

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Larissa Regina Diniz

**Síntese de Inibidores Covalentes Reversíveis da Enzima Cruzaína a
Partir de Aminoácidos Contendo um Núcleo Indólico**

São Carlos

2017

Larissa Regina Diniz

**Síntese de Inibidores Covalentes Reversíveis da Enzima Cruzaína a
Partir de Aminoácidos Contendo um Núcleo Indólico**

Monografia apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo como requisito para conclusão da
disciplina 7500006 – Monografia.

Área de Concentração: Química Orgânica e
Biológica

Orientador: Prof. Dr. Antonio C. B. Burloloso

São Carlos

2017

Agradecimentos

Agradeço a Deus por sua presença renovadora, a qual se apresentou como um verdadeiro lugar de descanso durante todos os meus dias.

À minha família, minha mãe Ivone e minha irmã Cynthia, que estiveram presentes a cada etapa do meu crescimento profissional e pessoal durante os quatro anos e meio de graduação. Dedico um agradecimento especial à memória de meu pai, Carlos, que não mediu esforços para que eu tivesse todo o apoio necessário para realizar minhas aspirações.

Ao Professor Antonio, que me apresentou ao trabalho científico da forma mais completa possível. O meu aprendizado a cada reação ou roda de conversa começa no ato de me colocar diante da bancada e termina no desejo de falar com todo o seu entusiasmo sobre o trabalho que escolheu fazer.

Aos colegas do laboratório: Alexander, João Vítor, Edson, Patrícia, Camila, Anees, Lucas, Rafael Gallo, Rafael Mafra, Gustavo, Nikolas, Bruna, Graziele, Meire e Bárbara. Além dos técnicos João Pedro e Marília. O Campus 2 se tornou um lugar muito menos longe de se chegar graças a presença de vocês. Agradeço pelos conselhos, discussões e histórias de vida compartilhadas.

Aos meus colegas de graduação cujos nomes e agradecimentos juntos seriam capazes de preencher uma segunda monografia, sou grata o companheirismo, a amizade, o apoio e a confiança em mim que, por vezes, era maior do que a minha própria.

Aos professores que participaram da minha formação acadêmica. Suas aulas abriram espaço para que eu enxergasse o conhecimento com muito carinho e me inspirou ainda mais a querer transmiti-lo.

À Central de Análises Químicas e Instrumentais (CAQI) do IQSC.

Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro durante a realização do projeto.

Resumo

A Cruzaína é a principal cisteíno protease expressa pelo protozoário *Trypanossoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, e por isso tem sido largamente utilizada como alvo de inibidores enzimáticos de interesse farmacológico. Os mais potentes inibidores dos quais se tem conhecimento agem sobre a Cruzaína de maneira irreversível ao ligar-se covalentemente ao sítio ativo da proteína. Trabalhos recentes têm reportado a utilidade de compostos que se ligam reversivelmente à enzima como possíveis inibidores. Neste trabalho será apresentada a metodologia utilizada para a produção de duas dipeptidil-nitrilas na intenção de que sejam encaminhadas para ensaios bioquímicos para avaliar sua efetividade como inibidores reversíveis de cisteíno protease. A síntese das dipeptidil-nitrilas escolhidas baseia-se na construção das moléculas de interesse a partir de aminoácidos comerciais, o D-triptofano e a L-serina. A obtenção do composto iniciando pelo D-triptofano segue uma rota de 4 etapas anteriormente descrita para compostos análogos em estudo de inibição da enzima Catepsina K. A síntese da dipeptidil-nitrila produzida a partir da L-serina foi realizada em 7 etapas, incluindo um acoplamento cruzado de Negishi entre o derivado do aminoácido inicial e uma molécula de 5-bromoindol, etapa chave do processo.

Lista de Figuras

Figura 1 - Distribuição geográfica das zonas endêmicas da doença de Chagas.....	9
Figura 2 - Distribuição dos vetores da doença de Chagas nas Américas Central e do Sul.....	11
Figura 3 - <i>Trypanossoma cruzi</i> , causador da doença de Chagas.....	12
Figura 4 - Processo de invasão do <i>T. cruzi</i> em células hospedeiras.....	14
Figura 5 - Estrutura dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.....	16
Figura 6 - Estrutura da Cruzaína com ligante nitrila.....	18
Figura 7 - Inibidores irreversíveis da enzima Cruzaína.....	20
Figura 8 - Inibidor reversível da enzima Cruzaína.....	21
Figura 9 - Estrutura das dipeptidil-nítrilas alvos de síntese.....	22
Figura 10 - Rota geral de preparo de dipeptidil-nítrilas a partir de aminoácidos.....	22
Figura 11 - Rota sintética para preparação do aminoácido derivado da L-serina.....	23
Figura 12 - Rota sintética empregada para preparação da dipeptidil-nítrila 1	24
Figura 13 - Mecanismo de formação do aminoéster.....	25
Figura 14. Esquema da formação da imina em condições básicas como descrito por Hughes.....	25
Figura 15 - Redução estereosseletiva por boroidreto de sódio.....	27
Figura 16 - Mecanismo da reação de acoplamento peptídico usando HATU.....	28
Figura 17 - Primeira parte da síntese da dipeptidil-nítrila 2	29
Figura 18 - Mecanismo de proteção com Cbz.....	29
Figura 19 - Mecanismo da reação de iodação com trifenilfosfina e imidazol.....	31
Figura 20 - Ciclo catalítico para acoplamento de Negishi.....	32
Figura 21 - Mecanismo simplificado da reação de desproteção por hidrogenação.....	32
Figura 22 - Segunda parte da síntese da dipeptidil-nítrila 2	33

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

α - alfa	Hz – Hertz
β - beta	J – constante de acoplamento
δ - deslocamento químico	m – multiplete
AcOEt – acetato de etila	MHz – Megahertz
Cbz – carbobenziloxi	ppm – parte por milhão
d – dubleto	RMN ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono 13
dd – duplo dubleto	RMN ^1H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio
DIPEA – diisopropiletilamina	s – singleto
DMF – N,N-dimetilformamida	t – tripleto
eq – equivalentes	TBME – éter metil-terc-butílico
HATU - hexafluorofosfato de 2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)1,1,3,3-tetrametilurônio	THF – tetraidrofurano
Hex - hexano	TMS - tetrametilsilano

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 A Doença de Chagas.....	8
1.1.1 Histórico e Distribuição da Endemia.....	8
1.1.2 Transmissão e Controle.....	10
1.1.3 Agente Etiológico.....	12
1.1.4 Efeitos da Doença.....	14
1.1.5 Tratamento Medicinal.....	15
1.1.6 Mecanismo de Ação dos Medicamentos.....	17
1.2 Estratégia de Busca por Possíveis Drogas: Inibição Enzimática.....	17
1.2.1 A Enzima Cruzaína.....	17
1.2.2 Inibidores Enzimáticos.....	19
1.2.3 Inibidores Irreversíveis.....	20
1.2.4 Inibidores Reversíveis.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.1 Preparação de Dipeptidil-nitrila a Partir do D-triptofano.....	24
3.2 Preparação de Dipeptidil-nitrila a Partir da L-serina.....	28
4. CONCLUSÃO.....	35
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	36
5.1 Procedimentos para o preparo das moléculas da rota do D-Triptofano.....	36
5.2 Procedimentos para o preparo das moléculas da rota da L-Serina.....	39
5.3 Procedimentos para o preparo do catalisador Pd ₂ (dba) ₃	44
6. REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Chagas

1.1.1 Histórico e Distribuição da Endemia

A Doença de Chagas, também chamada Tripanossomíase Americana, é uma doença parasitária do sistema cardiovascular causada pelo protozoário *Trypanossoma cruzi*¹. Este parasita é capaz de penetrar nas células do hospedeiro causando irritações e inflamações. Após vários ciclos reprodutivos a célula é rompida e novos parasitas são liberados na corrente sanguínea, a partir de onde poderão invadir novas células nas quais o ciclo se repete². A transmissão acontece principalmente por insetos triatomíneos existentes no ambiente domiciliar³, dentre eles o mais conhecido é o inseto vulgarmente chamado de “barbeiro”.

Os indivíduos mais afetados pela doença são as populações de baixa renda, mais efetivamente aquelas que vivem em habitações rudimentares. Os efeitos causados pela doença sobre os indivíduos infectados costumam ser relacionados a danos cardíacos que geram uma enorme redução de sua capacidade laboral e expectativa de vida⁴.

A infecção foi observada pela primeira vez em 1909 pelo médico e biólogo Carlos Chagas, durante a investigação de um surto de malária que afetava operários de uma estrada de ferro na cidade de Lassance, no interior de Minas Gerais. Enquanto examinava trabalhadores e habitantes do município detectou os flagelos do *T. cruzi* na circulação de uma criança. Pouco tempo após a descoberta do parasita o pesquisador descreveu, sozinho e de maneira detalhada, o parasito, o vetor, os efeitos e o reservatório animal da doença que posteriormente foi batizada com seu nome³.

No Brasil, logo quando lançada a nota com os detalhes sobre nova parasitíase, suas descobertas foram contestadas, tendo sido reconhecidas somente

quando o médico Salvador Mazza relatou haver observado na Argentina exatamente o mesmo microrganismo flagelado anteriormente descrito por Chagas³.

A doença, que foi primariamente diagnosticada em países americanos do hemisfério sul, é geograficamente distribuída desde o sul dos Estados Unidos, cobrindo todos os países da América Central, até o sul da Argentina e do Chile. Alguns casos já foram inclusive registrados em regiões metropolitanas dos EUA por conta do fluxo de imigrantes vindo de países latinos^{5,6}.

No ano de 1990 a tripanossomíase americana foi considerada pelo Banco Mundial como a doença parasítica mais séria dentro da América Latina, onde estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas com o protozoário e que 75 milhões estejam expostas à infecção (dados de 2011)^{2,7}. Nestas localidades, a infecção gera um impacto socioeconômico maior do que os efeitos combinados de todas as outras doenças parasíticas de igual ocorrência⁸.

Figura 1. Distribuição geográfica das zonas endêmicas da Doença de Chagas



Fonte: COURA, J. R.; DIAS, J. C. P.; 2009, p. 33

Neste ponto, vale mencionar que a doença de Chagas não se trata de uma patologia nova. Análises realizadas em múmias datadas de 9 mil anos de idade já detectaram o parasita como responsável por uma doença enzoótica repassada a

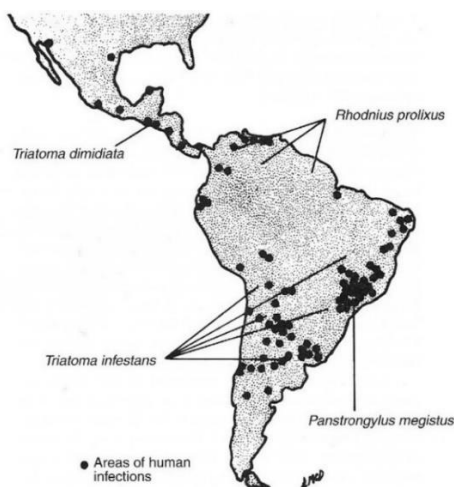
humanos como uma antroponose no momento em que este adentrou nos ecótopos naturais. Seu estabelecimento como endemia aconteceu apenas durante os últimos dois ou três séculos, quando a ação humana causou a eliminação do habitat natural de triatomas com o objetivo de abrir espaços para atividades como agricultura e pecuária. Estes triatomas, por sua vez, foram capazes de adaptar-se ao ambiente doméstico, aumentando sua proximidade com o homem^{9,10}.

Até 1975, ano em que os esforços para o controle da infecção tiveram início, a área de risco compreendia 36% do território brasileiro, contendo triatomas domiciliares em 2.493 municípios distribuídos em 18 estados¹¹. Atualmente os principais focos endêmicos se encontram na Bolívia e em Gran Chaco, na Argentina, onde há alto nível de infecção em algumas comunidades².

1.1.2 Transmissão e Controle

A tripanossomíase americana é transmitida majoritariamente por triatomíneos, insetos hematófagos obrigatórios e de hábitos noturnos. Existem descritas mais de 100 espécies desta classe, a maioria presentes no continente americano, sendo 52 deles descritos no Brasil^{3,5}. Destas espécies, 3 são de especial interesse como transmissores brasileiros: o *Triatoma brasiliensis*, o *Triatoma sordida* e o *Panstrongylus megistus*. Em países ao sul da América Latina como Uruguai, Chile e Argentina, o principal vetor é o *Triatoma infestans*, o inseto “barbeiro”, que leva este nome porque geralmente pica perto dos lábios do indivíduo^{1,12}. O *T. infestans* é um vetor tão conhecido que sua presença passou a ser uma indicação praticamente segura da existência de infecção humana³. A distribuição geográfica de alguns dos mais importantes vetores é apresentada na Figura 2.

Figura 2. Distribuição dos vetores da Doença de Chagas nas Américas Central e do Sul



Fonte: ROBERTS, L. S.; JANOVY, J.; 1937, p. 75

Além da transmissão pela picada do vetor outras formas de infecção passíveis de comentário são: transfusão de sangue, órgão ou tecidos; transmissão congênita, na qual a mãe passa a doença para o filho geralmente no momento do parto, quando o sangue materno entra em contato com as mucosas do recém-nascido (cerca de 10% dos casos); ou acidentes laboratoriais³.

De grande importância para a transmissão e resiliência de uma doença é a existência de reservatórios, ou seja, animais que albergam o agente etiológico sem sofrer prejuízo. No caso da doença de Chagas um grande número de animais pode servir como reservatório, havendo mais de 100 reservatórios selvagens já registrados incluindo morcegos, marsupiais, carnívoros, lagomorfos, roedores e primatas^{1,5}. Animais como cães e gatos também podem realizar o papel de reservatórios, sendo estes especialmente importantes para a transmissão direta ao homem, uma vez que estão presentes no ambiente doméstico¹².

O controle da endemia tem sido realizado no Brasil desde pouco depois da descoberta de Carlos Chagas através de borrifações com hexaclorociclohexano 6,5% nas áreas de infecção para combater o vetor¹¹. As medidas adotadas provaram-se tão efetivas que incentivaram outros países do Cone Sul a realizarem as mesmas ações em 1991, com o objetivo de eliminar o *T. infestans*¹². A iniciativa

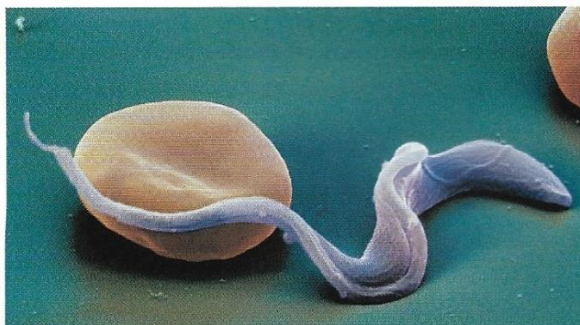
teve ótimos resultados, sendo o *T. infestas* hoje raro e a doença reduzida a casos esporádicos em território brasileiro³.

Para impedir a transmissão por transfusões sanguínea e teciduais é feita a triagem sorológica dos doadores, de modo a identificar o parasita caso presente. No Brasil, por ordem ministerial, qualquer amostra de sangue provindo de doação deve ser submetida a dois testes sorológicos para excluir a possibilidade de infecção por *T. cruzi*³.

1.1.3 Agente Etiológico

O *Trypanossoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, é um protozoário unicelular da classe Mastigophora, pertencente à ordem Kinetoplastida, e tem como característica a estrutura flagelada além de um único núcleo. Possui DNA separado do compartimento nuclear, localizado no interior de uma grande mitocôndria⁴.

Figura 3. *Trypanossoma cruzi* (em azul), causador da doença de Chagas



Fonte: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; 2012, p. 661

O *T. cruzi* apresenta três estágios de desenvolvimento: epimastigota, tripomastigota e amastigota, presentes em diferentes fases da infecção⁴.

O ciclo evolutivo começa na forma epimastigota, encontrada exclusivamente no intestino do vetor. Esta forma se desenvolve à temperatura ambiente e antes de ser eliminada nas fezes do inseto transforma-se para a forma tripomastigota,

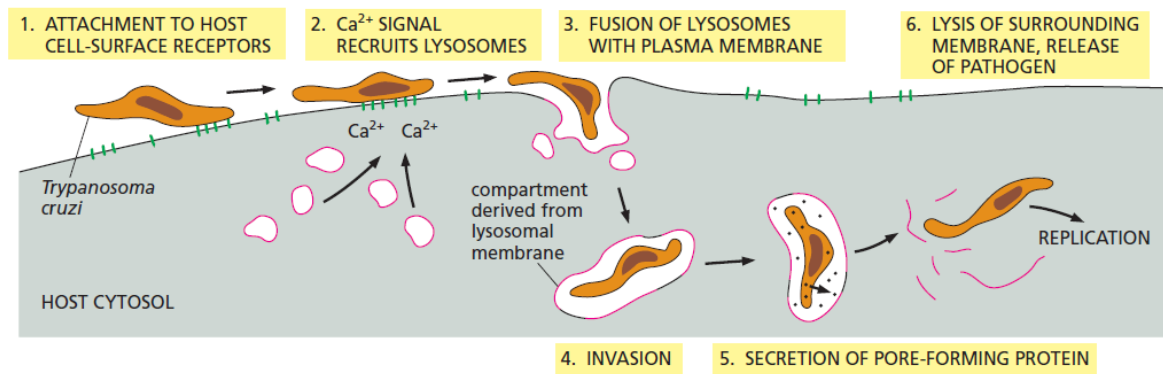
flagelada e extremamente móvel. O tripomastigota penetra então pelas mucosas ou lesões na pele (podem ter sido provocadas pela própria picada) do hospedeiro dentro do qual se locomove pela corrente sanguínea até penetrar o citoplasma de uma célula. No ambiente intracelular o parasita muda para a forma amastigota, arredondada e reprodutivamente capaz através de divisão binária.

A multiplicação do amastigota é extremamente rápida. Em seis dias um único parasito é capaz de dar origem a cerca de 512 novos protozoários, formando verdadeiras colônias intracelulares. A enorme quantidade de microrganismos dentro da célula torna-se insustentável e acarreta o rompimento da membrana celular, causando a disseminação dos parasitos no espaço extracelular. De volta a corrente sanguínea, muda novamente para a forma circulante tripomastigota e se propagam ao invadir novas células, onde o ciclo se repete³.

A forma tripomastigota, além de ser a responsável pela infecção é também aquela ingerida pelo inseto, tornando-o vetor da doença¹³. Sabendo de sua capacidade infecciosa, cabe comentar a maneira com que o tripomastigota penetra a célula do hospedeiro.

Logo ao anexar-se aos receptores de superfície de uma célula, o parasita provoca a indução de uma elevada concentração de íons Ca^{2+} no sítio de interação pelo lado do citosol. O sinal de iônico recruta lisossomos, que se fundem à membrana celular dando origem a um compartimento quase completamente constituído da membrana lisossomal. O parasita utiliza este novo compartimento como porta de entrada para o meio intracelular. Dentro do compartimento no qual se encontra, o parasita libera uma enzima cuja função é remover o ácido siálico, uma hexose, presente nas glicoproteínas do lisossomo, transferindo-as para sua própria superfície. Dessa forma, o parasita termina revestido com moléculas de açúcar do hospedeiro. Em seguida, secreta uma toxina formadora de poros que resulta na lise da membrana do compartimento do lisossomo, libertando o parasita no citoplasma da célula hospedeira, onde começa o ciclo reprodutivo⁷.

Figura 4. Processo de invasão do *T. cruzi* em células hospedeiras



Fonte: ALBERTS, B., 2008, p. 1510

1.1.4 Efeitos da Doença

A patologia é dividida, clinicamente, em duas fases caracterizadas pela gravidade de seus efeitos e cada qual contendo suas próprias classificações: a fase aguda e a fase crônica.

O primeiro caso classificado como agudo é a forma *assintomática*, diagnosticada em mais da metade dos pacientes. Sendo a doença assintomática, ela permanecerá neste estágio durante toda a vida do indivíduo infectado³. A segunda forma aguda é a *sintomática*, marcada por febre e inchaço de glândulas com duração de algumas semanas. As formas da fase aguda são mais frequentemente observadas em crianças, sendo que 20 a 30% dos pacientes neste estágio irão progredir para a fase crônica^{1,14}.

A fase crônica da doença é dividida em: *indeterminada*, que é a forma evoluída da fase aguda. Está presente em 60% dos indivíduos diagnosticados e gera alterações patológicas pouco significativas¹⁴. A forma *cardíaca* é caracterizada por comprometer progressivamente o tecido do miocárdio, levando à insuficiência cardíaca. É a forma mais grave da doença e é causa da maioria das mortes¹. A forma *digestiva* afeta o tubo digestivo do indivíduo, causando megaesôfago e megacólon. A última forma crônica existente é a *nervosa*, na qual o indivíduo apresenta alterações no sistema nervoso central e periférico³.

Todos os sintomas crônicos são consequência direta da desnervação do sistema parassimpático autônomo do indivíduo infectado².

1.1.5 Tratamento Medicinal

Por definição da Organização Mundial da Saúde, a droga ideal para o tratamento da doença de Chagas deve cumprir os seguintes requisitos: (I) levar à cura tanto dos casos agudos quanto crônicos; (II) ser efetiva em uma única ou apenas algumas doses; (III) ser vendida a baixo custo, de modo que seja acessível a todos os pacientes; (IV) não gerar efeitos colaterais ou teratogênicos; (V) não induzir resistência. Desafortunadamente, uma droga que cumpra todos os requisitos acima apresentados ainda não foi obtida¹³.

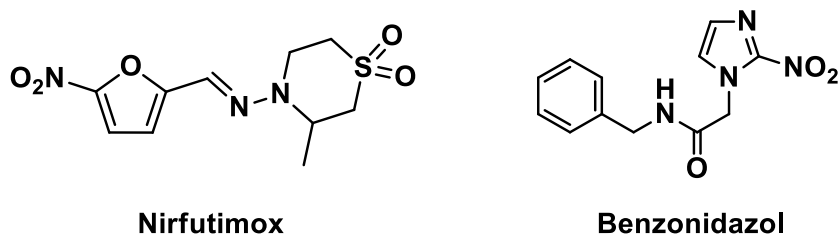
Desde 1912, diversas drogas foram testadas em ensaios clínicos, mas apenas anos depois, em 1952, Packachanian demonstrou que nitrofuranos eram moléculas promissoras ao estudar a nitrofurasona. Este composto foi testado em experimentos realizados por Brener em 1962, no qual a nitrofurasona foi administrada via oral em ratos durante 53 dias consecutivos. O resultado do experimento foi a cura de 95,4% dos animais. A partir destes trabalhos as pesquisas para o tratamento da doença de Chagas começaram com maior eficiência^{2,13}.

Apesar do sucesso do tratamento em ratos, a administração da nitrofurasona em humanos realizado por Coura e colaboradores entre 1961 e 1962 não foi bem-sucedida. A maioria dos pacientes submetidos a diferentes doses do composto tiveram que interromper o tratamento por conta dos severos efeitos colaterais gerados pelo uso da droga. Seis pacientes haviam sido inicialmente escolhidos para serem submetidos a um tratamento de longo prazo. Destes, apenas dois foram considerados curados após comprovação de testes sorológicos¹³.

Para tratamento prático dos infectados as medidas inicialmente aplicadas seguem as diretrizes definidas em 1997 por um conselho de especialistas em conjunto com o Ministro da Saúde. Estas medidas foram posteriormente reavaliadas pela Organização Pan-Americana de Saúde em 1978 e são as vigentes até hoje². De acordo com a decisão do órgão apenas duas drogas são legalmente aceitas para

o tratamento da doença: o nifutimox, patenteada pela empresa Bayer, e o benzonidazol, cuja patente pertence a ao laboratório Hoffman-La Roche, cedida ao governo brasileiro para produção pela LAFEPE¹⁷. No Brasil estes compostos foram comercializados com os nomes Lampit e Rochagan, respectivamente. Entretanto, devido ao baixo interesse das empresas farmacêuticas quanto a doenças tropicais, uma vez que a produção de medicamentos destinados ao seu tratamento não é lucrativa, a produção e venda do nifurtimox no Brasil foi encerrada¹³.

Figura 5. Estrutura dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas



Fonte: Adaptado de GONZÁLEZ, M.; et all.; 2012.

As duas drogas citadas apresentam atividade contra as formas tripomastigota e amastigota, aquelas encontradas dentro do organismo do hospedeiro, e devem ser aplicadas por cerca de 60 dias. Resultados em indivíduos infectados mostram que o uso do benzonidazol leva a cura de 80% dos pacientes em fase aguda e 20% dos que se encontram na fase crônica, sendo este mais efetivo do que o nifurtimox para o segundo caso^{3,15}. Infelizmente o uso de ambos os medicamentos causa graves efeitos colaterais como anorexia, perda de peso, hiperexcitabilidade, depressão medular, vertigens, cefaleia e dores abdominais^{1,6}.

Algumas outras drogas demonstraram efeito *in vitro*, como o allopurinol e certos inibidores de ergosterol, como o cetoconazol e itraconazol. Ensaios utilizando estas moléculas levaram invariavelmente à cura das células infectadas, no entanto apenas o itraconazol se mostrou efetivo *in vivo*, ainda que levando a baixa porcentagem de cura^{2,16}.

1.1.6 Mecanismo de Ação dos Medicamentos

A ação do nifurtimox começa com a formação do nitro ânion radical por nitroredutases. A reação metabólica gera, na presença de oxigênio, intermediário radicalares muito reativos, como por exemplo o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$). Uma vez que o *T. cruzi* é deficiente em mecanismos de desintoxicação de radicais, o parasita se torna suscetível a estes intermediários que se ligam a peptídeos, proteínas e ao próprio DNA do parasita^{13,14,16}.

O mecanismo de ação do benzonidazol se dá por um caminho diferente daquele do nifurtimox. A presença deste composto causa alterações na síntese de macromoléculas ao formar ligações covalentes ou outras interações entre os intermediários de nitroredução e compostos celulares. Também afeta a manutenção metabólica do protozoário pela ligação direta com o DNA, lipídeos e proteínas do parasita¹³.

1.2 Estratégia de Brusca por Possíveis Drogas: Inibição Enzimática

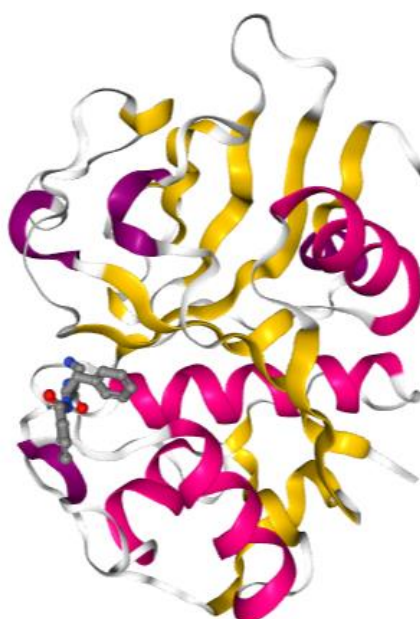
1.2.1 A Enzima Cruzaína

A Cruzaína, ou Cruzipaína, ou ainda GP57/51, é membro da família papaína C1 de cisteíno proteases, uma família de enzimas proteolíticas com diversas funções e amplamente distribuídas na natureza^{13,17}. Trata-se de uma glicoproteína de massa entre 52 e 58 kDa¹⁸ cuja estrutura é constituída de uma única cadeia polipeptídica de 215 resíduos de aminoácidos que se dividem em dois domínios: L e D. O primeiro é formado basicamente de α -hélices e fazem parte dele os resíduos 12 a 112 e 208 a 212. O segundo é constituído de uma extensa interação de folhas β antiparalelas, como tipicamente encontrado em outros membros da família das papaínas. Estão incluídos neste domínio os resíduos 1 a 11 e 113 a 207¹⁹.

Igualmente característica de proteínas semelhantes à papaína é a tríade catalítica Cys₂₅, His₁₅₉ e Asn₁₇₅ encontrada no sítio ativo da enzima. No caso específico da Cruzaína, além da tríade encontra-se também o resíduo Gln₁₉.

A figura abaixo mostra a estrutura cristalina da Cruzaína ligada a um inibidor com nitrilo warhead (N-(2-aminoetil)-N-alfa-benzoil-L-fenilalaninamida). A imagem mostra a enzima colorida de acordo com o tipo de estrutura secundária.

Figura 6. Estrutura da Cruzaína com ligante nitrila



Fonte: Protein Data Bank PDB:4QH6

A sequência gênica exata da Cruzaína foi reportada por completo por Eakin no ano de 1992, mostrando que sua estrutura possui 53% de equivalência em relação à cisteína protease encontrada no *Trypanossoma brucei*, agente etiológico da doença no sono, ou tripanossomíase africana¹⁹.

A Cruzaína encontra foco nas pesquisas relacionadas a doença de Chagas por ser o principal antígeno observado em todas as fases do ciclo evolutivo do *Trypanossoma cruzi*, tornando-a um excelente alvo para possíveis inibidores. A enzima pode ser encontrada principalmente na superfície do parasito quando na

forma amastigota (intracelular reprodutiva), em contato direto com o citoplasma do hospedeiro¹⁷.

1.2.2 Inibidores Enzimáticos

Inibidores enzimáticos são moléculas que anulam ou reduzem a atividade de determinada enzima ou grupo de enzimas por meio de interação reversível ou irreversível em pontos específicos na estrutura da proteína. A inibição ocorre porque o reconhecimento do ligante pela enzima causa uma série de modificações conformacionais e interações intermoleculares específicas que resultam no bloqueio da entrada do substrato no sítio ativo da enzima, impossibilitando que esta realize sua reação correspondente¹⁷.

Moléculas inibidoras de proteínas são usualmente vistas como compostos de interesse farmacêutico pela sua capacidade de impedir o funcionamento de enzimas importantes para a manutenção do microrganismo patológico.

Para serem consideradas drogas efetivas, os inibidores de proteínas devem apresentar: (I) caráter peptídico; (II) alta estabilidade a degradação proteolítica não seletiva; (III) boa permeabilidade em membranas; (IV) vida útil longa na corrente sanguínea e dentro das células; (V) baixa suscetibilidade à eliminação; (VI) alta seletividade e; (VII) boa biodisponibilidade. Usualmente os inibidores tem massa molecular menor do que 1000 Da²⁰.

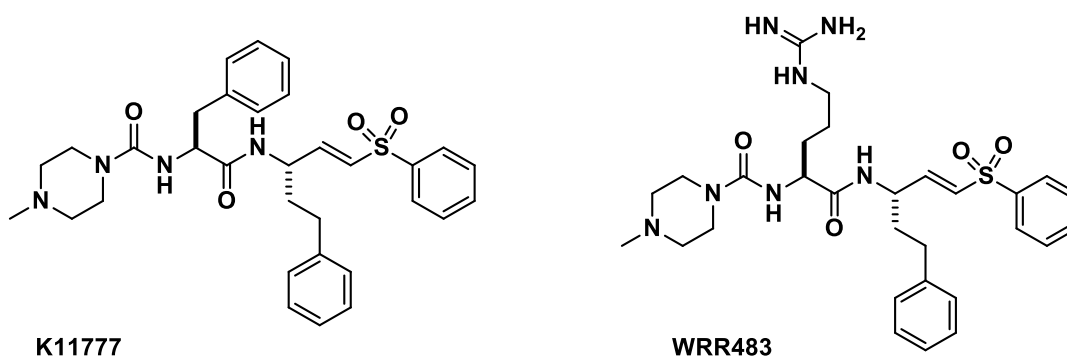
É importante ressaltar que identificar um novo composto para o tratamento de uma doença é um processo demorado, caro e imprevisível, com risco de fracasso na ordem de 80%. O tempo entre o descobrimento da droga certa até a prateleira da farmácia pode levar entre 8 e 14 anos, dependendo da complexidade dos testes clínicos, do foco e interesses da empresa patrocinadora²¹.

1.2.3 Inibidores Irreversíveis

A característica principal destes compostos é sua capacidade de interagir fortemente através da formação de ligações covalentes com o sítio ativo da enzima. A existência da ligação formada leva a enzima sua extinção via endocitose ou destruição química²¹.

Até recentemente os mais fortes inibidores de cisteína proteases, como a Cruzaína, eram do tipo irreversíveis no qual um “warhead” eletrofílico alquila a enzima através de substituição nucleofílica ou adição conjugada²². Na Figura 7 são apresentadas as estruturas de dois potentes inibidores irreversíveis inibidores de Cruzaína.

Figura 7. Inibidores irreversíveis da enzima Cruzaína



Fontes: Adaptado de YAO, S. Q.; HE, C. Y.; 2012.

Tanto o composto K11777 quanto o WRR483 apresentam um bom perfil farmacêutico, possuindo adequada solubilidade em água, disponibilidade oral, ausência de efeitos tóxicos ou mutagênicos, além de produzirem efeito aditivo ao serem combinados com benzonidazol. Ambos possuem o grupo vinissulfona em sua estrutura, função responsável pela interação irreversível com o resíduo Cys₂₅ do sítio ativo da Cruzaína por reação de adição de Michael, gerando uma ligação covalente carbono-enxofre. Atualmente os dois inibidores estão sendo utilizados em teste pré-clínicos avançados^{17,23,24}.

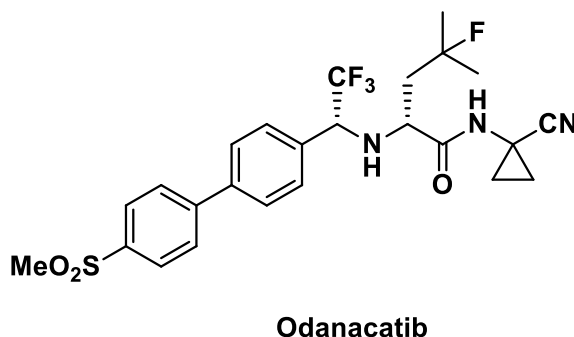
1.2.4 Inibidores Reversíveis

Geralmente inibidores reversíveis agem por interação não covalente entre enzima e inibidor, embora existam casos nos quais a ligação covalente é de fato formada. Para estes a ligação que se dá é altamente sensível a hidrólise, tornando possível a separação do complexo enzima-inibidor. Exemplos deste tipo de compostos são dipeptidil aldeídos ou nitrilas, sendo a última a classe contendo os inibidores de cisteína preteases mais potentes dentre os inibidores reversíveis^{25,26}.

Os inibidores contendo grupo nitrila foram reportados primeiramente por Hanzlik, no qual foram utilizadas como inibidoras da papaína protease²⁷. Um segundo trabalho realizado por Gütschow e colaboradores²⁶ em 2005 reporta diversos azapeptídes nitrilas proteoliticamente estáveis como uma classe de inibidores que eficientemente formam adutos reversíveis no sítio ativo da cisteína. Para estes estudos a enzima modelo utilizada foi a catepsina K, uma serino protease.

Ainda mais recentemente o Odanacatib, inibidor reversível contendo nitrilo warhead entrou em fase de estudos clínicos avançados para tratamento da doença de Chagas e está também sendo usado em estudos para o desenvolvimento do tratamento de osteoporose pós-menopáusia^{28,29}.

Figura 8. Inibidor Reversível da enzima Cruzaína

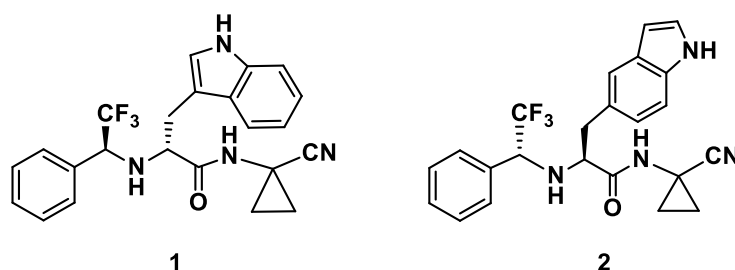


Fonte: Adaptado de BEAULIEU, C; et al.; 2010.

2. OBJETIVOS

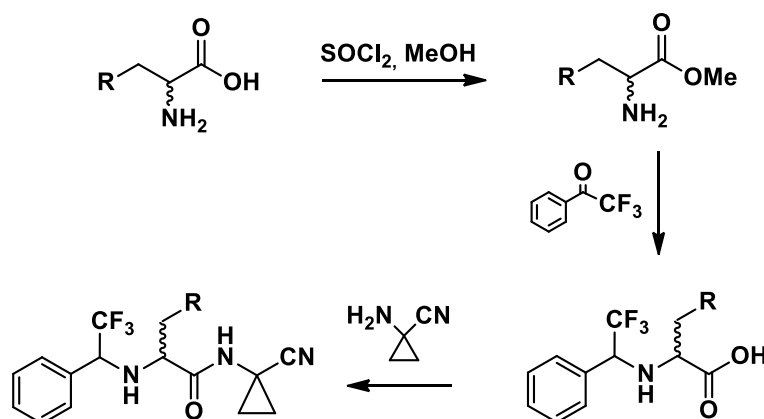
Em vista da importância dos compostos contendo grupo nitrila como possíveis fármacos para o tratamento da doença de Chagas, este trabalho tem por objetivo a síntese das seguintes dipeptidil-nitrilas que serão usadas em posteriores ensaios bioquímicos com intenção de avaliar sua efetividade como inibidores reversíveis da enzima Cruzaína.

Figura 9. Estrutura das dipeptidil-nitrilas alvos de síntese



A metodologia geral empregada para obtenção destes compostos, apresentada na Figura 10, segue a estratégia reportada em patente por Chen e colaboradores³⁰ em 2006. Utilizando esta rota deve-se iniciar a síntese com o aminoácido comercial que mais facilmente leve à molécula alvo, passando por reação de esterificação e inserção de moléculas como trifluoroacetofenona e a ciclopilaminonitrila, nesta sequência.

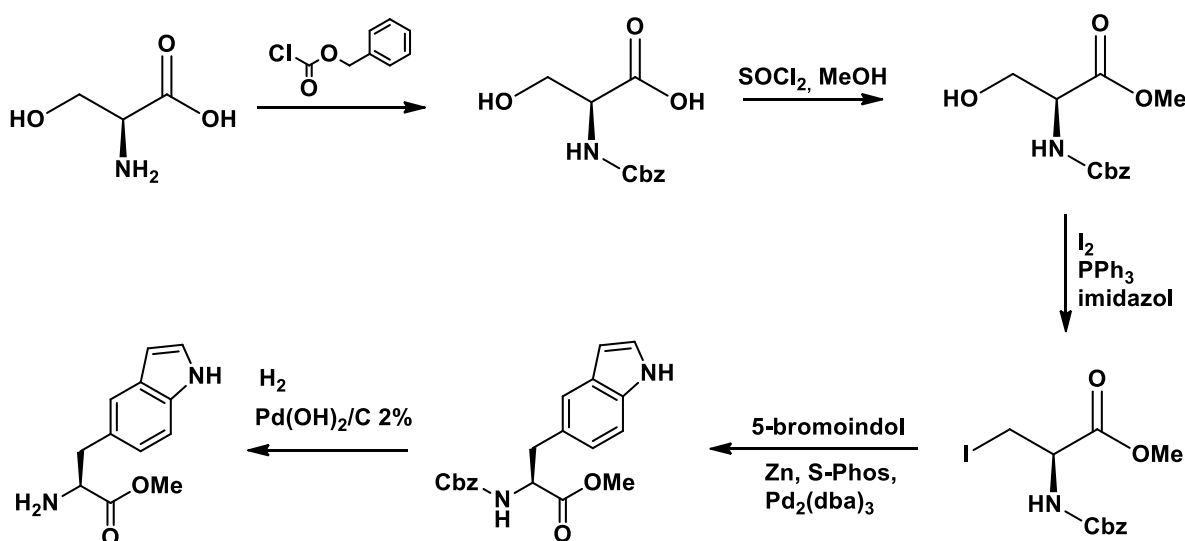
Figura 10. Rota geral de preparo de dipeptidil-nitrilas a partir de aminoácidos



O composto **1** pode ser facilmente preparado pela a rota apresentada tendo o D-triptofano como molécula inicial. O aminoácido necessário para a síntese da dipeptidil-nitrila **2**, no entanto, é comercialmente disponível apenas contendo o grupo amina protegido por Fmoc. Uma vez que a desproteção deste aminoácido, testada anteriormente por outro aluno do grupo, não foi eficiente, optou-se pela síntese completa da molécula a partir de um precursor mais distante, a L-serina.

Sendo assim, a rota escolhida para o preparo do composto **2** passa pela preparação do aminoácido de interesse a partir da L-serina e o 5-bromoindol, do qual provém o núcleo indólico da molécula e apenas depois segue pela rota proposta na Figura 10. O esquema sintético geral utilizado neste caso foi previamente descrito por Mcminn e colaboradores³¹ e é apresentado na Figura 11.

Figura 11. Rota sintética para preparação do aminoácido derivado da L-serina

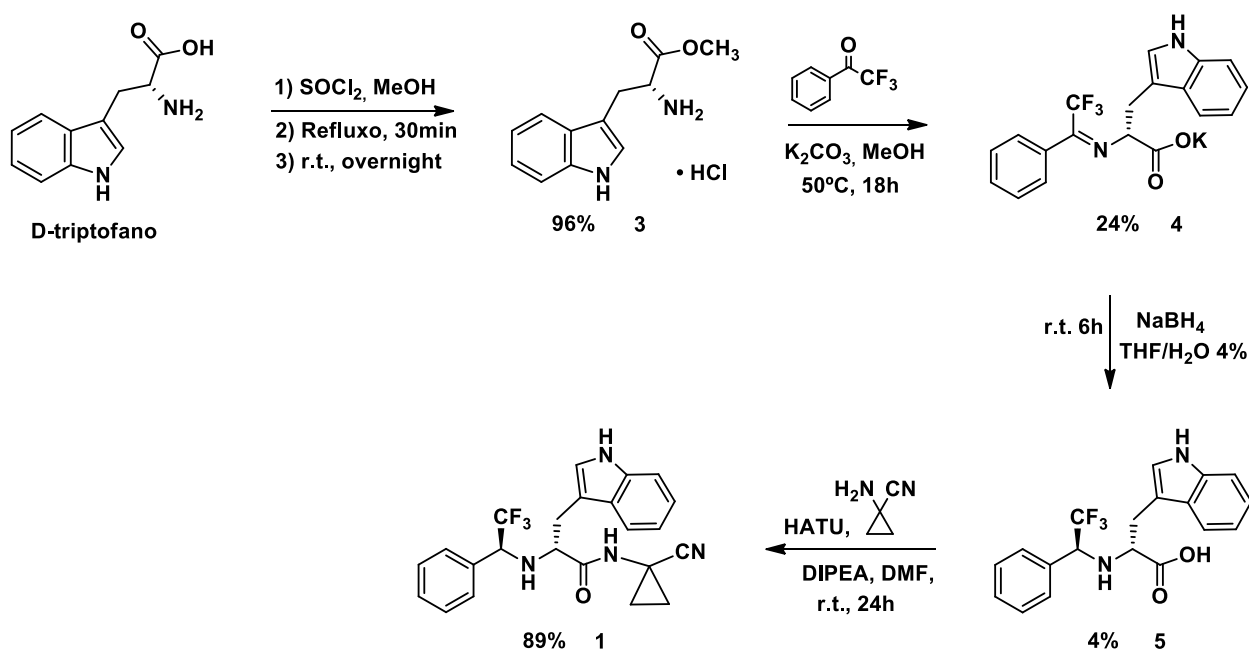


3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Preparação de Dipeptidil-nitrila a Partir do D-triptofano

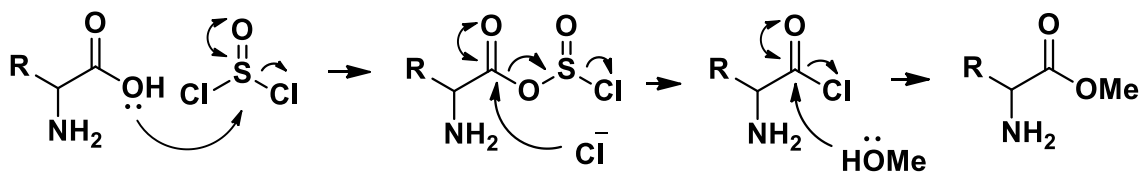
A estratégia empregada na produção do composto **1** envolveu a realização de 4 etapas consecutivas, da maneira disposta na Figura 12. Na primeira etapa o isômero D do triptofano sofre esterificação por um método clássico, utilizando cloreto de tionila em metanol. O aminoéster é facilmente obtido em alto rendimento.

Figura 12. Rota sintética empregada para preparação da dipeptidil-nitrila **1**



O mecanismo desta reação tem início quando a hidroxila do grupo ácido do triptofano realiza um ataque nucleofílico sobre o átomo de enxofre do cloreto de tionila, liberando ácido clorídrico. O íon cloreto vindo da ionização do ácido realiza então um segundo ataque nucleofílico, desta vez sobre a carboxila, liberando dióxido de enxofre e ácido clorídrico. Um terceiro ataque acontece pela hidroxila do metanol sobre a carbonila do cloreto de ácido recém formado, levando ao aminoéster simultaneamente com a expulsão de um íon cloreto.

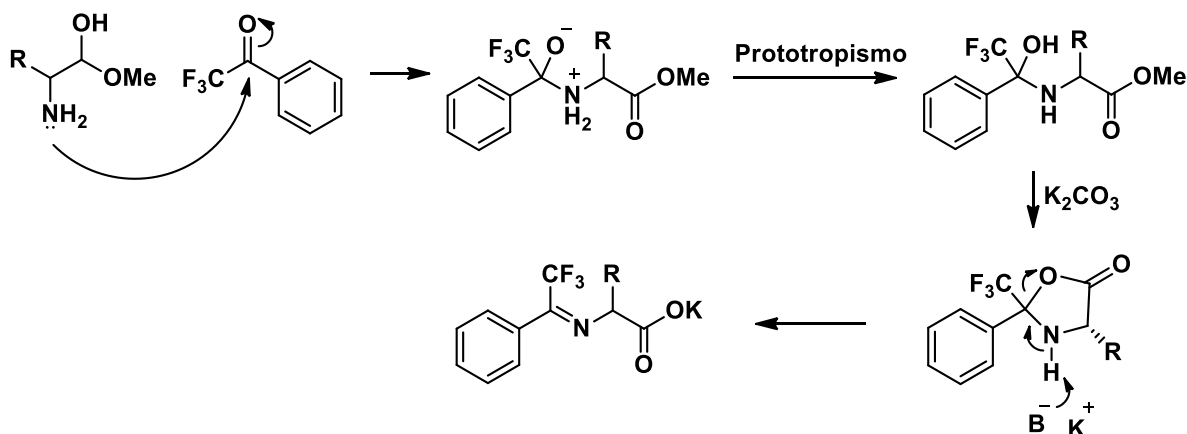
Figura 13. Mecanismo de formação do aminoéster



O aminoéster foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C , através dos quais a obtenção do produto pôde ser confirmada pela presença de um singlete em 3,80 ppm referente aos três hidrogênios da metila do éster, e o sinal em 170,8 ppm correspondente ao carbono da carbonila.

Dando seguimento a rota sintética, a segunda e terceira etapas juntas levam à aminação redutiva do aminoéster pela condensação com 2,2,2-trifenilacetofenona seguido de redução por boroidreto de sódio. Na primeira reação, representada na Figura 14, a condensação ocorre pelo ataque nucleofílico do par de elétrons livre da amina do aminoéster à carbonila do reagente a ser incorporado, passando por transferência de próton no intermediário tetraédrico. A presença de K_2CO_3 a elevada temperatura (50°C) conduz a um intermediário cíclico antes da formação do sal de potássio, como representado na Figura 14.

Figura 14. Esquema da formação da imina em condições básicas como descrito por Hughes



Fonte: Adaptado de HUGHES, G.; DEVINE, P. N.; NABER, J. R.; et al.; 2007

Usualmente são encontrados na literatura exemplos nos quais, em uma única etapa, a imina é gerada e pela adição direta do agente redutor é levada a amina sem necessidade de *workup* entre as duas reações. Por outro lado, esta reação foi também descrita por Hughes e colaboradores num estudo de aminação redutiva diastereoseletiva³² no qual apresentam uma metodologia utilizando base de força moderada como K₂CO₃, através da qual é possível isolar a imina na forma de carboxilato de potássio, que é retirado do meio reacional por precipitação em éter metil-terc-butílico.

Após isolar a imina usando o método citado acima a reação de redução era realizada o mais rápido possível devido à instabilidade do composto formado, preferencialmente no mesmo dia em que o carboxilato de potássio era produzido. Para a completa redução do composto utilizou-se 3 equivalentes de boroidreto de sódio.

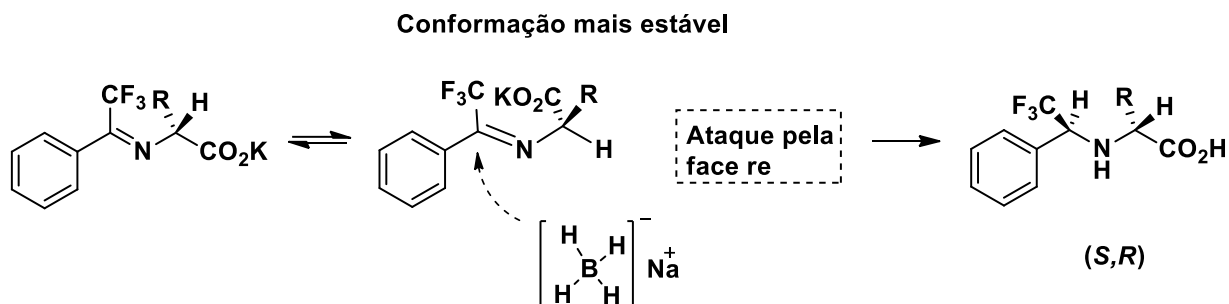
Nota-se que na etapa de redução foi obtido um rendimento extremamente baixo. Isso se deve não a má qualidade da metodologia utilizada, mas sim por perdas de massa durante *workup* e purificação. A redução por NaBH₄ foi realizada uma única vez para este composto em específico, dado que a massa final requerida para os testes biológicos é da ordem de poucos miligramas e a quantidade de produto obtido nesta etapa foi suficiente para prosseguir para a última reação.

Ainda neste assunto, cabe fazer uma importante observação: o aminoácido inicial possui um estereocentro de configuração *R* que permanece inalterado durante todo o procedimento de preparação da dipeptidil-nitrila. Apenas durante a etapa de redução da imina ocorre o surgimento de um segundo estereocentro na molécula, sendo que sua configuração preferencial (*R* ou *S*) pode ser direcionada pela escolha do agente redutor correto. Na abordagem já mencionada optou-se pelo boroidreto de sódio, um agente redutor que induz a formação do isômero *anti* (*S,R*) (**5**), ou seja, que induz a configuração *S* no novo carbono quiral.³²

Isto ocorre pois, em solução, a conformação de menor energia da molécula é aquela na qual o hidrogênio ligado ao carbono quiral é coplanar a ligação C=N da imina. Dessa forma o núcleo indólico se encontra posicionado em direção à face *si* da molécula, impedindo-a estericamente. Como a função carboxilato é menor do que

o substituinte indol o resultado é o ataque preferencial do hidreto pela face *re*, que leva ao isômero *anti*, como representado na Figura 15.

Figura 15. Redução estereoseletiva por boroidreto de sódio



A análise do composto por cromatografia de alta eficiência (HPLC) para comprovar a seletividade enantiomérica da reação não foi realizada, porém, estudos anteriores³² confirmam que a redução por borohidreto de sódio leva também neste caso a formação preferencial do isômero *anti* sobre o *syn* em uma proporção $\geq 95\%$.

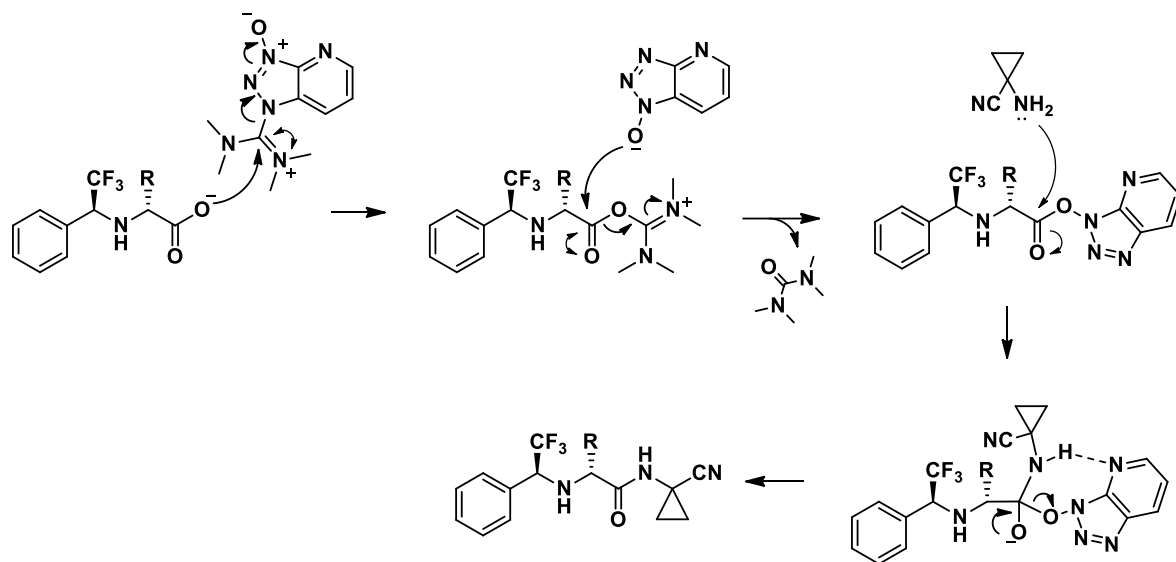
Para caracterização da molécula foi efetuado RMN de ^1H , no qual se percebe a ausência do singlete em 3,80 ppm correspondente aos hidrogênios da metila do aminoéster, e o aparecimento de sinais na região dos aromáticos referentes aos cinco hidrogênios fenílicos, além do quarteto em 4,03 ppm que corresponde ao hidrogênio do carbono vizinho ao grupo trifluorometil. Este mesmo carbono é perceptível no espectro de RMN de ^{13}C em 63,5 ppm.

Por fim, a síntese é completada na quarta etapa com a formação da ligação peptídica ao incorporar a ciclopropilaminonitrila em uma reação de 24h em meio básico na presença do agente de acoplamento HATU, ou hexafluorofosfato de 2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)1,1,3,3-tetrametilurônio, formando o composto **1**.

O mecanismo desta reação é apresentado na Figura 16. Nela o ânion carboxilato reage com o HATU para formar um sal isourônio e o ânion OAt, ou O-acil(tetrametil)isourônio. Logo que formado o ânion OAt ataca a carbonila dando origem a forma ativa do éster. A reação termina com o ataque nucleofílico da amina presente na ciclopropilamina, passando por um intermediário estável formado pela

interação do par de elétrons não-ligantes do nitrogênio do anel piridínico e o hidrogênio da ciclopropilamina.

Figura 16. Mecanismo da reação de acoplamento peptídico usando HATU



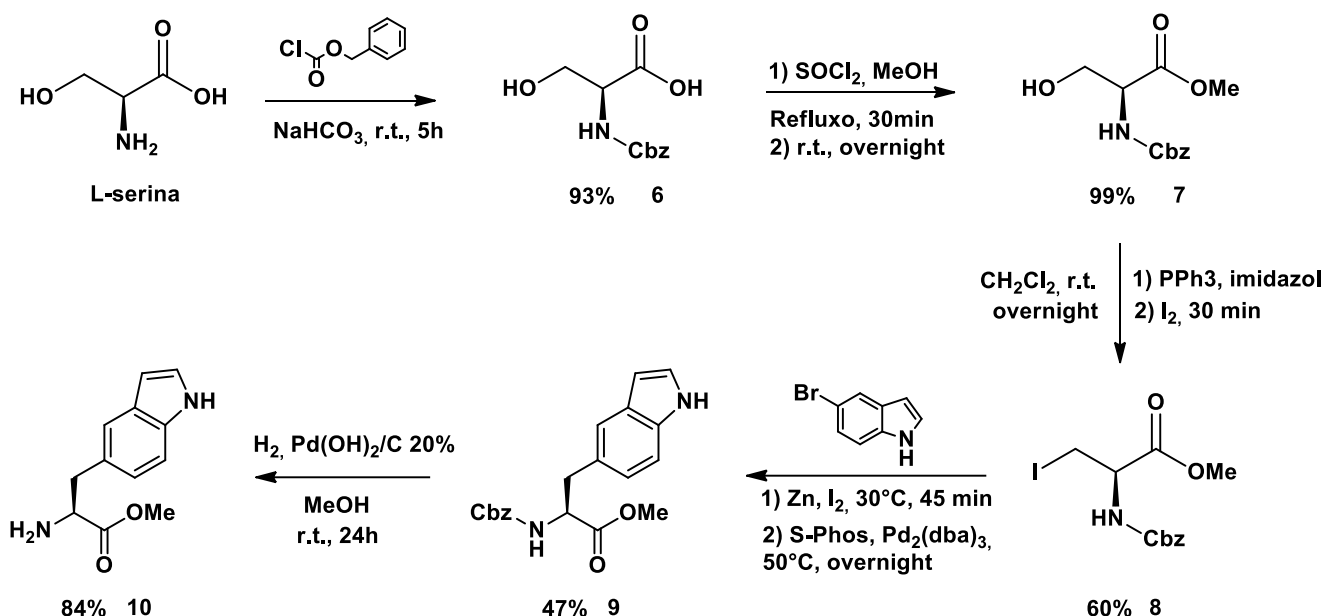
A estrutura da dipeptidil-nitrila foi comprovada através de análise dos espectros de RMN de ¹H, no qual se percebe a presença dos hidrogênios do ciclopropil em 1,57, 1,22 e 1,15 ppm, assim como os hidrogênios geminados da molécula de triptofano aparecendo como duplos dubletos em 3,26 e 2,93 ppm. Os picos referentes aos hidrogênios do indol e do anel aromático vindos da trifluoroacetofenona também são perceptíveis no espectro entre 7,36 e 6,74 ppm. A presença do carbono da função amida também pode ser percebida pelo pico característico em 174,5 ppm no espectro de RMN de ¹³C.

3.2 Preparação de Dipeptidil-nitrila a Partir da L-serina

No caso da dipeptidil-nitrila **2**, a abordagem utilizada começa pela produção do aminoácido contendo o núcleo indólico na posição desejada. Para sua obtenção foi seguida a metodologia apresentada por McMinn³¹, cuja descrição metodológica tem início pela síntese do composto **8**. Por conta disso, as moléculas **6** e **7** foram

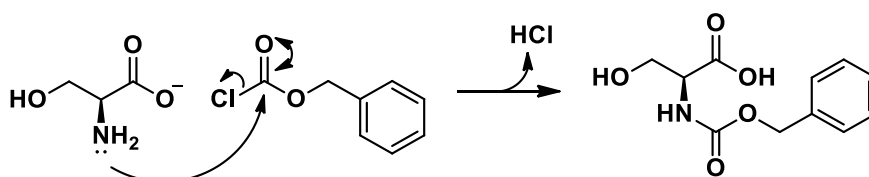
produzidas utilizando procedimentos anteriormente adotados no grupo a partir da L-serina.

Figura 17. Primeira parte da síntese da dipeptidil-nitrila **2**



Nestas reações iniciais ocorre primeiramente a proteção da função amina do aminoácido com cloroformato de benzila (Cbz) em solução aquosa de NaHCO_3 . Mecanicamente, ocorre o ataque nucleofílico da amina do aminoácido inicial sobre a carbonila da molécula de Cbz, levando à expulsão de um íon cloreto na forma de ácido clorídrico, dando origem ao aminoácido protegido. Em solução, o ácido clorídrico formado reage com o bicarbonato de sódio formando cloreto de sódio, gás carbônico e água.

Figura 18. Mecanismo de proteção com Cbz



A caracterização do composto foi realizada por RMN de ^1H e de ^{13}C . No primeiro a entrada do grupo de proteção é evidenciada pela presença de um multiplete em 7,28 – 7,38 ppm correspondentes aos cinco hidrogênios aromáticos e um singlete em 5,11 ppm, referentes aos dois hidrogênios benzílicos do grupo Cbz. Enquanto isso, no espectro de RMN de ^{13}C é possível perceber o sinal referente à carbonila do grupo protetor em 158,5 ppm e os sinais correspondentes aos carbonos do anel aromático em 138,1, 129,4, 129,0 e 128,8 ppm.

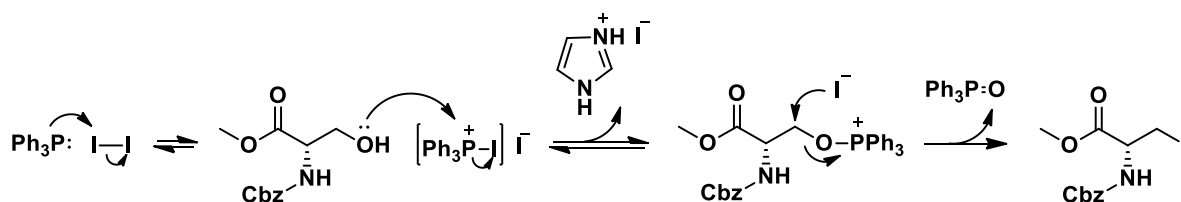
A segunda etapa foi a esterificação da carboxila utilizando cloreto de tionila em metanol, reação cujo mecanismo foi apresentado na Figura 13, de forma a obter o aminoéster de serina. Tanto a primeira quanto a segunda etapa da rota em questão foram eficientes, resultando em elevados rendimentos.

O aminoéster de serina foi analisado por RMN de ^1H , no qual a formação do éster é verificada pela presença de um singlete em 3,73 ppm referente aos três hidrogênios metílicos. Da mesma forma o carbono da metila foi observado como um sinal em 52,8 ppm no espectro de RMN de ^{13}C .

A rota sintética segue com a reação de iodação do aminoéster, realizada na presença de trifetilfosfina e imidazol em diclorometano. O procedimento utilizado nesta etapa foi ligeiramente diferente daquele descrito por McMinn no que se refere à temperatura de adição do iodeto e do composto **7** ao meio reacional, assim como a maneira como é feito o *workup*. As alterações realizadas aumentaram a velocidade de montagem do sistema reacional e elevaram o rendimento conseguido para a reação se comparado a quando foi utilizado o procedimento encontrado na patente.

A reação de iodação iniciou-se pela formação do iodeto de trifetilfosfina gerado pelo ataque nucleofílico da trifetilfosfina a molécula de I_2 . A hidroxila presente no aminoéster então realiza uma reação do tipo $\text{S}_\text{N}2$ sobre o iodeto de trifetilfosfina que origina um ânion iodo, capturado pelo imidazol presente no meio reacional, e o intermediário ligado a trifetilfosfina. Uma segunda substituição nucleofílica ocorre quando o iodeto ataca o carbono diretamente ligado ao oxigênio, liberando óxido de trifetilfosfina como grupo abandonador.

Figura 19. Mecanismo da reação de iodação com trifenilfosfina e imidazol

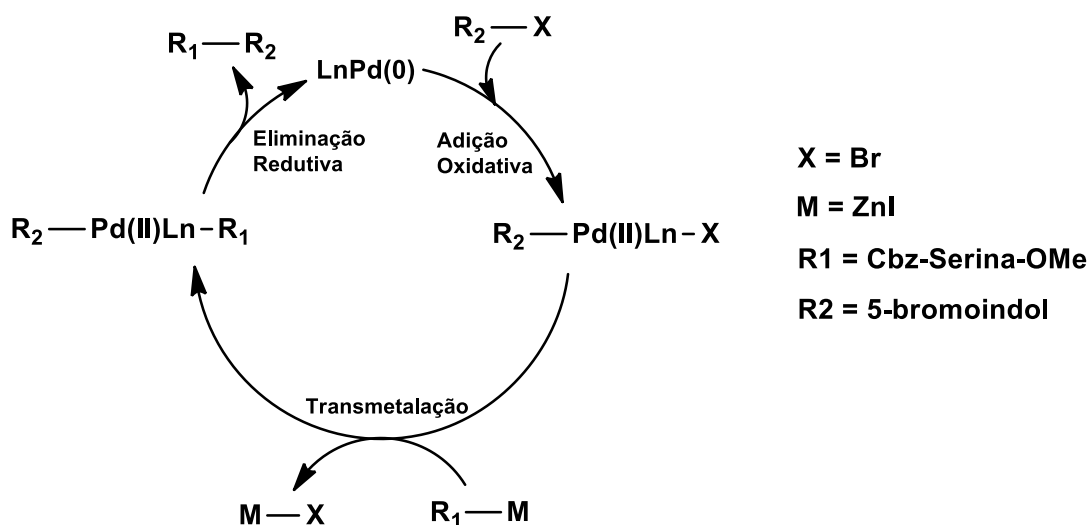


Os espectros de RMN de ^1H tanto para o material de partida (**7**) quanto o produto são, como esperado, bastante semelhantes, uma vez que sua estrutura muda apenas pela troca de um grupo funcional. A formação do iodeto, entretanto, foi percebida pelo deslocamento dos duplos dubletos referentes aos hidrogênios do carbono diretamente ligado à hidroxila no composto inicial. No composto **7** o deslocamento para os hidrogênios geminais encontra-se em 3,86 e 3,80 ppm, o que os posiciona como átomos moderadamente desblindados por conta do grupo retirador de elétrons (átomo de oxigênio) no carbono vizinho. Enquanto isso para o composto **8** este deslocamento passou para uma região ligeiramente mais blindada, em 3,59 e 3,47 ppm, sugerindo a mudança do grupo funcional vizinho para um grupo menos retirador de elétrons do que a hidroxila, como é o caso do iodo.

Na sequência realizou-se a etapa chave para formação do aminoácido contendo o núcleo indólico como almejado: a reação de acoplamento cruzado de Negishi, responsável pela formação da ligação carbono-carbono entre o aminoéster e o 5-bromoindol.

Seguindo o clássico ciclo catalítico para esta reação (Figura 20), o catalisador de paládio inicialmente na forma de $\text{Pd}(0)$ sofre uma adição oxidativa ao interagir com o haleto orgânico para formar o complexo de $\text{Pd}(\text{II})$. Durante a transmetalização o grupo R do composto organozinco gerado *in situ* toma o lugar do ânion haleto no complexo de paládio formando ZnBrI (M-X). Na fase final do ciclo o catalisador de $\text{Pd}(0)$ é regenerado e o produto de acoplamento é liberado do complexo.

Figura 20. Ciclo catalítico para acoplamento de Negishi

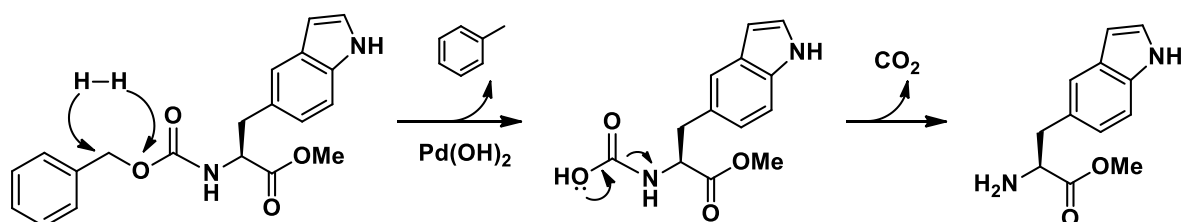


Fonte: Adaptado de VELOSO, D. P.; TEIXEIRA, R. R.; BARBOSA, L. C. A.; 2007

No procedimento adotado o catalisador de paládio utilizado foi o $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ produzido no próprio laboratório. A reação foi realizada em condições anidras a 50°C *overnight*, na presença de S-Phos, resultando em um rendimento de 47%.

A última etapa da primeira parte da abordagem apresentada é a desproteção do grupo amino por hidrogenação catalítica com $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20%, cujo mecanismo é apresentado de maneira simplificada na Figura 21. No espectro de RMN de ^1H do produto reacional percebeu-se a ausência dos sinais pertencentes ao grupo Cbz em aproximadamente 5,10 ppm e na região de hidrogênios aromáticos (7,40-7,20 ppm). A falta do sinal em 155,9 ppm referente ao carbono benzílico do Cbz no espectro de RMN de ^{13}C também é facilmente identificável e igualmente comprovou a retirada do grupo protetor.

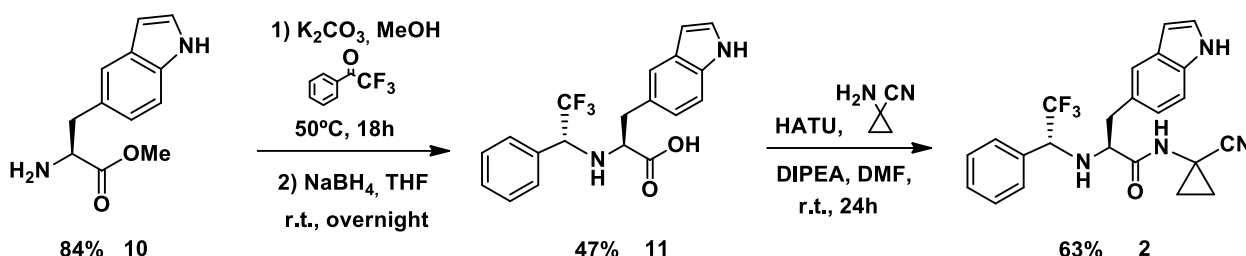
Figura 21. Mecanismo simplificado da reação de desproteção por hidrogenação



Vale comentar que a etapa de desproteção também foi realizada diferente do prescrito na patente de McMinn, na qual se utiliza Pd/C como catalisador da hidrogenação. É inclusive importante ressaltar que os melhores resultados tanto para reação de acoplamento quanto para a desproteção só foram obtidos ao reproduzir o procedimento com mais de 50 mg de material de partida.

A segunda parte da rota sintética envolve as mesmas reações apresentadas no item anterior (rota do D-triptofano), como representado na Figura 22, contendo pequenas alterações na etapa de aminação reductiva.

Figura 22. Segunda parte da síntese da dipeptidil-nitrila **2**



Diferente do observado na rota com o triptofano, ao reagir com a 2,2,2-trifluoroacetofenona não foi possível separar a imina formada do meio reacional. De modo que neste caso as etapas de geração e redução da imina foram realizadas *one-pot*, levando a um rendimento de 47%. É importante ressaltar que da mesma forma que na rota anterior, o uso de boroidreto de sódio como agente redutor leva somente ao isômero *anti*, ou *R,S*.

O produto reduzido foi caracterizado por RMN de 1H e de ^{13}C . Nestes a presença do anel aromático proveniente da trifluoroacetofenona foi perceptível pelos sinais entre 7,29 e 7,22 ppm no espectro de RMN 1H e entre 135,2 e 128,0 ppm no espectro de RMN de ^{13}C . Assim como explicado na rota anterior, a proporção enantiomérica obtida na reação de redução por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) não foi realizada, mas trabalhos anteriores contataram para essa reação uma razão *anti:syn* de 95:5.

Por fim, a formação da ligação peptídica para inclusão do grupo nitrila presente na ciclopropilaminonitrila encerrou a síntese da dipeptidil-nitrila **2**. Sua

estrutura final foi comprovada por análise dos espectros de RMN de ^1H , no qual se observam, à semelhança do composto **2**, os picos referentes aos hidrogênios do ciclo de três membros em 1,17 e 1,62-1,51 ppm e os hidrogênio geminados do carbono adjacente ao núcleo indólico em 6,71 e 6,80 ppm. Os hidrogênios aromáticos dos compostos apareceram na região entre 6,45 e 7,72 ppm, sendo o hidrogênio em 6,45 ppm um indício marcante da presença do indol. No espectro de RMN de ^{13}C o carbono referente à amida apareceu como um sinal em 174,2 ppm, enquanto os sinais em 20,1, 17,0 e 16,4 ppm representaram os carbonos do ciclo de três membros.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu descrever a síntese completa de duas dipeptidil-nitrilas contendo núcleo indólico a partir de aminoácidos essenciais de fácil acesso comercial. A abordagem iniciada pelo D-triptofano levou ao produto de interesse em 4 etapas nas quais foram obtidos rendimentos entre 96% e 4%. Já a rota a partir da L-serina levou à dipeptidil-nitrila desejada em 7 etapas, das quais duas haviam sido testadas na rota anterior. Nas reações empregadas na segunda rota obteve-se sempre rendimentos bons (entre 100 e 84%) ou aceitáveis (na faixa de 47%).

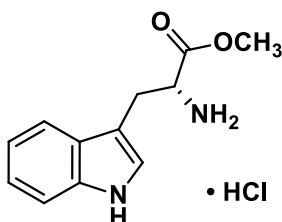
Apesar de escassamente relatadas na literatura em comparação aos compostos inibidores irreversíveis, percebeu-se que a preparação de possíveis inibidores reversíveis de caráter peptídico contendo nitrilo warhead, como são os compostos neste trabalho descritos, são possíveis de serem produzidos por meio de reações simples, sem grande complexidade. Este fato torna as dipeptidil-nitrilas práticas moléculas sobre as quais testes biológicos podem ser realizados.

Como expansão do trabalho realizado para a obtenção da dipeptidil-nitrila **2** (isômero *anti*), foi produzido em um trabalho pertencente ao mesmo projeto o isômero *syn*, ou S,S, empregando boroidreto de zinco durante a redução da imina formada a partir do composto **10**.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Procedimentos para o preparo das moléculas da rota do D-Triptofano

(*R*)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanoato de metila **3**

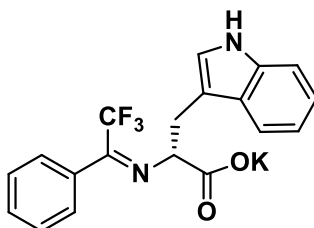


Em um balão de 25 mL acoplado a um condensador de refluxo sob atmosfera inerte adicionou-se 2 g (9,79 mmol) de D-triptofano e MeOH seco suficiente para dissolver o sólido. O balão foi posto em banho de gelo e adicionou-se lentamente 2 g (1,25 mL, 17 mmol, 1,7 eq) de cloreto de tionila destilado. A reação foi deixada em agitação a temperatura ambiente por 2 h e 30 min, seguidos de 30 min em refluxo. A solução foi deixada overnight. O solvente foi então evaporado e o sólido lavado com éter etílico. Obteve-se 2,39 g (96%) do produto na forma de um sólido branco.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7,55 (d, J = 8 Hz, 1H); 7,40 (d, J = 8 Hz, 1H); 7,21 (d, J = 8 Hz, 1H); 7,15 (t, J = 8 Hz, 1H); 7,07 (t, J = 8 Hz, 1H); 4,33 (m, 1H); 3,80 (s, 3H); 3,47 (dd, J = 15 e 6 Hz, 1H); 3,37 (dd, J = 15 e 7 Hz, 1H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 170,8; 138,3; 128,2; 125,6; 122,9; 120,3; 118,8; 112,7; 107,5; 54,6; 53,6; 27,6.

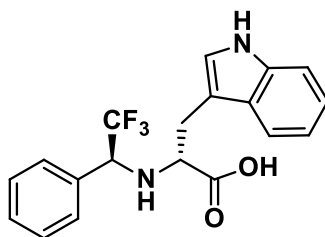
(*R,Z*)-3-(1H-indol-3-il)-2-(2,2,2-trifluoro-1-feniletilideno)amino)propanoato de potássio **4**



Em um balão de 25 mL ligado a um condensador de refluxo dissolveu-se 1,5 g (6,87 mmol) do composto **3** em 10 mL de MeOH e acrescentou-se 2,18 g (15,81 mmol, 2,3 eq) de K₂CO₃ e 1,20 g (6,87 mmol, 1 eq) de 2,2,2-trifluoroacetofenona. O sistema foi fechado sob atmosfera de argônio e deixado em refluxo 18 h a 50 °C. Após o tempo de reação filtrou-se em papel de filtro e evaporou-se o solvente em rotaevaporador. O sólido elástico resultante é então lavado com 25 mL de TBME e seco a pressão reduzida. Obteve-se 0,325 g (24,5%) do produto na forma de um sólido branco.

Análises – Não foram realizadas análises devido à instabilidade dos carboxilatos de potássio.

Ácido (*R*)-3-((1H-indol-3-il)-2(((*S*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletil)amino)propanoico **5**

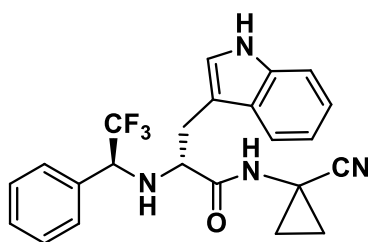


Em um balão de 10 mL adicionou-se 660 mg (1,656 mmol) do composto **4** em 7 mL de solução THF/H₂O 4%. Em seguida adicionou-se lentamente 188 mg (4,97 mmol, 3 eq) de NaBH₄ e deixou-se a reação em agitação sob atmosfera de argônio a temperatura ambiente por 6 h. O solvente foi então retirado em rotaevaporador e adicionou-se 25 mL de água destilada. Ajustou-se o pH da solução para 10 e extraiu-se com AcOEt (3x30 mL). A fase aquosa foi acidificada até pH 2 com solução de HCl e realizou-se uma segunda extração com AcOEt (5x30 mL). O produto foi seco e purificado em coluna tipo *flash* utilizando gradiente do eluente AcOEt:Hex, de 30% a 50%. O rendimento da reação foi de 4%.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8,09 (d, *J* = 21 Hz, 1H); 7,39–7,35 (m, 3H); 7,20 (dd, *J* = 15 e 8 Hz, 3H); 7,16–7,11 (m, 1H); 7,07 (t, *J* = 8 Hz, 2H); 7,01 (t, *J* = 8 Hz, 1H); 6,97 (s, 1H); 6,85 (d, *J* = 8 Hz, 2H); 4,02 (q, *J* = 7 Hz, 2H); 3,49 (dd, *J* = 9 e 5 Hz, 1H); 3,04 (dd, *J* = 15 e 9 Hz, 1H).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 136,5; 129,6; 129,4; 129,0; 128,7; 128,2; 123,3; 122,7; 122,6; 120,1; 120,0; 118,8; 118,6; 111,5; 111,4; 110,0; 63,5; 59,1; 29,8.

(*R*)-N-(1-cianociclopropil)-3-(1H-indol-3-il)-2(((*S*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletil)amino)propanamida **1**



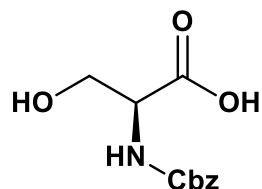
Em um balão de 25 mL foram dissolvidos 50 mg (0,138 mmol) do composto **5** em 2 mL de DMF seco. A seguir adicionou-se 18 mg (0,152 mmol, 1,1 eq) de ciclopropilaminonitrila, 78,7 mg (0,207 mmol, 1,5 eq) de HATU e 26,7 mg (36 mL, 0,207 mmol, 1,5 eq) de DIPEA. A solução foi deixada em agitação e sob atmosfera inerte por 24 h a temperatura ambiente. Dado o tempo da reação adicionou-se 15 mL de solução saturada de NaCl e extraiu-se com AcOEt (10 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente retirado em rotaevaporador. O produto foi purificado em coluna do tipo *flash* utilizando gradiente do eluente AcOEt:Hex, de 40% a 60%. O rendimento da reação foi de 89%.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8,19 (s, 1H); 7,69 (s, 1H); 7,34 (dd, *J* = 17 e 8 Hz, 2H); 7,18 (t, *J* = 7 Hz, 2H); 7,03 (t, *J* = 8 Hz, 1H); 6,99 (t, *J* = 8 Hz, 1H); 6,90 (s, 1H); 6,75 (d, *J* = 8 Hz, 2H); 3,37 (dd, *J* = 9 e 4 Hz, 1H); 3,26 (dd, *J* = 14 e 4 Hz, 1H); 2,93 (dd, *J* = 14 e 9 Hz, 1H); 1,57 (m, 2H); 1,22 (m, 1H); 1,15 (m, 1H).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 174,5; 136,5; 132,5; 129,2; 128,6; 127,8; 127,1; 123,3; 122,7; 120,1; 119,9; 118,5; 111,4; 110,0; 61,0; 60,5; 29,3; 21,2; 20,2; 17,1; 16,5; 14,3.

5.2 Procedimentos para o preparo das moléculas da rota da L-Serina

Ácido (S)-2-((benziloxi)carbonilamino)-3-hidroxipropanoico **6**

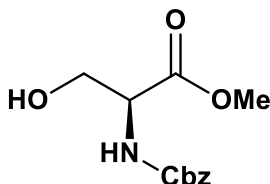


Em um balão de 250 mL, 4 g (38 mmol) de L-serina foram dissolvidos em 152 mL de NaHCO_3 . Lentamente e sob atmosfera inerte adicionou-se 9,56 g de cloroformiato de benzila (8 mL, 56 mmol, 1,5 eq). A reação foi deixada em constante agitação a temperatura ambiente e após 5 h foi extraída com dietil éter (6x30 mL). A fase aquosa foi então acidificada com 20 mL de HCl concentrado até pH 1, momento em que se observa a formação de um precipitado branco. Adicionou-se 150 mL de água destilada e extraiu-se com AcOEt (8x45 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente evaporado à vácuo. Obteve-se 8,44 g de produto (93%), sendo este um sólido branco.

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7,43-7,22 (m, 5H); 5,11 (s, 2H); 4,28 (t, J = 4 Hz, 1H); 3,86 (qd, J = 11 e 4 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 173,7; 158,8; 138,1; 129,4; 128,8; 67,7; 63,1; 57,7.

2-((benziloxi)carbonilamino)-3-hidroxipropanoato de (S)-metila **7**



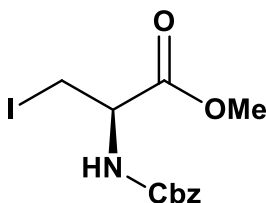
Em um balão de 500 mL sob atmosfera de argônio 8 g (33,4 mmol) do composto **7** foram solubilizados em 68 mL de MeOH seco e agitada a 0 °C. Adicionou-se lentamente 4 g (2,45 mL, 33,4 mmol, 1eq) de cloreto de tionila destilado e deixou-se a reação em agitação durante 1 h a 0 °C. Permitiu-se que a

mistura retornasse a temperatura ambiente e a reação seguiu-se por mais 14 h, seguindo-se a evaporação do solvente. O resíduo no balão foi solubilizado em MeOH, evaporado na sequência em rotaevaporador. Este procedimento de lavagem e evaporação foi realizado 5 vezes utilizando 8 mL de MeOH. O produto é um óleo transparente de clara tonalidade salmão. O rendimento foi quantitativo.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7,37-7,28 (m, 5H); 5,10 (s, 2H); 4,32 (t, 1H); 3,86 (dd, J = 12 e 7 Hz, 1H); 3,80 (dd, J = 11 e 4 Hz, 1H); 3,73 (s, 3H); 3,35 (s, 1H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 172,3; 157,9; 137,3; 129,1; 128,7; 128,5; 78,9; 78,6; 78,2; 67,6; 62,8; 57,3; 52,8.

2-((benziloxi)carbonilamino)-3-iodopropanoato de (*R*)-metila **8**

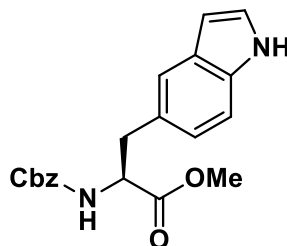


Em um balão de 25 mL adicionou-se 1,55 g (5,93 mmol, 1,5 eq) de trifenilfosfina e 400 mg (5,93 mmol, 1,5 eq) de imidazol, que foram dissolvidos em 6,8 mL de Cl_2CH_2 seco. 1,5 g (5,93 mmol, 1,5 eq) de iodo foram então adicionados durante um período de 30 min. Por fim adicionou-se a solução de 1 g (1,95 mmol) do composto **7** em 5 mL de Cl_2CH_2 , e a reação foi deixada overnight a temperatura ambiente sob atmosfera inerte. A mistura foi lavada com tiosulfato de sódio e purificada em coluna do tipo *flash* utilizando gradiente do eluente AcOEt:Hex, de 0% a 80%, para obter 0,856 g (60%) do produto na forma de sólido branco.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7,38-7,28 (m, 5H); 5,12 (s, 2H); 4,47 (t, 1H); 3,75 (s, 3H); 3,57 (dd, J = 10 e 4 Hz, 1H); 3,48 (dd, J = 10 e 7, 1H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 169,7; 155,4; 136,0; 128,6; 128,3; 128,1; 67,3; 54,1; 53,1.

2-((benziloxi)carbonilamino)-3-(1H-indol-5-il)propanoato de (S)-metila **9**

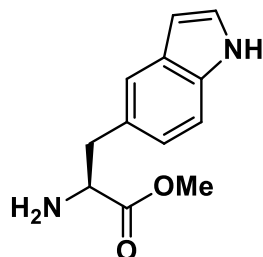


Em um balão previamente seco e sob atmosfera de argônio adicionou-se 270 mg (4,13 mmol, 3 eq) de zinco ativado e 97,40 mg (0,4 mmol, 0,3 eq) de iodo. O balão foi aquecido de modo que os grãos de iodo sublimassem em seguida resfriado até a temperatura ambiente para a adição de 0,7 mL de DMF seco. Uma solução contendo 500 mg (1,37 mmol) do composto **8** em 0,7 mL de DMF foi então adicionada e a mistura foi deixada em agitação por 5 min a temperatura ambiente, seguida de mais 45 min a 30 °C. Adicionou-se então a solução de 324 mg (1,65 mmol, 1,2 eq) de 5-bromoindol em 0,4 mL de DMF, 28,2 mg (0,069 mmol, 0,005 eq) de S-Phos e 25,2 mg (0,027 mmol, 0,02 eq) de Pd₂(dba)₃. A reação foi deixada sob agitação a 50 °C overnight e em seguida lavada com 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio e extraída com AcOEt (3x8 mL). A fase orgânica foi lavada uma última vez com 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio e concentrada a pressão reduzida. Foi, por fim, purificada em coluna do tipo *flash* utilizando gradiente do eluente AcOEt:Hex, de 10% a 50%, para obter 258 mg (46,9%) do produto puro, um viscoso óleo amarelo.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8,27 (s, 1H); 7,35-7,24 (m, 7H); 7,15 (t, 1H); 6,89 (d, *J* = 8 Hz, 1H) 6,46 (m, 1H); 5,23 (s, 1H); 5,08 (s, 2H); 4,68 (q, 1H); 3,70 (s, 3H); 3,19 (m, 2H).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 172,5; 155,9; 136,5; 135,2; 128,6; 128,3; 128,2; 128,2; 126,9; 127,7; 123,4; 121,4; 111,4; 102,6; 67,0; 55,4; 52,4; 38,4.

2-amino-3-(1H-indol-5-il)propanoato de (S)-metila **10**

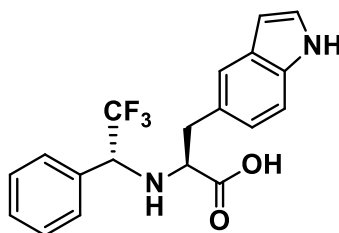


Em um balão de 25 mL, transferiu-se 214,64 mg (3,34 mmol, 1 eq) de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20% e adicionou-se uma solução de 1,32 g (3,34 mmol) do composto **9** em 14 mL de MeOH seco. A solução foi posta sob atmosfera de hidrogênio e deixada em agitação por 16 h a temperatura ambiente. Após este período a mistura foi filtrada com celite e o solvente evaporado a pressão reduzida, resultando em 0,612 mg (84%) de um óleo verde escuro de alta viscosidade.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 8,17 (s, 1H); 7,46 (s, 1H); 7,33 (d, J = 8 Hz, 1H); 7,20 (t, 1H); 7,01 (dd, J = 10 Hz, 1H); 6,50 (m, 1H); 3,78 (m, 1H); 3,73 (s, 3H); 3,21 (dd, J = 14 e 5 Hz, 1H); 2,94 (dd, J = 14 e 8 Hz, 1H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 175,8; 175,1; 128,4; 128,3; 124,7; 123,5; 121,4; 111,3; 102,6; 56,4; 52,1; 41,4.

Ácido (S)-3-(1H-indol-5-il)-2-(((R)-2,2,2-trifluoro-1-feniletil)amino)propanoico **11**



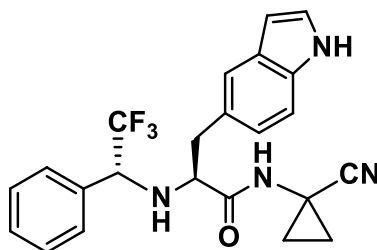
Em um viel foram dissolvidos 50 mg (0,229 mmol) do composto **10** mais 73 mg (0,527 mmol, 2,3 eq) de K_2CO_3 em MeOH seco. Após adição de 39,8 mg (0,229 mmol, 1 eq, 32 μL) de trifluoroacetofenona a reação foi deixada em agitação e atmosfera de argônio durante 18 h a 50 °C. Em seguida a mistura foi filtrada para retirar o K_2CO_3 e o filtrado foi seco a atmosfera reduzida para retirada do solvente. O sólido resultante foi redissolvido em THF seco, seguido da adição de 43,33 mg (1,15 mmol, 5 eq) de NaBH_4 anidro. A reação foi deixada overnight sob atmosfera de

argônio e temperatura ambiente. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, adicionou-se 3 mL de água destilada e extraiu-se com AcOEt (3x4mL). A fase aquosa foi acidificada com solução de HCl até pH 2, quando uma segunda extração com AcOEt (4x4mL) foi realizada. As fases orgânicas das duas extrações foram juntadas, secas com Na₂SO₄ e tiveram o solvente evaporado em rotaevaporador. A purificação foi feita em coluna do tipo *flash* utilizando AcOEt:Hex 50%. O rendimento da reação foi de 47% (38,7 mg).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8,01 (s, 1H); 7,33-7,20 (m, 7H); 7,13 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H); 6,99 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H); 6,88 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H); 6,37 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H); 3,23 (m, 1H); 3,12 (dd, *J* = 14 e 5 Hz, 1H), 2,92 – 2,83 (m, 1H).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 171,2; 135,2; 129,2; 128,6; 128,4; 128,2; 128,0; 127,5; 126,5; 124,9; 123,0; 121,2; 111,6; 102,8; 60,7; 38,8.

(*S*)-N(1-cianociclopropil)-3-(1H-indol-5-il)-2-(((*R*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletil)amino)propanamida **2**



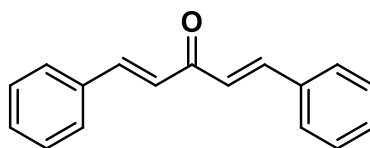
Em um frasco de 5 mL, 27 mg (0,075 mmol) do composto **11** foi dissolvido em 1 mL de DMF seco. Em seguida adicionou-se 9,78 mg (0,082 mmol, 1,1 eq) de ciclopropilaminonitrila, 42,77 mg (0,112 mmol, 1,5 eq) de HATU e 14,54 mg (0,112 mmol, 1,5 eq, 19,6 µL) de DIPEA. A solução foi deixada a temperatura ambiente por 24 h sob agitação e atmosfera de argônio. Completado o tempo de reação, 5 mL de solução de HCl foram adicionados e extraiu-se com AcOEt (6x4mL). A fase orgânica foi extraída uma segunda vez com NaCl (2x6mL). A solução foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A purificação foi realizada com coluna do tipo *flash* utilizando solução de AcOEt:Hex de 30% a 70% como eluente. O produto obtido foi um óleo amarelado semitransparente. O rendimento da reação foi de 63% (20,1 mg).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 8,02 (d, J = 8 Hz, 1H); 7,29–7,24 (m, 3H); 7,22 (d, J = 3 Hz, 1H); 7,13 (t, J = 8 Hz, 1H); 6,99 (d, J = 8 Hz, 2H); 6,88 (d, J = 8 Hz, 1H); 6,37 (s, 1H); 3,23 (dd, J = 8 e 5 Hz, 1H); 3,12 (dd, J = 13 e 5 Hz, 1H); 2,87 (dd, J = 13 e 8 Hz, 1H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 174,2; 135,1; 129,0; 128,5; 128,4; 127,8; 126,6; 125,0; 122,9; 121,0; 119,8; 111,6; 102,5; 62,0; 39,3; 20,1; 17,0; 16,4.

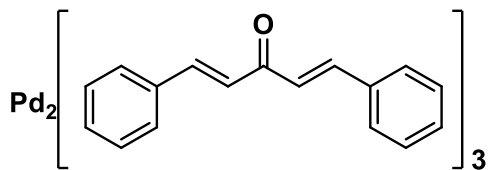
5.3 Procedimentos para o preparo do catalisador $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$

Dibenzilidenoacetona (dba)



Em um balão de 50 mL foram transferidos 15 mL de água destilada nos quais foram dissolvidos 1,5 g de cloreto de sódio. A solução foi mantida em agitação num banho ligeiramente gelado e 11,8 mL de etanol foram adicionados. Quando a solução voltou a temperatura ambiente adicionou-se metade da solução de 3 g (3 mL, 28,8 mmol, 2 eq) de benzaldeído destilado em 0,85 g (1,07 mL, 14,6 mmol, 1 eq) de acetona, observando a formação de um precipitado amarelo. A mistura foi agitada por 50 min e então adicionou-se o restante da solução de benzaldeído e acetona. A agitação foi mantida por mais 30 min, seguindo-se a filtração da suspensão e lavagem do floculado amarelo com água destilada até que se obtivesse um filtrado transparente. O sólido foi recristalizado com AcOEt. A massa final obtida foi de 1,786 g (52%), sendo o produto um sólido amarelo.

Tris(dibenzilidenoacetona)dipaládio (0)



Em um balão de 25 mL foram transferidos 334,5 mg (1,49 mmol) de acetato de paládio (II) e 122,2 mg (1,49 mmol, 1 eq), de acetato de sódio, além de 16,8 mL de MeOH. A reação foi agitada a 40 °C por 3 h, observando-se a formação de um precipitado marrom. A mistura foi filtrada e o sólido lavado com MeOH e água destilada. O produto foi arrastado para fora do filtro utilizando clorofórmio e seco a pressão reduzida. O sólido resultante deste processo foi dissolvido em 7 mL de clorofórmio destilado e 25 mL de acetona e deixado a -18 °C overnight. Os cristais obtidos foram filtrados à vácuo e lavados com 20 mL de acetona gelada. Obteve-se 0,372 mg (41%) de cristais roxo escuros de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$.

6. REFERÊNCIAS

- 1 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; **Microbiologia**. Editora Artmed, Porto Alegre, 10ª ed., 2012.
- 2 COURA, J. R.; PEREIRA, B. J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45 (3), p. 286-296, 2012.
- 3 CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; **Medicina Tropical**. Editora Atheneu, São Paulo, 2003.
- 4 BROOKS, G. F.; et all.; **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. AMGH Editora Ltda., Porto Alegre, 25ª ed., 2012.
- 5 COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 (Supl. I), p. 31-40, 2009.
- 6 MONTANARI, C. A. **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- 7 ALBERTS, B.; et. all.; **Molecular Biology of the Cell**. Garland Science, Nova York, 5ª ed., 2008.
- 8 DIAS, J. P. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The Impact of Chagas disease control in Latin America - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97 (5), p. 603-612, 2002.
- 9 COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 (suppl. I), p. 113-122, 2007.
- 10 ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 44-48, 2011.
- 11 VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16 (Sup. 2), p. 7-12, 2000.

- 12 ROBERTS, L. S.; JANOVY, J.; **Gerald D. Schmidt and Larry S. Robert's foundations of parasitology**. McGraw-Hill, Nova York, 7^a ed., 1937.
- 13 COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97 (1), p. 3-24, 2002.
- 14 OLIVEIRA, M. F.; et all. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37 (3), p. 209-228, 2008.
- 15 COURA, J. R.; PEREIRA, B. J. Chronic phase of Chagas disease: why should be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106 (6), p. 641-645, 2011.
- 16 JORGE, T. C. A.; CASTRO, S. L. **Doença de Chagas: manual para experimentação animal** [online]. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2000.
- 17 GONZÁLEZ, M.; et all. **Enfermedad de chagas**: Estratégias en la búsqueda de nuevos medicamentos. Una visión iberoamericana. Laboratorios Silanes e Ridimedchag-cyted, México, 2012.
- 18 GIORDANENGO, L. et all. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. **European Journal of Immunology**. v. 32, p. 1003-1011, 2002.
- 19 EAKIN, A. E.; et all. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (Cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7411-7420, 1992.
- 20 LEUNG, D.; ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D. P. Protease inhibitors: current status and future prospects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 305-41, 2000.
- 21 WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. Editora Lippincott Williams & Wilkins, 5^a ed., 2002.
- 22 GREENSPAN, P. D.; et all. Identification of Dipeptidyl Nitriles as Potent and Selective Inhibitors of Cathepsin B through Structure-Based Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4524-4534, 2001.

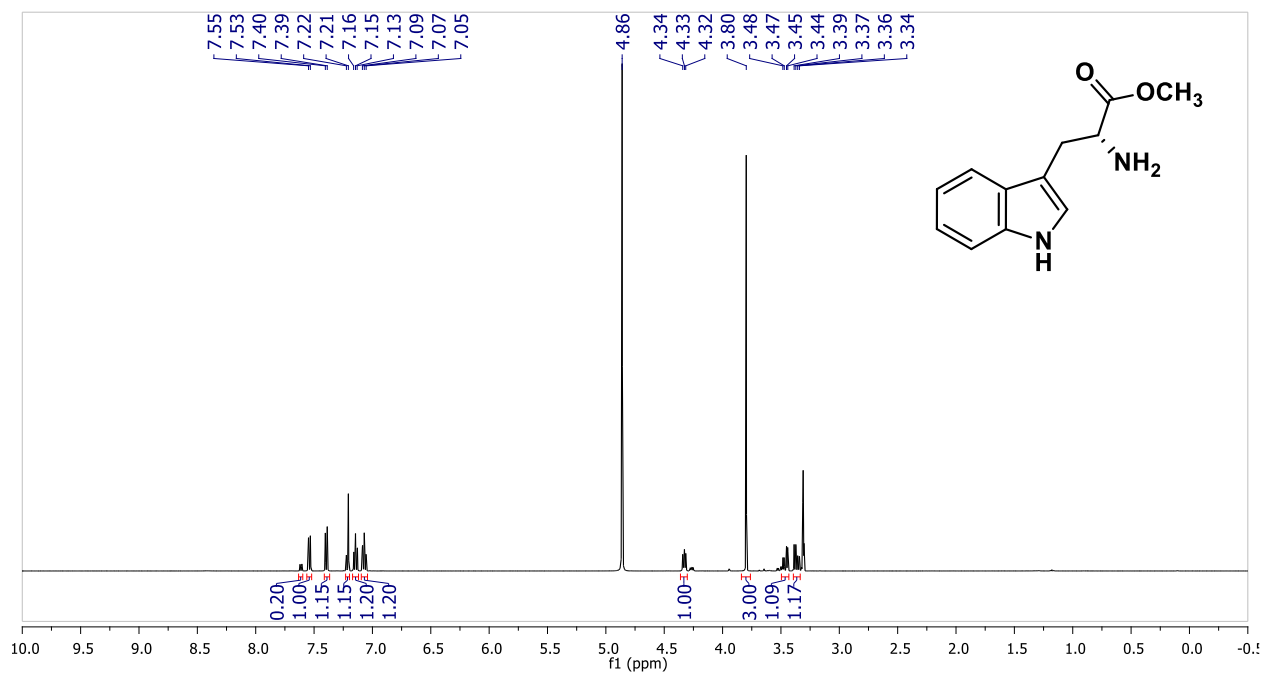
- 23 AVELAR, L. A. A.; MONTANARI, C. A.; et al. Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 90 (7): e0003916. doi:10.1371/journal.pntd.0003916, 2015.
- 24 YAO, S. Q.; HE, C. Y.; et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Potent Azadipeptide Nitrile Inhibitors and Activity-Based Probes as Promising Anti-Trypanosoma brucei Agents. **Chemistry European Journal**, v. 18, p. 6528-6541, 2012.
- 25 OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 133-171, 1997.
- 26 LÖSER, R.; SCHILLING, K.; DIMMIG, E.; GÜTSCHOW, M. Interaction of papain-like cysteine proteases with dipeptide-derived nitriles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 24, p. 7688-707, 2005.
- 27 WARD, Y. D.; et al. Design and Synthesis of Dipeptide Nitriles as Reversible and Potent Cathepsin S Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5471-5482, 2002.
- 28 BEAULIEU, C; et al. Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry letters**, v. 20, n. 24, p. 7444-9, 2010.
- 29 STOCH, S. A.; ZAJIC, S.; et al. Effect of the Cathepsin K Inhibitor Odanacatib on Bone Resorption Biomarkers in Healthy Postmenopausal Women: Two Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase I Studies. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, n. 2, p. 175-182, 2009.
- 30 MERCK AND CO., INC. Chen, C.; Devine, P.; Foster, B.; Hughes, G.; O'Shea, P. **Diastereoselective reductive amination process**. US nº 20060030731 A1, 29 jul. 2005, 9 fev. 2006.
- 31 ONYX THERAPEUTICS, INC. (United States). McMinn, D.; Johnson, H.; Bowers, S.; Moebius, D. C. **Tripeptide epoxy ketone protease inhibitors**. US nº WO2014152134 A1, 14 mar. 2013, 25 set. 2014.

- 32 HUGHES, G.; DEVINE, P. N.; NABER, J. R.; et al.; Diastereoselective reductive amination of aryl trifluoromethyl ketones and α -amino esters. **Angewandte Chemie**, v. 46, p. 1839-1842, 2007.
- 33 VELOSO, D. P.; TEIXEIRA, R. R.; BARBOSA, L. C. A. Reações de acoplamento cruzado de organossilanos catalisadas por paládio: aspectos históricos, sintéticos e mecanísticos. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1704-1720, 2007.
- 34 MCGRATH, M. E.; EAKIN, A. E.; et al. The crystal structure of Cruzain, a therapeutic target for Chagas's disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, p. 251-259, 1995.

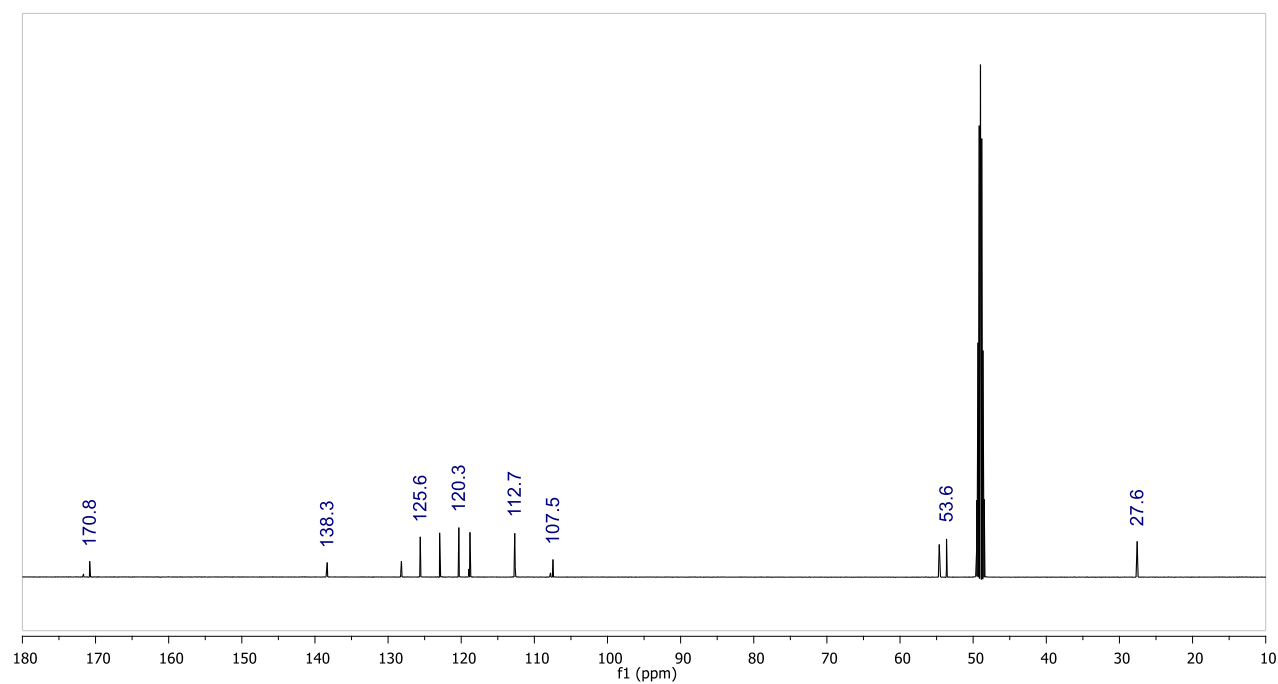
APÊNDICE

(*R*)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanoato de metila **3**

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD)

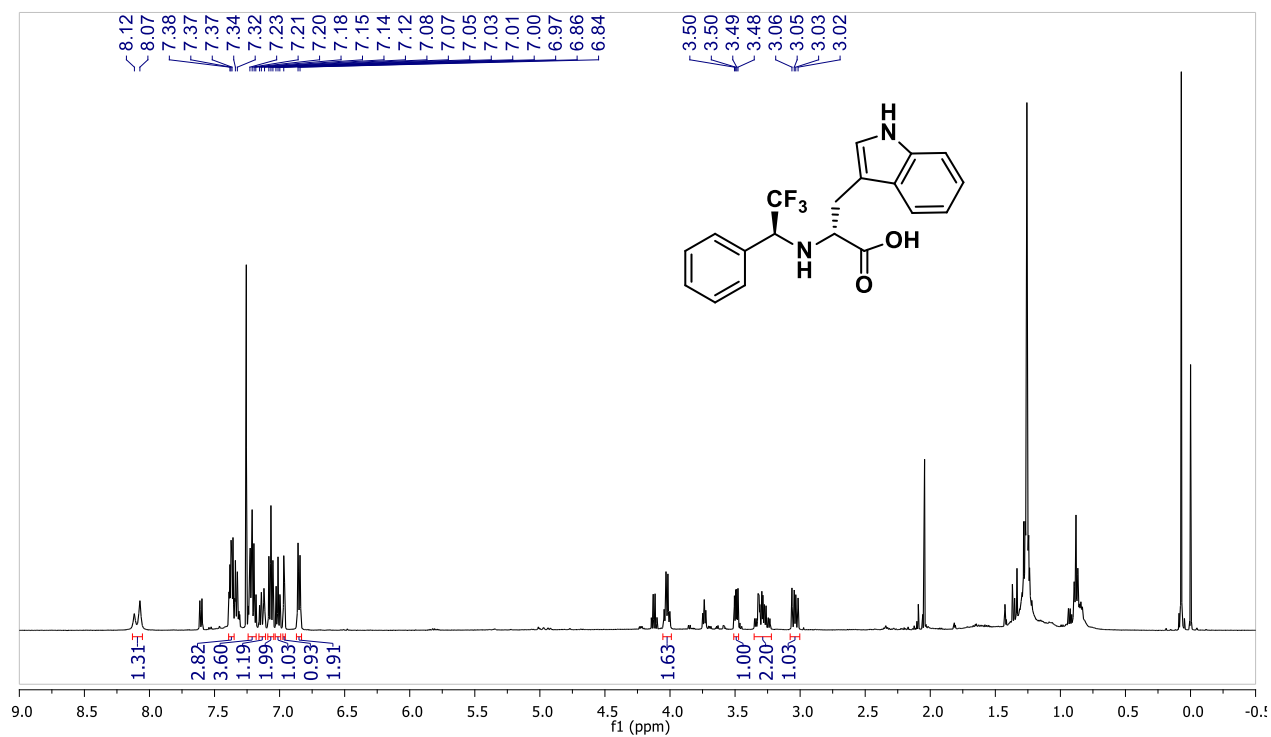


RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD)

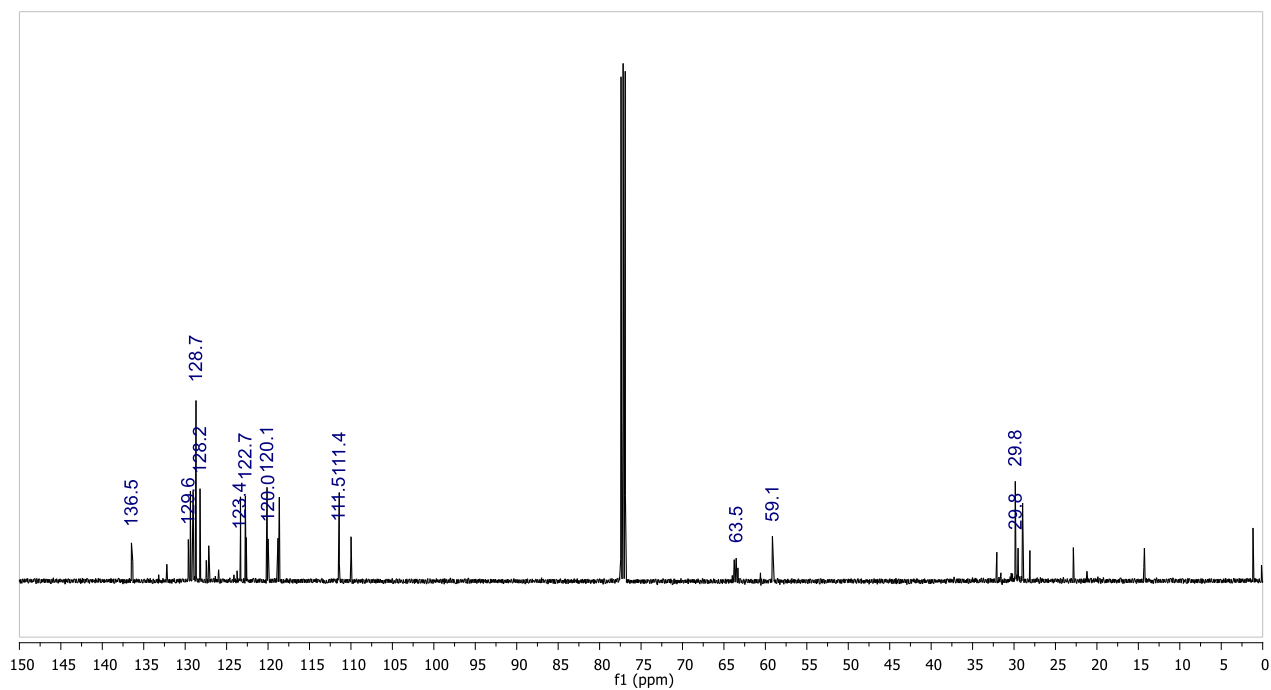


Ácido (*R*)-3-((1*H*-indol-3-il)-2(((*S*)-2,2,2-trifluoro-1feniletíl)amino)propanoico **5**

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3)

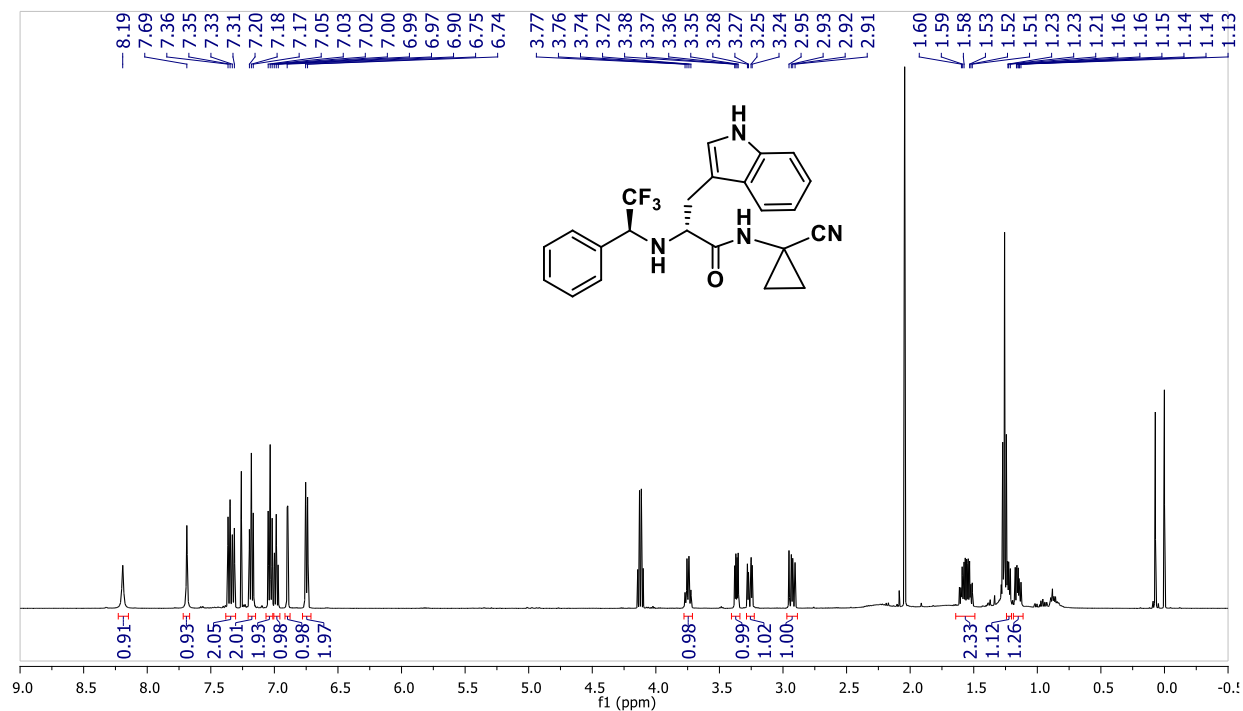


RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

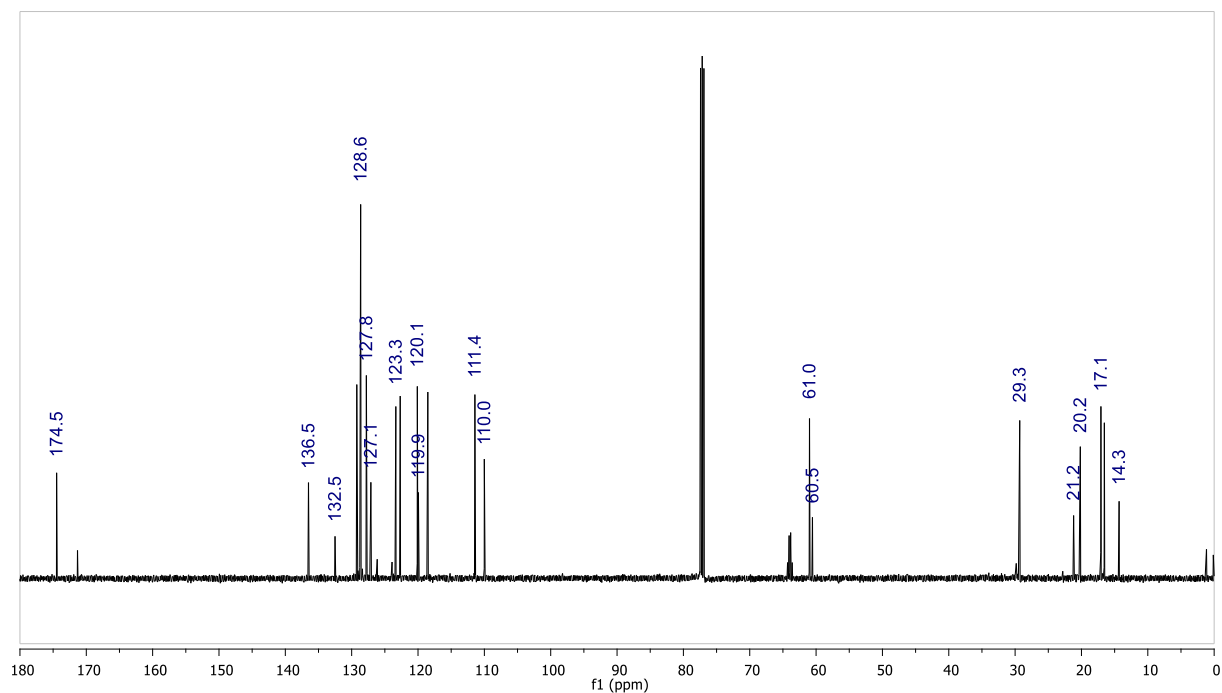


(*R*)-N-(1-cianociclopropil)-3-(1H-indol-3-il)-2(((*S*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletil)amino)propanamida **1**

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3)

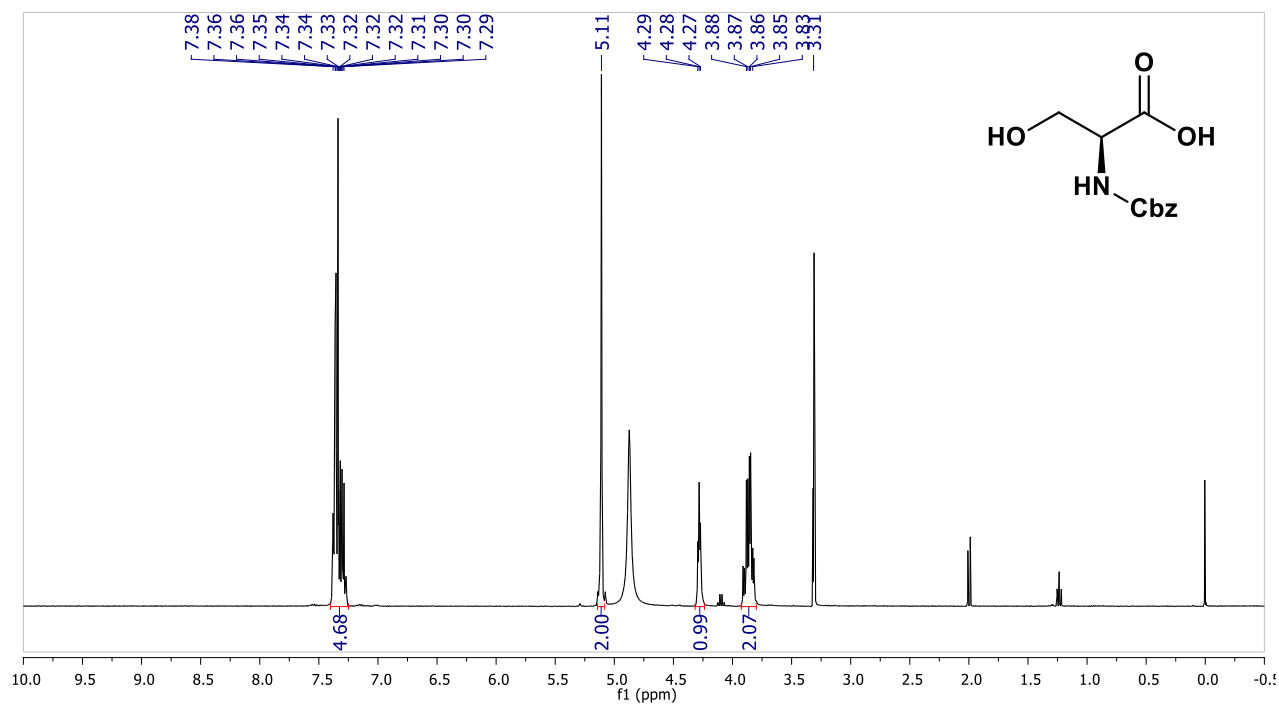


RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

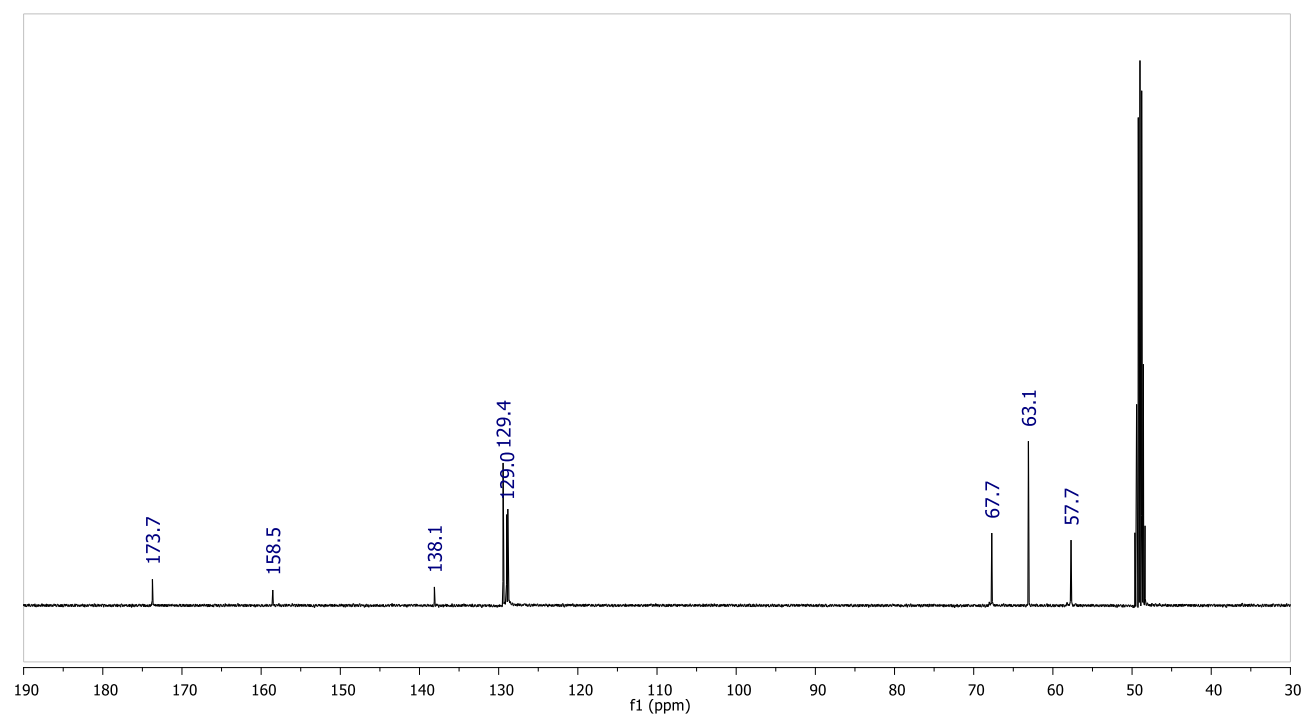


Ácido (S)-2-((benziloxi)carbonilamino)-3-hidroxipropanoico **6**

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD)

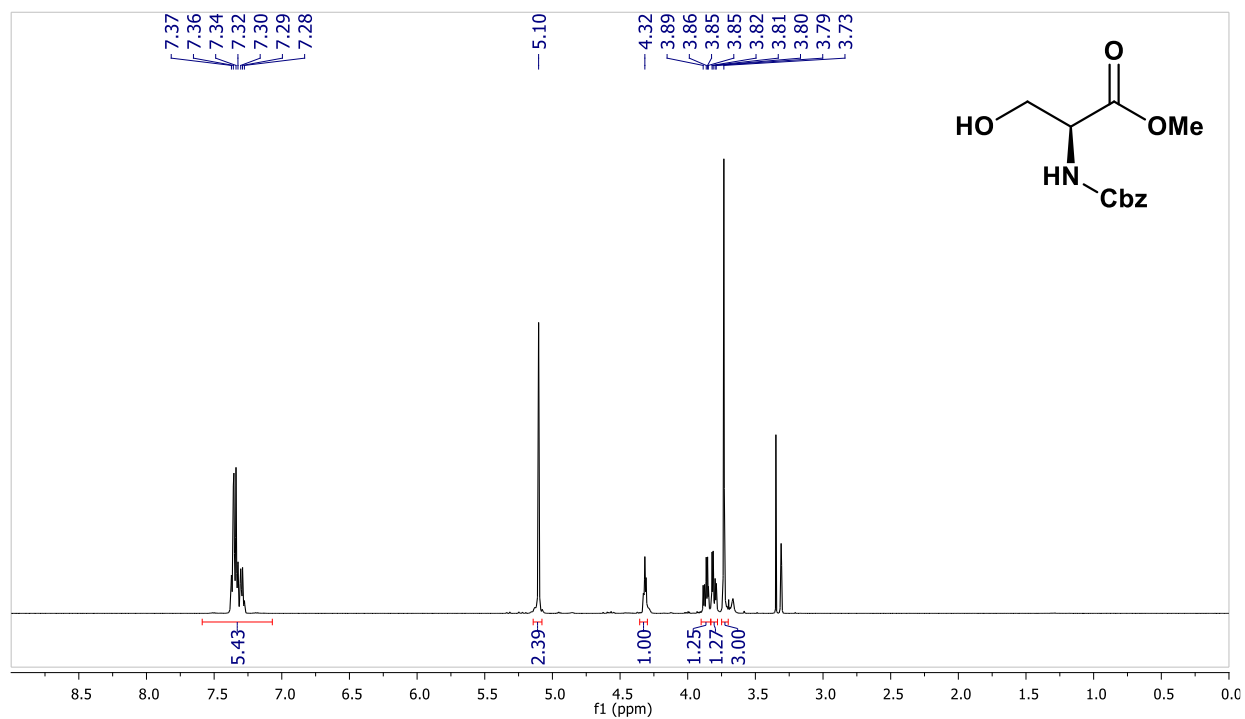


RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD)

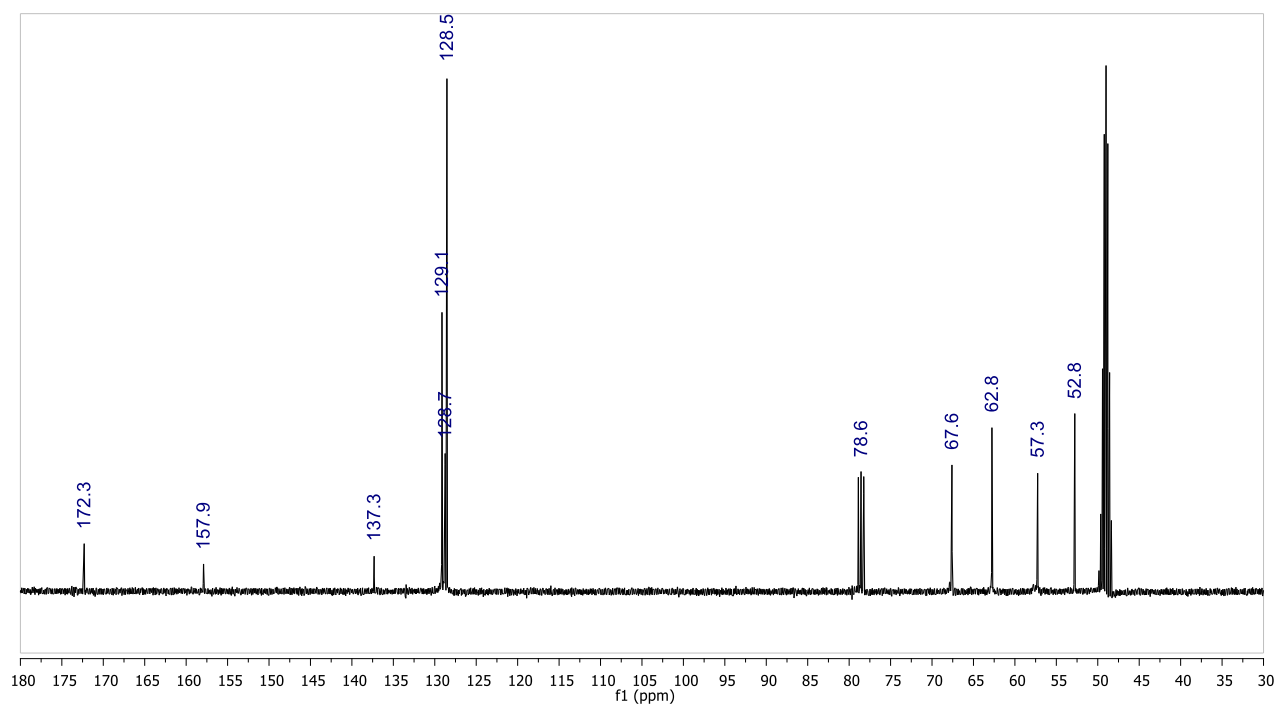


2-((benziloxi)carbonilamino)-3-hidroxiopropanoato de (S)-metila **7**

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD)

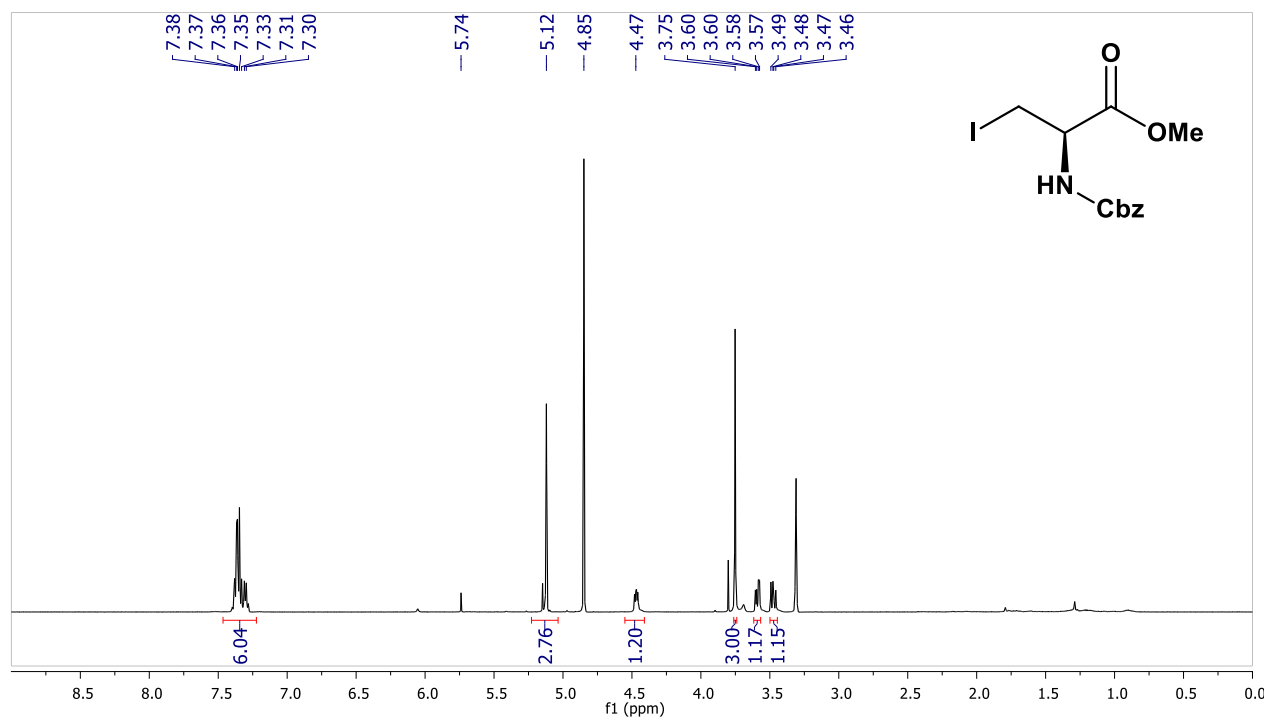


RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD)

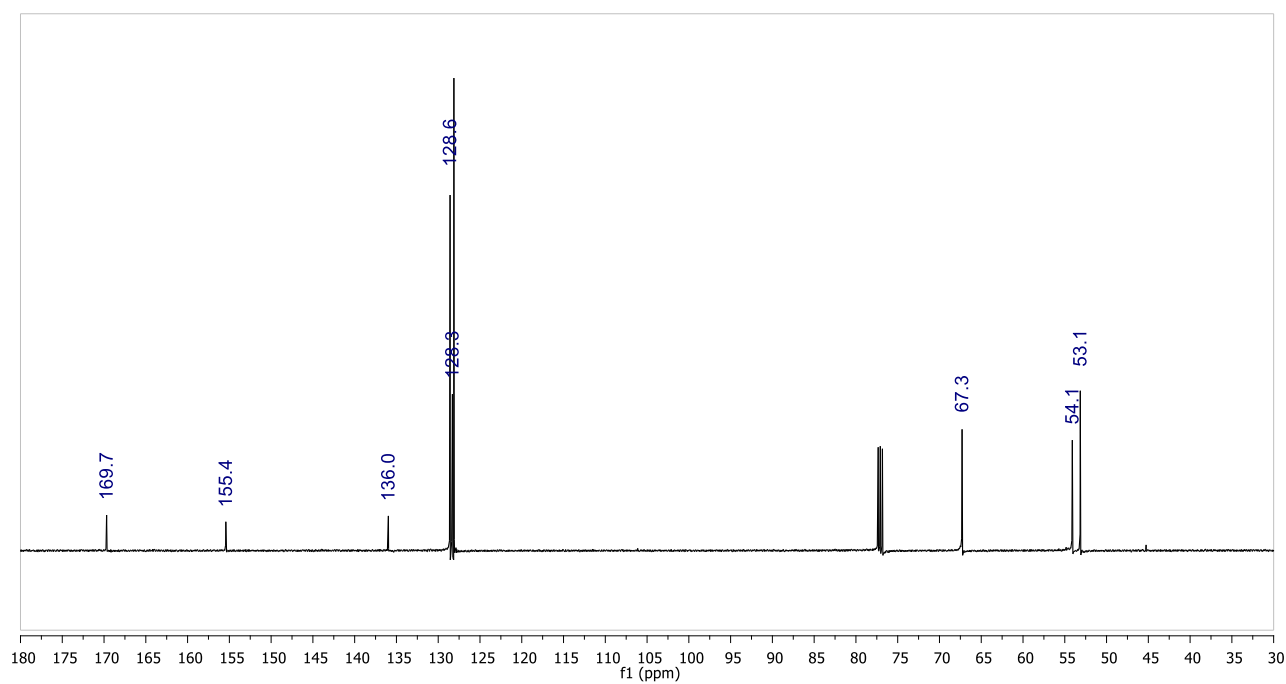


2-((benziloxi)carbonilamino)-3-iodopropanoato de (*R*)-metila **8**

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD)

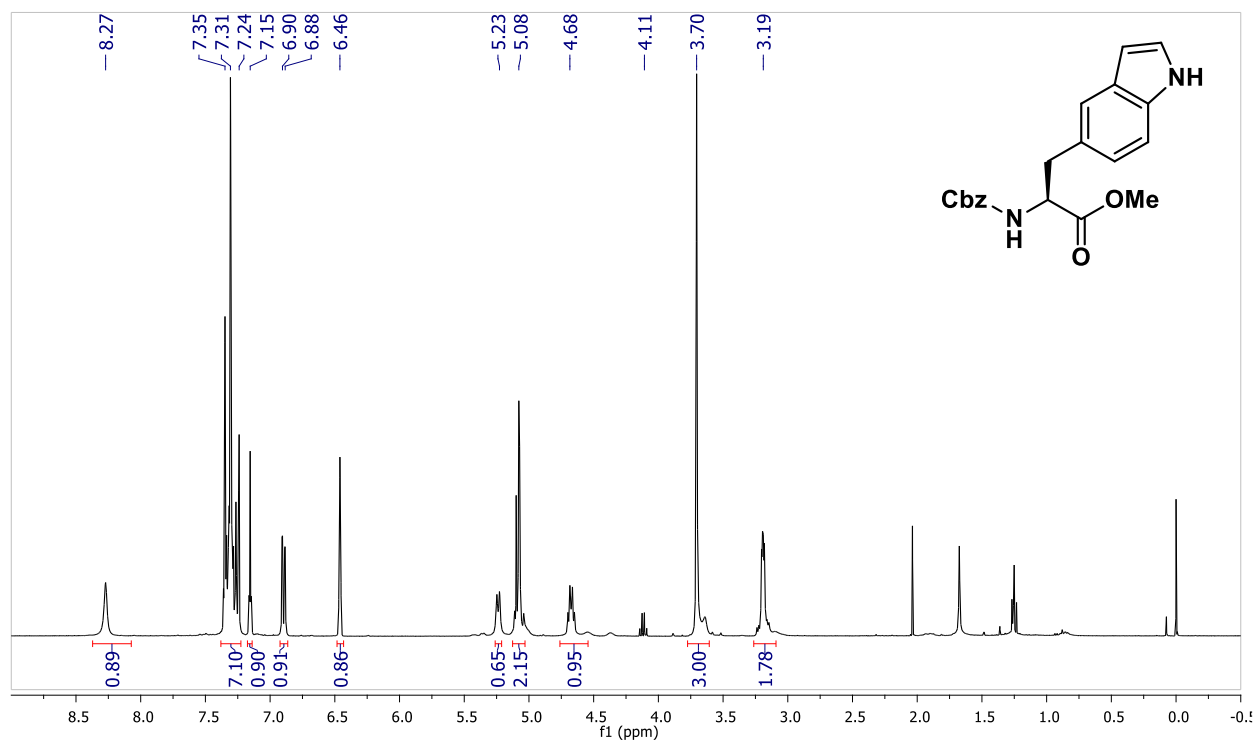


RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD)

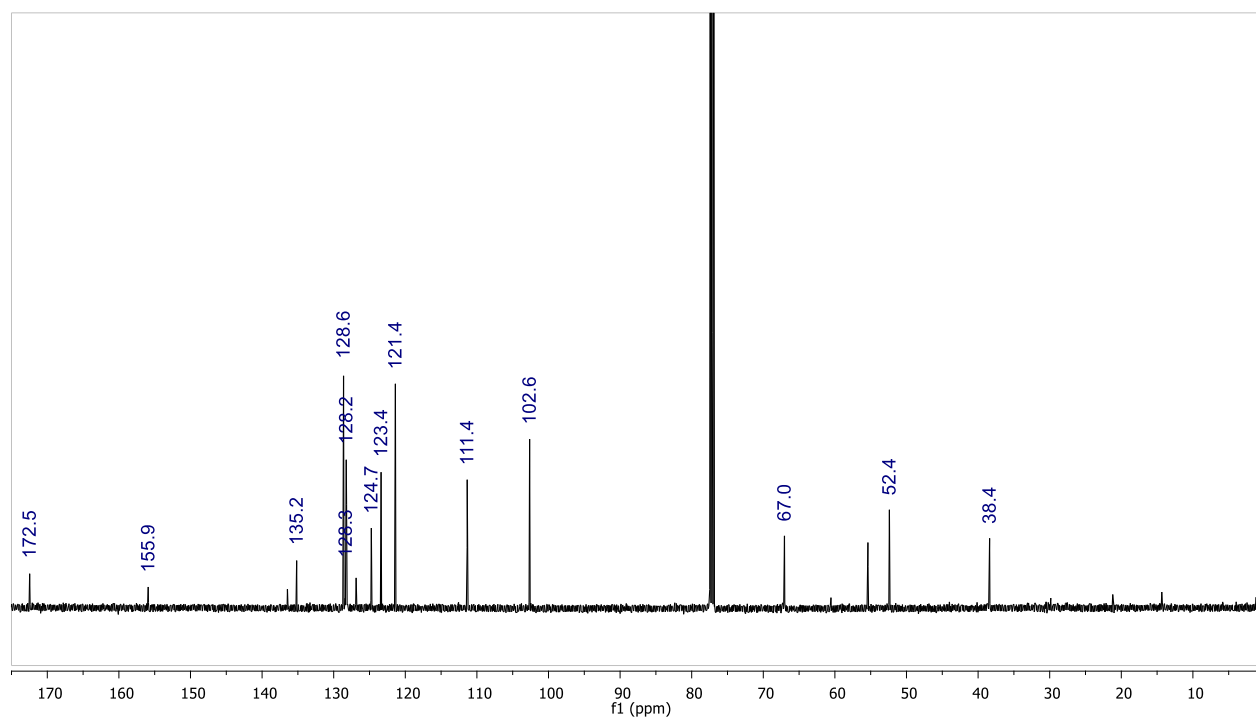


2-((benziloxi)carbonilamino)-3-(1H-indol-5-il)propanoato de (S)-metila **9**

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)

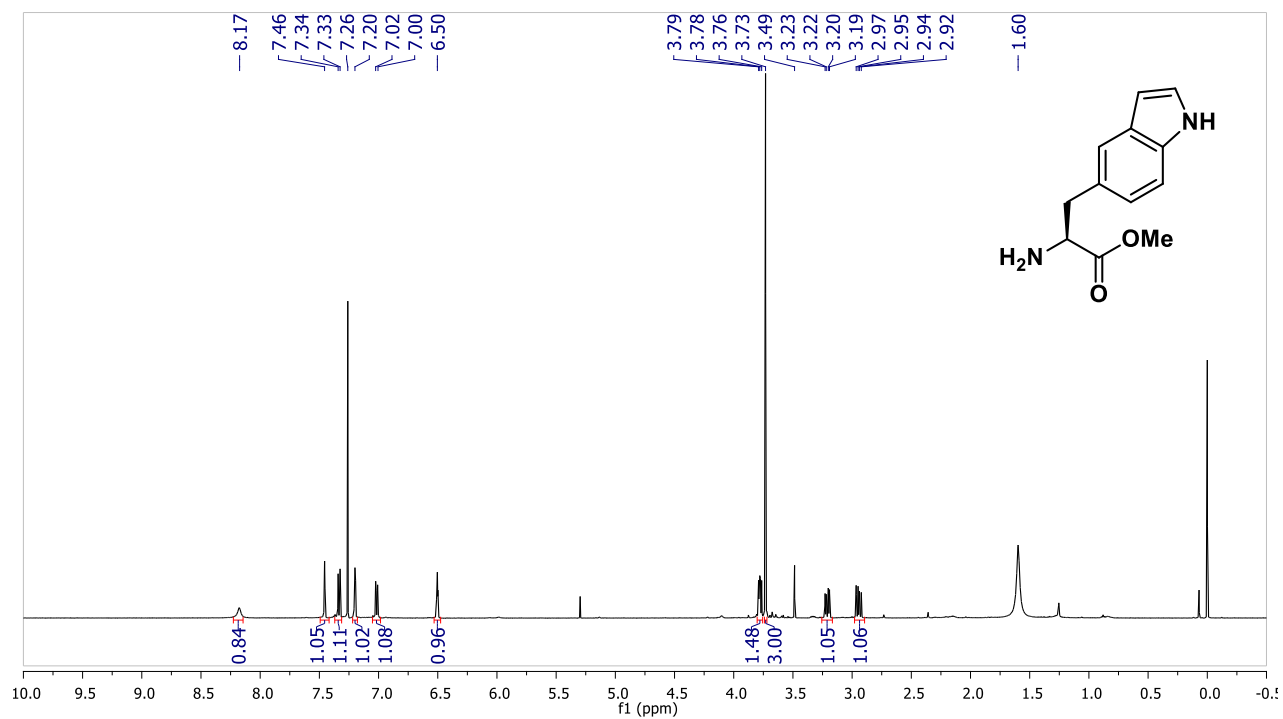


RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

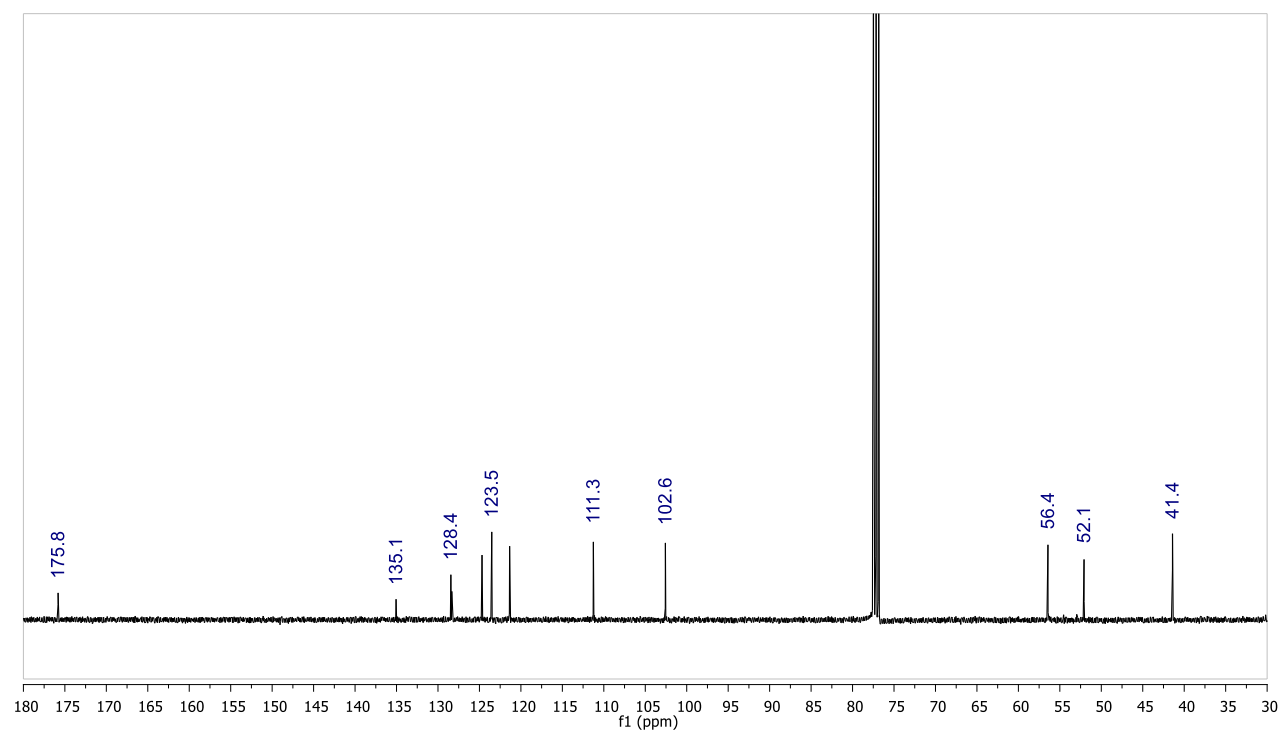


2-amino-3-(1H-indol-5-yl)propanoato de (S)-metila **10**

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3)

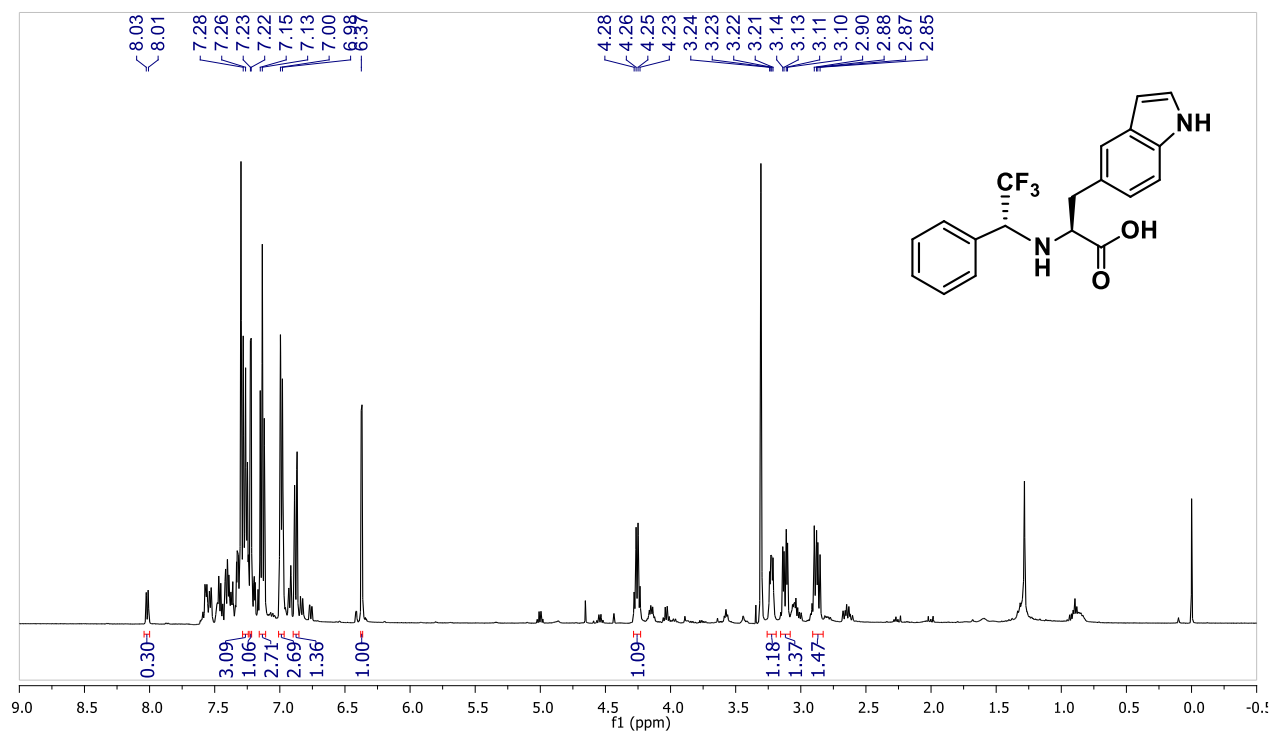


RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

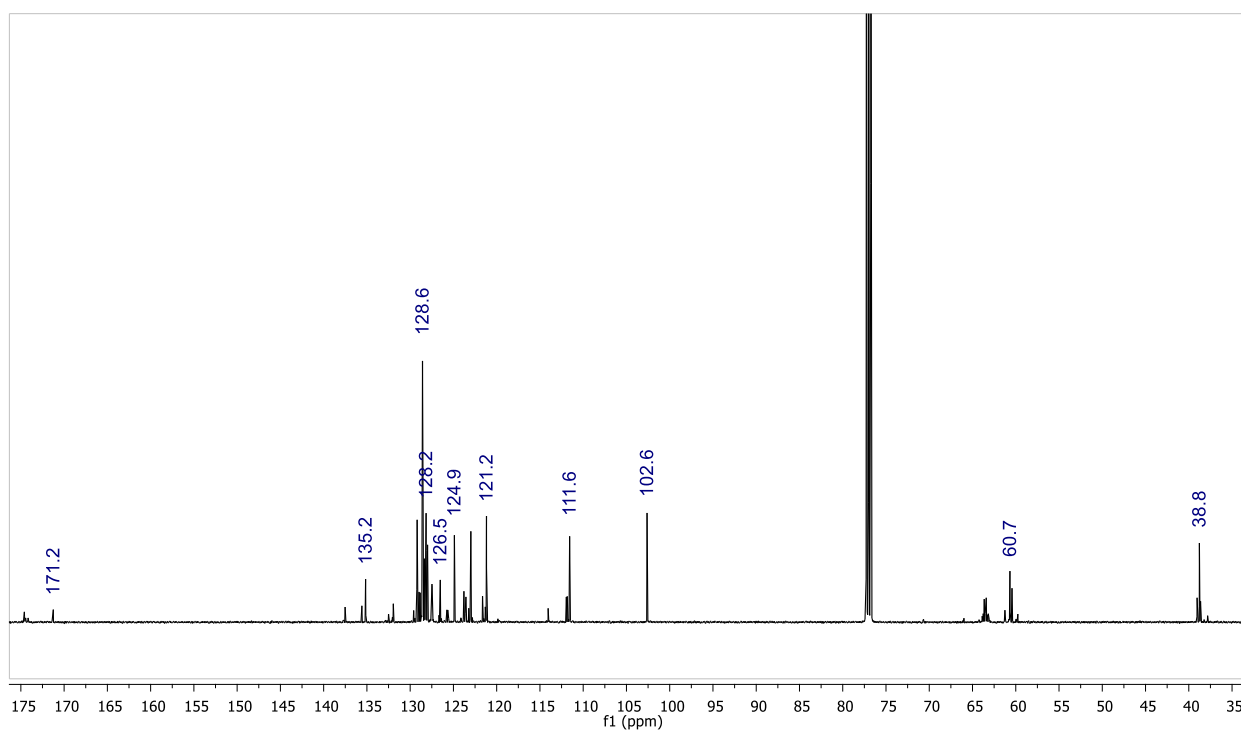


Ácido (S)-3-(1H-indol-5-il)-2-(((R)-2,2,2-trifluoro-1-feniletil)amino)propanoico **11**

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3)

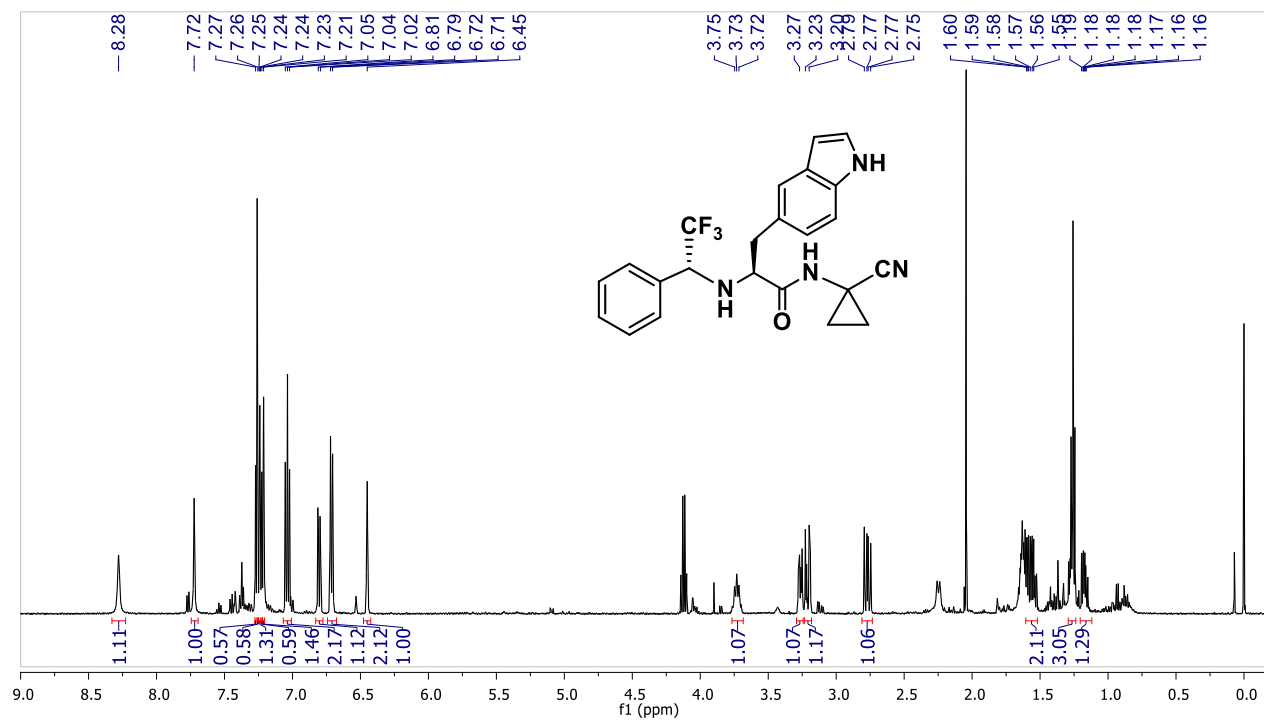


RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)



(S)-N(1-cianociclopil)-3-(1H-indol-5-il)-2-(((R)-2,2,2-trifluoro-1-feniletil)amino)propanamida **2**

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3)



RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

