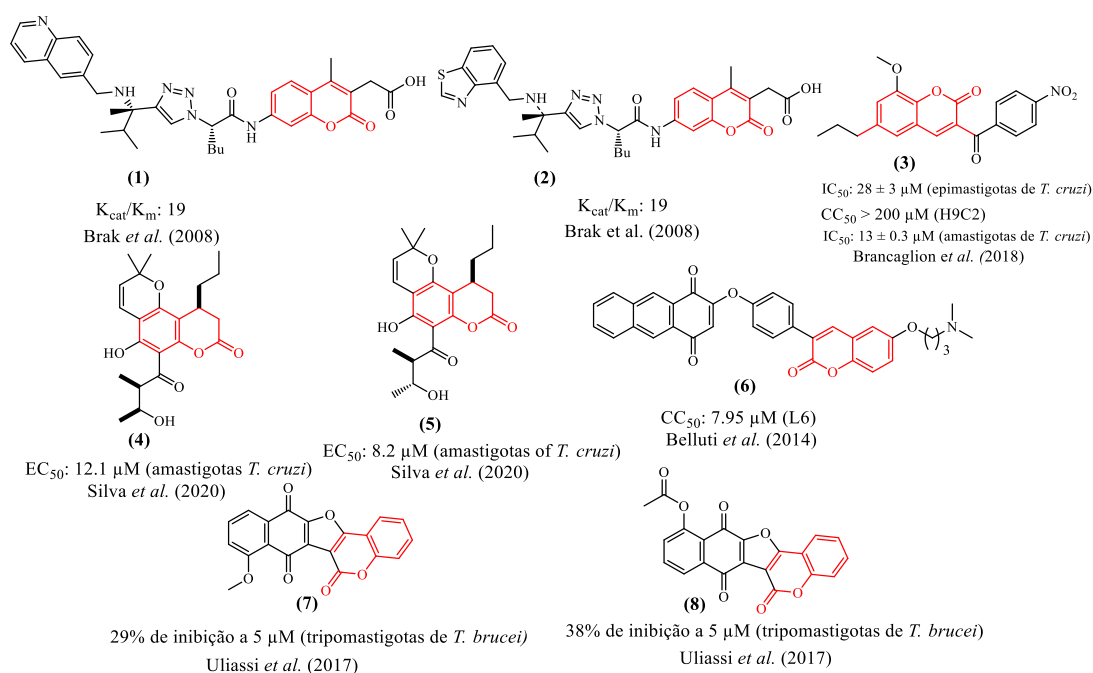
Cumarinas naturais e sintéticas têm sido reportadas na literatura como compostos promissores para o planejamento e obtenção de agentes com atividade tripanocida (ROSA; SCHENKEL; BERNARDES, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2021).

Nesse contexto, em um estudo publicado por Brak *et al.* (2008), foram reportadas 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos contendo o fluoróforo ácido 7-amino-4-metilacético (AMCA), com o intuito de rastrear substratos contra a CRZ do *T. cruzi*. Dentre esses, os substratos contendo o anel de quinolina (**1**) e benzotiazol (**2**) mostraram melhor eficiência de clivagem frente ao

alvo. Contudo, os autores não realizaram estudos de *docking* molecular para elucidar os mecanismos de ação de tais compostos.

Brancaglioni *et al.* (2018) identificaram um derivado cumarínico (**3**) de baixa citotoxicidade contra células de mamíferos (H9C2), tendo atividade contra epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Em adição, a cumarina **3** reduziu a parasitemia em 100% nos camundongos infectados com formas tripomastigotas, quando administrada por via oral. Continuando os estudos envolvendo *T. cruzi*, Silva *et al.* (2021b) identificaram duas cumarinas (**4** e **5**) provenientes de *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae), que foram ativas contra as formas amastigotas de *T. cruzi*. Também, em um estudo envolvendo agentes contra *T. brucei*, Belluti *et al.* (2014) verificaram um composto cumarínico (**6**) que apresentou considerável atividade frente às formas tripomastigotas de *T. brucei rhodesiense*, bem como, baixa toxicidade frente a células L6 de mamíferos. Contudo, os compostos sintetizados foram avaliados apenas como inibidores da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e da tripanotona redutase. Seguindo este contexto, o mesmo grupo reportou uma série de análogos de híbridos de cumarina-quinona, em que os derivados foram analisados quanto suas atividades diante das formas tripomastigotas de *T. brucei*. Dentre estes, os compostos **7** e **8** foram considerados os mais ativos, exibindo um valor de inibição de 29 e 38%, respectivamente (ULIASSI *et al.*, 2017).

Figura 14 - Compostos cumarínicos com atividade tripanocida.



Fonte: Autora, 2023.

2.10 Planejamento de compostos por meio de *docking* molecular

O *docking* molecular corresponde a uma técnica computacional comumente utilizada para o planejamento racional de moléculas, de modo a desempenhar um importante papel no processo de descoberta de medicamentos. Este é um método *in silico* que fornece uma função de pontuação (FitScore) baseada na afinidade de ligação do ligante no sítio de ligação de uma proteína alvo (WU *et al.*, 2023).

No processo de *docking* molecular, são combinadas e otimizadas diferentes variáveis: hidrofóbicas, estéricas e eletrostáticas, gerando, assim, diversas conformações e possíveis orientações entre o ligante e a proteína (ADELUSI *et al.*, 2022). Assim, a qualidade da pose de ligação gerada é avaliada utilizando a função de pontuação, o que possibilita identificar o complexo ligante-proteína mais adequado. Na descoberta de medicamentos, o *docking* molecular apresenta várias aplicações na otimização de leads e estudos de estrutura-atividade, por exemplo (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

Contudo, vale destacar que o *docking* molecular apresenta algumas limitações, como: valores de FitScore aproximados, podendo ocasionar resultados que não estabelecem correlação com afinidades de ligação experimentais; restrição da amostragem das conformações de ligante e receptor na predição de pose; além de ser um método estático, incapaz de responder as perturbações do meio biológico (VIDAL-LIMON; AGUILAR-TOALÁ; LICEAGA, 2022).

Por fim, o *docking* molecular, tem sido aplicado no desenvolvimento de novos compostos ativos contra o *T. cruzi* e *T. brucei*, frente à cruzaina e *TbrCATL*, demonstrando ser uma abordagem promissora (SILVA *et al.*, 2021a; SILVA *et al.*, 2021b).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar e avaliar a atividade de derivados de cumarinas frente ao *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, mediante a inibição das cisteíno proteases destes.

3.2 Objetivos Específicos

- Planejar racionalmente cumarinas como potenciais inibidores da CRZ e *Tbr*CATL, por meio de *docking* molecular.
- Sintetizar os candidatos mais promissores selecionados por ferramentas *in silico*;
- Determinar a citotoxicidade dos compostos sintetizados em células C2C12 por ensaios de Resazurina;
- Determinar a atividade inibitória dos novos compostos em ensaios envolvendo a CRZ e *Tbr*CATL em ensaios enzimáticos de fluorescência;
- Determinar a atividade tripanocida dos novos compostos frente às tripomastigotas do *T. brucei* e amastigotas intracelulares do *T. cruzi* em ensaios com células C2C12 infectadas;
- Discutir a relação estrutura-atividade (REA) para as moléculas ativas;
- Realizar estudos *in silico* para fornecer maiores percepções sobre os modos de interação entre as moléculas ativas e seus alvos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cromatografias

As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), que foi realizada em folhas de alumínio pré-revestidas com sílica gel 60 (F²⁵⁴, Merck[®]) na espessura de 0,25 mm. Para a visualização e interpretação das placas de CCD, utilizou-se a luz emissora de radiação ultravioleta (UV), no comprimento de onda (λ) de 254 nm. Para cromatografia em coluna, a sílica gel Merck 60G 0,063–200 mm (70–230 mesh ASTM) foi usado, bem como o sistema eluente pré-determinado.

4.2 Análise do grau de pureza relativo

A análise do grau de pureza dos compostos finais foi realizada mediante a cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (do inglês: *High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC), empregando-se cromatógrafo líquido HEWLETT PACKARD[®] 1100 series, além de uma coluna C18 com dimensões de 75 mm x 2,0 mm, da marca AGILENT[®] InfinityLab Poroshell 120 SB. O metanol $\geq 99\%$ (grau HPLC) foi utilizado como fase móvel do sistema durante a execução dos experimentos. Ainda, os seguintes parâmetros de análise foram delimitados: concentração da amostra igual a 1mg/mL; fluxo de corrida foi de 5 μ L/min; tempo de corrida de 10 minutos; e volume de injeção de 5 μ L. Por último, os tempos de retenção (R_T) e a absorbância foram registrados em minutos (min) e em miliunidades de absorbância (mAU), respectivamente (BRITO *et al.*, 2017).

4.3 Pontos de fusão (PF)

Os pontos de fusão foram determinados pelo aparelho MSTecnopon[®], modelo PFII Digital, mediante tubos capilares de vidro, contendo, particularmente, cada uma das amostras sólidas. A temperatura de partida admitida foi de 30 °C e, então, o aumento desta foi monitorado até a fusão completa da substância analisada, sendo considerado um intervalo de fusão de até 3°C de diferença.

4.4 Caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono treze (^{13}C)

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram determinados em Acetona- d_6 , MeOD, CDCl_3 ou DMSO- d_6 usando o espectrômetro Bruker Advanced[®] DPX em 600 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram computados em partes por milhão (ppm), enquanto os valores da constante de acoplamento (J) foram dados em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram determinadas como *s* (simpleto), *br s* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete), *q* (quarteto), e *m* (multiplete). Finalmente, todos os espectros de RMN foram tratados e analisados usando o *software*, como licença acadêmica, Bruker TopSpin[®], versão 4.0.8, 2019 (<https://www.bruker.com/de/products-and-solutions/mr/nmr-software/topspin.html>).

4.5 Estudos de *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizadas em um notebook Acer[®], modelo Aspire 3, com processador Intel[®] Core i3, 8 GB de RAM e sistema operacional Windows[®] 10. As moléculas foram desenhadas, convertidos em estruturas tridimensionais e minimizadas energeticamente por meio do método semi-empírico Parameterized Model 3 (PM3), usando ArgusLab[®] v. 4.0.1 (Richland, EUA) (<http://www.arguslab.com>). As estruturas 3D das proteases CRZ (PDB: 1AIM) e TbrCATL (PDB: 6EXQ) foram obtidas no site Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB, San Diego, EUA), website (<https://www.rcsb.org>). O pré-tratamento dessas macromoléculas e as simulações de *docking* molecular foram realizadas usando o *software* GOLD[®] v. 5.8.1 (Cambridge, Reino Unido) (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>). Posteriormente, todos os ligantes cocrystalizados foram removidos, incluindo moléculas de água e íons. Além disso, *Chemical Piecewise Linear Potential* (CHEMPLP) foi usada como uma função de pontuação para este protocolo. A análise do sítio de ligação e das ligações químicas formadas entre proteínas e ligantes foi realizada usando o *software* Discovery Studio[®] e PyMol[®], v. 0.99 (<https://pymol.org/2/>). Por fim, esses procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com trabalhos recentemente publicados por nossa equipe de pesquisa envolvendo abordagens *in silico* (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021).

4.6 Ensaio Enzimáticos Sobre a Cruzaína (CRZ) e Catepsina Tipo L (*Tbr*CATL)

A CRZ recombinante foi expressa e purificada conforme descrito anteriormente por Silva *et al.*, 2019, enquanto a *Tbr*CATL recombinante foi expressa e purificada segundo métodos descritos por Caffrey *et al.*, 2001. A atividade proteolítica foi medida monitorando-se a clivagem do substrato fluorescente Z-Phe-Arg-aminometilcumarina (Z-FRAMC), em um fluorímetro Synergy HTX (Biotek®). Todos os ensaios foram realizados em placas pretas de 96 poços, com volume final de 200 µL por poço, usando solução tampão de acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 na presença de ditioneitol 1 mM, Triton X-100 0,01%, enzima 0,5 nM, e 2,5 µM do substrato. A triagem inicial foi realizada sem pré-incubação e após 10 minutos de pré-incubação com os compostos, usando 100 µM de cada composto, exceto para **FN10** e **FN29**, que foram testados na concentração de 50 µM, devido à sua solubilidade limitada. Para cada ensaio, foram realizados dois experimentos independentes, cada um em triplicata. As atividades enzimáticas foram calculadas com base na comparação com um controle de DMSO, a partir das taxas iniciais de reação. *Trans*-Epoissuccinil-*L*-leucilamido(4-guanidino)butano (E64) foi usado como controle positivo na concentração de 1 µM no ensaio. Os compostos que inibiram mais de 70% da atividade enzimática tiveram sua concentração inibitória para 50% (IC₅₀) determinada, em dois experimentos independentes, cada um envolvendo sete concentrações de compostos em triplicatas. Os valores de IC₅₀ foram determinados por análise de regressão não linear do gráfico de velocidade *versus* concentração do inibidor, usando GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.00, La Jolla, Califórnia, EUA). Todos os ensaios de inibição enzimática foram realizados na Universidade da Califórnia, Escola Skaggs de Farmácia, sob supervisão dos Professores James H. McKerrow e Jair Lage de Siqueira-Neto.

4.7 Avaliação da Atividade Contra Amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Para examinar a atividade antiparasitária desses compostos à base de cumarina contra parasitas *T. cruzi*, os compostos foram colocados em placas de 384 poços usando ATS *Acoustic Liquid Dispenser* (EDC Biosystems). As células de cardiomioblastos murinos C2C12 (ATCC CRL-1772) foram cultivadas a 700 células/poço e as tripomastigotas da cultura de tecidos de *T. cruzi* foram adicionados a 7.000 parasitas/poço (razão de 10 parasitas/célula). Tanto as células quanto os parasitas foram semeados em meio DMEM High-Glucose (Gibco), contendo 5% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco). Células e parasitas foram incubados na presença dos compostos por 48 horas a 37 °C com 5%

de CO₂. As placas foram então fixadas com solução de formaldeído a 4% por pelo menos 1 hora, lavadas com 1X PBS e coradas com 5 µg mL⁻¹ DAPI. As placas foram medidas usando um microscópio ImageXpress (Molecular Devices) e analisadas pelo *software* MetaXpress (Molecular Devices) usando um módulo personalizado otimizado para este ensaio. Para obter curvas de dose-resposta, os compostos foram testados em uma diluição em série de 10 pontos 2 vezes começando em 20 µM em triplicado. Os resultados foram analisados usando GraphPad Prism *Software*, versão 6.05 (GraphPad *Software*, San Diego, CA) (SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2016). Todos os enaios em amastigotas de *T. cruzi* foram realizados na Universidade da Califórnia, Escola Skaggs de Farmácia, sob supervisão dos Professores Jair Lage de Siqueira-Neto e Miriam Aparecida Giardini.

4.8 Avaliação *in vitro* da Atividade Contra *Trypanosoma brucei*

O ensaio baseia-se na determinação indireta da viabilidade da população de parasitas pela quantificação do DNA total presente no poço usando o corante fluorescente SYBR Green I. Os compostos em estoques de 100% DMSO foram diluídos em 200 µL de meio HMI-9 modificado em placas de 96 poços (Greiner Bio-One 655090), proporcionando uma concentração final de DMSO de 0,5%. As formas sanguíneas de tripanossomas de *T. b. brucei* (Lister 427) em crescimento de fase logarítmica foram então diluídos para 2×10^5 tripanossomas/mL em um meio HMI-9 modificado e dispensados nas placas de 96 poços previamente preparadas a 100 µL/poço. As placas foram incubadas por 72 h a 37 °C e 5% de CO₂, momento em que os tripanossomas foram lisados pela adição de 50 µL de solução de lise (30 mM Tris pH 7,5, 7,5 mM EDTA, 0,012% saponina e 0,12% Triton X-100) contendo 1x SYBR Green. As placas foram agitadas a 300 rpm por 10 min e incubadas no escuro por 1 h em temperatura ambiente, seguida de medida no leitor de placas Envision (PerkinElmer), com excitação a 485 nm/emissão a 530 nm. A triagem foi realizada em triplicata, enquanto os dados da curva EC₅₀ representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes, cada um em triplicata (MONTI *et al.*, 2018). Todos ensaios sobre formas tripomastigotas de *T. brucei* foram realizados na Universidade da Califórnia, Escola Skaggs de Farmácia, sob supervisão do Professor Conor R. Caffrey.

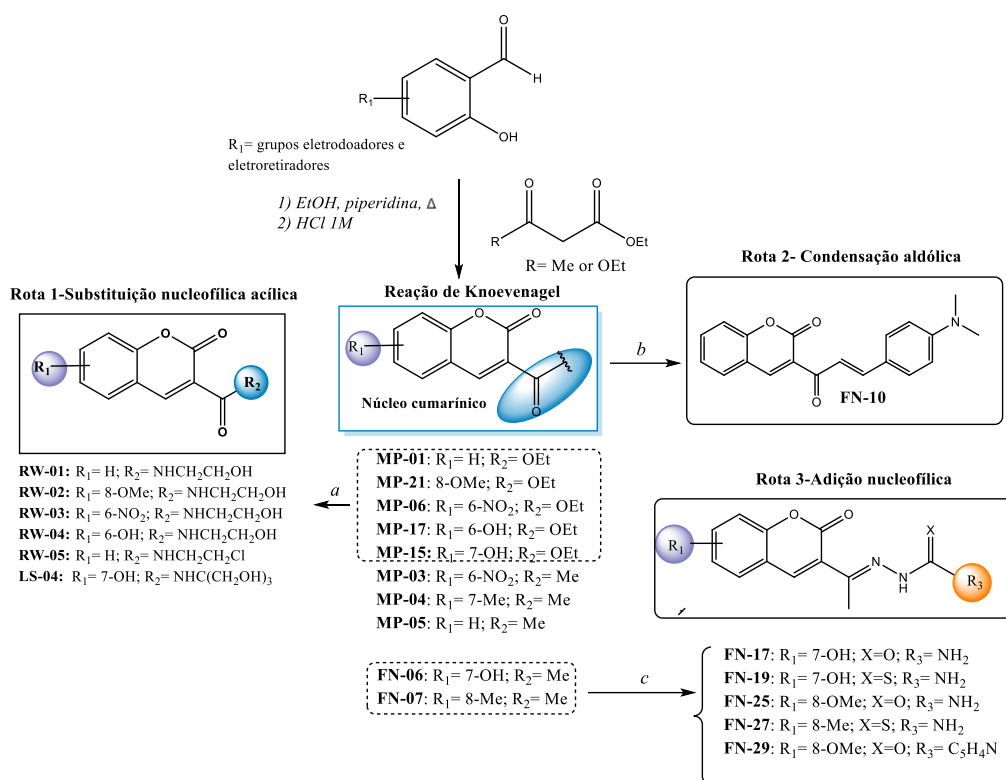
4.9 Ensaio de Resazurina Para Determinação da Viabilidade Celular

Um ensaio de redução de resazurina foi usado para investigar os efeitos dos compostos na viabilidade celular. Os compostos em estoques de 100% de DMSO foram diluídos em 100 μ L de meio DMEM completo [DMEM suplementado com 10% (v/v) de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina] em placas de 96 poços (Corning 353872), fornecendo uma concentração final de DMSO de 0,5%. Posteriormente, as células HEK-293 (2×10^4 células/poço) em meio DMEM completo foram dispensadas nas placas de 96 poços previamente preparadas a 50 μ L/poço. As placas foram incubadas por 46h a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, 20 μ L de resazurina 0,5 mM foram adicionados a cada poço após incubação por mais 2h. A fluorescência foi medida usando o leitor de placas Envision (PerkinElmer) em comprimentos de onda de 531 nm (excitação) e 595 nm (emissão). Por último, este experimento foi realizada em triplicata (O'BRIEN *et al.*, 2000).

4.10 Síntese dos núcleos cumarínicos e seus análogos planejados por vFBDD.

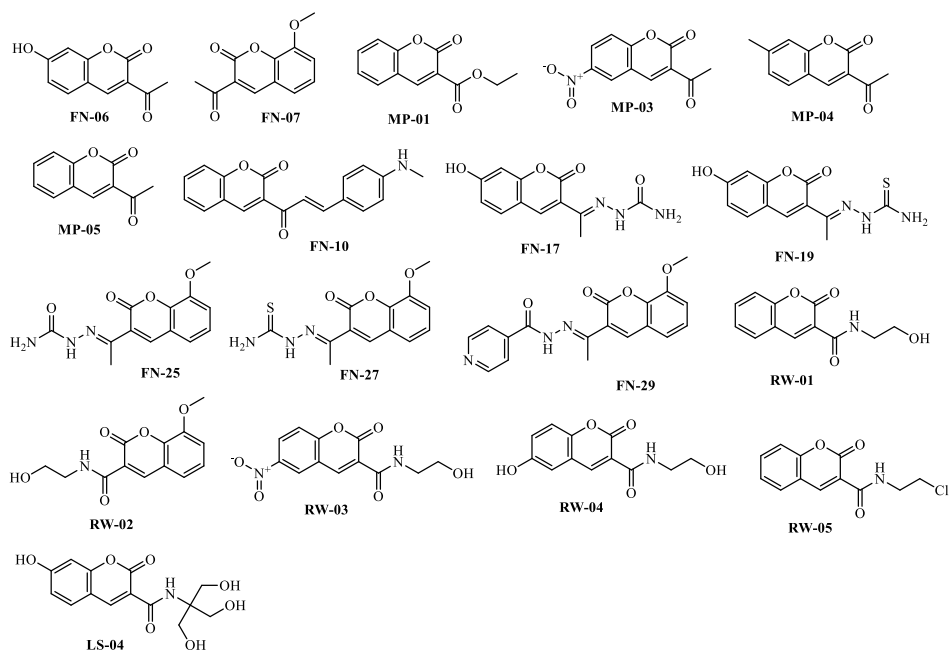
Os núcleos cumarínicos e seus análogos planejados pela técnica computacional virtual (vFBDD) e validados experimentalmente, foram cedidos pelo grupo de pesquisa de Síntese Orgânica e Medicinal, da Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, coordenado pela professora Dr^a. Sílvia Helena Cardoso, que é a coorientadora deste trabalho. Abaixo seguem as rotas sintéticas utilizadas para a síntese desses compostos (Esquema 4), bem como todas as estruturas químicas das moléculas obtidas e avaliadas biologicamente (Figura 15). A caracterização estrutural de tais compostos encontra-se no estudo de NUNES *et al.*, 2023.

Esquema 4 - Rotas sintéticas para obtenção dos compostos planejados po vFBDD.



Fonte: Autora, 2022. Condições de reação: a) 2-Aminoetanol ou 7-hidroxi-2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (**LS-04**) ou 2-cloroetanamina (**RW-05**), quantidades catalíticas de piperidina, em etanol refluído; b) *N,N*-dimetilamino-*p*-benzaldeído, quantidades catalíticas de piperidina, em etanol; c) Semicarbazida ou tiosemicarbazida, solução aquosa-etanólica (1:1), quantidades catalíticas de ácido acético.

Figura 15 - Estrutura química das cumarinas cedidas e avaliadas.



Fonte: Autora, 2023

4.11 Planejamento Racional de Novos Inibidores das Enzimas CRZ e *Tbr*CATL com Base na FN-27

Os dados iniciais desta pesquisa foram publicados como artigo científico (ver APÊNDICE C), em que os compostos planejados por vFBDD foram testados quanto à sua atividade inibitória contra as proteases CRZ e *Tbr*CATL. A partir dessas análises, foi possível identificar o inibidor mais promissor contra ambos os alvos, denominado **FN-27**, um análogo cumarina-tiossemicarbazona. Na seção de resultados e discussões, serão apresentadas maiores informações acerca de tais dados.

Dessa forma, tendo em vista os resultados promissores apresentados pela **FN-27** frente à CRZ e *Tbr*CATL, uma nova série de derivados cumarínicos foi planejada, com o intuito de produzir novas cumarinas potencialmente ativas e avaliar interações promissoras com o sítio ativo enzimático. Dessa forma, delimitou-se a síntese de novas cumarina-tiossemicarbazonas análogas da **FN-27**, com modificações no núcleo cumarínico, pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica e Medicinal, supervisionado pela coorientadora deste trabalho.

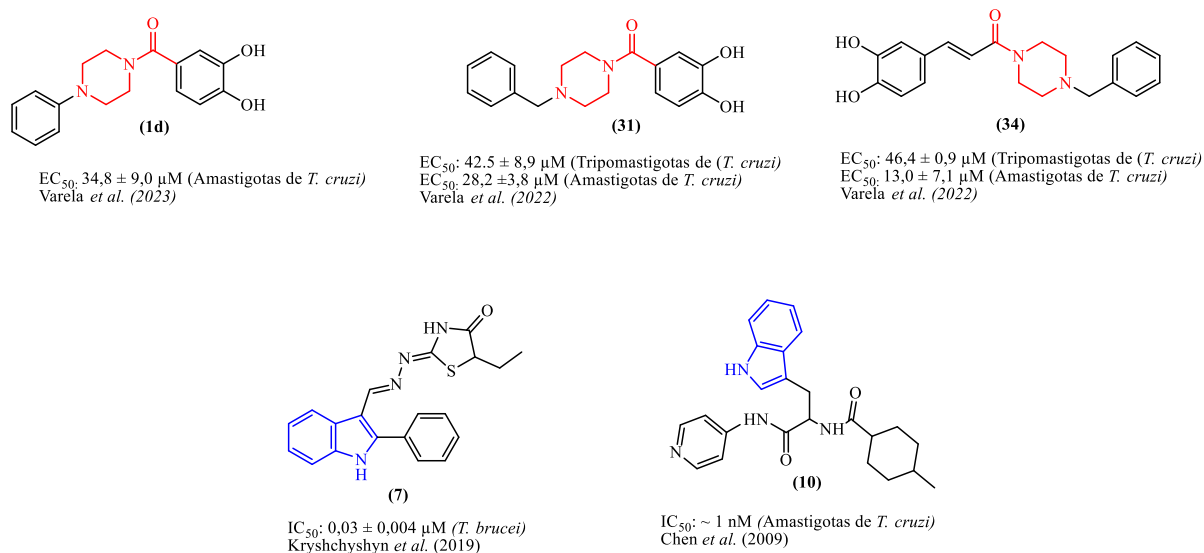
Paralelamente, com relação aos resultados presentes nesta pesquisa de mestrado, decidiu-se planejar novas moléculas a partir da combinação do núcleo cumarínico e diferentes aminas e, então, avaliá-las por *docking* molecular com a finalidade de classificar as melhores estruturas para posterior síntese. Vale ressaltar que, no núcleo cumarínico, diferentes substituintes eletrodadores ou eletroretiradores foram inseridos no anel aromático, com o intuito de investigar se essas substituições poderiam produzir moléculas ainda mais promissoras.

Em adição, na composição destes compostos planejados, a função amida foi adicionada como um *linker*. A escolha da função amida se deve ao fato deste grupo estar presente em diferentes moléculas biologicamente ativas, bem como ser utilizado na síntese de compostos que apresentam diversas atividades farmacológicas (KUMARI *et al.*, 2020; LI; MA; SZOSTAK, 2020), incluindo atividade tripanocida frente a *T. cruzi* (SANTOS *et al.*, 2023; VARELA *et al.*, 2022, 2023) e a *T. brucei* (WEINMANN *et al.*, 2023).

Para a seleção das aminas, deu-se preferência àquelas previamente relatadas na literatura. Assim, considerando os estudos de Papadopoulou *et al.* (2013, 2016) e Varela *et al.* (2022, 2023), em que compostos contendo piperazina foram reportados com atividade antitripanossômicas, e as investigações de Varela *et al.* (2022, 2023), nas quais a combinação de amidas-piperazinas possibilitou na obtenção de compostos promissores frente a formas evolutivas de *T. cruzi* (Figura 16), este grupo foi inserido nos compostos planejados. Ainda,

tendo em vista a presença do indol em compostos ativos frente *T. cruzi* (CHEN *et al.*, 2009) e *T. brucei* (Figura 16) (KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2019), este grupo também foi selecionado para a composição de algumas moléculas.

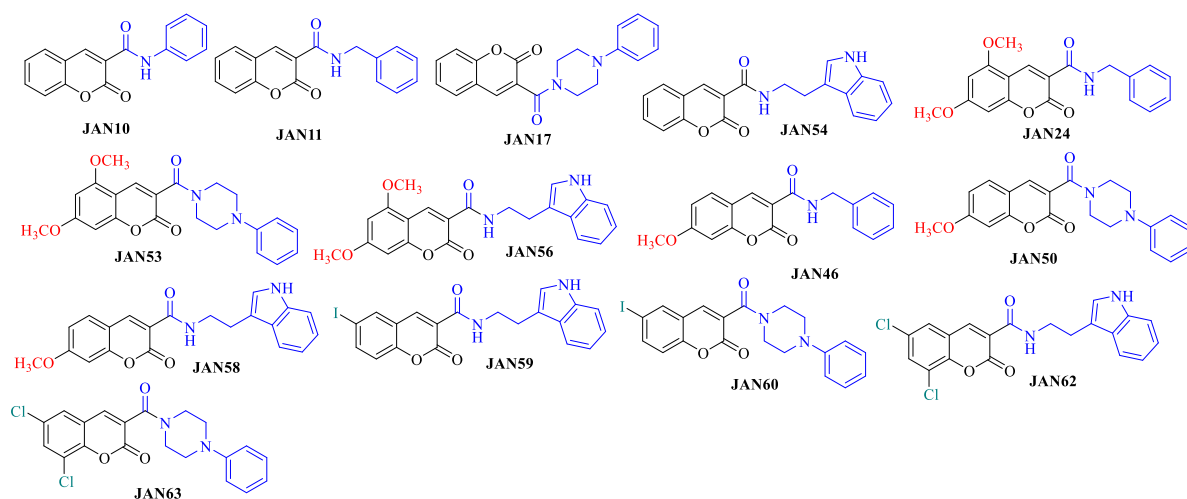
Figura 16 - Compostos contendo os grupos piperazina e indol com atividade tripanocida.



Fonte: Autora, 2023

Para os procedimentos de *docking* molecular foi adotada uma pontuação de corte igual a 44 (FitScore no GOLD[®]), sendo tal valor delimitado com base na análise do FitScore do **FN-27** frente a cruzaina (44). Ainda, considerando a similaridade e, conseqüentemente, o fato de muitas vezes os inibidores de cruzaina também inibirem *Tbr*CATL (SILVA *et al.*, 2021), foi realizado o *docking* molecular dos compostos planejados para ambas as cisteino proteases, sendo possível constatar semelhanças no que concerne a ordem dos valores de energia de correlação do complexo ligante/receptor. Por fim, um total de 14 compostos foram obtidos (Figura 17):

Figura 17 - Estruturas químicas dos compostos cumarínicos selecionados por docking molecular para síntese e avaliação biológica.



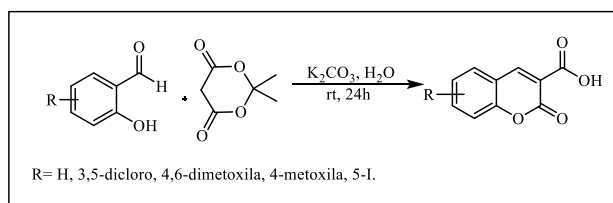
Fonte: Autora, 2023.

4.12 Síntese dos intermediários cumarinas-3-ácidos carboxílicos

Para a obtenção das cumarinas-3-ácido carboxílico foi aplicada a metodologia descrita por Brahmachari (2015), a qual faz uso de salicilaldeídos substituídos, ácido de Meldrum, água como solvente e carbonato de potássio como catalisador.

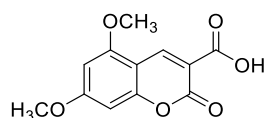
Assim, em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados os derivados 2-hidroxibenzaldeídos substituídos (1,0 mmol), ácido de Meldrum (1,2 mmol), carbonato de potássio (20% mol) e água destilada (10 mL) como solvente. A mistura reacional permaneceu sob agitação à temperatura ambiente durante um período de 24h. Após o término da reação, verificado por CCD, a solução resultante foi acidificada por meio da adição de algumas gotas de HCl, resultando na formação de um precipitado, que, posteriormente, foi filtrado e lavado com água fria, possibilitando a obtenção das cumarinas-3-ácido carboxílico (Esquema 5).

Esquema 5 - Procedimento geral para a obtenção das cumarinas-3-ácido carboxílico.



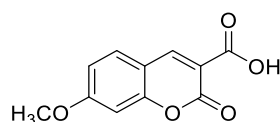
Fonte: Autora, 2023.

Ácido 5,7-dimetoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (JAN22)



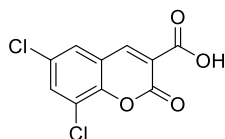
Rendimento: 77%; Aspecto: pó marrom amorfo; MM: 250,21 g mol⁻¹; PF: 252-255 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 8,5 (*s*, 1H); 6,6 (*d*, *J* = 1,9 Hz, 1H); 6,5 (*d*, *J* = 2,0 Hz, 1H); 3,9 (*s*, 3H); 3,8 (*s*, 3H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 166,4 (C=O de ácido carboxílico); 164,7 (C=O de lactona); 158,5 (C); 157,9 (C); 157,8 (C); 103,3 (C); 143,0 (CH); 95,7 (CH); 93,5 (CH); 57,0 (CH₃); 56,8 (CH₃).

Ácido 7-metoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (JAN27)



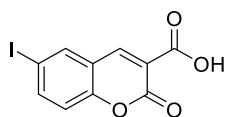
Rendimento: 76%; Aspecto: pó marrom amorfo, MM: 220,18 g mol⁻¹; PF: 215-218 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 8,3 (*s*, 1H); 7,7 (*d*, *J* = 8,6 Hz, 1H); 6,9 (*m*, 2H); 3,9 (*s*, 3H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 165,4 (C=O de ácido carboxílico); 163,8 (C=O de lactona); 158,3 (C); 156,5 (C); 120,2 (C); 112,6 (C); 145,2 (CH); 131,1 (CH); 100,7 (CH); 56,5 (CH₃).

Ácido 6,8-dicloro-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (JAN21)



Rendimento: 85%; Aspecto: pó branco amorfo, MM: 259,04 g mol⁻¹; PF: 225-228 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 8,3 (*s*, 1H); 7,9 (*dd*, *J* = 2,4 e 2,3 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 164,6 (C=O de lactona); 155,8 (C=O de ácido carboxílico); 149,1 (C); 128,6 (C); 122,6 (C); 122,6 (C); 121,2 (C); 145,5 (CH); 132,9 (CH); 128,3 (CH).

Ácido 6-iodo-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (JAN30)



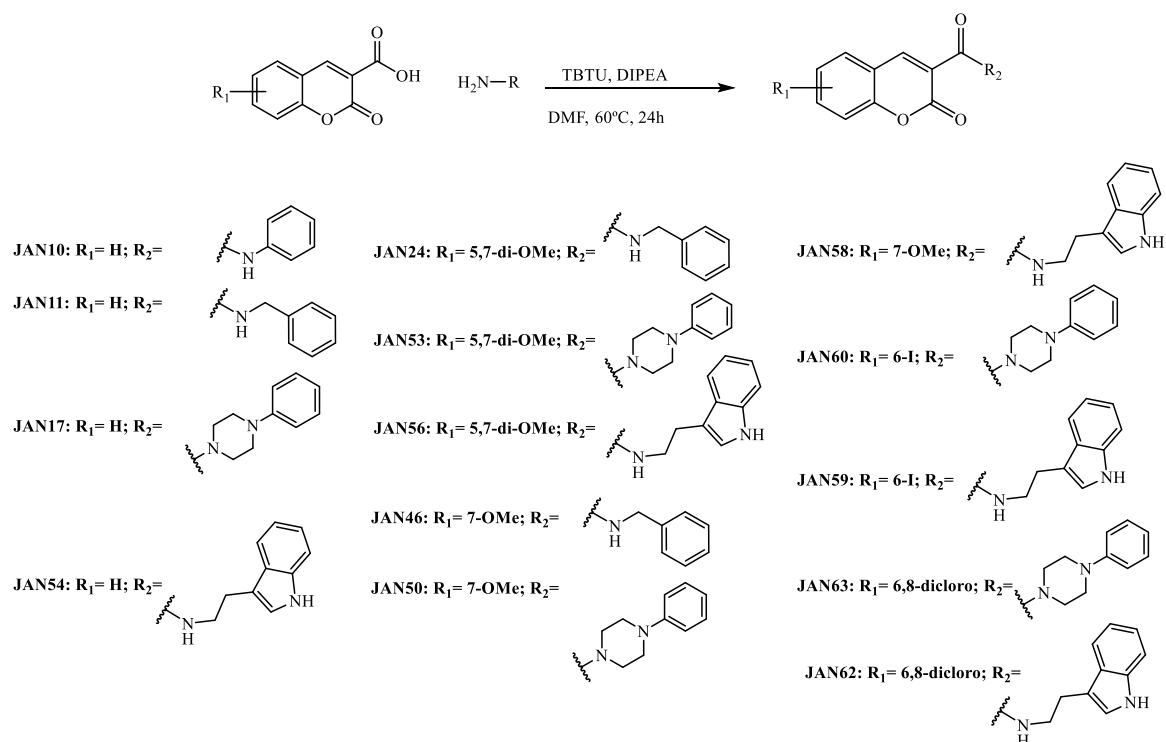
Rendimento: 93%; Aspecto: pó creme amorfo; MM: 316,05 g mol⁻¹; PF: 200-203 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 8,6 (*s*, 1H); 8,2 (*d*, *J* = 1,9 Hz, 1H); 7,9 (*dd*, *J* = 2,0 e 1,9 Hz, 1H); 7,2 (*d*, *J* = 8,6 Hz, 1H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 164,2 (C=O de ácido

carboxílico); 156,6 (C=O de lactona); 154,5 (C); 120,8 (C); 120,3 (C); 88,6 (C); 146,8 (CH); 142,4 (CH); 138,3 (CH); 119,8 (CH).

4.13 Acoplamento de aminas aromáticas aos intermediários cumarinas ácidas

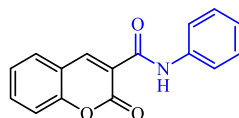
O correspondente intermediário cumarinas-3-ácido carboxílico (1 eq.) foi adicionado a um tubo selado, contendo 2 mL de dimetilformamida (DMF) anidro como solvente. Em seguida, adicionou-se 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamino tetrafluoroborato - TBTU (1 eq.) a solução, que permaneceu sob agitação em temperatura ambiente durante 15 minutos. Após este período, a amina correspondente (1,1 eq.) e DIPEA (3,5 eq.), como base catalítica, foram adicionadas. A mistura reacional foi mantida sob atmosfera de argônio e agitação à 60 °C durante 24 horas (Esquema 6). Logo após constatado o término da reação, mediante CCD, foi adicionada água gelada e realizada a extração líquido-líquido usando-se acetato de etila. Posteriormente, a fase orgânica foi coletada, seca sob sulfato de magnésio e submetida a evaporação rotativa, rendendo um pó impuro como produto. Assim, para os compostos **JAN10**, **JAN11**, **JAN17**, **JAN24**, **JAN50**, **JAN53**, **JAN56**, **JAN60** e **JAN63**, realizou-se uma recristalização a partir de uma mistura de acetona e água destilada (1:2), obtendo-se o produto desejado puro. Os produtos **JAN46**, **JAN54** e **JAN59** foram purificados por meio de uma coluna cromatográfica, utilizando-se hexano e acetato de etila (6:4) como fase móvel. Por fim, no que diz respeito aos compostos **JAN58** e **JAN62**, estes também foram purificados via coluna cromatográfica, usando hexano e acetato de etila como sistema de eluição na proporção de 1:1 para **JAN58** e 7:3 para **JAN62**. As frações obtidas puras foram evaporadas por redução de pressão, possibilitando, assim, a obtenção dos respectivos produtos.

Esquema 6 – Procedimento geral para a obtenção das amidas.



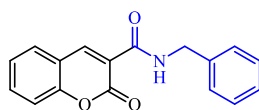
Fonte: Autora, 2023.

2-Oxo-N-fenil-2H-cromeno-3-carboxamida (JAN10)



Rendimento: 27%; Aspecto: pó amarelo cristalino, MM: 265,27 g mol⁻¹; PF: 245-248 °C. R_T: 3,43 min; Pureza: 99%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 10,6 (*s*, 1H); 8,9 (*s*, 1H); 8,0 (*d*, *J* = 7,4 Hz, 1H); 7,8 (*t*, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,7 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,6 (*d*, *J* = 8,1 Hz, 1H); 7,5 (*t*, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,4 (*t*, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,1 (*t*, *J* = 7,6 Hz, 1H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 160,9 (C=O de lactona); 160,3 (C=O de amida); 154,3 (C); 138,4 (C); 120,5 (C); 118,9 (C); 147,8 (CH); 134,7 (CH); 130,7 (CH); 129,4 (CH); 125,7 (CH); 124,7 (CH); 120,4 (CH); 116,72 (CH).

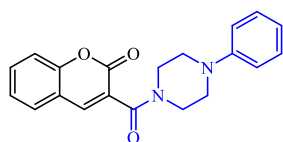
N-Benzil-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida (JAN11)



Rendimento: 39%; Aspecto: pó marrom claro cristalino; MM: 279,30 g mol⁻¹; PF: 165-168 °C; R_T: 3,23 min; Pureza: 95%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 9,13 (*t*, *J* = 5,7 Hz, 1H); 8,8 (*s*, 1H); 8,0 (*d*, *J* = 6,8 Hz, 1H); 7,7 (*t*, *J* = 7,2 Hz, 1H); 7,5 (*d*, *J* = 8,6 Hz, 1H); 7,4 (*t*, *J* = 7,5 Hz,

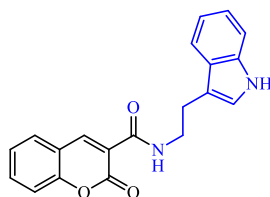
1H); 7,3 (*q*, *J*= 6,1 Hz, 4H); 7,2 (*t*, *J*= 6,4 Hz, 1H); 4,5 (*d*, *J*= 5,9, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 161,75 (C=O de lactona); 160,78 (C=O de amida); 154,38 (C); 139,36 (C); 118,96 (C); 147,95 (CH); 134,54 (CH); 140,71 (CH); 128,85 (CH); 127,85 (CH); 127,85 (CH); 127,42 (CH); 125,59 (CH); 119,66 (CH); 118,96 (CH); 116,60 (CH); 43,24 (CH₂).

3-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN17)



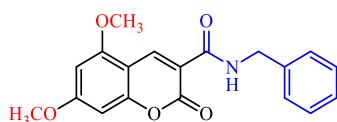
Rendimento: 40%; Aspecto: pó creme amorfo; MM: 334,38 g mol⁻¹; PF: 130-133 °C; R_T: 3,07 min; Pureza: 99%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 8,2 (*s*, 1H); 7,8 (*dd*, *J*= 1,3 e 1,1 1H); 7,7 (*m*, 1H); 7,5 (*d*, *J*= 8,2, 1H); 7,4 (*t*, *J*= 7,8 Hz, 1H); 7,2 (*t*, *J*= 8,2 Hz, 1H); 6,9 (*d*, *J*= 8,0 Hz, 1H); 6,8 (*t*, *J*= 7,2 Hz, 1H); 3,7 (*t*, *J*= 4,6 Hz, 2H); 3,5 (*t*, *J*= 4,6 Hz, 2H); (*t*, *J*= 4,6 Hz, 2H); 3,2 (*t*, *J*= 4,6 Hz, 2H); 3,1 (*t*, *J*= 4,7 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 163,32 (C=O de lactona); 158,14 (C=O de amida); 151,20 (C); 125,08 (C); 118,85 (C); 142,82 (CH); 133,19 (CH); 129,48 (CH); 125,31; 119,94 (CH); 116,75 (CH); 116,49 (CH); 116,28 (CH); 49,30 (CH₂); 48,81 (CH₂); 46,64 (CH₂); 41,75 (CH₂).

N-(2-(1H-indol-3-il)etil)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida (JAN54)



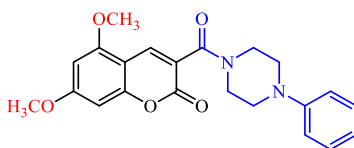
Rendimento: 35%; Aspecto: pó creme amorfo; MM: 332,36 g mol⁻¹; PF: 165-168 °C; R_T: 3,12 min; Pureza: 99%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 10,8 (*s*, 1H); 8,9 (*s*, 1H); 8,8 (*t*, *J*= 5,3 Hz, 1H); 7,9 (*d*, *J*= 7,7 Hz, 1H); 7,7 (*t*, *J*= 7,4 Hz, 1H); 7,6 (*d*, *J*= 7,9, 1H); 7,5 (*d*, *J*= 8,5 Hz, 1H); 7,4 (*t*, *J*= 7,5 Hz, 1H); 7,3 (*d*, *J*= 8,9 Hz, 1H); 7,2 (*d*, *J*= 1,0 Hz, 1H); 7,0 (*t*, *J*= 7,2 Hz, 1H); 6,9 (*t*, *J*= 7,5 Hz, 1H); 3,6 (*q*, *J*= 6,7 Hz, 2H); 2,9 (*t*, *J*= 7,2 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 161,4 (C=O de lactona); 160,8 (C=O de amida); 154,3 (C); 136,8 (C-NH); 127,6 (C); 119,5 (C); 118,9 (C); 111,9 (C); 147,8 (CH); 134,5 (CH); 130,7 (CH); 125,5 (CH); 123,3 (CH); 121,4 (CH); 118,8 (CH); 118,7 (CH); 116,6 (CH); 116,5 (CH); 111,8 (CH); 29,4 (CH₂); 25,4 (CH₂).

N-Benzil-5,7-dimetoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida (JAN24)



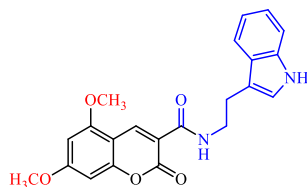
Rendimento: 50%; Aspecto: pó marrom amorfo; MM: 339,35 g mol⁻¹. PF: 172-175 °C; R_T: 3,34 min; Pureza: 98%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 9,0 (t, *J*= 5,9, 1H); 8,8 (s, 1H); 7,3 (d, *J*= 4,5 Hz, 4H); 6,7 (d, *J*= 1,7 Hz, 1H); 6,6 (d, *J*= 1,9 Hz, 1H); 4,5 (d, *J*= 5,9 Hz, 2H); 3,9 (s, 3H); 3,9 (s, 3H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 166,46 (C=O de lactona); 162,0 (C=O de amida); 161,3 (C); 158,6 (C); 157,7 (C); 139,5 (C); 113,2 (C); 103,9 (C); 142,0 (CH); 129,1 (CH); 128,1 (CH); 127,4 (CH); 96,1 (CH); 95,1 (CH); 93,5 (CH); 88,5 (CH); 57,2 (CH₃); 56,8 (CH₃); 43,19 (CH₂).

5,7-Dimetoxi-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN53)



Rendimento: 53%; Aspecto: pó creme amorfo; MM: 394,43 g mol⁻¹. 210-213 °C; R_T: 3,17 min; Pureza: 99%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 8,0 (s, 1H); 7,2 (t, *J*= 8,3, 2H); 6,9 (d, *J*= 7,9, 2H); 6,8 (t, *J*= 7,3, 1H); 6,7 (d, *J*= 1,8, 1H); 6,6 (d, *J*= 1,9 Hz, 1H); 3,8 (s, 3H); 3,9 (s, 3H); 3,5 (t, *J*= 4,6 Hz, 2H); (t, *J*= 4,6 Hz, 2H); 3,2 (t, *J*= 4,6 Hz, 2H); 3,2 (t, *J*= 4,7 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 164,9 (C=O de lactona); 163,8 (C=O de amida); 158,3 (C); 157,8 (C); 156,8 (C); 151,2 (C); 119,5 (C); 103,3 (C); 95,8 (CH); 93,7 (CH); 138,1 (CH); 129,46 (CH); 119,8 (CH); 116,4 (CH); 49,3 (CH₂); 48,8 (CH₂); 46,7 (CH₂); 41,8 (CH₂); 56,9 (CH₃); 56,7 (CH₃).

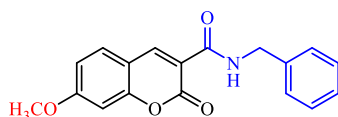
N-(2-(1H-Indol-3-il)etil)-5,7-dimetoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida (JAN56)



Rendimento: 39%; Aspecto: pó marrom amorfo; MM: 392,41 g mol⁻¹. PF: 220-223 °C; R_T: 3,18 min; Pureza: 98%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 10,8 (s, 1H); 8,8 (s, 1H); 8,7 (t, *J*= 5,5 Hz, 1H); 7,6 (d, *J*= 7,8 Hz, 1H); 7,3 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H); 7,2 (s, 1H); 7,0 (t, *J*= 7,4, 1H); 6,9 (t, *J*= 7,5 Hz, 1H); 6,7 (d, *J*= 1,6 Hz, 1H); 6,5 (d, *J*= 1,9 Hz, 1H); 3,9 (s, 3H); 3,8 (s, 3H); 3,6 (q, *J*= 6,9 Hz, 2H); 2,9 (t, *J*= 7,2 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, , DMSO-*d*₆, δ (ppm)):

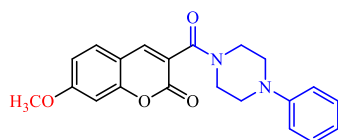
166,4 (C=O de lactona); 161,8 (C=O de amida); 161,3 (C); 158,3 (C-NH); 136,8 (C); 127,6 (C); 113,3 (C); 111,9 (C); 110,7 (C); 142,4 (CH); 123,2 (CH); 121,4 (CH); 120,3 (CH); 118,8 (CH); 111,8 (CH); 96,1 (CH); 95,5 (CH); 57,1 (CH₃); 56,9 (CH₃).

***N*-Benzil-7-metoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN46)**



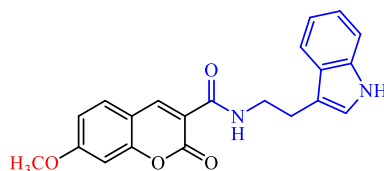
Rendimento: 46%; Aspecto: pó creme amorfo; MM: 309,32 g mol⁻¹. PF: 165-168 °C; R_T: 3,26 min; Pureza: 98%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 9,0 (t, *J*= 5,9, 1H); 8,8 (s, 1H); 7,9 (d, *J*= 8,9 Hz, 1H); 7,3 (t, *J*= 4,3 Hz, 4H); 7,2 (m, 1H); 7,1 (d, *J*= 2,1 Hz, 1H); 7,0 (dd, *J*= 2,3 e 2,3 Hz, 1H); 4,5 (d, *J*= 5,9 Hz, 2H); 3,9 (s, 3H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 164,9 (C=O de lactona); 162,0 (C=O de amida); 161,2 (C); 156,6 (C); 139,4 (C); 115,4 (C); 112,6 (C); 148,4 (CH); 132,02 (CH); 128,8 (CH); 127,8 (CH); 127,4 (CH); 114,0 (CH); 100,8 (CH); 56,7 (CH₃) 43,19 (CH₂).

7-Metoxi-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2*H*-cromen-2-ona (JAN50)



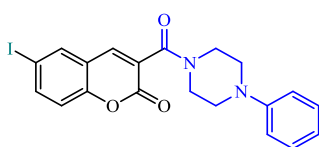
Rendimento: 36%; Aspecto: pó marrom amorfo; MM: 364,40 g mol⁻¹. PF: 141-143 °C; R_T: 3,09 min; Pureza: 97%. RMN ¹H (600 MHz, , DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,0 (s, 1H); 6,6 (d, *J*= 8,6, 1H); 6,0 (t, *J*= 8,5, 3H); 5,9 (d, *J*= 2,2, 1H); 6,6 (d, *J*= 8,6, 1H); 5,8 (d, *J*= 7,9, 2H); 5,6 (t, *J*= 7,1, 1H); 2,7 (s, 3H); 2,6 (t, *J*= 4,6 2H); 2,3 (t, *J*= 4,6 Hz, 2H); 2,0 (t, *J*= 4,6 Hz, 2H); 1,9 (t, *J*= 4,6 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, , DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 163,7 (C=O de lactona); 158,3 (C=O de amida); 156,0 (C); 151,2 (C); 121,3 (C); 112,4 (C); 119,5 (C); 103,3 (C); 143,3 (CH); 130,6 (CH); 129,4 (CH); 119,9 (CH); 116,7 (CH); 116,4 (CH); 113,4 (CH); 101,14 (CH); 49,3 (CH₂); 48,8 (CH₂); 46,7 (CH₂); 41,8 (CH₂); 56,6 (CH₃).

***N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-7-metoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN58)**



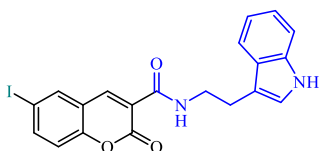
Rendimento: 41% ; Aspecto: pó marrom amorfo ; MM: 362,39 g mol⁻¹; PF: 110-113 °C; R_T: 2,84 min; Pureza: 92%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 10,8 (*s*, 1H); 8, 8 (*s*, 1H); 8,7 (*t*, *J*= 6,3 Hz, 1H); 7,9 (*d*, *J*= 8,6 Hz, 1H); 7,6 (*d*, *J*= 7,8 Hz, 1H); 7,3 (*d*, *J*= 8,0, 1H); 7,2 (*s*, 1H); 7,0 (*m*, 3H); 6,9 (*t*, *J*= 7,3 Hz, 1H); 3,8 (*s*, 3H); 3,6 (*q*, *J*= 6,7 Hz, 2H); 2,9 (*t*, *J*= 6,9 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 164,9 (C=O de lactona); 161,8 (C=O de amida); 161,3 (C); 156,6 (C); 136,8 (C-NH); 127,6 (C); 115,4 (C); 112,6 (C); 111,9 (C); 148,2 (CH); 131,9 (CH); 123,3 (CH); 121,4 (CH); 118,8 (CH); 118,7 (CH); 114,1 (CH); 111,8 (CH); 100,7 (CH); 56,7 (CH₃); 56,9 (CH₂); 25,5 (CH₂).

6-iodo-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN60)



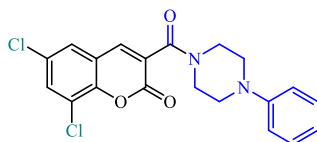
Rendimento: 60%; Aspecto: pó laranja claro amorfo; MM: 460,27 g mol⁻¹; PF: 210-213 °C; R_T: 3,13 min; Pureza: 97%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 8,1 (*d*, *J*= 14,4 Hz, 2H); 7,9 (*dd*, *J*= 2,6 e 2,6 Hz, 1H); 7,3 (*d*, *J*= 8,9 Hz, 1H); 7,2 (*t*, *J*= 7,9 Hz, 2H); 6,9 (*d*, *J*= 7,9 Hz, 2H); 6,8 (*t*, *J*= 7,3 Hz, 1H); 3,7 (*t*, *J*= 5,2 Hz, 2H); 3,5 (*t*, *J*= 5,4 Hz, 2H); 3,2 (*t*, *J*= 5,4 Hz, 2H); 3,1 (*t*, *J*= 4,7 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 162,9 (C=O de lactona); 157,7 (C=O de amida); 153,7 (C); 151,2 (C); 125,8 (C); 121,4 (C), 88,7 (C); 141,4 (CH); 141,1 (CH); 137,4 (CH); 129,5; 119,9 (CH); 119,1 (CH); 116,5 (CH); 49,3 (CH₂); 48,8 (CH₂); 46,6 (CH₂); 41,8 (CH₂).

N-(2-(1H-indol-3-il)etil)-6-iodo-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida (JAN59)



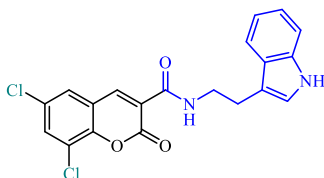
Rendimento: 38%; Aspecto: pó amarelo cristalino; MM: 458,26 g mol⁻¹; PF: 224-227°C; R_T: 3,26 min; Pureza: 99%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 10,8 (*s*, 1H); 8, 8 (*s*, 1H); 8,7 (*t*, *J*= 7,7 Hz, 1H); 8,3 (*s*, 1H); 8,0 (*dd*, *J*= 7,7 e 7,7 Hz, 1H); 7,6 (*d*, *J*= 7,7 Hz, 1H); 7,3 (*d*, *J*= 8,3 e 8,7, 2H); 7,2 (*s*, 1H); 7,0 (*t*, *J*= 7,4 Hz, 1H); 6,9 (*t*, *J*= 7,4 Hz, 1H); 3,6 (*q*, *J*= 7,0 Hz, 2H); 2,9 (*t*, *J*= 7,0 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 161,2 (C=O de lactona); 160,3 (C=O de amida); 153,9 (C); 136,8 (C-NH); 127,6 (C); 121,2 (C); 120,4 (C); 111,9 (C); 146,5 (CH); 142,3 (CH); 138,5 (CH); 123,3 (CH); 121,4 (CH); 118,8 (CH); 118,8 (CH); 118,7 (CH); 111,8 (CH); 89,2 (CH₂); 25,4 (CH₂).

6,8-dicloro-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN63)



Rendimento: 32%; Aspecto: pó amarelo cristalino; MM: 403,26 g mol⁻¹; PF: 205-208 °C; R_T: 3,23 min; Pureza: 99%. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 8,1 (*s*, 1H); 8,0 (*d*, *J*= 3,4 Hz, 1H); 7,8 (*d*, *J*=6,0 Hz, 1H); 7,2 (*t*, *J*= 8,0 Hz, 2H); 6,9 (*d*, *J*= 8,0 Hz, 2H); 6,8 (*t*, *J*= 7,0 Hz, 1H); 3,7 (*t*, *J*= 5,6 Hz, 2H); 3,5 (*t*, *J*= 5,6 Hz, 2H); 3,2 (*t*, *J*= 5,6 Hz, 2H); 3,1 (*t*, *J*= 5,1 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 162,6 (C=O de lactona); 157,0 (C=O de amida); 151,2 (C); 148,6 (C); 128,9 (C), 126,8 (C); 121,4 (C), 121,4 (C); 141,3 (CH); 132,1 (CH); 129,5; 127,6 (CH); 119,9 (CH); 116,5 (CH); 49,3 (CH₂); 48,8 (CH₂); 46,5 (CH₂); 41,8 (CH₂).

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6,8-dicloro-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN62)



Rendimento: 31% ; Aspecto: pó amarelo cristalino; MM: 401,24 g mol⁻¹ ;PF: 185-187 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 10,8 (*s*, 1H); 8,8 (*s*, 1H); 8,7 (*t*, *J*= 7,6 Hz, 1H); 8,1 (*s*, 1H); 8,0 (*d*, *J*= 7,6 Hz, 1H); 7,6 (*d*, *J*= 7,8 Hz, 1H); 7,3 (*d*, *J*= 8,1, 1H); 7,2 (*s*, 1H); 7,0 (*t*, *J*= 7,1 Hz, 1H); 6,9 (*t*, *J*= 7,3 Hz, 1H); 3,6 (*q*, *J*= 6,8 Hz, 2H); 2,9 (*t*, *J*= 7,3 Hz, 2H). RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 160,9 (C=O de lactona); 159,5 (C=O de amida); 148,8 (C); 136,8 (C-NH); 129,2 (C); 127,6 (C); 121,6 (C); 121,3 (C); 146,3 (CH); 133,2 (CH); 128,7 (CH); 123,3 (CH); 121,4 (CH); 118,8 (CH); 118,7 (CH); 111,9 (CH); 89,2 (CH₂); 25,4 (CH₂).

4.14 Determinação de parâmetros físico-químicos

Algumas propriedades físico-químicas dos compostos sintetizados, mais especificamente descritores relacionados a regra de Lipinski, foram analisadas mediante a utilização da ferramenta de *web-software* SwissADME (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019) (<http://www.swissadme.ch/>). Tais parâmetros descrevem a similaridade dos compostos com

fármacos, de modo a desempenhar um importante papel no que diz respeito processo de design e desenvolvimento de medicamentos (JIA *et al.*, 2020) .

5 RESULTADOS

5.1 Planejamento dos Inibidores por vFBDD

O planejamento racional de inibidores baseados em fragmentos - FBDD (do inglês, *fragment-based drug design*) emergiu como uma alternativa promissora e eficaz para a identificação de compostos bioativos na descoberta de fármacos, nas últimas décadas (KIRSCH *et al.*, 2019; KUMAR; VOET; ZHANG, 2012). Inicialmente, neste estudo, foi aplicada à técnica computacional virtual FBDD utilizando uma pequena biblioteca interna de cumarinas, exibindo 32 núcleos substituídos diferentes (APÊNDICE A). Subsequentemente, estes análogos baseados na natureza foram investigados pelas suas afinidades de ligação (FitScore) tanto para proteases CRZ como *Tbr*CATL, mediante a realização de estudos de *docking* molecular.

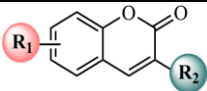


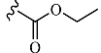



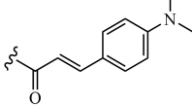
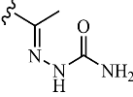
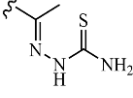
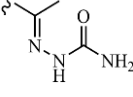
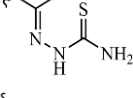
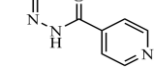
Em seguida, todas essas moléculas foram analisadas por inspeção visual, a fim de identificar os substituintes associados às interações com estes núcleos cumarínicos. Em geral, foi verificado que estes pequenos compostos se ligam preferencialmente ao subsítio S2. Assim, os sete pequenos núcleos cumarínicos mais promissores (FitScore ≥ 44.0) foram selecionados para novas investigações experimentais em direção a estes alvos. Além disso, foram propostas várias modificações para estes núcleos. Ao todo, 77 compostos foram racionalmente idealizados utilizando a abordagem de crescimento de fragmentos. Depois, todos estes compostos selecionados foram também investigados por *docking* molecular em ambas as proteases de cisteína. A partir desta etapa, observou-se que alguns deles poderiam interagir com os subsítios S2 e S1 (parcialmente), estando próximos da tríade catalítica.

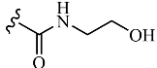
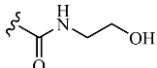
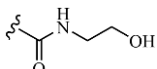
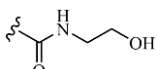
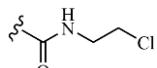
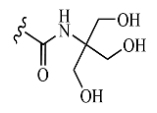
5.2 Atividade Inibitória Enzimática de Cumarinas Sobre Proteases CRZ e *Tbr*CATL e Relação Estrutura-Atividade (REA)

No que diz respeito a atividade inibitória enzimática, inicialmente, seis núcleos de cumarina diferentes foram testados frente às proteases CRZ e *Tbr*CATL, tendo em vista que esses pequenos fragmentos químicos foram selecionados para gerar moléculas mais complexas. Posteriormente, a atividade inibitória dos novos análogos à base de cumarina também foi avaliada. De maneira geral, observa-se que esta série de cumarinas apresentou baixa inibição tanto para CRZ e *Tbr*CATL, exceto para **FN-27** e **RW-03**, que exibiram uma atividade mais potente contra CRZ (IC₅₀: 14,4 \pm 0,02 μ M e 79,9 \pm 8,6 μ M, respectivamente) e *Tbr*CATL (IC₅₀:

2,0 ± 0,6 μM e 84,7 μM ± 5,77 μM, respectivamente). No entanto, é possível discutir alguns aspectos da relação estrutura-atividade (REA) para esses compostos, considerando os resultados dos ensaios realizados antes e após 10 min de pré-incubação com ambas as proteases (Tabela 1). Posteriormente, as curvas dose-resposta concernentes aos compostos **FN-27** e **RW-03** são apresentadas na Figura 18.

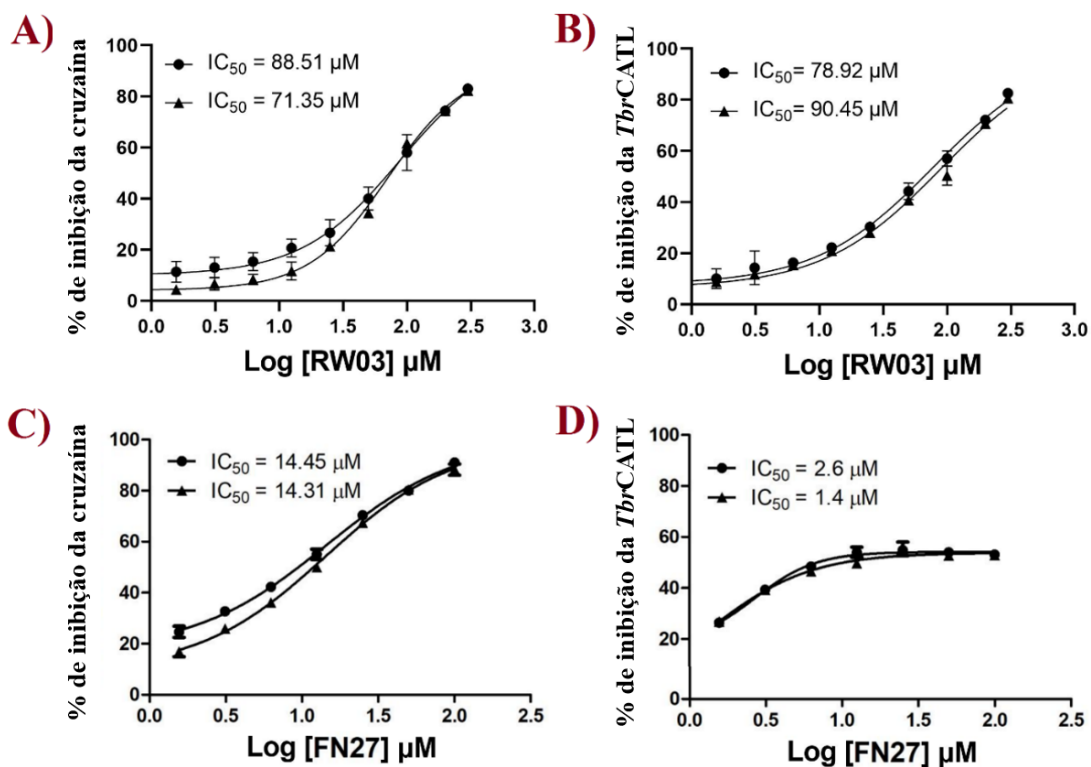
Tabela 1 - Atividade inibitória de compostos cumarínicos em relação às proteases CRZ e *Tbr*CATL.

						
Código	R1	R2	CRZ %inib. (100 μM) ^a		<i>Tbr</i> CATL %inib. (100 μM) ^a	
			SI	I	SI	I
FN-06	7-OH		ND	ND	ND	ND
FN-07	8-OCH ₃		22 ± 2	10 ± 3	17 ± 2	12 ± 1
MP-01	H		I	I	I	I
MP-03	6-NO ₂		21 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	1 ± 2
MP-04	7-CH ₃		35 ± 2	31 ± 1	15 ± 1	7 ± 1
MP-05	H		22 ± 2	27 ± 2	17 ± 2	16 ± 2
FN-10	H		28 ± 2	20 ± 4	19 ± 1	22 ± 2
FN-17	7-OH		ND	ND	ND	ND
FN-19	7-OH		ND	ND	ND	ND
FN-25	8-OCH ₃		17 ± 1	10 ± 2	9 ± 0	2 ± 1
FN-27	8-OCH ₃		76 ± 2	99 ± 1	86 ± 7	100 ± 0
FN-29	8-OCH ₃		10 ± 1	1 ± 0	8 ± 1	0 ± 0

RW-01	H		I	I	I	I
RW-02	8-OCH ₃		21 ± 3	25 ± 3	14 ± 2	18 ± 1
RW-03	6-NO ₂		54 ± 4	60 ± 2	53 ± 1	54 ± 2
RW-04	6-OH		I	I	I	I
RW-05	H		I	I	I	I
LS-04	7-OH		11 ± 0	5 ± 1	11 ± 1	7 ± 1
E-64 (1 μM)	-	-	60 ± 2	99 ± 0	94 ± 1	100 ± 0

Fonte: Autora, 2023. ^a Os resultados representam a média e o erro de desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata. Os erros são dados pela razão entre o desvio padrão e a raiz quadrada do número de medições. SI: Sem pré-incubação. I: Pré-incubação. ND: Não determinado. I: Inativo.

Figura 18 - Curvas dose-resposta para determinação de IC₅₀ do inibidor RW-03 e FN-27 sobre as proteases cruzaina e TbrCATL.



Fonte Autora, 2023. Os valores de IC₅₀ representam a média de dois experimentos independentes que foram determinados com base em sete concentrações de compostos em triplicata. Os erros são dados pela razão entre o desvio padrão e a raiz quadrada do número de medições.

Para esta discussão, a cumarina cetona não substituída (**MP-05**) foi considerada como ponto de partida, tendo apresentado uma fraca atividade contra CRZ de *T. cruzi* (SI: 22% ± 2 e I: 27% ± 2) e *TbrCATL* (SI: 17% ± 2 e 16% ± 2). Portanto, quando um grupo metila é inserido na posição 7 da **MP-05**, tem-se um composto (**MP-04**) com atividade semelhante contra CRZ (SI: 35% ± 2 e I: 31% ± 1) e *TbrCATL* (SI: 15% ± 1 e I: 7% ± 1). Ainda, tendo em vista que o substituinte nitro é conhecido como um grupo farmacofórico associado à atividade antiparasitária contra *T. cruzi* e *T. brucei* (SILVA *et al.*, 2017; SANTOS-JÚNIOR *et al.*, 2022; ZHOU *et al.*, 2013), uma cumarina contendo 6-nitro (**MP-03**) foi investigada em ambos os alvos, demonstrando baixa inibição antes (CRZ SI: 21% ± 1 e *TbrCATL* SI: 10% ± 1) e após (CRZ I: 10% ± 1 e *TbrCATL* I: 1 % ± 2) pré-incubação.

Posteriormente, quando ocorre uma substituição do grupo metila por uma metoxila, obtém-se uma cumarina (**FN-07**) com inibição de CRZ semelhante, embora apresente certa melhora em relação à inibição de *TbrCATL* (SI: 17% ± 1 e I: 12% ± 1). Contudo, quando um grupo hidroxila é inserido na posição 7 do **MP-05**, observa-se um composto (**FN-06**) com alta fluorescência intrínseca. Tal fato impossibilitou na determinação da atividade de **FN-06**, uma vez que sua alta fluorescência foi considerada um sinal de interferência no ensaio enzimático, o qual se baseia na clivagem de substrato que libera um fluoróforo.

Continuando a investigação, quando o grupo 3-cetona de **MP-05** é substituído por um grupo éster etílico (3-COOEt), obteve-se um composto inativo (**MP-01**). Vale destacar que todos os núcleos de cumarina mencionados anteriormente foram selecionados como ponto de partida para a obtenção de novos análogos de cumarina, excetuando o **MP-01** em razão da sua inatividade. Também, decidiu-se avançar com o composto **FN-06** para a próxima etapa, esperando que sua fluorescência inerente fosse reduzida após algumas modificações estruturais.

Em relação ao núcleo de cumarina **MP-05**, este originou os análogos **FN10** e **RW-05**. Inicialmente, quando um grupo fenildimetilamina é ligado à vinilcetona como aceptor de Michael (**FN-10**), observa-se valores de inibição baixos e semelhantes para ambas as proteases (CRZ SI: 28% ± 2 e I: 20% ± 4; *TbrCATL* SI : 19% ± 1 e I: 22% ± 2), sendo similar ao seu precursor (**MP-05**). Ao introduzir um grupo amida halogenado no núcleo do **MP-05**, um composto inativo (**RW-05**) é gerado. Da mesma forma, quando ocorre a substituição do átomo

de cloro por um grupo hidroxila (**RW-01**), obtém-se um composto inativo, em concentração de até 100 μM . Por outro lado, quando um grupo amida tri-hidroxilado é inserido no **FN-06** resulta em uma molécula (**LS-04**) quase inativa até a concentração de 100 μM , exibindo valores de inibição ainda piores após a pré-incubação (CRZ I: $5\% \pm 1$ e *TbrCATL* I: $7\% \pm 1$). Ainda, quando um grupo amida hidroxilado é inserido no **FN-07**, tem-se uma molécula pouco ativa (**RW-02**), sendo pior que seu núcleo precursor (CRZ SI: $21\% \pm 3$ e I: $25\% \pm 3$; *TbrCATL* SI: $14\% \pm 2$ e I: $18\% \pm 1$).

Além disso, quando este mesmo substituinte químico está presente em um núcleo contendo 6-nitro (**MP-03**), um composto (**RW-03**) exibindo o segundo melhor valor é observado, inibindo >50% das atividades das proteases. Os valores de IC_{50} apresentados por esse composto foram de $79,9 \pm 8,6 \mu\text{M}$ para CRZ e $84,7 \pm 5,77 \mu\text{M}$ para *TbrCATL*. No entanto, ao realizar a substituição de seu grupo nitro por um grupo 6-hidroxila, gera-se uma molécula (**RW-04**) inativa, sugerindo, assim, a importância do grupo nitro para a atividade desse núcleo químico.

Como referido anteriormente, foram realizadas modificações estruturais no composto **FN-06** para produzir menos análogos fluorescentes. Além do mais, tendo em vista que tiossemicarbazonas e semicarbazonas podem ser ativas contra *T. cruzi* e *T. brucei* (DU *et al.*, 2002; FUJII *et al.*, 2005; JASINSKI *et al.*, 2022; MORENO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2011), o núcleo do **FN-06** foi convertido em uma semicarbazona (**FN-17**) e uma tiossemicarbazona (**FN-19**). Contudo, detectou-se, mais uma vez, uma alta fluorescência, impossibilitando a determinação dos valores de inibição de tais compostos. Assim, sugere-se que a presença do grupo 7-hidroxila, doador de elétrons, seja desfavorável para a atividade das cumarinas correspondentes, pois gera um comportamento PAINS (*Pan-Assay Interference*). Os compostos PAINS são conhecidos como agentes altamente promíscuos, levando a obtenção de resultados falsos positivos, bem como por apresentarem subestruturas que são capazes de interferir em ensaios bioquímicos (BAELL; NISSINK, 2018; BOLZ; ADASME; SCHROEDER, 2021). A abordagem de *docking* molecular, infelizmente, não é capaz de prever fluorescência, citotoxicidade ou mesmo solubilidade, permitindo, muitas vezes, selecionar compostos falso-positivos.

Da mesma forma, a partir do núcleo de cumarina **FN-07**, foram obtidos os seguintes compostos: uma semicarbazona (**FN-25**), uma tiossemicarbazona (**FN-27**) e uma piridilacildirazona (**FN-29**). Quando a tiossemicarbazona-cumarina substituída com o grupo metoxila na posição 8, o melhor composto desta série foi obtido (**FN-27**), apresentando valores máximos de inibição após pré-incubação com as proteases CRZ e *TbrCATL*. O composto **FN-**

27 inibiu mais de 70% da atividade de ambas as enzimas, tendo seus valores de IC₅₀ determinados para as proteases CRZ e *Tbr*CATL, sendo $14,4 \pm 0,02 \mu\text{M}$ e $2,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$, respectivamente.

Entretanto, quando o grupo tiona deste análogo da tiosemicarbazona foi substituído por um grupo carbonila, gerando a correspondente semicarbazona (**FN-25**), observa-se uma drástica redução de sua atividade sobre CRZ (SI: $17\% \pm 1$ e I: $10\% \pm 2$), sendo praticamente inativo contra *Tbr*CATL (SI: $9\% \pm 0$ e I: $2\% \pm 1$). Similarmente, quando a porção semicarbazona do **FN-25** é substituída por um grupo isonicotinoilhidrazona, foi obtida uma molécula (**FN-29**) com o mesmo perfil para as medições antes e após a pré-incubação para ambos os alvos. Por fim, vale salientar que todas as discussões sobre REA, focadas em compostos que demonstraram apenas valores de % de inibição, foram realizadas considerando observações apenas na concentração de $100 \mu\text{M}$, obtidas por dois experimentos independentes em triplicatas, não sendo considerado as tendências em diferentes concentrações nesta discussão.

Subsequentemente, com o intuito de verificar se **FN-27** exerce sua atividade por meio de um mecanismo de ação envolvendo a protease CRZ ou *Tbr*CATL, foram realizadas investigações adicionais desse análogos cumarínico em células infectadas por amastigotas de *T. cruzi* e tripomastigotas de *T. brucei*. Além disso, os demais análogos, provenientes dos núcleos cumarínicos, também foram rastreados quanto às suas atividades em diferentes formas evolutivas, pois foi considerado que esses outros compostos poderiam exercer seus efeitos por um mecanismo de ação diferente, no qual CRZ ou *Tbr*CATL poderiam não estar envolvidos nele.

5.3 Atividade Tripanocida *in vitro* de Análogos Cumarínicos em Células Infectadas por Formas Amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e Tripomastigotas de *Trypanosoma brucei*

Na investigação acerca da atividade tripanocida dos compostos à base de cumarina sintetizados, foram realizados ensaios *in vitro* contra mioblastos de camundongos (C2C12) infectados com *T. cruzi* CA-I/72. O fármaco benznidazol foi usado como controle positivo nos ensaios anti-*T. cruzi*. Assim, constatou-se que o composto **FN-27** apresentou um ótimo valor de EC₅₀, como pode ser observado na Tabela 2. Além disso, como verificado anteriormente, esta tiosemicarbazona **FN-27** apresentou uma excelente atividade contra a principal cisteína protease do *T. cruzi*, CRZ (ver Tabela 1), sendo coerente, assim, com a importância da inibição dessa cisteína protease para a atividade tripanocida.

Posteriormente, com o intuito de obter informações sobre a atividade desses análogos contra *T. brucei*, que podem estar relacionadas à inibição da protease *TbrCATL*, tais cumarinas também foram testadas contra formas tripomastigotas (corrente sanguínea) desse protozoário (Lister 427). Dentre os 13 derivados cumarínicos testados (Tabela 2), somente o composto **FN-10** foi capaz de inibir o crescimento de *T. brucei*, tendo apresentado um valor de EC₅₀ de 4,8 ± 0,15 μM (Figura 19). Ainda, nenhum dos compostos avaliados foi apreciavelmente citotóxico para células HEK293 a 10 μM (viabilidade ≥ 90%).

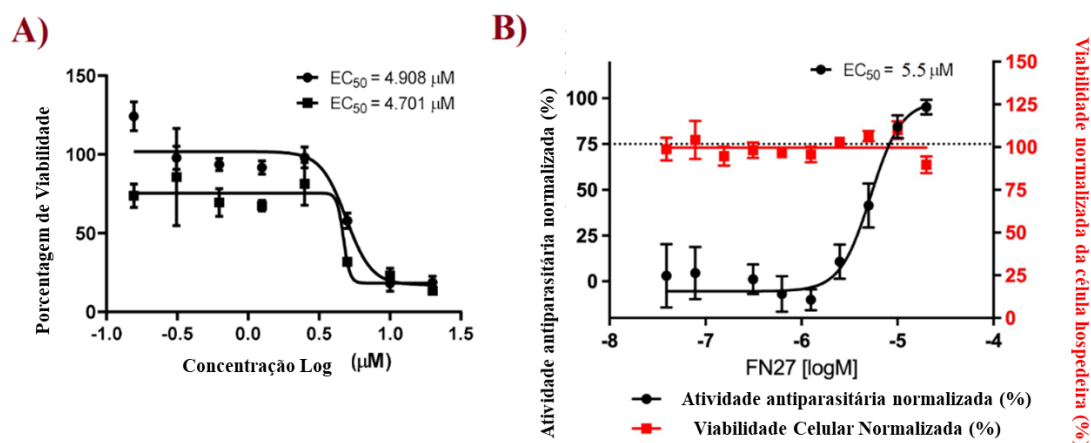
Adicionalmente, com o intuito de obter informações sobre um possível alvo de *T. brucei* para **FN-10**, uma vez que este composto não demonstrou atividade contra *TbrCATL*, um total de 72 alvos macromoleculares foram investigados por *docking* molecular (ver Tabela 1A em APÊNDICE B). Dessa forma, a prostaglandina F_{2α} sintase de *T. brucei* foi considerada um alvo potencial para **FN-10**. Esta é expressa na tripomastigota e catalisa a redução dependente de NADPH do 9,11-endoperóxido PGH F_{2α} para PGF_{2α}, estando envolvido na elevação da concentração de PGF_{2α} durante HAT (FIGARELLA *et al.*, 2006; KUBATA *et al.*, 2000; OKANO *et al.*, 2002).

Tabela 2 - Atividade *in vitro* de análogos cumarínicos contra células infectadas por formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* e células HEK293.

Código	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei</i>		Citotoxicidade em HEK293	
	EC ₅₀ (μM) ^a	%Inibição (a 10 μM)	EC ₅₀ (μM ± DP)	% Viabilidade (a 10 μM)	CC ₅₀ (μM ± DP)
FN-10	> 10	98	4.8 ± 0.1	93	> 10
FN-17	> 20	26	> 10	100	> 10
FN-19	> 20	13	> 10	96	> 10
FN-25	> 20	31	> 10	100	> 10
FN-27	5.5	9	> 10	99	> 10
FN-29	> 20	17	> 10	100	> 10
RW-01	> 20	26	> 10	100	> 10
RW-02	> 20	2	> 10	95	> 10
RW-03	> 20	45	> 10	97	> 10
RW-04	> 20	29	> 10	100	> 10
RW-05	> 20	25	> 10	100	> 10
LS-04	> 20	29	> 10	100	> 10
Pentamidina^b	-	100.0	0.015 ± 0.0003	-	-
Benznidazol^a	2.4 ± 0.2	-	-	-	-

Fonte: Autora, 2022. ^aValor de EC₅₀ de um experimento que foi determinado com base em diluições em série 1:2 de cada composto em triplicado. Os erros são dados pela razão entre o desvio padrão e a raiz quadrada do número de medições; ^b A concentração testada na triagem foi de 4 μM. Pentamidina: controle positivo para *T. brucei*.

Figura 19 - Curvas dose-resposta para determinação de EC₅₀ dos compostos FN-10 (A) e FN-27 (B) sobre tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* e células infectadas por *T. cruzi*.



Fonte: Autora, 2022.

5.4 Investigação *in silico* do FN-27 e Suas Interações Com as Proteases CRZ e TbrCATL

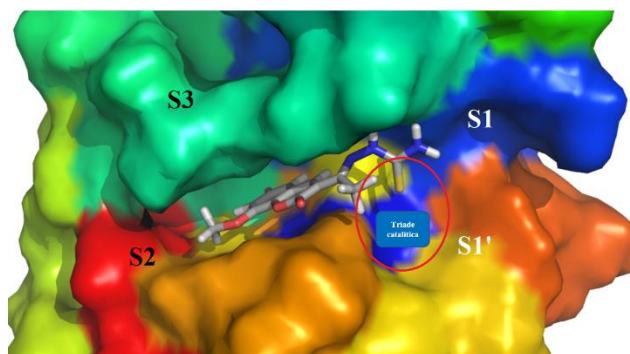
5.4.1 Simulações de *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizados para obter informações sobre os modos de ligação do composto **FN-27** nos sítios catalíticos das proteases *TbrCATL* e CRZ. Inicialmente, foi analisada a posição de ligação de **FN-27** complexado no sítio de ligação de CRZ. Assim, foi verificado que **FN-27** está ligado entre os subsítios S1 e S2 (Figura 20). Observa-se que seu núcleo de cumarina 8-metoxi-substituído está bem encaixado no subsítio S2, uma vez que tem preferência por interações de van der Waals com substituintes hidrofóbicos (CHOE *et al.*, 2006; POLITICELLI *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2019), enquanto sua porção tiosemicarbazona é orientada para o subsítio S1, que tipicamente está associado a inibidores e acomoda melhor os grupos não volumosos (SANTOS *et al.*, 2021; SANTOS; FERREIRA, 2022).

Em relação às suas interações com os resíduos do sítio de ligação do CRZ, observa-se que **FN-27** apresenta interação de van der Waals com o resíduo His¹⁵⁹ e interação π -alquil com resíduo de Cys²⁵, que correspondem a resíduos da tríade catalítica. Observa-se ainda uma

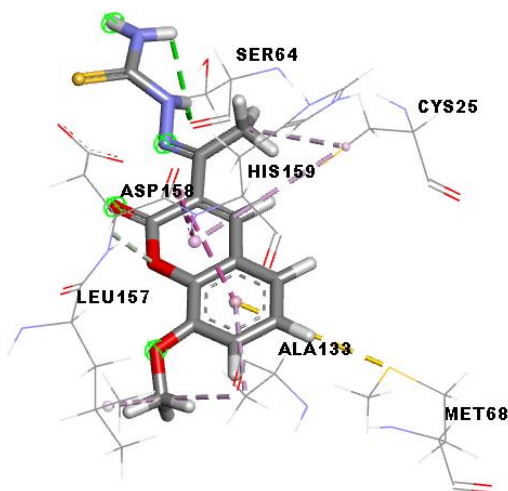
ligação convencional de hidrogênio com a Ser⁶⁴, bem como interações com Met⁶⁸, Ala¹³³, Leu¹⁵⁷ e Asp¹⁵⁸ (Figura 21). Quanto ao complexo FN-27 com a protease *TbrCATL*, observa-se interações com resíduos catalíticos de pares iônicos Cys²⁵ e His¹⁶², bem como interações com Ala²⁰⁸, Ala¹³⁸, Met⁶⁸, Leu¹⁶⁰, Asp¹⁶¹ (Figura 23). Ademais, FN-27 apresenta uma pose semelhante no sítio de ligação *TbrCATL*, embora observou-se que seu núcleo cumarínico está menos encaixado no subsítio S2 e seu grupo tiosemicarbazona encontra-se mais orientado para o subsítio S1 (Figura 22).

Figura 20 - Composto FN-27 em complexo com a protease CRZ.



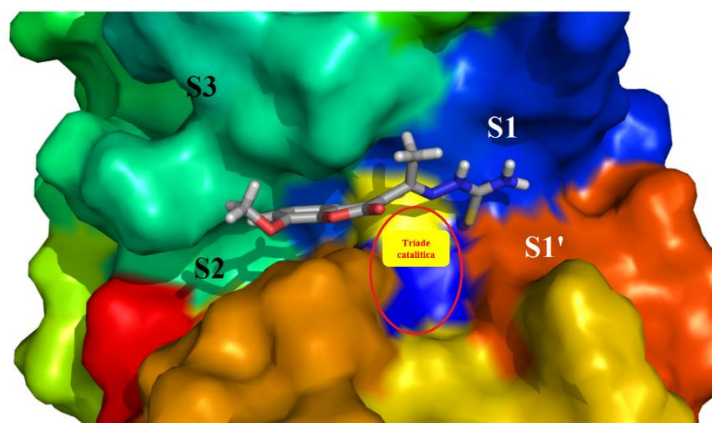
Fonte: Autora, 2023. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMol[®] v. 0.99.

Figura 21 - Interações observadas para os resíduos do sítio de ligação FN-27 e CRZ.



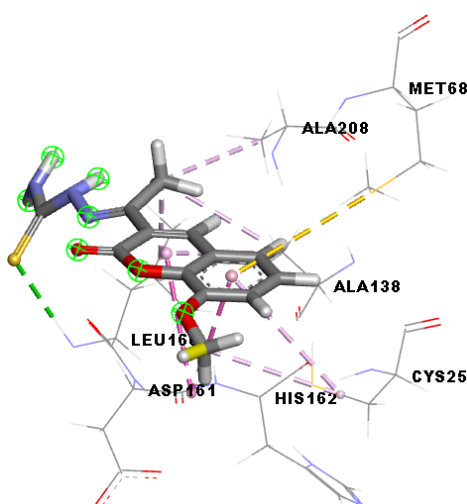
Fonte: Autora, 2023. Diagrama gerado através do *software* Discovery Studio 2021.

Figura 22 - Composto FN-27 em complexo com a protease *TbrCATL*.



Fonte: Autora, 2023. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMol® v. 0.99

Figura 23 - Interações de FN-27 e resíduos do sítio de ligação *TbrCATL*.



Fonte: Autora, 2022. Diagrama gerado através do *software* Discovery Studio 2021.

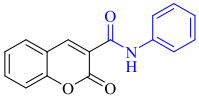
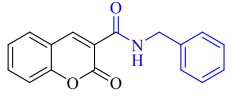
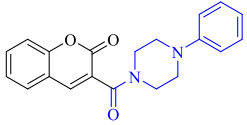
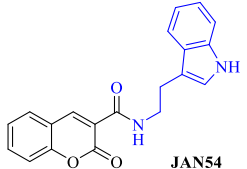
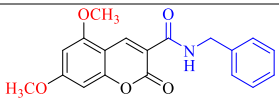
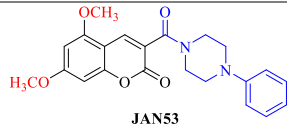
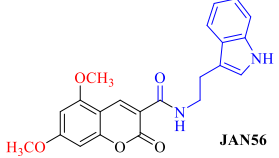
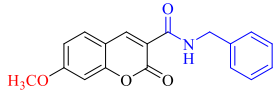
5.5 Resultados de *Docking* Molecular das Novas Cumarinas Planejadas com Base na FN-27


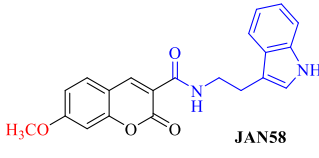
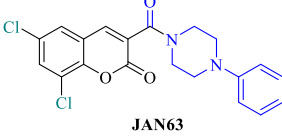
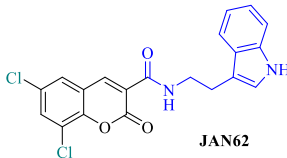
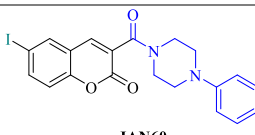
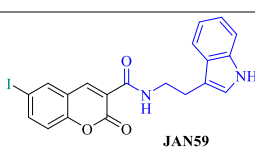
Os dados explanados a seguir ainda não foram publicados e correspondem a resultados de *docking* molecular das novas cumarinas planejadas tendo o composto **FN-27** como referência, com o intuito de obter análogos ativos mediante a realização de modificações estruturais neste.

Neste sentido, após a realização de todas as simulações de *docking* molecular, os resultados de FitScore calculados das 14 moléculas planejadas e sintetizadas são apresentados na Tabela 3 para CRZ e *TbrCATL*. De modo geral, pode-se observar que os ligantes apresentaram uma energia de correlação significativa quando comparados com o composto de referência, **FN-27**. Além disso, foi possível verificar que as cumarinas contendo a porção indol se destacaram frente a ambos os alvos, tendo a maioria apresentado um FitScore maior ou igual

a 60. Ainda, notou-se que, para estes ligantes, os valores mantiveram-se próximos mesmo diante de diferentes substituintes contidos no anel aromático do núcleo cumarínico. Paralelamente, constatou-se que substituição do grupo fenila pela benzila acarretou em uma melhora em tais parâmetros.

Tabela 3 - Valores de FitScore obtidos a partir da formação dos complexos ligante/proteína com as enzimas CRZ e *Tbr*CATL.

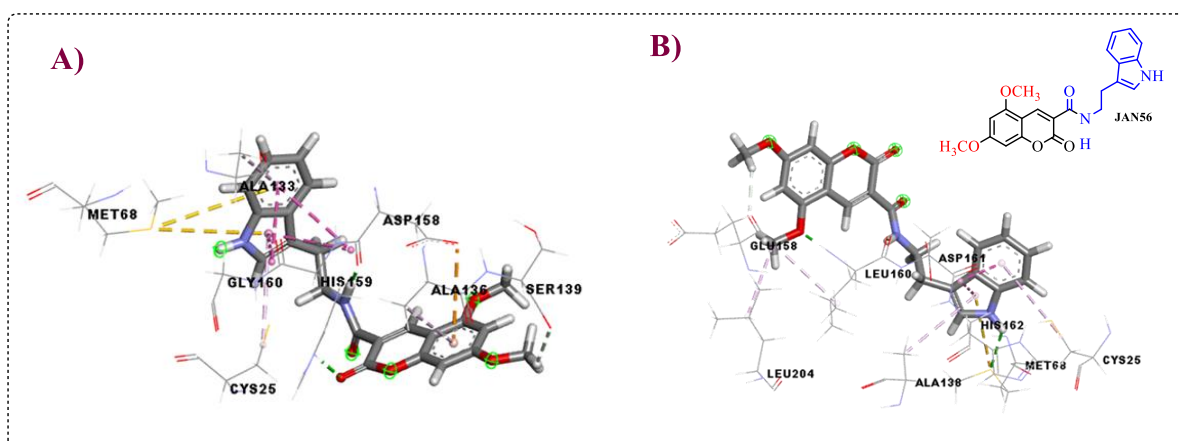
Composto	FitScore - CRZ	FitScore - <i>Tbr</i> CATL
 JAN10	45.11	49.13
 JAN11	49.28	56.65
 JAN17	52.95	52.48
 JAN54	61.36	61.57
 JAN24	49.24	54.12
 JAN53	48.88	55.98
 JAN56	62.98	61.86
 JAN46	50.12	53.14

 JAN50	54.96	49.30
 JAN58	61.51	58.96
 JAN63	54.65	51.22
 JAN62	61.60	60.06
 JAN60	51.75	53.69
 JAN59	62.20	59.60
FN-27	44	42.72

Fonte: Autora, 2023.

Para os compostos em questão, destaca-se as interações do derivado **JAN56**, que apresentou o maior valor de fitscore calculado, com a enzima cruzaina. A partir do diagrama abaixo (Figura 23), observa-se que o composto **JAN56**, assim como **FN-27**, mantém interações com os resíduos catalíticos Cys²⁵ e His¹⁵⁹, bem como Asp¹⁵⁸, Met⁶⁸ e Ala¹³³. De modo específico, destaca-se que a inserção do substituinte 7-OCH₃ em **JAN56** acaba perfazendo uma interação com Ser¹³⁹ do tipo carbono-hidrogênio. Em relação a enzima *TbrCATL*, evidencia-se as interações do derivado **JAN56**, que apresentou o maior valor de fitscore calculado nos ensaios de *docking* molecular. Observa-se que, em comparação com **FN-27**, também permanecem as interações com os resíduos catalíticos Cys²⁵ e His¹⁶², bem como Asp¹⁶¹, Met⁶⁸, Leu¹⁶⁰ e Ala¹³⁸. Por outro lado, nota-se o surgimento de uma ligação carbono-hidrogênio com o resíduo de Glu¹⁵⁸, a partir da inserção do grupo 7-OCH₃ em **JAN56** (Figura 24), além de uma interação de grupo alquila com o resíduo Leu²⁰⁴, mediante a presença do substituinte 5-OCH₃.

Figura 24 - Interações entre o composto JAN56 e as enzimas cruzaina e *Tbr*CATL.



Fonte: Autora, 2023. Diagrama gerado através do *software* Discovery Studio 2021. A) Interações observadas para os resíduos do sítio de ligação de **JAN56** e cruzaina. B) Todas as interações dos resíduos do sítio de ligação de **JAN56** e *Tbr*CATL.

5.6 Síntese dos Ácidos cumarinas-3-carboxílico

As cumarinas-3-ácido carboxílico foram obtidas como intermediários para a síntese dos compostos finais. As cumarinas ácidas apresentam uma ampla gama de aplicações e são consideradas compostos iniciais importantes para a síntese de derivados à base de cumarina (BRAHMACHARI, 2015). A síntese deste composto químico ocorreu por meio da condensação de Knoevenagel, com rendimentos satisfatórios entre 77-93% (Tabela 4). Tal metodologia apresentou-se eficaz, de baixo custo e toxicidade.

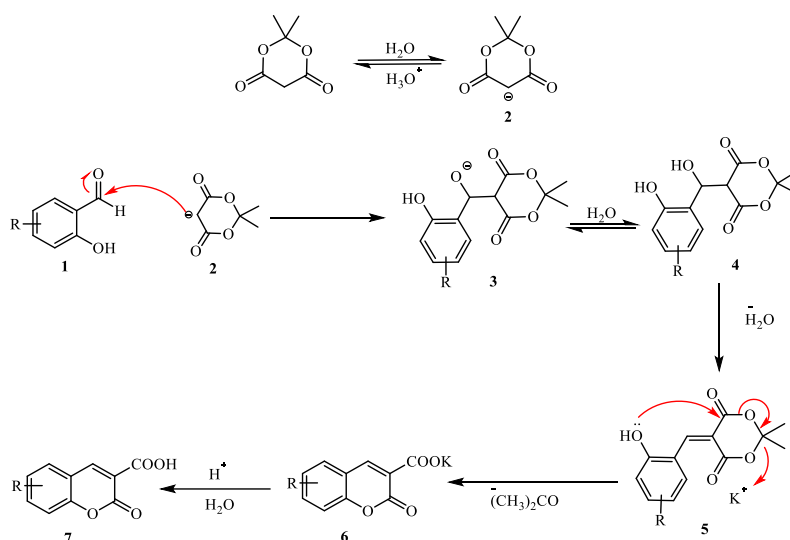
Tabela 4 - Rendimento dos intermediários sintetizados.

Composto	R	Rendimento%
JAN22	5,7-di-OMe	77
JAN27	7-OMe	76
JAN21	6,8-di-Cl	85
JAN30	6-I	93

Fonte: Autora, 2023.

Essa é uma reação de condensação aldólica que inclui uma adição nucleofílica entre aldeídos ou cetonas e moléculas contendo grupos metilênicos ativados, na presença de um catalisador básico, seguida geralmente pela eliminação de água (CUNHA; SANTANA, 2012). A proposta de mecanismo reacional para a obtenção desses intermediários envolve inicialmente a abstração de um próton do ácido de Meldrum na solução básica (2). Em seguida, a base conjugada do ácido de Meldrum (2) realiza um ataque nucleofílico à carbonila do salicilaldeído (1) e, posteriormente, ocorre a etapa de eliminação de uma molécula de água, formando a ligação dupla carbono-carbono. Assim, tais etapas geram o intermediário de Knoevenagel (5) através das espécies intermediárias 3 e 4. Após isso, grupo fenólico presente em 5 sofre reação de fechamento de anel através de um ataque nucleofílico à carbonila referente a parte do ácido de Meldrum, produzindo como intermediário a cumarina-3-carboxilato (6), com a remoção de uma molécula de acetona. Por fim, a acidificação do sal (6) possibilita a formação das cumarinas-3-ácido carboxílico (7) (Figura 25).

Figura 25 - Mecanismo reacional proposto para a obtenção das cumarinas-3-ácido carboxílico.



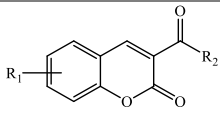
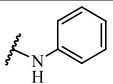
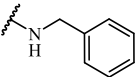
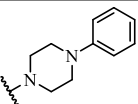
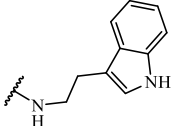
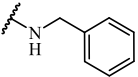
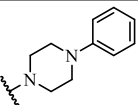
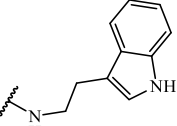
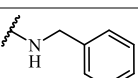
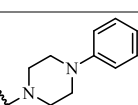
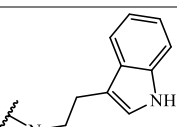
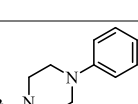
Fonte: Adaptada de BRAHMACHARI, 2015.

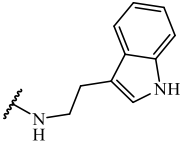
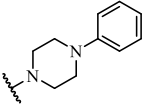
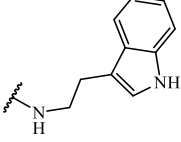
5.7 Síntese dos Derivados cumarínicos-3-ácido carboxílico Acoplados às Aminas

As amidas correspondem a uma classe importante de moléculas orgânicas com aplicação em diferentes campos, incluindo na Química Medicinal, sendo a reação mais praticada nesta área (DUNETZ; MAGANO; WEISENBURGER, 2016). Neste estudo, o

acoplamento de amidas foi empregado para conectar as cumarinas-3-ácido carboxílico com diferentes aminas, sendo possível obter um rendimento entre 27 a 60% (Tabela 5).

Tabela 5 - Rendimento dos compostos finais sintetizados.

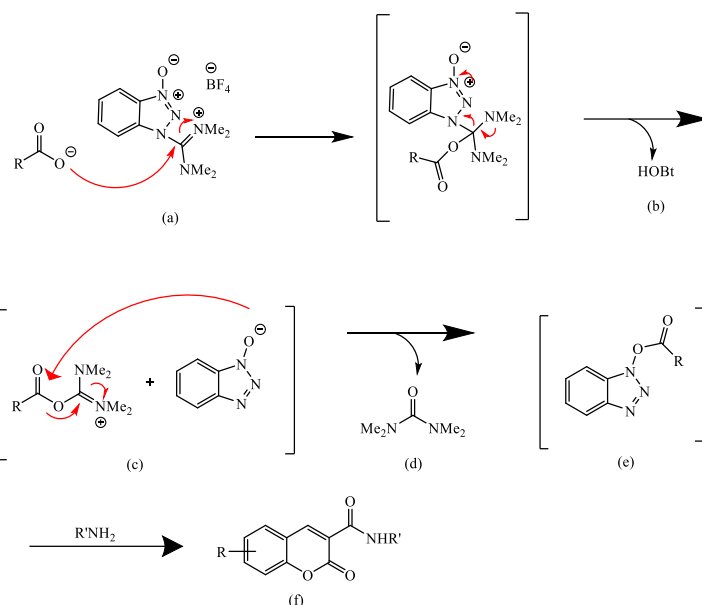
			
Composto	R ₁	R ₂	Rendimento%
JAN10	H		27
JAN11	H		39
JAN17	H		40
JAN54	H		35
JAN24	5,7-di-OMe		50
JAN53	5,7-di-OMe		53
JAN56	5,7-di-OMe		39
JAN46	7-OMe		46
JAN50	7-OMe		36
JAN58	7-OMe		41
JAN60	6-I		60

JAN59	6-I		38
JAN63	6,8-dicloro		32
JAN62	6,8-dicloro		31

Fonte: Autora, 2023.

Para tanto, utilizou-se o TBTU, como reagente de acoplamento, e a DIPEA como base. A reação de acoplamento por TBTU envolve primeiramente a formação do carboxilato, mediante a desprotonação ácida por uma amina terciária (DIPEA). Com isso, ocorre o ataque nucleofílico do ácido carboxílico ao carbono polarizado positivamente do cátion-urânio-TBTU (**a**), o que acarreta na liberação de HOBt (**b**). Posteriormente, o carboxilato reage com o TBTU para gerar uma *O*-acilsoureia, que pode então sofrer uma reação adicional com o ânion benzotriazol (**c**). Em seguida, esse intermediário é convertido em um éster hidroxibenzotriazol ativado (**e**), gerando a tetrametilureia como subproduto (**d**), o qual corresponde a força motriz para a ativação ácida. Por fim, a amina suficiente nucleofílica pode então sofrer aminólise, possibilitando, assim, a formação da amida (Figura 26) (MAGANO, 2022; SILVA-JUNIOR, 2019).

Figura 26 - Mecanismo reacional para a obtenção dos derivados cumarínicos-3-ácido carboxílico acoplados as correspondentes aminas.



Fonte: Adaptada de MAGANO, 2022 e SILVA-JUNIOR, 2019.

5.8 Caracterização Estrutural dos Compostos Sintetizados

Os compostos finais apresentaram tempo de retenção variando de 2,84 a 3,43 min, sendo tal valor determinado usando cromatografia líquida de alta eficiência. Ainda, tais compostos, evidenciados pela função amida, foram caracterizados devidamente por meio da Ressonância Magnética de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C), mediante o emprego da técnica de DEPT-Q. Tendo em vista a similaridade das estruturas químicas dos derivados cumarínicos sintetizados, foram selecionadas as quatro amidas da série (**JAN10**, **JAN11**, **JAN17** e **JAN54**) que apresenta o núcleo cumarínico não substituído, para análise de sua caracterização. Vale destacar que, no espectro de RMN de ^1H de cada compostos selecionado, estão contidos os dados concernentes ao deslocamento, constante de acoplamento, multiplicidade e integração do sinal. Ainda, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos demais compostos sintetizados estão disponíveis no ANEXO A desta dissertação.

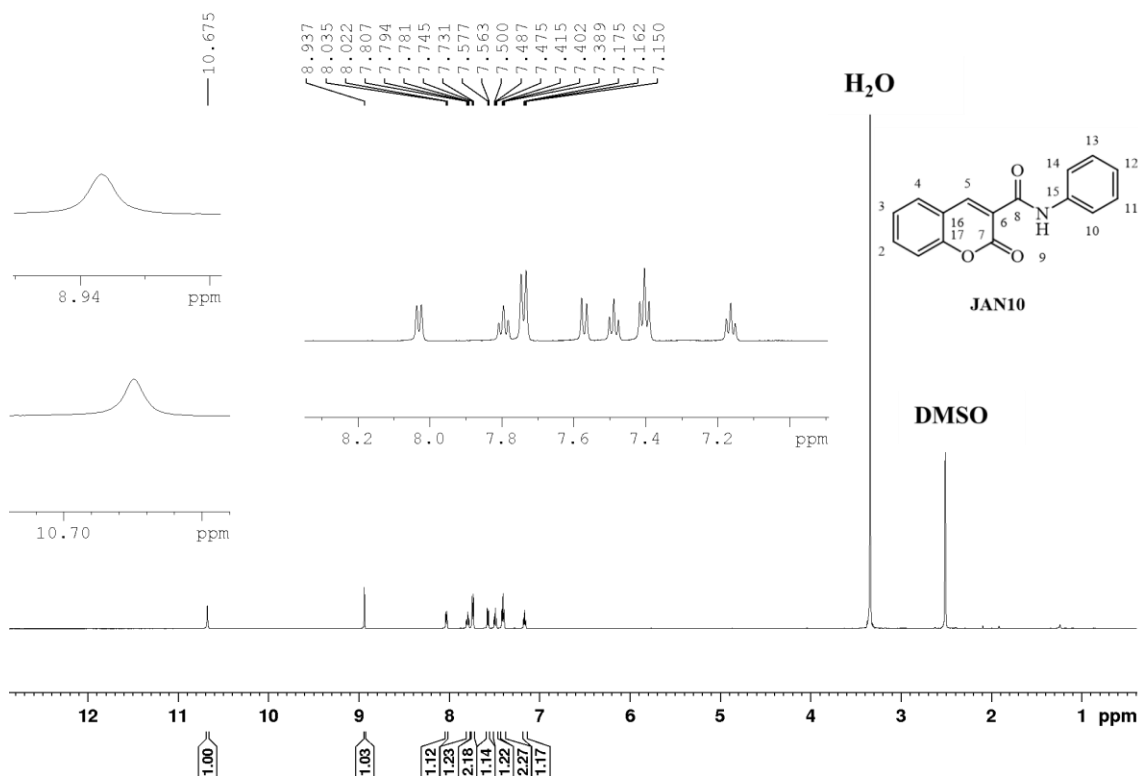
No espectro de RMN ^1H do composto **JAN10**, conforme representado na Figura 27 e Tabela 6, os sinais entre 7,5 a 8,0 ppm (H_1 , H_2 , H_3 e H_4) são equivalentes aos hidrogênios do anel aromático da cumarina; o simpleto em 8,9 ppm (H_5) refere-se ao hidrogênio do anel pirona. Adicionalmente, o sinal atribuído ao hidrogênio da função amida encontra-se com um deslocamento químico em 10,6 ppm, no qual é verificado um simpleto. Por fim, os hidrogênios referentes ao grupo fenil são encontrados entre 7,1 a 7,7 ppm (H_{10} , H_{11} , H_{12} , H_{13} e H_{14}).

Tabela 6 - Dados do espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO_d₆) do 2-Oxo-N-fenil-2H-cromeno-3-carboxamida (JAN10).

Atribuição do sinal	δ (ppm)	Constante de acoplamento J (Hz)	Multiplicidade	Integração do sinal
9	10,6	-	Simpleto	1H
5	8,9	-	Simpleto	1H
4	8,0	7,4	Dupleto	1H
1	7,6	8,1	Dupleto	1H
10; 14	7,7	7,9	Dupleto	2H
12	7,1	7,6	Tripleto	1H
11; 13	7,4	7,9	Tripleto	2H
3	7,5	7,6	Tripleto	1H
2	7,8	7,9	Tripleto	1H

Fonte: Autora, 2023

Figura 27 - Espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO) do 2-Oxo-N-fenil-2H-cromeno-3-carboxamida (JAN10).



Fonte: Autora, 2023

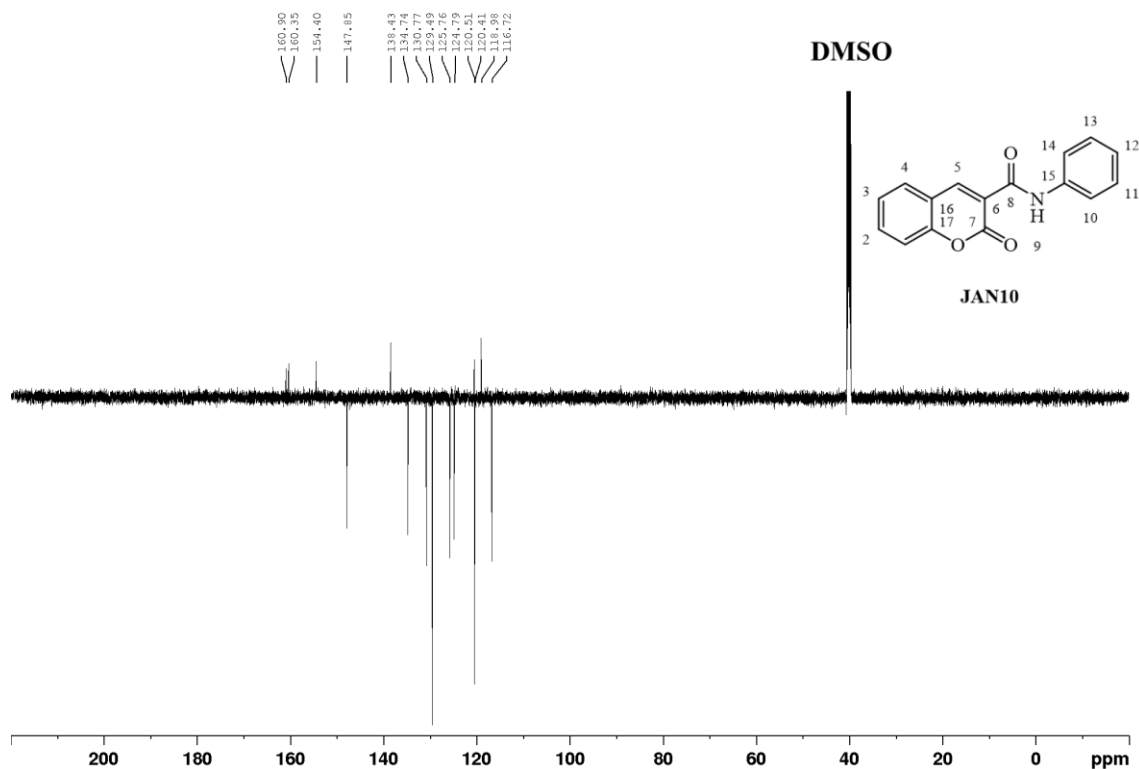
Com relação a caracterização de RMN de ^{13}C do composto **JAN10** (Figura 28 e Tabela 8), os deslocamentos químicos entre 116,7 a 134,7 ppm são característicos dos carbonos CH que pertencem ao anel aromático do núcleo cumarínico, enquanto os sinais na faixa de 120,4 a 147,9 ppm referem-se aos carbonos CH do grupo fenil. Ainda, os sinais da carbonila (C=O) de lactona e amida são observados em 160,9 e 160,3, respectivamente.

Tabela 7 - Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C do 2-Oxo-*N*-fenil-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN10).

Atribuição do sinal	δ (ppm)
C=O de lactona	160,9
C=O de amida	160,3
C	154,4
C	138,4
C	118,9
C	120,5
CH	147,9
CH	134,7
CH	130,7
CH	129,5
CH	125,8
CH	124,8
CH	120,4
CH	116,7

Fonte: Autora, 2023

Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C – DEPTQ 2-Oxo-*N*-fenil-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN10).



Fonte: Autora, 2023

Para o composto **JAN11**, o espectro de RMN ^1H (Figura 29 e Tabela 8) mostrou entre 7,4 a 8,0 ppm os sinais referentes ao anel aromático da cumarina (H_1 , H_2 , H_3 e H_4). O simpleto em 8,8 ppm equivale ao H_5 do anel pirona. Além disso, o sinal correspondente ao hidrogênio da função amida é observado como um tripleto em 9,1 ppm; e o dubleto em 4,5 ppm (H_{10}) concerne ao grupo metileno (CH_2). Finalmente, os hidrogênios condizentes ao grupo benzil apresentam um deslocamento químico entre 7,2 a 7,3 ppm (H_{11} , H_{12} , H_{13} , H_{14} e H_{15}).

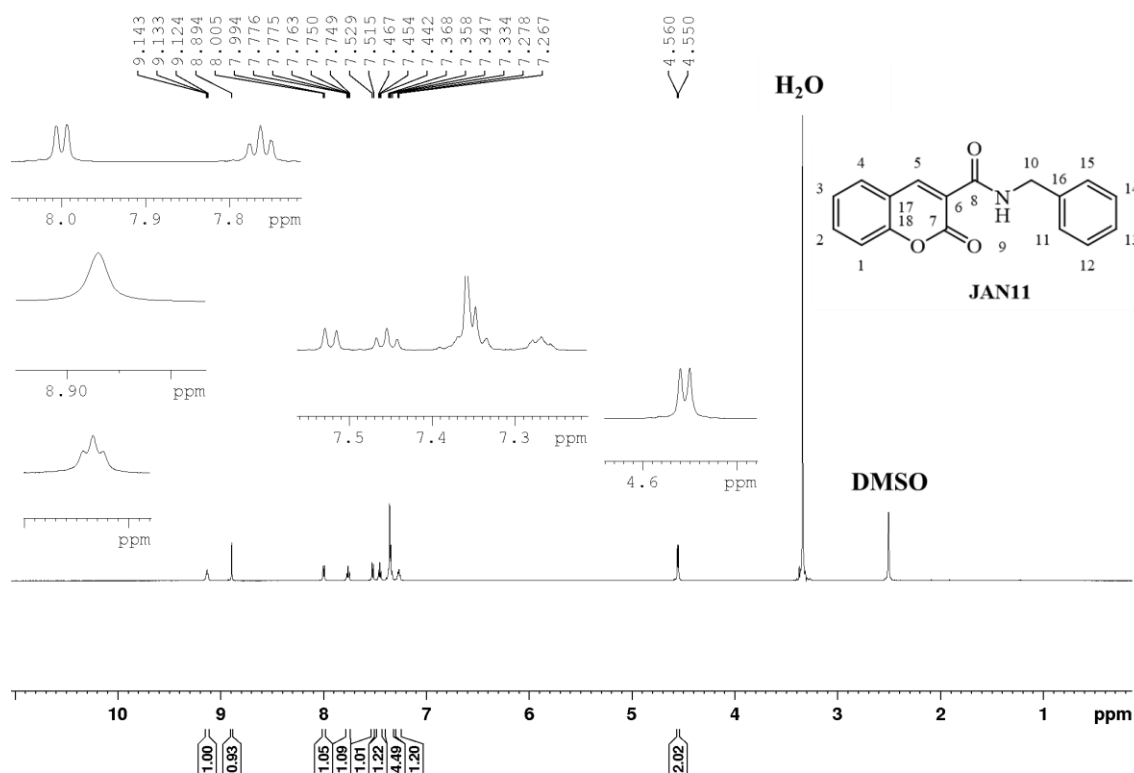
Tabela 8 - Dados do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) do *N*-Benzil-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida (JAN11).

Atribuição do sinal	δ (ppm)	Constante de acoplamento J (Hz)	Multiplicidade	Integração do sinal
9	9,1	5,7	Tripleto	1H
10	4,5	5,9	Dupleto	2H
5	8,8	-	Simpleto	1H
2	7,7	7,2	Tripleto	1H
3	7,4	7,5	Tripleto	1H
11,12,14 e 15	7,3	6,1	Quarteto	4H
13	7,2	6,4	Tripleto	1H

4	8,0	6,8	Dupleto	1H
1	7,5	6,6	Tripleto	1H

Fonte: Autora, 2023

Figura 29 - Espectro de RMN 1H (600 MHz, DMSO) do *N*-Benzil-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN11).



Fonte: Autora, 2023.

No que diz respeito ao espectro de RMN de ¹³C para tal composto (Figura 30 e Tabela 9), os sinais entre 116,6 a 134,5 ppm correspondem aos carbonos CH do anel aromático do núcleo cumarínico; ao passo que os sinais na faixa de 125,6 a 147,9 ppm referem-se aos carbonos CH do grupo benzil. Observa-se também o sinal condizente ao carbono do grupo metileno (CH₂) em 43,2 ppm, bem como são observados em 161,8 e 160,8 os sinais da carbonila (C=O) referentes a lactona e a amida, respectivamente.

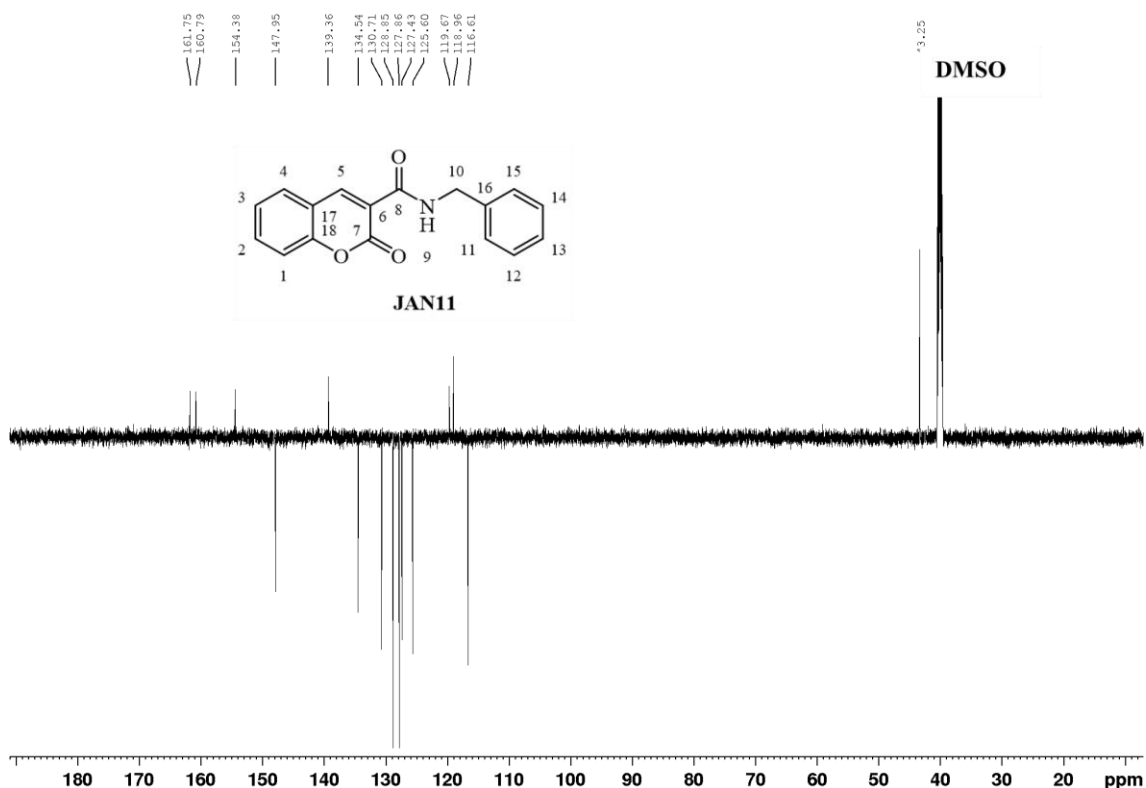
Tabela 9 - Atribuição dos sinais de RMN de ¹³C do *N*-Benzil-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN11).

Atribuição do sinal	δ (ppm)
C=O de lactona	161,8
C=O de amida	160,8
C	154,4

C	139,4
C	119,7
C	118,9
CH	147,9
CH	134,5
CH	130,7
CH	128,9
CH	127,8
CH	127,4
CH	125,6
CH	116,6
CH ₂	43,2

Fonte: Autora, 2023

Figura 30 - Espectro de RMN de ¹³C – DEPTQ *N*-Benzil-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN11).



Fonte: Autora, 2023

O espectro de RMN de ¹H do composto **JAN17** (Tabela 10 e Figura 31) exibiu os sinais esperados para os hidrogênios do anel aromático da cumarina entre 7,4 a 7,8 ppm (H₁, H₂, H₃ e H₄), além do sinal observado como um simpleto em 8,2 ppm referente ao H₅. Os sinais referentes aos hidrogênios ao anel piperazina foram constatados como tripleto entre 3,1 a 3,7

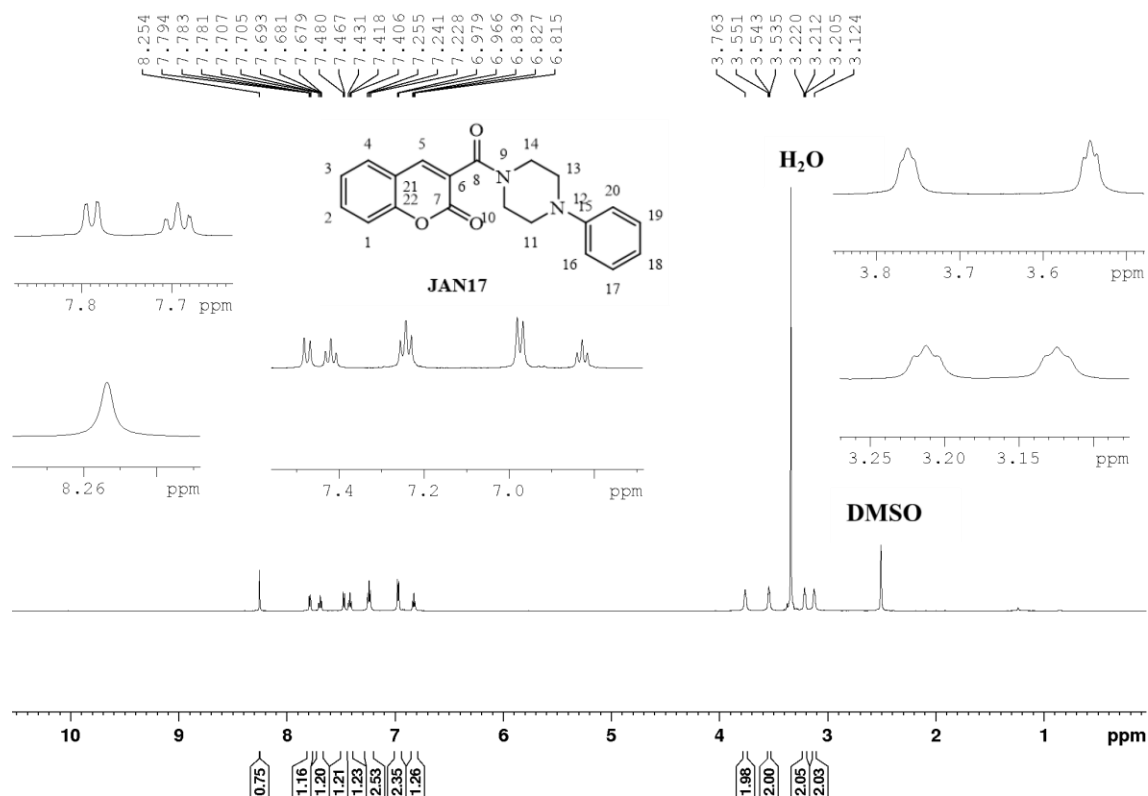
ppm (H₁₀, H₁₁, H₁₃ e H₁₄). Adicionalmente, os deslocamentos químicos entre 6,8 a 7,2 são pertinentes aos hidrogênios do grupo fenil (H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀).

Tabela 10 - Dados do espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO_{d6}) do 3-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN17).

Atribuição do sinal	δ (ppm)	Constante de acoplamento J (Hz)	Multiplicidade	Integração do sinal
1	7,5	8,2	Dupleto	1H
2	7,7	-	Multiplero	1H
3	7,4	8,2	Triplero	1H
4	7,8	1,3 e 1,1	Duplo dubleto	1H
5	8,2	-	Simpleto	1H
18	6,8	7,2	Triplero	1H
16; 20	6,9	8,0	Dupleto	1H
17; 19	7,2	8,2	Triplero	1H
14	3,7	4,6	Triplero	2H
10	3,6	4,6	Triplero	2H
13	3,2	4,6	Triplero	2H
11	3,1	4,7	Triplero	2H

Fonte: Autora, 2023

Figura 31 - Espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO) do do 3-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN17).



Fonte: Autora, 2023

Para tal composto, o espectro de RMN de ¹³C (Tabela 11 e Figura 32) confirmou os sinais referentes aos carbonos CH do anel aromático da cumarina entre 116,5 a 133,2 ppm. Os sinais de CH₂ pertinentes ao anel piperidina foram observados entre 41,6 a 49,3. Para os sinais de CH do grupo fenil, observou-se que estes estavam compreendidos entre 116,8 a 142,3 ppm. A carbonila da função lactona foi verificada em 163,3, enquanto que a carbonila da amida foi confirmada em 158,1.

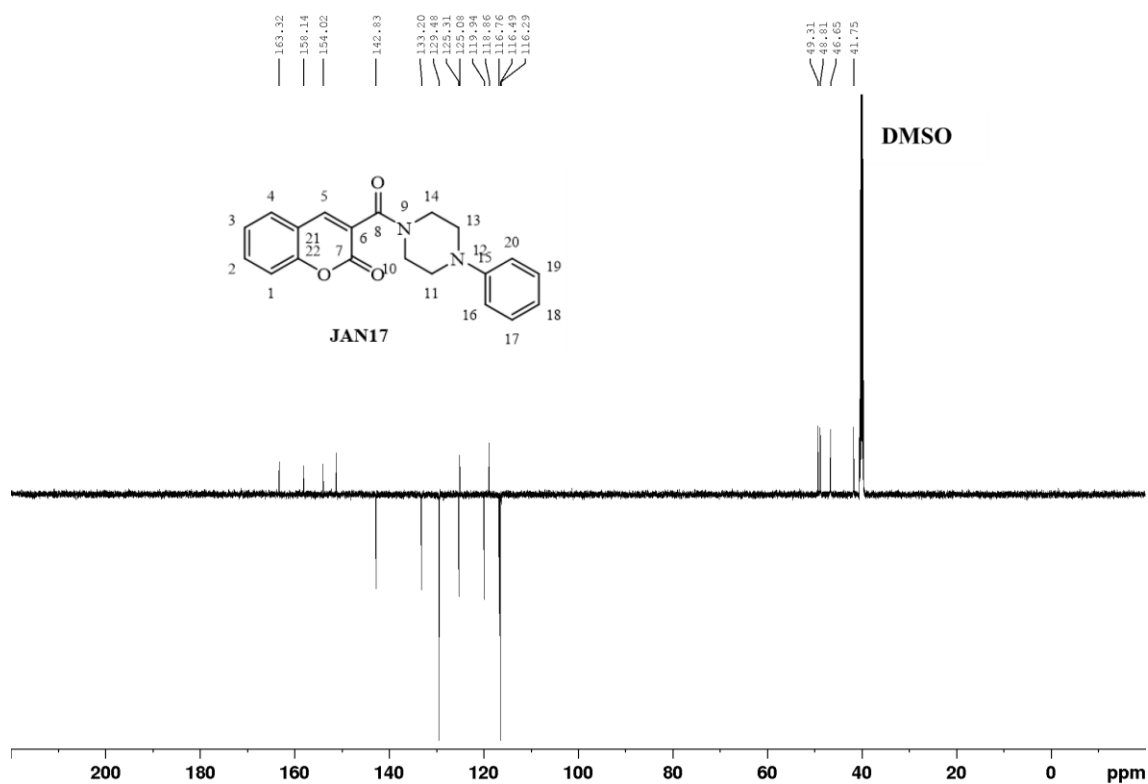
Tabela 11 - Atribuição dos sinais de RMN de ¹³C do do 3-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN17).

Atribuição do sinal	δ (ppm)
C=O de lactona	163,3
C=O de amida	158,1
C	154,0
C	151,2
C	125,0
C	118,9
CH	142,3
CH	133,2

CH	129,5
CH	125,2
CH	125,3
CH	119,9
CH	116,8
CH	116,5
CH ₂	49,3
CH ₂	48,8
CH ₂	46,6
CH ₂	41,6

Fonte: Autora, 2023

Figura 32 - Espectro de RMN de ¹³C – DEPTQ do 3-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN17).



Fonte: Autora, 2023

A partir do espectro da Figura 33 e os dados da Tabela 12 referentes ao composto **JAN54**, observa-se o sinal do hidrogênio da função amida como um simpleto em 10,8 ppm, sendo na maioria dos casos comum não verificar a constante de acoplamento em decorrência do momento de quadrupolo do átomo de nitrogênio ou devido a troca química que acarreta no

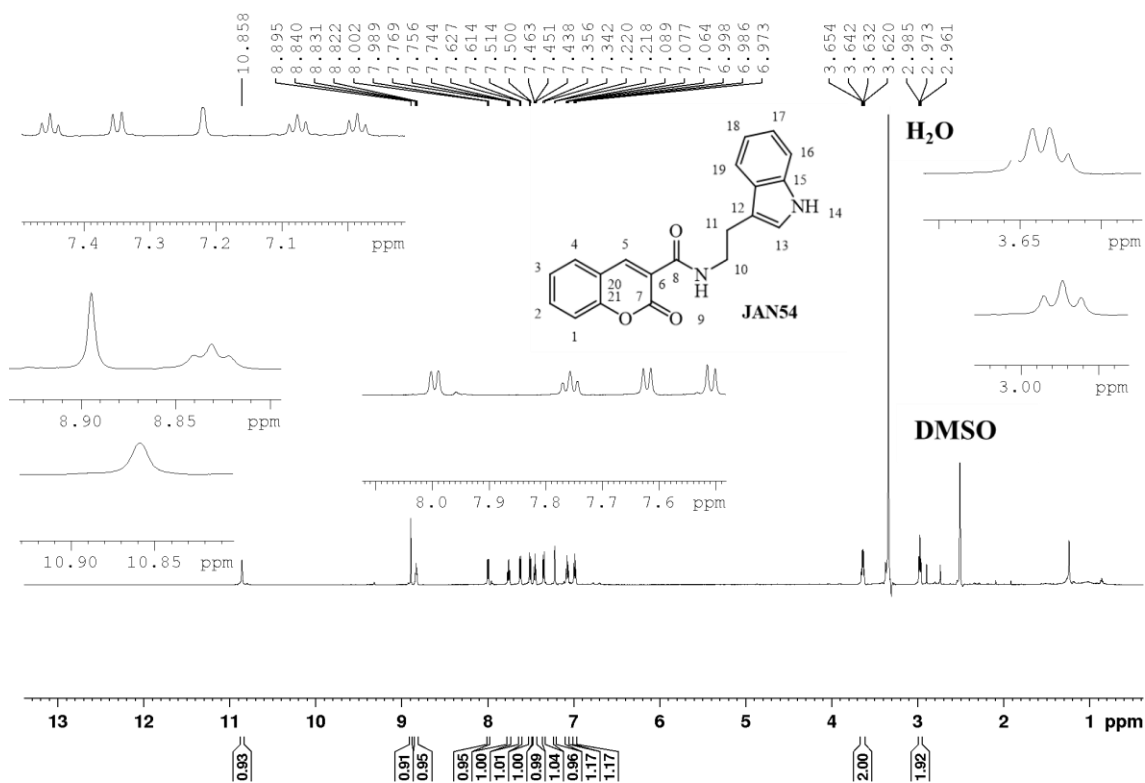
desacoplamento dessa interação (PAVIA *et al.*, 2010). Os hidrogênios da região alifática da molécula foram analisados em 3,6 ppm (H₁₀) e 2,9 ppm (H₁₁). Com relação ao sinal do hidrogênio para o nitrogênio indólico (NH), este foi observado como um duplete em 7,2 ppm. Por fim, os hidrogênios do anel aromático da cumarina foram confirmados entre 7,4 a 7,9 ppm (H₁, H₂, H₃ e H₄); e o simpleto do H₅ foi analisado em 8,9 ppm.

Tabela 12 - Dados do espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO_d₆) do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN54).

Atribuição do sinal	δ (ppm)	Constante de acoplamento J (Hz)	Multiplicidade	Integração do sinal
9	10,8	-	Simpleto	1H
5	8,9	-	Simpleto	1H
17	8,8	5,3	Tripleto	1H
4	7,9	7,7	Dupleto	1H
2	7,7	7,4	Tripleto	1H
1	7,6	7,9	Dupleto	1H
16	7,5	8,5	Dupleto	1H
3	7,4	7,5	Tripleto	1H
13	7,3	8,9	Dupleto	1H
14	7,2	1,0	Dupleto	1H
18	7,0	7,2	Tripleto	1H
19	6,9	7,5	Tripleto	1H
10	3,6	6,7	Quarteto	2H
11	2,9	7,2	Tripleto	2H

Fonte: Autora, 2023

Figura 33 - Espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO) do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN54).



Fonte: Autora, 2023

Quanto ao espectro de RMN ¹³C (Tabela 13 e Figura 34), destaca-se os carbonos das carbonilas dos grupos lactona e amida em 161,5 e 160,8 ppm, respectivamente; os sinais em 25,4 e 29,4 ppm referentes aos carbonos CH₂ da região alifática; e os sinais entre 116,6 a 134,5 ppm correspondentes aos carbonos CH do anel aromático da cumarina. Ademais, observa-se os sinais referentes aos carbonos CH da porção indol na faixa de 111,8 a 147,9 ppm.

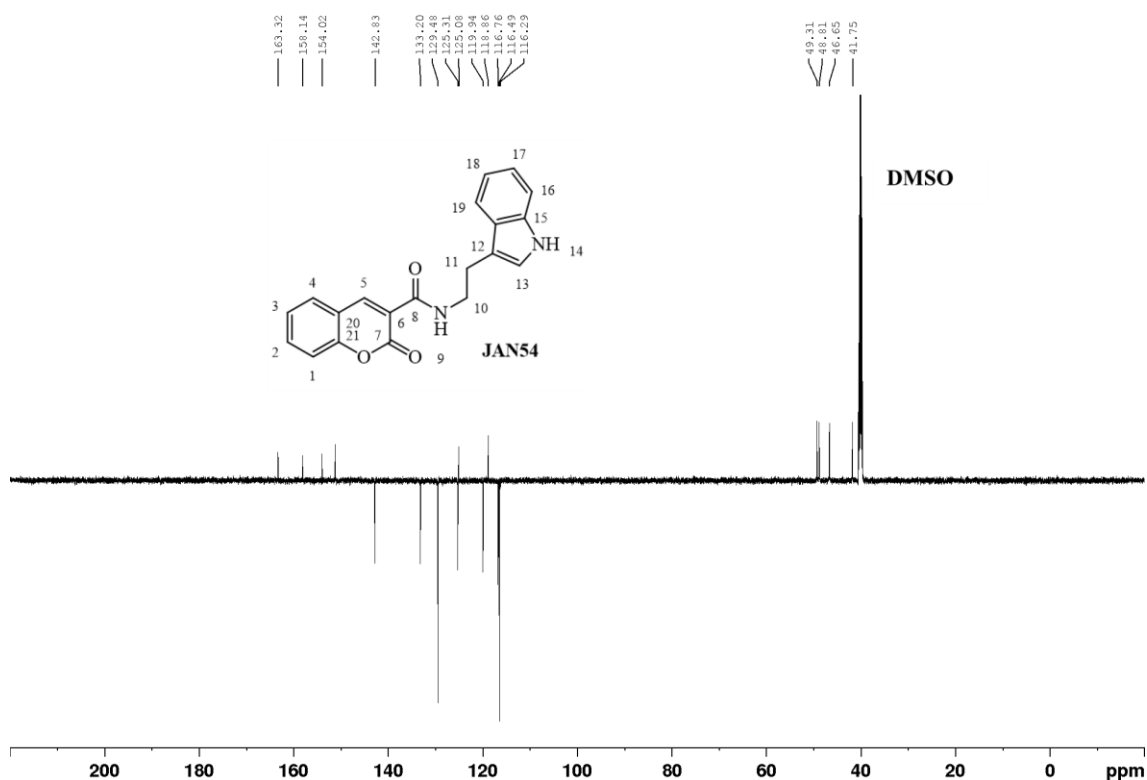
Tabela 13 - Atribuição dos sinais de RMN de ¹³C do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN54).

Atribuição do sinal	δ (ppm)
C=O de lactona	161,5
C=O de amida	160,8
C	154,3
C	127,6
C	119,5
C	118,9
C	111,9
C	136,8
CH	147,9
CH	134,5

CH	130,7
CH	125,6
CH	123,3
CH	121,4
CH	118,8
CH	118,7
CH	116,6
CH	111,8
CH ₂	29,4
CH ₂	25,4

Fonte: Autora, 2023

Figura 34 - Espectro de RMN de ¹³C – DEPTQ *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN54).



Fonte: Autora, 2023

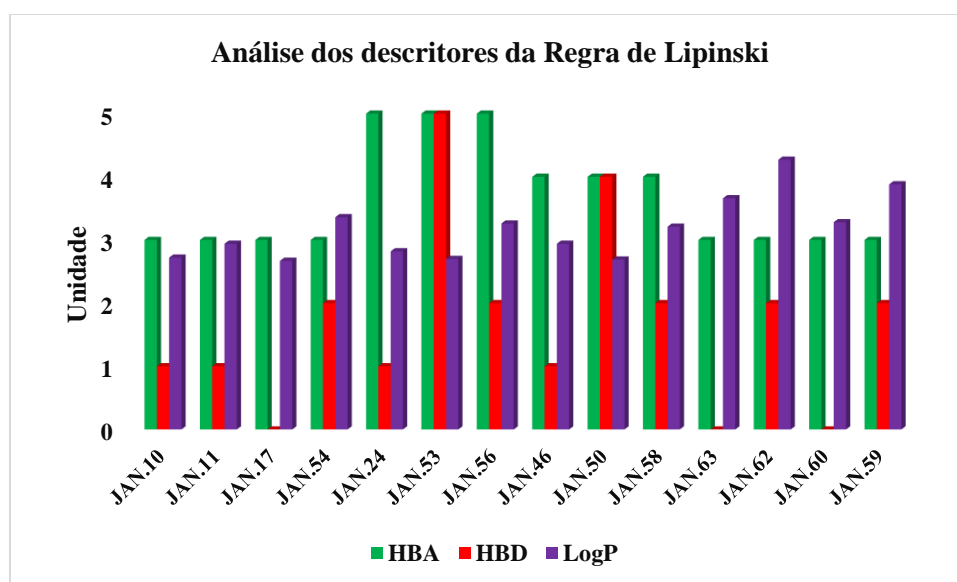
5.9 Análise dos parâmetros de Lipinski para os Compostos Sintetizados

Com o intuito de investigar o potencial como fármaco dos compostos planejados e sintetizados, suas propriedades físico-químicas foram analisadas mediante a plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), uma ferramenta disponível gratuitamente que apoia a descoberta de medicamentos por meio de diferentes descritores físico-químicos fornecidos

para a molécula. Assim, esses dados desempenham um importante papel na redução do número de falhas nos estágios posteriores relacionados ao desenvolvimento de medicamentos (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019; JIA *et al.*, 2020).

Dentre os parâmetros físico-químicos fornecidos, avaliou-se os descritores concernentes a regra de Lipinski: massa molecular (MM); doadores de ligação de hidrogênio (HBA); aceptores de ligação de hidrogênio (HBD) e coeficiente de partição (LogP). De acordo com esta regra, compostos com $MM \leq 500 \text{ g mol}^{-1}$, $HBA \leq 10$, $HBD \leq 5$ e $\text{LogP} \leq 5$ são considerados potenciais para biodisponibilidade oral (BARRET, 2018; MAHGOUB; ATATREH; GHATTAS, 2022; VARELA *et al.*, 2022). Nesse sentido, verificou-se que todos os compostos sintetizados enquadram-se nesses critérios. Os dados calculados acerca dos parâmetros HBA, HBD e LogP são apresentados na Figura 35. No que diz respeito a MM dos compostos, esta variou de 265,27 a 460,27 g mol^{-1} .

Figura 35 - Avaliação dos Descritores da Regra de Lipinski para os compostos sintetizados.



Fonte: Autora, 2023. Gráfico elaborado utilizando-se o *software* Microsoft® Office Excel.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo, cumarinas racionalmente planejadas pela técnica de vFBDD foram sintetizadas e caracterizadas. Um derivado cumarínico-tiossemicarbazona, **FN-27**, foi selecionado como a molécula mais ativa contra as proteases CRZ (IC₅₀ de 14,4 ± 0,02 µM) e *Tbr*CATL (IC₅₀: 2,0 ± 0,6 µM), além de exibir atividade efetiva contra células infectadas por amastigotas de *T. cruzi* (EC₅₀: 5,5 µM). Para este inibidor, foram realizadas simulações de *docking* molecular, com o intuito de obter informações sobre seus modos de ligação, em que foi possível observar que, em ambas as proteases, **FN-27** se ligou efetivamente próximo à tríade catalítica. De modo paralelo, um análogo cumarínico-chalcona, **FN-10**, mostrou-se bastante promissor contra a forma tripomastigota de *T. brucei* (EC₅₀: 4,8 ± 0,1 µM), porém não demonstrou atividade contra CRZ ou *Tbr*CATL. Tal resultado pode indicar que **FN-10** estaria exercendo sua atividade por um mecanismo de ação não associado a essas cisteíno proteases. Logo, alvos diferentes estariam sendo envolvidos por esse composto.

Adicionalmente, após a execução de experimentos de *docking* molecular, tendo sido a **FN-27** adotada como composto controle, uma série de 14 novas cumarinas foi projetada para exploração sintética e posterior avaliação biológica. Tais cumarinas apresentaram rendimento sintético entre 27 a 60%. De modo geral, os compostos planejados, frente a CRZ e *Tbr*CATL, apresentaram interessantes valores de FitScore, destacando-se as cumarinas com a porção indol que demonstraram uma energia de correlação superior as demais. No momento, tais cumarinas foram submetidas a análise inibitória enzimática sobre as proteases cruzaina e *Tbr*CATL, bem como avaliação tripanocida *in vitro* frente as principais formas evolutivas de *T. cruzi* e *T. brucei*, a fim de comprovar a acuracidade dos estudos *in silico*. Todos os ensaios biológicos estão sendo realizados na Universidade da Califórnia, Escola Skaggs de Farmácia, cuja supervisão está a cargo dos Professores James H. McKerrow e Jair Lage de Siqueira-Neto, porém os resultados ainda não estão disponíveis.

Após a realização dos ensaios biológicos, o grupo de pesquisa pretende dar continuidade e realizar, em conjunto, estudos *in silico* de *docking* molecular a fim de propor um mecanismo de ação para as moléculas mais ativas preparadas nessa segunda etapa do trabalho, contribuindo, assim, para uma maior elucidação das interações entre complexos molécula-ligante, auxiliando a compreender como as moléculas ativas interagem com os alvos dos parasitos. Portanto, espera-se que os dados obtidos contribuam no desenvolvimento de agentes tripanocidas promissores, de modo a contribuir na busca de um tratamento para estas doenças negligenciadas ameaçadoras (doença de Chagas e tripanossomíase humana africana).

REFERÊNCIAS

- ADELUSI, T. I. *et al.* Molecular modeling in drug discovery. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 29, p. 100880, 2022.
- ALCOLEA, V.; PÉREZ-SILANES, S. Selenium as an interesting option for the treatment of Chagas disease: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 206, p. 112673, 2020.
- BAELL, J. B.; NISSINK, J. W. M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017—Utility and Limitations. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 36–44, 2018.
- BAKER, C. H.; WELBURN, S. C. The Long Wait for a New Drug for Human African Trypanosomiasis. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 818–827, 2018.
- BARRET, R. Lipinski's Rule of Five. *In: Therapeutical Chemistry*. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 97–100.
- BELLUTI, F. *et al.* Toward the Development of Dual-Targeted Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase/Trypanothione Reductase Inhibitors against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **ChemMedChem**, v. 9, n. 2, p. 371–382, 2014.
- BERENSTEIN, A. J.; FALK, N.; MOSCATELLI, G.; MORONI, S.; GONZÁLEZ, N.; GARCIA-BOURNISSEN, F.; BALLERING, G.; FREILIJ, H.; ALTICHEH, J. Adverse Events Associated with Nifurtimox Treatment for Chagas Disease in Children and Adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 2, 2021.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BOIANI, M.; PIACENZA, L.; HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; DENICOLA, A. Mode of action of Nifurtimox and *N*-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 12, p. 1736–1745, 2010.
- BOLZ, S. N.; ADASME, M. F.; SCHROEDER, M. Toward an Understanding of Pan-Assay Interference Compounds and Promiscuity: A Structural Perspective on Binding Modes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 5, p. 2248–2262, 2021.
- BORGES, F.; ROLEIRA, F.; MILHAZES, N.; SANTANA, L.; URIARTE, E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 887–916, 2005.
- BOTTIEAU, E.; CLERINX, J. Human African Trypanosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 61–77, 2019.
- BOUHAOUI, A.; EDDAHMI, M.; DIB, M.; KHOULI, M.; AIRES, A.; CATTO, M.;

BOUISSANE, L. Synthesis and Biological Properties of Coumarin Derivatives. A Review. **ChemistrySelect**, v. 6, n. 24, p. 5848–5870, 2021.

BRAGA, S. F. P. *et al.* Synthesis and biological evaluation of potential inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain designed by molecular simplification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1889–1900, 2017.

BRAHMACHARI, G. Room Temperature One-Pot Green Synthesis of Coumarin-3-carboxylic Acids in Water: A Practical Method for the Large-Scale Synthesis. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 9, p. 2350–2358, 2015.

BRAK, K.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ELLMAN, J. A. Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 20, p. 6404–6410, 2008.

BRANCAGLION, G. A.; TOYOTA, A. E.; CARDOSO, J. V. M.; FERNANDES JÚNIOR, A. Á.; SILVEIRA, A. T.; VILAS BOAS, D. F.; SANTOS, E. G.; CALDAS, I. S.; CARVALHO, D. T. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activities of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2 H -cromen-2-one, a new synthetic coumarin of low cytotoxicity against mammalian cells. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 92, n. 5, p. 1888–1898, 2018.

BRITO, W. A. *et al.* Development and Validation of HPLC-DAD and UHPLC-DAD Methods for the Simultaneous Determination of Guanyldihydrazone Derivatives Employing a Factorial Design. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1394, 2017.

BURGOS, L. M.; FARINA, J.; LIENDRO, M. C.; SALDARRIAGA, C.; LIPRANDI, A. S.; WYSS, F.; MENDOZA, I.; BARANCHUK, A. Neglected Tropical Diseases and Other Infectious Diseases Affecting the Heart. The NET-Heart Project: Rationale and Design. **Global Heart**, v. 15, n. 1, 2020.

BÜSCHER, P.; CECCHI, G.; JAMONNEAU, V.; PRIOTTO, G. Human African trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 390, n. 10110, p. 2397–2409, 2017.

CAFFREY, C. R. *et al.* Active site mapping, biochemical properties and subcellular localization of rhodesain, the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 61–73, 2001.

CAZZULO, J.; STOKA, V.; TURK, V. The Major Cysteine Proteinase of *Trypanosoma cruzi*: A Valid Target for Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 12, p. 1143–1156, 2001.

CDC. **Parasites - African Trypanosomiasis (also known as Sleeping Sickness)**. 2020a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>. Acesso em: 9 jan. 2023.

CDC. **Parasites - African Trypanosomiasis (also known as Sleeping Sickness)**. 2020b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>.

CHEN, C.; DOYLE, P. S.; YERMALITSKAYA, L. V.; MACKEY, Z. B.; ANG, K. K. H.;

MCKERROW, J. H.; PODUST, L. M. *Trypanosoma cruzi* CYP51 Inhibitor Derived from a *Mycobacterium tuberculosis* Screen Hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, p. e372, 2009.

CHOE, Y.; LEONETTI, F.; GREENBAUM, D. C.; LECAILLE, F.; BOGYO, M.; BRÖMME, D.; ELLMAN, J. A.; CRAIK, C. S. Substrate Profiling of Cysteine Proteases Using a Combinatorial Peptide Library Identifies Functionally Unique Specificities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 18, p. 12824–12832, 2006.

CORREIA, M. M. G.; BARBOZA, J. V. M.; ESPÍNDOLA, A. L. Sleeping sickness: An agent-based model approach. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 582, p. 126282, 2021.

CRISTOVÃO-SILVA, A. C.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A.; HERNANDES, M. Z.; PEREIRA, V. R. A. Chagas disease: Immunology of the disease at a glance. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 62, p. 15–22, 2021.

CUNHA, S.; SANTANA, L. L. B. Condensação de Knoevenagel de aldeídos aromáticos com o ácido de Meldrum em água: uma aula experimental de Química Orgânica Verde. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 642–647, 2012.

DI CHIO, C. *et al.* Development of novel dipeptide nitriles as inhibitors of rhodesain of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 236, p. 114328, 2022.

DOYLE, P. S.; ZHOU, Y. M.; HSIEH, I.; GREENBAUM, D. C.; MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C. The *Trypanosoma cruzi* Protease Cruzain Mediates Immune Evasion. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002139, 2011.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure– activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **ACS Publications**, v. 45, n. 13, p. 2695–2707, 2002.

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

ECHAVARRÍA, N. G.; ECHEVERRÍA, L. E.; STEWART, M.; GALLEGO, C.; SALDARRIAGA, C. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Current Problems in Cardiology**, v. 46, n. 3, p. 100507, 2021.

ETTARI, R.; PREVITI, S.; TAMBORINI, L.; CULLIA, G.; GRASSO, S.; ZAPPALÀ, M. The Inhibition of Cysteine Proteases Rhodesain and *TbCatB*: A Valuable Approach to Treat Human African Trypanosomiasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 1374–1391, 2016.

ETTARI, R.; TAMBORINI, L.; ANGELO, I. C.; MICALE, N.; PINTO, A.; MICHELI, C.; CONTI, P. Inhibition of Rhodesain as a Novel Therapeutic Modality for Human African Trypanosomiasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5637–5658, 2013.

FABIAN, L.; MARTINI, M. F.; SARDUY, E. S.; ESTRIN, D. A.; MOGLIONI, A. G. Evaluation of quinoxaline compounds as ligands of a site adjacent to S2 (AS2) of cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 16, p. 2197–2202, 2019.

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

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. ADMET modeling approaches in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 5, p. 1157–1165, 2019.

FERSING, C. *et al.* Nongenotoxic 3-Nitroimidazo[1,2- a]pyridines Are NTR1 Substrates That Display Potent *in vitro* Antileishmanial Activity. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 1, p. 34–39, 2019.

FIGARELLA, K.; UZCATEGUI, N. L.; BECK, A.; SCHOENFELD, C.; KUBATA, B. K.; LANG, F.; DUSZENKO, M. Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, n. 10, p. 1802–1814, 2006.

FILARDY, A. A.; GUIMARÃES-PINTO, K.; NUNES, M. P.; ZUKERAM, K.; FLIESS, L.; PEREIRA, L.; NASCIMENTO, D. O.; CONDE, L.; MORROT, A. Human Kinetoplastid Protozoan Infections: Where Are We Going Next? **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

FRANCISCO, C. S.; FRANCISCO, C. S.; CONSTANTINO, A. F.; NETO, Á. C.; LACERDA, V. Synthetic Methods Applied in the Preparation of Coumarin-based Compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 23, n. 24, p. 2722–2750, 2020.

FRANCO, J.; SCARONE, L.; COMINI, M. A. Drugs and Drug Resistance in African and American Trypanosomiasis. *In: Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Academic Press, 2018. p. 97–133.

FUJII, N. *et al.* Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 1, p. 121–123, 2005. 3.

GARCÍA-HUERTAS, P.; CARDONA-CASTRO, N. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112020, 2021.

GONÇALVES, G. A.; CERECETTO, H.; POSER, G. L. V.; CANTO, R. F. S.; EIFLER-LIMA, V. L. Chagas Disease and Coumarins: A Review of Natural and Synthetic Coumarins As Anti-*Trypanosoma cruzi* Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 1701–1717, 2021.

GONÇALVES, G. A.; SPILLERE, A. R.; NEVES, G. M.; KAGAMI, L. P.; VON POSER, G. L.; CANTO, R. F. S.; EIFLER-LIMA, V. Natural and synthetic coumarins as antileishmanial agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 203, p. 112514, 2020.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 164–169, 2019.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Poverty, Migration, and Chagas Disease. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 1, p. 52–58, 2021.

JASINSKI, G.; SALAS-SARDUY, E.; VEGA, D.; FABIAN, L.; MARTINI, M. F. MOGLIONI, A. G. Thiosemicarbazone derivatives: Evaluation as cruzipain inhibitors and molecular modeling study of complexes with cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 61, p. 116708, 2022.

JIA, C.; LI, J.; HAO, G.; YANG, G. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 1, p. 248–258, 2020.

JUMAL, J.; N. S. Synthesis, Characterization, and Applications of Coumarin Derivatives: A Short Review. **Malaysian Journal of Science Health & Technology**, v. 7, n. 1, p. 62–68, 2021.

KENNEDY, P. G. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 2, p. 186–194, 2013.

KENNEDY, P. G. E. Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Journal of Neurology**, v. 266, n. 9, p. 2334–2337, 2019.

KENNEDY, P. G. E.; RODGERS, J. Clinical and Neuropathogenetic Aspects of Human African Trypanosomiasis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

KIRSCH, P.; HARTMAN, A. M.; HIRSCH, A. K. H.; EMPTING, M. Concepts and Core Principles of Fragment-Based Drug Design. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4309, 2019.

KRATZ, J. M. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. **Acta Tropica**, v. 198, p. 105107, 2019.

KRATZ, J. M.; BOURNISSEN, F. G.; FORSYTH, C. J.; SOSA-ESTANI, S. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 2018.

KRISHNA, S.; KLEINE, C.; STICH, A. African Trypanosomiasis. *In: Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Elsevier, 2020. p. 755–761.

KRYSHCHYSHYN, A.; KAMINSKY, D.; KARPENKO, O.; GZELLA, A.; GRELLIER, P.; LESYK, R. Thiazolidinone/thiazole based hybrids – New class of antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 174, p. 292–308, 2019.

KUBATA, B. K. *et al.* Identification of a Novel Prostaglandin F_{2α} Synthase in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 9, p. 1327–1338, 2000.

KUMAR, A.; VOET, A.; ZHANG, K. Y. J. Fragment Based Drug Design: From Experimental to Computational Approaches. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 30, p. 5128–5147, 2012.

KUMARI, S.; CARMONA, A. V.; TIWARI, A. K.; TRIPPIER, P. C. Amide Bond Bioisosteres: Strategies, Synthesis, and Successes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63,

n. 21, p. 12290–12358, 2020.

KUMESO, V. K. B. *et al.* Efficacy and safety of acoziborole in patients with human African trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a multicentre, open-label, single-arm, phase 2/3 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 463-470 2022.

KÜPELI AKKOL, E.; GENÇ, Y.; KARPUZ, B.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; CAPASSO, R. Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1959, 2020..

LI, G.; MA, S.; SZOSTAK, M. Amide Bond Activation: The Power of Resonance. **Trends in Chemistry**, v. 2, n. 10, p. 914–928, 2020.

LINDNER, A. K. *et al.* New WHO guidelines for treatment of gambiense human African trypanosomiasis including fexinidazole: substantial changes for clinical practice. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. e38–e46, 2020.

LONČARIĆ, M.; GAŠO-SOKAČ, D.; JOKIĆ, S.; MOLNAR, M. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives from Different Starting Materials. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 151, 2020.

LÓPEZ-VÉLEZ, R.; NORMAN, F. F.; BERN, C. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *In: Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Elsevier, 2020. p. 762–775.

MAGANO, J. Large-Scale Amidations in Process Chemistry: Practical Considerations for Reagent Selection and Reaction Execution. **Organic Process Research & Development**, v. 26, n. 6, p. 1562–1689, 2022.

MAHGOUB, R. E.; ATATREH, N.; GHATTAS, M. A. Using filters in virtual screening: A comprehensive guide to minimize errors and maximize efficiency. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 99–136.

MALVY, D.; CHAPPUIS, F. Sleeping sickness. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 7, p. 986–995, 2011.

MANSOLDO, F. R. P.; CARTA, F.; ANGELI, A.; CARDOSO, V. S.; SUPURAN, C. T.; VERMELHO, Alane Beatriz. Chagas Disease: Perspectives on the Past and Present and Challenges in Drug Discovery. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5483, 2020..

MARTINEZ, F.; PERNA, E.; PERRONE, S. V; LIPRANDI, A. S. Chagas Disease and Heart Failure: An Expanding Issue Worldwide. **European Cardiology Review**, v. 14, n. 2, p. 82–88, 2019.

MARTINS-MELO, F. R.; CASTRO, M. C.; WERNECK, G. L. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. **Acta Tropica**, v. 220, p. 105948, 2021.

MASOCHA, W.; KRISTENSSON, K. Human African trypanosomiasis: How do the parasites enter and cause dysfunctions of the nervous system in murine models? **Brain Research Bulletin**, v. 145, p. 18–29, 2019..

MATETOVICI, I.; VOOGHT, L.; ABBEELE, J. V. D. Innate immunity in the tsetse fly (*Glossina*), vector of African trypanosomes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 98, p. 181–188, 2019.

MATOS, M. J.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; ABREU, O. A.; MOLINA, E.; YORDI, E. G. Coumarins — An Important Class of Phytochemicals. *In: Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. [s.l.] : InTech, 2015.

MCDONALD, A.; STONE, N. R. H. Human African Trypanosomiasis (Sleeping Sickness). *In: The Travel and Tropical Medicine Manual*. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 382–390.

MCKERROW, J. H. The diverse roles of cysteine proteases in parasites and their suitability as drug targets. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. e0005639, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL; SAÚDE, S. De V. Em. **Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial**. **Bol Epidemiol.**2021. p. 1–43.

MONTI, L.; WANG, S. C.; OUKOLOFF, K.; SMITH, A. B.; BRUNDEN, K. R.; CAFFREY, C. R.; BALLATORE, C. Brain-Penetrant Triazolopyrimidine and Phenylpyrimidine Microtubule Stabilizers as Potential Leads to Treat Human African Trypanosomiasis. **ChemMedChem**, v. 13, n. 17, p. 1751–1754, 2018.

MORENO-RODRÍGUEZ, A. *et al.* *In vitro* antiparasitic activity of new thiosemicarbazones in strains of *Trypanosoma cruzi*. , v. 87, p. 23–29, 2014.

NASCIMENTO, I. J. N. *et al.* Molecular Modeling Applied to Design of Cysteine Protease Inhibitors – A Powerful Tool for the Identification of Hit Compounds Against Neglected Tropical Diseases. **Frontiers in computational chemistry**, v. 5, p. 63–110, 2020.

NASCIMENTO, I. J. S.; AQUINO, T. M.; SILVA-JÚNIOR, E. F. Cruzain and Rhodesain Inhibitors: Last Decade of Advances in Seeking for New Compounds Against American and African Trypanosomiasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 1871–1899, 2021

NIKOLSKAIA, O. V. Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 10, p. 2739–2747, 2006.

NUNES, J. A. *et al.* Coumarin-based derivatives targeting *Trypanosoma cruzi* cruzain and *Trypanosoma brucei* cathepsin L-like proteases. **New Journal of Chemistry**, v. 47, n. 21, p. 10127–10146, 2023.

NUNES, J. A.; SILVA-JÚNIOR, E. F. Hybrid-Compounds Against Trypanosomiasis. **Current Drug Targets**, v. 23, n. 14, p. 1319–1329, 2022.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OKANO, Y.; INOUE, T.; KUBATA, B. K.; KABUTUTU, Z.; URADE, Y.; MATSUMURA,

H.; KAI, Y. Crystallization and Preliminary X-Ray Crystallographic Studies of *Trypanosoma brucei* Prostaglandin F₂ Synthase. **Journal of Biochemistry**, v. 132, n. 6, p. 859–861, 2002.

OMS. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. 2022a. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 8 jan. 2023.

OMS. **Neglected tropical diseases**. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>. Acesso em: 29 de jan. 2023.

OMS. **Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness)**. 2022b. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)). Acesso em: 9 jan. 2023.

ORTIZ, H. I. A.; FARINA, J. M.; SALDARRIAGA, C.; MENDOZA, I.; SOSA LIPRANDI, A.; WYSS, F.; BURGOS, L. M.; ALEXANDER, B.; BARANCHUK, A. Human African trypanosomiasis & heart. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 18, n. 12, p. 859–865, 2020.

PAPADOPOULOU, M. V.; BLOOMER, W. D.; ROSENZWEIG, H. S.; KAISER, M.; CHATELAIN, E.; IOSET, Jean-Robert. Novel 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazole-based piperazines and 2-amino-1,3-benzothiazoles as antichagasic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 6600–6607, 2013.

PAPADOPOULOU, M. V.; BLOOMER, W. D.; ROSENZWEIG, H. S.; WILKINSON, S. R.; SZULAR, J.; KAISER, M. Antitrypanosomal activity of 5-nitro-2-aminothiazole-based compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 117, p. 179–186, 2016.

PARTHASARATHY, A.; KALESH, K. Defeating the trypanosomatid trio: proteomics of the protozoan parasites causing neglected tropical diseases. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 625–645, 2020.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4^a edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PENTA, S. **Advances in Structure and Activity Relationship of Coumarin Derivatives**. In: PENTA, S. (org.). Academic P ed. Amsterdam. p. 1–9.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; CRESPILO-ANDÚJAR, C.; BOSCH-NICOLAU, P.; MOLINA, I. Trypanocidal treatment of Chagas disease. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)**, v. 39, n. 9, p. 458–470, 2021.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.

POLTICELLI, F.; ZAINI, G; BOLLI, A.; ANTONINI, G.; GRADONI, L.; ASCENZI, P. Probing the Cruzain S 2 Recognition Subsite: A Kinetic and Binding Energy Calculation Study. **Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. 2781–2789, 2005.

PONTE-SUCRE, A. An Overview of *Trypanosoma brucei* Infections: An Intense Host–

Parasite Interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RAWAT, A.; ROY, M.; JYOTI, A.; KAUSHIK, S.; VERMA, K.; SRIVASTAVA, V. K. Cysteine proteases: Battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes. **Microbiological Research**, v. 249, p. 126784, 2021.

RIBEIRO, V.; DIAS, N.; PAIVA, T.; HAGSTRÖM-BEX, L.; NITZ, N.; PRATESI, R.; HECHT, M.. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p. 7–17, 2020.

ROCHA, D. A.; SILVA, E. B.; FORTES, I. S.; LOPES, M. S.; FERREIRA, R. S.; ANDRADE, S. F. Synthesis and structure-activity relationship studies of cruzain and rhodesain inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 1426–1459, 2018.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, K. D.; MARTÍNEZ, I.; AGREDANO-MORENO, L. T.; JIMÉNEZ-GARCÍA, L. F.; REYES-CHILPA, R.; ESPINOZA, B.. Coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* produce ultrastructural alterations and affect *in vitro* infectivity of *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 61, p. 152827, 2019.

ROSA, R.; SCHENKEL, E. P.; BERNARDES, L. S. C. Semisynthetic and newly designed derivatives based on natural chemical scaffolds: moving beyond natural products to fight *Trypanosoma cruzi*. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 1, p. 105–122, 2020.

SAJID, M.; ROBERTSON, S. A.; BRINEN, L. S.; MCKERROW, J. H. Cruzain: the path from target validation to the clinic. *In*: ROBINSON, M. W.; DALTON, J. P. (Org.). **Cysteine proteases of pathogenic organisms**. Springer Science & Business Media, 2011, p. 100-115.

SALEM, M. A.; HELAL, M. H.; GOUDA, M. A.; AMMAR, Y. A.; EL-GABY, M. S. A.; ABBAS, S. Y. An overview on synthetic strategies to coumarins. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 13, p. 1534–1550, 2018.

SANTOS, É.; MENEZES FALCÃO, L. Chagas cardiomyopathy and heart failure: From epidemiology to treatment. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 39, n. 5, p. 279–289, 2020.

SANTOS, L. H.; WALDNER, B. J.; FUCHS, J. E.; PEREIRA, G. A. N.; LIEDL, K. R.; CAFFARENA, E. R.; FERREIRA, R. S. Understanding Structure–Activity Relationships for Trypanosomal Cysteine Protease Inhibitors by Simulations and Free Energy Calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 1, p. 137–148, 2019.

SANTOS, V. C.; FERREIRA, R. S. Computational approaches towards the discovery and optimisation of cruzain inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210385, 2022.

SANTOS, V. C.; LEITE, P. G.; SANTOS, L. H.; PASCUTTI, P. G.; KOLB, P.; MACHADO, F. S.; FERREIRA, R. S. Structure-based discovery of novel cruzain inhibitors

with distinct trypanocidal activity profiles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 257, p. 115498, 2023.

SANTOS, V. C.; OLIVEIRA, A. E. R.; CAMPOS, A. C. B.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C.; TEIXEIRA, S. M. R.; LIMA, A. P. C. A.; FERREIRA, R. S. The gene repertoire of the main cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*, cruzipain, reveals four sub-types with distinct active sites. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 18231, 2021.

SANTOS-JUNIOR, P. F. S. **Planejamento e avaliação de novos derivados 2- iminotiofen-tiazolidínicos como inibidores de cisteína proteases de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis***. 2022. Universidade Federal de Alagoas, 2022.192 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia). Departamento de Química e Biotecnologia, Maceió, AL, 2022.

SANTOS-JÚNIOR, P. F. S.; SILVA, L. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SILVA-JÚNIOR, E. F. Nitro compounds against trypanosomatidae parasites: Heroes or villains? **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 75, p. 128930, 2022.

SCARIM, C. B.; JORNADA, D. H.; MACHADO, M. G. M.; FERREIRA, C. M. R.; SANTOS, J. L.; CHUNG, M. C. Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malaria. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 162, p. 378–395, 2019.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1–19, 2021.

SIERRA, E. J. T.; CORDEIRO, C. F.; DINIZ, L. F.; CALDAS, I. S.; HAWKES, J. A.; CARVALHO, D. T. Coumarins as Potential Antiprotozoal Agents: Biological Activities and Mechanism of Action. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 592–611, 2021.

SILVA, A. C. C.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A.; LEITE, A. C. L.; PEREIRA, V. R. A.; HERNANDES, M. Z. Chagas Disease Treatment and Rational Drug Discovery: A Challenge That Remains. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

SILVA, E. B. *et al.* Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 39–50, 2017.

SILVA, E. B. *et al.* Structure-Based Optimization of Quinazolines as Cruzain and *Tbr*CATL Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 17, p. 13054–13071, 2021a.

SILVA, E. B.; DALL, E.; BRIZA, P.; BRANDSTETTER, H.; FERREIRA, R. S. Cruzain structures: apocruzain and cruzain bound to S -methyl thiomethanesulfonate and implications for drug design. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 75, n. 6, p. 419–427, 2019.

SILVA, L. G.; GOMES, K. S.; COSTA-SILVA, T. A.; ROMANELLI, M. M.; TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G. Calanolides E1 and E2, two related coumarins from *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae), displayed *in vitro* activity against

amastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 23, p. 5373–5377, 2021b.

SILVA, L. R.; GUIMARÃES, A. S.; NASCIMENTO, J.; NASCIMENTO, I. J. S.; SILVA, E. B.; MCKERROW, J. H.; CARDOSO, S. H.; SILVA-JÚNIOR, E. F. Computer-aided design of 1,4-naphthoquinone-based inhibitors targeting cruzain and rhodesain cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 116213, 2021c.

SILVA-JÚNIOR, E. F. *et al.* Design, synthesis, molecular *docking* and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4228–4240, 2016.

SILVA-JUNIOR, E. F. **Síntese e avaliação biológica de compostos duais frente às enzimas NS2B-NS3 dos vírus dengue e zika e NSP2 do vírus hikungunya**. 2019. Universidade Federal de Alagoas, 2019. 235 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia). Departamento de Química e Biotecnologia, Maceió, AL, 2019.

SILVA-JUNIOR, E. F.; BARCELLOS FRANCA, P. H.; RIBEIRO, F. F.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; AQUINO, T. M.; ARAÚJO-JUNIOR, J. X. Molecular *Docking* Studies Applied to a Dataset of Cruzain Inhibitors. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 14, n. 1, p. 68–78, 2018.

SILVA-JÚNIOR, E. F.; SCHIRMEISTER, T.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. Promising trypanocidal heterocyclic compounds of natural origin and their synthetic analogs. *In*: **Discovery and Development of Therapeutics from Natural Products Against Neglected Tropical Diseases**. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 165–217.

SIQUEIRA-NETO, J. L.; DEBNATH, A.; MCCALL, L.; BERNATCHEZ, J. A.; NDAO, M.; REED, S. L.; ROSENTHAL, P. J. Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006512, 2018.

SOARES, R. O. A.; ECHEVARRIA, A.; BELLINENY, M. S. S.; PINHO, R. T.; LEO, R. M. M.; SEGUINS, W. S.; MACHADO, G. M.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; LEON, L. L. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 4, p. 381–387, 2011.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 273–343, 2021.

STEFANACHI, A.; LEONETTI, F.; PISANI, L.; CATTO, M.; CAROTTI, A. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 250, 2018.

STEVERDING, D.; CAFFREY, C. R. Should the enzyme name ‘rhodesain’ be discontinued? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 245, p. 111395, 2021.

STEVERDING, D.; SEXTON, D. W.; WANG, X.; GEHRKE, S. S.; WAGNER, G. K.; CAFFREY, C. R. *Trypanosoma brucei*: Chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug target. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 5, p. 481–488, 2012.

TESORIERO, C.; DEL GALLO, F.; BENTIVOGLIO, M. Sleep and brain infections. **Brain Research Bulletin**, v. 145, p. 59–74, 2019.

ULIASSI, E. *et al.* Crassiflorone derivatives that inhibit *Trypanosoma brucei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*TbGAPDH*) and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase (*TcTR*) and display trypanocidal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 138–148, 2017.

VARELA, M. T.; AMARAL, M.; ROMANELLI, M. M.; LEVATTI, E. V. C; TEMPONE, A. G.; FERNANDES, J. P. S. Optimization of physicochemical properties is a strategy to improve drug-likeness associated with activity: Novel active and selective compounds against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 171, p. 106114, 2022.

VARELA, M. T.; ROMANELLI, M.; AMARAL, M.; TEMPONE, A. G.; FERNANDES, J. P. S. Piperazine amides with desirable solubility, physicochemical and drug-like properties: Synthesis and evaluation of the anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 31, n. 7, p. 1265–1273, 2023.

VARIKUTI, S.; JHA, B. K.; VOLPEDO, G.; RYAN, N. M.; HALSEY, G.; HAMZA, O. M.; MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Host-Directed Drug Therapies for Neglected Tropical Diseases Caused by Protozoan Parasites. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

VEKARIYA, R. H.; PATEL, H. D. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives via Knoevenagel Condensation: A Review. **Synthetic Communications**, v. 44, n. 19, p. 2756–2788, 2014.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–14, 2013.

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 2016.

VIDAL-LIMON, A.; AGUILAR-TOALÁ, J. E.; LICEAGA, A. M. Integration of Molecular Docking Analysis and Molecular Dynamics Simulations for Studying Food Proteins and Bioactive Peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 934–943, 2022.

WEINMANN, J.; KIRCHNER, L.; ENGSTLER, M.; MEINEL, L.; HOLZGRABE, U. Design, synthesis and biological evaluations of quinolone amides against African trypanosomiasis with improved solubility. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 250, p. 115176, 2023.

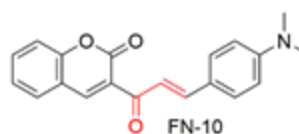
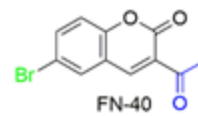
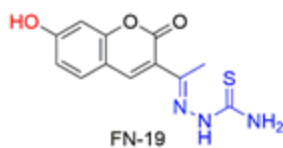
WU, K.; KARAPETYAN, E.; SCHLOSS, J.; VADGAMA, J.; WU, Y. Advancements in small molecule drug design: A structural perspective. **Drug Discovery Today**, v. 28, n. 10, p. 103730, 2023..

WU, Yi; XU, J.; LIU, Y.; ZENG, Y.; WU, G. A Review on Anti-Tumor Mechanisms of Coumarins. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2020.

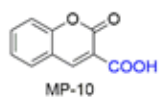
ZHOU, L.; STEWART, G.; RIDEAU, E.; WESTWOOD, N. J.; SMITH, T. K. A Class of 5-Nitro-2-furancarboxylamides with Potent Trypanocidal Activity against *Trypanosoma brucei* *in vitro* . **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 796–806, 2013.

APÊNDICE A - Planejamento dos Inibidores por vFBDD

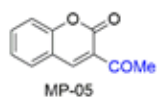
SERIE A



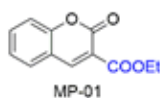
SERIE C



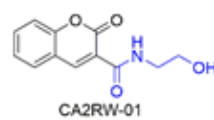
SERIE D



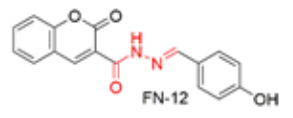
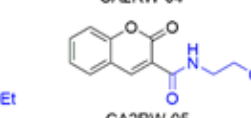
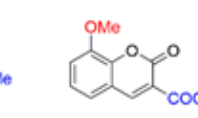
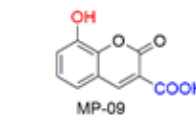
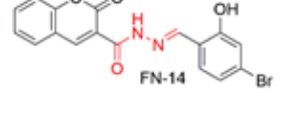
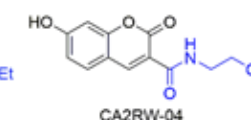
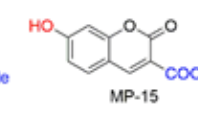
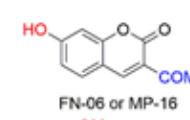
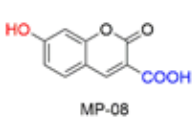
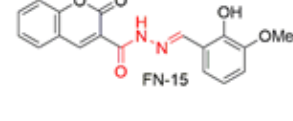
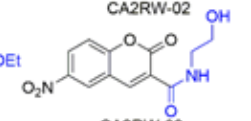
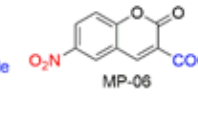
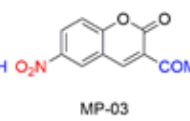
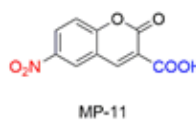
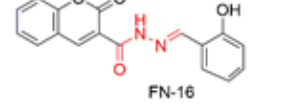
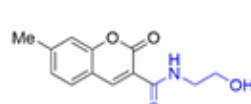
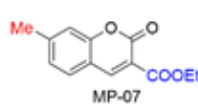
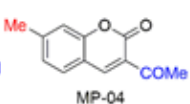
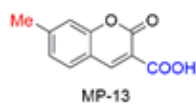
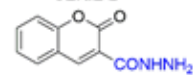
SERIE E



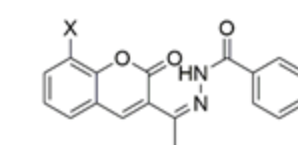
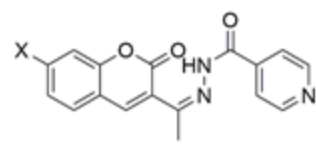
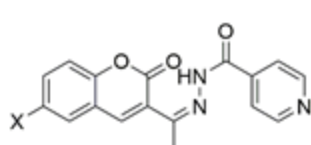
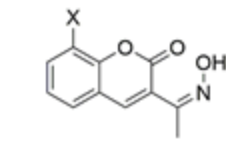
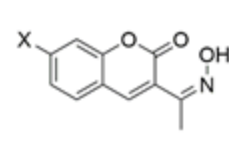
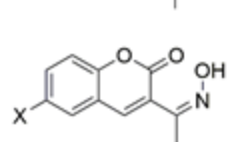
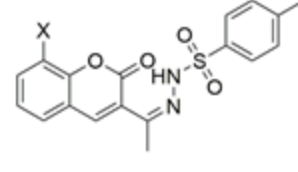
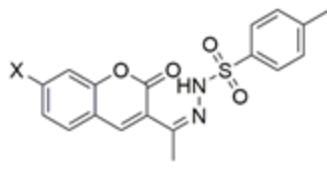
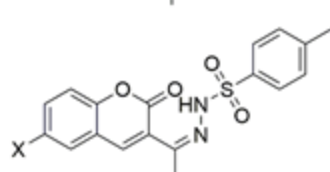
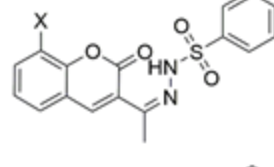
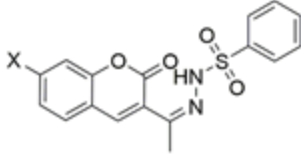
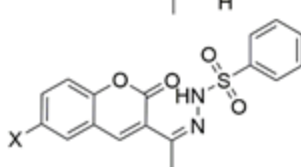
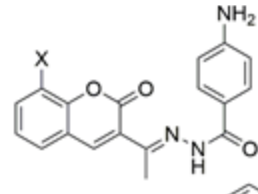
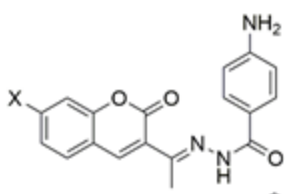
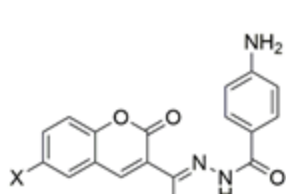
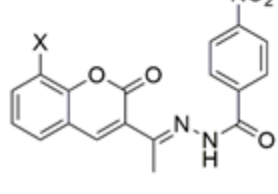
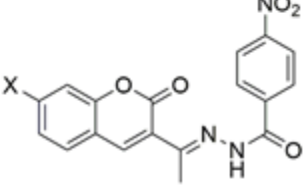
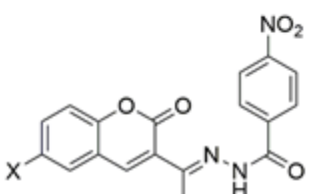
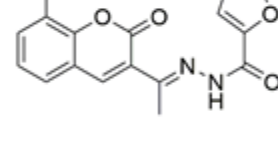
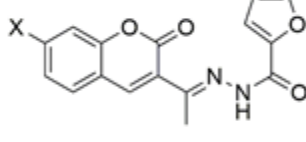
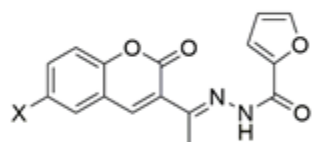
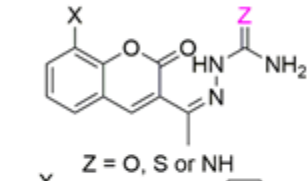
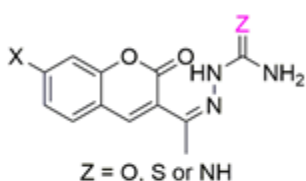
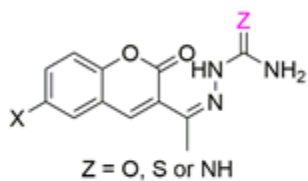
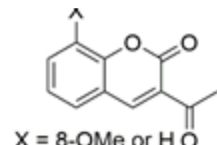
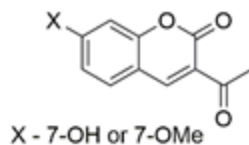
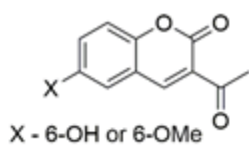
SERIE F



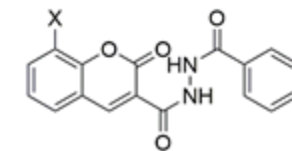
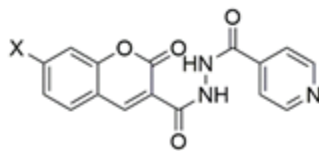
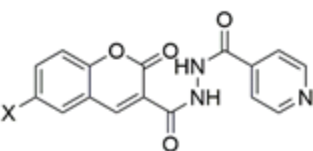
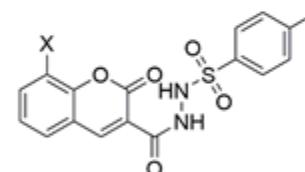
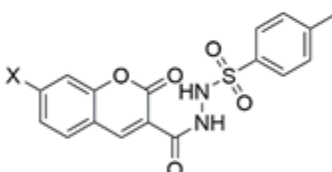
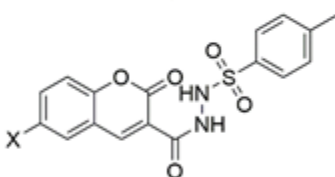
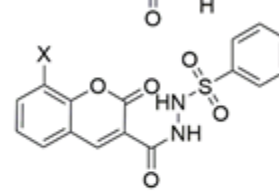
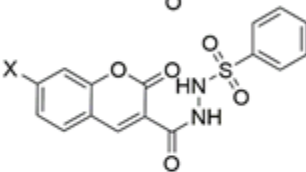
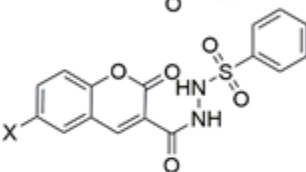
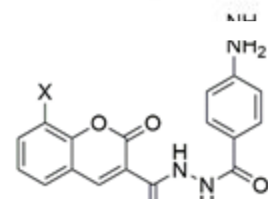
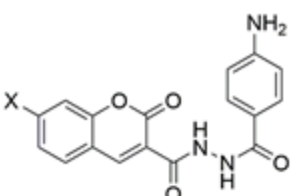
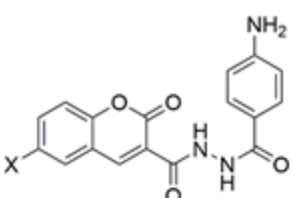
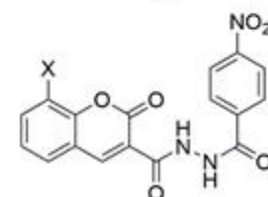
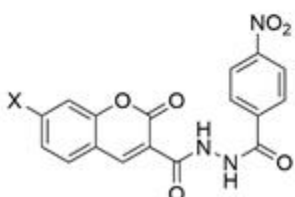
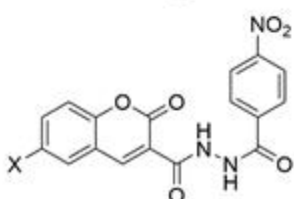
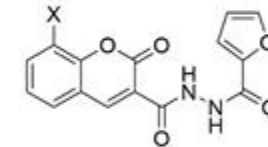
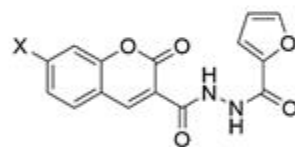
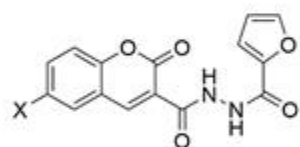
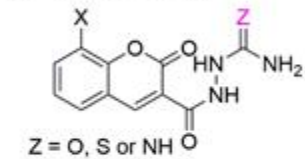
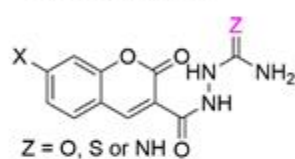
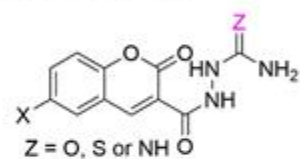
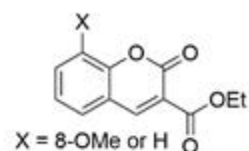
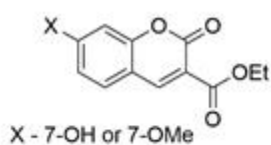
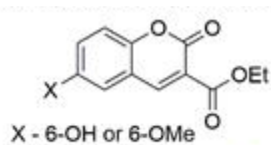
SERIE B



Derivados de cumarina-3-cetona



Derivados de cumarina-3-ésteres



APÊNDICE B - Tabela 1A. Todas as proteínas/enzimas de *Trypanosoma brucei* investigadas como alvos potenciais para FN-10.

PDB	Proteína/Nome do alvo	FitScore
3NVL	2,3-Bisphosphoglycerate-Independent Phosphoglycerate Mutase	41.73
4BI9	3-Ketoacyl-CoA Thiolase, Putative	58.49
16PK	3-Phosphoglycerate Kinase	38.37
3EB9	6-Phosphogluconolactonase	50.84
5C5V	Acidocalcisomal Pyrophosphatase	35.53
5VN4	Adenine Phosphoribosyltransferase, Putative	71.81
3H9U	Adenosylhomocysteinase	72.44
4EFC	Adenylosuccinate Lyase	61.54
7DL8	ALBA1-Domain Protein	56.90
4EFD	Aminopeptidase	21.00
4LWO	Arginine <i>N</i> -Methyltransferase, Putative	50.74
4LNS	Asparagine Synthetase A	42.78
4W5K	Aspartate Aminotransferase, Mitochondrial	52.99
4I15	Class 1 Phosphodiesterase PDEB1	53.09
4HWY	Cysteine Peptidase C (CPC)	45.32
4DK2	Deoxyuridine Triphosphatase	54.07
5XFW	Dihydroorotate Dehydrogenase (Fumarate)	58.19
2HKE	Diphosphomevalonate Decarboxylase, Putative	52.37
6GIM	DNA Duplex	76.32
2PTW	Enolase	55.65
6R36	Farnesyl Pyrophosphate Synthase	28.67
1F2J	Fructose-Bisphosphate Aldolase, Glycosomal	49.33
3DWV	Glutathione Peroxidase-Like Protein	83.31
4P8R	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase, Cytosolic	66.22
2VEI	Glycosomal Triosephosphate Isomerase	30.98
3O6O	Heat Shock Protein 83	77.99
6IF4	Histone Acetyltransferase	46.19
6MXC	Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase	57.42
4I70	Inosine-Adenosine-Guanosine-Nucleoside Hydrolase	57.08
6IA7	Intraflagellar Transport Protein 22	55.59
3ESF	Iron-Containing Superoxide Dismutase B2	47.47
7E3N	Isocitrate Dehydrogenase [NADP]	58.77
5NTD	Leucyl Aminopeptidase	75.89
5L9A	L-Threonine 3-Dehydrogenase	78.75
4AFP	Metacaspase Mca2	53.94
4ZT6	Methionyl-Trna Synthetase	68.23
4EU1	Mitochondrial Aspartate Aminotransferase	52.35

2GIA	Mitochondrial Rna-Binding Protein 1	35.93
3I3G	<i>N</i> -Acetyltransferase	56.83
4FKY	Nucleoside Diphosphate Kinase	74.35
4BP8	Oligopeptidase B	47.45
1SZR	Ornithine Decarboxylase	47.79
3JV1	P22 Protein	44.26
6GMP	Parvulin 42	47.02
6SPT	Peroxin 14	64.39
3CVN	Peroxisome Targeting Signal 1 Receptor	27.49
5H2R	Phosphodiesterase	69.17
1VBJ	Prostaglandin F_{2α} Synthase	85.80
1YAR	Proteasome Alpha Subunit	66.87
6GEY	Pteridine Reductase	65.26
3ZS7	Pyridoxal Kinase	41.16
4KCU	Pyruvate Kinase 1	50.32
1FX2	Receptor-Type Adenylate Cyclase Gresag 4.1	62.14
3BNW	Riboflavin Kinase, Putative	46.27
6FXS	Ribose 5-Phosphate Isomerase, Putative	57.86
4NLB	Ribosomal RNA Processing Protein 6	59.46
7C45	RNase D Complex with RNA U12	42.13
5TVM	S-Adenosylmethionine Decarboxylase Alpha Chain	60.84
3LSS	Seryl-Trna Synthetase	58.31
3G1Q	Sterol 14-Alpha-Demethylase	76.90
6LP1	Succinyl-CoA:3-Ketoacid-Coenzyme A Transferase	53.01
5KLH	Surface Glycoprotein	48.77
1R26	Thioredoxin	60.95
5FUW	Thymidine Kinase	68.69
6TIM	Triosephosphate Isomerase	59.97
2WOW	Trypanothione Reductase	67.44
6GXY	Tryparedoxin	64.91
4B6M	Tubulin-Specific Chaperone, Putative	54.86
3M4U	Tyrosine Specific Protein Phosphatase, Putative	36.76
1GY8	UDP-Galactose 4-Epimerase	64.69
4BQH	UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase	50.79
3GUE	UTP-Glucose-1-Phosphate Uridyltransferase 2	62.07



Cite this: *New J. Chem.*, 2023,
47, 10127

Coumarin-based derivatives targeting *Trypanosoma cruzi* cruzain and *Trypanosoma brucei* cathepsin L-like proteases†

Jéssica Alves Nunes,^a Fabrícia Nunes da Silva,^b Elany Barbosa da Silva,^{id c}
Clara Andrezza Crisóstomo Bezerra Costa,^d Johnnatan Duarte de Freitas,^d
Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Junior,^{id e} Miriam Aparecida Giardini,^{id c}
Jair Lage de Siqueira-Neto,^c James H. McKerrow,^c Thaiz Rodrigues Teixeira,^{id c}
Louis William Odeesho,^c Conor R. Caffrey,^c Sílvia Helena Cardoso^{*b} and
Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{id *a}

The protozoa, *Trypanosoma cruzi* (etiological agent of Chagas diseases – also named American trypanosomiasis) and *T. brucei* (causative agent of human African trypanosomiasis – HAT), negatively impact public health, being endemic in several countries and leading to thousands of deaths per year. Moreover, the pharmacological treatment of diseases has several limitations, such as parasitic resistance and several side effects in patients, which decrease therapeutic adherence. Two cysteine proteases, cruzain (CRZ) from *T. cruzi* and a cathepsin L-like enzyme (*Tbr*CATL) from *T. brucei*, are considered promising targets of these protozoa since they are responsible for many key biological processes in their life cycles. Coumarin analogs have been reported in diverse studies targeting the development of trypanocidal

REVIEW ARTICLE

Hybrid-Compounds Against Trypanosomiases

Jessica Alves Nunes¹ and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{1,2,*}¹Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, 57072-970, Maceió, Brazil; ²Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas, 57072-970, Maceió, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: January 26, 2022
Revised: March 08, 2022
Accepted: March 08, 2022DOI:
10.2174/1389450123666220509202352

Abstract: Neglected tropical diseases (NTDs) are a global public health problem associated with approximately 20 conditions. Among these, Chagas disease (CD), caused by *Trypanosoma cruzi*, and human African trypanosomiasis (HAT), caused by *T. brucei gambiense* or *T. brucei rhodesiense*, affect mainly the populations of the countries from the American continent and sub-Saharan Africa. Pharmacological therapies used for such illnesses are not yet fully effective. In this context, the search for new therapeutic alternatives against these diseases becomes necessary. A drug design tool, recently recognized for its effectiveness in obtaining ligands capable of modulating multiple targets for complex diseases, concerns molecular hybridization. Therefore, this review aims to demonstrate the importance of applying molecular hybridization in facing the challenges of developing prototypes as candidates for the treatment of parasitic diseases. Therefore, studies involving different chemical classes that investigated and used hybrid compounds in recent years were compiled in this work, such as thiazolidinones, naphthoquinones, quinolines, and others. Finally, this review covers several applications of the exploration of molecular hybridization as a potent strategy in the development of molecules potentially active against trypanosomiases, in order to provide information that can help in designing new drugs with trypanocidal activity.

Keywords: Neglected tropical diseases, Chagas disease, human African trypanosomiasis, molecular hybridization, rational drug design, trypanocidal activity.

1. INTRODUCTION

Neglected tropical diseases (NTDs) are represented by a group of pathologies responsible for causing morbidity and mortality worldwide, which commonly affect the poorest and most marginalized populations [1]. The World Health Organization (WHO) currently recognizes 20 conditions as NTDs [2]. It is estimated that NTDs affect about 2 billion







rural communities, where approximately 55 million people are at risk of contracting it [4].

The clinical treatment of CD is performed with only two drugs, benznidazole (1) and nifurtimox (2) (Fig. 1), which have proven efficacy only in the acute phase of the disease [6]. On the other hand, the treatment of HAT consists of five drugs being pentamidine (3) and suramin (4) used in the



Article

Coumarin-Based Compounds as Inhibitors of Tyrosinase/Tyrosine Hydroxylase: Synthesis, Kinetic Studies, and In Silico Approaches

Jéssica Alves Nunes ^{1,†}, Rodrigo Santos Aquino de Araújo ^{2,†}, Fabrícia Nunes da Silva ³, Joanna Cytarska ⁴, Krzysztof Z. Łączkowski ⁴, Silvia Helena Cardoso ³, Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Júnior ^{2,*} and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior ¹

¹ Biological and Molecular Chemistry Research Group, Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, AC Simões Campus, Lourival Melo Mota Avenue, s/n, Maceió 57072-970, Alagoas, Brazil

² Laboratory of Synthesis and Drug Delivery, Department of Biological Sciences, State University of Paraíba, João Pessoa 58429-500, Paraíba, Brazil

³ Laboratory of Organic and Medicinal Synthesis, Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Manoel Severino Barbosa Avenue, Arapiraca 57309-005, Alagoas, Brazil

⁴ Department of Chemical Technology and Pharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: franciscojaime@servidor.uepb.edu.br; Tel.: +55-83-9-9924-1423

† The authors contributed equally.

Abstract: Cancer represents the main cause of morbidity and mortality worldwide, constituting a serious health problem. In this context, melanoma represents the most aggressive and fatal type of skin cancer, with death rates increasing every year. Scientific efforts have been addressed to the devel-

Natural Coumarin Derivatives Targeting Melanoma

Leandro Rocha Silva¹, Jéssica Alves Nunes¹, Peng Zhan¹, Krzysztof Z Łączkowski²,
Sílvia Helena Cardoso³, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior¹

Affiliations + expand

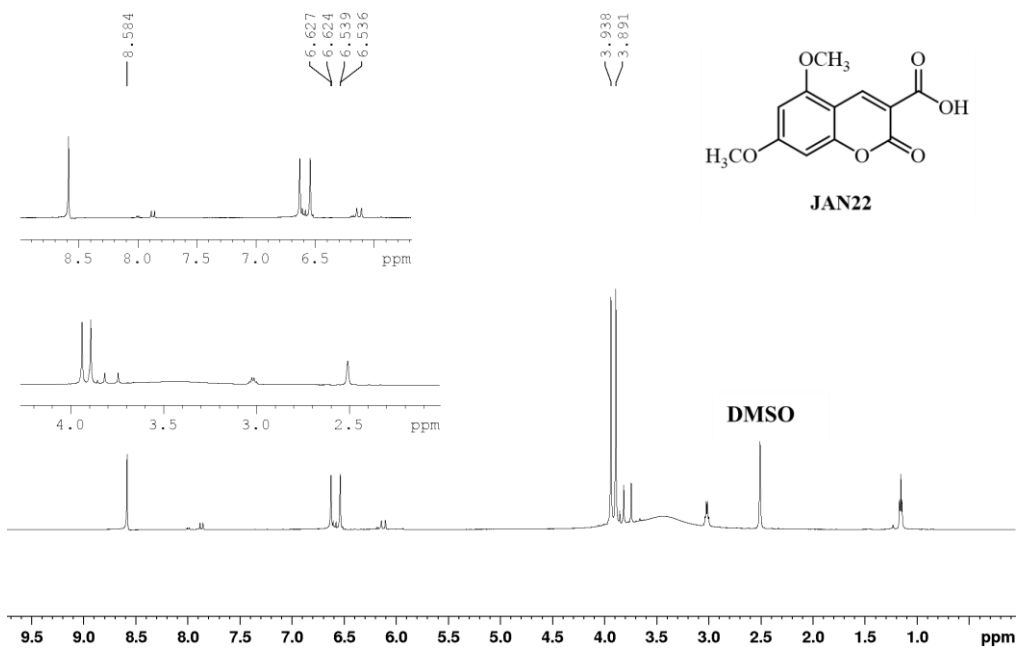
PMID: 37078582 DOI: 10.2174/0929867330666230420152145

Abstract

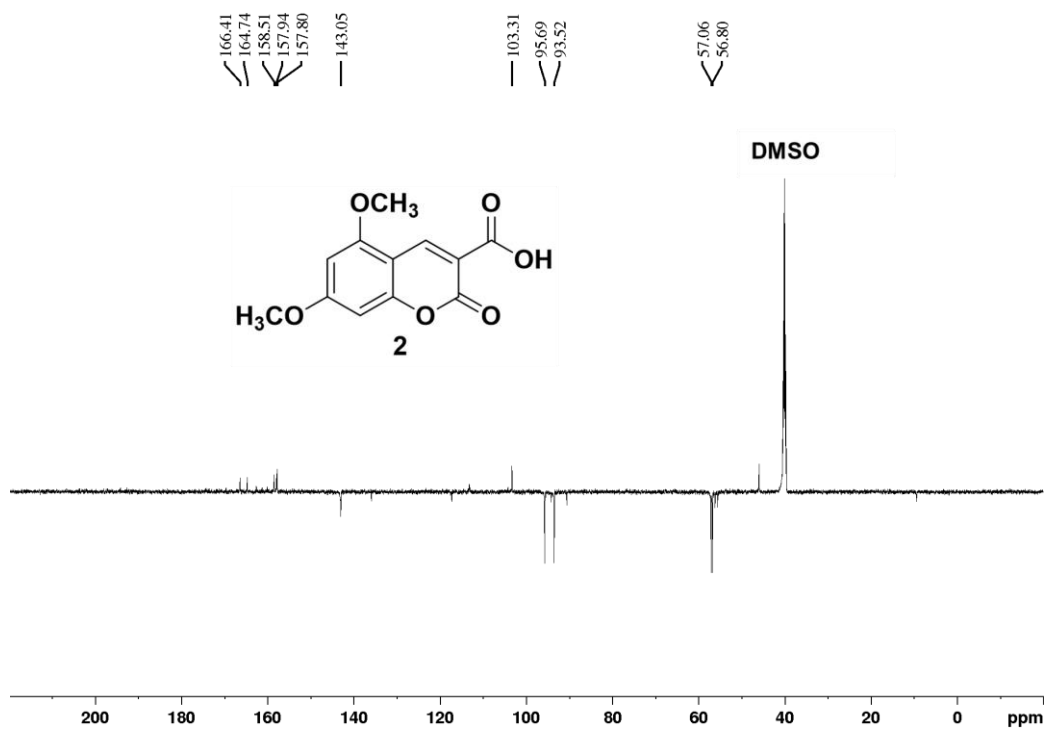
In general, a cancerous process starts from uncontrolled cell growth, apoptosis, and rapid proliferation of cellular clones, as well as, reactive oxygen species (ROS) and imbalance of ROS-antioxidant production also could be involved in the genesis of the disease. Cancer has accounted for millions of deaths worldwide every year, representing a relevant threat to human lives. In this context, malignant melanoma represents the most aggressive and deadliest type of cancer, leading to increased rates of patient deaths. Natural active compounds have demonstrated their pharmacological benefits in several different studies. Among these compounds, coumarin analogs have demonstrated promising biological profiles, considering their efficacy and low toxicity. In this context, this phytochemical oxygenated core has been broadly investigated since it presents several biological properties of interest in the medicinal field. Herein, we reported a complete compilation of studies focused on natural coumarins against melanoma, as well as, tyrosinase since it is a cooper-catalyzed oxidase that performs an essential role during melanogenesis (Eu-melanins and Pheo-melanins), which is associated with melanoma. Thus, three different subclasses of natural coumarin

ANEXO A - Caracterização estrutural dos compostos sintetizados

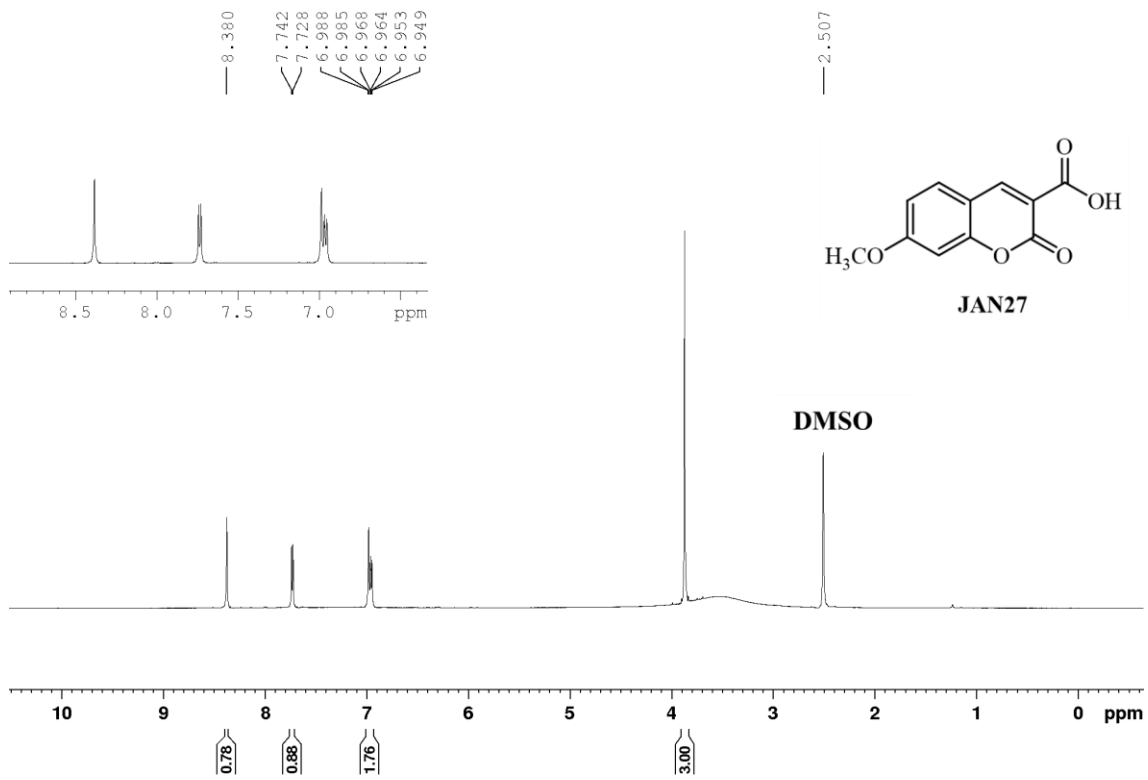
Espectro de RMN de ^1H do Ácido 5,7-dimetoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (JAN22)



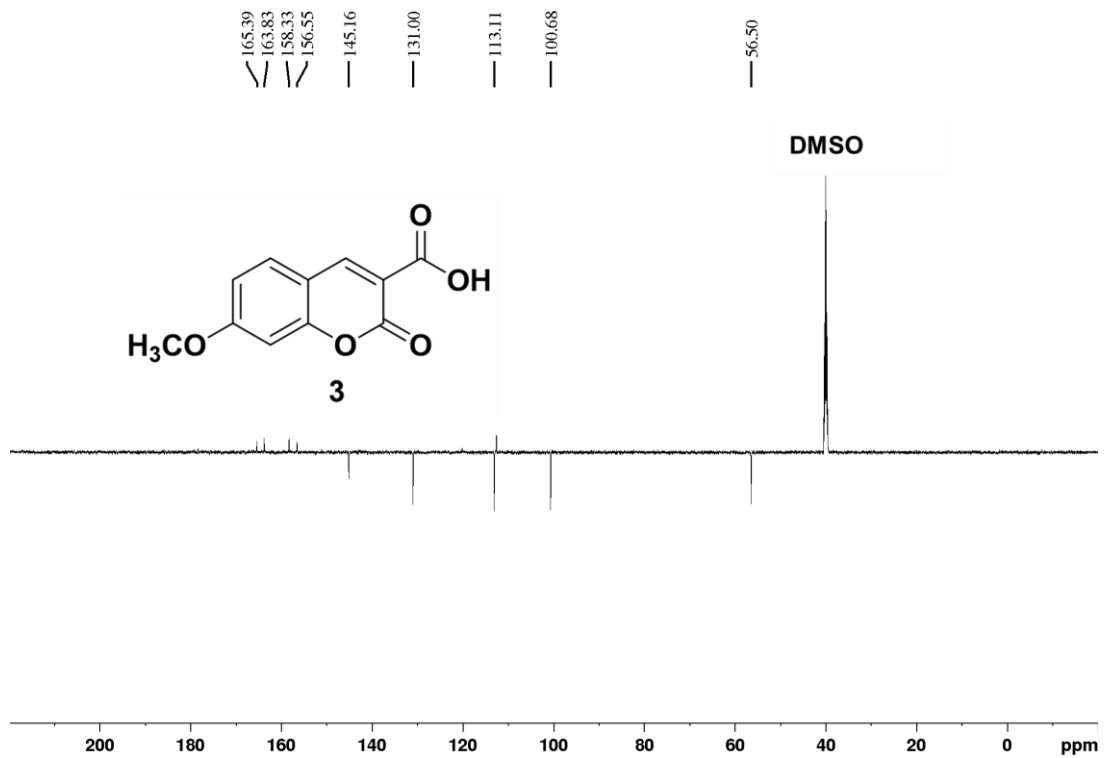
Espectro de RMN de ^{13}C do Ácido 5,7-dimetoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (JAN22)



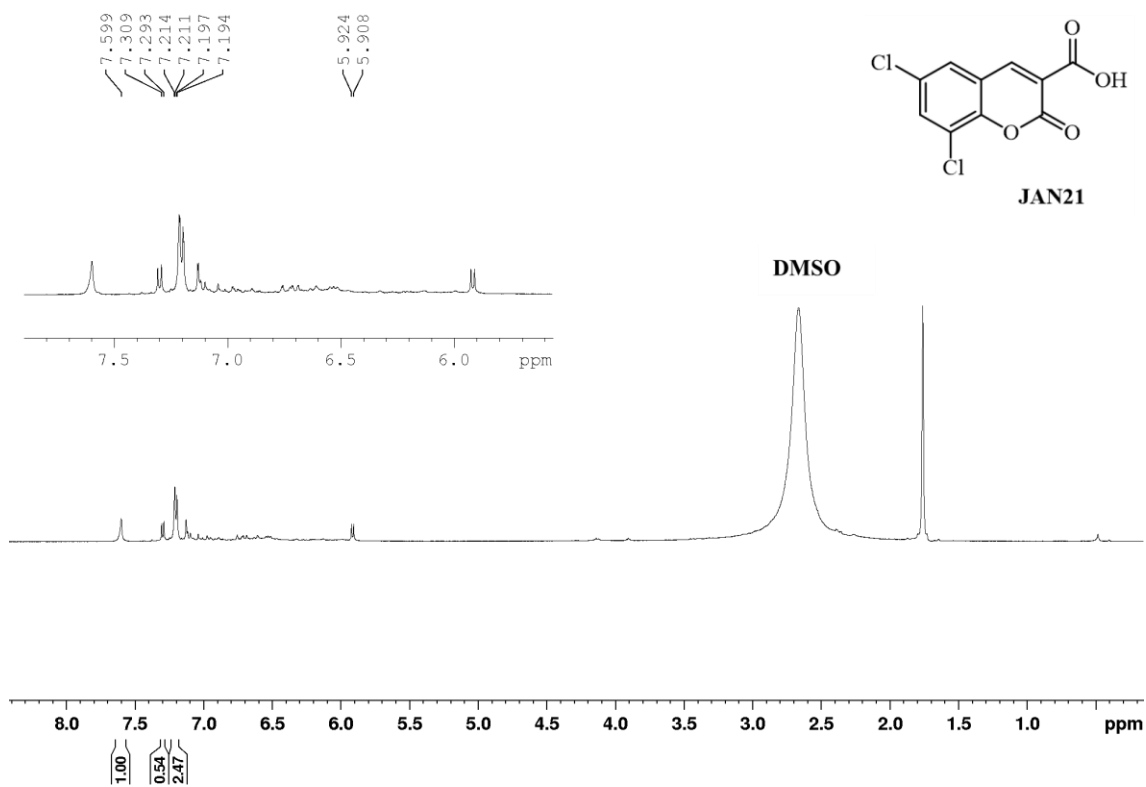
Espectro de RMN de ^1H do Ácido 7-metoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (JAN27)



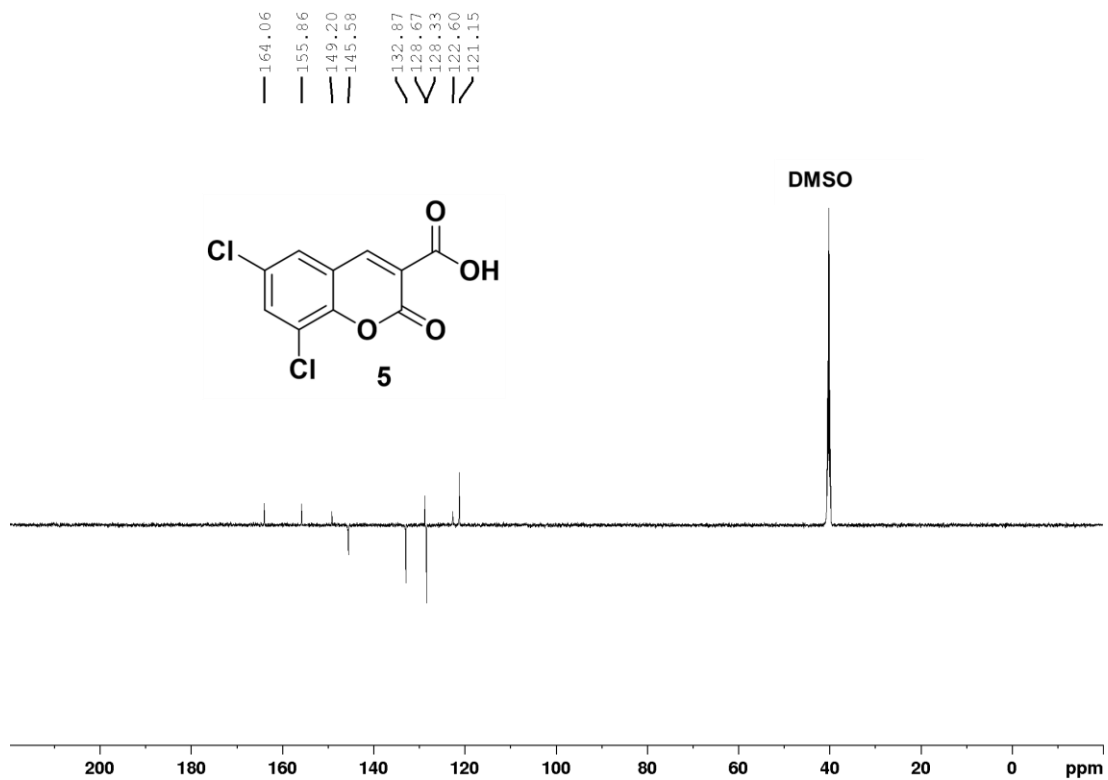
Espectro de RMN de ^{13}C do Ácido 7-metoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (JAN27)



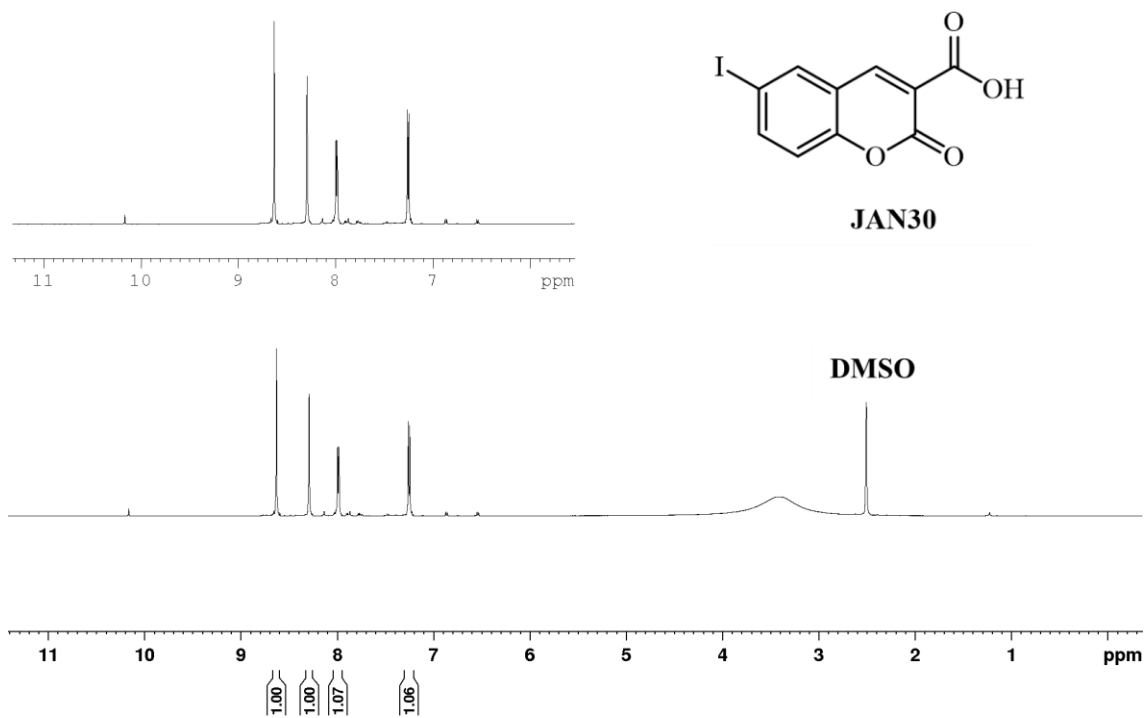
Espectro de RMN de ^1H Ácido 6,8-dicloro-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxílico (JAN21)



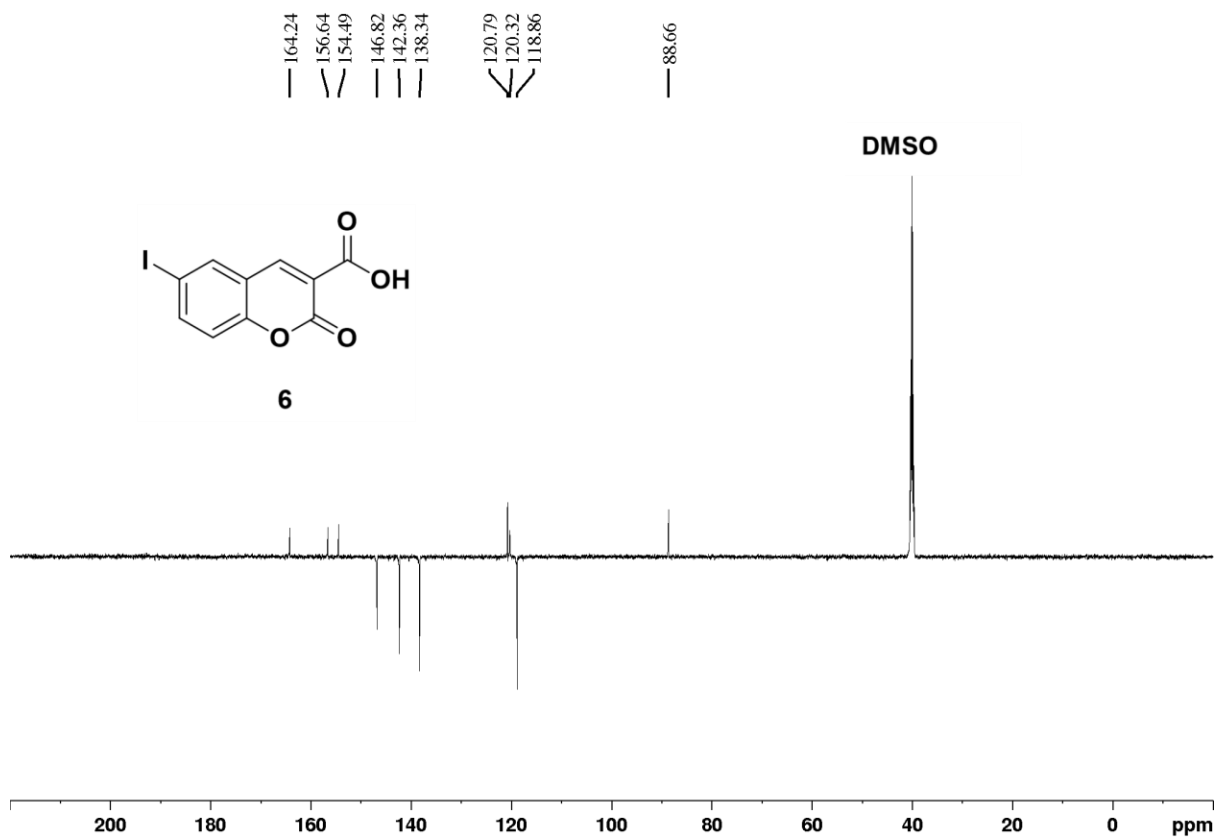
Espectro de RMN de ^{13}C Ácido 6,8-dicloro-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxílico (JAN21)



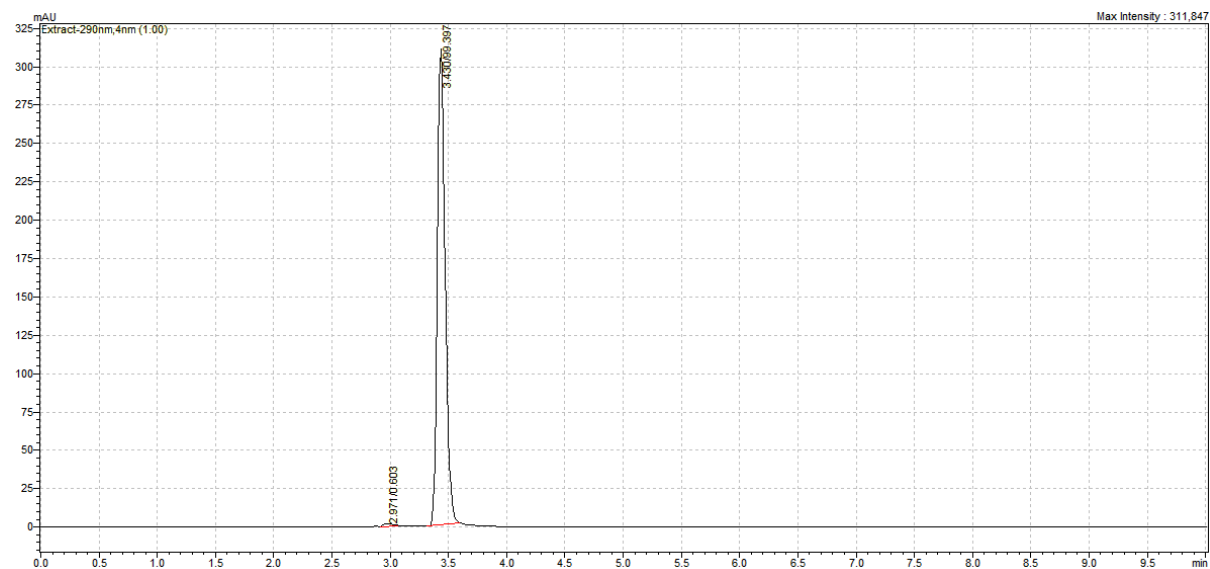
Espectro de RMN de ^1H do Ácido 6-iodo-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxílico (**JAN30**)



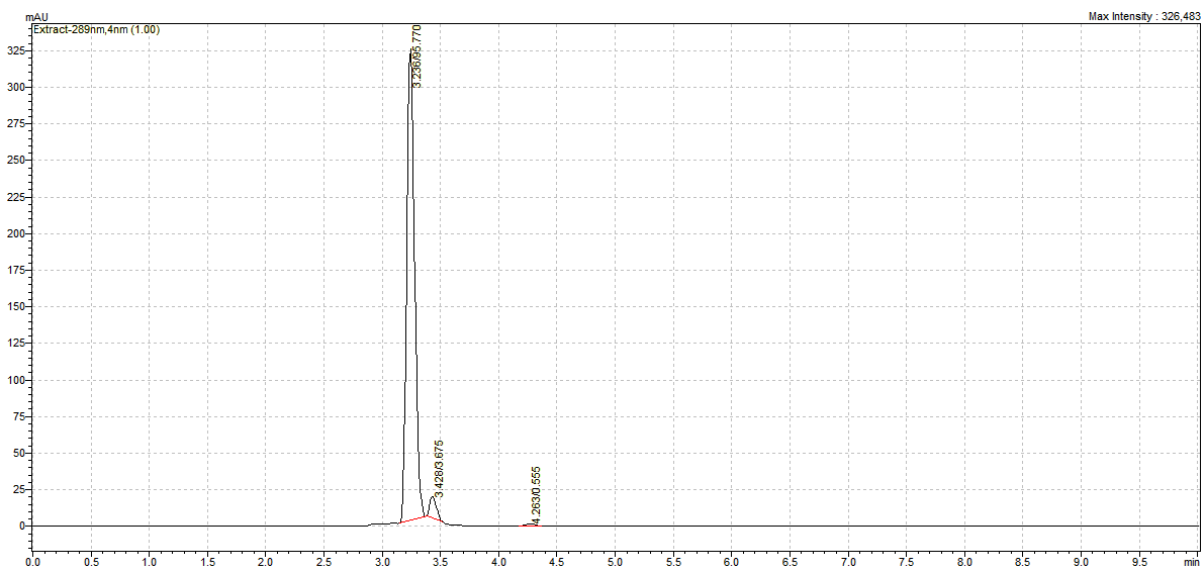
Espectro de RMN de ^{13}C do Ácido 6-iodo-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxílico (**JAN30**)



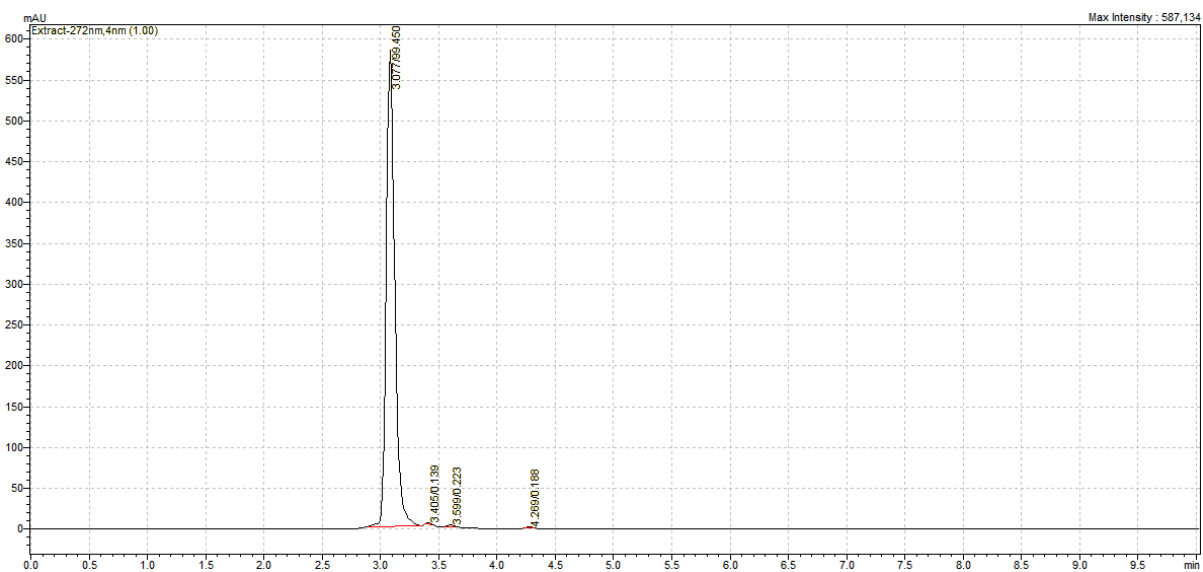
Cromatograma de HPLC de 2-Oxo-*N*-fenil-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN10)



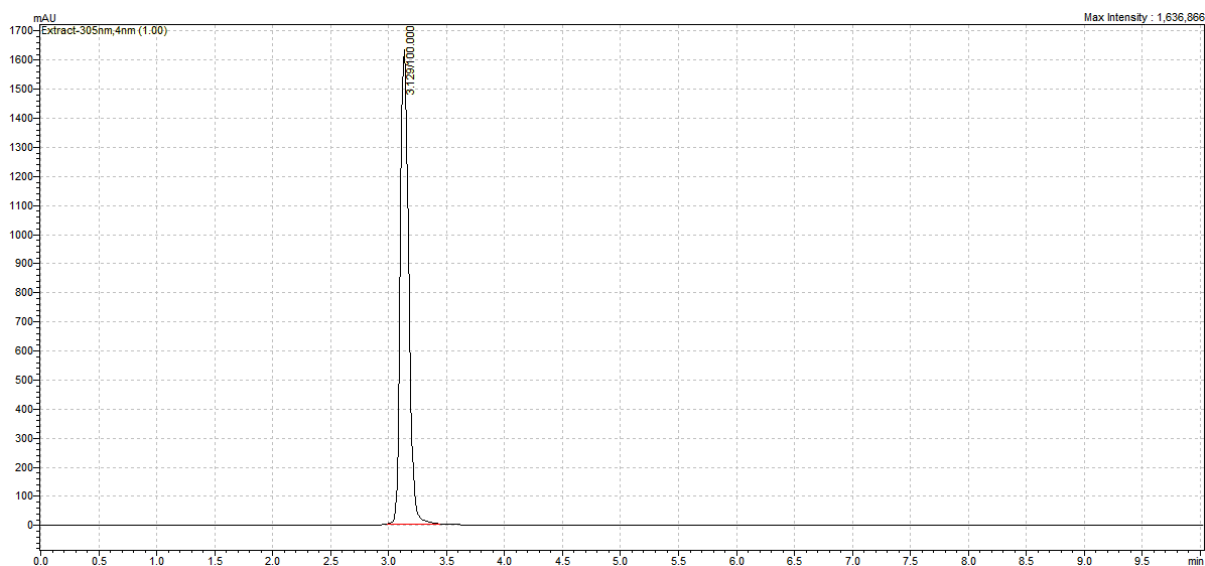
Cromatograma de HPLC de *N*-Benzil-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN11)



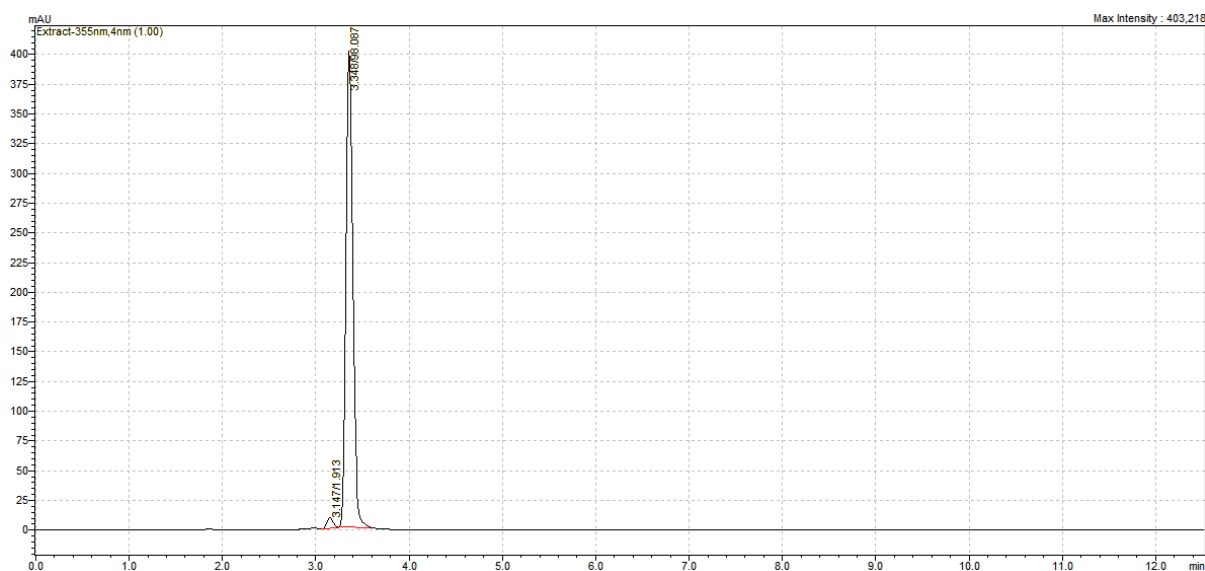
Cromatograma de HPLC de 3-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN17)



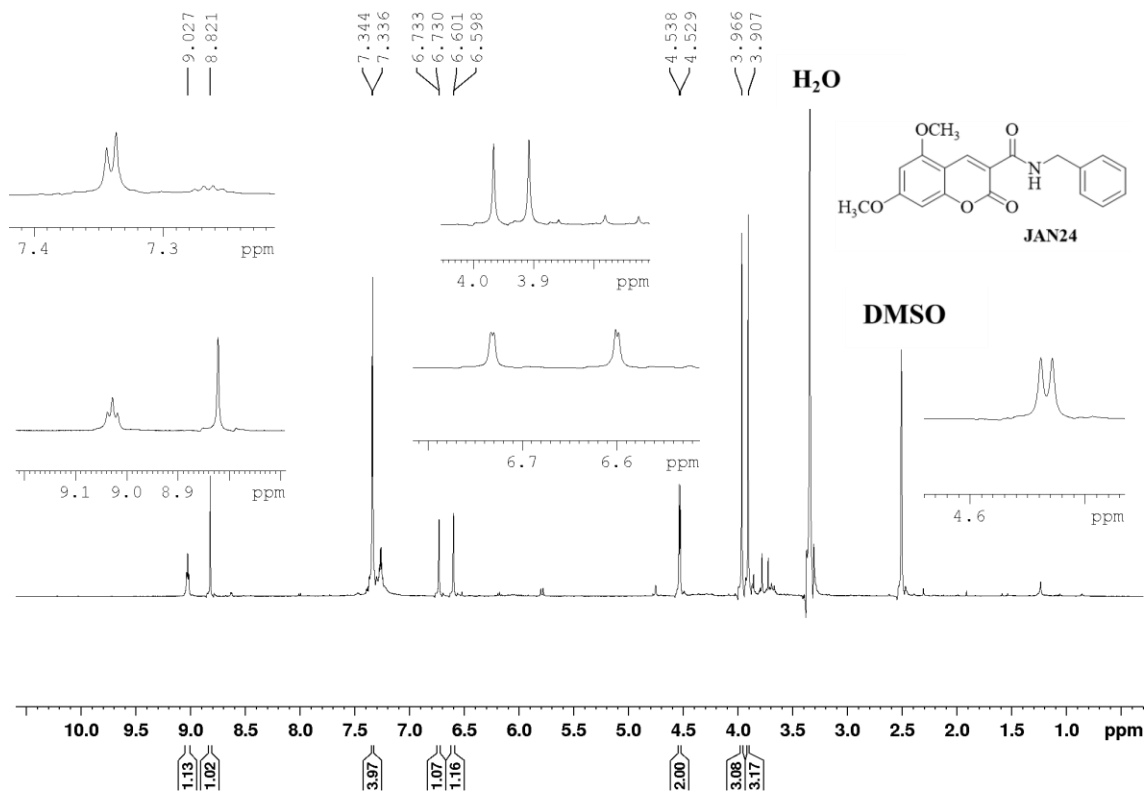
Cromatograma de HPLC de N-(2-(1H-indol-3-il)etil)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida (JAN54)



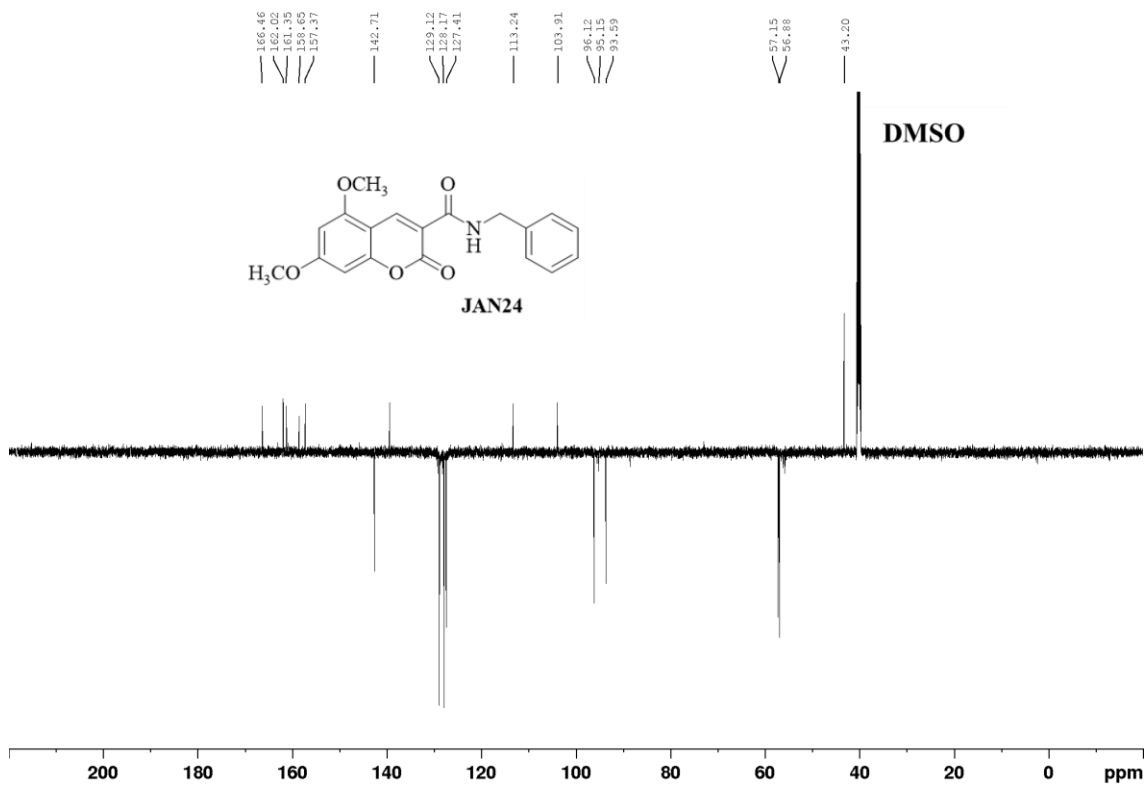
Cromatograma de HPLC de *N*-Benzil-5,7-dimetoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida
(JAN24)



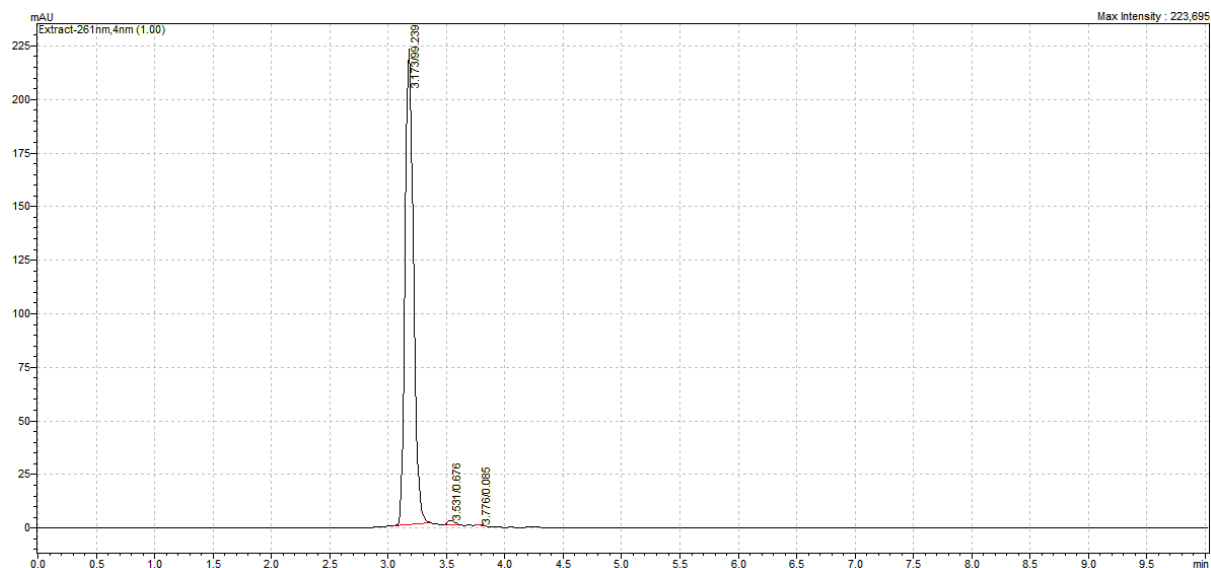
Espectro de RMN de ^1H *N*-Benzil-5,7-dimetoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN24)



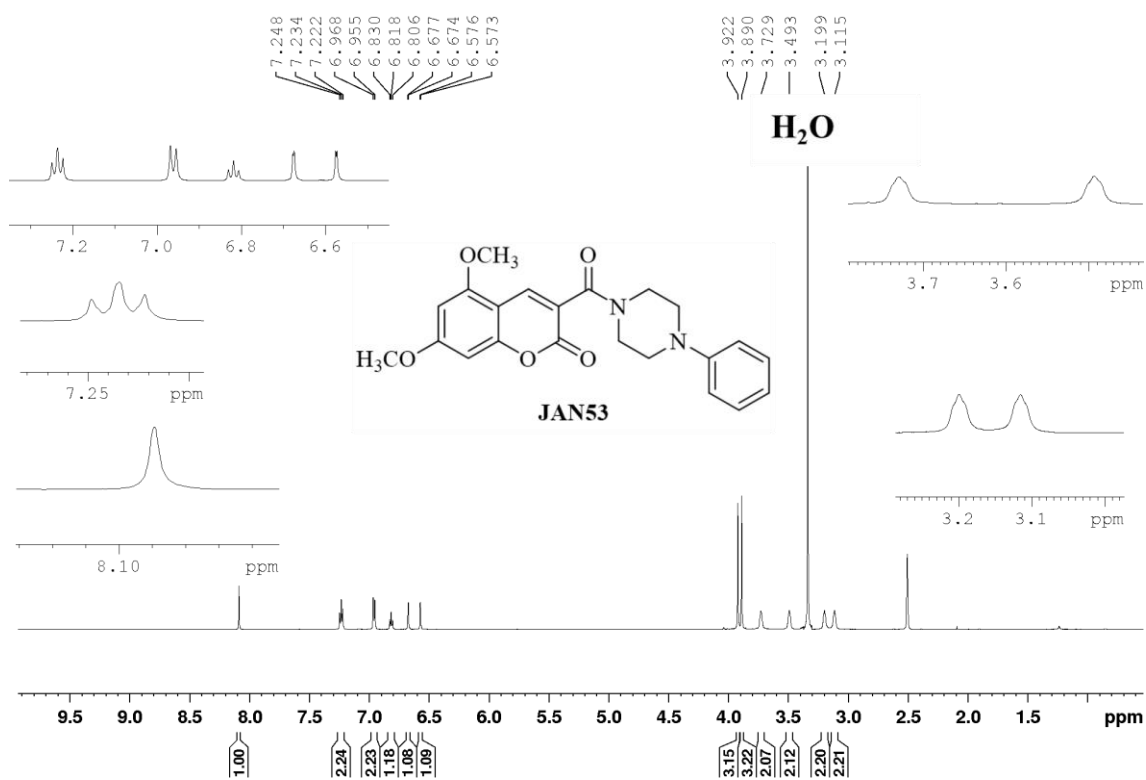
Espectro de RMN de ¹³C *N*-Benzil-5,7-dimetoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN24)



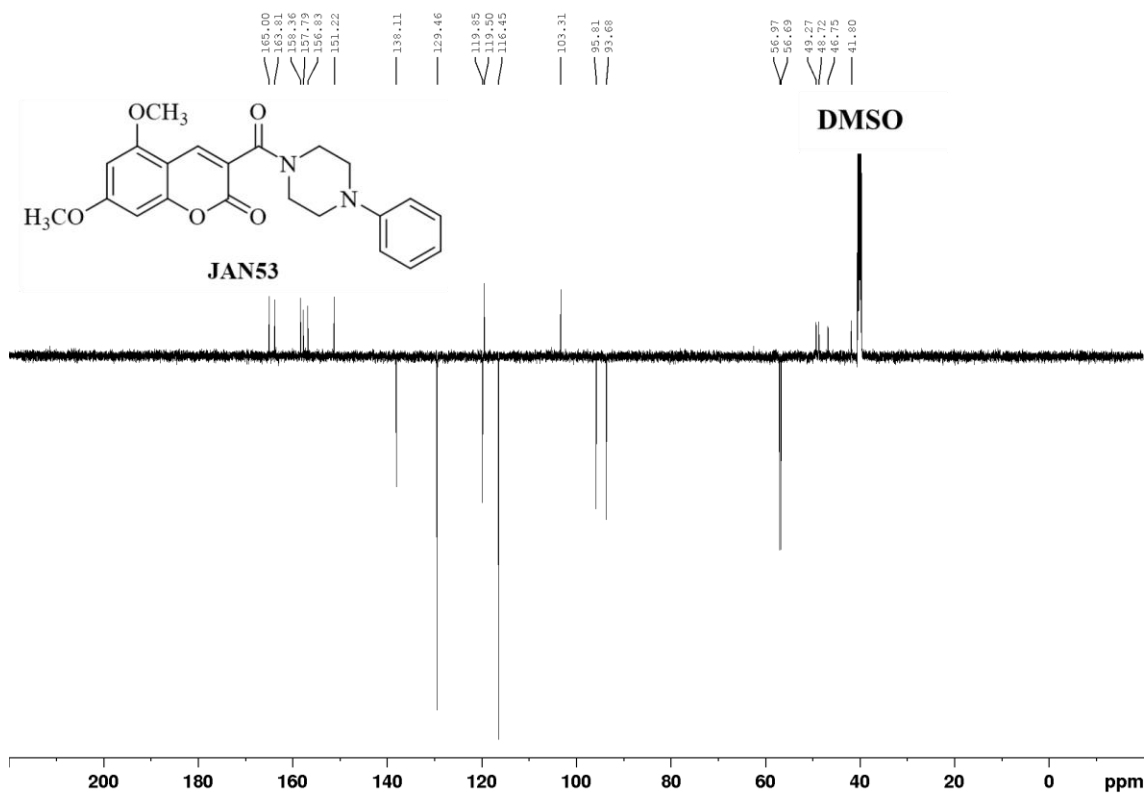
Cromatograma de HPLC do 5,7-Dimetoxi-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona
(JAN53)



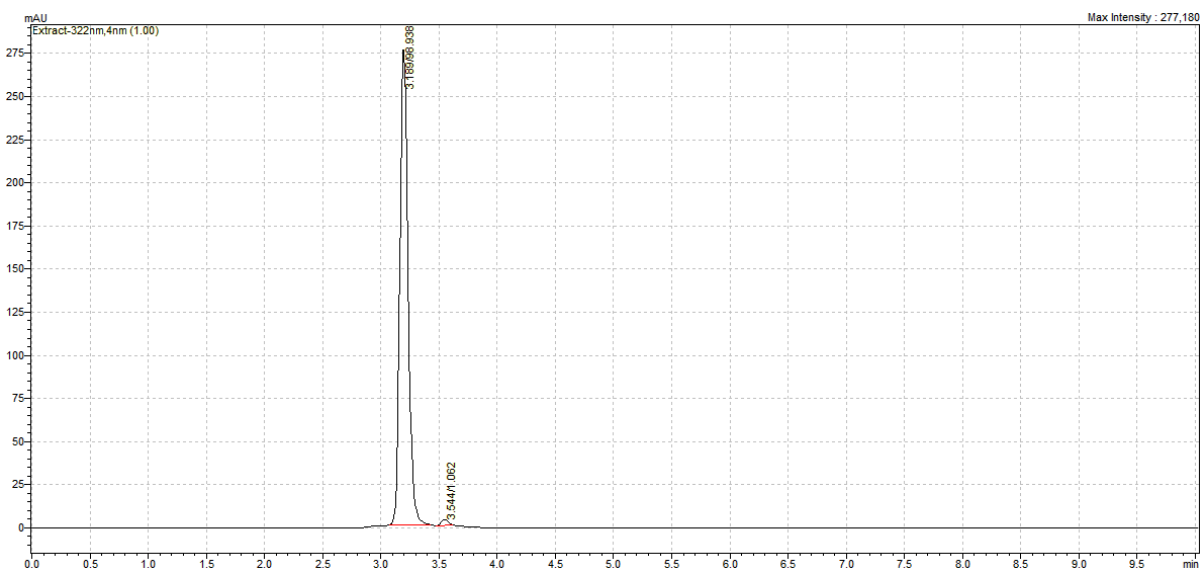
Espectro de RMN de ^1H do 5,7-Dimetoxi-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona
(JAN53)



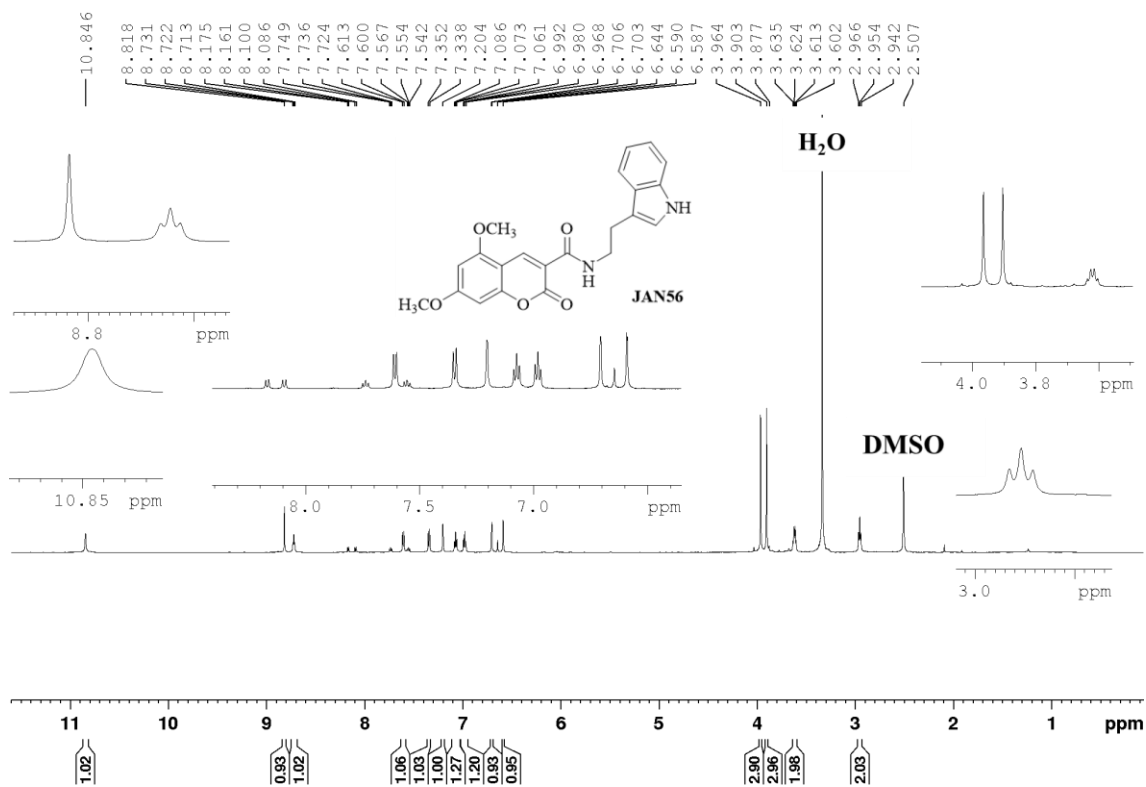
Espectro de RMN de ^{13}C do 5,7-Dimetoxi-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona
(JAN53)



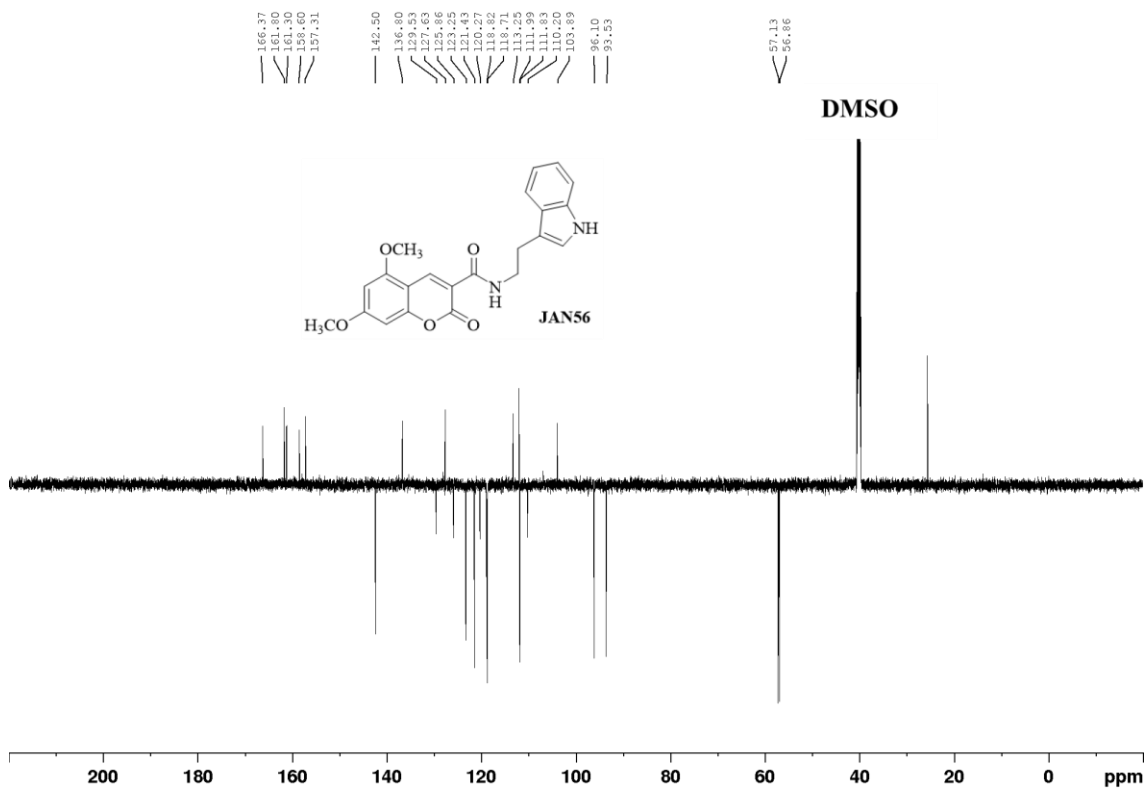
Cromatograma de HPLC de *N*-(2-(1*H*-Indol-3-il)etil)-5,7-dimetoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (**JAN56**)



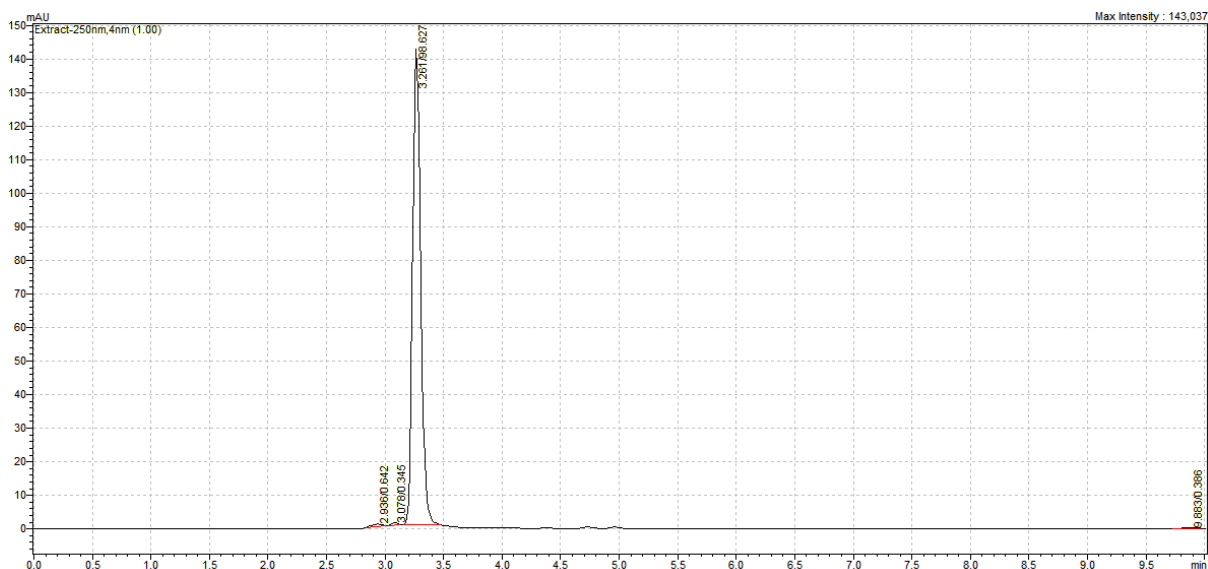
Espectro de RMN de ^1H do *N*-(2-(1*H*-Indol-3-il)etil)-5,7-dimetoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (**JAN56**)



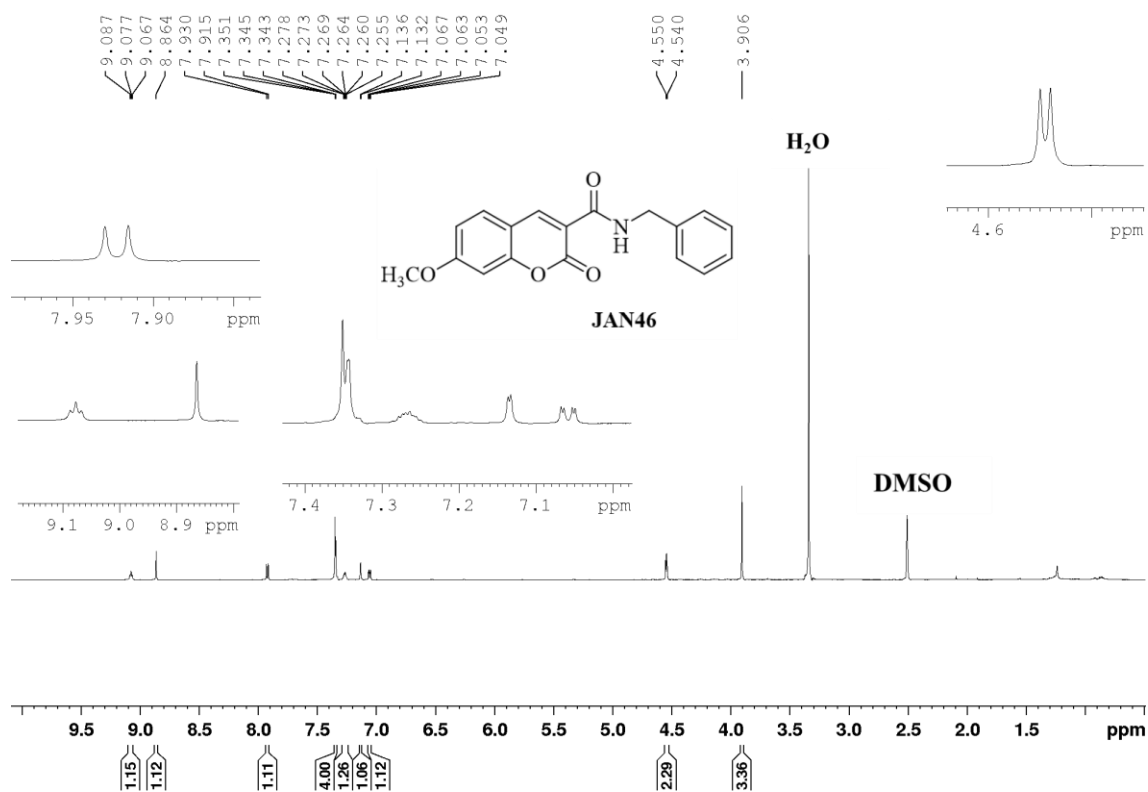
Espectro de RMN de ¹³C do *N*-(2-(1*H*-Indol-3-il)etil)-5,7-dimetoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN56)



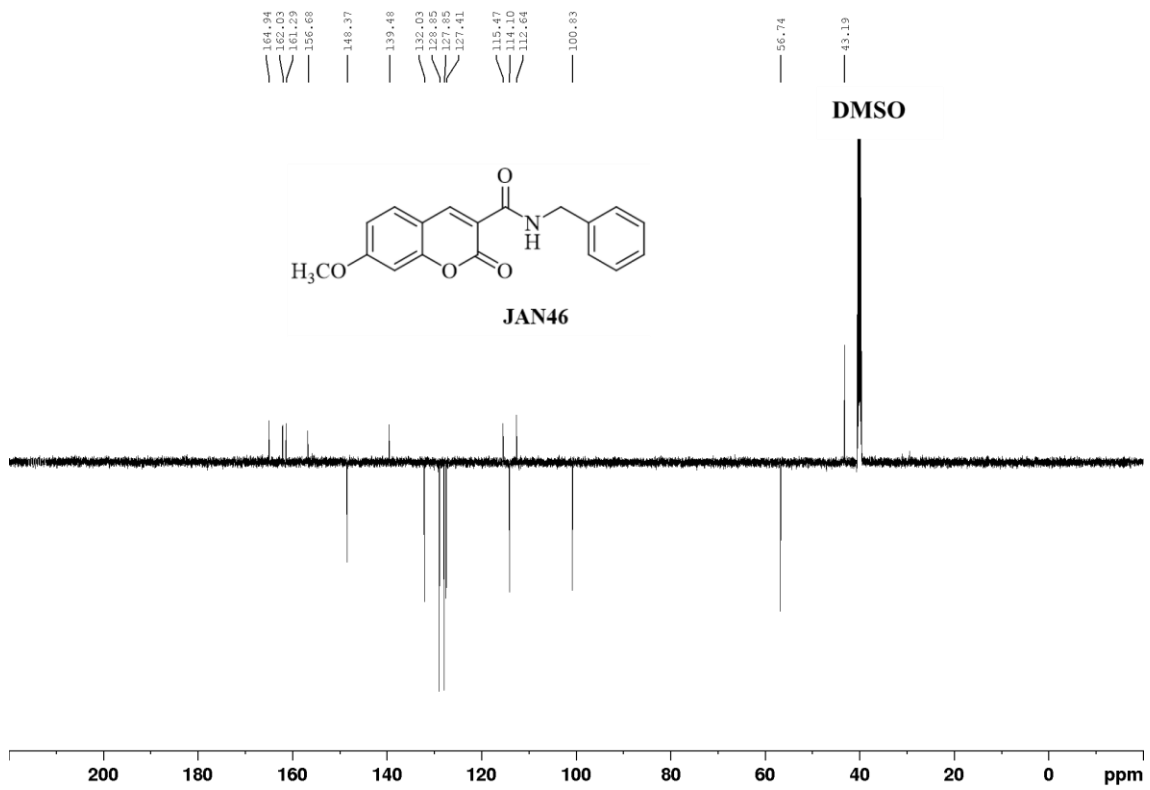
Cromatograma de HPLC do *N*-Benzil-7-metoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN46)



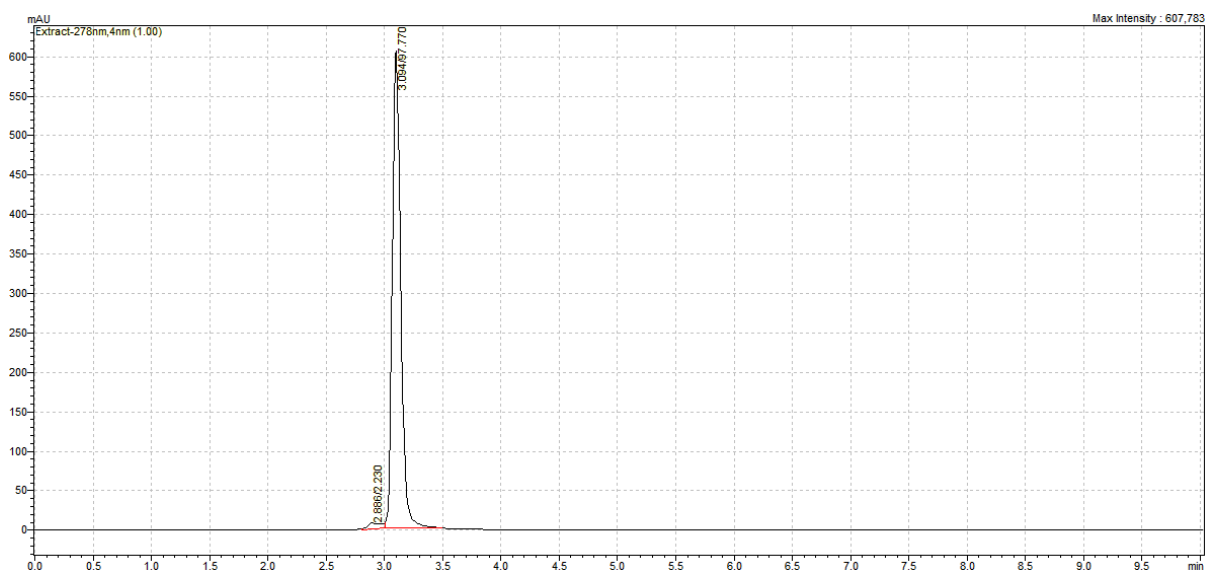
Espectro de RMN de ^1H do *N*-Benzil-7-metoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN46)



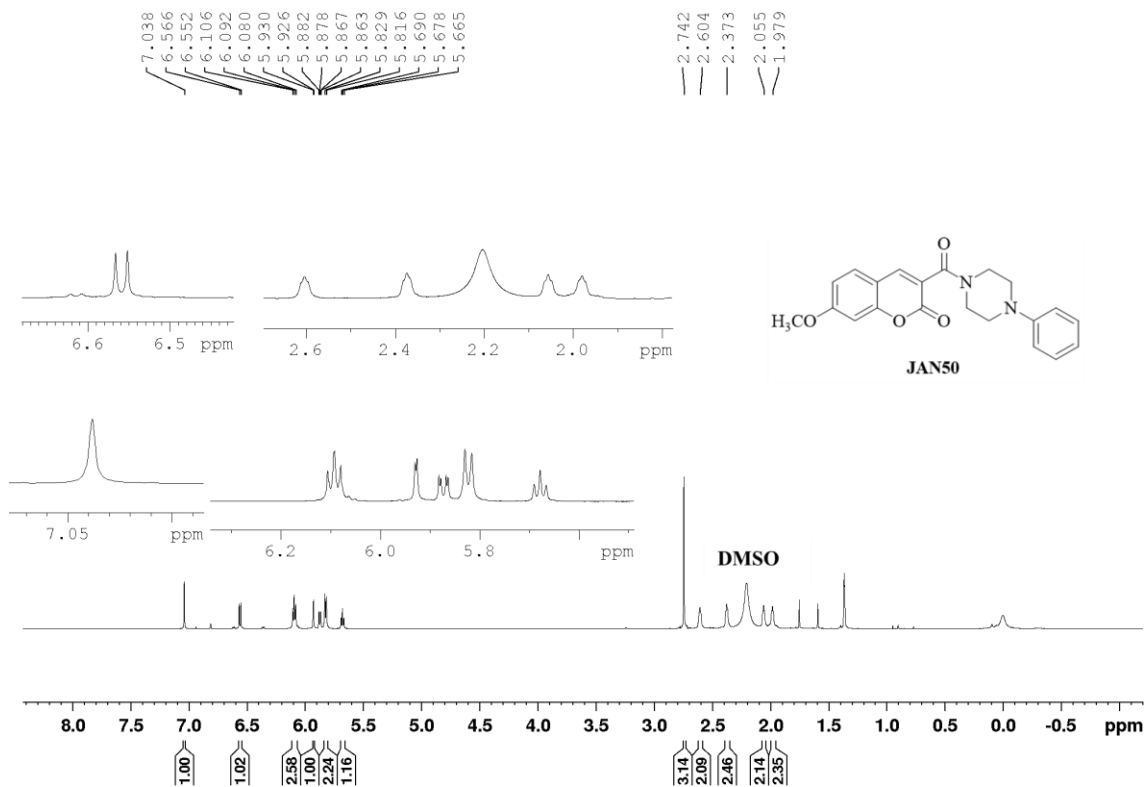
Espectro de RMN de ^{13}C do *N*-Benzil-7-metoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN46)



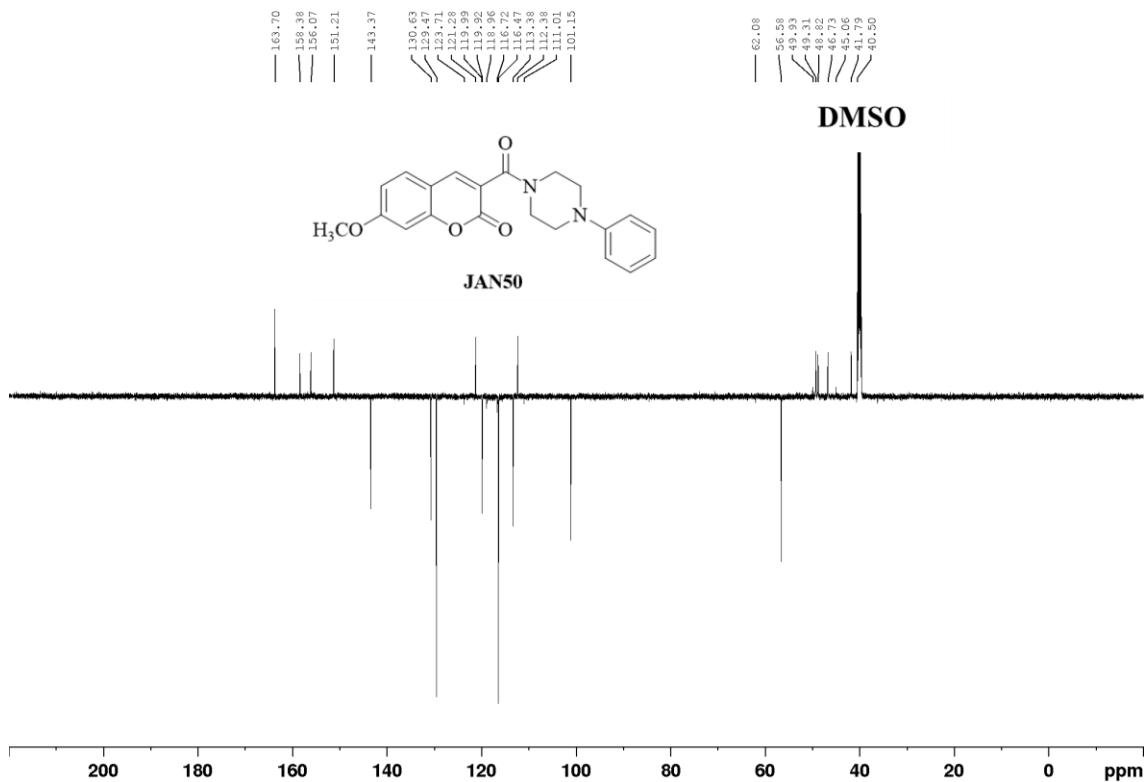
Cromatograma de HPLC do 7-Metoxi-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2*H*-cromen-2-ona
(JAN50)



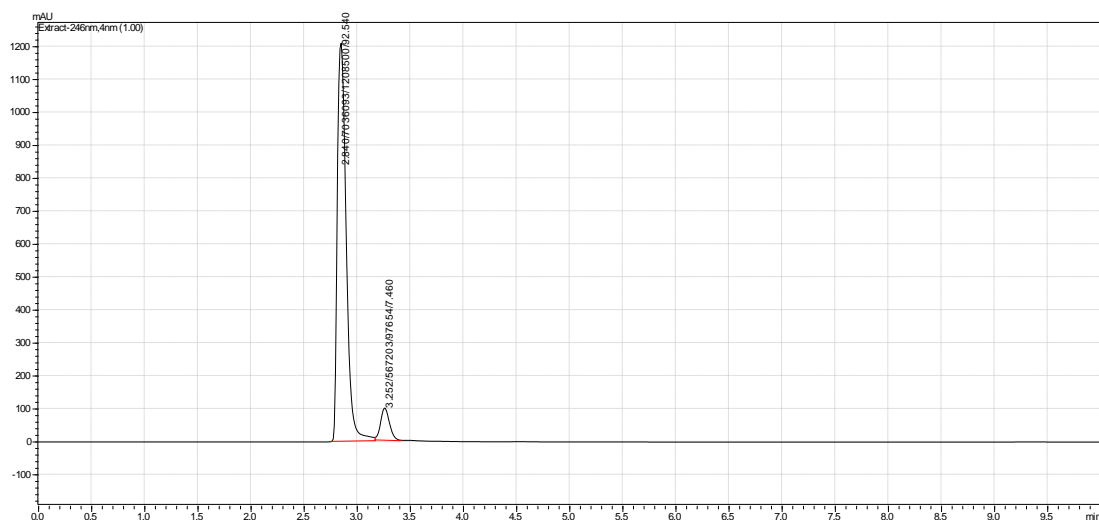
Espectro de RMN de ¹H do 7-Metoxi-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2*H*-cromen-2-ona
(JAN50)



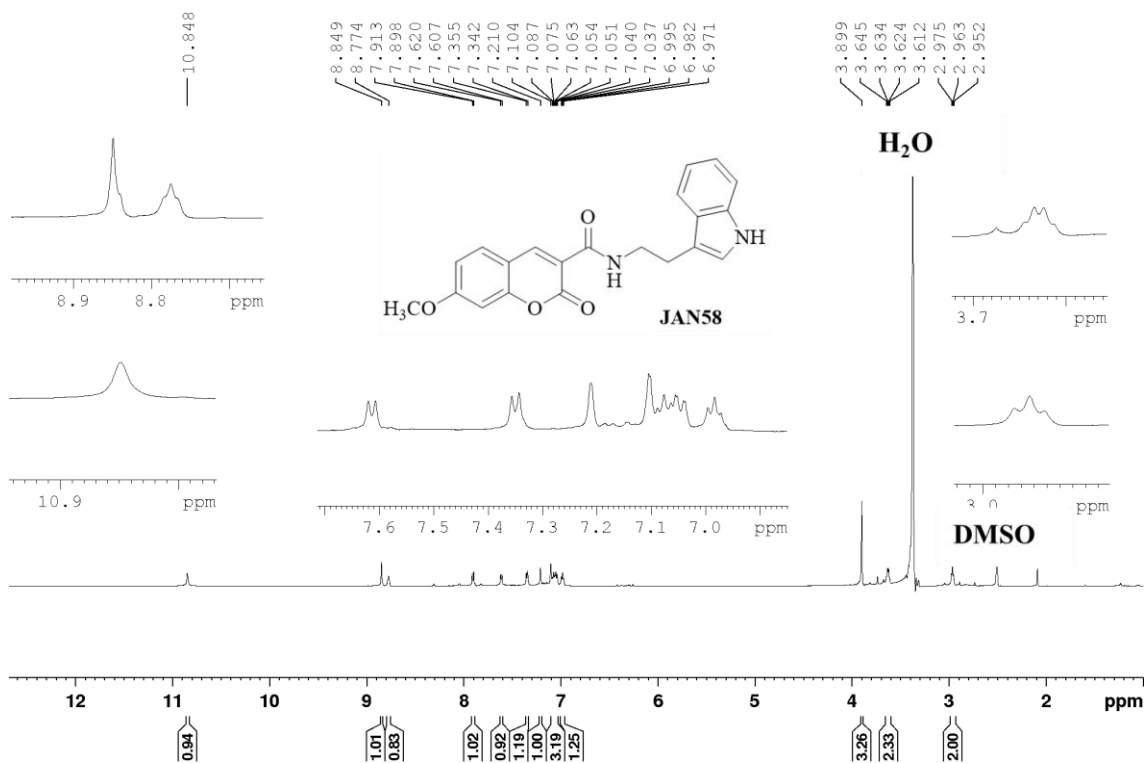
Espectro de RMN de ¹³C do 7-Metoxi-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona
(JAN50)



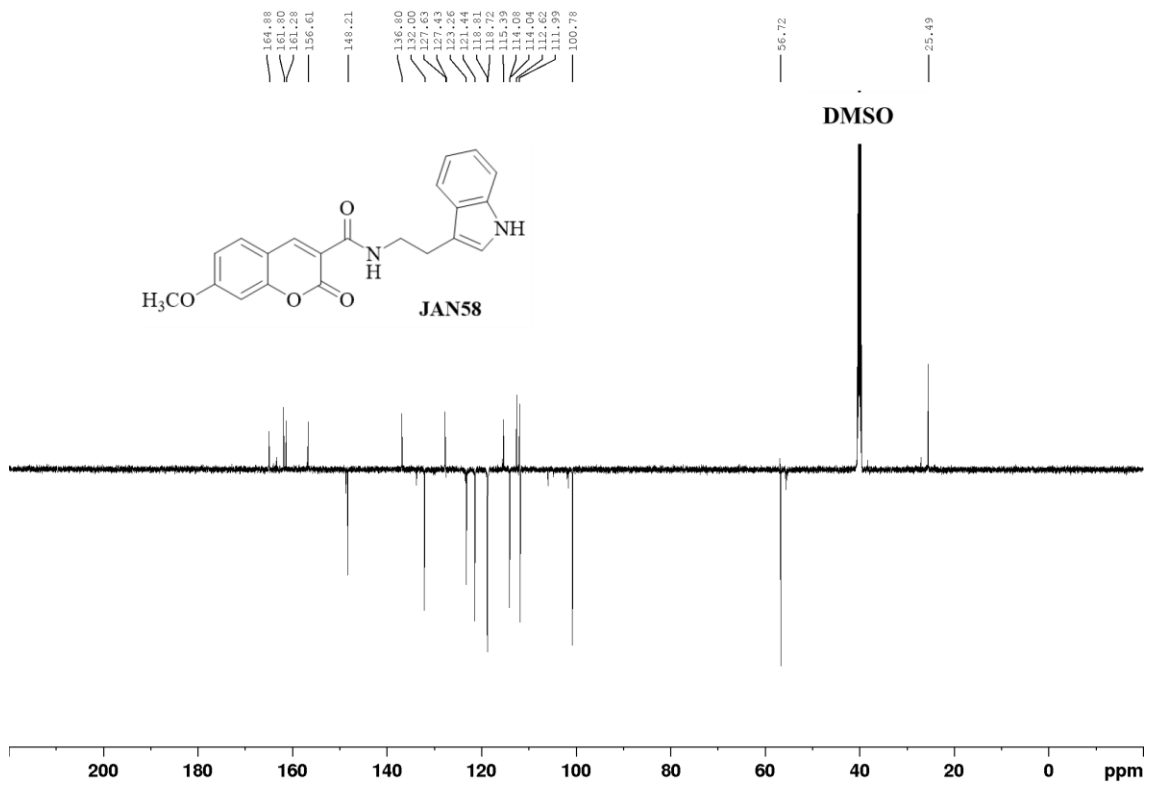
Cromatograma de HPLC do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-7-metoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (**JAN58**)



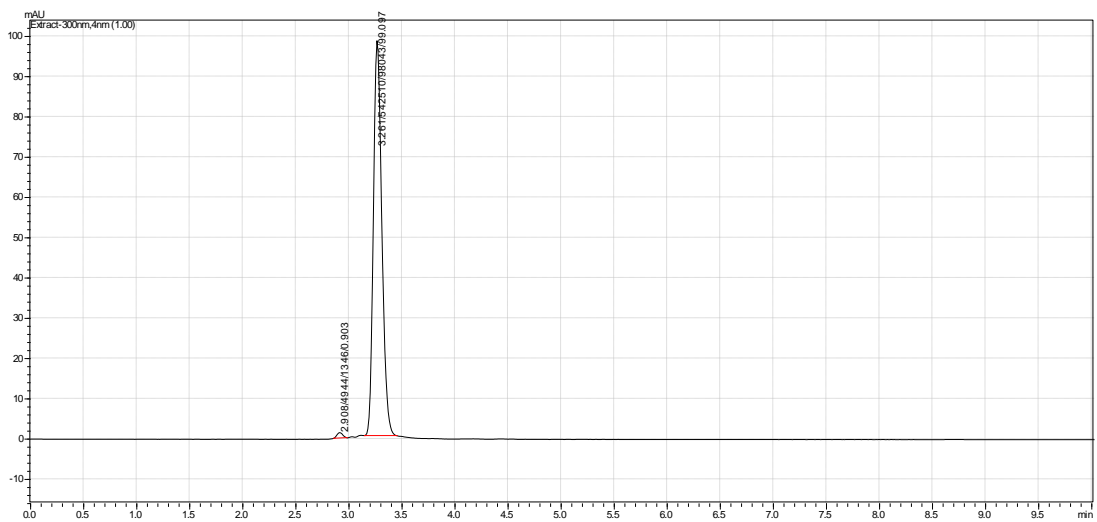
Espectro de RMN de ¹H do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-7-metoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (**JAN58**)



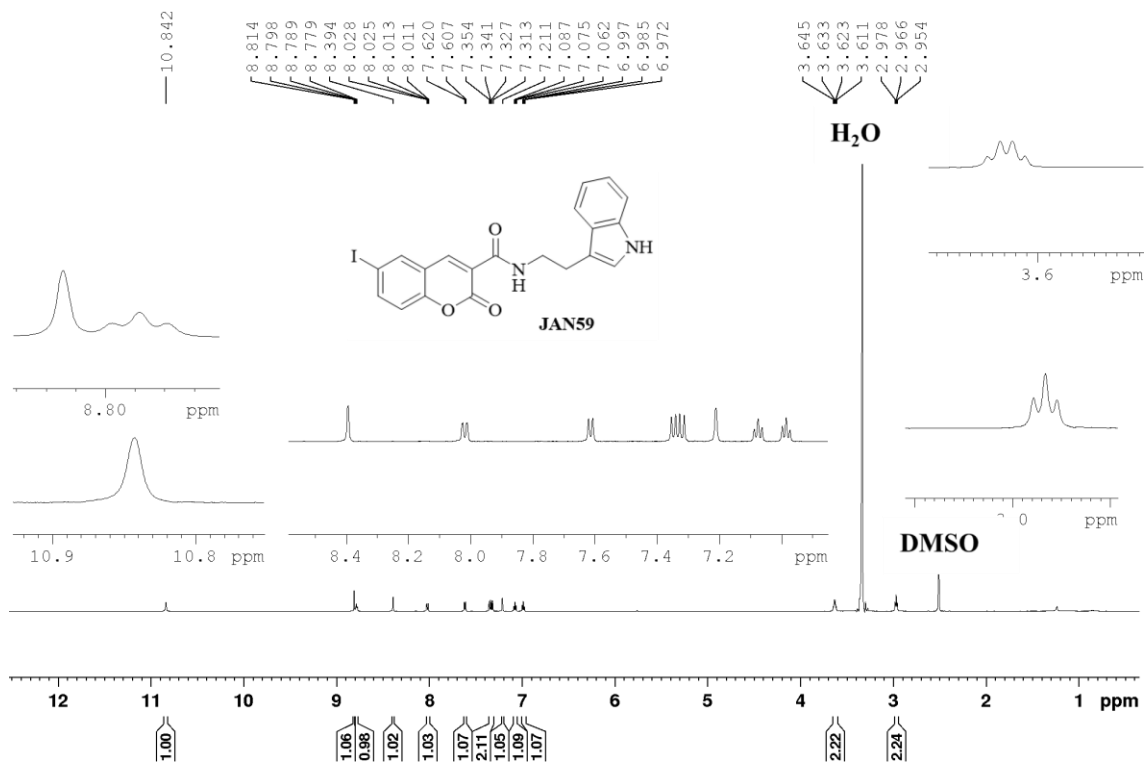
Espectro de RMN de ¹³C do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-7-metoxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (**JAN58**)



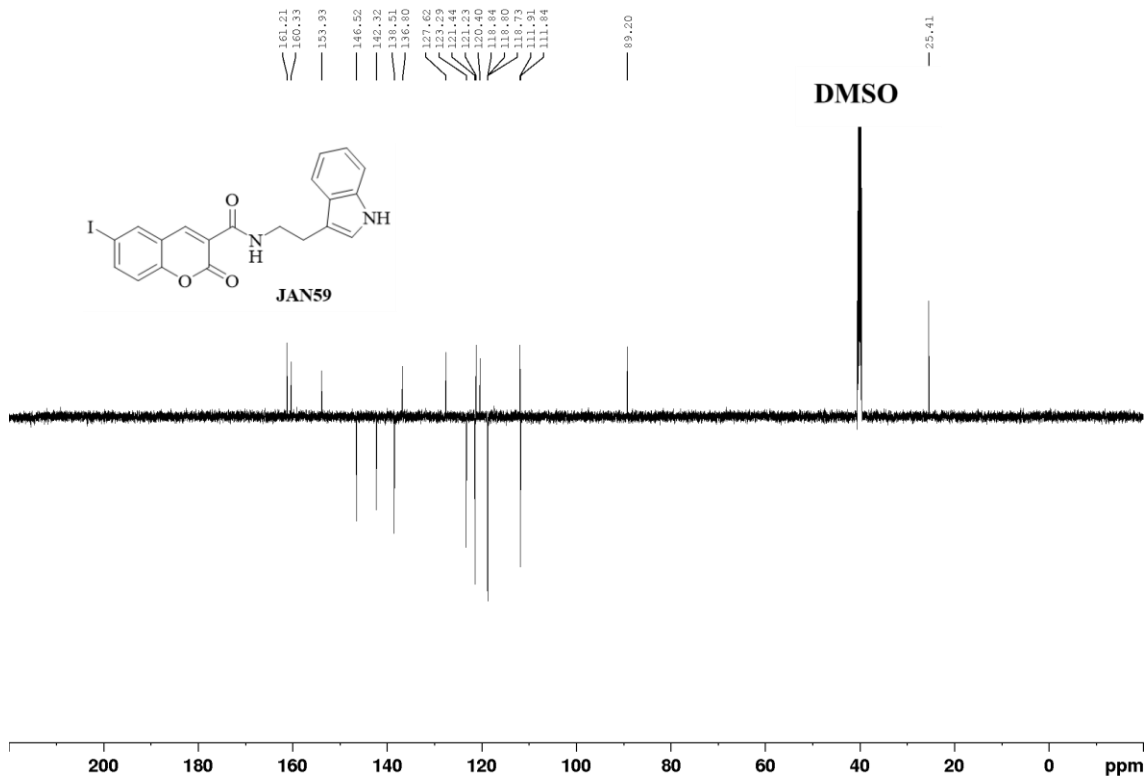
Cromatograma de HPLC do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-iodo-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN59)



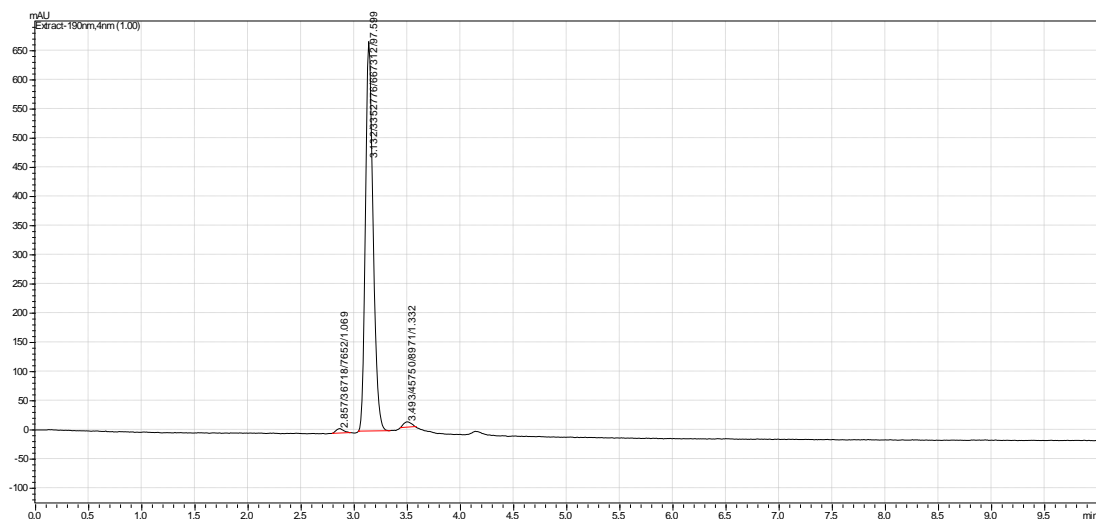
Espectro de RMN de ¹H do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-iodo-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN59)



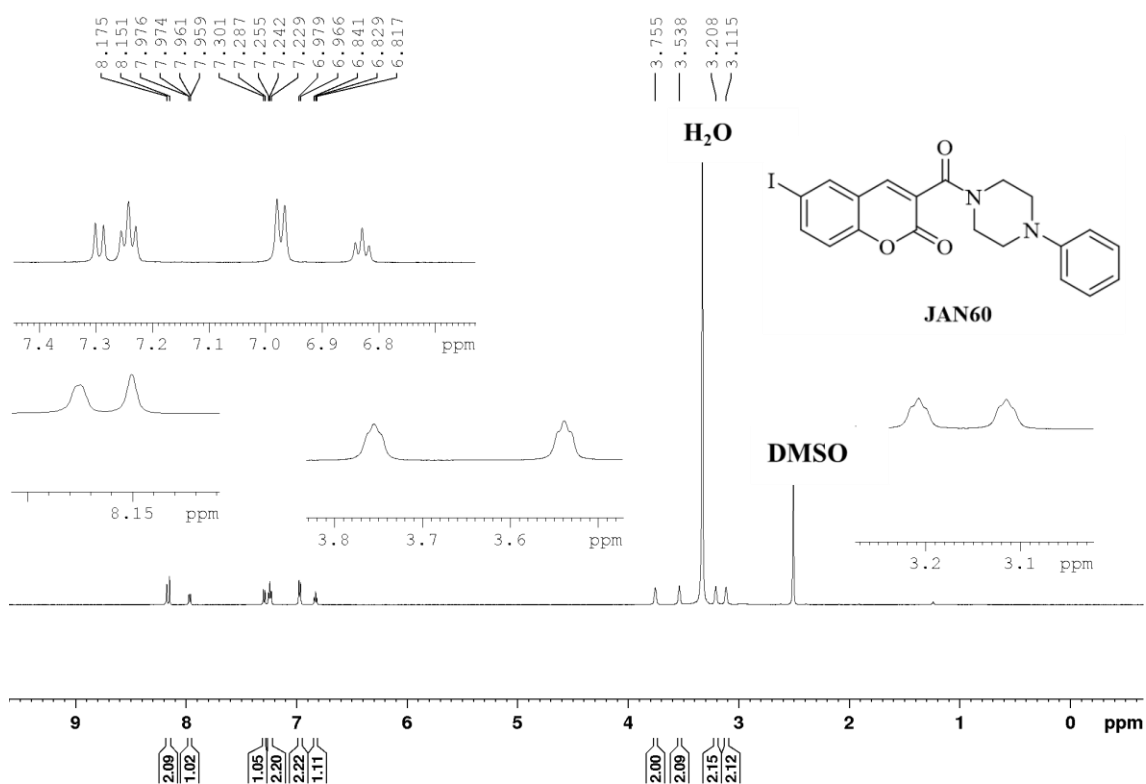
Espectro de RMN de ¹³C do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-iodo-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (JAN59)



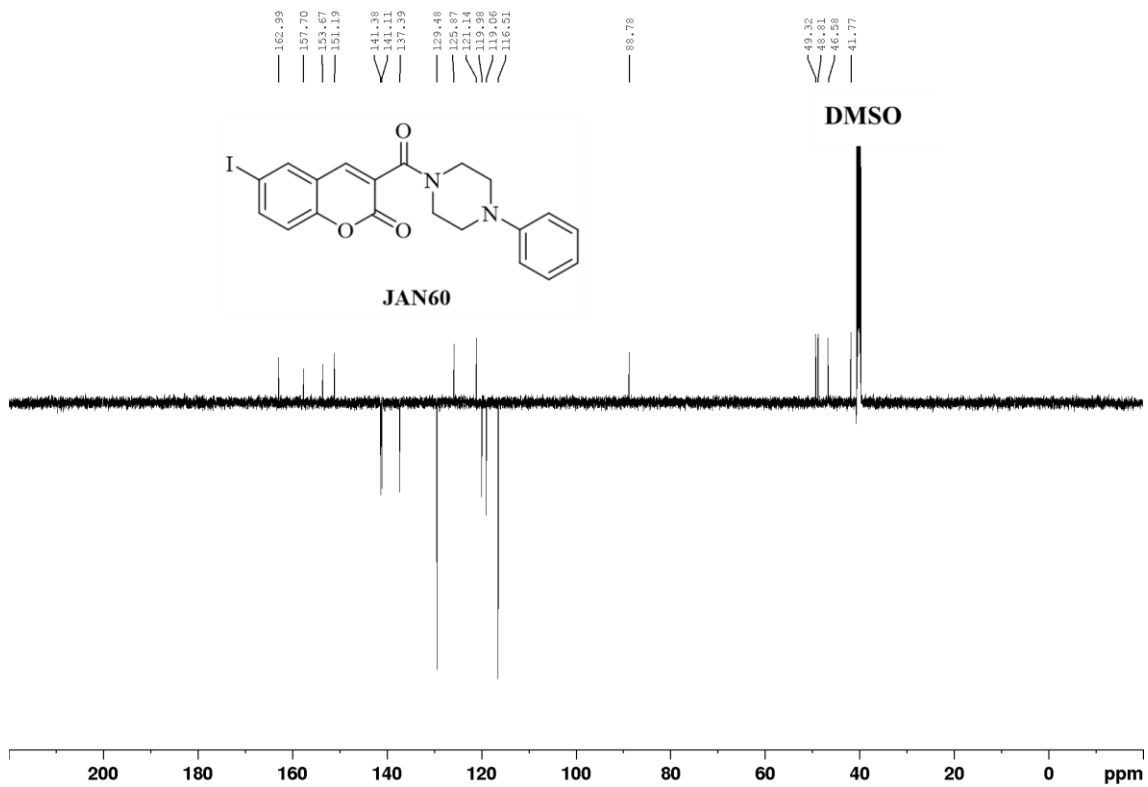
Cromatograma de HPLC do 6-iodo-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2*H*-cromen-2-ona (JAN60)



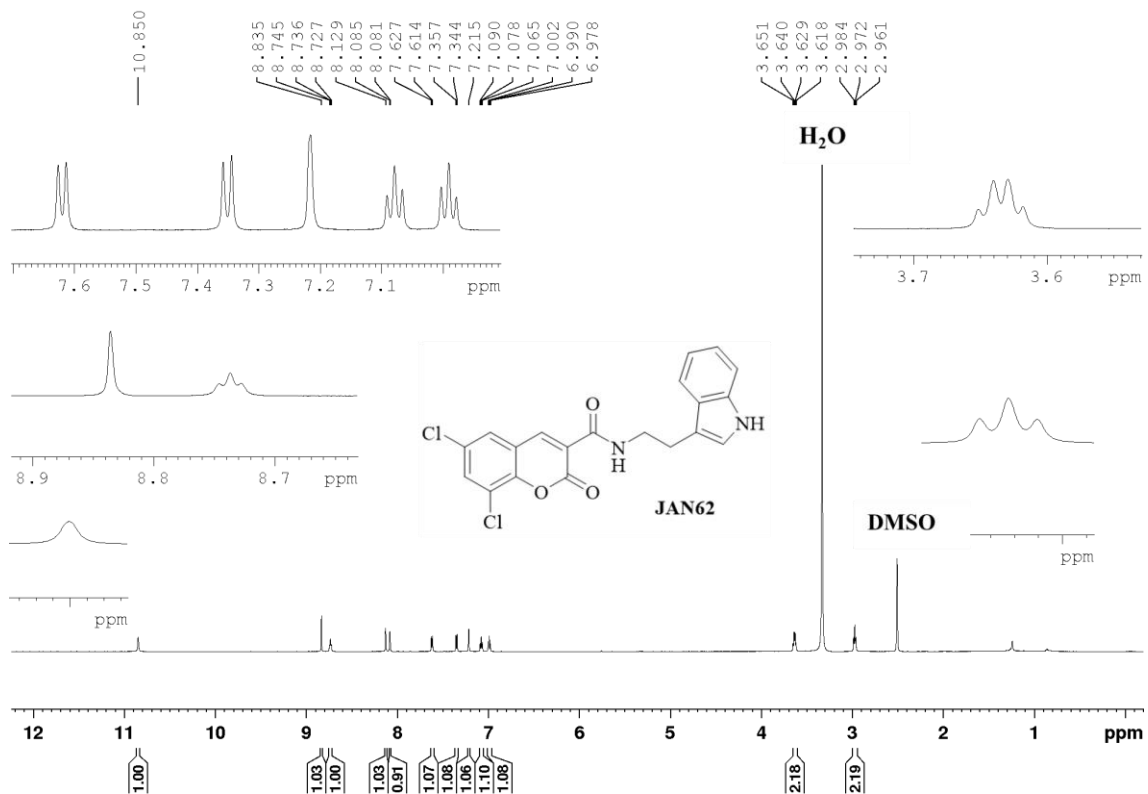
Espectro de RMN de ^1H do 6-iodo-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2*H*-cromen-2-ona (JAN60)



Espectro de RMN de ^{13}C do 6-iodo-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2*H*-cromen-2-ona (JAN60)

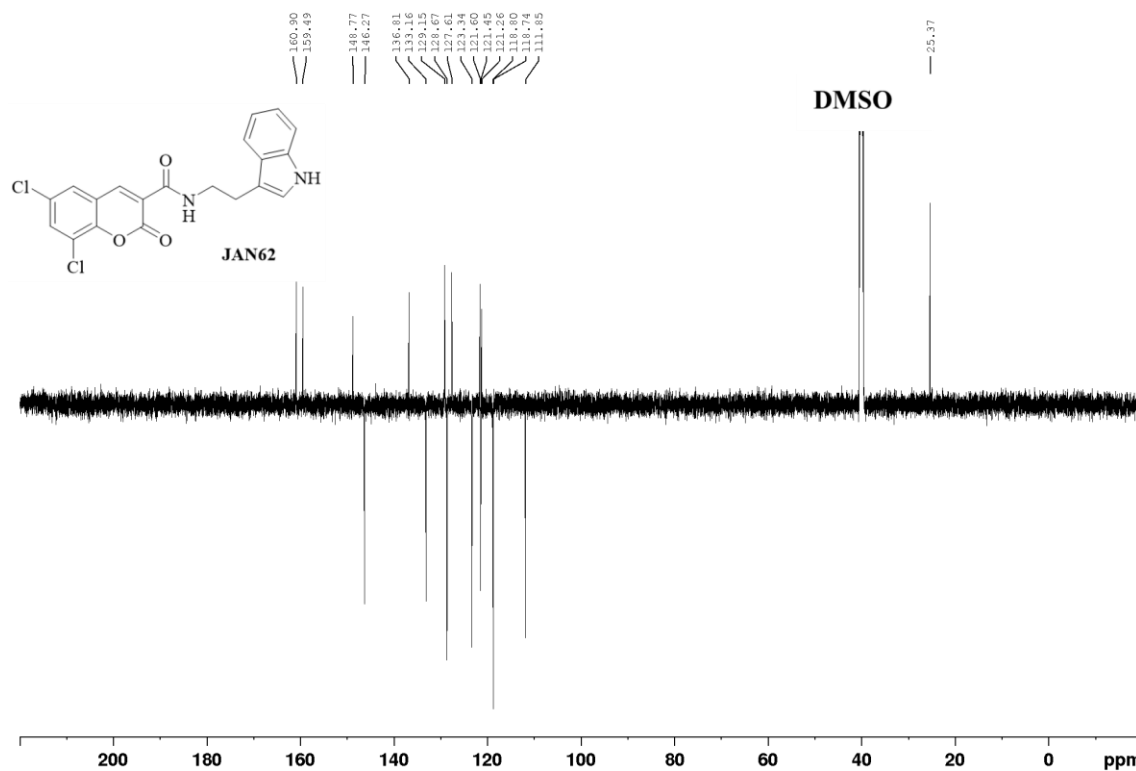


Espectro de RMN de ^1H do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6,8-dicloro-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (**JAN62**)

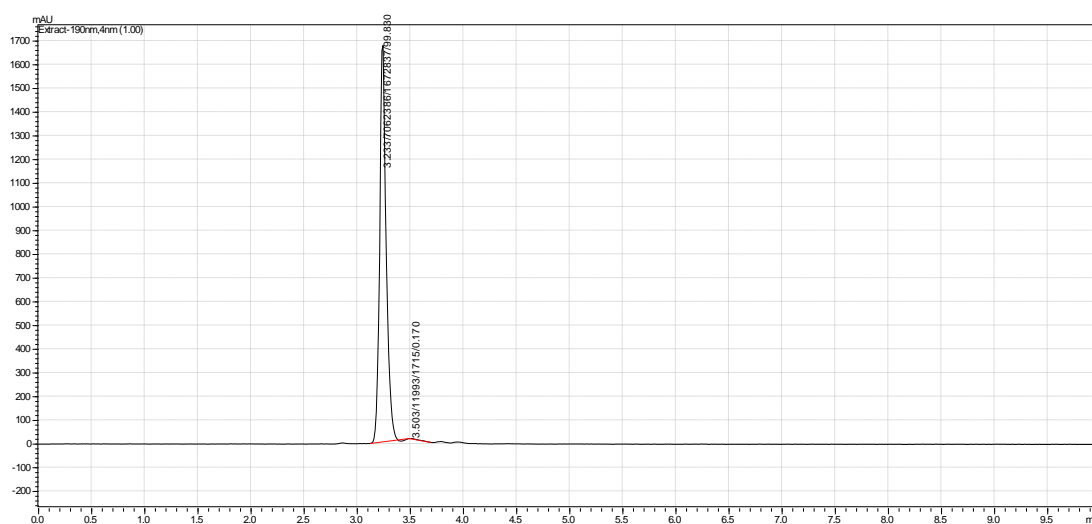


Espectro de RMN de ^{13}C do *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6,8-dicloro-2-oxo-2*H*-cromeno-3-

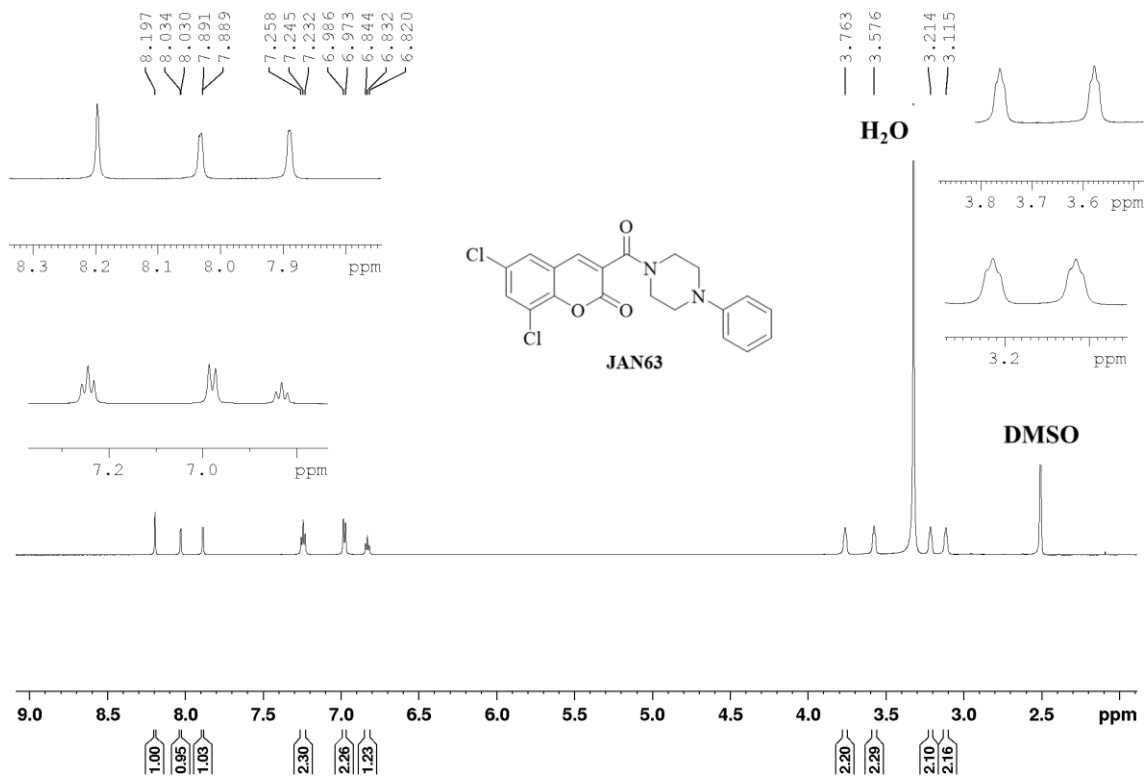
carboxamida (JAN62)



Cromatograma de HPLC do 6,8-dicloro-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN63)



Espectro de RMN de 1H do 6,8-dicloro-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN63)



Espectro de RMN de ¹³C do 6,8-dicloro-3-(4-fenilpiperazina-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona (JAN63)

