

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**ANTICHAGÁSICO POTENCIAL: PLANEJAMENTO E SÍNTSE DE HÍBRIDO
MOLECULAR DE INIBIDOR DA ENZIMAS Fe-SUPERÓXIDO DISMUTASE E CYP51
E COM LIBERADOR DE ÓXIDO NÍTRICO**

Erick Tavares Marcelino Alves

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Orientadora

Profa.Dr(a) Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2023

TCC MODELO 1 – CIENTÍFICO ORIGINAL SUMÁRIO

Pág.

Lista de Abreviaturas	1
RESUMO	2
		3
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO	38
6. REFERÊNCIAS	39

LISTA DE ABREVIATURAS

DC	Doença de Chagas
SBDD	Structure-Based Drug Design
LBDD	Ligand-Based Drug Design
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
HM	Hibridação molecular
MC	Monte Carlo
TS	Tabu Search
SO	Swarm Optimization
AEs	algoritmos evolucionarios

RESUMO

Alves, E. T. M. **ANTICHAGÁSICO POTENCIAL: PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE HÍBRIDO MOLECULAR DE INIBIDOR DA ENZIMAS Fe-SUPERÓXIDO DISMUTASE E CYP51 E COM LIBERADOR DE ÓXIDO NÍTRICO.** 2023. no. f. 42 Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, ano.

Palavras-chave: Planejamento de fármacos; Doença de Chagas; Hibridação molecular.

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, causa a morte de mais de 10 mil pessoas por ano e atinge mais de 7 milhões de pessoas anualmente. Apesar de tal doença ser endêmica em 21 países da América Latina, é bastante negligenciada, tendo apenas 2 fármacos aprovados na terapêutica, o nifurtimox e o benznidazol. Apesar de estes serem bastante eficazes na fase aguda da doença, tais fármacos apresentam vários índices de toxicidade e apenas o último é utilizado no Brasil. Estimulados pela premência de se encontrar novos fármacos antichagásicos, o objetivo deste trabalho é explorar características de liberação de óxido nítrico, inibição da Fe-SOD e CYP51 reportadas em trabalhos anteriores, contendo os grupos acetofenona, piperazina e furoxano. Dessa forma, o projeto em questão consiste no planejamento por hibridação molecular e bioisosterismo, de forma a sintetizar moléculas que atuem de 3 formas diferentes e que possuam potencial antichagásico. Os materiais utilizados consistem em referências usuais de laboratório e softwares de ancoragem molecular (GOLD) e de desenho de estruturas (Chemdraw). Ainda, as metodologias utilizadas consistem em metodologias de síntese como ciclização de anel, esterificação, aminólise, substituição nucleofílica, baseadas em reações similares observadas na literatura. Um dos dois compostos planejados foi obtido com rendimento de 91%. Ademais, diversos tipos de interação pi-stacking e também de hidrogênio foram identificadas por meio de estudo de ancoragem molecular. Um dos compostos foi obtido, com perspectiva de teste *in vitro* de atividade no parasita intracelular. Estudos de dinâmica molecular também devem ser realizados para corroborar os achados da ancoragem.

Abstract

Alves, E. T. M. **DESIGN OF POTENTIAL ANTI-CHAGAS DISEASE: DESIGN AND SYNTHESIS OF MOLECULAR HYBRID OF Fe-SUPERÓXIDO DISMUTASE AND CYP51 INHIBITORS AND WITH NITRIC OXIDE RELEASING GROUP.** 2023. no. f. 42 Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023

Keywords: Drug design; Chagas disease; molecular hybridization.

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, causes the death of more than 10,000 people per year and affects more than 7 million people annually. Although this disease is endemic in 21 countries in Latin America, it is quite neglected, with only 2 drugs approved for therapy, nifurtimox and benznidazole. Although they are quite effective in the acute phase of the disease, these drugs have different levels of toxicity, and only the last one is used in Brazil. Stimulated by the urgency of finding new antichagasic drugs, the objective of this work is to explore characteristics of nitric oxide release, Fe-SOD and CYP51 inhibition reported in previous works, containing the acetophenone, piperazine and furoxane groups. Thus, the project in question consists of planning molecular hybridization and bioisosterism in order to synthesize molecules that act in 3 different ways and that have antichagasic potential. The materials used consisted of usual laboratory bookshelves, molecular docking software (GOLD) and structure design software (Chemdraw). In addition, the methodologies used consist of synthesis methodologies such as ring cyclization, esterification, aminolysis, nucleophilic substitution based on similar reactions observed in the literature. One of the two planned compounds was obtained with a yield of 91% and several types of pi-stacking and also hydrogen interactions were perceived through its molecular docking studies. One of the compounds was obtained, with the perspective of an *in vitro* test of activity in the intracellular parasite, and molecular dynamics studies should also be performed to corroborate the docking findings.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, a partir do contato com fezes do “barbeiro” (*Triatoma infestans*), após a picada do inseto. É uma doença que não atinge somente áreas rurais, mas, também, regiões urbanas, muito em razão de emigração e mobilidade populacional, tanto é que países mais desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá e países da Europa e da Oceania têm apresentado casos da doença. Entre 6 e 7 milhões de pessoas são infectadas pela doença no mundo, sendo mais encontrada em áreas endêmicas de 21 países da América Latina (WHO, 2023; PAHO, 2023). Como o quadro frequentemente é assintomático, muitas pessoas não sabem que têm a doença, podendo levar até um terço das pessoas que contraem a danos cardíacos(DNDI, 2023; PAHO, 2023).

O tratamento padrão para a DC conta, apenas, com benznidazol e nifurtimox. No Brasil, somente o benznidazol faz parte da terapia desta parasitose. Embora sejam medicamentos bastante eficazes, sobretudo na fase aguda da doença, resultam em efeitos adversos significativos. Há algumas controvérsias em relação à efetividade da terapia realizada com esses dois medicamentos em estágios mais crônicos da doença e diversos casos de resistência a nifurtimox foram registrados (MCKERROW et al., 2009).

Vale ressaltar que a doença de Chagas é considerada extremamente negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2023). Poucos países investem na procura de novas soluções para esse problema, em princípio, de populações negligenciadas. Além disso, o tratamento ainda apresenta muitos efeitos adversos (DNDI, 2023). Por essas razões, é necessário o planejamento de novos fármacos para combate à doença.

1.2 Planejamento de fármacos

O planejamento de fármacos consiste em uma área da Química Farmacêutica Medicinal que busca a construção, desenvolvimento e síntese de novos fármacos, envolvendo a multidisciplinaridade com química orgânica, bioquímica, informática e tantas outras áreas.

O planejamento de novos fármacos utiliza-se de diversas estratégias, que podem ser abordadas, dependendo, por exemplo, se há o conhecimento ou não da estrutura do alvo envolvido (BARREIRO; FRAGA, 2009). Se há o conhecimento da estrutura tridimensional do alvo, podemos utilizar a técnica *Structure-based drug design (SBDD)* (GUIDO et al., 2010).

Em situações em que não se conhece a estrutura do alvo, o *Ligand-based drug design (LBDD)* pode ser utilizado, explorando estruturas dos ligantes ativos biologicamente (GUIDO et al., 2010).

Para fazer melhor uso e complementar de tais estratégias, modificações moleculares podem ser efetuadas visando a melhorar propriedades farmacêuticas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Entre os processos de modificação disponíveis, podem-se citar o bioisosterismo e a hibridação molecular (BARREIRO; FRAGA; 2009; SERAFIM, 2016).

1.2.1 Hibridação molecular

A hibridação molecular (HM) é uma estratégia bastante utilizada na Química Farmacêutica medicinal e consiste em unir características estruturais de dois compostos bioativos diferentes, de modo que a estrutura formada poderá apresentar atividade relacionada a uma das estruturas, ou atividades parciais de cada uma delas (BARREIRO; FRAGA, 2009).

Há alguns objetivos que se pode atingir utilizando a hibridação molecular. Dentro deles, podem-se citar o tratamento de doenças heterogêneas complexas, uma vez que fármacos sozinhos não são capazes, muitas vezes, de tratar efetivamente a doença sinergismo de ação dos fármacos em questão, terapia de dupla-ação farmacológica e

até mesmo modulação de efeitos secundários não desejáveis (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007; ARAUJO et al., 2015).

Um dos métodos utilizados para se obter moléculas via hibridação molecular foi proposto por Holland (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007). Neste método, a ideia é unir diferentes características estruturais de dois compostos de modo a construir uma biblioteca considerável de derivados utilizando algoritmos genéticos e estratégias de busca baseadas em modelos Darwinianos.

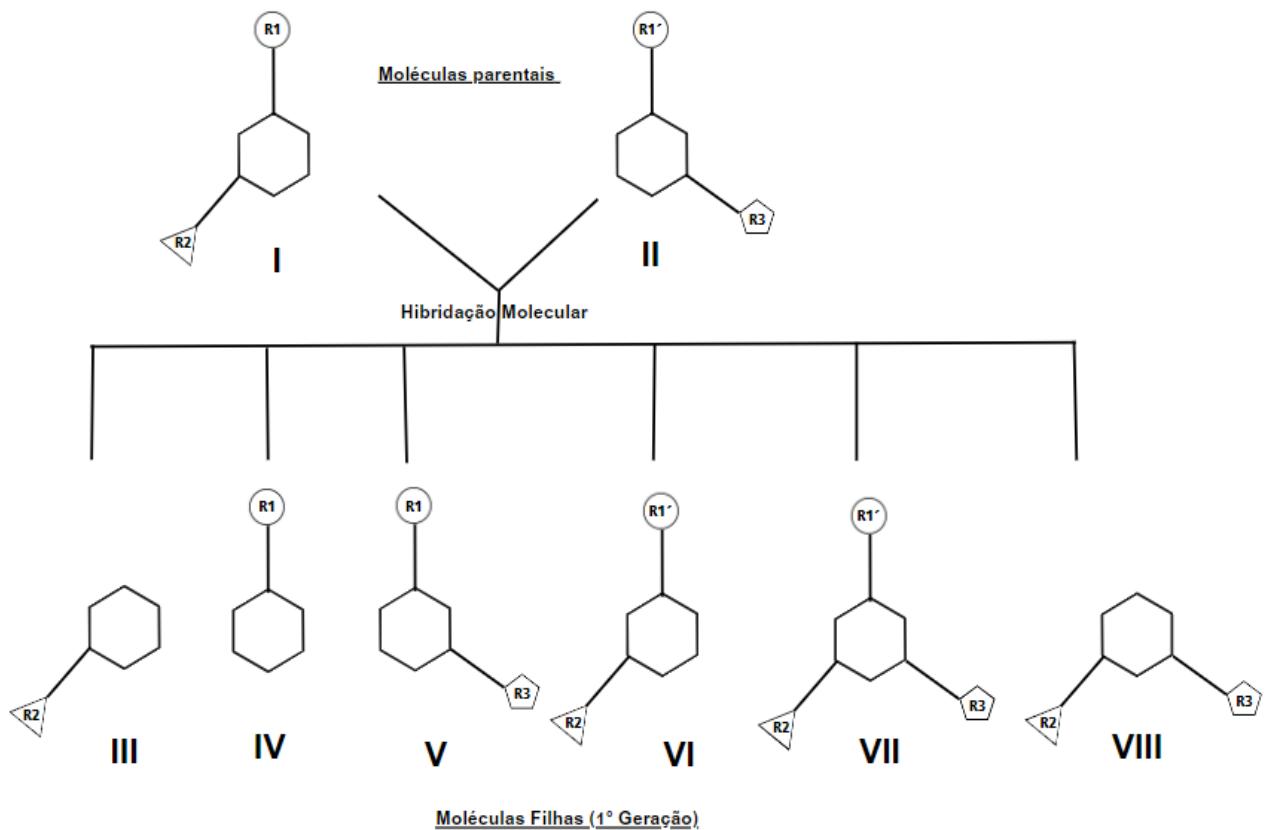


Figura 1. Metodologia de hibridação molecular citada por VIEGAS-JUNIOR et al.(2007).

1.2.2 Bioisosterismo

O termo isosterismo tem origem na Química e consiste em uma junção de termos do grego (isos = igual; steros = volume) e foi cunhado por Langmuir, em 1919 (JAYASHREE et al., 2022). Assim sendo, compostos isósteros são aqueles com propriedades eletrônicas e estéricas similares (MEANWELL, 2011). Partindo da definição anterior, surge o bioisosterismo, que relaciona a química às propriedades biológicas e consiste em substituição de grupos que apresentam volume, forma e propriedades físico-químicas semelhantes, de forma a apresentar melhora nas propriedades biológicas. Sendo assim, utilizar tal propriedade de forma a trocar fragmentos de moléculas por outros que apresentam propriedades semelhantes é uma forma de modificação molecular (BARREIRO, 2022).

Assim sendo, a ideia de mudar fragmentos de modo a não interferir significativamente na atividade biológica beneficia tanto a otimização de líder quanto o descobrimento de novos compostos potencialmente bioativos. Os fatores a serem considerados durante o uso de bioisosterismo são tamanho estérico, forma da molécula, propriedades eletrônicas, como carga e habilidade de formação de ligação de hidrogênio, eletronegatividade, lipofilicidade e flexibilidade (JAYASHREE et al., 2022). A mudança de grupos pode ser importante para melhorar a estabilidade metabólica, simplificar rotas sintéticas e reduzir toxicidade, além de aprimorar a interação com o alvo (JAYASHREE et al., 2022).

Tal técnica é muito usada nos primeiros estágios de busca por novos fármacos, sendo também importante no desenvolvimento de fármacos *me-too* e fármacos órfãos (JAYASHREE et al., 2022), principalmente quando há escassez de informação necessária para se fazer uma análise quantitativa ou então quando há o objetivo de mudar o caminho do planejamento para uma nova série de compostos, sendo que nesse caso pode-se recorrer à QSAR, do inglês Quantitative Structure-Activity Relationships simultaneamente (LIPINSKI, 1986).

1.2.3. Ancoragem Molecular

A ancoragem molecular (*docking*) é um método de análise computacional que busca predizer a conformação e orientação de moléculas em um alvo macromolecular (CHAUDHARY et al., 2016; TORRES et al., 2019). Desta forma, é uma parte relevante da gama de ferramentas utilizadas em *SBDD*, sendo muito importante para a predição de interação de ligantes conhecidos, estimativa de afinidade de ligação em *screening* virtual de bibliotecas, tendo em vista a diminuição do custo de tempo e dinheiro no processo de desenvolvimento de novos fármacos (TORRES et al., 2019; GUEDES et al., 2014). Além disso, o uso de ferramentas de *docking* tem sido essencial na otimização *hit-to-lead*, indicando se análogos planejados poderiam melhorar as interações com o alvo estudado (TORRES et al., 2019).

Unindo, então, esforços decorrentes da relação entre a estrutura química e a atividade biológica e da cristalografia, várias moléculas de ação interessante têm sido descobertas (DE RUYCK et al., 2016).

Diversos algoritmos de buscas podem ser utilizados para realizar *docking*: determinístico, estocástico e sistemático, sendo que o segundo será o mais usado nesse trabalho. O algoritmo de busca estocástico tende a mudar graus de liberdade em cada passo do processo, o que gera uma gama de soluções. Assim, as poses resultantes podem ser avaliadas de acordo com critérios probabilísticos como Monte Carlo(MC), Tabu Search (TS), Swarm optimisation (SO) e algoritmos evolucionários AEs (GUEDES et al., 2014). O programa de *docking* Gold utiliza algoritmos evolucionários, denominados genéticos. Assim sendo, diversas soluções são geradas de forma aleatória. Cada membro equivale a um cromossomo, que contém informação sobre interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre o ligante e o receptor correspondente, além da conformação relativa às ligações do ligante e grupos OH da proteína (alvo). Desta forma, cada cromossomo é associado a um *score* baseado na capacidade preditora de afinidade de cada um e são ranqueados. Assim, a população de cromossomos é subsequentemente otimizada, sendo que em cada passo uma mutação pontual ocorre em um cromossomo ou dois se cruzam para gerar um novo.

Por fim, a seleção dos cromossomos parentais é endereçada para os membros com melhores *scores* no final (JONES et al., 1997).

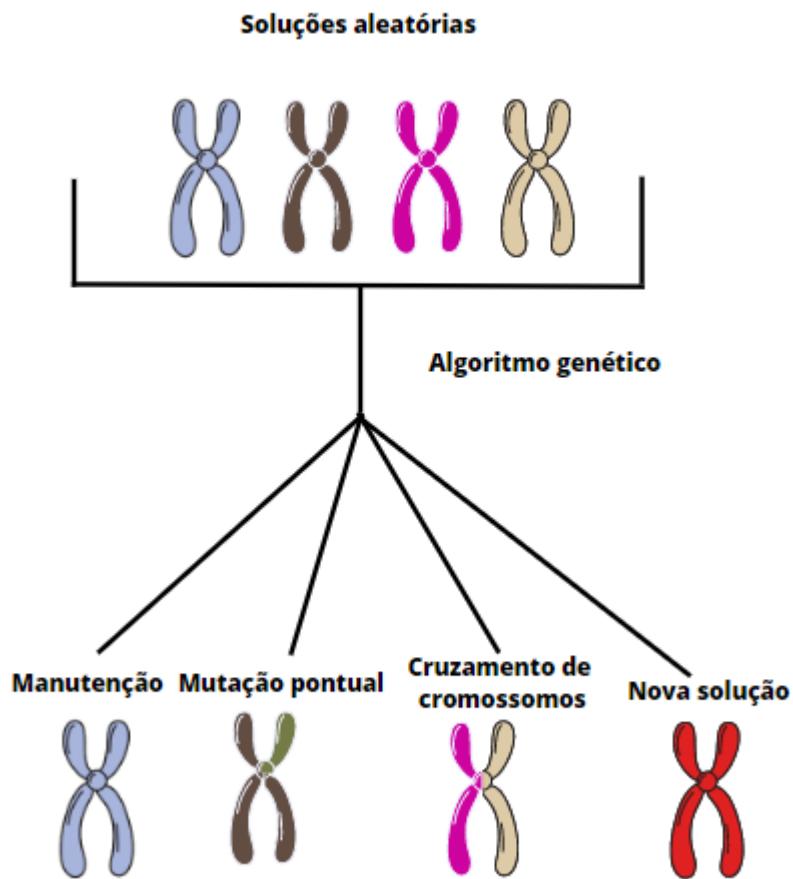


Figura 2. Ilustração do funcionamento do algoritmo genético (JONES et al., 1997).

1.3. Quimioterápicos em estudo

1.3.1. Liberadores de óxido nítrico

O óxido nítrico, para seres humanos, é uma molécula que regula diversos processos biológicos, atuando como mensageiro intracelular, autacóide, substância paracrína, hormônio e neurotransmissor (SERAFIM et al., 2012). Em relação a organismos parasitários, tal substância pode exercer efeitos citostáticos e citotóxicos.

Assim, visando a explorar esse potencial, é interessante que haja estudos mais aprofundados com o óxido nítrico e seus compostos liberadores (SERAFIM et al., 2016).

Além disso, tendo em vista que diversas patologias acabam ocorrendo com o envolvimento de mais de uma via bioquímica, é extremamente importante o uso de mecanismos farmacodinâmicos complementares. Assim, considera-se interessante a composição de híbridos moleculares contendo um grupo liberador de óxido nítrico e uma subunidade farmacológica diferente (SERAFIM et al., 2012; BURGAUD et al., 2006).

Um dos mais importantes grupos moleculares libertadores de óxido nítrico usados na terapêutica é o furoxano (SERAFIM et al., 2016; ARIAS et al., 2017; SCARIM et al., 2019). Com base nessa atividade, em nosso laboratório (LAPEN:Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos contra Doenças Negligenciadas), o derivado *N*-acilidrazônico (Figura 1) contendo o furoxano, grupo liberador de óxido nítrico, apresentou um índice maior de seletividade, se comparado ao benznidazol (IS=26 e 18, respectivamente), além de apresentar ação contra a forma amastigota do parasita (SERAFIM et al., 2016).

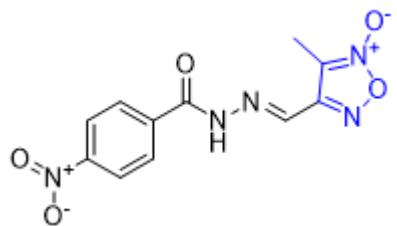


Figura 3: Derivado *N*-acilidrazônico contendo furoxano (SERAFIM et al., 2016).

Além disso, compostos que contêm benzofuroxano têm sido estudados como antimicrobianos, antiparasitários e antitumorais (PETRY et al., 2021). O mecanismo de ação de compostos com benzofuroxanos envolve sua respectiva redução para espécies radicalares em ambientes biológicos (OLEA-AZAR et al., 2003).

Em um estudo realizado por Jorge et al. (2012) sintetizaram-se diversos compostos contendo o benzofuroxano, que se mostraram menos genotóxicos do que

o benznidazol, usado como composto de referência.

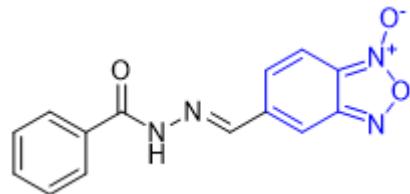


Figura 4: Derivado *N*-(benzofuroxan-5-il)methileno benzidrazida contendo benzofuroxano (JORGE et al., 2012).

1.3.2. Inibidores de Fe-superóxido dismutase (Fe-SOD)

As superóxido dismutase são metaloenzimas conservadas que, de maneira geral, protegem os organismos de substâncias reativas de oxigênio. A Fe-superóxido dismutase, especificamente, é uma enzima presente nos tripanossomas exclusivamente, estando, portanto, ausente em células eucariotas. Sua função é a de eliminar espécies reativas de oxigênio, permitindo ao *Trypanosoma* proteção contra o estresse oxidativo (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2018).

Duas isoformas da Fe-SOD (citosólica e mitocondrial) foram investigadas como alvos para descoberta de novos fármacos (BELTRAN-HORTELANO et al., 2017).

O derivado arilaminocetona (Figura 2) é um dos compostos explorados como potencial inibidor de Fe-SOD, tendo, assim, uma atividade antiparasitária importante, assim como alta seletividade ($IC_{50} = 0,60 \mu M$; SI = 88,7), devido à presença dos grupos ilustrados a partir de *docking* (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2018). Em estudo de *docking* realizado com a enzima Fe-SOD mostrou-se que os grupos carbonila, amina cíclica e fenila interagiam de maneira similar em todos os compostos estudados: o anel fenílico realiza interações do tipo empilhamento π com a Phe123 e as aminas cíclicas se ligam nas proximidades de Glu66 (MARTÍN-ESCOLANO et al, 2018).

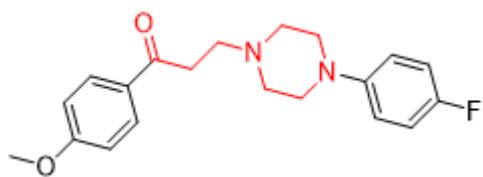


Figura 5: Derivado arilaminocetona com grupo piperazina.

1.3.3 Inibidores da CYP51

A enzimas esterol 14 α -desmetilases (CYP51s) catalisam uma reação estereosseletiva, em três passos, consistindo na remoção do grupo metila na posição 14 α de um ou mais precursores de esterol como o lanosterol (LEPESHEVA et al., 2012).

Muitos antifúngicos têm sido validados e utilizados com esse princípio, a exemplo do fluconazol e itraconazol que, como azois, interagem com o grupo heme da enzima 14 α -esterol desmetilase presente no complexo enzimático do citocromo P450 (SILVA, 2014).

A efetividade de tais fármacos em destruir parasitas decorre das propriedades farmacocinéticas, incluindo alto tempo de meia-vida e volume de distribuição de tais fármacos. Além disso, é importante levar em consideração as diferenças estruturais da cyp51 humana daquela do parasita, na tentativa de melhoria de efetividade e de seletividade de potenciais fármacos que tenham tal mecanismo de ação contra parasitas intracelulares (McKERROW et al., 2009).

Um grupo importante para o estudo em questão é um derivado alquil-1,2,4-triazol com o grupo 2,4-difluorofenil (*Figura 3*), apresentando inibição próxima à relacionada ao benznidazol e alto índice de seletividade, em relação à célula parasitária (EC 50 = 5,53 μ M; SI > 36) (SILVA et al., 2016).

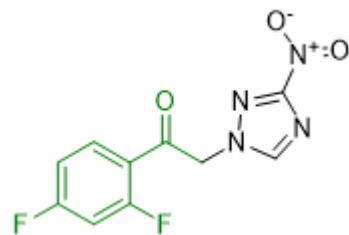


Figura 6: Derivado alquil-1,2,4-triazol com o grupo 2,4-difluorofenila.

2. OBJETIVOS

Nos últimos anos, têm se buscado cada vez mais alvos e mecanismos de ação diferentes para o planejamento de antichagásicos. Dentre esses, encontram-se a liberação de óxido nítrico (SERAFIM, 2016; MACE, 2015), inibição da CYP51 (SILVA, 2014) e inibição da Ferro-superóxido dismutase (MARTIN-ESCOLANO et al., 2018). Dessa forma, este projeto visa, a partir de hibridação molecular e bioisosteriso (KABIR, MUTH, 2022).

Além disso, realizaram-se, também, estudos de modelagem molecular para melhor entendimento de predição de poses relacionados aos compostos sintetizados e a enzima CYP51. Embora seja extremamente necessário realizar ensaios com o cinetoplastídeo, demonstrando que os compostos em questão têm atividade, o complemento do projeto a partir do *docking* é interessante para modificações futuras das moléculas em conjunto com atividade *in vitro*, podendo levar a possíveis mudanças estruturais.

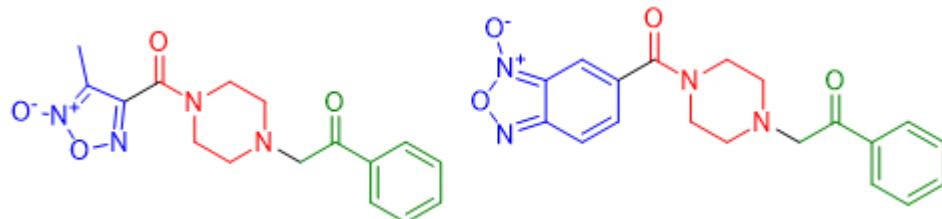


Figura 7. Dois compostos híbridos moleculares planejados para o projeto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese

3.1.1. Material

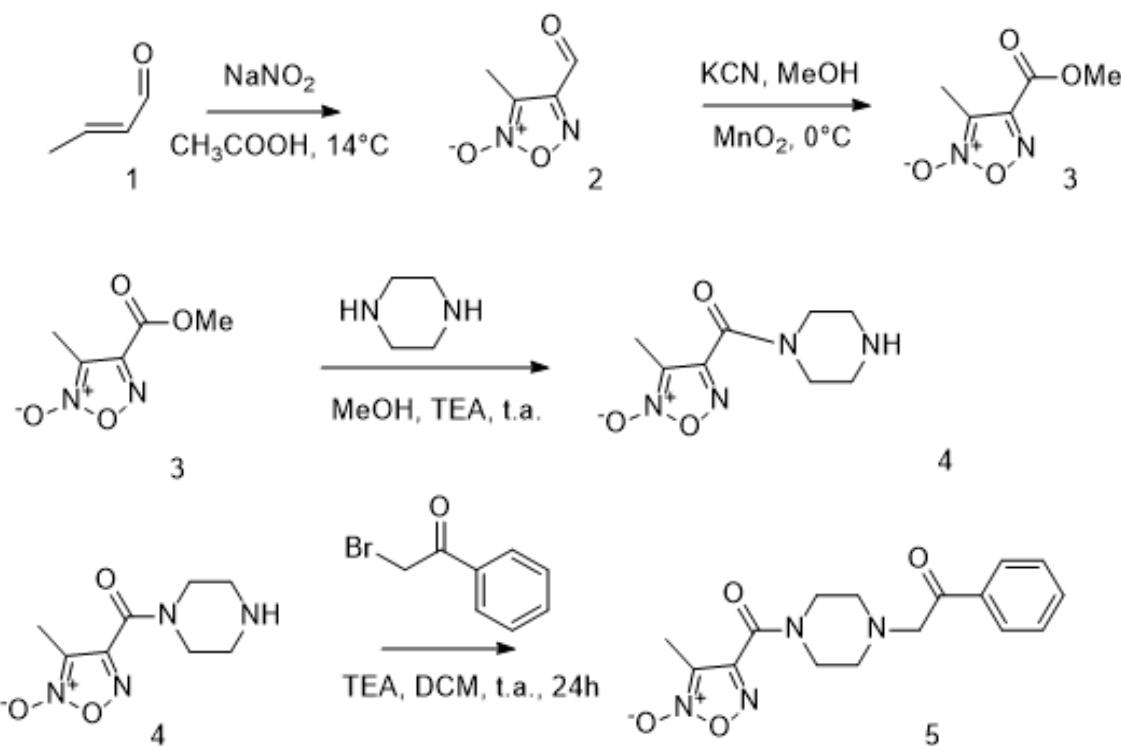
Reagentes e solventes: nitrito de sódio, crotonaldeído, ácido acético glacial, diclorometano, trietilamina, metanol, 3-cloro-4-nitro-benzaldeído, dimetilsulfóxido. Vídraria comum em laboratório de síntese orgânica.

Equipamentos: agitadores, rotaevaporador, bombas de vácuo e equipamentos para análise espectrométrica de RMN.

Cromatografia: em camada delgada, placas de sílica-gel e câmara de UV; em

coluna *flash*, Isolera Biotage.

3.1.2. Métodos



Esquema 1: rota sintética, composto 5.

3.1.2.1. Síntese do 3-metil-4-furoxanocarbaldeído (2)

Após pesar 34,3657 g de NaNO_2 (0,498 mol), dissolveu-se o sal em um bêquer contendo 120 mL de água destilada. Em solução de crotonaldeído (11,8 mL, 0,14 mmol) em ácido acético glacial (20 mL), sob agitação a 14°C , adicionou-se, vagarosamente, $\text{NaNO}_{2(\text{aq})}$. Em seguida, manteve-se o sistema por agitação à temperatura ambiente por 1 hora (FRUTTERO, 1986). Diluiu-se, então, o meio reacional com 200 mL de água destilada. Extraiu-se 3 vezes com diclorometano e, em seguida, lavou-se com *brine*, salmoura ($\text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$). O material resultante foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando diclorometano/metanol como sistema eluente. Dessa forma, obteve-se um sólido amarelado, com 15% de rendimento.

3.1.2.2. Síntese do 4-(metoxicarbonil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (3)

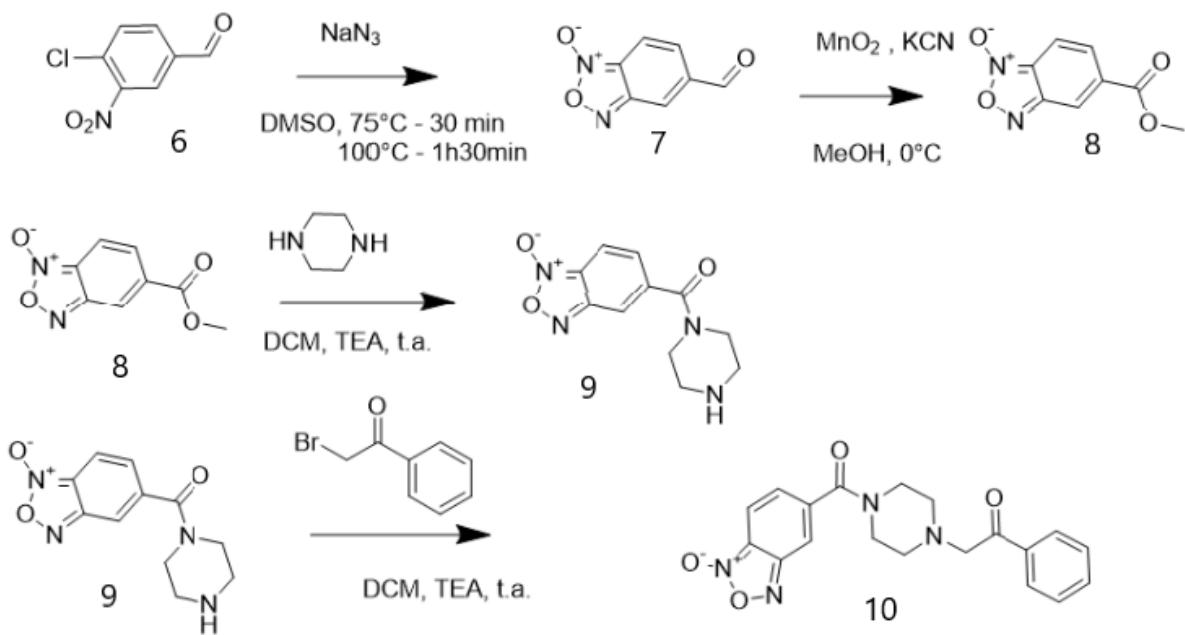
Em uma solução do composto (2) em MeOH (30 mL), sob agitação a 0°C, adicionou-se, em sequência, KCN_(s) (900 mg, 13,4 mmol) e MnO_{2(s)} (8,5 g, 97,6 mmol) aos poucos, em 5 min. Em seguida, a reação continuou sob agitação a 0°C por 30 min. Então, seguiu-se para filtração em coluna de celite com auxílio de diclorometano. Realizou-se, então, lavagem com *brine*, salmoura (NaCl + H₂O). O material resultante foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando diclorometano/metanol como sistema eluente. Dessa forma, obteve-se um sólido cristalino branco amarelado. O rendimento de produto obtido foi 35%.

3.1.2.3. Síntese do 3-metil-4-(piperazina-1-carbonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (4)

Em uma solução da piperazina em MeOH e TEA à temperatura ambiente adicionou-se, aos poucos, o composto (3). A reação continuou sob agitação por 5 h, quando o meio reacional foi concentrado para retirada de MeOH. Adicionou-se EtOAc e lavou-se com *brine*, salmoura (NaCl + H₂O). A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro e concentrada. Em seguida, a fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ e rotavaporou-se. O material resultante foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando-se diclorometano/metanol como sistema eluente. Dessa forma, obteve-se um sólido amarelo poroso com 56% de rendimento.

3.1.2.4. Síntese do 3-metil- 4- (4- (2-oxo-2-feniletil) piperazina - 1 -carbonil) -1,2,5-oxadiazol 2-óxido (5)

Em uma solução de DCM anidro, TEA e composto (4) sob agitação há 15 min em r.t. em atmosfera inerte, adicionou-se uma solução de 2-bromoacetofenona em DCM. A reação continuou sob agitação, quando foi interrompida para extração com *brine*, salmoura (NaCl + H₂O) e EtOAc. O material resultante foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando-se diclorometano/metanol como sistema eluente. Dessa forma, obteve-se um sólido branco amarelado com 91% de rendimento.



Esquema 2: rota sintética composto **10**.

3.1.2.5. Síntese 6-formilbenzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxido (7)

Em uma solução de (6) em DMSO, adicionaram-se 9,7 mmol de NaN₃. Após isso, a reação foi mantida a 75 °C por 30 min e em seguida a 100°C por 1h30 min, sob agitação. Então, adicionou-se água destilada e extraiu-se com acetato de etila, secando a fase orgânica e rotaevaporando-a, obtendo um sólido amarelado com rendimento de 81% (MACE et al., 2015).

3.1.2.6. Síntese do 6-(metoxicarbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxido (8)

Em uma solução de (2), em MeOH (30 mL), adicionou-se, vagarosamente, KCN_(s) (900 mg, 13,4 mmol) e MnO₂_(s) (8,5 g, 97,6 mmol) sob agitação a 0 °C. Após isso, manteve-se a solução sob agitação por 30 min e adicionou-se água destilada. Em seguida, lavou-se a com DCM e extraiu-se com salmoura (*brine*). O rendimento foi de

22%, com a obtenção de um sólido branco amarelado. Resolveu-se, então, testar a realização da reação em sequência à ativação do dióxido de manganês. Para isso, deixou-se o mesmo 8 h em uma mufla a 300 °C. Após isso, o rendimento da reação subiu para 33,5% (PORCAL et al., 2008).

3.2. Modelagem molecular

3.2.1. Material

Relacionam-se, a seguir, os softwares utilizados para as atividades indicadas. Visualização de estruturas: PyMOL.

Construção de ligantes: Chemdraw e Chem3D.

Minimização de energia : Spartan '14 .

Docking : GOLD.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Construção tridimensional dos ligantes

A construção tridimensional dos ligantes iniciou-se em 2D, utilizando-se o CHEMDRAW, passando para o CHEM3D, salvando-se em .mol2. Depois disso, procedeu-se à minimização de energia por métodos semi-empíricos PM3 ou PM6, pelo Spartan'14, aplicando, em seguida, o OPLS-aa pelo ligpargen para minimizar a energia eletrostática, de modo a colocar as cargas nos lugares correspondentes.

3.2.2.2. Reancoragem

Redocking, que consiste em reproduzir complexos determinados experimentalmente, foi efetuado para testar a CYP51 e a Fe-SOD, utilizando-se as estruturas do PDB com ligantes e realizando o *docking* dos últimos em GOLD e AUTODOCK VINA, de forma a analisar se os scores do software utilizado avaliam as funções das mesma forma que foi avaliada experimentalmente. Assim, pode-se realizar o *docking* utilizando os mesmos parâmetros escolhidos a partir dos RMSD (Root mean square deviation), obtidos inicialmente.

Para realizar a reancoragem com a CYP51, retiraram-se do Protein Data Bank (PDB) , que contém uma base de dados de proteína, estruturas da CYP51 de *Trypanosoma cruzi* cristalizadas junto a um ligante, fazendo um filtro de resolução entre 1,5 e 3 Å, seguindo a metodologia de Silva (2014), que escolheu uma estrutura com resolução de 2,8 Å. Dessa forma, retirou-se o ligante da proteína e fez-se o *redocking* nos programas visando a obter as melhores condições possíveis para realizar o *docking* com os ligantes preliminarmente planejados.

3.2.2.3. Docking dos ligantes preliminarmente planejados

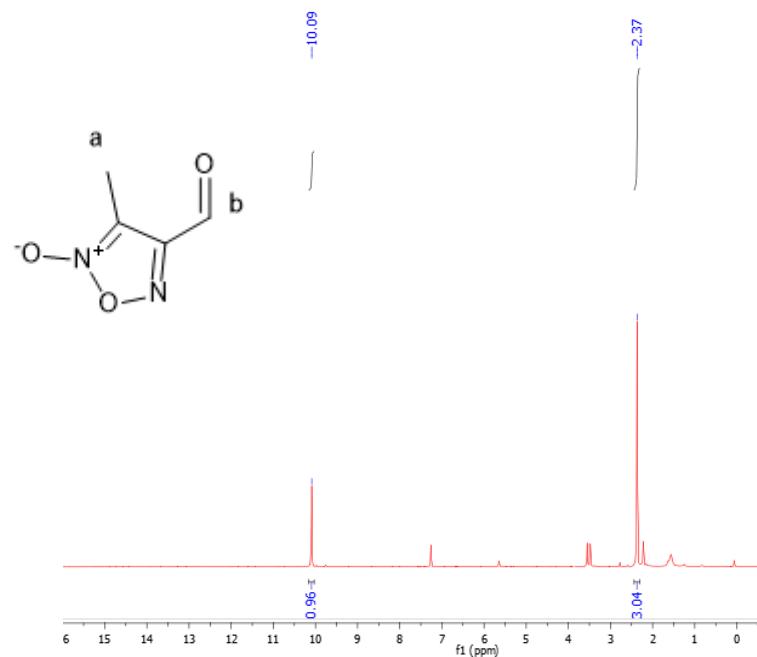
Para realização do *docking* dos ligantes preliminarmente planejados, utilizaram-se dados obtidos do *redocking* a fim de se poder ter melhores dimensões de caixa e parâmetros utilizando o GOLD.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

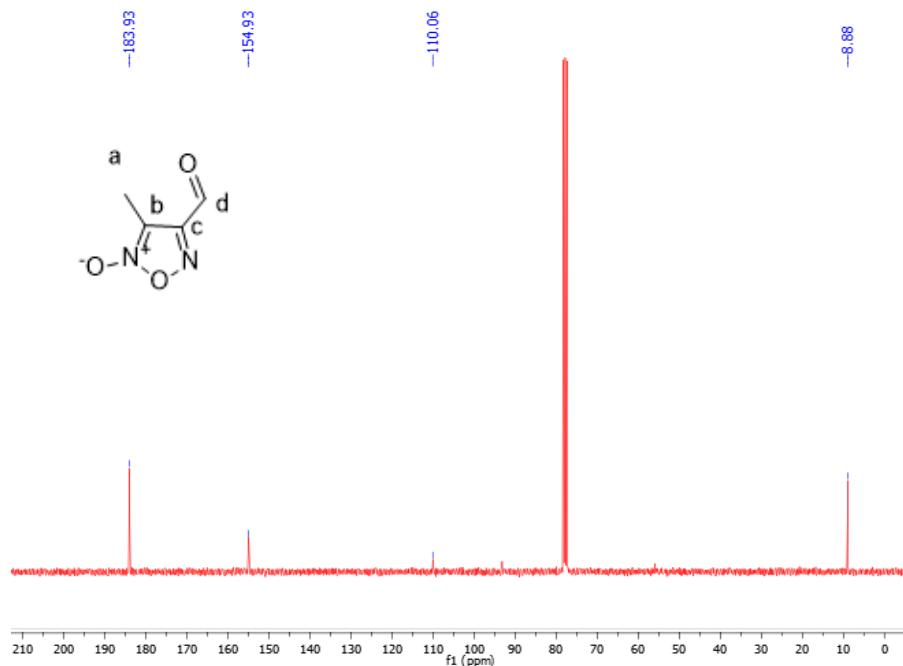
4.1. Síntese

4.1.1. Esquema 1

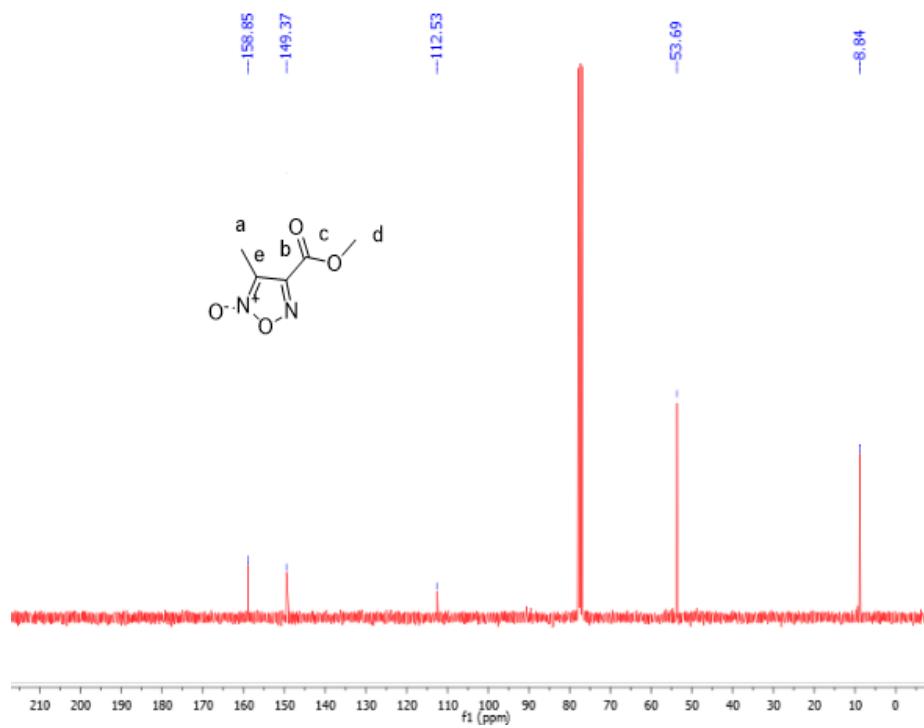
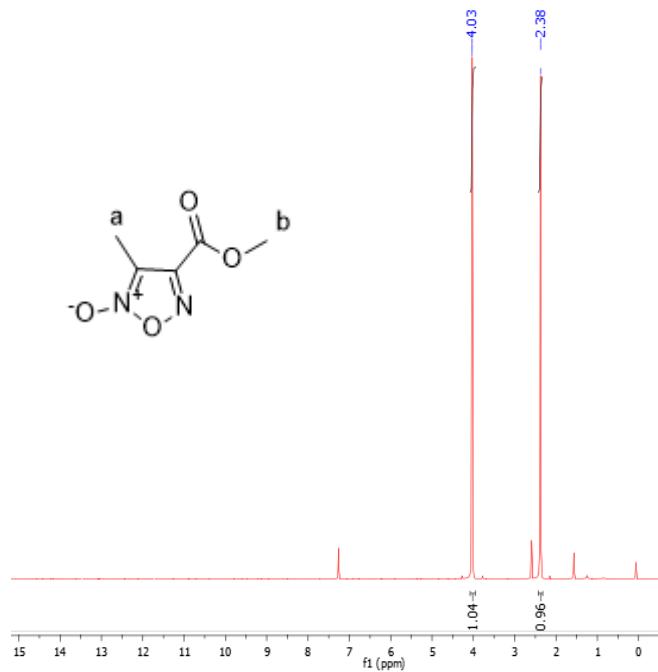
A confirmação da identidade dos compostos sintetizados foi realizada por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tanto de C¹³ quanto de H¹, além da realização de estudos de ponto de fusão dos compostos, sendo importante destacar o acompanhamento das reações realizado a partir de cromatografia de camada delgada com fases móveis adequadas.



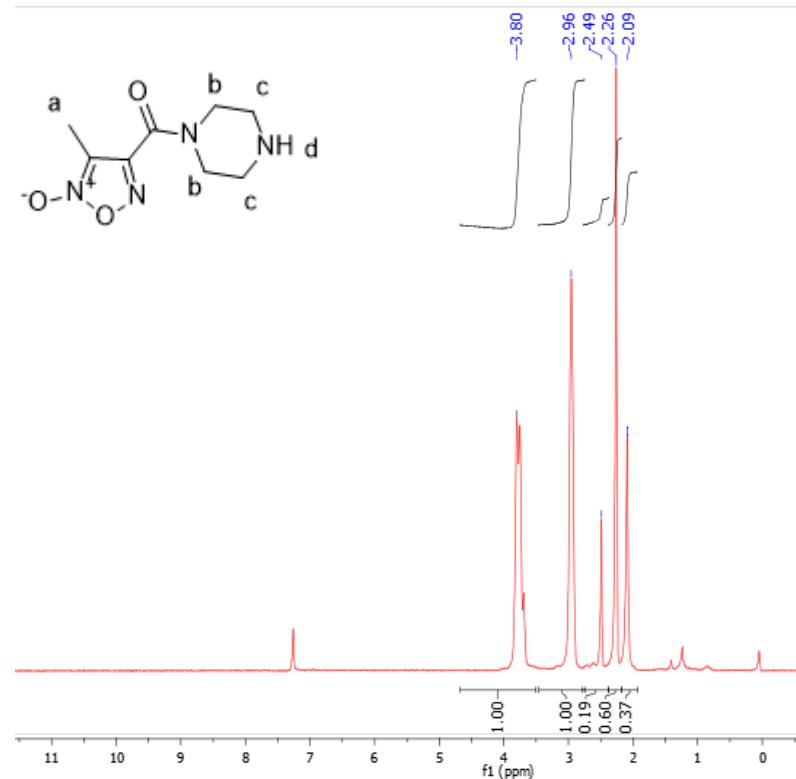
Espectro 1: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , σ =ppm) do composto 3-metil-4-furoxanocarbaldeído (**2**). 10,0891(s, 1H - a); 2,3694(s, 3H - b).



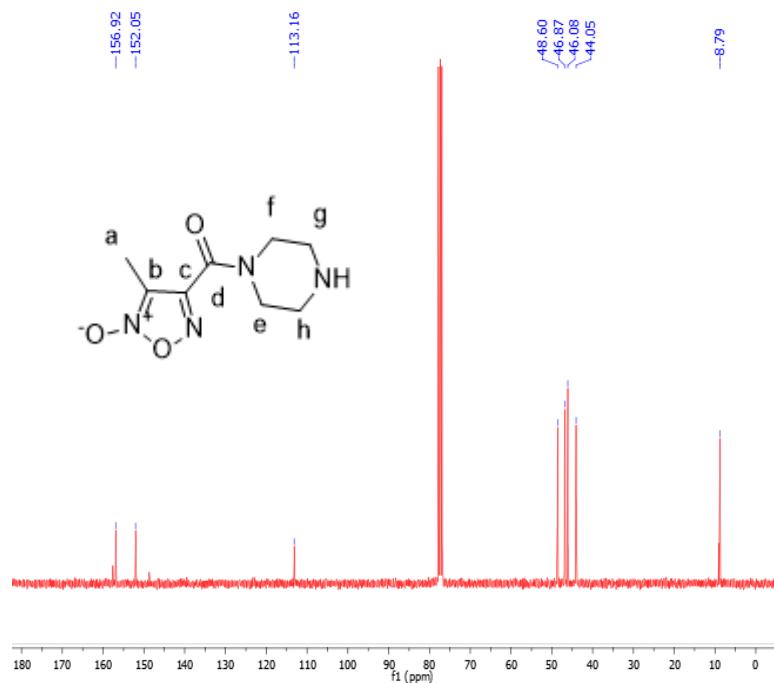
Espectro 2: RMN ^{13}C do composto 3-metil-4-furoxanocarbaldeído (**2**) (75 MHz, CDCl_3 , σ =ppm): 183,93-d; 154,93-c; 110,06-b; 8,8-8a.



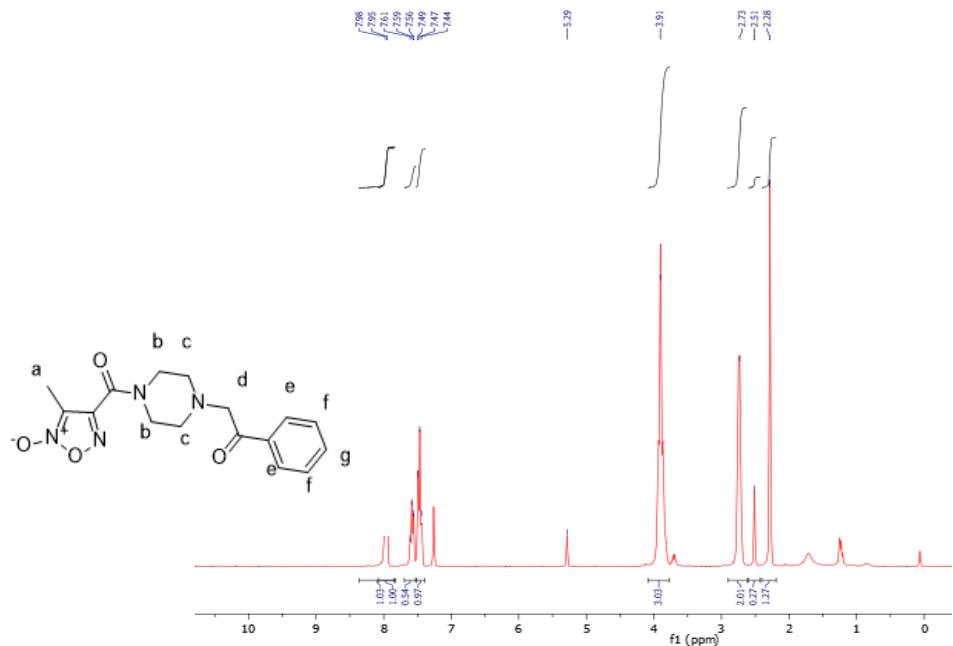
Espectro 4: RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\sigma=\text{ppm}$) do composto 4-(metoxicarbonil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol (**3**): 158,85-d; 149,37-c; 112,53-b; 53,69-e; 8,80-a.



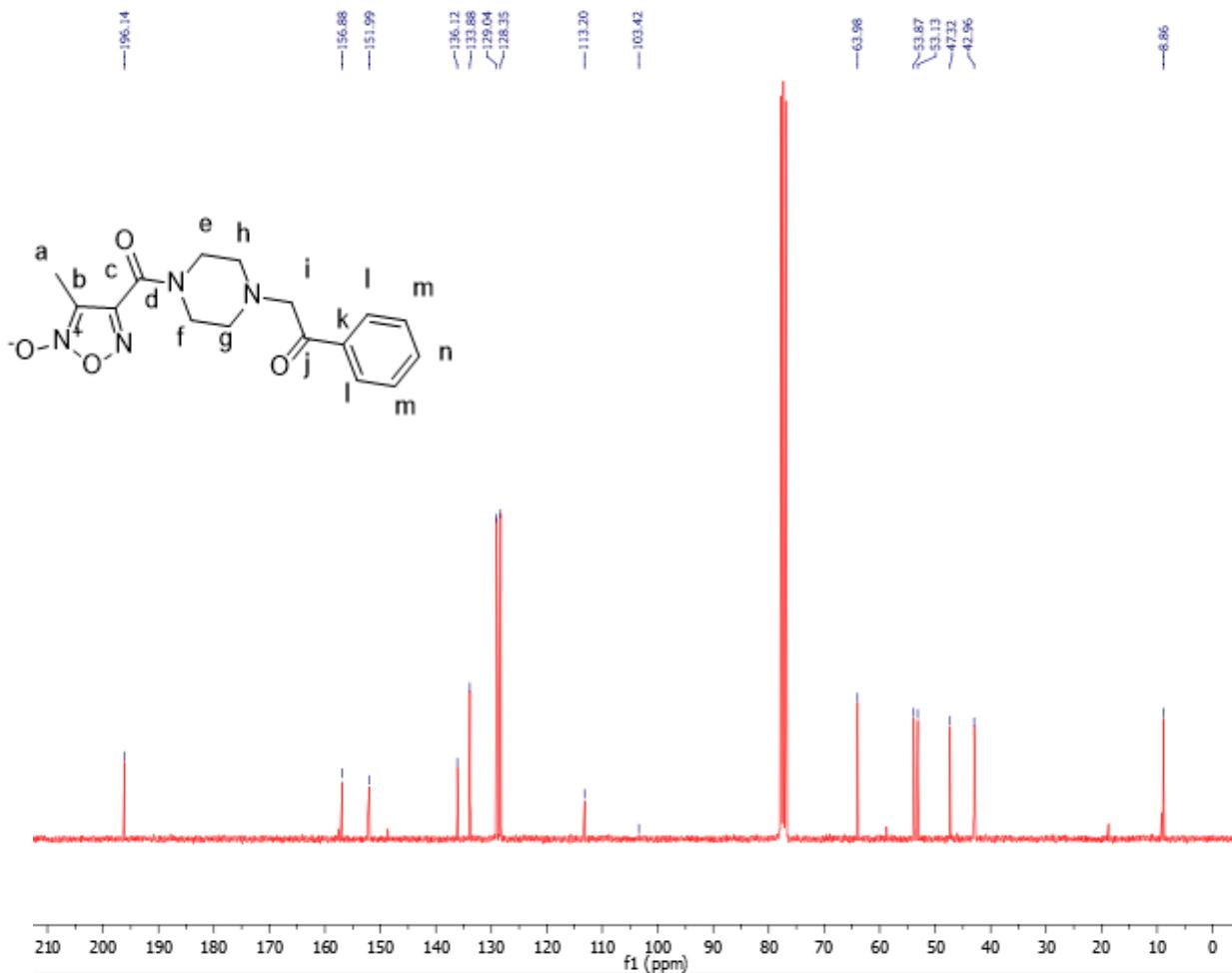
Espectro 5: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\sigma=\text{ppm}$) composto (**4**): 3,80 (m, 4H - b); 2,96 (s, 4H - c); 2,26 (s, 3H - a) ; 2,09 (1H - d).



Espectro 6: RMN ^{13}C do composto (4) (75 MHz, CDCl_3 , σ =ppm): 156,92d; 152,05c; 113,16b; 48,60e/f; 46,87e/f; 46,08g/h; 44,05g/h; 8,79a.



Espectro 7: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , σ =ppm) composto (5): 7,97 (d, $J=9$ Hz, 2H - e), 7,59 (t, $J= 7,5$ Hz, 1H - g), 7,47(t, $J= 7,5$ Hz, 1H - f), 5,29 (s, 2H - d), 3,91 (m, 4 h - b), 2,73 (m, 4 H - c), 2,28(s, 3H - a).



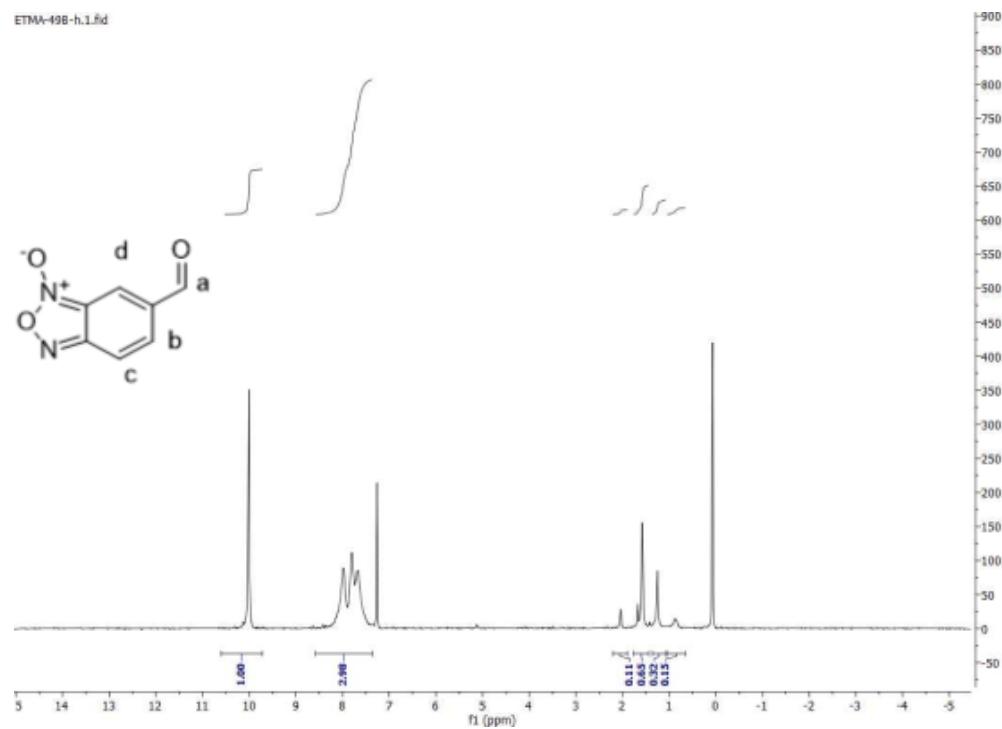
Espectro 8 : RMN ^{13}C do composto (5) (75 MHz, CDCl_3 , σ =ppm): 196,14 - j; 156,88 - d; 151,99 - c; 136,12 - k; 133,88 - n; 129,04 - l; 128,35 - m; 113,20 - b; 63,98 - i; 53,87 - g/h; 53,13 - g/h; 47,32 - e/f; 42,96 - e/f; 8,86 - a;

A partir dos 8 espectros (4 de ^1H e 4 de ^{13}C), observam-se pontos bem interessantes a destacar. No primeiro (Espectro 1), há a presença de dois tipos de hidrogênio, sendo que a integral de um tipo é aproximadamente 3 vezes a do outro, ou seja, há uma proporção de hidrogênio de 3:1, como observada na estrutura do composto 3-metil-4-furoxanocarbaldeído. Assim, observa-se um sinal em ~10 ppm que é típico de aldeído e outro sinal em ~2 ppm, caracterizado pela metila próxima de um anel furoxano aromático, que geralmente apresenta sinal entre 2 e 3 ppm (SILVERSTEIN, 2005).

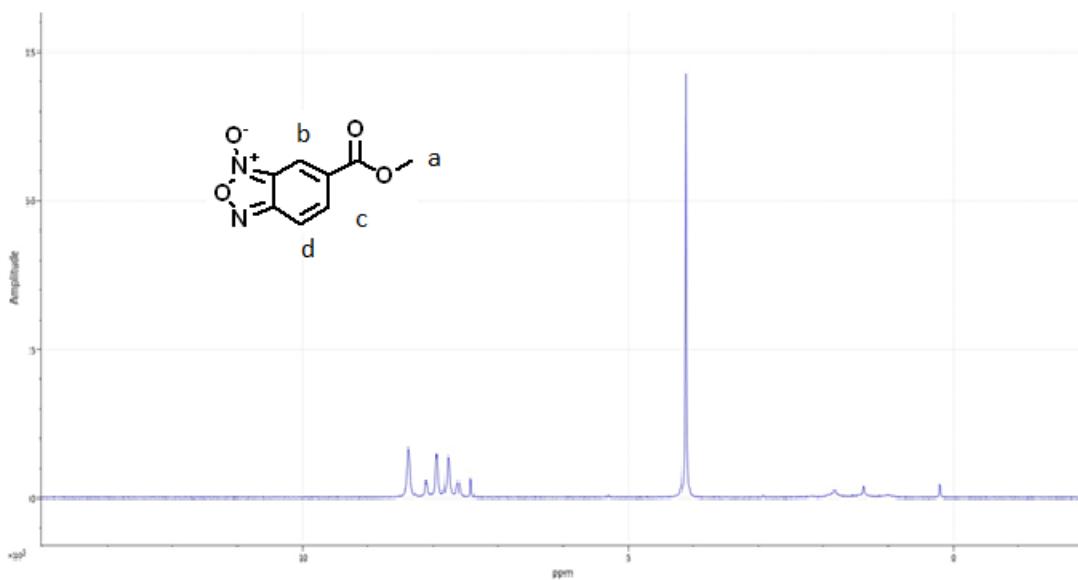
Do espectro 1 de ^1H (para o espectro 3 , observa-se o desaparecimento do sinal em ~10 ppm e o aparecimento de outro em ~4 ppm. Isso acontece devido à formação de um éster e do consumo de aldeído. Hidrogênios em carbonos ligados a oxigênio normalmente têm sinal entre 3 e 4 ppm (SILVERSTEIN, 2005). Além disso, há a presença de um sinal em ~2 ppm. Há uma pequena diferença em relação ao espectro anterior devido à mudança do ambiente químico com a adição do grupo metoxila.

Os espectros 5 e 6 confirmam a presença do composto (3) 4-(metoxicarbonil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido, após a realização da substituição nucleofílica. Primeiramente, observa-se a presença de 8 sinais diferentes no espectro de ^{13}C , inferindo a presença de 8 carbonos na molécula. Em seguida, analisa-se o espectro de ^1H obtido, em que há apenas um sinal, que parece se referir à presença dos mesmos hidrogênios do espectro anterior (espectro 4). Dessa forma, na região onde antes aparecia sinal a ~2 ppm agora há sinais entre 2,26 e 2,49 ppm. Além disso, observam-se 2 “conjuntos” de sinais interessantes. O primeiro conjunto de multipletos está presente entre 3,5 e 4,0 ppm, o que está dentre a faixa geralmente atingida por hidrogênios ligados a grupos amina, e o segundo conjunto, em que se observa um triplete, está próximo a 3 ppm, representado também por hidrogênio em carbonos ligados a grupo amina, mas que dessa vez estão mais afastados de um grupo carbonila, ficando menos desprotegidos do que o primeiro grupo citado. Dessa forma, observa-se a presença do composto (4), que corresponde à última etapa da síntese do composto não substituído no anel benzênico (5). Por último, identifica-se a presença de carbonos aromáticos de j-n com deslocamento variando entre 128,35 e 131,12 ppm e um novo sinal característico de carbono ligado a oxigênio e próximo a anel aromático em 196,14 ppm, o que corrobora a presença do composto 5. Além disso, no espectro 7, observamos a presença de 1 duploto e 2 tripletos na faixa dos aromáticos, correspondendo à presença dos hidrogênios aromáticos do composto 5.

4.1.2. Esquema 2



Espectro 9 : RMN ^1H do composto intermediário aldeídico (300 MHz, CDCl_3 , δ =ppm).
1,04 (s, a); 7,4-8,3 (m, b,c,d).



Espectro 10: RMN ^1H do intermediário éster metílico do benzoxadiazol (60 MHz, CDCl_3 , δ = ppm). 4,03 (s, a); 7,5-8,5 (m, b,c,d)*.¹

Em relação aos dois últimos espectros, 9 e 10, comparativamente observa-se que houve desaparecimento do sinal característico de aldeído (\sim 10 ppm) e surgimento de um sinal característico do éster metílico correspondente (\sim 4 ppm), o que corrobora a formação dos intermediários benzoxadiazol.

Tabela 1: testes de reação de aminólise.

¹Os espectros para os dois últimos compostos não estão muito bem delimitados por um problema nos últimos dois meses em relação ao espectrômetro de RMN, que houve nos últimos meses, mas logo mais serão realizados também determinações de ^{13}C .

Teste	4(mmol)	5(mmol)	Aditivo	Solvente	T (°C)	Conversão	Tempo (h)	Atmosfera
1	0,15	0,15	TEA	MeOH	TA	sem conversão	24	normal
2	0,15	0,2	TEA	MeOH	TA	sem conversão	48	normal
3	0,15	0,2	TEA	MeOH	60	conversão baixa	24	normal
4	0,15	0,6	TEA	MeOH	TA	conversão baixa	24	tubo selado
5	0,15	0,6	TEA	MeOH	60	conversão baixa	24	tubo selado
6	0,15	0,6	TEA	MeOH	60	conversão baixa	24	tubo selado
7	0,15	0,6	FeCl ₃	ACN	80	conversão baixa	24	tubo selado
8	0,15	0,6	TEA	MeOH	60	conversão baixa	24	tubo selado
9	0,15	0,75	AcOH	MeOH	60	conversão baixa	24	tubo selado

10	0,25	1	TEA	MeOH	60	conversão baixa	24	tubo selado
11	0,5	2	K ₂ CO ₃	Tolueno	110	conversão baixa	24	inerte
12	1,5	7,5	DBU	MeOH	TA	Conversão quase total	2	normal

Para realizar a síntese 6-(piperazina-1-carbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxido várias condições foram tentadas. Tal fato se observou porque a aminólise não ocorreu como esperado por testes anteriores (Esquema 1). Primeiramente, simularam-se as condições para a síntese da 3-metil-4-(piperazina-1-carbonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido, em que se utilizou metanol como solvente, trietilamina como base e temperatura ambiente, tendo um equivalente da amina e do éster. Porém, tal reação não resultou na formação do produto. Desta forma, série de outras condições foram tentadas com base em reações da literatura (FOLEY, 2010; MKHONAZI et al., 2020; VIGANTE, 2011; LIMA, 2011). Entretanto, nenhum teste teve sucesso e uma possível mudança de rota de reação entrará em estudo.

4.2. Modelagem computacional

4.2.1. Reancoragem

A fim de validar os estudos de ancoragem futuros, redocking é um método importante a ser realizado (MATEEV, 2022). Para isso utilizou-se um estrutura de cyp51 cristalografada com o ligante UDO, com o código 3GZ2 (LOKAREDDY et al., 2010). A escolha de tal estrutura ocorreu devido a uma resolução boa comparada a outras estruturas presentes no PDB(2.80 Å) e também tendo uma conformação no sítio ativo referente a um ligante com atividade considerável ($EC_{50} = 7.5$ nM em amastigotas de *T. cruzi*, cepa Tulahuen).

Desta forma, após redesenhado, parametrizado e minimizado, o ligante UDO foi submetido à *redocking*, selecionando-se as condições que resultaram no menor RMSD entre a pose do UDO resultante do *redocking* e aquela presente no cristal> Utilizaram-se 3 tipos de função de score (ChemPLP, ASP e ChemScore), 2 tipos de eficiência do algoritmo genético (100% e 200%) e 3 tipos de diâmetro de caixa (8, 10 e 12 Å).

4.2.2. Ancoragem

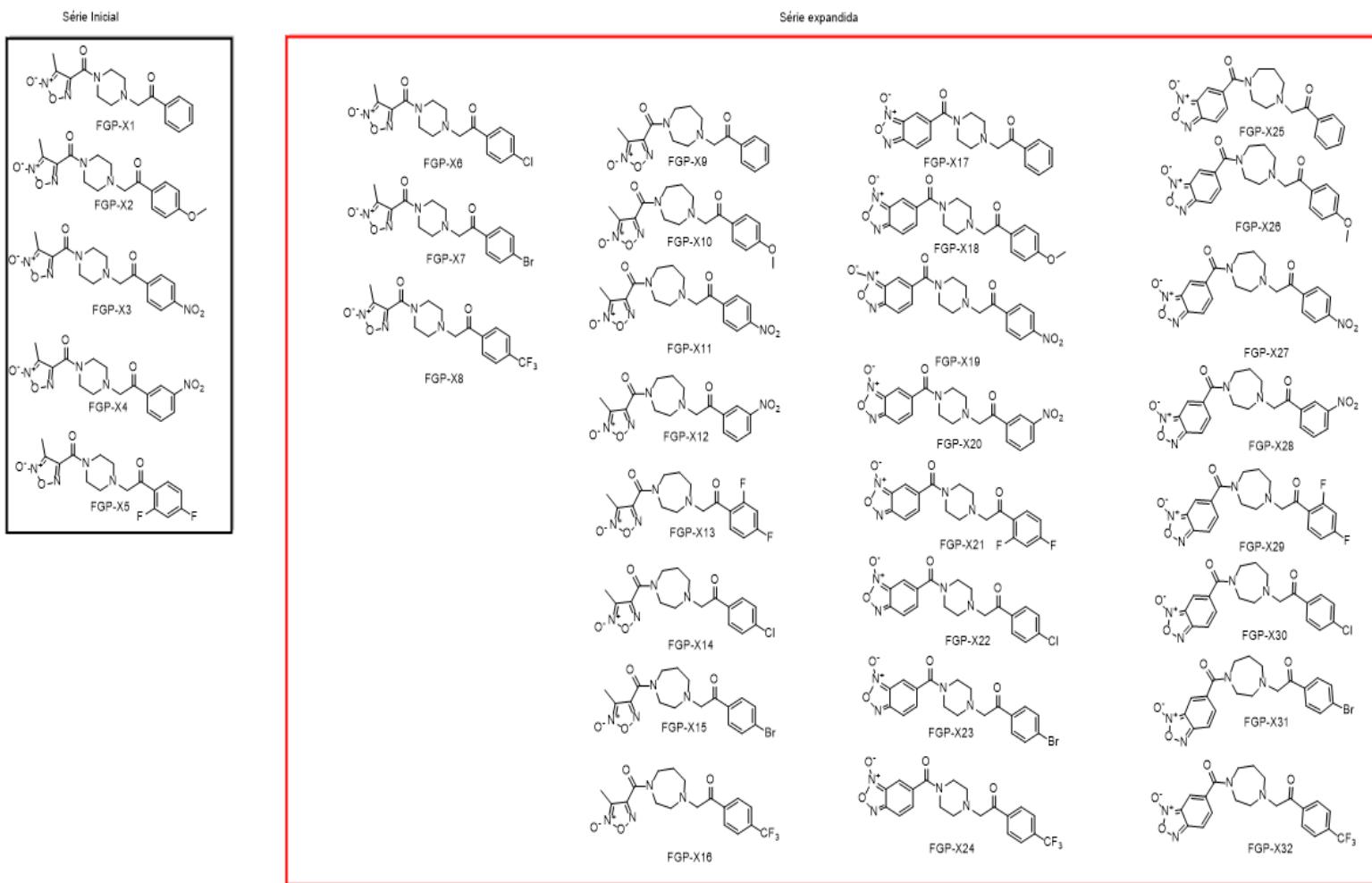


Figura 8.Compostos propostos usados para o experimento de *docking*.

Tabela 2. Compostos analisados e scores representativos

Compostos	ASP
FGP-X1	43,46
FGP-X2	45,77
FGP-X3	47,36
FGP-X4	47,90
FGP-X5	44,67
FGP-X6	43,19
FGP-X7	41,33
FGP-X8	48,44
FGP-X9	43,40
FGP-X10	46,44
FGP-X11	49,79
FGP-X12	49,52
FGP-X13	48,06

FGP-X14	44,56
FGP-X15	43,70
FGP-X16	54,45
FGP-X17	46,07
FGP-X18	48,74
FGP-X19	51,21
FGP-X20	51,83
FGP-X21	50,50
FGP-X22	47,66
FGP-X23	47,30
FGP-X24	53,90
FGP-X25	48,41
FGP-X26	48,48
FGP-X27	51,02
FGP-X28	54,60
FGP-X29	53,70

FGP-X30 47,77

FGP-X31 46,60

FGP-X32 53,56

Tendo em vista as melhores condições obtidas no experimento de reancoragem no programa GOLD (Raio de caixa=10, eficiência de algoritmo genético=100% e Função de score = ASP).

4.2.2.1.Série inicial

Procedeu-se ao experimento de ancoragem dos compostos FGP-X1 a FXP-X5 inicialmente, aqueles estruturalmente similares ao o composto 1 (Tabela 1). E em seguida, realizou-se o mesmo procedimento com outros compostos que foram propostos para serem sintetizados pelo mestrandro Filipe Gomes Pernichelli.

Observa-se que o composto FGP-X4 obteve a maior média de *score* utilizando-se a função ASP (Figura 9).

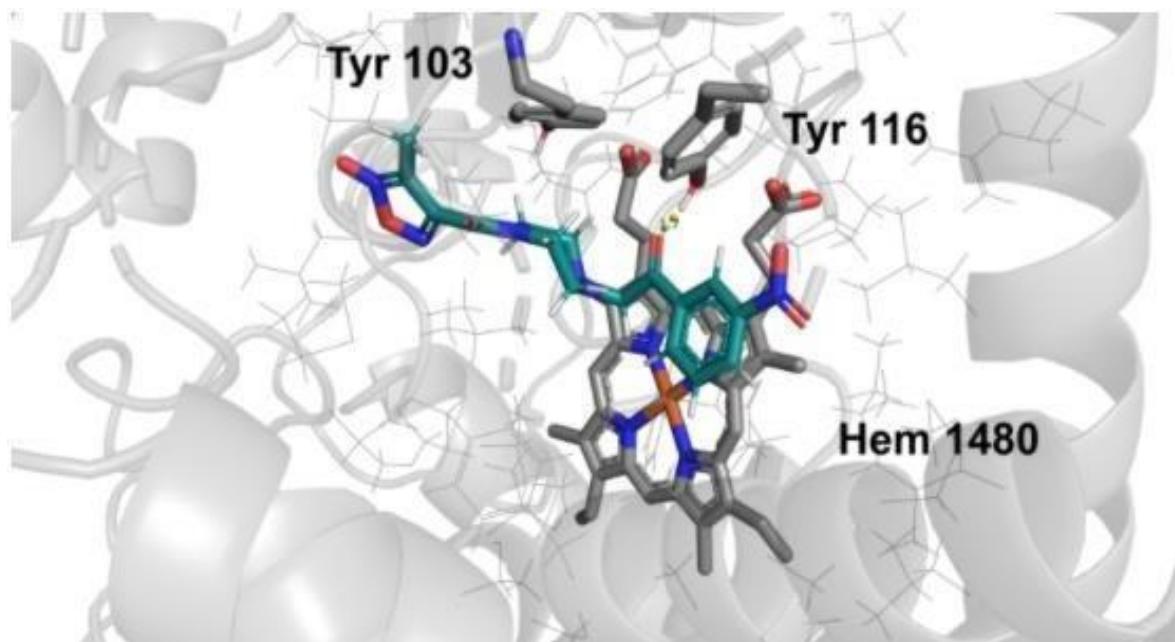


Figura 9: Visualização da pose de maior *score* da série inicial (contém compostos mais similares ao composto sintetizado).

Observou-se que tal molécula realiza interação de hidrogênio com a Tyr₁₁₆ e encontra-se próxima ao resíduo Tyr₁₀₃, tendo um paralelismo importante entre o grupo piperazina e o anel aromático da tirosina. É importante ressaltar que tais resíduos de aminoácido também representaram importância no encaixe dos outros ligantes no sítio catalítico, embora nem todos os ligantes realizem interações de hidrogênio nas poses obtidas. Além disso, tais resíduos foram destacados, pois também foram relatados em experimentos de ancoragem realizados em compostos similares sintetizados por SILVA (2014) e HARGROVE et al. (2013), apresentando formação de ligação de hidrogênio em alguns casos. É Importante ressaltar que o trabalho realizado por SILVA (2014) serviu de base para o planejamento da porção que teria maior interação com a CYP51 do composto que está sendo sintetizado, o que aponta para uma possível similaridade em mecanismo de ação considerando a Cyp51 (embora isso só possa ser confirmado em ensaios biológicos).

4.2.2.2. Serie expandida

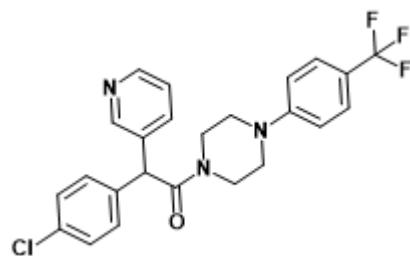


Figura 10. Ligante UDO, nativo do cristal (PDB:3zg2) com cyp51. Adaptado de HARGROOVE et al., 2013.

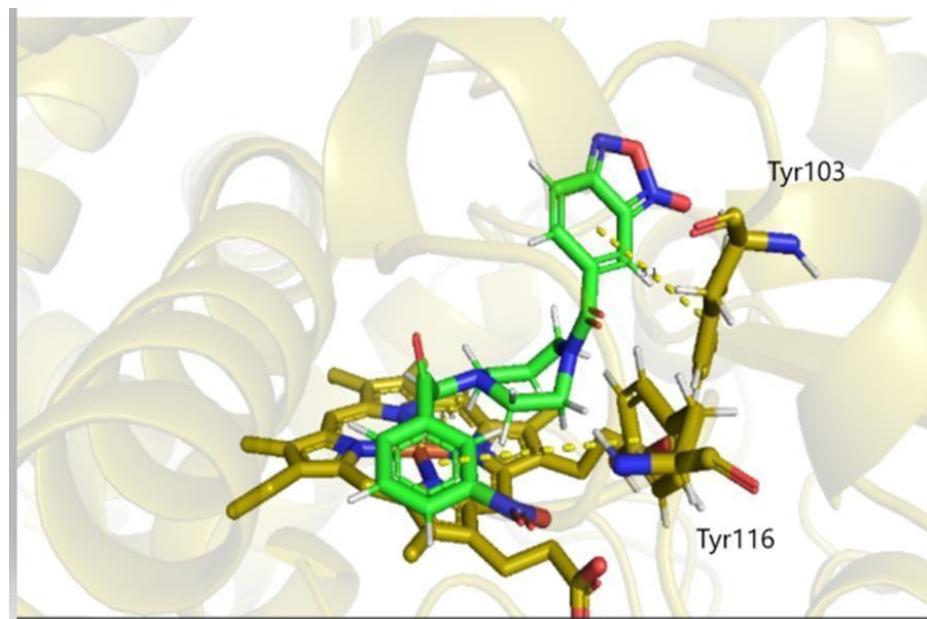


Figura 11. Pose representativa do FGP-X28.

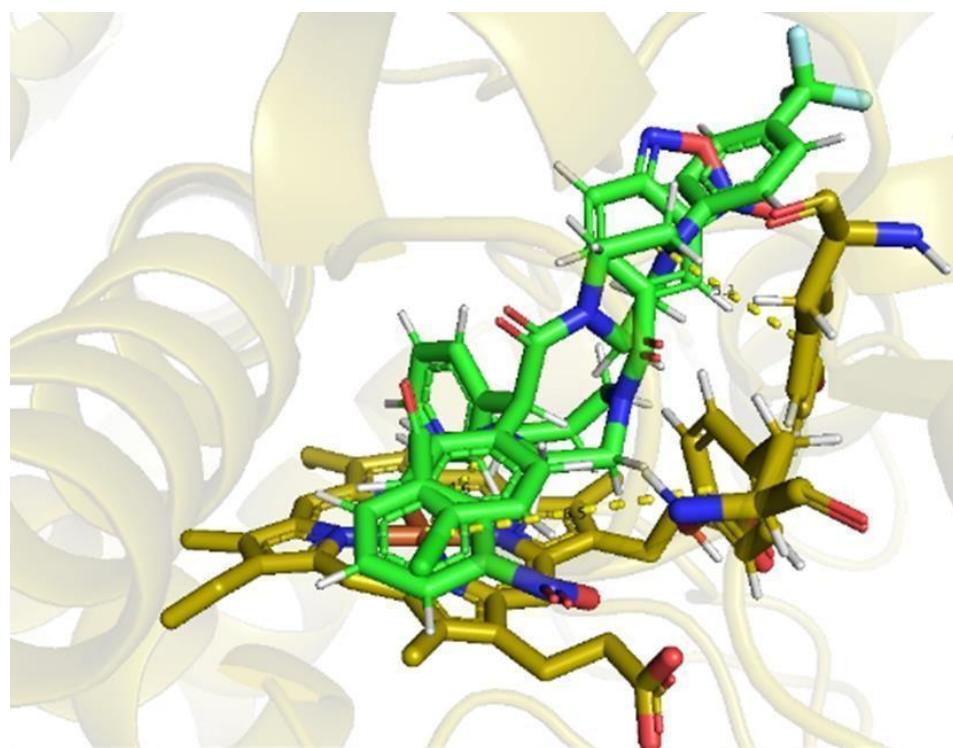


Figura 12. Sobreposição entre o ligante nativo do cristal (UDO) e FGP-X28.

A pose representativa com melhor score dentre as estudadas foi a FGP-X28 (Figura 11). Dessa forma, observa-se a proximidade do anel aromático da Tyr₁₁₆ com o aromático do composto (6,5 Å) e uma distância ainda menor entre o anel da Tyr₁₀₃ e anel do benzofuroxano (5,1 Å). Ainda, observa-se proximidade interessante entre um dos nitrogênios da piperazina e o ferro do grupo porfirínico heme (4,6 Å) (Figura 12). Mesmo com este resultado, são extremamente necessárias a síntese e a caracterização química de todos os compostos propostos pelo aluno e o mestrandro Filipe Gomes Pernichelli.

Além disso, tais resíduos foram destacados, pois coincidiram com aqueles observados em experimentos de *docking* realizados em compostos similares sintetizados por SILVA (2014) e HARGROVE et al. (2013), apresentando formação de ligação de hidrogênio em alguns casos. É Importante ressaltar que o trabalho realizado por SILVA (2014) serviu de base para o planejamento da porção que teria maior interação com a CYP51 do composto que está sendo sintetizado, o que aponta para uma possível similaridade em mecanismo de ação considerando a Cyp51 (embora

isso só possa ser confirmado em ensaios biológicos e melhor estudado a partir de dinâmica molecular).

5. CONCLUSÃO

Face aos espectros mostrados e as caracterizações, é possível concluir que foi obtido um dos compostos no projeto, com rendimento 91%. Desta forma, as perspectivas consistem em auxiliar o mestrande Filipe Gomes Pernichelle na síntese dos compostos por ele planejados e subsequentemente enviar os compostos para testes biológicos de atividade tripanocida no laboratório coordenado por Dra. Carolina Borsoi de Moraes. Os compostos foram enviados em junho de 2022, porém devido a alguns problemas técnicos com os aparelhos que realizariam as medidas biológicas, tais valores de atividade *in vitro* não estarão presentes neste trabalho.

Além disso, a segunda rota sintética teve um comportamento diferente da primeira. Enquanto a reação de aminólise ocorreu sem problemas, apenas com adição de base e piperazina na primeira rota, na segunda várias condições químicas e de temperatura foram testadas, mas sem o esperado sucesso na reação. Como perspectiva tem-se a mudança da rota para realização de acoplamento peptídico entre ácido carboxílico (ao invés de realizacao de aminolise como nas tentativas de 1 a 12 - tabela 1) e amina com acopladores. Ainda, tal diferença de reatividade entre o furoxano e benzofuroxano pode ser melhor explorado a partir de estudos de química quântica similares ao realizados por PRIETO et al.(2022) .

Em relação à parte do trabalho referente à modelagem molecular, observou-se um modo de ligação similar ao que antes foi notado por SILVA et al. (2014). Como os sítios de CYPs, de modo geral, são repletos de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, interações hidrofóbicas, principalmente de pi-stacking foram identificadas, além de interações de hidrogênio com resíduos de tirosina. Por se tratar de *docking* molecular, nenhum outro tipo de conclusão pode ser retirada sem o auxílio de resultados dos testes em parasita, da cristalografia e também estudos mais aprofundados de dinâmica molecular. No entanto, considera-se interessante o estudo para dar um panorama geral de possíveis modos de ligação dos compostos envolvidos neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- ARAUJO, C.R. M. et al. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual Scifinder®. **Química Nova**, v. 38, p. 868-873, 2015.
- ARIAS, D.G. et al. Rational design of nitrofuran derivatives: Synthesis and valuation as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. European **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 1088-1097, 2017.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 171-223, 2008.
- BELTRAN-HORTELANO, I.; PEREZ-SILANES, S.; GALIANO, S.. Trypanothione reductase and superoxide dismutase as current drug targets for *Trypanosoma cruzi*: an overview of compounds with activity against Chagas disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24 , p. 1066-1138, 2017.
- BURGAUD, J.-L.; ONGINI, E.; DEL SOLDATO, P.. Nitric oxide-releasing drugs: a novel class of effective and safe therapeutic agents. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 962, , p. 360-371, 2002.
- CHAUDHARY, Kamal Kumar; MISHRA, Nidhi. A review on molecular docking: novel tool for drug discovery. **Databases**, v. 3, p. 1029, 2016.
- DE RUYCK, Jerome et al. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, p. 1-11, 2016.
- DNDI, Drugs for Neglected Disease initiative. In: <https://www.dndi.org/doencas/doenca-chagas/>. Acesso em 19 abr. 2023.
- PETRY, L. S. et al. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of a benzofuroxan derivative against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 226, p. 108125, 2021.
- FOLEY, Megan A.; JAMISON, Timothy F. Amide bond formation via reversible, carboxylic acid-promoted lactone aminolysis. **Organic Process Research & Development**, v. 14, p. 1177-1181, 2010.
- FRUTTERO, R. et al. Unsymmetrically substituted furoxans. Part 11. Methylfuroxancarbaldehydes. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 26, p. 1345-1347, 1989.
- GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARRENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical reviews**, v. 6, p. 75-87, 2014.
- GUIDO, R.; et al. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados [online]**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.
- HARGROVE, Tatiana Y. et al. Complexes of *Trypanosoma cruzi* sterol 14 α -demethylase (CYP51) with two pyridine-based drug candidates for Chagas disease: structural basis for pathogen selectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 44, p. 31602-31615, 2013.

- JAYASHREE, B. S.; NIKHIL, P. S; PAUL, S.t. Bioisosterism in drug discovery and development-an overview. **Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 915-925, 2022.
- JONES, Gareth et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.
- JORGE, S. D. et al. Preliminary *in vitro* evaluation of N'-(benzofuroxan-5-yl) methylene benzohydrazide derivatives as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **MedChemCommunication**, v. 3, n.7, p. 824-828, 2012.
- KABIR, Abbas; MUTH, Aaron. Polypharmacology: The science of multi-targeting molecules. **Pharmacological Research**, p. 106055, 2022.
- LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14alpha-Demethylase (CYP51) as a Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2060-2071, 2011.
- LIMA, Evanoel Crizanto de et al. DBU as a catalyst for the synthesis of amides via aminolysis of methyl esters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 2186-2190, 2011.
- LIPINSKI, C. A. Chapter 27. Bioisosterism in drug design. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 283–291, 1986.
- LOKAREDDY, Ravi Kumar et al. Combination of two separate binding domains defines stoichiometry between type III secretion system chaperone IpgC and translocator protein IpaB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 39965-39975, 2010.
- MACÉ, Y. et al. Cytotoxic activities and metabolic studies of new combretastatin analogues. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, p. 3143-3156, 2015.
- MATEEV, Emilio et al. Validation through re-docking, cross-docking and ligand enrichment in various well-resolved MAO-B receptors. **International Journal of Pharmaceutical Science Research**, v. 13, p. 1099-1107, 2022.
- MCKERROW, James H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 263-269, 2009.
- MEANWELL, N.A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 2529-2591, 2011.
- MKHONAZI, Blessing D. et al. Solvent-free iron (III) chloride-catalyzed direct amidation of esters. **Molecules**, v. 25, , p. 1040, 2020.
- OLEA-AZAR, C. et al. Electrochemical and microsomal production of free radicals from 1,2,5-oxadiazole N-oxide as potential antiprotozoal drugs. **Spectrochimica Acta Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, p. 69-74, 2003.
- PAHO, PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (org.). Chagas disease. 2022.

Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>. Acesso em 24 abr. 2023.

PORCAL, Williams et al. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuran heterocycle. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, p. 6995-7004, 2008.

PRIETO, D.C. et al. Succinylated isoniazid potential prodrug: Design of Experiments (DoE) for synthesis optimization and computational study of the reaction mechanism by DFT calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1254, p. 132323, 2022.

SCARIM, C. B.; MAN CHIN, Chung. Nitroheterocyclic derivatives: privileged scaffold for drug development against Chagas disease. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, p. 2099-2108, 2019.

SERAFIM, R. A. M.; PRIMI, M. C., TROSSINI, G. H. G; FERREIRA, E. I. Nitric oxide: state of the art in drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 386-405, 2012.

SILVA, F. T. **Antichagásicos potenciais**: planejamento e síntese de bioisósteros 1,2,4-triazólicos do hidroximetilnitrofural e análogos. 227p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Fármaco e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, , Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, David J. **Spectrometry identification of Organic Compounds**. New York???: John Wiley & Sons, INC.; 7th edition, 2005.

VIEGAS-JUNIOR, Claudio et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1829-1852, 2007.

VIGANTE, Brigita et al. Direct aminolysis of ethoxycarbonylmethyl 1,4-dihydropyridine-3-carboxylates. **Molecules**, v. 20, p. 20341-20354, 2015.

TAMULY, Chandan et al. Reduction of aromatic nitro compounds catalyzed by biogenic CuO nanoparticles. **RSC Advances**, v. 4, n. 95, p. 53229-53236, 2014.

TORRES, Pedro HM et al. Key topics in molecular docking for drug design. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

WHO, World Health Organization. In: <https://www.who.int/chagas/en/>. Acesso em: 19 abr. 2023.

Eduardo M Alves

Data e assinatura do aluno(a)



Data e assinatura do orientador(a)