

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Filipe Gomes Pernichelle

**Antichagásicos potenciais: planejamento e
síntese de híbridos moleculares e de derivados de azaindóis**

SÃO PAULO
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Filipe Gomes Pernichelle

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre na Universidade de
São Paulo na área de Insumos Farmacêuticos

Orientadora: Prof. Dra. Elizabeth Igne Alves Ferreira

SÃO PAULO
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P452a Pernichelle, Filipe Gomes
ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: PLANEJAMENTO E
SÍNTESE DE HÍBRIDOS MOLECULARES E DE DERIVADOS DE
AZAINDÓIS / Filipe Gomes Pernichelle. - São Paulo,
2023.
75 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação
em Fármaco e Medicamentos.
Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne Alves

1. Doença de Chagas. 2. Antichagásicos
potenciais. 3. Óxido nítrico. 4. Fe-SOD e CYP-51. 5.
Azaindóis. I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne Alves,
orientador.

Filipe Gomes Pernichelle

Antichagásicos potenciais: planejamento e
síntese de híbridos moleculares e de azaindóis

Dissertação para obtenção do Título de Mestre na Universidade de
São Paulo na área de Insumos Farmacêuticos

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dra. Elizabeth Igne Alves Ferreira
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2023.

“NINGUÉM VAI BATER TÃO FORTE
COMO A VIDA, MAS A QUESTÃO
NÃO É O QUÃO FORTE VOCÊ
CONSEGUE BATER. É O QUÃO
FORTE VOCÊ CONSEGUE APANHAR
E CONTINUAR SEGUINDO EM
FRENTE”

ROCKY BALBOA

Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer minha família (minha mãe Izilda, minha vó Zeri, meu pai Cristiano, meus irmãos Gustavo e Henrique, meus tios Tadeu, Andréia, Gilda e Luís, e meus primos Guilherme, Matheus e Alice). Muito obrigado por estarem comigo sempre me apoiando em minhas decisões. AMO VOCÊS.

À minha orientadora, Profa. Dra. Elizabeth Igne Alves Ferreira, por toda a orientação no decorrer do projeto, por ter me aceitado teimoso como sou, pela amizade e por todo o carinho. O meu agradecimento e prazer são imensos.

À minha namorada e futura esposa, Lucianna, por seu amor, carinho, respeito e por sempre me ajudar a levantar a cabeça nos momentos mais difíceis da minha vida. Não consigo expressar a sua importância para mim apenas com palavras. Te amo muito meu amor.

Aos meus sogros, Olinda e Ricardo, e a minha cunhada, Marianna, por sempre me receberem de abraços abertos em sua casa, me dando conselhos e me apoiando nas decisões mais importantes da minha vida.

Aos meus amigos, João, Neto, Murilo, Balçante, Tavares, Julia, Munir, Bruna, Natália, Manoella, André, Gustavo, Bruna, Gabriel, Erika, Vitor e Everton, por sempre me fazerem dar as melhores risadas e sentir as maiores alegrias que amigos podem nos proporcionar.

Em especial ao meu amigo Ricardo, por me acompanhar durante minha trajetória inteira na área de química medicinal, inclusive em meu período na Alemanha durante o estágio de pesquisa no exterior, sendo mais que um tutor e mestre, mas também um verdadeiro amigo.

A todos meus amigos e colegas do LAPEN e LAPESSB (alguns ex-membros): Charles, Gabriel, João, Rodrigo, Lucas, Luccas, Cecília, Fred, Diego, Nuno, Karoline, Lara, Karinne, Valéria e Giovanna.

À Especialista em laboratório e amiga dos alunos, Mônica, por todos os ensinamentos, broncas, brincadeiras e conversas durante meu período no laboratório. Muito obrigado!

Aos meus alunos de IC, Erick e Noá, pela amizade, conversas e pela grande ajuda nas sínteses dos nossos projetos.

Aos professores, Dra. Jeanine Giarolla e Dr. Roberto Parise, pelas conversas, orientações e amizade desde que comecei na iniciação científica até agora.

Ao professor, Dr. Matthias Gehrig, por me receber muito bem em seu laboratório durante o Estágio de Pesquisa no Exterior na Alemanha, pelas conversas, ensinamentos e pela amizade que lá foi feita.

Aos meus amigos que conheci na Alemanha e que levarei para o resto da vida, Julia, Laura, Lisa, Max, Stefan, Julia, Thales, Danilo, Leon, Kilian, Jim, Débora, Raissa, Sara, Leon, Pascal, Ekaterina, Vale, Markus, Alex, Fred, Alix e Joud.

À FAPESP, pelas bolsas de Iniciação Científica (2016/03124-0), Mestrado (2020/13347-2) e de Estágio de Pesquisa no Exterior (2022/00283-1) concedidas no decorrer deste trabalho.

Resumo

Pernichelle, F.G. **Antichagásicos potenciais: planejamento e síntese de híbridos moleculares e de azaindóis, 2023, 75p.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A doença de Chagas é uma antroponose comum na América Latina e sua transmissão ocorre através do parasita denominado *Trypanosoma cruzi*. Essa doença negligenciada apresenta graves problemas de saúde pública no continente americano, entretanto, devido à globalização e à imigração legal e ilegal de pessoas provenientes de países endêmicos, diversos casos têm sido relatados em outros países, como Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália, assim como em diversos países da Europa. Atualmente, nos 21 países considerados endêmicos, aproximadamente 75 milhões de pessoas estão expostas à infecção, seis a sete milhões estão infectadas e mais de 30 mil novos casos surgem por ano. Além disso, cerca de oito mil recém-nascidos são contaminados durante a gestação e em torno de 14 mil pessoas morrem anualmente por Chagas, sendo assim considerada a doença tropical que mais mata no mundo. Descoberta há mais de 100 anos, sua quimioterapia ainda é precária, contando com apenas dois fármacos disponíveis no mercado, nifurtimox e benznidazol, este último, o único disponível no Brasil. Ambos apresentam baixa taxa de eficácia na fase crônica da doença e mais de 80% dos pacientes não obtêm a cura parasitológica neste estágio. Por estes dados alarmantes citados, observa-se a importância da busca por compostos que sejam mais eficazes contra o *T. cruzi*. Em face da necessidade da busca por moléculas com atividade anti-*T. cruzi* e ante o fato de as terapias baseadas em liberadores de óxido nítrico (NO) e inibições enzimáticas da CYP51 e da Fe-SOD, e inibição de proteínas quinases se apresentarem como interessantes abordagens para o planejamento de novos antiparasitários, sintetizou-se duas novas séries de compostos, uma com híbridos, contendo grupo piperazina como *linker* e com interação na Fe-SOD, grupo furoxano como liberador de NO e grupo aromático substituído com possível interação com a enzima CYP51 e a outra com azaindóis potencialmente inibidores de quinases. Os híbridos foram obtidos com bons rendimentos, em geral. Ensaados em *T. cruzi*, os compostos obtidos não se mostraram ativos nas condições dos testes, tampouco tóxicos em células de mamíferos, à exceção de FGP-30B e FGP-46A, que apresentaram atividade modesta (50% de atividade antiparasitária), e do FGP-33B, que foi moderadamente citotóxico (50% de atividade anticelular). Obtiveram-se, adicionalmente, com bons rendimentos, 5 derivados de azaindol. A atividade biológica desses compostos será determinada proximamente.

Palavras-Chaves: Doença de Chagas; Antichagásicos potenciais; Óxido-nítrico; Fe-SOD; CYP-51; Azaindóis.

Abstract

Pernichelle, F.G. **Potential anti-chagasic agents: design and synthesis of molecular hybrids and azaindoles, 2023, 75p.** Dissertation (Master Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Chagas disease is a common anthrozoosis in Latin America and its transmission occurs through the parasite called *Trypanosoma cruzi*. This neglected disease presents serious public health problems in the American continent, however, due to globalization and legal and illegal immigration of people from endemic countries, several cases have been reported in other countries, such as the United States, Canada, Japan and Australia, as well as in many European countries. Currently, in the 21 countries considered endemic, approximately 75 million people are exposed to the infection, six to seven million are infected and more than 30,000 new cases arise per year. In addition, about eight thousand newborns are infected during pregnancy and around 14 thousand people die annually from Chagas, thus being the disease considered the tropical disease that kills the most in the world. Discovered more than a hundred years ago, its chemotherapy still remains precarious, with only nifurtimox and benznidazole available on the market, and only the latter available in Brazil. Both have a low rate of effectiveness in the chronic phase of the disease and more than 80% of patients do not obtain a parasitological cure in this stage. These alarming data show the importance of searching for compounds that are more effective against *T. cruzi*. In view of the need to search for molecules with anti-*T. cruzi* and considering therapies based on nitric oxide (NO) releasers, enzymatic inhibitions of CYP51 and Fe-SOD, and protein kinases inhibition present themselves as interesting approaches for the design of new antiparasitic agents, the objective of this work was the synthesis of two new series, one of hybrid compounds, containing piperazine group as linker and with interaction in Fe-SOD, furoxane group as NO releasers and substituted aromatic group with possible interaction with CYP51 enzyme, and other with potent azaindole-derived kinase inhibitors. Most of the compounds were obtained in good yields. Submitted to antiparasitic tests against *T. cruzi* and to cytotoxic tests in mammal cells, the compounds did not show neither activity nor cytotoxicity, with the exception of FGP-30B and FGP-46A (50% of antiparasitic activity), that show modest activity, and FGP-33B, which was moderately cytotoxic (50% of anticellular activity). In addition, 5 azaindoles derivatives were synthesized in several synthetic steps, in good yields in general. They are potential quinase inhibitors and will be further submitted to biological assays in *T. cruzi*.

Keywords: Chagas Disease; Potential antichagasic agents; Nitric oxide; Fe-SOD; CYP-51; Azaindoles.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Doença de Chagas	10
1.1.1 <u>Histórico</u>	10
1.1.2 <u>Epidemiologia</u>	10
1.1.3 <u>Transmissão e ciclo</u>	11
1.1.4 <u>Diagnóstico</u>	13
1.1.5 <u>Quimioterapia</u>	14
1.1.5.1 <i>Quimioterápicos disponíveis na terapêutica</i>	14
1.1.5.2 <i>Planejamento de antichagásicos</i>	14
1.1.5.2.1 <i>Liberadores de óxido nítrico</i>	14
1.1.5.2.2 <i>Inibidores da Fe-superóxido dismutase</i>	15
1.1.5.2.3 <i>Inibidores da CYP51</i>	16
1.1.5.2.4 <i>Derivados de azaindol</i>	17
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	18
3. PARTE EXPERIMENTAL	20
3.1 Material e Métodos	20
3.1.1 <u>Material</u>	20
3.1.2 <u>Métodos de síntese</u>	20
3.1.2.1 <i>Rota Sintética dos derivados do furoxano obtidos no Brasil (Grupo 1)</i> 20	
3.1.2.2 <i>Procedimento geral de síntese do intermediário 4-formil-3-metil-2-N-oxido-1,2,5-oxadiazol (furoxano) (2p)</i>	21
3.1.2.3 <i>Síntese do segundo intermediário 4-metoxi-furoxano (3P)</i>	22
3.1.2.4 <i>Síntese do terceiro intermediário 4-piperazina-furoxano (4P)</i>	23
3.1.2.5 <i>Procedimento final de síntese dos compostos híbridos de acetofenona-piperazina-furoxano (5Pa-f)</i>	23
3.1.3 <u>Rota Sintética-Derivados do Azaindol (Grupo 2) obtidos durante estágio BEPE/FAPESP, na Alemanha</u>	24
3.1.3.1 <i>Compostos derivados para/meta-nitrila</i>	24
3.1.3.2 <i>Compostos derivados contendo aceptor de Michael</i>	25
3.1.3.3 <i>Compostos derivados contendo grupos ligantes covalentes reversíveis</i>	25
3.1.3.4 <i>Procedimento de síntese do intermediário 5-bromo-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina (2)</i>	26
3.1.3.5 <i>Procedimento de síntese do intermediário ácido 1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxílico (3)</i>	26

3.1.3.6 Procedimento de síntese do intermediário 1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxamida (4).....	27
3.1.3.7 Procedimento de síntese do intermediário 3-bromo-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida (5).....	28
3.1.3.8 Procedimento de síntese do intermediário 3-(4-cianofenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida (7a).....	29
3.1.3.9 Procedimento de síntese do intermediário 3-(3-cianofenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxamida (7b)	30
3.1.3.10 Procedimento de síntese dos produtos finais 4-(3-cianofenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida e 3-(3-cianofenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida (8a,b)	31
3.1.3.11 Procedimento de síntese do intermediário 3-(2-fluor-5-nitrofenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxamida (9).....	32
3.1.3.12 Procedimento de síntese do intermediário 3-(5-amino-2-fluorfenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxamida (10).....	33
3.1.3.13 Procedimento de síntese do intermediário 3-(5-acrilamido-2-fluorfenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida (11).....	34
3.1.3.14 Procedimento de síntese do produto final 3-(5-acrilamido-2-fluorfenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida (12)	35
3.1.3.15 Procedimento de síntese do intermediário 2-ciano-N-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)acetamida (14)	36
3.1.3.16 Procedimento de síntese do intermediário 3-(3-(2-cianoacetamido)fenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxamida (15).....	37
3.1.3.17 Procedimento de síntese do intermediário (E,Z)-3-(3-(2-ciano-3-ciclopropilacrilamida)fenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida (16a).....	38
3.1.3.18 Procedimento de síntese do intermediário (E,Z)-3-(3-(2-ciano-3-(furan-3-il)acrilamido)fenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida (16b).....	39
3.1.3.19 Procedimento de síntese do produto final (E,Z)-3-(3-(2-ciano-3-ciclopropilacrilamido)fenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida (17a).....	40
3.1.3.20 Procedimento de síntese do produto final (E,Z)-3-(3-(2-ciano-3-(furan-3-il)acrilamido)fenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida (17b).....	41
3.2 Metodologia Analítica	42
3.3 Avaliação Biológica	42
3.3.1 <u>Preparação da solução teste</u>	42
3.3.2 <u>Cultura de células</u>	42
3.3.2.1 LLC-MK2 (Células epiteliais de macaco Rhesus)	42
3.3.2.2 U2OS (Células de osteosarcoma humano)	43

3.3.2.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Sylvio X10/1).....	43
3.3.2.4 <i>Ensaio dos compostos teste</i>	43
3.3.3 <u>Análise dos dados</u>	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Síntese	44
4.1.1 <u>Derivados de furoxano (Grupo 1)</u>	44
4.1.2 <u>Derivados de azaindol (Grupo 2)</u>	48
4.2 Ensaio biológicos	53
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

1.1.1 Histórico

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, descoberta em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas, é uma doença parasitária causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida por insetos triatomíneos (CHAGAS, 2023; Pesquisa FAPESP, 2023).

Durante a década de 1980, diversos escritores calculavam que a doença afetava cerca de 18-20 milhões de pessoas nas áreas endêmicas da América Latina. De acordo com informações da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que existiam de 16 a 18 milhões de infectados pelo *T. cruzi* até 2005. No entanto, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, existem 12-14 milhões de pessoas infectadas apenas na América Latina. Esses dados mostram a falta de pesquisas epidemiológicas e indicam, como apontado pela OMS, que ainda há necessidade de maior conhecimento sobre a prevalência e incidência da doença. De qualquer forma, os números destacam a importância social da doença de Chagas, há mais 100 anos após sua descoberta (CHAGAS, 2023; Pesquisa FAPESP, 2023; WHO, 2002).

1.1.2 Epidemiologia

Atualmente, a Doença de Chagas ainda é negligenciada e continua apresentando graves problemas de saúde pública no continente americano, onde 6 milhões de pessoas estão infectadas nos 21 países endêmicos na região (DNDi, 2023; PAHO, 2023) (**Figura 1**) Além da América Latina, devido à globalização e à migração legal e ilegal de pessoas provenientes de países endêmicos, diversos casos têm sido relatados em outros países, como Estados Unidos, Canadá e em diversos países da Europa e do Pacífico Oeste (DNDi, 2023; LIDANI et al., 2019; PAHO, 2023).

Aproximadamente 70 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair a doença de Chagas e, anualmente, além de surgirem 30 mil novos casos, morrem cerca de 14 mil pessoas, sendo, assim, considerada uma das doenças tropicais que mais matam no mundo (DNDi, 2023; LIDANI et al., 2019; PAHO, 2023).



Figura 1 – Mapa da incidência de doença de Chagas (2019): 21 países endêmicos na América Latina e países não endêmicos mas com a doença presente (Disponível em: <https://dndial.org/doencas/doenca-de-chagas#fatos-sobre-a-doenca/> Acesso em: 24 Jul. 2023).

1.1.3 Transmissão e Ciclo Evolutivo

A principal fonte de transmissão do *T. cruzi* é a picada do inseto vetor *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como barbeiro, infectado com o parasita. Durante a fase no hospedeiro invertebrado (**Figura 2**), o *T. cruzi* se transforma em epimastigotas e, então, inicia-se a diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese) os quais, eliminados pelas fezes e urina do inseto vetor, são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. O parasita não penetra a pele intacta, mas, somente picando o hospedeiro via mucosa ou ferimentos na pele (CHAGAS, 2023; DNDi, 2023; LIDANI et al., 2019; PAHO, 2023; WHO, 2023).

Nos mamíferos, o ciclo no hospedeiro vertebrado pode ocorrer em diferentes espécies sendo o homem o hospedeiro definitivo mais relevante. Atualmente há evidências de que cães, gatos, roedores comensais e cobaias domesticadas são capazes de manter *T. cruzi* na ausência de qualquer outra espécie hospedeira. O primeiro contato do hospedeiro vertebrado com o *T. cruzi* em uma infecção vetorial é com as formas tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas pelo inseto vetor e entram em contato com mucosas ou regiões lesadas da pele desses hospedeiros.

Estas formas podem invadir células como macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre outras. Ao invadi-las, ocorre proliferação intracelular e liberação de formas tripomastigotas, bem como algumas formas intermediárias e amastigotas em menor proporção no espaço intercelular (BUSCAGLIA, DINOIA, 2003; CHAGAS, 2023; DNDi, 2023; LIDANI et al., 2019; PAHO, 2023; WHO, 2023). A *Figura 2* apresenta o ciclo biológico do *T. cruzi*.

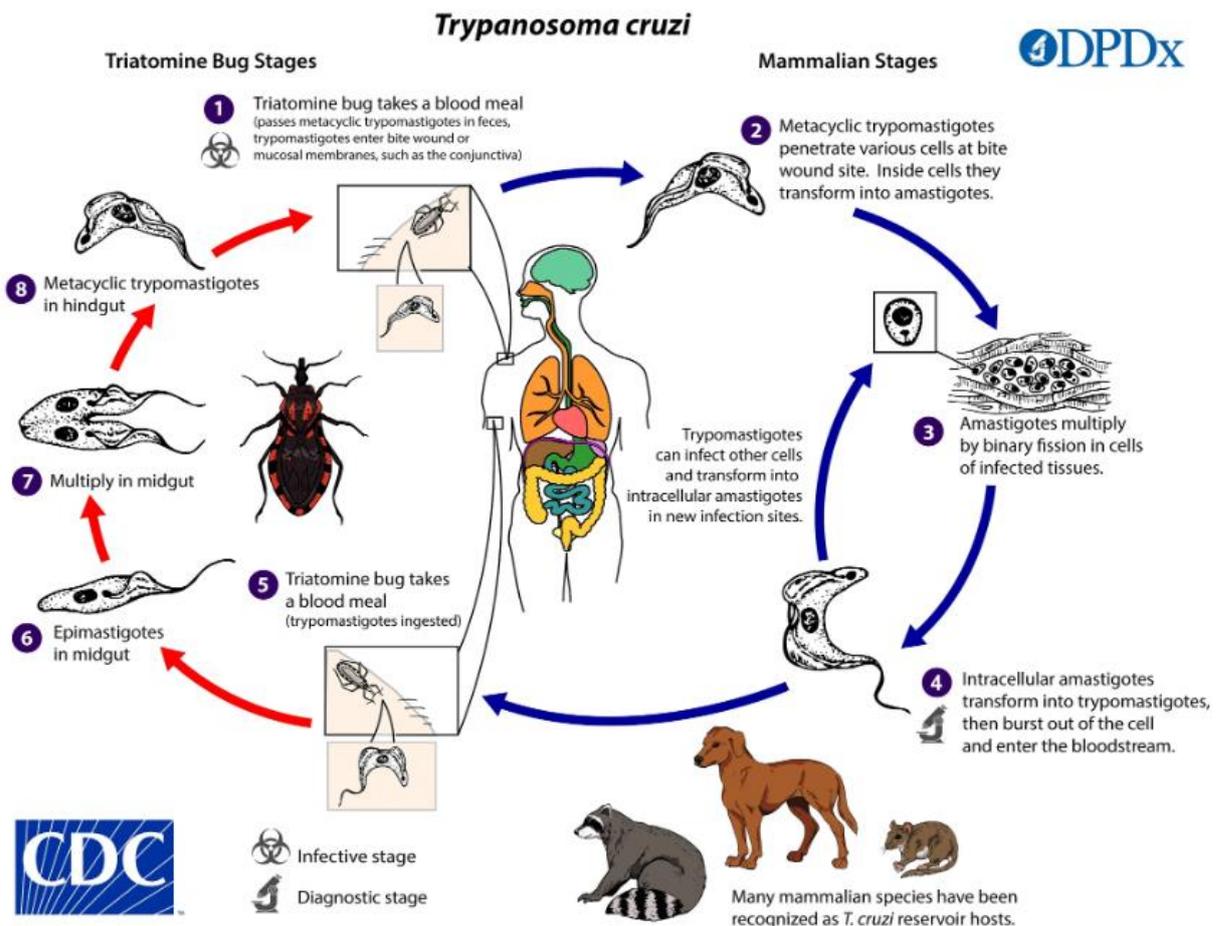


Figura 2 - Ciclo biológico do *T. cruzi* (Disponível em:

<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/modules/ChagasLifeCycle/>

Acesso em: 29 Jul.2023).

Estas formas podem invadir novas células localizadas no sítio de infecção, mas podem atingir a corrente circulatória e atingir todos os tecidos do hospedeiro, onde vão invadir os mais diferentes tipos celulares. Durante este processo, a forma tripomastigota começa a se diferenciar para a forma amastigota, sendo, então, liberada para o citoplasma da célula hospedeira, onde se multiplica diversas vezes. Quando o citoplasma da célula hospedeira fica repleto de formas amastigotas há o início da nova

diferenciação, agora de forma amastigota para forma tripomastigota. A forma tripomastigota é muito móvel e secreta enzima que atuará na membrana plasmática da célula hospedeira. Estes dois fatores levam ao rompimento desta célula, liberando muitas formas tripomastigotas para o meio extracelular (CHAGAS, 2023b; DNDi, 2023; LIDANI et al., 2019; PAHO, 2023; WHO, 2023).

Embora a forma tripomastigota seja reconhecida como a principal forma infectante de *T. cruzi*, tem se demonstrado, de modo crescente, que amastigotas também possuem capacidade de infectar células hospedeiras nucleadas. Em alguns casos a infecção é rápida e em outros casos só será detectada muito tempo após a infecção inicial, isto porque a população de *T. cruzi* é composta por um conjunto altamente heterogêneo de cepas com variação intra-espécies marcantes e exibindo características biológicas abrangentes (CHAGAS, 2023b; DNDi, 2023; LIDANI et al., 2019; PAHO, 2023; WHO, 2023).

Adicionalmente, a infecção pode ocorrer por outros meios, como transfusão sanguínea, transmissão vertical da mãe grávida para o bebê por meio da placenta, transplante de órgãos e ingestão de alimento contaminado com fluidos e/ou partes do inseto vetor (CHAGAS, 2023b; DNDi, 2023; LIDANI et al., 2019; PAHO, 2023; WHO, 2023).

1.1.4 Diagnóstico

Durante a fase aguda ou crônica da doença de Chagas, o diagnóstico pode ser feito através da detecção do parasita usando métodos parasitológicos (diretos ou indiretos) ou pela presença de anticorpos no soro, usando testes sorológicos como IFI, Imunofluorescência Indireta, HAI, Hemaglutinação Indireta, e ELISA, do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. Se os testes sorológicos apresentarem resultado indeterminado ou para verificar a cura após o tratamento antiparasitário, o teste molecular como a PCR pode ser usado, apesar de sua complexidade e da falta de protocolos padronizados (CHAGAS, 2023c; DNDi, 2023; WHO, 2023).

Contudo, existem limitações na precisão dos exames laboratoriais parasitológicos. Especialmente no diagnóstico da fase crônica, ainda esse enfatiza a necessidade de um método mais direto e sensível, que possa monitorar a presença do parasita e confirmar a causa da doença. Adicionalmente, há o fato de que menos de 10% dos pacientes com doença de Chagas na América são testados e apenas 1% deles recebem o tratamento adequado, o que mostra a importância da busca por compostos que sejam mais eficazes

contra o *T. cruzi* principalmente na fase crônica da doença (CHAGAS, 2023c; DNDi, 2023; WHO, 2023).

1.1.5 Quimioterapia

1.1.5.1 *Quimioterápicos disponíveis na terapêutica*

Mesmo a doença de Chagas tendo completado mais de cem anos desde sua descoberta, a quimioterapia utilizada no tratamento ainda permanece precária, tendo apenas dois fármacos disponíveis no mercado, nifurtimox e benznidazol (**Figura 3**), os quais foram descobertos há meio século. Ambos apresentam baixa taxa de eficácia na fase crônica da doença e mais de 80% dos pacientes não obtêm a cura parasitológica neste estágio (DNDi, 2023; LIDANI et al., 2019; PAHO, 2023; WHO, 2023).

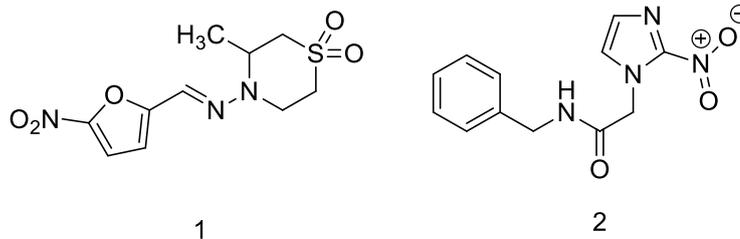


Figura 3 - nifurtimox (1) e benznidazol (2).

1.1.5.2 *Planejamento de antichagásicos*

1.1.5.2.1 *Liberadores de óxido nítrico*

O óxido-nítrico (NO) é considerado uma importante molécula com propriedades citotóxicas e citostáticas para muitos parasitas, tais como *Leishmania major*, *Plasmodium spp* e *T. cruzi*. Os compostos liberadores de NO (p.ex. grupos furoxanos) são capazes de alterar quimicamente a atividade de cisteíno-proteases parasitárias, tais como a cruzaina, enzima de extrema importância para a nutrição e proteção do *T. cruzi*, por exemplo, através da formação de grupos S-nitrosotióis na cisteína catalítica do sítio ativo da enzima (CAZZULO; STOKA; TURK., 1997; McKERROW; ROSENTHAL; SWENERTON; DOYLE, 2008; SILVA; DALL; BRIZA; BRANDSTETTER; FERREIRA, 2019).

Em nosso laboratório (LAPEN: Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos contra Doenças Negligenciadas), o derivado *N*-acilidrazônico contendo furoxano como grupo liberador de óxido nítrico (**Figura 4**) apresentou atividade contra a forma amastigota de *T. cruzi* (IC 50 = 2,88 μ M), além de um índice de seletividade (IS) superior ao fármaco referência, o benznidazol (IS = 28 e 18, respectivamente) (SERAFIM, 2016; SERAFIM et al., 2014).

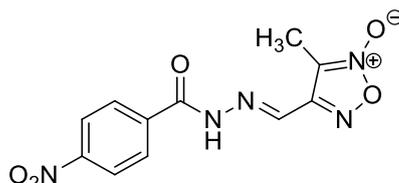


Figura 4 - Derivado *N*-acilidrazônico contendo furoxano.

1.1.5.2.2 Inibidores da Fe-superóxido dismutase

A enzima dos tripanossomas Fe-superóxido dismutase (Fe-SOD) possui importante função de proteção ao parasita, pois desempenha o papel de eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROS), protegendo o parasita de qualquer dano que pudesse ser causado pelo estresse oxidativo de, por exemplo, compostos liberadores de óxido-nítrico, como o grupo furoxano (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2018; MARTINEZ et al., 2014).

Além disso, a Fe-SOD é também responsável pela resposta ao estresse redox que a mitocôndria do parasita sofre e, devido a isso, novos estudos sugerem que a inibição dessa enzima pode causar desde disfunção mitocondrial até atividade tripanocida no *T. cruzi* (DOCAMPO, 1990; MARTÍN-ESCOLANO et al., 2018; MARTINEZ et al., 2014).

Um recente estudo mostrou que o derivado arilaminocetona contendo o grupo *linker* piperazina (**Figura 5**) tem grande potencial inibidor da enzima Fe-SOD e, conseqüentemente, atividade parasitária contra a forma amastigota do *T. cruzi*, além de alta seletividade (IC 50 = 0,60 μ M; SI = 88,7), pois possui três grupos importantes para a interação enzimática (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2018).

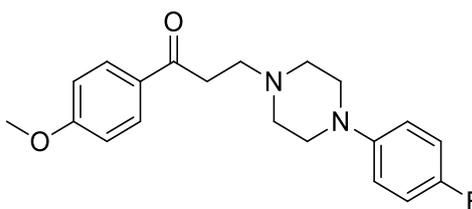


Figura 5 - Derivado arilaminocetona com grupo piperazina.

Resultados de estudos de *docking* molecular mostraram que o derivado de arilaminocetona interage com a enzima Fe-SOD por meio da interação iônica entre o *linker* piperazina e a Glu166 da enzima e por meio de interações de empilhamento π entre a fenila da molécula e o anel aromático de aminoácidos da enzima, dentre eles a Phe123 (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2018).

1.1.5.2.3 Inibidores da CYP51

A enzima 14α -esterol desmetilase, conhecida também por CYP51, faz parte da família do citocromo P450 e é responsável pela importante catálise oxidativa de diversos derivados do 2,3-epóxido-esqualeno, por exemplo, o lanosterol, resultando na produção de colesterol, ergosterol, sitosterol, dentre outros esteróis (LEPESHEVA; WATERMAN, 2011; SILVA, 2014; SUN et al., 2007).

Dessa forma, a inibição da CYP51 tem se mostrado como uma das estratégias na busca por novos fármacos potenciais contra a doença de Chagas. Trata-se de alvo validado, por muitos estudos, para antifúngicos. Estes fármacos inibidores da 14α -esterol desmetilase proporcionam efeitos tóxicos ao parasita por aumentarem o nível dos esteróis, gerando alterações na parede celular e diminuindo a capacidade de replicação celular do protozoário, que acabam por causar a morte do *T. cruzi* (LEPESHEVA et al., 2005; MORAES et al., 2014; SUN et al., 2007).

Devido a esse fato, alguns fármacos antifúngicos inibidores da CYP51 vêm sendo estudados contra o *T. cruzi* e têm mostrado, durante os ensaios biológicos, potente ação tripanomicida, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Dentre as moléculas usadas em testes recentes contra o parasita estão o posaconazol, o ravuconazol e dois derivados de fenarimol (EPL-BS967 e EPL-BS1246). No estudo, Moraes e seus colegas avaliaram a ação desses fármacos utilizando diferentes cepas do parasita e concluíram que o posaconazol, mesmo não sendo capaz de eliminar completamente uma infecção causada pelo *T. cruzi*, fato esse em função da possível resistência que o micro-

organismo possui à molécula, tem alta atividade tripanomicida e, embora esta seja variável entre as cepas, o referido fármaco pode ser eficaz contra a doença de Chagas (LEPESHEVA; WATERMAN, 2011; MORAES et al., 2014; SILVA, 2014).

Além disso, outros estudos de modelos moleculares em 3D mostraram interações que podem ocorrer no sítio ativo dessa enzima com os fármacos antifúngicos e, dentre elas, destacam-se as importantes interações com grupos triazol e acetofenona halogenado por meio de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações π - π , empilhamento π e ligação ao heme (LEPESHEVA; WATERMAN, 2011; SILVA, 2014; SUN et al., 2007)

Também em nosso laboratório (LAPEN), o derivado alquil-1,2,4-triazol com o grupo 2,4-difluorfenil (**Figura 6**) mostrou potencial de inibição de células amastigotas do *T. cruzi* similar ao do benzimidazol e boa seletividade em relação à célula parasitária (EC 50 = 5,53 μ M; SI > 36) (SILVA et al., 2016).

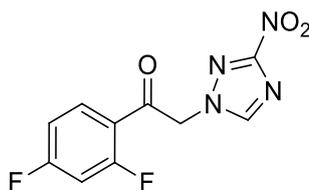


Figura 6 - Derivado alquil-1,2,4-triazol com o grupo 2,4-difluorfenil.

1.1.5.2.4 Derivados de azaindol

Os Azaindóis são compostos que apresentam anéis de pirrol e piridina fundidos. Os Azaindóis e seus derivados apresentam atividades biológicas consideráveis, sendo excelentes bioisómeros dos sistemas indol ou purina. Em relação à regra dos cinco de Lipinski, pKa, lipofilicidade, propriedades ADME e ligação ao alvo, os Azaindóis podem ter características muito interessantes em comparação com muitos outros heterociclos fundidos (MÉROUR et al., 2014).

O 7-azaindol é o derivado mais conhecido devido à sua relevância como um elemento de ligação da região da *hinge* da quinase, onde o átomo de N da piridina e o NH do pirrol atuam como receptor e doador de ligações de hidrogênio, respectivamente, para formar hidrogênio bidentado com o esqueleto peptídico no sítio de ligação do ATP da quinase (IRIE; SAWA, 2018; MAHINDRA et al., 2020). Dessa forma, o 7-azaindol é considerado um fragmento privilegiado de quinase, estando presente em mais de

100.000 estruturas químicas diferentes, muitas das quais são inibidoras de proteína quinase (IRIE; SAWA, 2018; MÉROUR et al., 2014).

Recentemente, mais estudos têm sido publicados mostrando propriedades inibitórias da molécula de 7-azaindol em diversas quinases ou em outras enzimas de alguns parasitas de doenças negligenciadas, como malária, doença de Chagas e tripanossomíase africana humana (HAT). Klug et al. (2021) demonstraram a relevância do 7-azaindol para a inibição do crescimento de *Trypanosoma brucei* em HAT, estabelecendo uma vasta relação estrutura-atividade (REA) para a metilação deste anel e tosilação do -NH no indol ou substituindo o azaindol por outros heterociclos. Ambos anularam a atividade antitripanossômica, o que destaca a importância do 7-azaindol para a atividade inibidora.

No caso da malária, Mahindra e colaboradores (2020) estudaram a inibição da PfCLK3, uma quinase essencial para o processamento do RNA do parasita *P. falciparum*, por um análogo do 7-azaindol. Nesse caso, o análogo *hit* do 7-azaindol, TCMDC-135051, com atividade nanomolar contra PfCLK3 em ensaios *in vitro* em quinase, foi encontrado em um *High Throughput Screening* (HTS), com cerca de 25.000 compostos (ALAM et al., 2019; MAHINDRA et al., 2020).

Recentemente, outro composto derivado de 7-azaindol (**Figura 7**), inicialmente desenvolvido como um inibidor das proteínas quinases BMX e BTK por Forster e colaboradores (2020) no laboratório anfitrião do projeto BEPE, foi submetido a uma triagem fenotípica contra *Plasmodium falciparum*, a qual revelou inibição do crescimento do parasita por esse composto via direcionamento à quinase essencial do *Plasmodium* (dados não publicados) (FORSTER et al., 2020). Dado o fato de que as proteínas quinases também são moléculas sinalizadoras essenciais no *Trypanosoma*, existe um potencial no reaproveitamento do análogo 7-azaindol contra o *Trypanosoma cruzi*.

Por fim, Koovits e colaboradores (2020) estudaram a REA de um derivado de 4-azaindol (**Figura 7**) para inibição de *T. cruzi*. Embora os análogos de azaindol não tenham mostrado atividade nanomolar nos ensaios fenotípicos, eles foram capazes de validar o anel azaindol sendo crucial para a potência micromolar contra a forma amastigota do parasita.

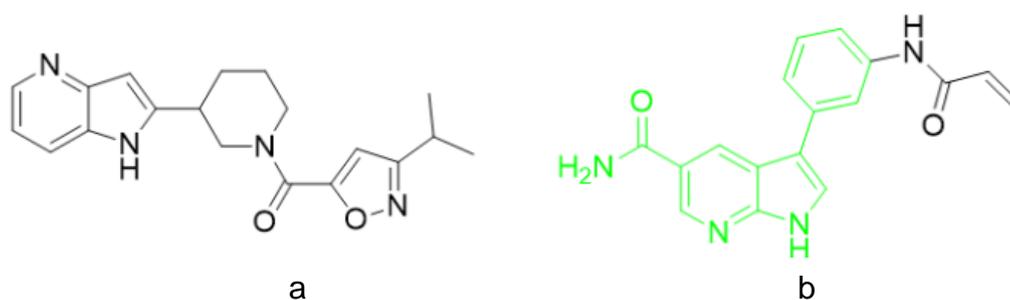


Figura 7 - Derivados de 4-azaindol (a) e 7-azaindol (b).

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Conforme os dados expostos anteriormente, é urgente a busca por novas moléculas contra o parasita *T. cruzi*. Este fato, somado ao interesse que as moléculas liberadoras de óxido nítrico, inibidoras da Fe-SOD e da CYP 51 e derivados de azaindol têm apresentado nas últimas décadas em relação à atividade em estudos anti-*T. cruzi*, determinam o objetivo deste trabalho. Assim, realizou-se o planejamento, a síntese de dois grupos de compostos: 1) contendo os grupos furoxano, acetofenona e piperazina realizado no Brasil (**Série 1**); 2) contendo o grupo 7-azaindol, realizado na Alemanha durante estágio BEPE/FAPESP, na University of Tübingen, Department of Pharmacy and Biochemistry, Institute of Pharmaceutical Sciences, Tübingen, Alemanha (**Série 2**) para a obtenção de novos candidatos a fármacos contra a doença de Chagas. O primeiro grupo foi submetido a ensaios em *T. cruzi*. O segundo grupo será, também, ensaiado em *T. cruzi* e, posteriormente, em *Plasmodium spp*, devido ao potencial de inibição de crescimento do parasita mostrado pela molécula lead.

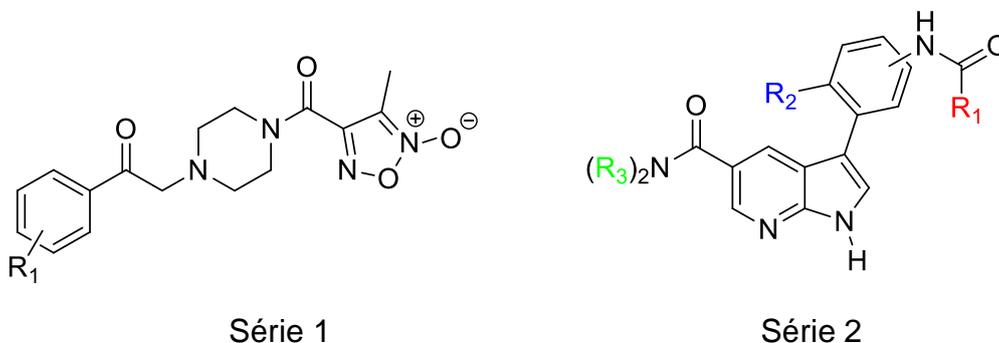


Figura 8: Esqueleto molecular geral dos derivados.

3. PARTE EXPERIMENTAL

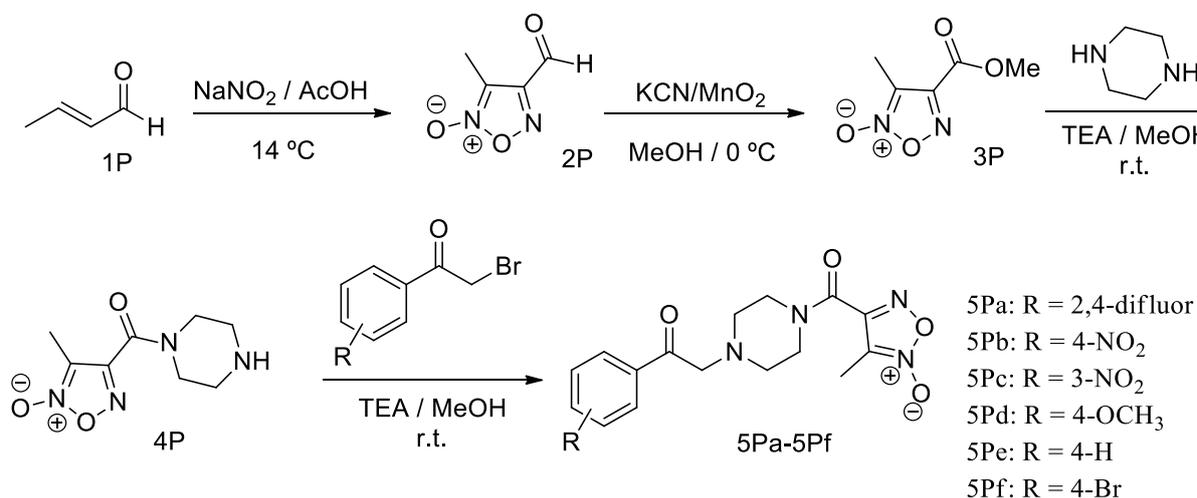
3.1 Material e Métodos

3.1.1 Material

O material utilizado durante este projeto consistiu em vidraria comum em laboratório de síntese, como béqueres, balões, agitadores, entre outros.; placas de sílica-gel para realização de CCD; rotaevaporador; câmara de UV; purificador Isolera Biotage; HPLC; HPLC-MS; DC-MS. Como reagentes químicos e solventes específicos para as sínteses utilizaram-se nitrito de sódio, crotonaldeído, ácido acético glacial, cianeto de potássio, óxido de manganês, coluna celite, diclorometano, trietilamina, piperazina, dimetilformamida, carbonato de potássio, brometos de acila aromáticos, óxido de magnésio e catalisador de ouro.

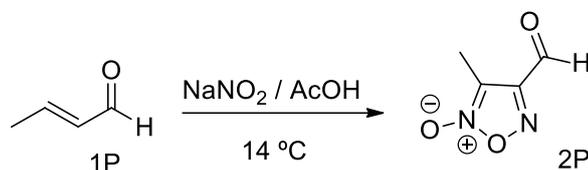
3.1.2 Métodos de síntese

3.1.2.1 *Rota Sintética dos derivados do furoxano obtidos no Brasil (Série 1)*



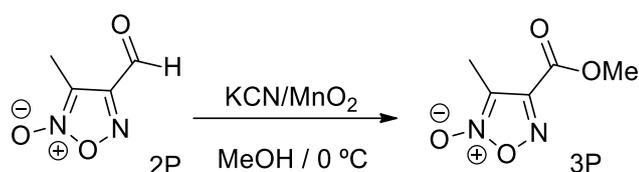
Esquema 1: Rota Sintética Geral dos derivados do **Série 1**.

3.1.2.2 *Procedimento de preparação de síntese do intermediário 4-formil-3-metil-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (furoxano) (2P)*



Em solução agitada e resfriada (5-10 °C) de crotonaldeído (0,142 mol) e ácido acético (20 mL), adicionou-se, lentamente (cerca de uma hora), solução aquosa saturada de nitrito de sódio (0,497 mol). Durante a adição, a temperatura variou entre 11-13 °C. Após completa adição da solução de nitrito de sódio, a mistura continuou sob agitação à temperatura ambiente por mais uma hora. Por fim, adicionaram-se 200 mL de água para diluição da reação. Extraiu-se a solução com diclorometano e lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio e concentrada, resultando em um óleo amarelo escuro. O material resultante foi purificado por coluna cromatográfica, utilizando-se apenas diclorometano como eluente de sistema isocrático, resultando em um óleo amarelo claro com rendimento de 56%.

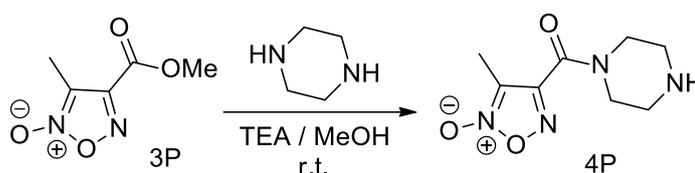
3.1.2.3 *Síntese do segundo intermediário 4-metoxi-furoxano (3P)*



Em uma solução sob agitação a 0 °C de furoxano (2P) (8,58 mmol) em metanol (13,2 mL) adicionaram-se, sequencialmente, cianeto de potássio (14,19 mmol) e, então, óxido de manganês (IV) (42,9 mmol) aos poucos (10 minutos). Após completa adição, a reação continuou sob agitação por mais 30 minutos a 0 °C e, então, seguiu para filtração em coluna celite, que foi lavada com diclorometano. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, secada com sulfato de sódio e concentrada obtendo-se sólido laranja. O material foi purificado por coluna cromatográfica,

utilizando-se apenas diclorometano como eluente de sistema isocrático, resultando em um sólido amarelo claro com rendimento de 68%.

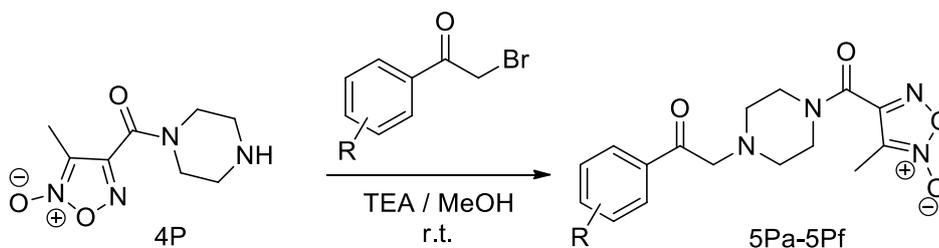
3.1.2.4 Síntese do terceiro intermediário 4-piperazina-furoxano (**4P**)



Em uma solução, à temperatura ambiente, de piperazina (7,096 mmol), metanol (78 mL) e trietilamina (7,096 mmol), adicionou-se aos poucos o composto **3P** (7,096 mmol). Após adição total, a reação continuou sob agitação por cinco horas, quando foi interrompida para retirada de metanol, formando um sólido amarelo de consistência pastosa. Ao composto, adicionou-se acetato de etila, lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio e a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio e concentrada, gerando um sólido amarelo e poroso. O material foi purificado por coluna cromatográfica, utilizando-se diclorometano-metanol (0-20%) como eluente, resultando em um sólido amarelo com rendimento de 43%.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ (ppm)): 3,82-3,77 (d, J_{a,b}=15 Hz, 4H-a); 2,97 (s, 4H-b); 2,81 (s, 3H-c).

3.1.2.5 Procedimento final de síntese dos compostos híbridos de acetofenona-piperazina-furoxano (**5Pa-f**)

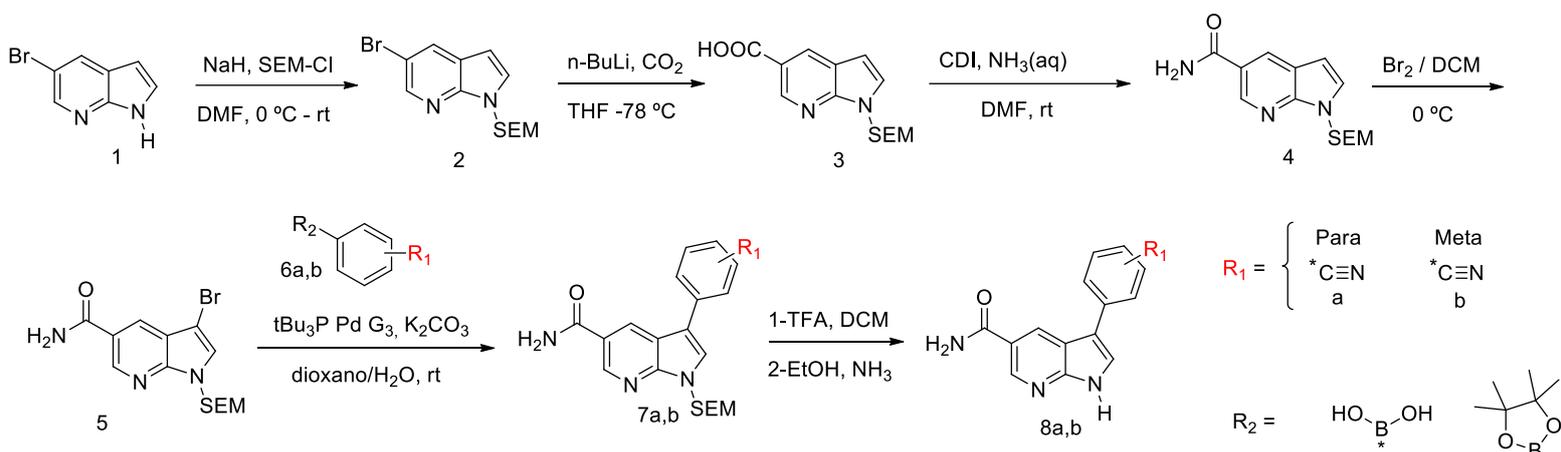


Em uma solução de diclorometano anidro (10 mL), trietilamina (0,55 mmol) e **4P** (0,5 mmol), sob agitação em temperatura ambiente e atmosfera inerte por 15 minutos, adicionou-se solução de diclorometano e 2-bromoacetofenona (0,5 mmol)

correspondente ao produto final. A reação continuou sob agitação por 24 h, quando foi interrompida adicionando-se diclorometano (40 mL). Lavou-se a reação com solução saturada de cloreto de sódio. Em seguida, a fase orgânica foi secada e concentrada, gerando um óleo transparente amarelado. O material foi purificado por coluna cromatográfica, utilizando-se diclorometano-acetonitrila (0-10%) e, depois, diclorometano 95:5 metanol como eluentes, resultando em um produto sólido, de amarelo a alaranjado com rendimentos variando entre 16 a 91%.

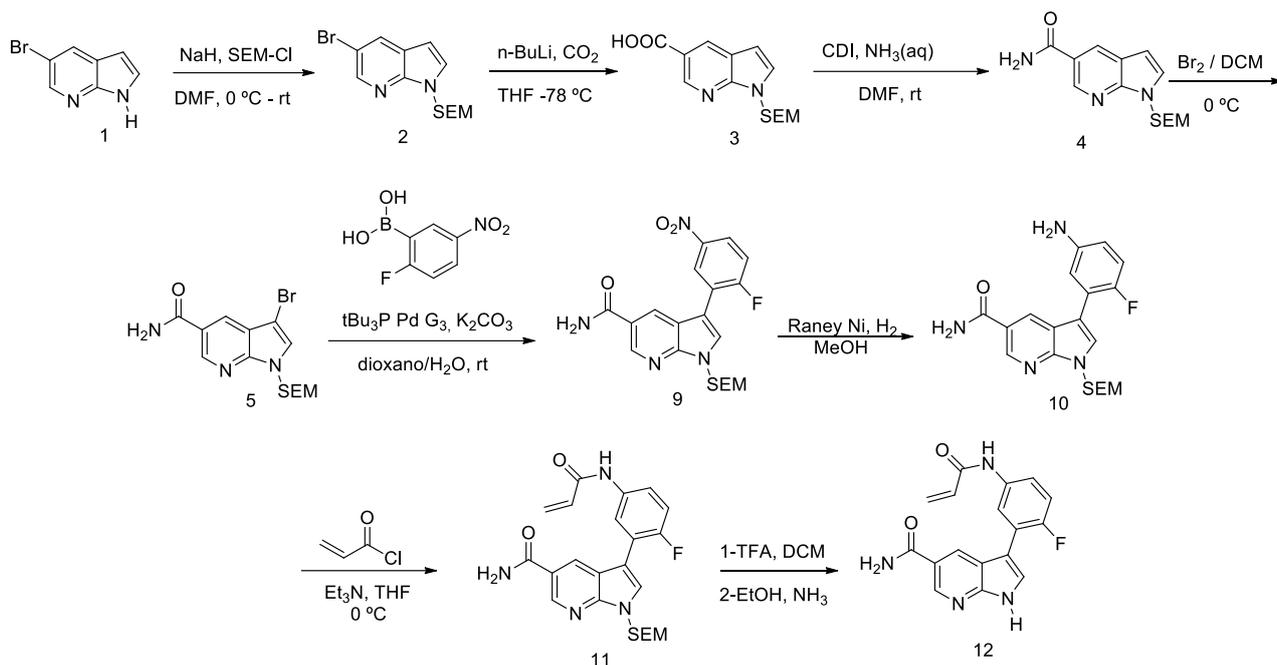
3.1.3 Rota Sintética-Derivados do azaindol (Série 2) obtidos durante estágio BEPE/FAPESP, na Alemanha

3.1.3.1 Compostos derivados para/meta-nitrila



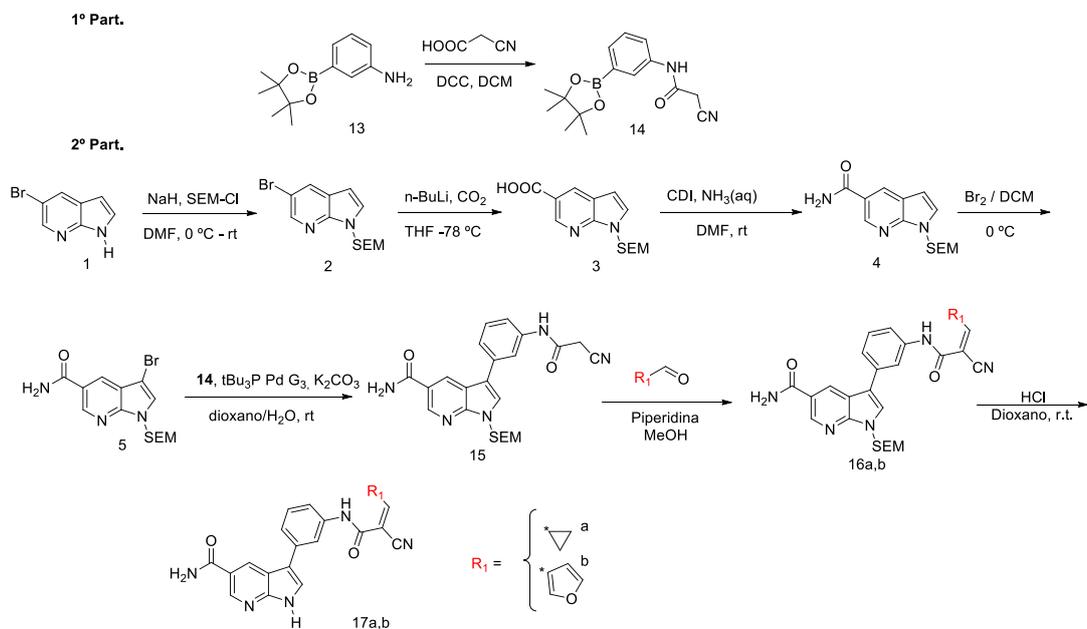
Esquema 2: Rota sintética dos derivados de azaindol contendo grupo nitrila nas posições *meta* e *para*.

3.1.3.2 Compostos derivados contendo aceptor de Michael



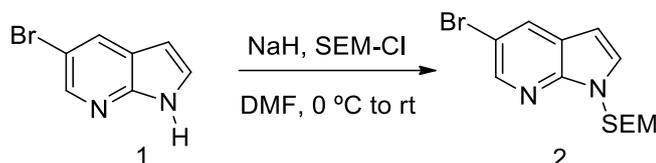
Esquema 3: Rota Sintética dos derivados de azaindol contendo aceptor de Michael

3.1.3.3 Compostos derivados contendo grupos ligantes covalentes reversíveis



Esquema 4: Rota sintética dos derivados de azaindol contendo grupos ligantes covalentes reversíveis.

3.1.3.4 Procedimento de síntese do intermediário 5-bromo-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (**2**)

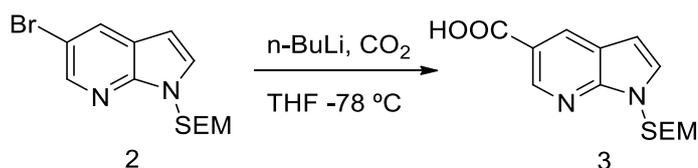


Dissolvem-se 5,910 mg de **1** em 30 ml de DMF anidro e a reação é resfriada a 0°C. Adicionam-se, então, 1,554 mg de NaH e a mistura é agitada à temperatura ambiente por uma hora. Adicionam-se, então, lentamente, 5,802 mL de SEM-Cl gota a gota enquanto a reação é novamente resfriada com gelo. A solução é agitada à temperatura ambiente por 90 minutos. A mistura reacional é diluída com acetato de etila (EtOAc) e a fase orgânica é lavada quatro vezes com água e uma vez com solução saturada de cloreto de sódio (salmoura), depois seca com sulfato de sódio (Na₂SO₄) e concentrada a vácuo. É então purificado por coluna cromatográfica hexano:EtOAc (0-10%). O produto é isolado como um óleo incolor com rendimento de 82%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,35 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,02 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,35 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 6,46 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 5,64 (s, 2H), 3,54 – 3,50 (m, 2H), 0,92 – 0,87 (m, 2H), -0,07 (s, 9H).

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 148,04, 145,19, 132,34, 130,79, 123,65, 113,68, 102,05, 74,50, 67,83, 19,23, 0,25, 0,00, 1,73 - -0,26 (m).

3.1.3.5 Procedimento de síntese do intermediário ácido 1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxílico (**3**)



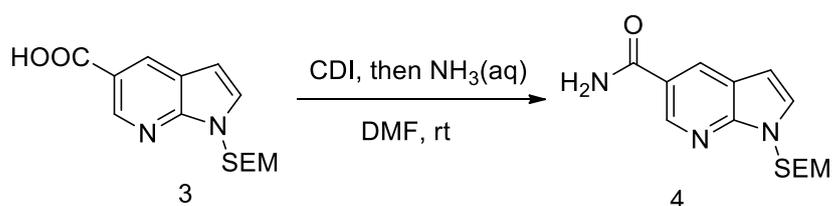
Dissolvem-se 8,063 mg de **2** em 222 mL de THF seco, em atmosfera inerte. A mistura é resfriada a -80 °C. Agora, 10,86 mL de *n*-BuLi 2,5 M (butil lítio) em solução de hexano são lentamente adicionados gota a gota. Agita-se a esta temperatura

durante mais 120 minutos (a solução torna-se ligeiramente laranja, mas torna-se novamente incolor). Dióxido de carbono anidro (CO₂) é, então, passado pela solução por 240 minutos. Para este propósito, o CO₂ é passado para a mistura de reação via coluna de cloreto de cálcio. O excesso de *n*-BuLi é neutralizado pela adição lenta de água (5,6 mL) e a mistura é aquecida lentamente à temperatura ambiente e depois diluída com EtOAc. A fase orgânica é extraída três vezes com solução de NaOH 0,5 M. As fases aquosas combinadas são acidificadas com ácido clorídrico 2 M e reextraídas com EtOAc três vezes. As fases orgânicas combinadas são lavadas com salmoura, secas sobre Na₂SO₄ e concentradas sob pressão reduzida. Purifica-se, em seguida, por coluna cromatográfica hexano:EtOAc (0-20%). O produto é isolado como um sólido branco com rendimento de 50%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) 9,10 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 8,67 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,45 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 6,66 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 5,73 (s, 2H), 3,58 – 3,54 (m, 2H), 0,94 – 0,90 (m, 2H), -0,07 (s, 9H).

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 171,83, 150,40, 146,07, 131,94, 129,75, 120,18, 118,48, 102,81, 73,28, 66,66, 17,92, -1,33.

3.1.3.6 Procedimento de síntese do intermediário 1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-*b*]piridina-5-carboxamida (**4**)



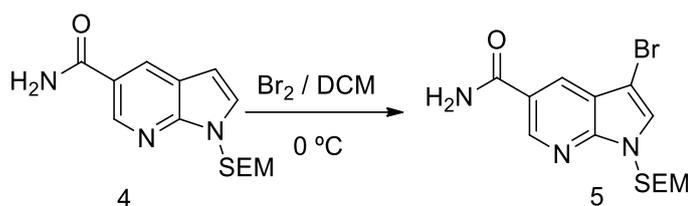
Dissolvem-se 2.216,7 mg de **3** em 53,5 mL de DMF anidro. 1.476 mg de CDI são adicionados e a mistura é agitada à temperatura ambiente por 60 minutos. 6,7 ml de solução concentrada de amônia são, então, adicionados e a mistura é agitada à temperatura ambiente por 2 h. A mistura é diluída com água e a fase aquosa é extraída três vezes com acetato de etila. Em seguida, é lavada duas vezes com água e solução saturada de NaCl, seca com Na₂SO₄ e o solvente é removido em rota-evaporador. É,

então, purificado por coluna cromatográfica hexano:EtOAc (0-50%). O produto é isolado como um cristal sólido branco com rendimento de 78%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,82 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,43 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,43 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 6,61 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 6,15 (s, 2H), 5,70 (s, 2H), 3,56 – 3,52 (m, 2H), 0,92 – 0,88 (m, 2H), -0,08 (s, 9H).

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 168,95, 149,48, 142,71, 129,81, 129,28, 122,40, 120,31, 102,44, 73,34, 66,61, 17,91, -1,33.

3.1.3.7 Procedimento geral de síntese do intermediário 3-bromo-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina-5-carboxamida (**5**)

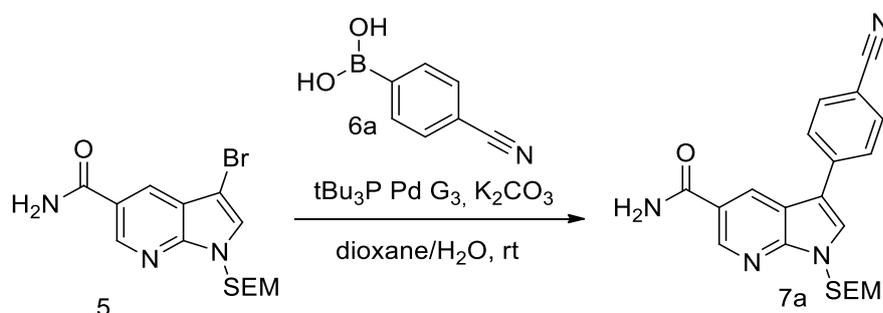


Dissolvem-se 1.289,8 mg de **4** em 80,61 mL de DCM anidro e resfriados a 0°C. A solução de bromo 1M em DCM é então lentamente adicionada gota a gota. A solução inicialmente torna-se turva, depois assume coloração amarelada, que desaparece gradativamente. A solução de bromo é então adicionada gota a gota até que o amarelo persista. A mistura é, então, agitada à temperatura ambiente com TLC, indicando conversão completa (cerca de uma hora). O excesso de bromo é reduzido com solução de sulfito de sódio e diluído com EtOAc. Em seguida, a fase orgânica é lavada uma vez com solução saturada de bicarbonato de sódio (K₂CO₃) e salmoura. É seca com Na₂SO₄ e o solvente é removido sob pressão reduzida. É então purificado por coluna cromatográfica hexano:EtOAc (0-60%). O produto é isolado como um cristal sólido branco com rendimento de 94%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,87 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 8,36 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,47 (s, 1H), 6,21 (s, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,56 – 3,52 (m, 2H), 0,93 – 0,89 (m, 2H), -0,06 (s, 9H).

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 168,26, 148,27, 143,89, 128,72, 128,18, 123,03, 119,81, 91,47, 73,39, 66,91, 17,90, -1,32.

3.1.3.8 Procedimento de síntese do intermediário 3-(4-cianofenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina-5-carboxamida (**7a**)



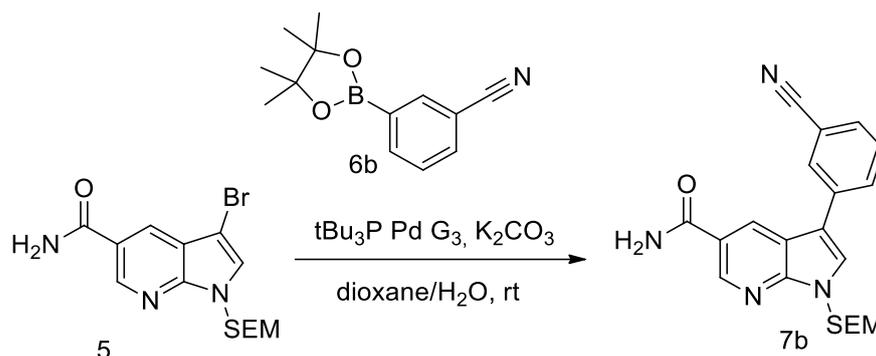
Combinam-se 200 mg de **5**, 129,2 mg de ácido (4-cianofenil)-borônico e 12,5 mg de catalisador de paládio G3 em um frasco e são tornados inertes. São adicionados 20 mL de dioxano desgaseificado e 5 mL de solução de K_2CO_3 0,5 M desgaseificada. O argônio é então passado através da solução por mais 5 minutos. É agitado à temperatura ambiente por uma hora. A reação é diluída com EtOAc e lavada com salmoura. É então seco com Na_2SO_4 e o solvente é removido sob pressão reduzida. É então purificado por coluna cromatográfica em hexano:EtOAc (0-60%). O produto é isolado como um sólido amarelo com rendimento de 78%.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,84 (s, 1H), 8,74 (d, $J = 1,1$ Hz, 1H), 7,75 (dd, $J = 11,9, 7,8$ Hz, 5H), 6,12 (s, 2H), 5,77 (s, 2H), 3,62 – 3,58 (m, 2H), 0,96 – 0,92 (m, 2H), -0,05 (s, 9H).

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 169,37, 151,10, 144,28, 139,69, 134,04, 129,83, 128,89, 128,51, 124,30, 120,08, 119,05, 117,14, 111,28, 74,53, 68,04, 18,94, -0,30.

DC-MS (ESI(-)): 391.5 [M – H⁺]

3.1.3.9 Procedimento de síntese do intermediário 3-(3-cianofenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxamida (**7b**)



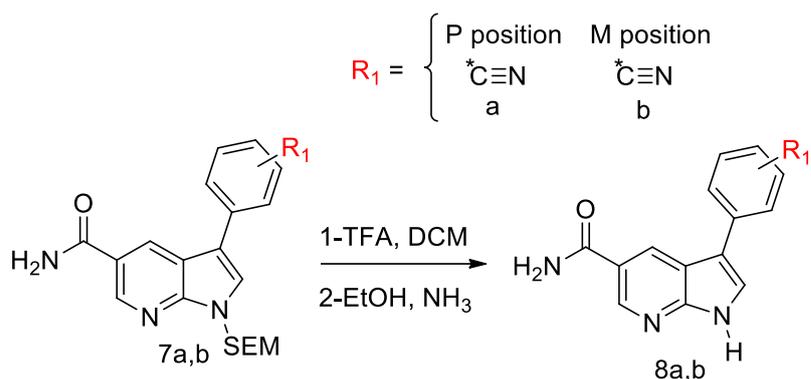
Combinam-se 200 mg de **5**, 129,2 mg de ácido (3-cianofenil)borônico e 12,5 mg de G3 paládio em um frasco e são tornados inertes. São adicionados 20 mL de dioxano desgaseificado e 5 mL de solução de K_2CO_3 0,5 M desgaseificada. Agita-se à temperatura ambiente por quatro horas. A reação é diluída com EtOAc e filtrada em coluna de celite. O solvente é removido sob pressão reduzida. Em seguida, é purificado por coluna cromatográfica diclorometano (DCM):(MeOH) Metanol (0-20%). O produto é isolado como um sólido branco com rendimento de 98%.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,84 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 8,66 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,88 (d, $J = 8,9$ Hz 2H), 7,65 (s, 1H), 7,59 (dd, $J = 13,4, 5,9$ Hz, 2H), 6,19 (s, 2H), 5,74 (s, 2H), 3,61 – 3,57 (m, 2H), 0,95 – 0,91 (m, 2H), -0,09 (s, 9H).

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 168,56, 149,88, 143,43, 135,27, 131,57, 128,42, 127,35, 123,19, 118,87, 117,99, 115,73, 113,39, 73,49, 66,98, 17,93, -1,31.

DC-MS (ESI-(+)): 415.1 [M + Na⁺]

3.1.3.10 Procedimento de síntese dos produtos finais 4-(3-cianofenil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina-5-carboxamida e 3-(3-cianofenil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina-5-carboxamida (**8a,b**)



Dissolvem-se 205 mg de **7** em 23 mL de DCM e 5,8 mL de TFA são adicionados lentamente. A reação é agitada à temperatura ambiente por 24 h. Substâncias voláteis são separadas sob pressão reduzida. O resíduo foi retomado em 12 mL de etanol. 2,9 mL de solução de amônia a 25% em água são adicionados e a mistura é agitada por mais 24 h. Todos os voláteis são removidos sob pressão reduzida. É então purificado por coluna cromatográfica DCM:MeOH (0-30%). Ambos os produtos são isolados como sólidos brancos.

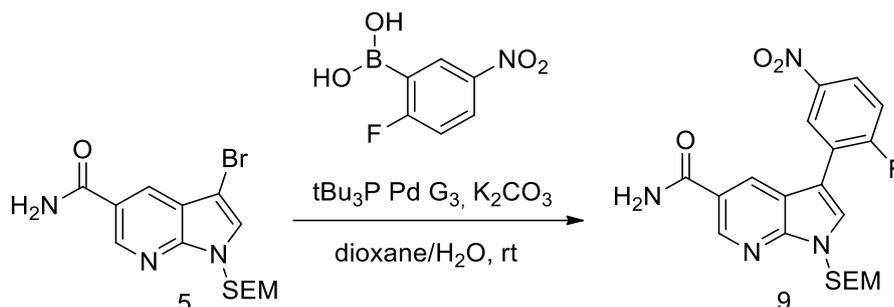
8a ¹H RMN (400 MHz, DMSO- D₆) δ 12,50 (s, 1H), 8,84 (s, 2H), 8,25 (d, *J* = 12,5 Hz, 2H), 8,03 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,90 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,43 (s, 1H).

¹³C RMN (101 MHz, DMSO- D₆) δ 168,00, 150,78, 144,29, 140,02, 133,28, 127,86, 127,71, 127,11, 123,29, 119,72, 116,43, 114,06, 108,25.

8b ¹H RMN (500 MHz, DMSO- D₆) δ 12,36 (s, 1H), 8,83 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 8,23 (d, *J* = 30,0 Hz, 4H), 7,72 (d, *J* = 21,3 Hz, 2H), 7,44 (s, 1H).

¹³C RMN (101 MHz, DMSO- D₆) δ 167,46, 150,08, 143,67, 135,82, 130,79, 129,97, 129,27 (d, *J* = 4,1 Hz), 126,82, 126,31, 122,63, 118,85, 115,83, 113,20, 112,03.

3.1.3.11 Procedimento de síntese do intermediário 3-(2-fluor-5-nitrofenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-*b*]piridina-5-carboxamida (**9**)



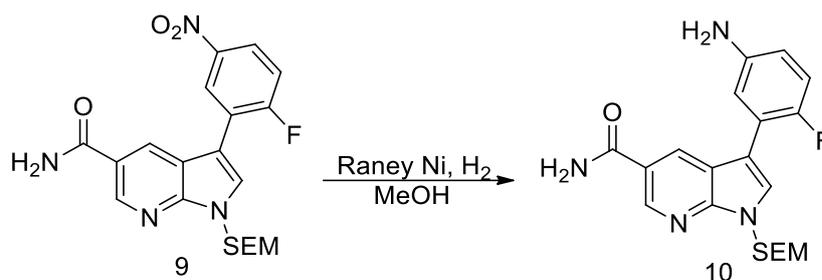
Combinam-se 300 mg de **5**, 180 mg de ácido (2-fluor-5-nitrofenil)borônico e 18,75 mg de G3 Palladium em um frasco e são tornados inertes. São adicionados 30 mL de dioxano desgaseificado e 7,5 mL de solução de K_2CO_3 0,5 M desgaseificada. Agita-se à temperatura ambiente por 4h. A reação é diluída com EtOAc e filtrada em coluna de celite. O solvente é removido sob pressão reduzida. É então purificado por coluna cromatográfica DCM:MeOH (0-20%). O produto é isolado como um sólido amarelo com rendimento de 93%.

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,86 (dd, $J_{h,f} = 17,8, 20$ Hz, 1H), 8,62 – 8,49 (m h,f , 1H), 8,36 – 8,16 (m h,f , 1H), 7,85 – 7,43 (m h,f , 1H), 7,36 (t, $J_{h,f} = 9,2$ Hz, 1H), 6,00 (s, 2H), 5,78 (s, 1H), 5,67 (s, 1H), 3,75 – 3,38 (m h,f , 2H), 1,07 – 0,79 (m h,f , 2H), -0,06 (d, $J_{h,f} = 6,4$ Hz, 9H).

^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 168,24, 163,13 (d, $J_{c,f} = 258,4$ Hz, 2C), 149,11, 144,79, 143,58 (d, $J_{c,f} = 49,8$ Hz, 2C), 129,54 (dd, $J_{c,f} = 74,6, 4,9$ Hz, 2C), 128,48 (d, $J_{c,f} = 51,0$ Hz, 2C), 124,83 (dd, $J_{c,f} = 149,6, 8,1$ Hz, 2C), 123,32 (d, $J_{c,f} = 16,5$ Hz, 2C), 123,03 (d, $J_{c,f} = 7,3$ Hz, 2C), 119,83, 118,49, 117,39 (d, $J_{c,f} = 25,2$ Hz, 2C), 109,31, 73,58 (d, $J_{c,f} = 34,1$ Hz, 2C), 67,02 (d, $J_{c,f} = 21,6$ Hz, 2C), 17,91 (d, $J_{c,f} = 5,0$ Hz, 2C), -1,31.

DC-MS (ESI(+)): 453,0 [M + Na⁺]

3.1.3.12 Procedimento de síntese do intermediário 3-(5-amino-2-fluorofenil)-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxamida (**10**)



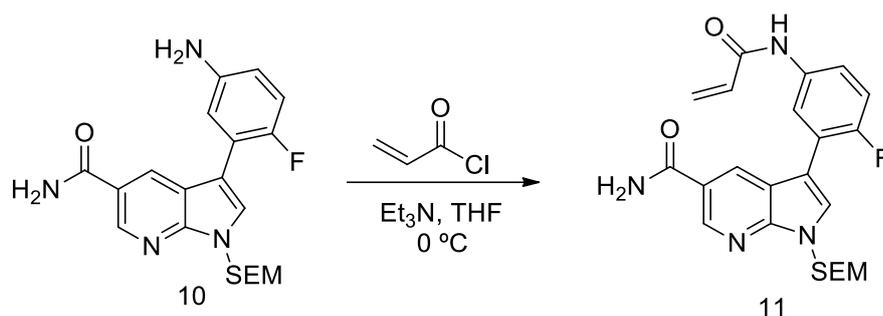
Dissolvem-se 110 mg de **9** em uma quantidade quantitativa de Raney Ni em 22 mL de MeOH e tornados inertes. Em seguida, gás hidrogênio é passado pela solução por 60 minutos. Raney Ni nunca deve secar devido à sua grande área de superfície e alto volume de gás hidrogênio contido. Também deve ser manuseado sob uma atmosfera inerte. A reação é diluída com MeOH e filtrada em coluna de celite. O solvente é removido sob pressão reduzida e se torna um produto sólido branco. Nenhuma purificação adicional é necessária. O rendimento é de 94%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,82 (d, $J_{h,f} = 26,0$ Hz, 1H), 8,54 (d, $J_{h,f} = 47,3$ Hz, 1H), 8,11 (d, $J_{h,f} = 34,2$ Hz, 1H), 7,82 (d, $J_{h,f} = 81,4$ Hz, 1H), 7,41 (t, $J_{h,f} = 24,6$ Hz, 1H), 7,16 – 6,82 (m_{h,f}, 2H), 6,69 – 6,43 (m_{h,f}, 1H), 5,67 (d, $J_{h,f} = 26,8$ Hz, 2H), 5,06 (s, 1H), 3,54 (dt, $J_{h,f} = 25,6, 7,9$ Hz, 3H), 0,82 (dd, $J_{h,f} = 17,0, 9,1$ Hz, 2H), -0,11 (d, $J_{h,f} = 4,8$ Hz, 9H)

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 167,56 (d, $J_{c,f} = 9,8$ Hz, 1C), 151,30 (d, $J_{c,f} = 232,9$ Hz, 2C), 147,11 (d, $J_{c,f} = 329,9$ Hz, 2C), 143,25 (d, $J_{c,f} = 34,6$ Hz, 2C), 130,73, 128,95 (dd, $J_{c,f} = 113,9, 13,7$ Hz, 3C), 123,12 (d, $J_{c,f} = 46,1$ Hz, 2C), 121,21 – 118,90 (m_{c,f}, 3C), 118,21 – 115,51 (m_{c,f}, 3C), 114,75 – 112,75 (m_{c,f}, 3C), 110,10, 101,45, 72,61 (d, $J_{c,f} = 14,6$ Hz, 2C), 65,62 (d, $J_{c,f} = 21,0$ Hz, 2C), 17,22, 0,78 – -4,01 (m_{c,f}, 3C)

DC-MS (ESI-(+)): 423,1 [M + Na⁺]

3.1.3.13 Procedimento de síntese do intermediário 3-(5-acrilamido-2-fluorfenil)-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida (**11**)



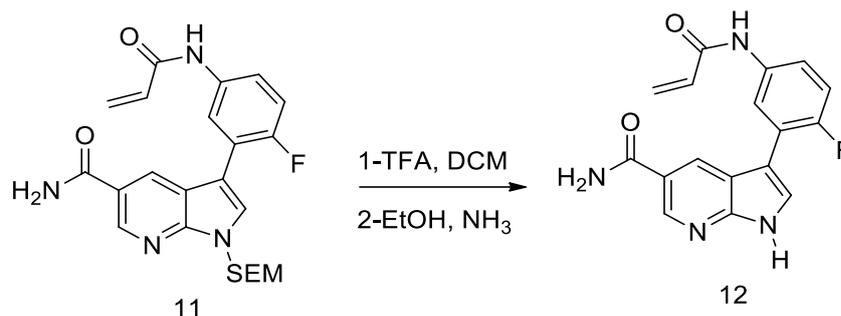
Dissolvem-se 100 mg de **10** e 43,49 μL de trietilamina em 11 mL de THF anidro. Uma solução de 22,16 μL de cloreto de acrilóila em 1,7 mL de THF anidro é adicionada lentamente, gota a gota, a 0 °C. A mistura é agitada à temperatura ambiente por uma hora. O excesso de cloreto de acrilóila é consumido com solução saturada de NaHCO_3 . As fases são separadas e a fase orgânica é lavada com água e salmoura. É, então, purificado por coluna cromatográfica com $\text{DCM}:\text{MeOH}$ (0-20%) como eluente. O produto é isolado como um sólido branco, com rendimento de 59%.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 10,34 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 8,11 (d, $J_{\text{h,f}} = 34,2$ Hz, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,03 (d, $J_{\text{h,f}} = 10,3$ Hz, 2H), 7,84 – 7,59 (m, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,34 (t, $J_{\text{h,f}} = 9,6$ Hz, 1H), 6,45 (dd, $J_{\text{h,f}} = 16,9, 10,1$ Hz, 1H), 6,29 (d, $J_{\text{h,f}} = 16,9$ Hz, 1H), 5,84 – 5,68 (m, 3H), 3,58 (t, $J_{\text{h,f}} = 7,9$ Hz, 3H), 0,84 (t, $J_{\text{h,f}} = 7,9$ Hz, 2H), -0,11 (s, 9H)

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 165,35 (d, $J_{\text{c,f}} = 415,8$ Hz, 1C), 155,10 (d, $J_{\text{c,f}} = 242,5$ Hz, 2C), 146,19 (d, $J_{\text{c,f}} = 520,4$ Hz, 2C), 135,77, 130,90 (d, $J_{\text{c,f}} = 176,0$ Hz, 1C), 127,65 (d, $J_{\text{c,f}} = 90,3$ Hz, 2C), 123,60, 121,17 (d, $J_{\text{c,f}} = 15,7$ Hz, 2C), 120,61 (d, $J_{\text{c,f}} = 2,3$ Hz, 1C), 119,27 (d, $J_{\text{c,f}} = 8,3$ Hz, 2C) 117,58, 116,37 (d, $J = 23,3$ Hz, 2C), 109,15, 72,77, 65,81, 17,22, -1,37

DC-MS (ESI-(+)): 477,1 [M + Na⁺]

3.1.3.14 Procedimento de síntese do produto final 3-(5-acrilamido-2-fluorfenil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina-5-carboxamida (**12**)

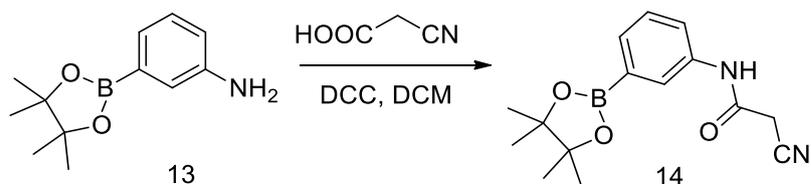


Dissolvem-se 71,2 mg de **11** em 7 mL de DCM e 1,8 mL de TFA são adicionados lentamente. A reação é agitada à temperatura ambiente por duas horas e meia. Substâncias voláteis são separadas no vácuo. O resíduo é retomado em 3,5 mL de etanol. Adiciona-se 0,9 mL de solução de amônia a 25% em solução aquosa e a mistura é agitada por mais 12 h. Todos os voláteis são removidos sob pressão reduzida. É então purificado por coluna cromatográfica com eluente DCM:MeOH (0-20%). O produto é isolado como um sólido branco com presença de éter dietílico.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-D₆) δ 12,32 (d, $J_{h,f} = 1,6$ Hz, 1H), 10,34 (s, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,98 (dd, $J_{h,f} = 6,8, 2,6$ Hz, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,75 – 7,65 (m, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,35 – 7,28 (m, 1H), 6,45 (dd, $J_{h,f} = 17,0, 10,1$ Hz, 1H), 6,28 (dd, $J_{h,f} = 17,0, 2,0$ Hz, 1H), 5,78 (dd, $J_{h,f} = 10,1, 2,0$ Hz, 1H), 3,08 (dd, $J = 12,7, 5,7$ Hz, éter dietílico - 2H); 1,16 (t, $J = 7,3$ Hz, éter dietílico - 3H)

¹³C RMN (101 MHz, DMSO-D₆) δ 167,76, 163,29, 149,71, 143,43, 135,72 (d, $J_{c,f} = 2,4$ Hz, 2C), 131,82, 127,71, 127,17, 122,72, 121,89 (d, $J_{c,f} = 15,8$ Hz, 2C), 120,67 (d, $J_{c,f} = 3,6$ Hz, 1C), 118,92 (d, $J_{c,f} = 7,8$ Hz, 1C), 117,01, 116,26 (d, $J_{c,f} = 23,5$ Hz, 2C), 108,97, 45,82, 8,66

3.1.3.15 Procedimento de síntese do intermediário 2-ciano-N-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)acetamida (**14**)



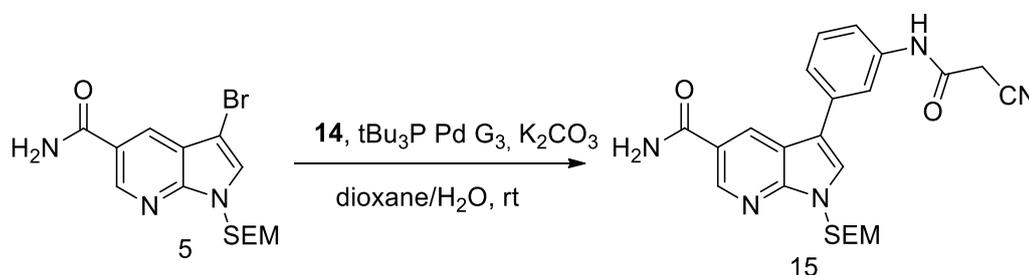
Dissolvem-se 300 mg de 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina, 116,5 mg de ácido cianoacético, 282,5 mg de *N,N'*-dicicloexilcarbodiimida (DCC) em 20 mL de DCM anidro e a reação é agitada durante meia hora à temperatura ambiente. O DCM é removido sob pressão reduzida. Purifica-se por coluna cromatográfica com DCM:MeOH (0-10%) como eluente. O produto é isolado como um sólido branco com rendimento de 100%.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,55 (s, 1H), 7,79 – 7,67 (m, 2H), 7,59 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,34 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 3,59 (s, 2H), 1,32 (s, 12H)

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 159,72, 157,20, 136,44, 131,85, 128,77, 126,60, 123,67, 114,72, 84,17, 49,40, 33,97, 26,92, 25,61, 24,98

DC-MS (ESI(-)): 284,9 [M – H⁺]

3.1.3.16 Procedimento de síntese do intermediário 3-(3-(2-cianoacetamido)fenil)-1-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxamida (15)



Combinam-se 405 mg de **5**, 375,4 mg de **14** e 18,63 mg de catalisador de paládio G3 em um frasco e são tornados inertes. São adicionados 45 mL de dioxano desgaseificado e 11,3 mL de solução de K_2CO_3 0,5 M desgaseificada. Agita-se à

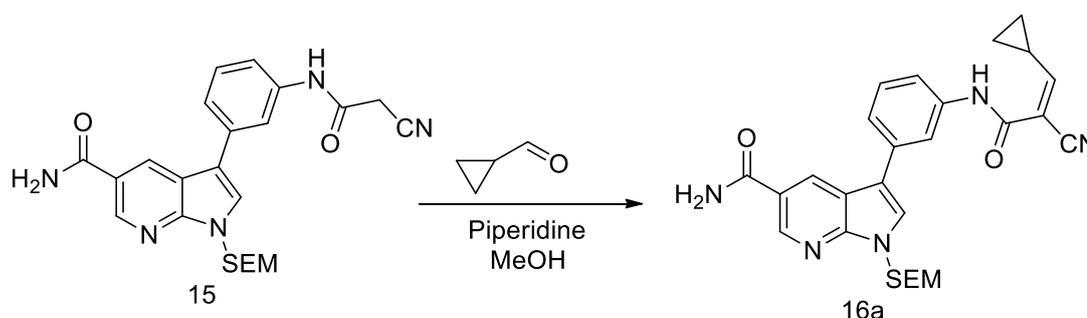
temperatura ambiente por 4h. A reação é diluída com EtOAc e filtrada em coluna de celite. O solvente é removido sob pressão reduzida. É então purificado por coluna cromatográfica com eluente DCM:MeOH (0-10%). O produto é isolado como um sólido amarelo com rendimento de 49%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,55 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 8,77 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,90 (t, J = 1,7 Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,57 – 7,33 (m, 3H), 5,72 (s, 2H), 3,80 (s, 2H), 3,70 – 3,52 (m, 2H), 0,99 – 0,78 (m, 2H), -0,09 (s, 9H)

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 171,44, 162,91, 150,95, 144,65, 139,86, 135,87, 130,65, 129,54, 128,74, 124,45, 119,61, 119,42, 118,10, 115,92, 74,33, 67,52, 27,20, 18,59, -1,42

DC-MS (ESI(-)): 447,9 [M – H⁺]

3.1.3.17 Procedimento de síntese do intermediário (*E,Z*)-3-(3-(2-ciano-3-ciclopropilacrilamida)fenil)-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirrolo[2,3-*b*]piridina-5-carboxamida (**16a**)



Dissolvem-se 80 mg de **15** e 16 µL de ciclopropanocarbaldeído em 15 mL de MeOH anidro e são tornados inertes. 1,6 µL de piperidina com 1 mL de MeOH são adicionados e a solução é agitada à temperatura ambiente durante a noite. Após a conversão completa, o solvente é evaporado. Purifica-se por coluna cromatográfica com eluente Hex:EtOAc (0-100%). O produto é isolado como um sólido branco com rendimento de 43%.

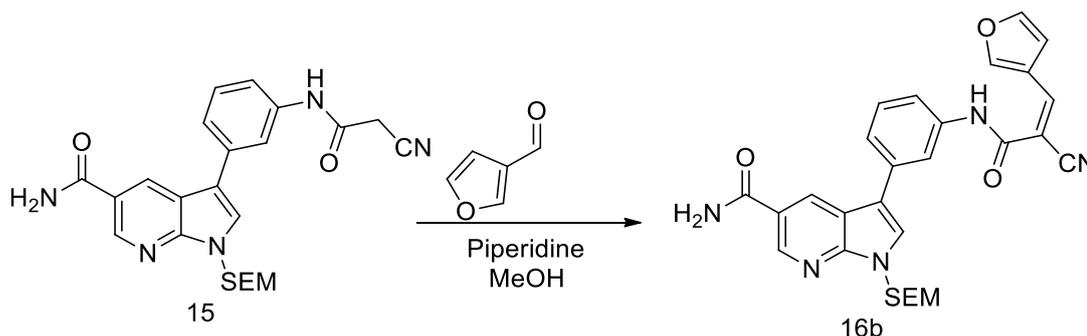
¹H RMN (400 MHz, DMSO-D₆) δ 10,16 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,94 (d, J = 26,7 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,55 – 7,41 (m, 2H),

7,12 (d, $J = 11,1$ Hz, 1H), 5,92 (s, 1H), 5,71 (s, 1H), 3,70 – 3,51 (m, 3H), 1,98 (dtd, $J = 15,6, 7,9, 4,2$ Hz, 1H), 1,28 (ddd, $J = 22,5, 10,7, 7,1$ Hz, 2H), 1,10 – 0,98 (m, 1H), 0,93 – 0,76 (m, 2H), -0,08 (d, $J = 13,8$ Hz, 9H)

^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- D_6) δ 167,40, 164,73, 159,86, 149,19, 143,51, 138,90, 134,19, 129,41, 127,97, 127,77, 123,51, 122,58, 118,66, 116,97, 115,56, 115,47, 108,41, 72,67, 65,71, 17,16, 15,78, 10,71, 0,17, -1,38

LC-MS (ESI-(+)): 503 [M + H⁺]

3.1.3.18 Procedimento de síntese do intermediário (*E,Z*)-3-(3-(2-ciano-3-(furan-3-il)acrilamido)fenil)-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirrol[2,3-*b*]piridina-5-carboxamida (**16b**)



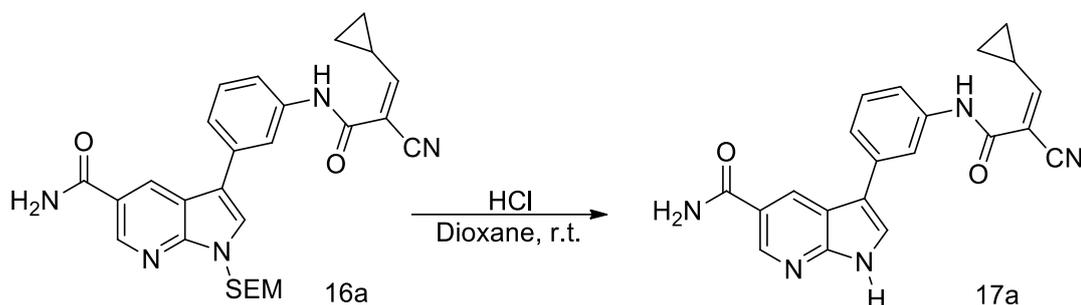
Dissolvem-se 50 mg de **15** e 13,6 μL de furano-3-carbaldeído em 10 mL de MeOH anidro e são tornados inertes. 0,7 mL de 27 μL de Piperidina em 10 mL de solução de MeOH são adicionados e a solução é agitada à temperatura ambiente durante a noite. Após a conversão completa, o solvente é evaporado sob pressão reduzida. Purifica-se, então, purificado por coluna cromatográfica Hex:EtOAc (0-100%). O produto é isolado como um sólido amarelado, com rendimento de 84%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- D_6) δ 10,51 (s, 1H), 8,85 (d, $J = 12,0$ Hz, 2H), 8,50 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,70 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,50 (dd, $J = 16,1, 7,6$ Hz, 3H), 7,22 (s, 1H), 5,72 (s, 2H), 3,58 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H), 0,85 (t, $J = 7,9$ Hz, 3H), -0,10 (s, 9H)

^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- D_6) δ 167,39, 160,44, 150,61, 149,18, 146,16, 143,47, 124,27, 138,93, 134,17, 129,41, 127,99, 127,79, 123,48, 122,59, 120,45, 118,73, 116,92, 116,44, 115,42, 107,59, 105,26, 72,67, 65,70, 17,15, -1,39

DC-MS (ESI(+)): 549,6 [M + Na $^+$]

3.1.3.19 Procedimento de síntese do produto final (*E,Z*)-3-(3-(2-ciano-3-ciclopropilacrilamido)fenil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina-5-carboxamida (**17a**)

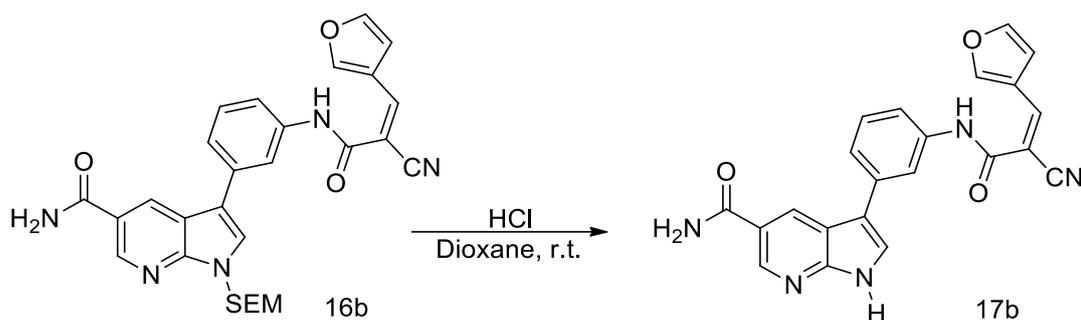


Dissovem-se 38,8 mg de **16a** em 0,37 mL de dioxano e a solução é tratada com 6,15 mL de solução de HCl 4M em dioxano. A solução é agitada à temperatura ambiente durante a noite. Após a conversão completa, o solvente é evaporado. É, então, purificado por coluna cromatográfica, com eluente DCM:MeOH (0-20%). O produto é isolado como um sólido branco com presença de diclorometano.

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 9,04 – 8,63 (m, 2H), 7,92 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,58 (s, 2H), 7,45 (dt, $J = 15,4, 8,2$ Hz, 3H), 7,06 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H), 5,77 (s, diclorometano-2H), 1,57 – 1,15 (m, 3H), 1,15 – 0,91 (m, 2H). Não há o sinal do próton amínico porque o solvente é metanol deuterado.

^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD) δ 166,88, 160,74, 142,94, 138,64, 135,47, 130,10, 129,73, 125,50, 124,47, 120,61, 120,12, 117,64, 115,74, 108,59, 30,21, 16,52, 11,44

3.1.3.20 Procedimento de síntese do produto final (*E,Z*)-3-(3-(2-ciano-3-furan-3-il)acrilamido)fenil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina-5-carboxamida (**17b**)



Dissolvem-se 59,8 mg de **16b** em 0,5 mL de dioxano e a solução é tratada com 8,36 mL de solução de HCl 4M em dioxona. A solução é agitada à temperatura ambiente durante a noite. Após a conversão completa, o solvente é evaporado. É então purificado por coluna cromatográfica DCM:MeOH (0-15%). O produto é um sólido amarelado não puro.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 12,20 (s, 1H), 10,45 (s, 2H), 8,87 (s, 2H), 8,79 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H), 8,51 (s, 2H), 8,29 (s, 2H), 8,17 (d, $J = 23,7$ Hz, 2H), 8,01 (dd, $J = 17,0, 6,9$ Hz, 5H), 7,94 – 7,82 (m, 3H), 7,66 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 7,57 – 7,27 (m, impureza - 9H), 7,23 (s, 2H), 6,69 (s, impureza - 2H), 6,28 (s, impureza - 1H), 5,71 (s, diclorometano - 3H), 1,23 (s, éter dietílico - 7H), 0,99 – 0,69 (m, éter dietílico - 4H), -0,05 (d, $J = 6,7$ Hz, impureza - 4H)

3.2 Metodologia Analítica

Os derivados obtidos no Brasil (**Série 1**) foram analisados por: CCD, com fases móveis adequadas; em cromatografia *flash*, em aparelho Isolera Biotage, com fases móveis adequadas; por RMN de ^1H e de ^{13}C , em espectrômetro de RMN Bruker Advance 300, de 300 MHz, e quanto à faixa de fusão, em aparelho digital Büchi M-565.

Em relação aos derivados obtidos durante estágio BEPE, estes foram analisados por: TLC, HPLC, HPLC-MS, todos com fases móveis apropriadas; em cromatografia *flash*, em aparelho PuriFlash, com fases móveis apropriadas; por RMN de ^1H e ^{13}C , em espectrômetro de RMN a 300 e 500 MHz; Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (HRMS).

3.3 Avaliação Biológica

3.3.1 Preparação das soluções teste

Os compostos 5Pa-f e o 4P foram pesados e diluídos no em volume adequado de DMSO para preparar soluções estoque de 20 mM, que foram congeladas a - 20°C e protegidas da luz. As soluções foram submetidas ciclos de congelamento e descongelamento por número limitado de tempos. O benznidazol (#419656) foi obtido da Sigma Aldrich e preparado em SMSO a 80 mM.

3.3.2 Cultura de células

3.3.2.1 *LLC-MK2 (Células epiteliais de macaco Rhesus)*

As células formam monocamada contígua, que pode ser mantida por várias semanas. Esse estoque foi adquirido de BCRJ (Rio de Janeiro Cell Bank – Xerém – RJ, Brasil) e foi mantido em meio DMEM suplementado com Soro Bovino Cosmic 10% 10% (CS – Hyclone, Cytiva). As células LLC-MK2 foram utilizadas para a manutenção de *T. cruzi* em cultura de tecido em frascos.

3.3.2.2 *U2OS (Células de osteosarcoma humano)*

Este estoque foi adquirido de BCRJ (Rio de Janeiro Cell Bank – Xerém – RJ, Brasil) e foi mantido em meio DMEM suplementado com Soro Bovino Cosmic 10% 10% (CS – Hyclone, Cytiva). As células U2OS foram utilizadas como células de hospedeiro nos ensaios dos compostos.

3.3.2.3 *Trypanosoma cruzi (cepa Sylvio X10/1)*

As formas tripomastigotas foram obtidas de culturas infectadas de LLC-MK2-infected cultures e utilizadas para infectar células U2OS em microplacas de 384-poços. As culturas infectadas foram mantidas em DMEM suplementado com CS 10%.

3.3.2.4 *Ensaio dos compostos teste*

Células U2OS foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com CS 10%, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina 7 °C in 5% de CO₂ em um incubador umidificado. Para o plaqueamento das células, frascos de cultura foram tripsinizados com tripsina-EDTA 0,05%, as células foram coletadas, contadas e ressuspensas a 25 x 10⁴ células/mL em meio DMEM comp. The suspensão de células

U2OS foi plaqueada a 40 μ L/poço em placas de 384-poços (ie., 500 células/poço). As placas foram incubadas a 37 °C, em 5% de CO₂ em incubador umidificado por 24 h.

Os tripomastigotas de *T. cruzi* recuperados do sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas foram utilizados para infectar as células U2OS nas placas. No dia da infecção, os tripomastigotas foram colhidos, contados e ressuspensos a 1×10^5 /mL em meio DMEM completo e 10 μ L desta suspensão foram adicionados a poços contendo suspensão de células U2OS cells, previamente semeadas. Nos poços com controle não-infectado, 10 μ L of de meio DMEM completo foram adicionados. As placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ 24 horas adicionais.

Os compostos testes solubilizados em DMSO foram diluídos em série em placas estoque por um fator 2 em DMSO. Placas intermediárias foram preparadas em PBS, pH 7.4 por diluição de 33.3-vezes em relação à placa estoque. O conteúdo é então misturado antes de transferir 10 μ L da solução da placa intermediária para a placa de ensaio. Nas placas de ensaio, o veículo e os compostos foram diluídos 200 vezes em relação às placas estoque. As placas foram, então, incubadas a 37 °C e 5% de CO₂.

Quatro dias, 996 horas após o tratamento com os compostos teste, adicionaram-se, 30 μ L de solução de paraformaldeído 12% em PBS, pH 7.4 (PFA) em cada poço. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS, pH 7.4. As células e os parasitos foram corados com 10 μ L of 5 μ M Draq5 (in PBS) and 100 μ g/mL DAPI. O Operetta automated High Content Screening (HCS) Sistema de imagem automatizado foi utilizado para adquirir as imagens utilizando objetiva de 20x e o Harmony Software foi utilizado para a análise automatizada da imagem.

3.3.3 Análise dos dados

A proporção da infecção (IR) foi definida como a proporção entre (i) o número total de células infectadas em todas as imagens dos poços and (ii) o número total de células em todas as imagens do mesmo poço. IR foi normalizado para controle negativo (células infectadas, com tratamento simulado com DMSO) e controle positivo (células infectadas com controle positivo) para determinar a atividade normalizada: $NA = [1 - (Av. IRT - Av. IRP)/(Av. IRN - Av. IRP)] \times 100$. A proporção de células foi definida como aquela entre o número total de células no poço do composto e a média total do número de células dos poços de controle negativo (células infectadas, com tratamento simulado

com DMSO). A proporção de célula é uma estimativa da atividade do composto teste contra a célula do hospedeiro U2OS e é medida para estimar a seletividade do composto frente ao parasita *T. cruzi*.

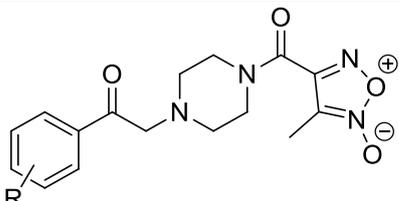
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese

4.1.1 Derivados de furoxano (Série 1)

Os 6 derivados propostos foram obtidos sem dificuldade, em quatro etapas: a) ciclização do furoxano, a partir do crotonaldeído; b) formação do 4-metoxi-furoxano; c) formação do 4-piperazina-furoxano; d) condensação para formação dos compostos finais (acetofenona-piperazina-furoxano). Os rendimentos da última etapa foram considerados de razoáveis, variando de 91% a 16%. Inicialmente, determinaram-se as faixas de fusão dos derivados. A *Tabela 1* mostra as estruturas dos compostos, a faixa de fusão dos mesmos e os respectivos rendimentos.

Tabela 1 - Características dos derivados de acetofenona-piperazina-furoxano



Compostos	R	Faixa de fusão (°C)	Rendimento (%)
5Pe	4-H	129-131	91
5Pa	2,4-diF	118-120	88
5Pd	4-OCH ₃	125-126	59
5Pc	3-NO ₂	113-115	16
5Pb	4-NO ₂	112-114	23
5Pf	4-Br	109-113	48

Sobre a rota sintética, o primeiro intermediário formado é comumente conhecido como furoxano, cujo mecanismo reacional exato para a obtenção desse composto não é conhecido, porém há sugestões de que ocorra participação de reações em cadeia. Schonaefinger (1999) afirma que as rotas sintéticas que podem ser mais utilizadas para a preparação do núcleo N-óxido-1,2,5-oxadiazol são: a) Oxidação de [KS2][KS3] dioximas com agentes como hipoclorito de sódio ou $K_3Fe(CN)_6$; b) Termólise de *o*-nitroazidas; c) dimerização de nitrilas *N*-óxidos; d) Oxidação de *o*-amino-nitroderivados; e) Reação de alcenos com N_2O_3 . A **Figura 9** mostra o possível mecanismo de reação para a formação do intermediário **2P**, por meio da reação de alcenos com trióxido de dinitrogênio (N_2O_3).

Primeiramente, o crotonaldeído, que é um eletrófilo de Michael, é atacado pelo grupo nitro, a partir de seu nitrogênio. Este átomo é responsável pelo ataque nucleofílico, pois é atraído pelos eletrófilos de Michael. Após isso, ocorre um rearranjo com formação de um carbânion que ataca o trióxido de dinitrogênio, expulsando o grupo nitro e ficando ligado no NO. Em seguida, uma série de rearranjos forma o anel oxadiazol com duas hidroxilas ligadas aos nitrogênios, uma delas recebe, por meio da tautomeria, um hidrogênio formando uma molécula de água que deixa a oxadiazol após os rearranjos formarem o furoxano.

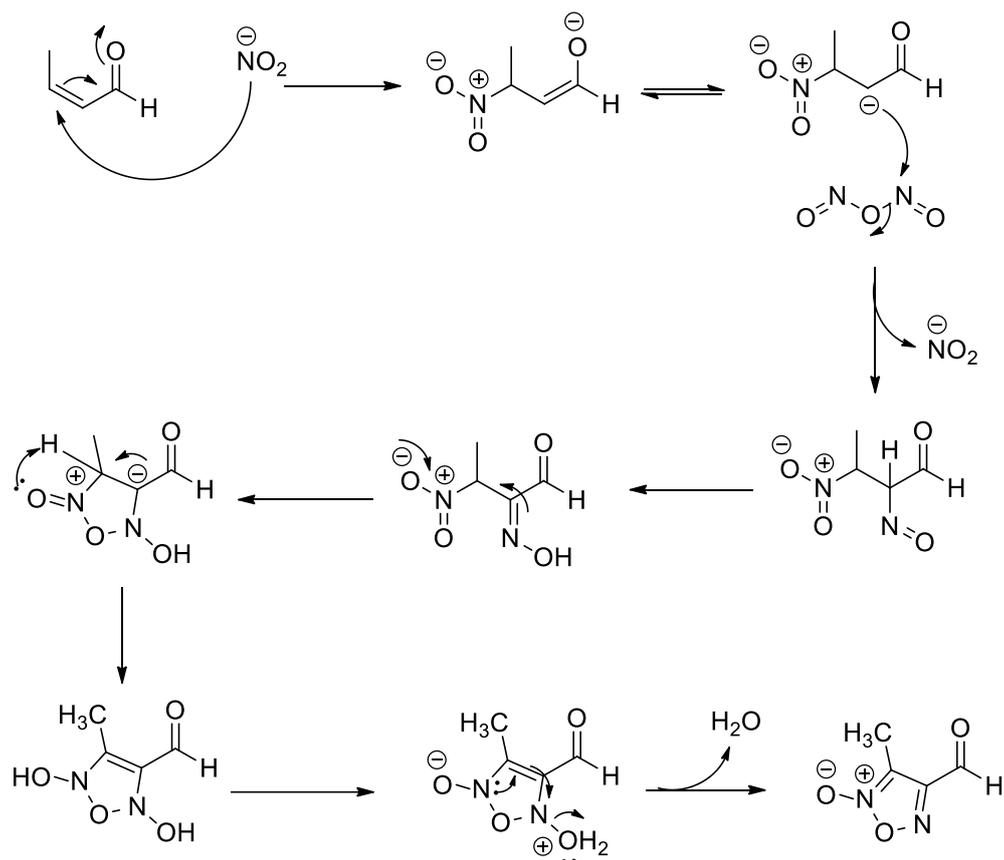
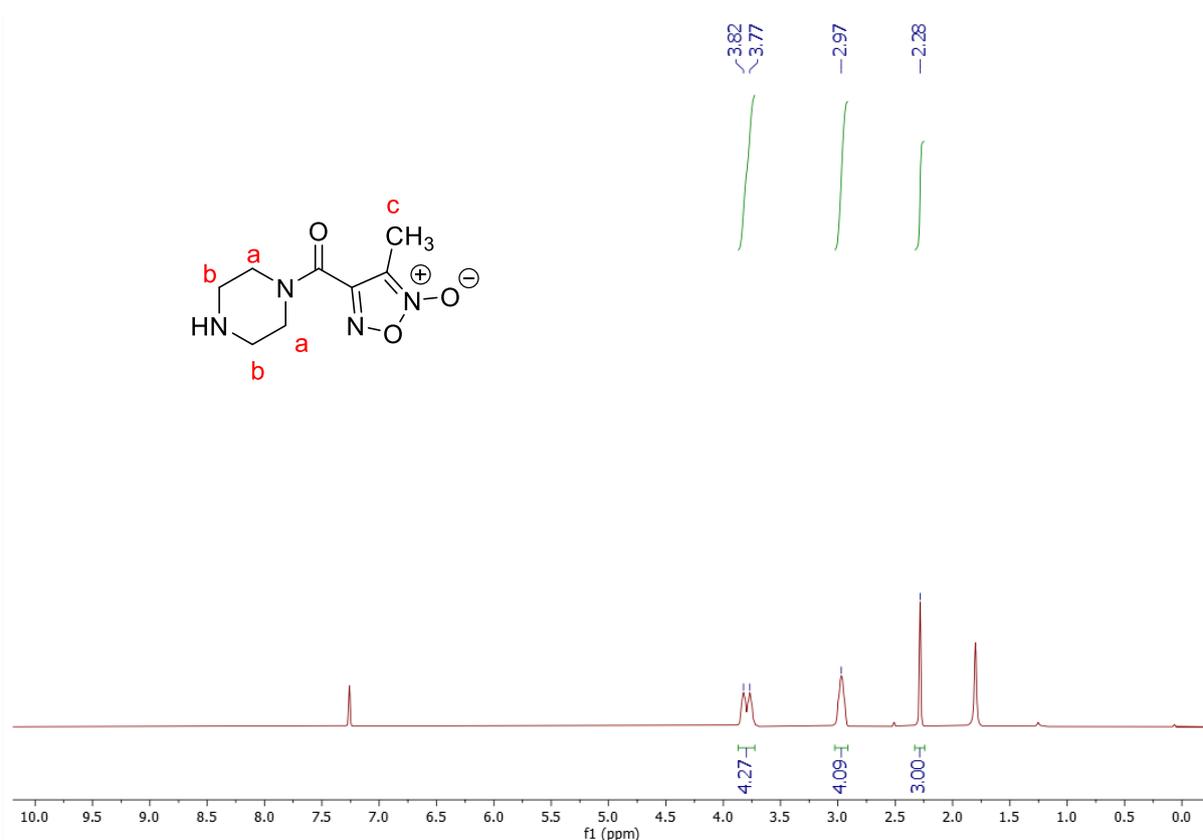


Figura 9 - Mecanismo de reação do 4-formil-3-metil-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol.

Os compostos, tanto os intermediários quanto os finais, foram analisados por RMN ^1H e ^{13}C . O espectro 1 corresponde ao intermediário 4-piperazina-furoxano (**4P**). Esse composto foi obtido na forma de sólido amarelo, com 51% de rendimento.

Espectro 1 - ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm)) de 4-piperazina-furoxano.

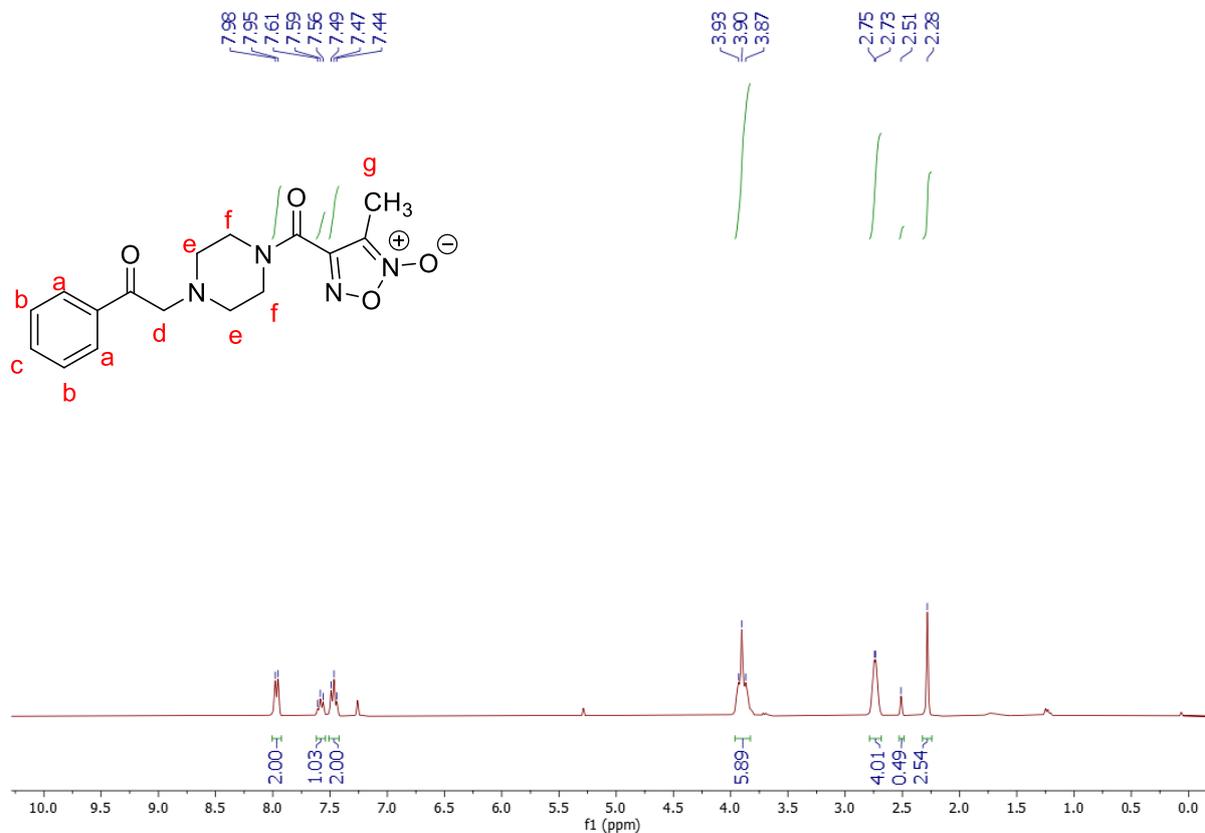


^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm)): 3,82 (d, $J_{a,b}=15$ Hz, 4H-a); 2,97 (s, 4H-b); 2,81 (s, 3H-c).

Para ilustrar a caracterização por RMN dos compostos finais, apresentam-se os espectros do composto 3-metil-4-(4-(2-oxo-2-feniletíl)-piperazina-1-carbonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (**5Pa**). O espectro 1 corresponde ao ^1H RMN e o espectro 3 é relativo ao ^{13}C RMN do mesmo composto.

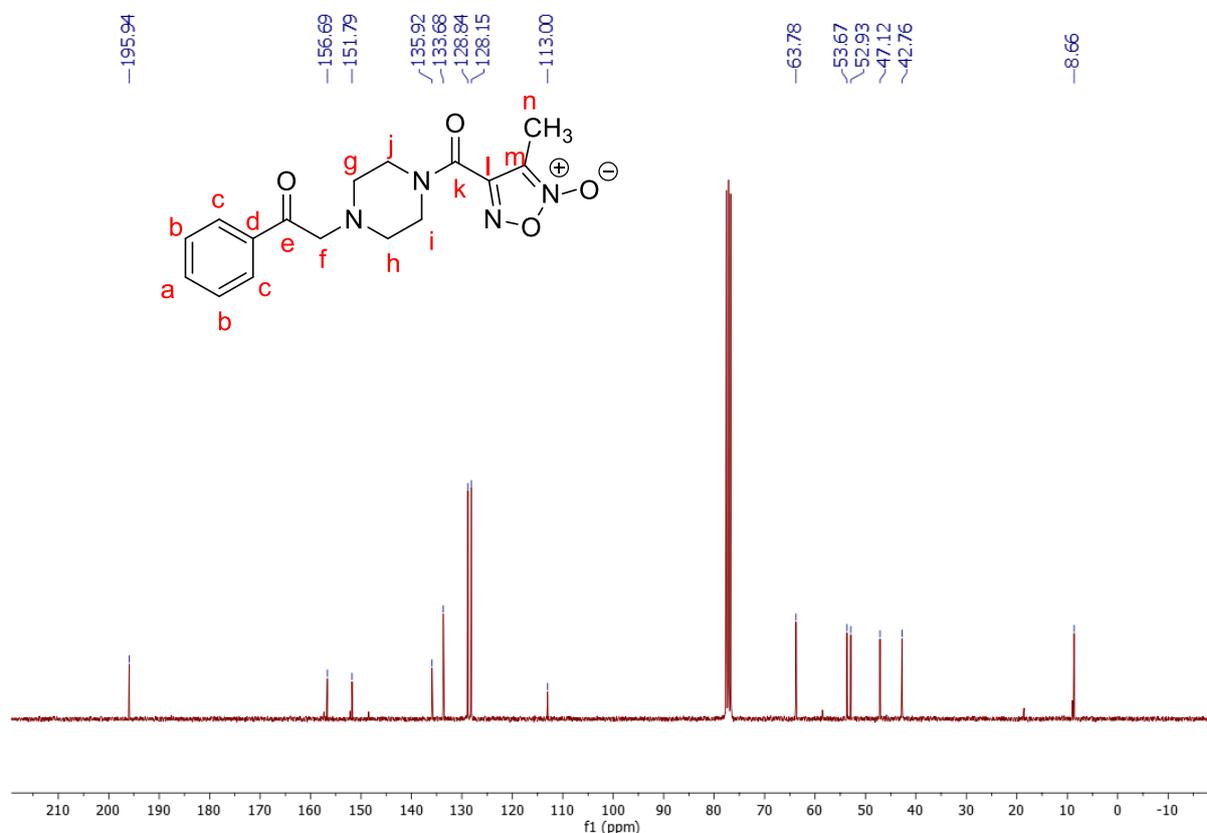
Os demais compostos, de 2 a 5, apresentam os sinais piperazínicos, furoxânicos e das carbonilas, variando de acordo com o grupo substituinte do anel aromático.

Espectro 2 - ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) do 3-metil-4-(4-(2-oxo-2-feniletil)-piperazina-1-carbonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido.



^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,98 (d, $J=12$ Hz, 2H-a); 7,47 (t, $J=7,5$ Hz, 2H-b); 7,59 (t, $J=7,5$ Hz, 1H-c); 3,90 (t, $J=9$ Hz, 6H-d/f); 2,75 (d, $J=6$ Hz, 4H-e); 2,51 (s, 1H-g); 2,28 (s, 2H-g)

Espectro 3 - ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm)) de 3-metil-4-(4-(2-oxo-2-feniletil)-piperazina-1-carbonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido.



^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm)): 195,94-e; 156,69-k; 151,79-l; 135,92-d; 133,68-a; 128,84-c; 128,15-b; 113,00-m; 63,78-f; 53,67-i/j; 52,93-i/j; 47,12-g/h; 42,76-g/h; 8,66-n

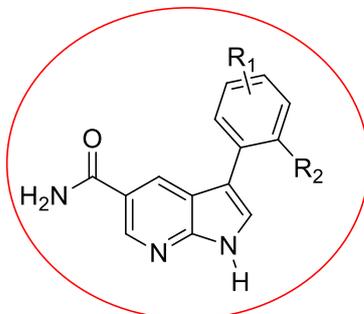
Os demais espectros encontram-se no ANEXO.

4.1.2 Derivados de Azaindol (Série 2)

Os 5 derivados foram obtidos com certa dificuldade em relação à purificação, devido a sua alta polaridade, o que dificultava sua saída da coluna de sílica. Além disso, o composto 17b continua impuro mesmo depois de muitas tentativas de purificação e, por isso, não será possível sua presença na avaliação biológica. No entanto, as sínteses foram realizadas sem muitos problemas, os equipamentos e reagentes disponíveis pelo laboratório eram mais que suficientes para que as reações fossem bem-sucedidas. Infelizmente, devido ao prazo do BEPE, priorizamos os 5 produtos apresentados em relação aos demais, levando em consideração o *High Throughput Screening (HTS)* realizado anteriormente. Os rendimentos da última etapa foram considerados bons a

razoáveis, variando de 99% a 51%. A *Tabela 2* mostra as estruturas dos compostos, as análises DC-MS/HRMS e seus rendimentos.

TABELA 2 – Características dos derivados de 7-Azaindol (**Série 2**)



Compostos	R ₁	R ₂	DC-MS/HRMS	Rendimento %
8a	p- C≡N	H	263.0931	51
8b	m- C≡N	H	263.09300	58
12		F	347.09208	94
17a		H	370.2	99
17b		H	419.7	93

A **Figura 10** mostra o acoplamento Suzuki, publicado por Saito (2007), que é o acoplamento cruzado catalisado por paládio entre o ácido organoborônico e os haletos, utilizado na rota sintética de todos os produtos obtidos. Os avanços recentes de catalisadores e métodos ampliaram as possíveis aplicações, de modo que o escopo da reação não se restringe a aris, mas inclui alquis, alquenis e alquinis. Trifluorboratos de potássio e organoboranos ou ésteres de boronatos podem ser utilizados no lugar de

ácidos borônicos. Alguns pseudo-halogenetos (por exemplo, triflatos) também podem ser utilizados como parceiros de acoplamento.

No mecanismo de acoplamento de Suzuki, o ácido borônico deve ser ativado, por exemplo, com base. Essa ativação do átomo de boro aumenta a polarização do ligante orgânico e facilita a transmetalização. Se os materiais de partida forem substituídos por grupos lábeis de base (por exemplo, ésteres), o KF em pó efetua essa ativação, deixando os grupos lábeis de base inalterados.

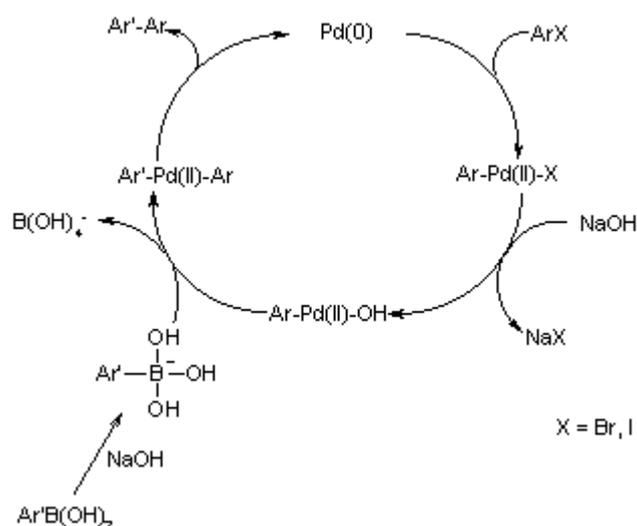


Figura 10 - Mecanismo da reação de acoplamento de Suzuki (Disponível em <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/suzuki-coupling.shtml>. Acesso em: 31 Jul. 2023).

A condensação de Knoevenagel foi a reação utilizada para obtenção dos dois compostos finais com potencial de ligação covalente reversível. Ela produz a formação, a partir de compostos de ácido carbônico com aldeídos, de compostos α,β -insaturados. Zacuto (2019) demonstra que um enol intermediário é inicialmente formado e este reage com um aldeído, resultando em um aldol, que passa por uma subsequente eliminação induzida por base, conforme *Figura 11*.

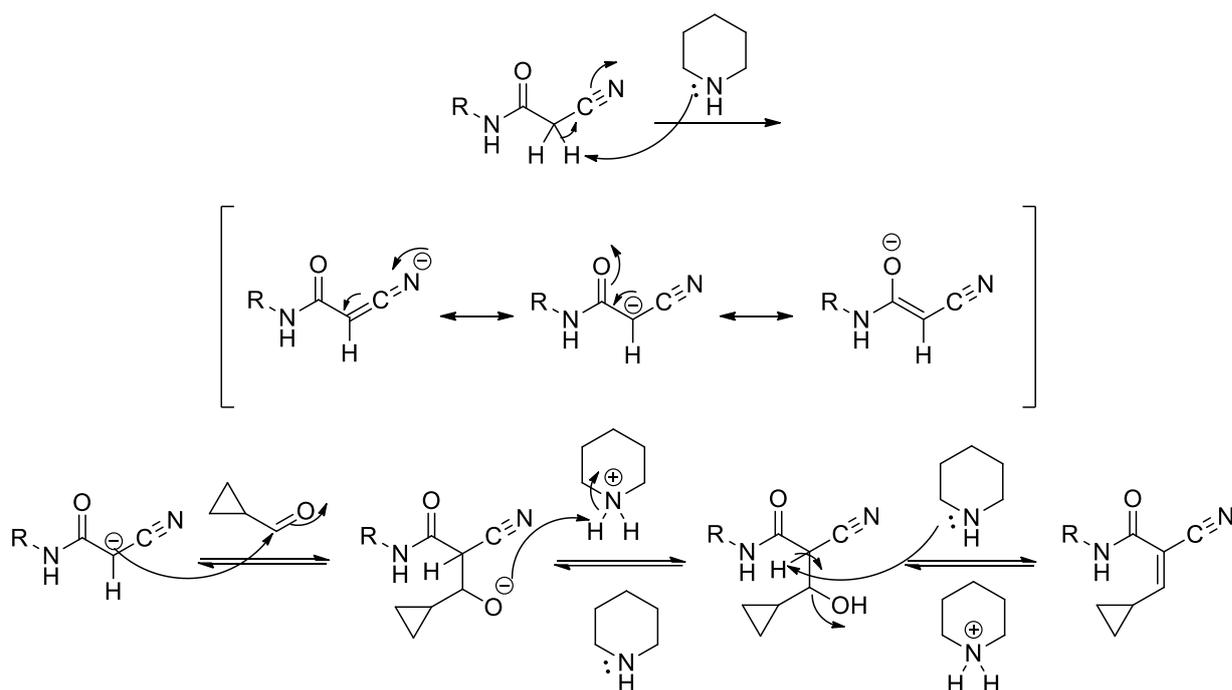
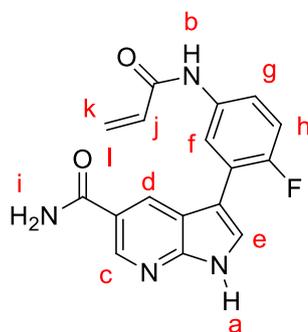
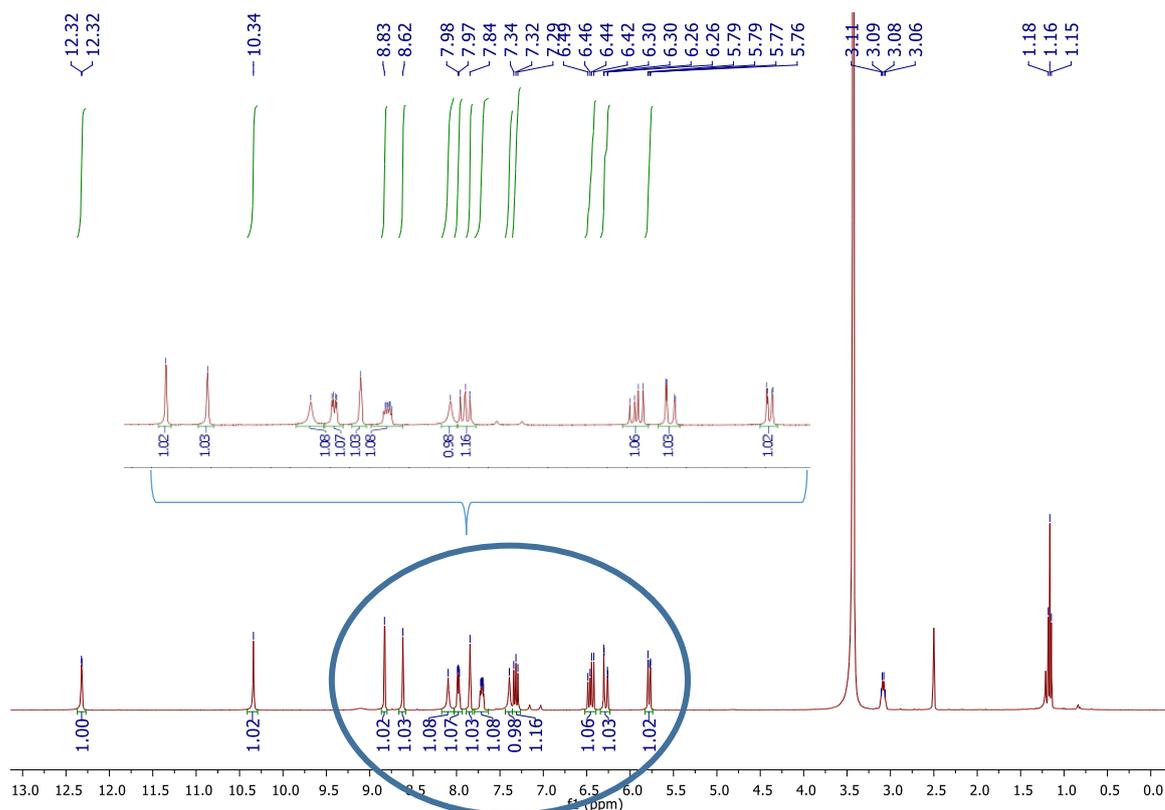


Figura 11 - Mecanismo da condensação de Knoevenagel.

Para ilustrar a caracterização por RMN dos compostos finais, são apresentados os espectros do composto **12** 3-(5-acrilamido-2-fluorfenil)-1H-pirrólo[2,3-b]piridina-5-carboxamida. O *espectro 4* corresponde a ^1H RMN e o *espectro 5* refere-se a ^{13}C RMN do mesmo composto.

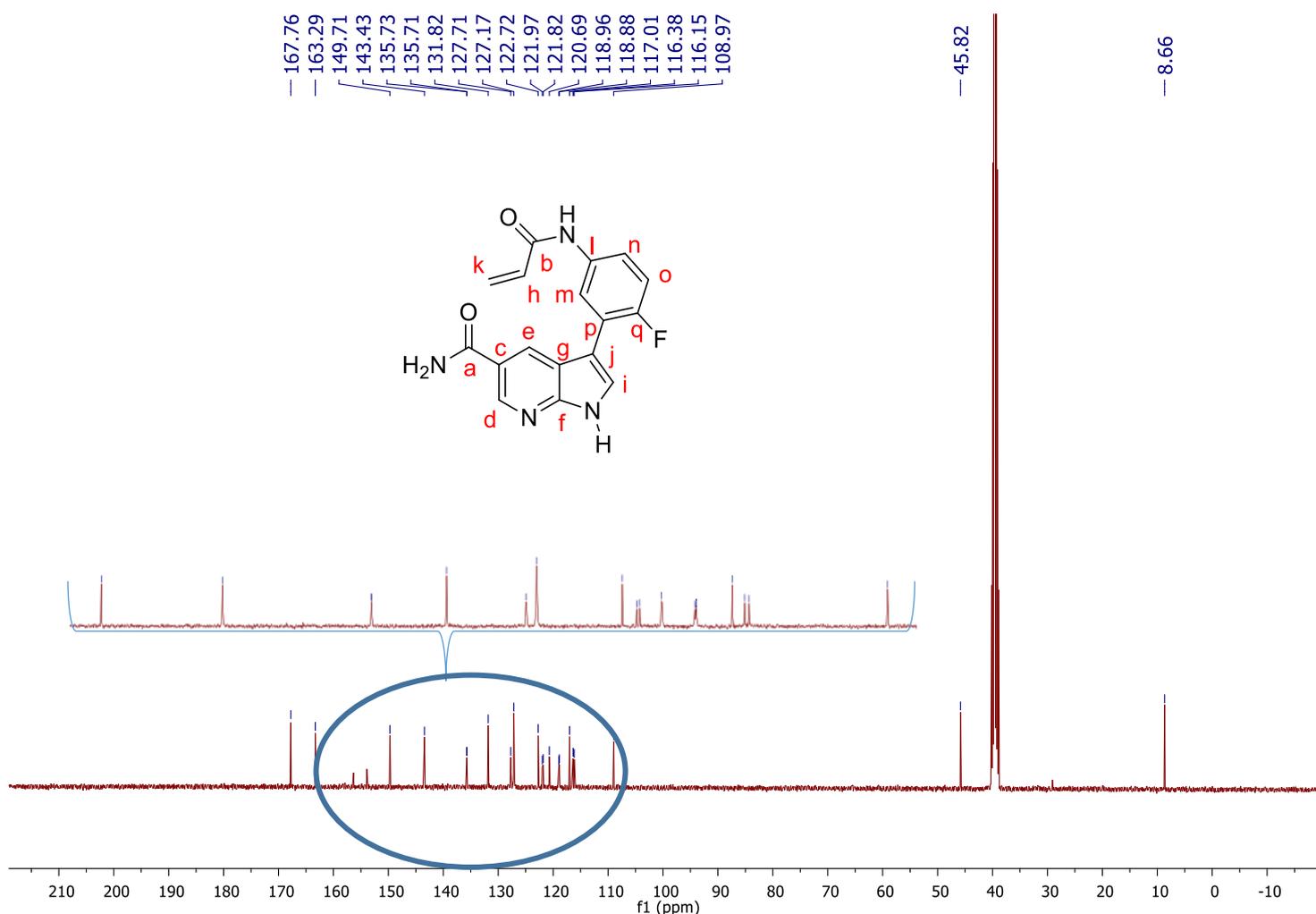
Espectro 4 - ^1H RMN (DMSO- D_6), 400 MHz, δ (ppm) de 3-(5-acrilamido-2-fluorfenil)-1H-pirrólo[2,3-b]piridina-5-carboxamida





^1H RMN (400 MHz, DMSO- D_6) δ 12,32 (d, $J_{\text{h,f}} = 1,6$ Hz, 1H-a) 10,34 (s, 1H-b), 8,83 (s, 1H-c), 8,62 (s, 1H-d), 8,10 (s, 1H-e), 7,98 (dd, $J_{\text{h,f}} = 6,8, 2,6$ Hz, 1H-f), 7,84 (s, 1H-g), 7,75 – 7,65 (m, 1H-h), 7,39 (s, 1H-i), 7,35 – 7,28 (m, 1H-j), 6,45 (dd, $J_{\text{h,f}} = 17,0, 10,1$ Hz, 1H-k), 6,28 (dd, $J_{\text{h,f}} = 17,0, 2,0$ Hz, 1H), 5,78 (dd, $J_{\text{h,f}} = 10,1, 2,0$ Hz, 1H), 3,08 (dd, $J = 12,7, 5,7$ Hz, éter dietílico - 2H); 1,16 (t, $J = 7,3$ Hz, éter dietílico - 3H).

Espectro 5 – ^{13}C RMN (DMSO- D_6), 101 MHz, δ (ppm) de 3-(5-acrilamido-2-fluorofenil)-1H-pirrol [2,3-b]piridina-5-carboxamida

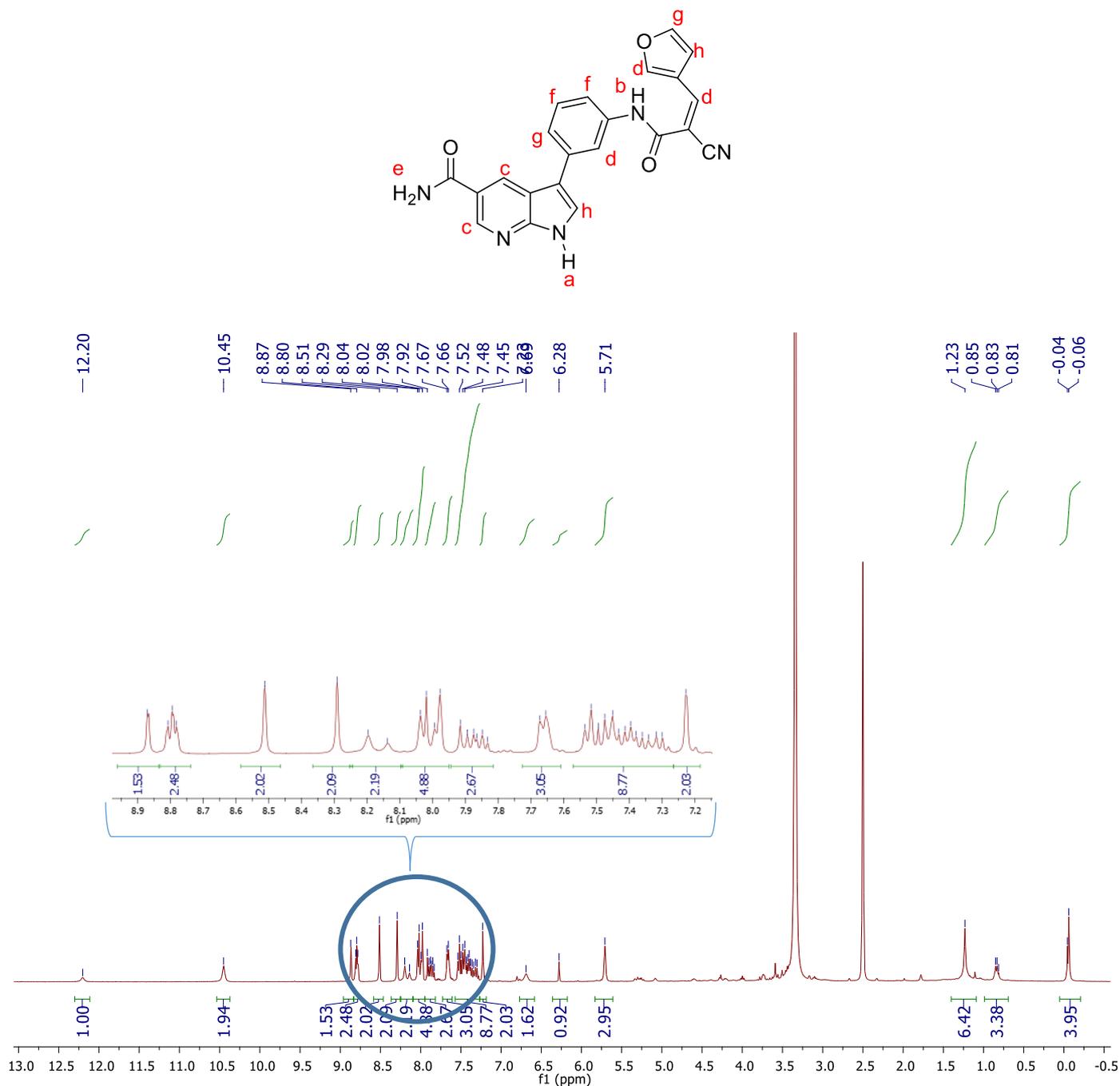


^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- D_6) δ 167,76-a, 163,29-b, 149,71-c, 143,43-d, 135,72-e (d, $J_{\text{c,f}} = 2,4$ Hz, 2C), 131,82-f, 127,71-g, 127,17-h, 122,72-i, 121,89-j (d, $J_{\text{c,f}} = 15,8$ Hz, 2C), 120,67-k (d, $J_{\text{c,f}} = 3,6$ Hz, 1C), 118,92-l (d, $J_{\text{c,f}} = 7,8$ Hz, 1C), 117,01-m, 116,26-n (d, $J_{\text{c,f}} = 23,5$ Hz, 2C), 108,97-o, 45,82-p, 8,66-q.

HRMS – 347.09208 [M + Na $^+$]

Para discutir sobre as impurezas do produto final **17b**, o *espectro 6* mostra a caracterização de NMR deste composto com suas impurezas.

Espectro 6 – ^1H RMN (DMSO- D_6), 400 MHz, δ (*E,Z*)-3-(3-(2-ciano-3-(furan-3-il)acrilamido)fenil)-1H-pirrolo[2,3- b] piridina-5-carboxamida:



¹H RMN (400 MHz, DMSO-D₆) δ 12,20 (s, 1H-a), 10,45 (s, 2H-b), 8,87 (s, 2H-c), 8,79 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H-c), 8,51 (s, 2H-d), 8,29 (s, 2H-d), 8,17 (d, *J* = 23,7 Hz, 2H-e), 8,01 (dd, *J* = 17,0, 6,9 Hz, 5H-e), 7,94 – 7,82 (m, 3H-f), 7,66 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H-g), 7,57 – 7,27 (m, impureza não identificada - 9H), 7,23 (s, 2H-h), 6,69 (s, impureza não identificada) -

2H), 6,28 (s, impureza não identificada - 1H), 5,71 (s, diclorometano - 3H), 1,23 (s, éter dietílico - 7H), 0,99 – 0,69 (m, éter dietílico - 4H), -0,05 (d, $J = 6,7$ Hz, impureza não identificada - 4H)

Levando em consideração apenas os materiais e reagentes que foram utilizados nesta rota sintética, os sinais entre 7,57 – 7,27 (m - 9H) não representam reagente algum utilizado nesta rota, também é estranho que este sinal tenha 9 hidrogênios. É difícil ter uma definição sobre esse fato sem mais análises. O mesmo ocorre com os picos 6,69 (s, 2H) e 6,28 (s, 1H). O pico 5,71 (s, 3H) representa restos de diclorometano, pois esteve presente na etapa de purificação da síntese final. Os picos 1,23 (s, 7H) e 0,99 – 0,69 (m, 4H) encaixam com restos de graxa de H, o que é totalmente possível devido à presença do grupo protetor SEM. Finalmente, o sinal -0,05 (d, $J = 6,7$ Hz, 4H) se encaixa com graxa de silicone, também possível devido à sílica presente na coluna de purificação.

Outra questão importante a mencionar é que o **espectro 4** do composto **17b** parece ter alguns sinais duplicados, possivelmente, devido à presença de dois diastereoisômeros. No entanto, o espectro de RMN do composto **17a** não possui sinal duplicado. Essa diferença pode ocorrer porque o solvente usado no RMN de **17a** foi CD₃OD, e o solvente usado para o RMN de **17b** foi DMSO-D₆. O espectro de RMN 1H do composto **17a** está presente nos anexos.

4.2 Ensaio biológicos

Até o momento, apenas os derivados híbridos furânicos foram submetidos aos ensaios biológicos em *T. cruzi*. O ensaio foi realizado em duplicata, mas apenas uma das replicatas foi aprovada no controle de qualidade.

Os compostos não apresentaram atividade ou toxicidade sob as condições do teste, à exceção dos derivados 5Pd e 5Pe, que se mostraram modestamente ativos, e o 5Pf, que se mostrou moderadamente citotóxico (*Tabela 3*).

Tabela 3 - EC₅₀ and CC₅₀ do benznidazol e dos compostos testados

Composto	EC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)
benznidazol	10,8	> 400 µM

FGP-30B = 5Pe	> 100 μ M	> 100 μ M
FGP-31B = 5Pa	> 100 μ M	> 100 μ M
FGP-32A = 5Pd	> 100 μ M	> 100 μ M
FGP-33B = 5Pf	> 100 μ M	> 100 μ M
FGP-45B = 4P	> 100 μ M	> 100 μ M
FGP-46A = 5Pc	> 100 μ M	> 100 μ M
FGP-46B = 5Pb	> 100 μ M	> 100 μ M

A *Figura 12* apresenta os gráficos da atividade antiparasitária e citotóxica dos compostos ensaiados, comparativamente ao benznidazol.

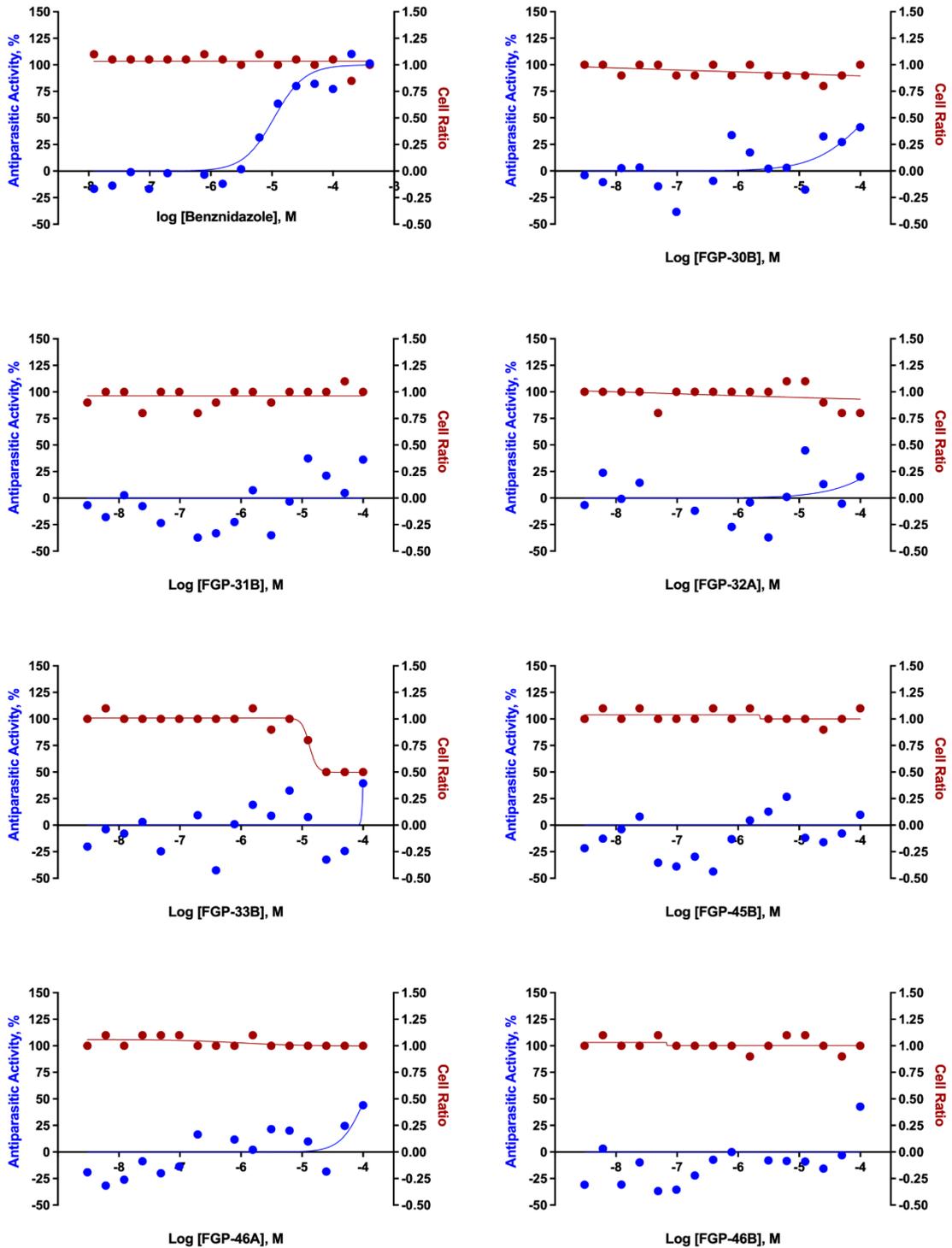


Figura 12 - Atividade antiparasitária (à esquerda, eixo Y) e citotóxica (eixo Y à direita) do benznidazol e dos compostos testados contra formas intracelulares de *T. cruzi*. Concentração dos compostos (M) é apresentada na escala logarítmica (eixo X). FGP-30B = 5Pe; FGP-31B = 5Pa; FGP-32A = 5Pd; FGP-33B = 5Pf; FGP-45B = 4P; FGP-46A = 5Pc; e FGP-46B = 5Pb.

As diferenças entre os compostos moderadamente ativos – 5Pd apresenta grupo OCH₃ em para no anel benzênico e 5Pe não tem substituição, portanto, a menos de conjugação com o grupo carbonila, no primeiro caso, não há outra diferença. Em termos

de lipofilicidade, o derivado 5Pd é menos lipofílico, devido à natureza polar do grupo substituinte. O número de compostos e a natureza da substituição não foram suficientes para que se chegasse a uma discussão. São necessários estudos mais aprofundados, uma vez que no híbrido mais de um alvo molecular deve estar envolvido e as exigências estruturais são diferentes. O fato de apenas o derivado bromado (5Pf) ser medianamente tóxico e os outros não apresentarem toxicidade também suscita a necessidade de mais estudos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Obtiveram-se os 5 compostos derivados de híbridos de acetofenona-piperazina-furoxano com rendimentos entre 91% e 16%. Estes foram caracterizados por faixa de fusão e RMN. Submetidos aos ensaios de atividade biológica, apenas dois compostos 5Pd e 5Pe apresentaram atividade modesta e o composto 5Pf mostrou-se citotóxico.

Os 5 compostos derivados do 7-azaindol foram obtidos com rendimentos entre 99% e 51%. Estes foram caracterizados por ¹³C e ¹H RMN, DC-MS, HRMS, HPLC-MS e HPLC. O próximo passo será determinar as atividades biológicas de todos os compostos, exceto 17b. Serão analisados qualitativamente relacionando-os com as características estruturais das moléculas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, M. M. et al. Validation of the protein kinase PfCLK3 as a multistage cross-species malarial drug target. *Science*, v. 365, n. 6456, 2019.

CHAGAS, Fiocruz. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/sessao/historia/>. Acesso em: 24 Maio. 2023a.

CHAGAS, Fiocruz. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/>. Acesso em: 24 Maio. 2023b.

CHAGAS, Fiocruz. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/doenca/diagnostico/>. Acesso em: 06 Jun. 2023c.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-Biological Interactions*, v.7, p.1–27, 1990.

DNDi, Drugs for Neglected Disease initiative. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>. Acesso em: 24 Mai. 2023.

KLUG, D. M. et al. Lead optimization of 3,5-disubstituted-7-Azaindoles for the treatment of Human African Trypanosomiasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 64, n. 13, p. 9404–9430, 2021.

KOOVITS, P. J. et al. Structure-activity relationship of 4-azaindole-2-piperidine derivatives as agents against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 30, n. 1, p. 126779, 2020.

IRIE, T.; SAWA, M. Recent progress in medicinal chemistry 7-Azaindole : a versatile scaffold for developing kinase inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 66, n. 1, p. 29–36, 2018.

LEPESHEVA, G. I et al. CYP51 from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 281, p. 3577-3585 2005.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 alpha-Demethylase (CYP51) as a Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, [S.L.], v. 11, p. 2060-2071, 2011.

LIDANI, K. C. F. et al. Chagas Disease: from discovery to a worldwide health problem. *Frontiers in Public Health*, [S.L.], v. 7, art. 166.

MAHINDRA, A. et al. Development of potent PfCLK3 inhibitors based on TCMDC-135051 as a new class of antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 63, n. 17, p. 9300–9315, 2020.

MARTÍN-ESCOLANO, R et al. Second generation of Mannich base-type derivatives with in vivo activity against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 61, n. 13, p. 5643-5663, 2018.

MARTINEZ, A et al. Structural and Molecular Basis of the Peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of *Trypanosoma cruzi* iron-superoxide dismutases (Fe-SODs) A and B. *Journal of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 289, p. 12760-12778, 2014.

MCKERROW, J. H.; ROSENTHAL, P. J.; SWENERTON, R.; DOYLE, P. Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Current Opinion in Infectious Disease*. v.21, n.6, 668-672, 2008.

MÉROUR, J. Y. et al. The azaindole framework in the design of kinase inhibitors. *Molecules*, v. 19, n. 12, p. 19935–19979, 2014.

MORAES, C. B. et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for chagas disease drug discovery and development. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 4, p. 1-11, 2014.

PAHO, PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (org.). Chagas disease. 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>. Acesso em: 24 Maio. 2023.

PESQUISA FAPESP. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/chagas-2/>. Acesso em: 24 Maio. 2023.

SAITO, B.; FU, G. C. Alkyl-Alkyl Suzuki crosscouplings of unactivated secondary alkyl halides at room temperature. *Journal of American Chemical Society*, v.129, p.9602-9603, 2007

SCHOENAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. *Farmaco.*, v.54, p.316–320, 1999.

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. 385-405, 2012.

SERAFIM, R. A. M et al. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of *N*-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, [S.L.], v. 82, p. 418-425, 2014.

SERAFIM, R. A. M. *Antichagásicos Potenciais: Síntese e modelagem molecular de híbridos de hidrazonas e liberadores de óxido nítrico*. 2016. 301 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, Área de Insumos Farmacêuticos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SERAFIM, R. A. M.; PERNICHELE, F. G.; FERREIRA, E. I. The latest advances in the discovery of nitric oxide hybrid drug compounds. *Expert Opinion on Drug Discovery*, [S.L.], v. 12, p. 941-953, 2017.

SILVA, F. T. *Antichagásicos Potenciais: Planejamento e síntese de bioisómeros 1,2,4-triazólicos do hidroximetilnitrofuril e análogos*. 2014. 227 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, Área de Insumos Farmacêuticos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SILVA, F. T et al. Design, synthesis and antitrypanosomal activity of some nitrofurazone 1,2,4-triazolic bioisosteric analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, [S.L.], v. 121, p. 553-560, 2016.

SUN, Q et al. Synthesis of novel triazole derivatives as inhibitors of cytochrome P450 14 α -demethylase (CYP51). *European Journal of Medicinal Chemistry*, [S.L.], v. 42, p. 1226-1233, 2007.

WHO, World Health Organization. Control of Chagas disease. Geneva: World Health Organization; 2002. (Technical Report Series, 905).

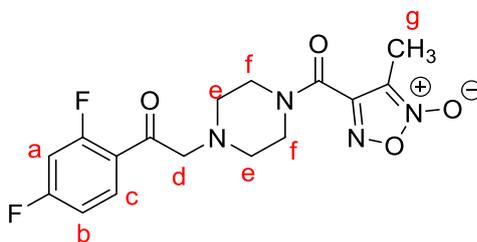
WHO, World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/chagas/en/>. Acesso em: 24 Mai. 2023.

ZACUTO, M. J. Synthesis of acrylamides via the Doebner-Knoevenagel condensation.
Journal of Organic Chemistry, v.84, p.6465-6474, 2019.

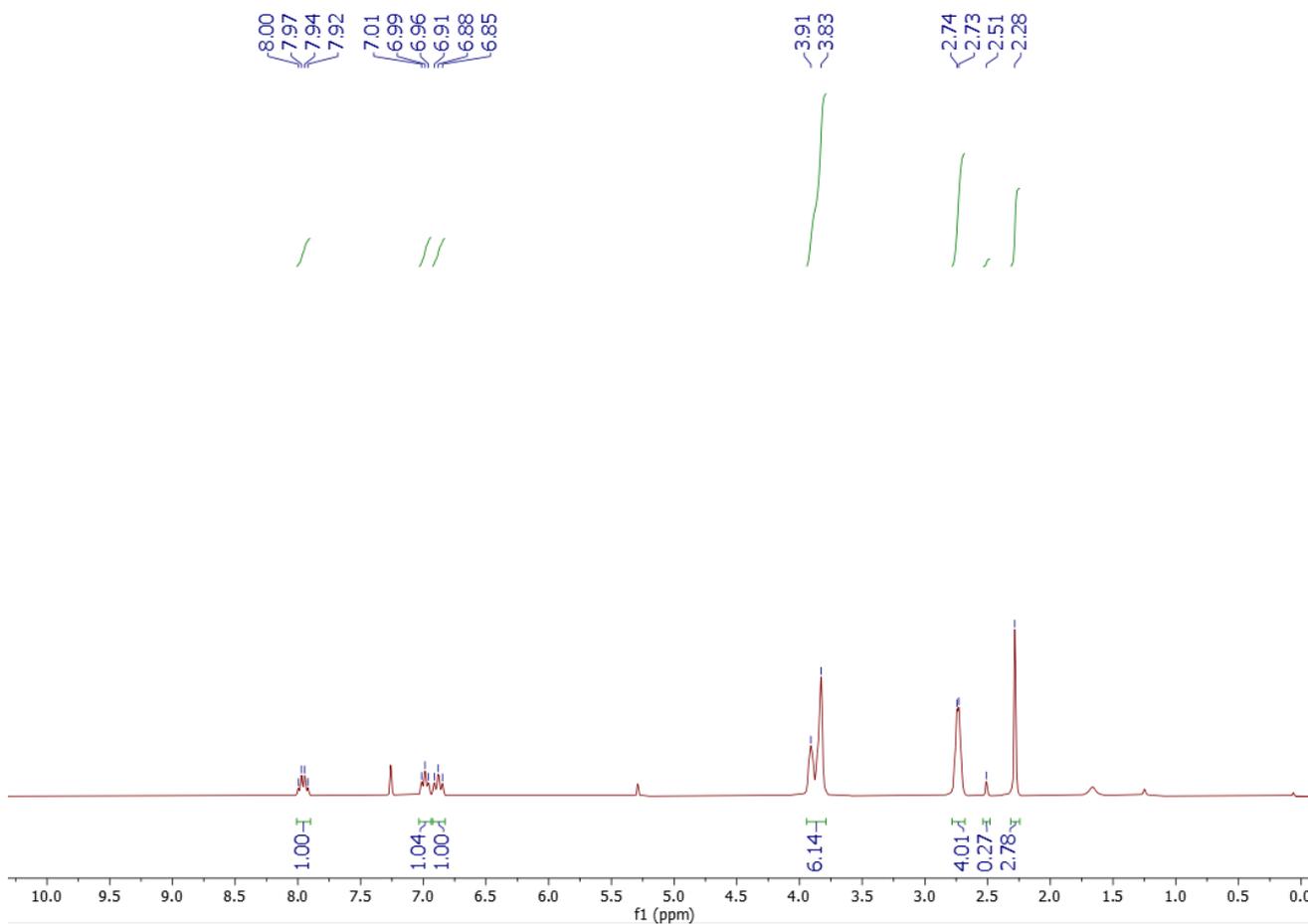
ANEXOS

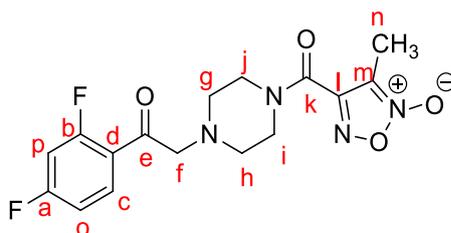
4-(4-(2-(2,4-difluorfenil)-2-oxoetil)-piperazina-1-carbonil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração amarela (p.f.: 118-120 °C). 88% de rendimento.

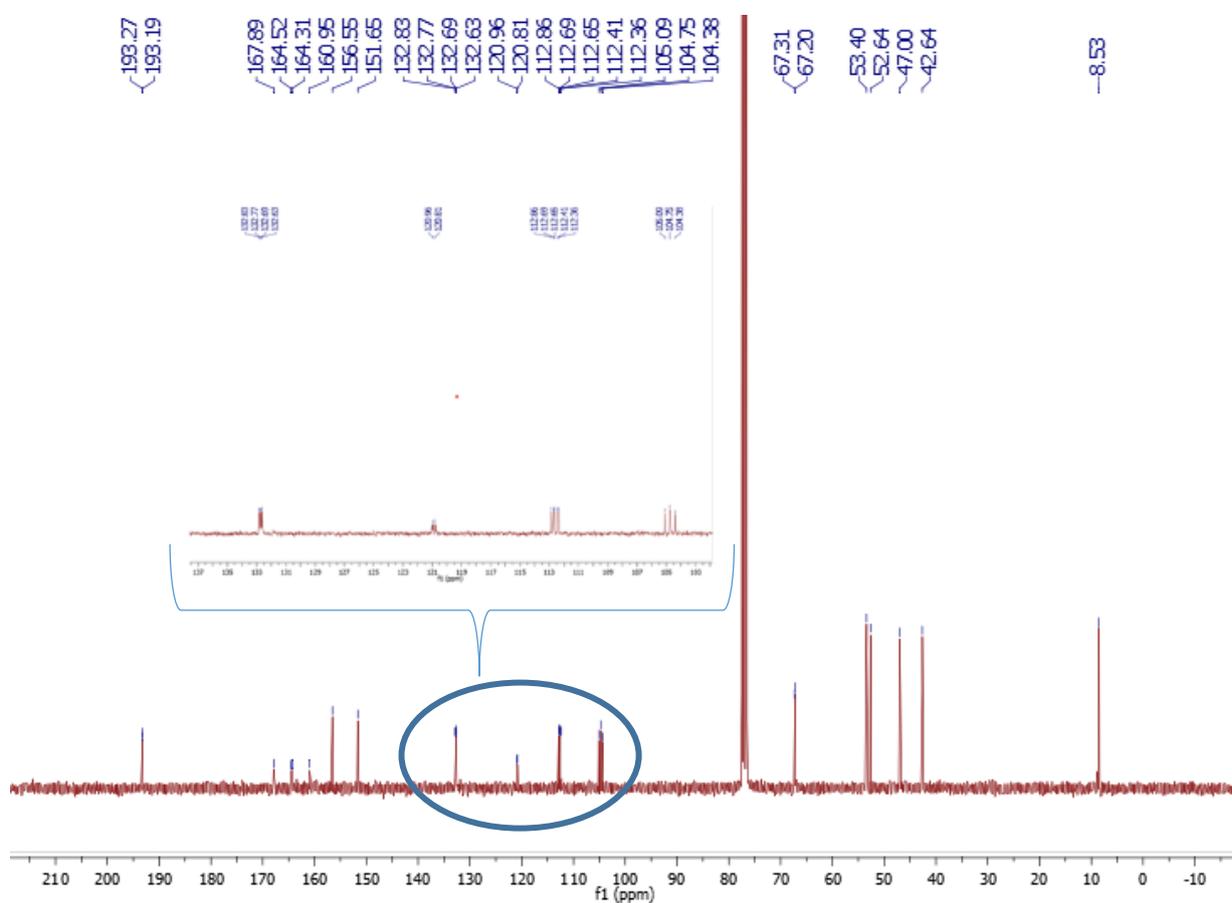


^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8,00 (*dd*, $J=8$ Hz, 1H-a); 7,01 (*t*, $J=7,5$ Hz, 1H-b); 6,91 (*t*, $J=9$ Hz, 1H-c); 3,91 (*d*, $J=24$ Hz, 6H-d/f); 2,74 (*d*, $J=3$ Hz, 4H-e); 2,51 (*s*, 1H-g); 2,28 (*s*, 2H-g).



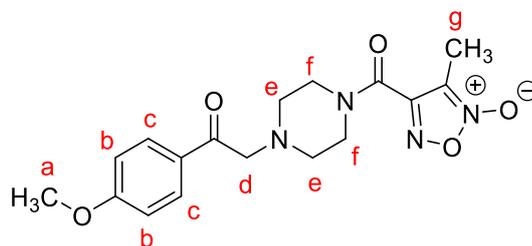


^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm)): 193,27-193,19-a; 167,89-b; 164,52-164,31-p;
 160,95-o; 156,55-k; 151,65-l; 135,92-d; 132,83-132,63-e; 120,96-120,81-c; 112,86-
 112,36-b; 105,09-104,38-m; 67,31-67,20-f; 53,40-i/j; 52,64-i/j; 47,00-g/h; 42,64-g/h;
 8,53-n

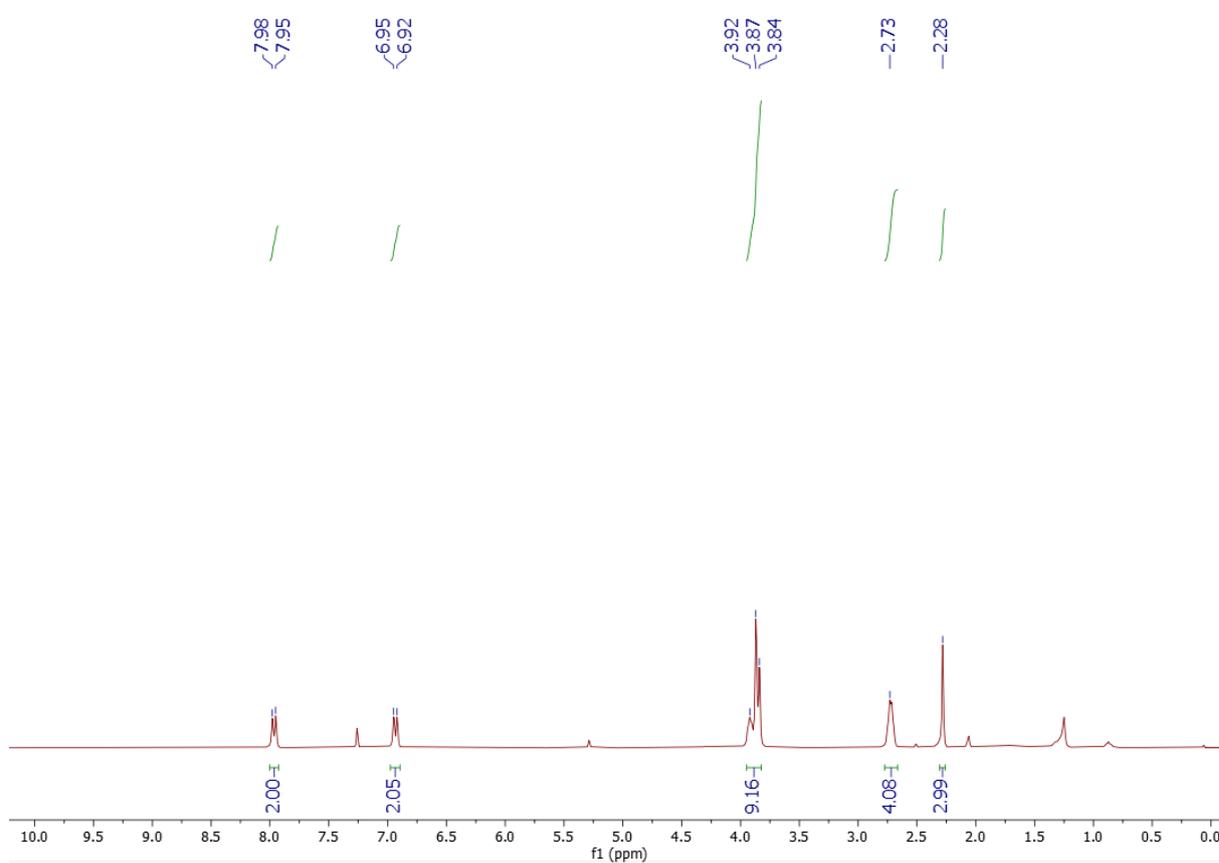


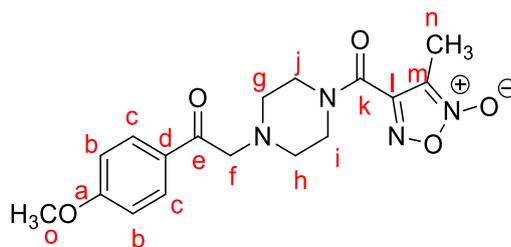
4-(4-(2-(4-metoxifenil)-2-oxoetil)-piperazina-1-carbonil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 125-126 °C). 59% de rendimento.

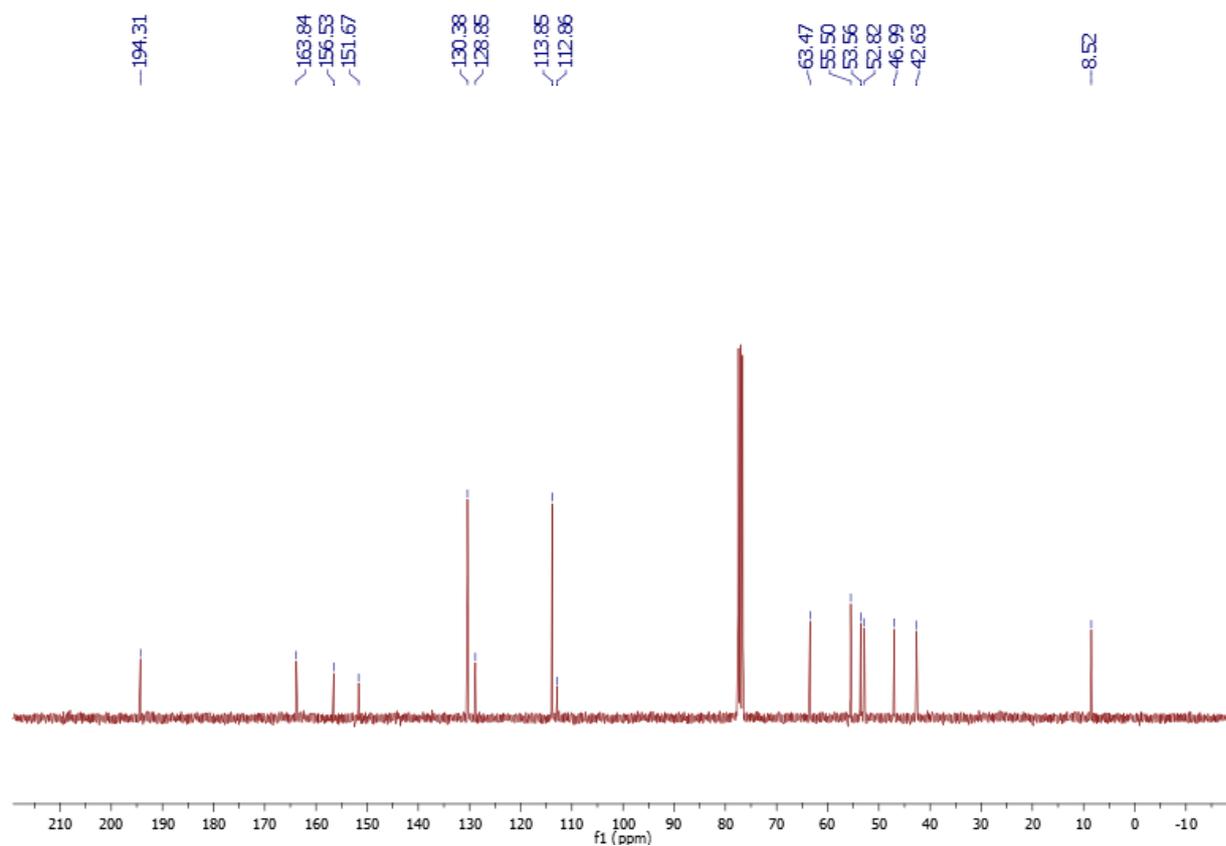


¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,98 (d, J=9 Hz, 2H-b); 6,95 (d, J=9 Hz, 2H-c); 3,92-3,84 (m, J= 12 Hz, 9H-a/d/f); 2,73 (s, 4H-e); 2,28 (s, 3H-g).



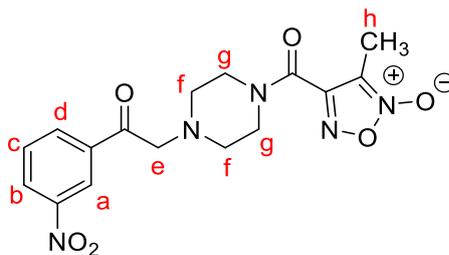


^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 194,31-e; 163,84-a; 156,53-k; 151,67-l; 130,38-d; 128,85-c; 113,85-b; 112,86-m; 63,47-f; 55,50-o; 53,56-i/j; 52,82-i/j; 46,99-g/h; 42,63-g/h; 8,52-n

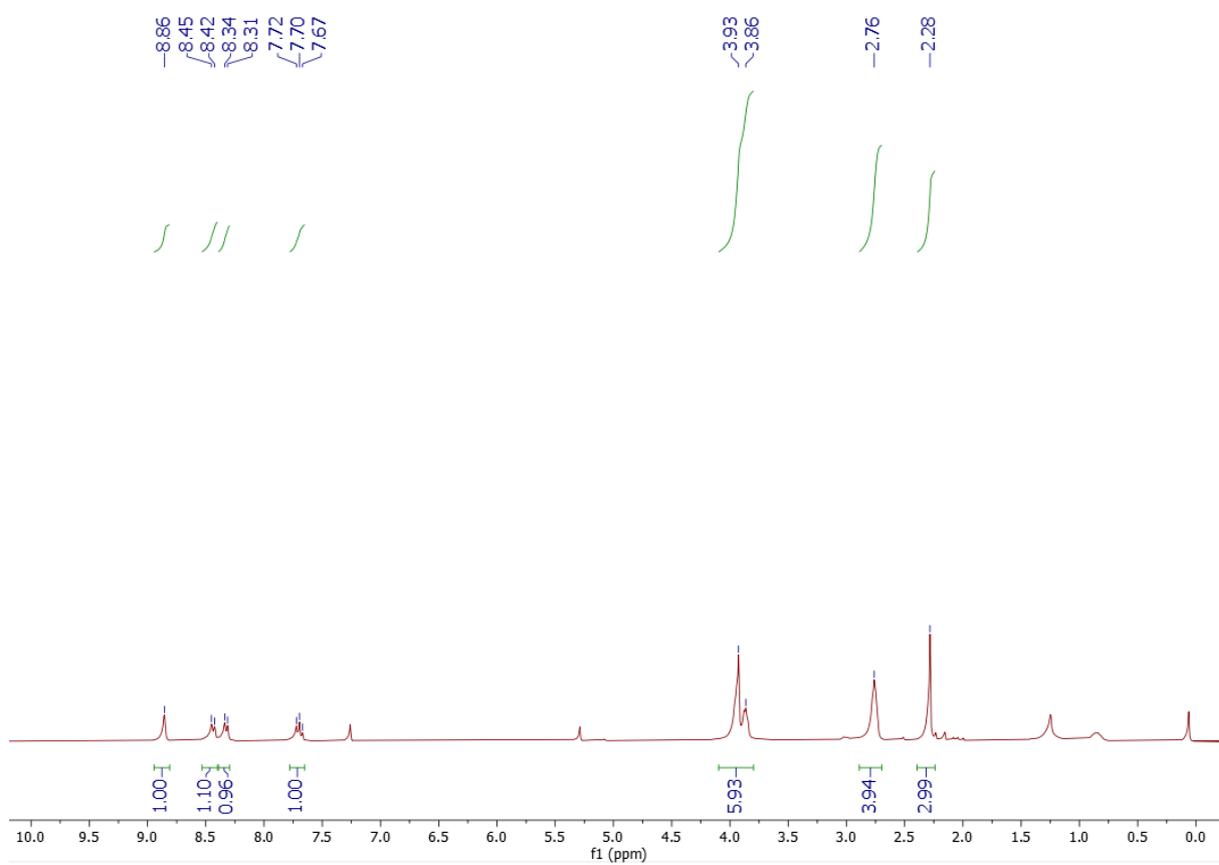


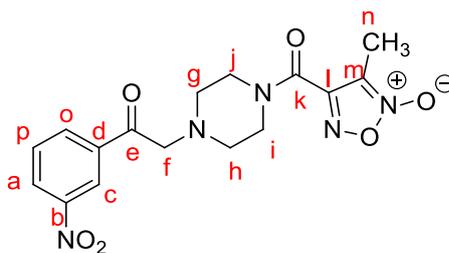
4-(4-(2-(3-nitrofenil)-2-oxoetil)-piperazina-1-carbonil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração amarela avermelhada (p.f.: 113-115 °C). 16% de rendimento.

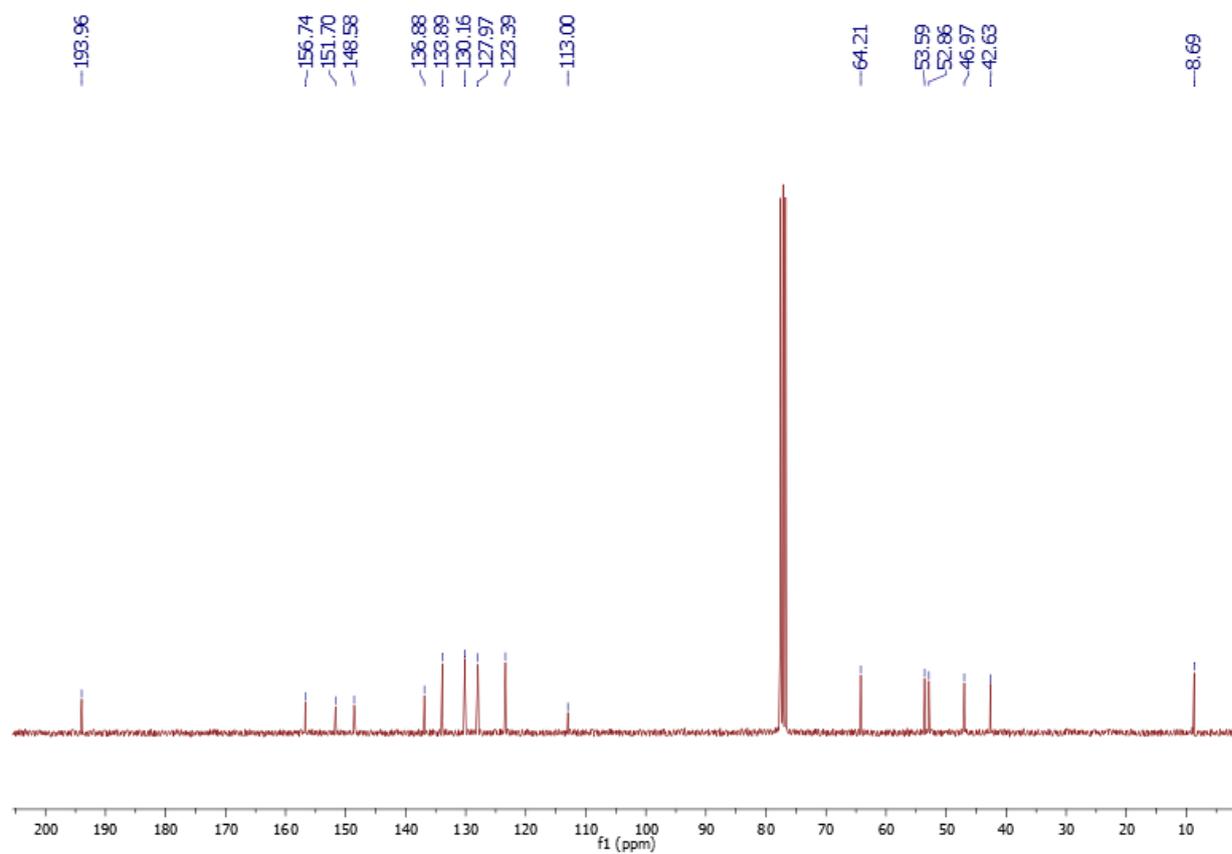


¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 8,86 (s, 1H-a); 8,45 (d, J=9 Hz, 1H-b); 8,34 (d, J=9 Hz, 1H-d); 7,72 (t, J=7,5 Hz, 1H-c); 3,93 (d, J=21 Hz, 6H-g/e); 2,76 (s, 4H-f); 2,28 (s, 3H-h).



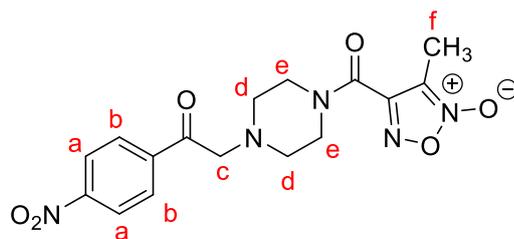


^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 193,96-e; 156,74-k; 151,70-l; 148,58-a; 136,88-b; 133,89-c; 130,16-d; 127,97-p; 123,39-m; 113,00-o; 64,21-f; 53,59-i/j; 52,86-i/j; 46,97-g/h; 42,63-g/h; 8,69-n

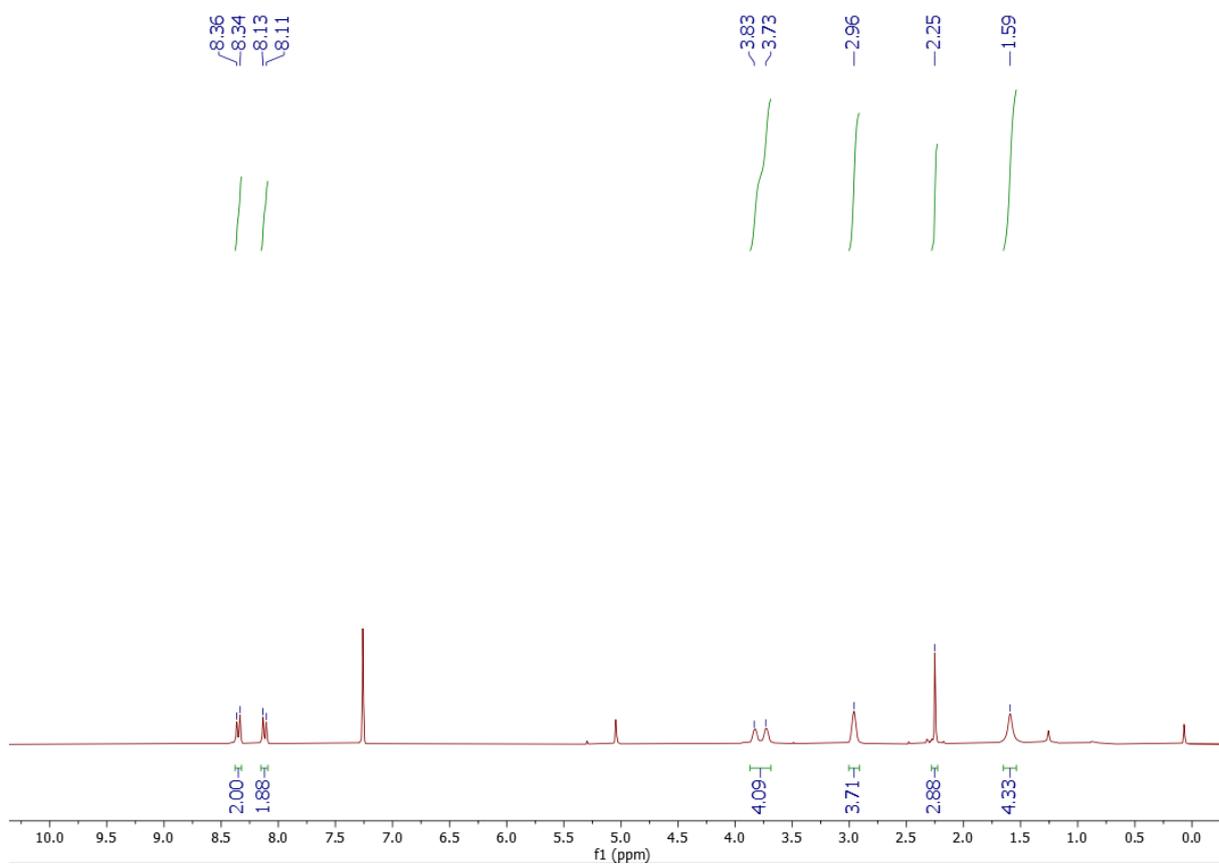


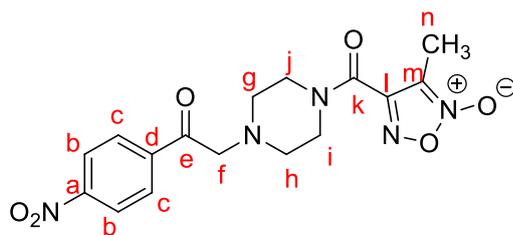
4-(4-(2-(4-nitrofenil)-2-oxoetil)-piperazina-1-carbonil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração amarela avermelhada (p.f.: 112-114 °C). 23% de rendimento.

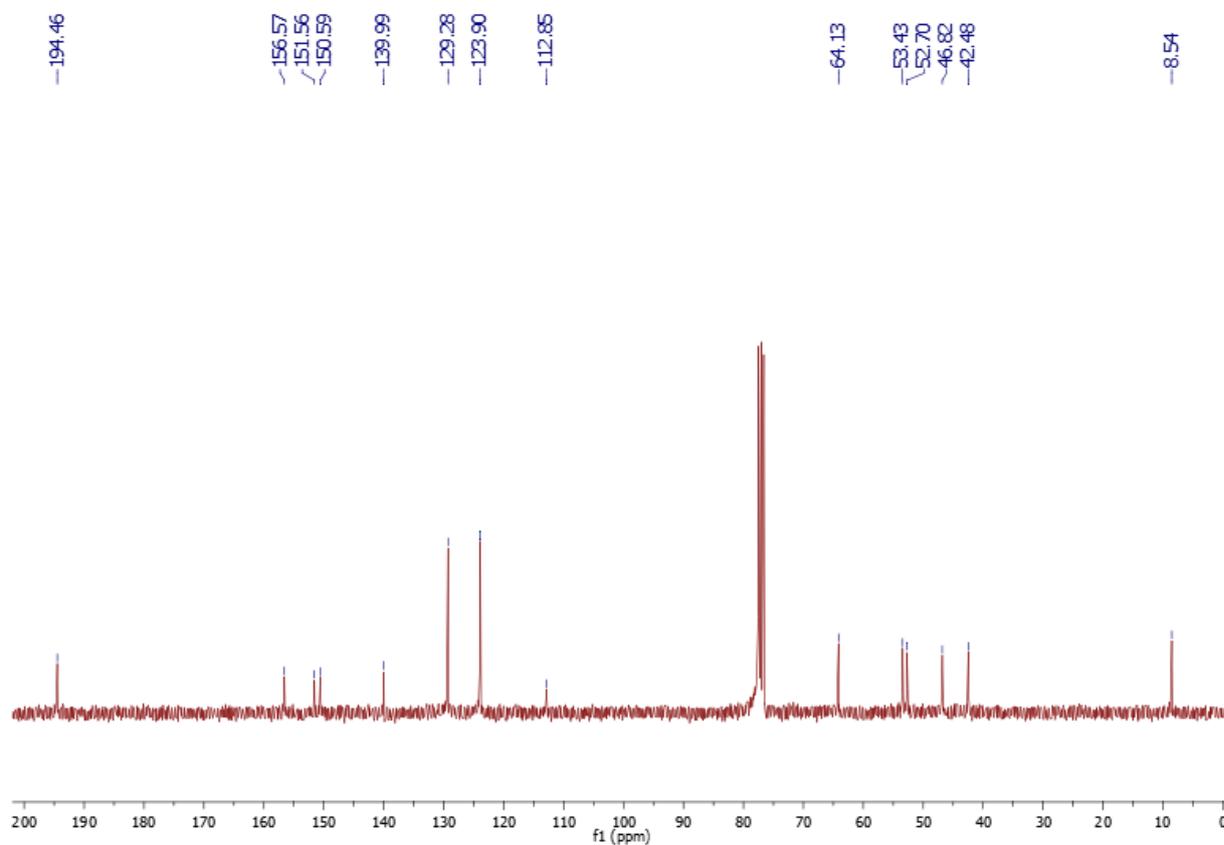


^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8,36 (d, $J=6$ Hz, 2H-a); 8,13 (d, $J=6$ Hz, 2H-b); 3,83 (d, $J=30$ Hz, 4H-e); 2,96 (s, 3H-c); 2,25 (s, 3H-f); 1,59 (s, 4H-d);



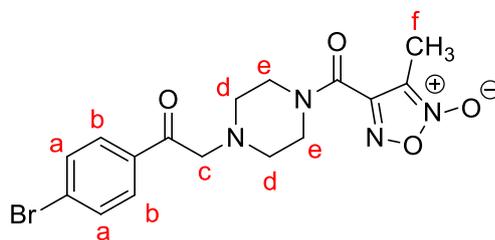


¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz, δ (ppm)): 194,46-e; 156,57-k; 151,56-l; 139,99-a; 136,88-b;
129,28-c; 123,90-m; 112,85-d; 64,13-f; 53,43-i/j; 52,70-i/j; 46,82-g/h; 42,48-g/h; 8,54-n

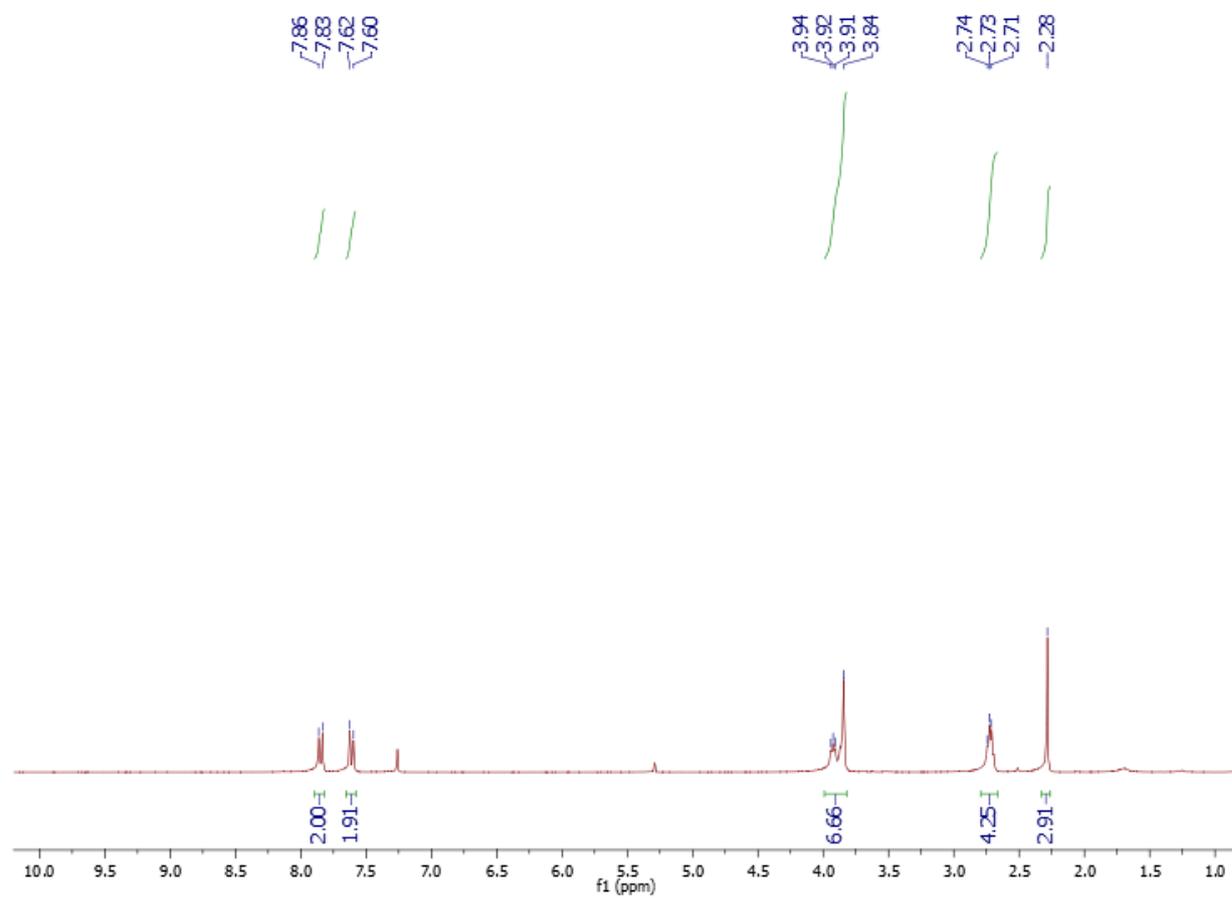


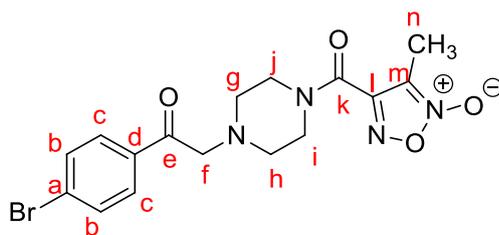
4-(4-(2-(4-bromofenil)-2-oxoetil)piperazina-1-carbonil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-oxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 109-113 °C). 48% de rendimento.

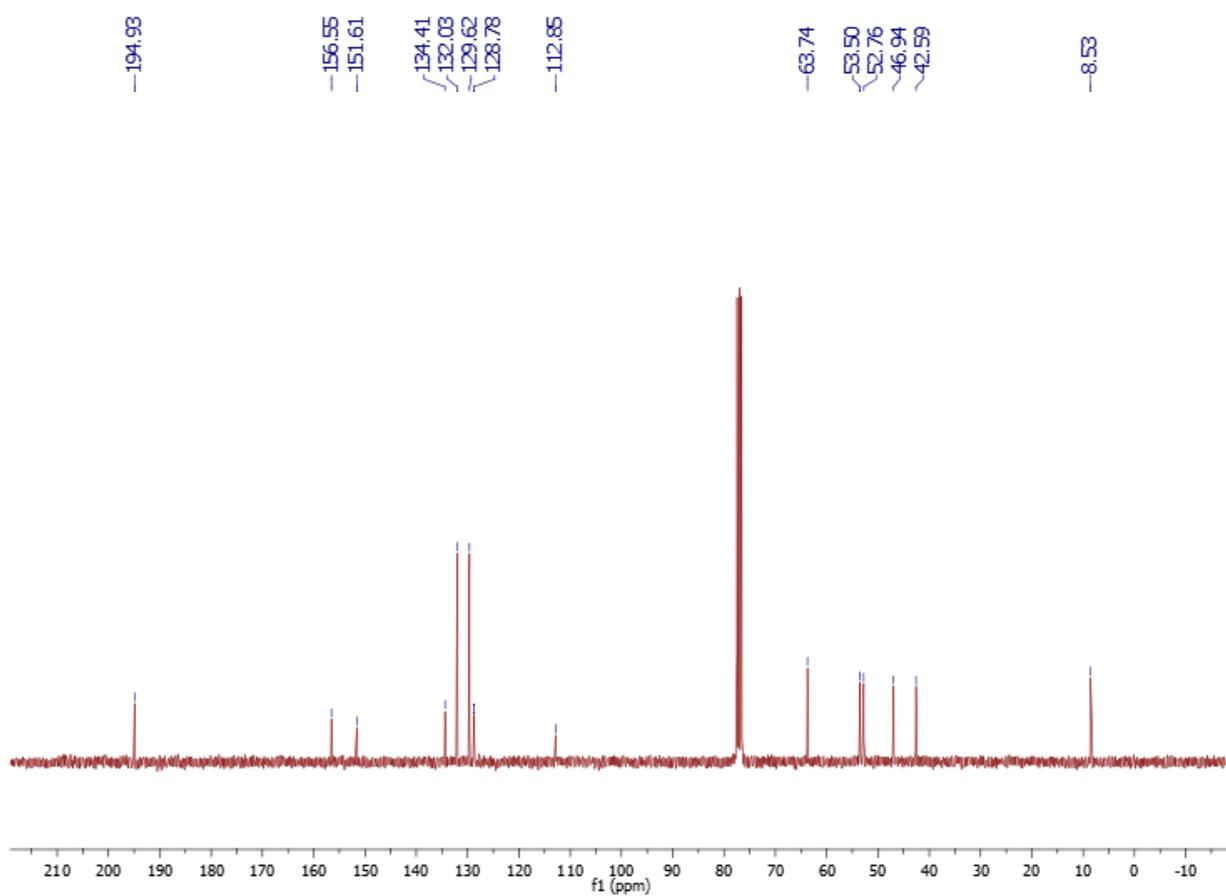


^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,86 (d, $J=8,5$ Hz, 2H-a); 7,62 (d, $J=8,5$ Hz, 2H-b); 3,94-3,91 (m, 4H-e); 3,84 (s, 2H-c); 2,74-2,71 (m, 4H-d); 2,28 (s, 3H-f);

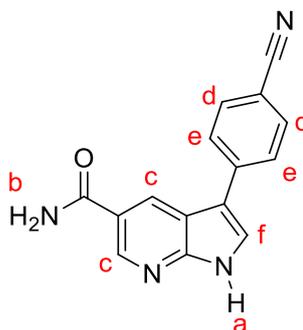




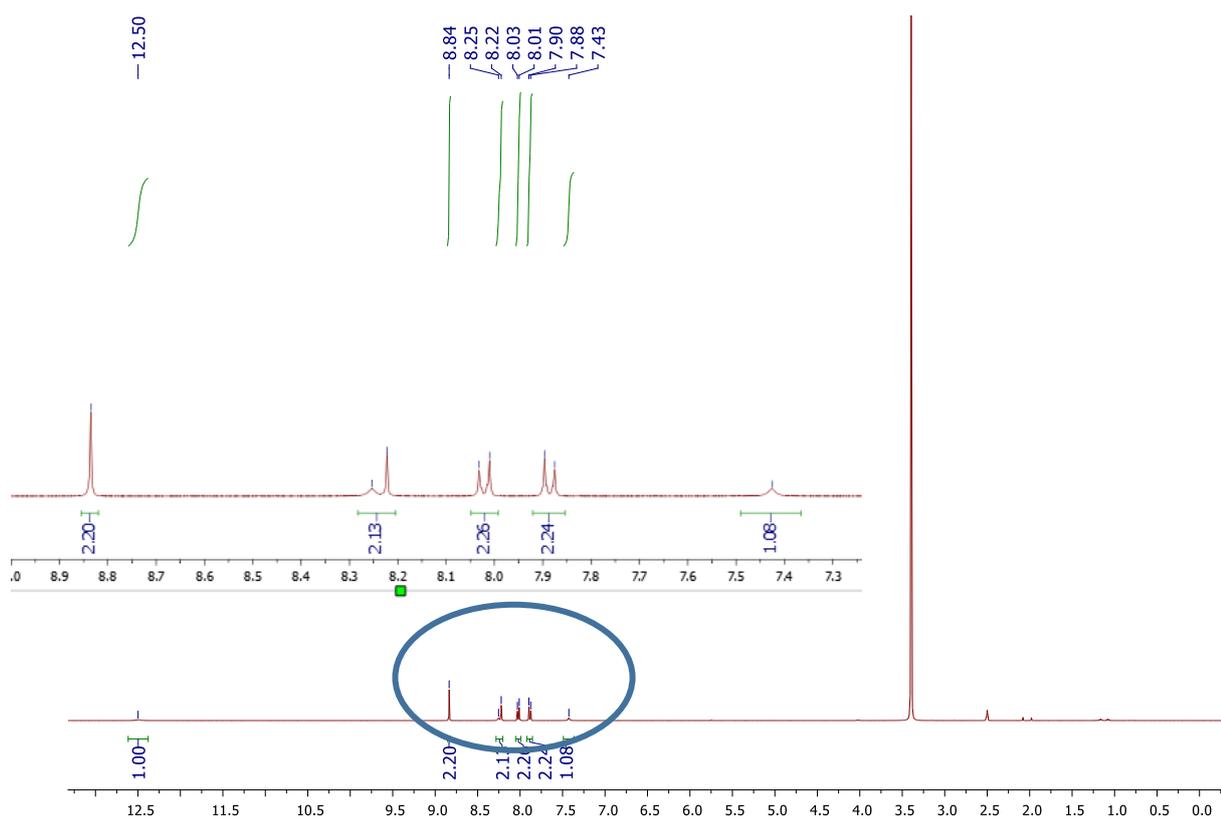
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm)): 194,93-e; 156,55-k; 151,61-l; 134,41-a; 132,03-b;
129,62-c; 128,78-m; 112,85-d; 63,74-f; 53,50-i/j; 52,76-i/j; 46,94-g/h; 42,59-g/h; 8,53-n

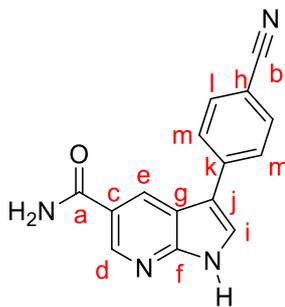


3-(4-cianofenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-5-carboxamida – 8a
 51% de rendimento, sólido branco, HRMS = 263.0931

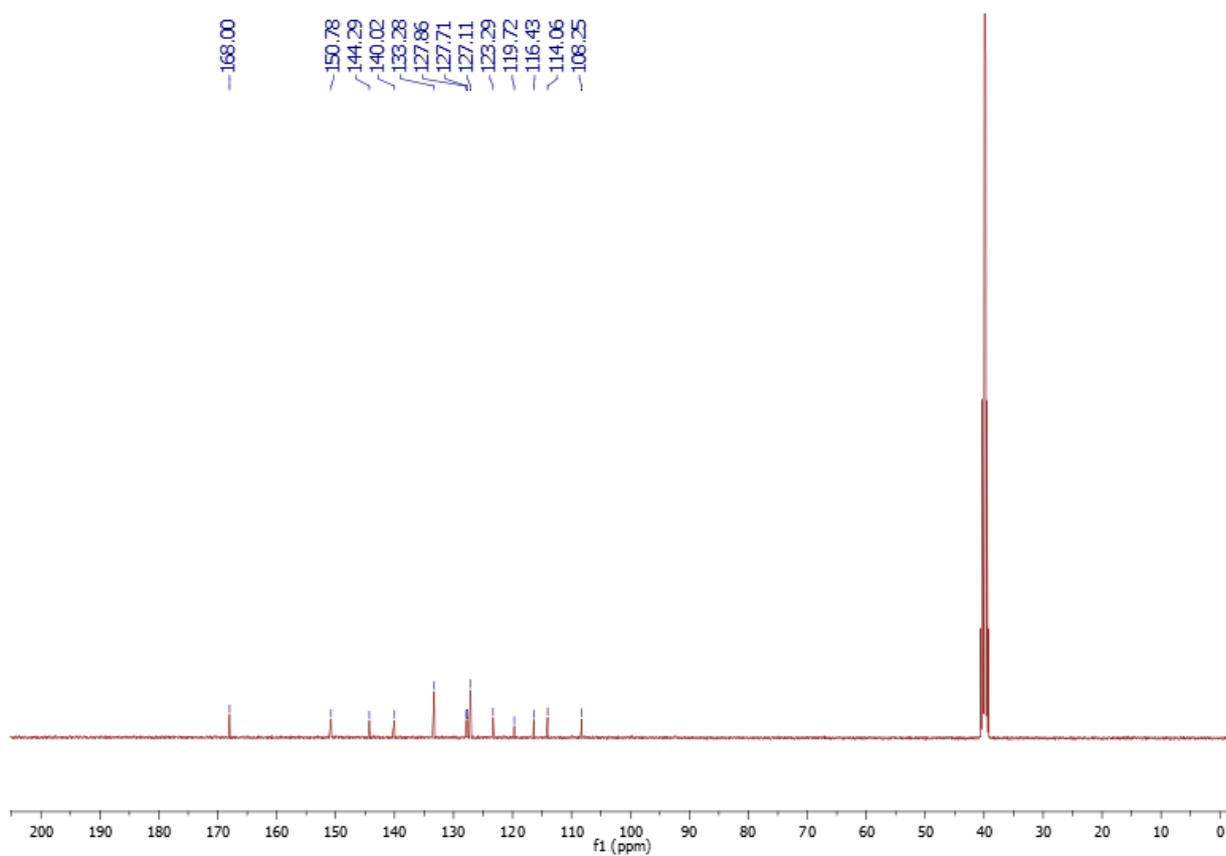


^1H RMN (400 MHz, DMSO- D_6) δ 12,50 (s, 1H-a), 8,84 (s, 2H-b), 8,25 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H-c), 8,03 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H-d), 7,90 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H-e), 7,43 (s, 1H-f).

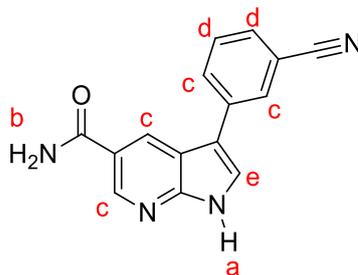




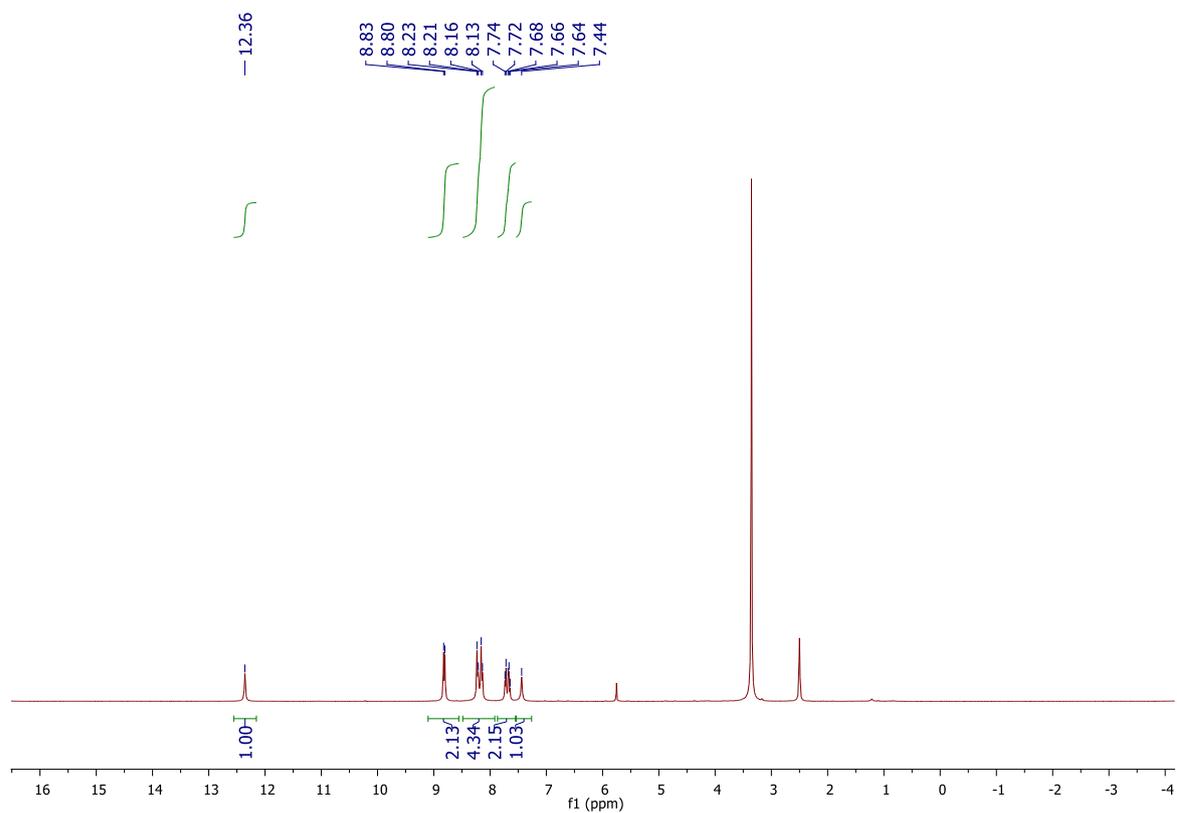
^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- D_6) δ 168,00-a; 150,78-f; 144,29-c; 140,02-d; 133,28-m; 127,86-g; 127,71-e; 127,11-l; 123,29-i; 119,72-j; 116,43-b; 114,06-k; 108,25-h.

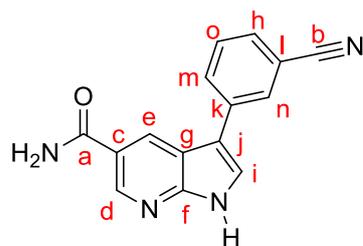


3-(3-cianofenil-1*H*-pirrol[2,3-*b*]piridina-5-carboxamida – 8b
 58% de rendimento, sólido branco, HRMS = 263,09300

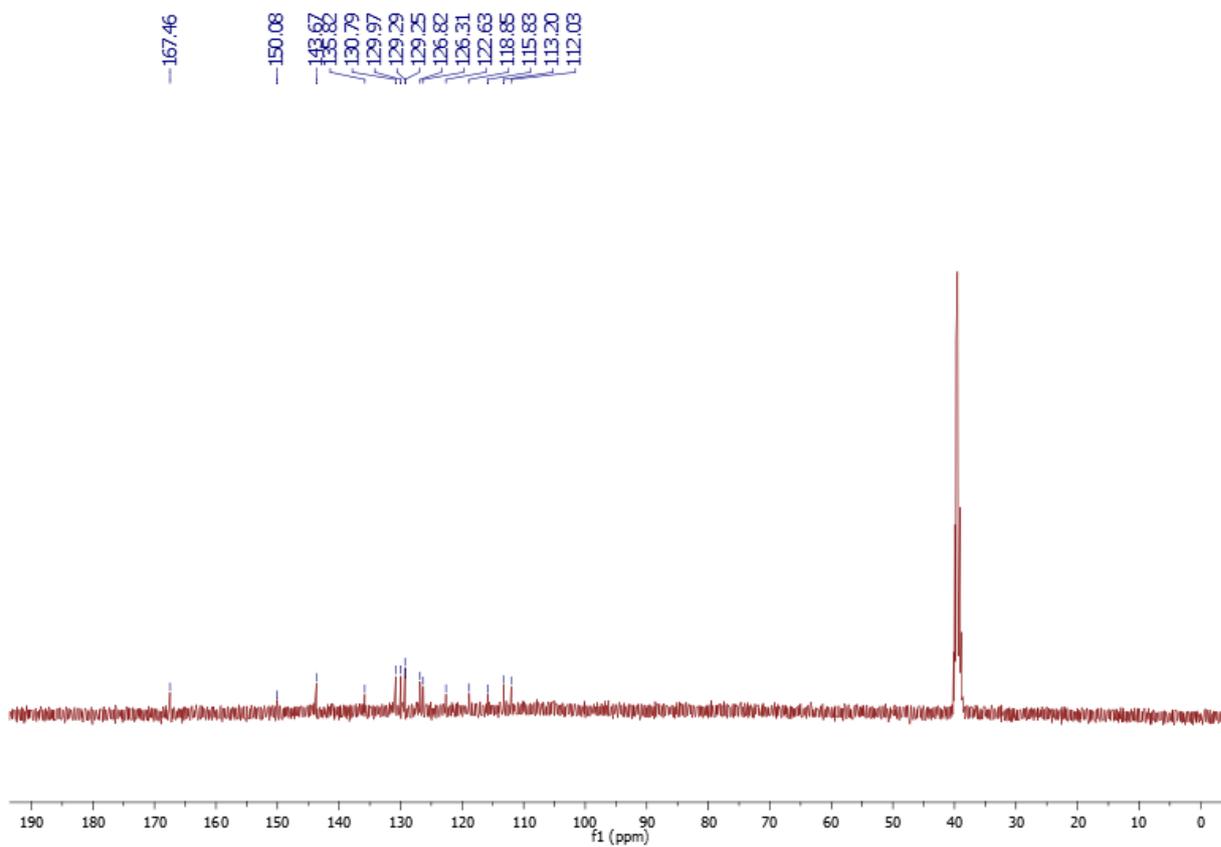


^1H RMN (500 MHz, DMSO- D_6) δ 12,36 (s, 1H-a), 8,83 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H-b), 8,23 (d, $J = 30,0$ Hz, 4H-c), 7,72 (d, $J = 21,3$ Hz, 2H-d), 7,44 (s, 1H-e).



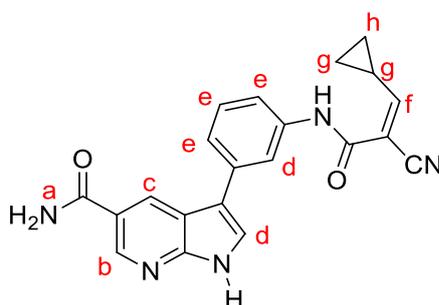


^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- D_6) δ 167,46-a; 150,08-f; 143,67-c; 135,82-d; 130,79-m; 129,97-g; 129,29-e; 129,25-l; 126,82-i; 126,31-n; 122,63-o; 118,85-j; 115,83-b; 113,20-k; 112,03-h.

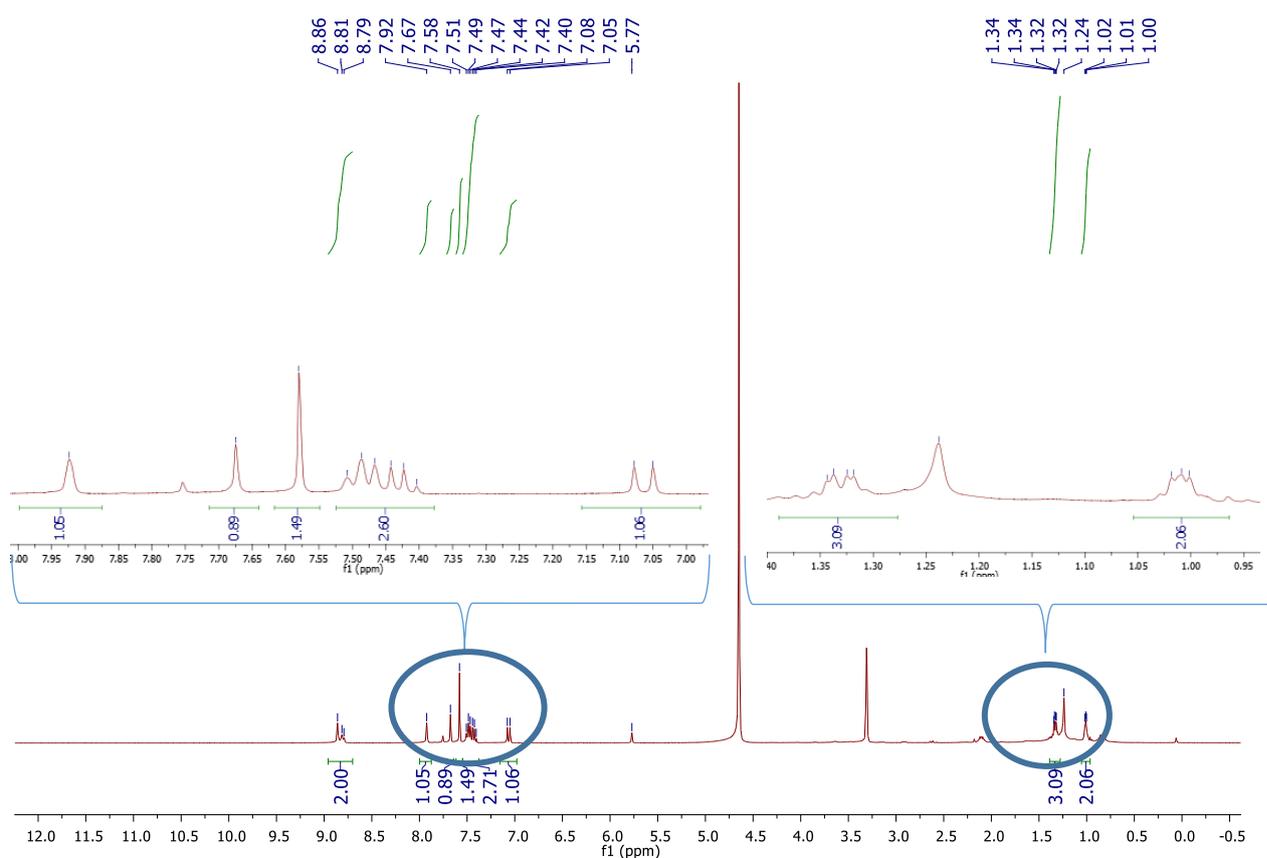


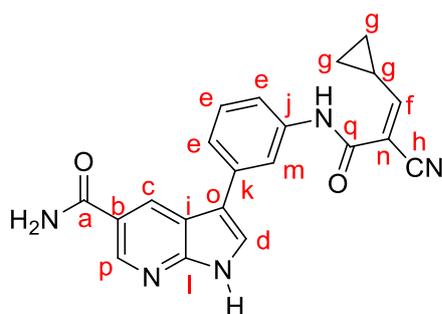
(*E,Z*)-3-(3-(2-ciano-3-ciclopropilacrilamido)fenil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina-5-carboxamida - 17A

99% de rendimento, sólido branco, DC-MS = 370.2 [M + H⁺]



¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 9,04 – 8,63 (m, 2H-a), 7,92 (s, 1H-b), 7,67 (s, 1H-c), 7,58 (s, 2H-d), 7,45 (dt, J = 15,4, 8,2 Hz, 3H-e), 7,06 (d, J = 11,2 Hz, 1H-f), 5,77 (s, diclorometano - 2H), 1,57 – 1,15 (m, 3H-g), 1,15 – 0,91 (m, 2H-h). Não mostra o sinal de prótons da amina porque o solvente é metanol deuterado.





¹³C RMN (101 MHz, DMSO-D₆) δ 166,88-a; 160,74-q; 142,94-l; 138,64-p; 135,47-d; 130,10-e; 129,73-b; 125,50-c; 124,47-i; 120,61-j; 120,12-k; 117,64-o; 115,74-m; 108,59-h; 30,21-n; 16,52-f; 11,44-g

