

PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS NA ÁREA DE DOENÇA DE CHAGAS: AVANÇOS E DESAFIOS

Giarolla, J., Ferreira, E. I.

Resumo

O artigo trata dos aspectos gerais do planejamento e desenvolvimento de fármacos, especialmente na área de doenças negligenciadas. Enfatiza o cenário atual, mostra os avanços recentes efetuados na quimioterapia da doença de Chagas e discute os principais desafios a serem enfrentados bem como a contribuição da Química Medicinal Brasileira e do Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos em Doenças Negligenciadas (LAPEN).

Palavras-chave: Planejamento de fármacos; Desenvolvimento de fármacos; Doenças negligenciadas; Doença de Chagas; Química Medicinal; Química Medicinal Brasileira; LAPEN.

Abstract

The paper reports the general aspects about drug design and development, especially in the area of neglected diseases. The current scenario is emphasized, the recent advances in the Chagas' disease chemotherapy are shown and the main challenges to be faced are discussed as well as the perspectives of the contribution of the Brazilian Medicinal Chemistry and of the Laboratory of Design and Synthesis of Chemotherapeutic Agents potentially active on Neglected Diseases (LAPEN).

Keywords: Drug Design; Drug Development; Neglected Diseases; Chagas' Disease; anti-Chagas' disease chemotherapy; Medicinal Chemistry; Brazilian Medicinal Chemistry; LAPEN.

PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS NA ÁREA DE DOENÇA DE CHAGAS: AVANÇOS E DESAFIOS

Jeanine Giarolla, Elizabeth Igne Ferreira

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 13 05508-900 Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP elizabeth.igne@gmail.com

- 1 - Introdução
- 2 - Desafios na pesquisa de novos agentes quimioterápicos para doença de Chagas
 - 2.1 - Motivação para químicos medicinais a pesquisar na área
 - 2.2 - Validação de novos alvos moleculares
 - 2.3 - Novos compostos líderes
 - 2.3.1 - Avanços
 - 2.3.2 - Contribuições da Química Medicinal Brasileira à pesquisa de novos antichagásicos
 - 2.3.2.1 - Contribuições do Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos em Doenças Negligenciadas, LAPEN, FCF, USP
 - 2.4 - Motivação para a indústria farmacêutica
- 3 - Perspectivas
- 4 - Agradecimentos

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, descoberta por Carlos Chagas há 103 anos, é uma das 17 doenças negligenciadas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde.¹ Entende-se por doenças negligenciadas aquelas que “não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países”.² Aproximadamente um bilhão de pessoas pobres do mundo estão infectadas com pelo menos um tipo de doença tropical negligenciada.^{3,4} Estas doenças não despertam, em geral, o interesse das indústrias farmacêuticas em razão do baixo retorno financeiro, considerando-se a baixa renda das pessoas acometidas. Em adição, fatores como baixa visibilidade, falta de exposição

e escassez de informações fazem com que doenças como a de Chagas, leishmaniose e tripanossomíase africana humana não sejam prioridades em programas nacionais de saúde.⁵

Endêmica em 21 países da América Latina,⁶ a doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Graças às correntes migratórias de indivíduos infectados, essa parasitose se dissemina em países da Europa, na Austrália, além de ser encontrada ao sul dos Estados Unidos na fronteira com o México, e, também no Canadá. Atualmente, em torno de 8 milhões de pessoas encontram-se infectadas com a doença, que se constitui em risco para 100 milhões de indivíduos nas regiões endêmicas. Registram-se, anualmente, mais de 15 mil mortes de pacientes infectados.^{5,7}

A quimioterapia da doença de Chagas restringe-se a apenas dois fármacos nitro-heterocíclicos: nifurtimox (1) e benznidazol (2), (Figura 1), descobertos nos anos 1960 e 1970, respectivamente. Ambos são mais eficazes na fase aguda da doença e há diferenças de eficácia em relação às cepas. Nifurtimox, por exemplo, não é utilizado no Brasil, em razão da sua ineficácia e dos seus efeitos adversos. O benznidazol, por outro lado, manifesta atividade nas cepas existentes no Brasil. Porém, a indústria farmacêutica Roche suspendeu a produção de benznidazol (Rochagan[®]) e o governo brasileiro repassou a incumbência ao Laboratório Farmacêutico de Pernambuco, LAFEPE. No entanto, o medicamento ainda não foi produzido, reduzindo, ainda mais, a disponibilidade de fármacos para a doença de Chagas, não só para o Brasil, mas para toda a América Latina.⁹

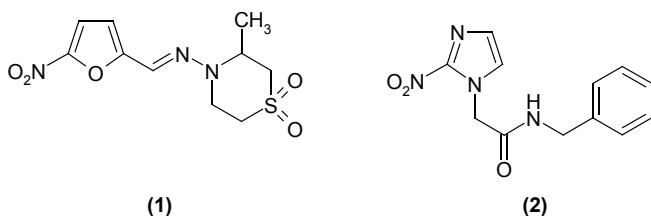


Figura 1. Estruturas dos agentes quimioterápicos contra a doença de Chagas disponíveis, (1) nifurtimox e (2) benznidazol.

É, portanto, imperativo, face à essa grave situação, que se fortaleçam as pesquisas por novos candida-

tos a agentes tripanomicidas, sobretudo para a fase crônica da doença, que compromete, expressivamente, a qualidade de vida dos infectados e pode levá-los à morte.

2 - DESAFIOS NA PESQUISA DE NOVOS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS PARA DOENÇA DE CHAGAS

Química Medicinal, segundo a IUPAC¹⁰ “se preocupa com invenção, descoberta, planejamento, identificação e preparação de compostos bioativos, com estudo do metabolismo, interpretação molecular do modo de ação ao nível molecular e construção de relações entre a estrutura química e a atividade biológica”. Aos pesquisadores dessa área de caráter multidisciplinar, envolvendo Química, Ciências Biológicas, Médicas e Farmacêuticas, compete a busca de compostos bioativos nas diferentes áreas da terapêutica, incluindo a busca de compostos eficazes para a doença de Chagas.

Dentre os grandes desafios na pesquisa de agentes quimioterápicos para a doença de Chagas, assim como de novos fármacos para outras doenças negligenciadas, podem-se destacar: (a) a motivação aos químicos medicinais a pesquisar na área; (b) a validação de novos alvos moleculares, (c) a busca de novos compostos líderes e, (d) a motivação da indústria farmacêutica, especialmente, a nacional, sensibilizando-a para a importância do desenvolvimento dessa classe de fármacos.

2.1- MOTIVAÇÃO PARA OS QUÍMICOS MEDICINAIS A PESQUISAR NA ÁREA

Segundo dados do Diretório de Grupos de Pesquisa do Brasil do CNPq¹¹, em 2013, 244 grupos estão envolvidos em pesquisa sobre planejamento de fármacos em geral. Em torno de 53% desses grupos (131) encontram-se localizados na região sudeste do País. Apenas cerca de 4% desses grupos brasileiros se dedicam à pesquisa de fármacos para a doença de Chagas, estando 100% na região sudeste. Embora esses números representem aumento do número de grupos dedicados à pesquisa em relação ao passado, há que se encetar esforços para que aumente substancialmente, a dedicação para a pesquisa de novos compostos tripanomicidas.

O mundo acadêmico no plano mundial registra, analogamente, baixo interesse pelas doenças negligenciadas, a julgar pelo número de publicações nos últimos 40 anos.¹² Doenças negligenciadas e não-negligenciadas com o mesmo número de anos de vida adaptados à incapacidade (DALY, disability-adjusted life year) apresentam número de publicações expressivamente diferentes, nos bancos de dados Web of Science¹³ (5.221 e 2.335.105 artigos, respectivamente) e PubMed¹⁴ (5.466 e 2.867.092 artigos, respectivamente). Enquanto as publicações sobre doenças não-negligenciadas tiveram ascensão significativa, aquelas relativas a doenças negligenciadas registraram discretíssimo aumento no período pesquisado.

2.2 VALIDAÇÃO DE NOVOS ALVOS MOLECULARES

O planejamento de fármacos passou de fenotípico a genotípico. No primeiro, prioriza-se o efeito final dos compostos bioativos, preocupando-se, posteriormente, com o mecanismo de ação e a relação entre estrutura e atividade. No último, visa-se ao conhecimento da doença em bases moleculares, etapa essa realçada pelo sequenciamento do genoma humano. Esta última abordagem é considerada planejamento racional de fármacos, em que a busca por alvos moleculares, responsáveis por determinada atividade farmacológica e mecanismo de ação é prioritária. A partir dos alvos são planejados compostos potencialmente mais ativos e depois se procuram as relações com a atividade que permitam aprimorar essa atividade.¹⁶

Ainda que haja controvérsias acerca do papel do planejamento por meio de único alvo molecular de determinada ação na diminuição de novos candidatos a fármacos,¹⁷ esses alvos específicos merecem atenção por parte daqueles que pesquisam doenças negligenciadas. Ressalte-se que a seletividade é premissa fundamental da quimioterapia e a busca de alvos específicos, com a descoberta de candidatos com maior seletividade de ação. No entanto, por questão de resistência dos agentes etiológicos à quimioterapia, a estratégia preconizada para essas doenças é a de se encontrar mais de um alvo interessante no mesmo patógeno.¹⁸ Dessa forma, procura-se diminuir a probabilidade do aparecimento de cepas de microrganismos resistentes.

Os alvos moleculares da ação de candidatos tripanomicidas dependem do conhecimento de vários processos do parasita, como por exemplo os mecanismos de invasão no hospedeiro.^{18,19} Vale destacar, também, as possibilidades que o conhecimento do genoma de *T. cruzi* representa na identificação de novos alvos.²⁰ Enzimas chave estão igualmente entre os alvos preferidos para o desenvolvimento de novos fármacos.²¹ Fosfatases,²² biossíntese de esteróis^{23,24} (esterol-14-desmetilase, lanosterol sintase, esqualeno epoxidase, esqualeno sintase, farnesiltransferase diidroorotato, dentre outras), via glicolítica (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, fosfofrutoquinase)²⁴, biossíntese de lipídeos (alquil-lisofosfolipídeos, glicosfingolipídeos)²⁴, metabolismo de pentose fosfato (6-fosfogluconato desidrogenase)²⁴, transporte e metabolismo de poliaminas (arginina descarboxilase, glutationil espermidina sintetase)²⁴, síntese de nucleotídeos (purina fosforibosil transferases, di-hidrofolato redutase, pteridina redutase, diidroorotato desidrogenase)^{24,25}, transferência de ácido siálico (transialidase)²⁴, topoisomerases I²⁶ e II²⁷, entre outros, são alguns dos exemplos. Contudo, a cruzaina^{28,29}, a tripanotiona redutase³⁰ e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)^{24,31,32} estão entre os alvos mais estudados com vistas a esse objetivo. O estudo in silico com estruturas cristalográficas desses alvos vem experimentando avanços nos últimos tempos graças principalmente ao desenvolvimento de novas ferramentas computacionais.³³ Deve-se ressaltar a importância de se validar esses alvos por meio de ensaios experimentais, de preferência em laboratórios certificados.

2.3 NOVOS COMPOSTOS LÍDERES

O desafio de encontrar novos compostos líderes (leads) encontra-se intimamente ligado à busca por alvos moleculares, no contexto do planejamento genotípico. Processos de planejamento racional, com base na estrutura do receptor (Structure-based drug design, SBDD) ou na estrutura do ligante (Ligand-based drug design, LBDD), são empregados com vistas a encontrar, ao final, os compostos líderes, incluindo aqueles para doenças parasitárias.³⁵ A triagem virtual (VS)³⁶ e o ensaio biológico automatizado de grandes coleções de compostos (HTS, do inglês High Throughput Screening)³⁷ também se valem da identificação dos alvos moleculares para

resultados mais profícuos. Esse tipo de abordagem não descarta, no entanto, a aplicação do planejamento fenotípico,³⁸ que tem na modificação molecular de compostos sintéticos e naturais suporte essencial para se identificar novos compostos bioativos para a doença de Chagas.

Deve-se mencionar, também, o processo de drug repurposing, piggy-back chemotherapy ou therapeutic switching^{39,40}, termos em inglês que significam triagem de fármacos anteriormente desenvolvidos com outros propósitos para o uso em doenças negligenciadas. O portfólio do DNDi de 2013⁴¹, por exemplo, traz alguns desses casos.

2.3.1 AVANÇOS

Em revisão recente, o Annual Reports in Medicinal Chemistry de 2010²⁹ traz os recentes avanços na descoberta de fármacos para doenças negligenciadas, entre elas, a doença de Chagas. Compostos inibidores da biossíntese de esteróis encontram-se entre os mais promissores (Figura 2). Diversas enzimas envolvidas nessa via biossintética têm sido validadas como alvos moleculares, entre elas a 14 α -esterol desmetilase dependente de citocromo P₄₅₀. O posaconazol (3), inibidor seletivo dessa enzima, mostrou-se ativo em modelos murinos com eficácia tanto na fase aguda quanto na crônica. Derivados amídicos da indometacina (4) também se mostraram efetivos na inibição de 14 α -esterol desmetilase e inibidores imidazólicos, como análogos do tipifarnibe (5, 6), apresentaram ação na farnesil transferase.

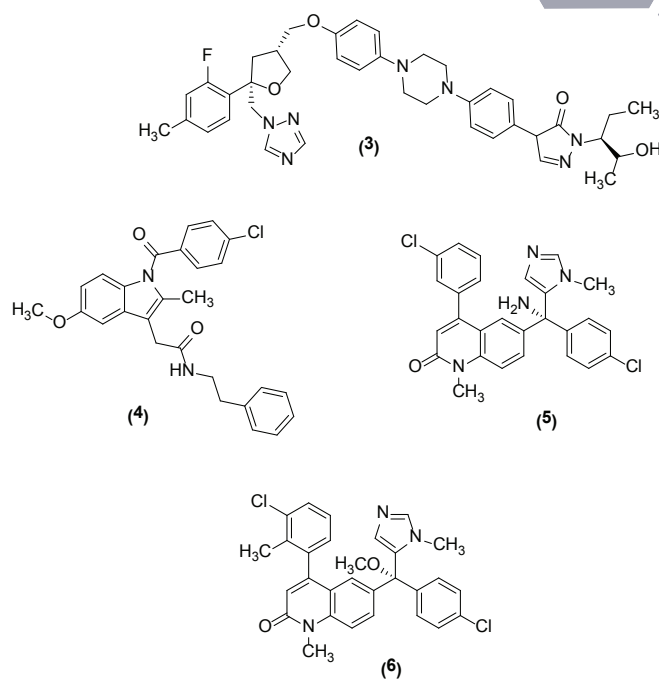


Figura 2. Estrutura de inibidores da biossíntese de esteróis.

Inibidores da cruzaina²⁹ (Figura 3), forma recombinante da cruzipaina,⁴² enzima essencial do *T. cruzi* e não existente nos mamíferos, são o derivado peptídico (7), que mostrou atividade *in vitro* e *in vivo*, e o derivado não-peptídico (8), que faz parte de série de nitrilas triazínicas, identificadas por HTS. Este último apresentou-se como inibidor da cruzaina de alta potência, com IC₅₀ da ordem de 10 nM, embora não manifestasse atividade nos parasitas *in vitro*. Tal fato ocorre, não raro, por problemas de permeabilidade dos compostos ensaiados.

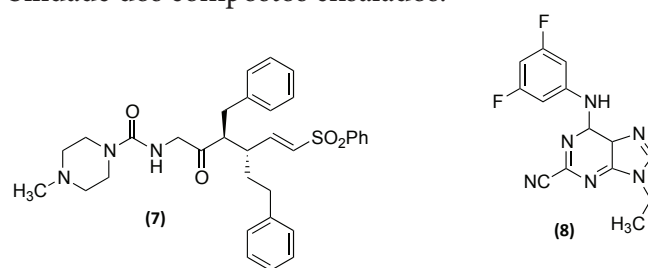


Figura 3. Estrutura de inibidores da cruzaina.

Nitro-heterociclos continuam a despertar interesse entre os pesquisadores da área. A Figura 4 mostra dois derivados, um nitrofurano (9) e um nitroindazol (10),²⁹ que apresentaram atividade *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, esse último com potência semelhante ao nifurtimox (1). Entre as naftoquinonas, a 2,3-difenil-1,4-naftoquinona (11)²⁹ mostrou-se ativa nas três fases do parasita e relativa seletividade, comparativamente às células de mamíferos.

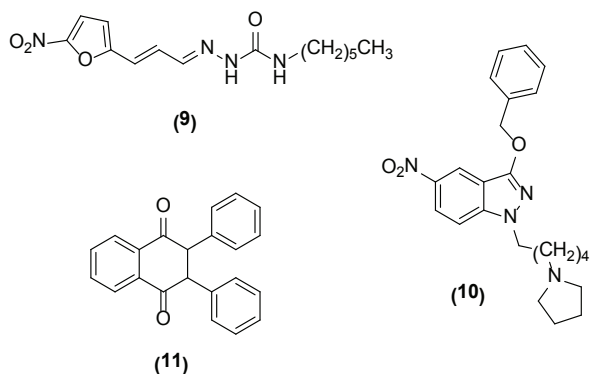


Figura 4. Nitro-heterociclos com atividade tripanomicida potencial.

O grupo de Cerecetto, da Universidad de La Republica, no Uruguai,⁴³ desenvolve, há algum tempo, pesquisa com nitro-heterociclos, o que lhe rendeu a síntese de mais de 500 compostos, estudados sob vários aspectos, e a identificação de moléculas promissoras. O mesmo grupo publicou, recentemente, artigo sobre derivados tiossemicarbazonas derivadas de 1-indanonas,⁴⁴ encontrando dois compostos (12, 13) com a atividade significativa em *T. cruzi* in vitro, refletiva em IC_{50} de 1,8 μ M e 1,0 μ M, respectivamente (Figura 5). Tais derivados inibiram a cruzaina em 61% e 67%, respectivamente, e apresentaram índice de seletividade, em relação à citotoxicidade a eritrócitos de 989 e 770, respectivamente. Constituem-se, portanto, em compostos líderes com promissora atividade contra *T. cruzi*.

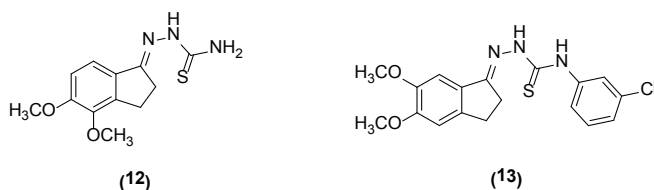


Figura 5. Tiossemicarbazonas derivadas de 1-indanonas.

Chung e colaboradores, em 2008, publicaram revisão sobre pró-fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas, dentre elas a doença de Chagas.⁴⁵ Um dos poucos exemplos são os pró-fármacos derivados do oxamato de N-isopropila (14), como o éster etílico (15), que inibiu a enzima lactato desidrogenase do *T. cruzi* em testes in vivo.⁴⁶

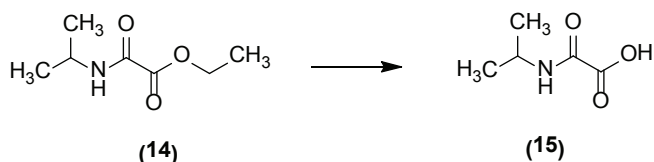


Figura 6. Pró-fármacos inibidores da lactato desidrogenase de *T. cruzi* in vivo.

Compostos de origem natural continuam despertando interesse como fonte de novos fármacos inclusive para doença de Chagas.⁴⁷ Uchiyama, em 2009,⁴⁸ publicou importante revisão a respeito de compostos de várias classes químicas, dentre elas, as de fenilpropanoides, flavonoides e terpenoides, com atividade tripanomicida, ressaltando, no entanto, o desafio de se prosseguir nos estudos com tais derivados, sobretudo no que se refere aos respectivos mecanismos de ação. Tasdemir e colaboradores, em 2006, estudaram a atividade tripanomicida e leishmanicida in vitro de uma grande biblioteca de flavonóides e compostos fenólicos relacionados. Determinaram ainda, a Relação Estrutura Atividade (Structure Activity Relationships – SAR) e seletividade de alguns antiparasitários. Resultados interessantes revelaram a capacidade in vitro em inibir o *T. cruzi* e parasitas do gênero *Leishmania* de alguns compostos, sem causar toxicidade significativa em células de mamíferos.⁴⁹

É interessante ressaltar que bibliotecas de estruturas químicas com base em derivados de origem natural ou neles inspirados podem se constituir em ferramentas úteis na busca de compostos líderes tripanomicidas, representando alternativa interessante à abordagem baseada no receptor (SBDD).⁵⁰

2.3.2 - CONTRIBUIÇÕES DA QUÍMICA MEDICINAL BRASILEIRA À PESQUISA DE NOVOS ANTICHAGÁSICOS

A Química medicinal brasileira apresenta contribuições importantes para a busca de compostos líderes na área de agentes contra a doença de Chagas. O Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, que faz parte do Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INCT/CNPq), liderado pelo Dr. Glaucius Oliva, apresenta contribuições de alta relevância. Identificando inibidores promissores para a GAPDH de *T. cruzi*, enzima cristalografada pelo grupo⁵¹ (Figura 7) e para a cruzaina, esse grupo se consolidou na aplicação integrada de técnicas computacionais e experimentais,^{52,53} utilizando a cristalografia de Raio X para a identificação estrutural de alvos moleculares.

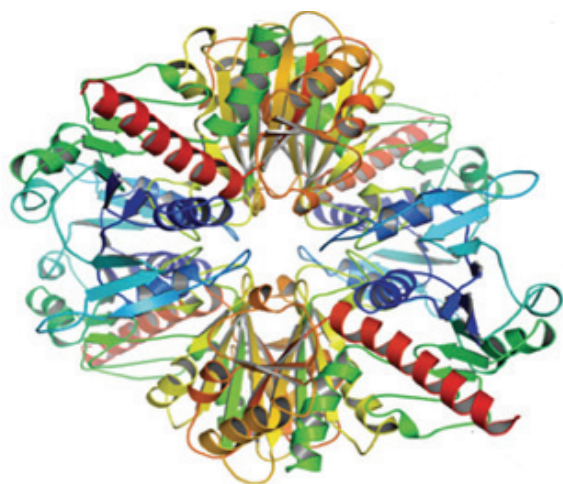


Figura 7. Estrutura cristalografada da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)(PDB 1D 3DMT).

Um dos derivados isolados é o ácido anacárdico, extraído do caju e reduzido quimicamente (16),⁵⁴ composto cuja atividade inibitória foi demonstrada em GAPDH de *T. cruzi* (Figura 8). Revisão publicada pelo grupo, em 2009,⁵⁵ mostra o estado da arte no desenvolvimento de novos compostos tripanomicidas, apresentando algumas das suas mais importantes contribuições.

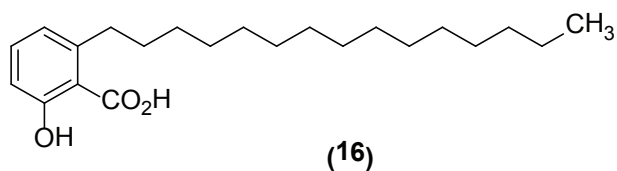


Figura 8. Estrutura do ácido anacárdico reduzido.

A Fundação Oswaldo Cruz vem também através de seus vários laboratórios, contribuindo significativamente para a busca de novos fármacos contra *T. cruzi*.⁵⁶ O Laboratório de Biologia Celular (IOC/Fiocruz), Mangunhos, RJ, coordenado pela Dra. Maria de Nazaré Soeiro, por exemplo, desenvolve pesquisas relacionadas à atividade de compostos potencialmente ativos contra a doença de Chagas, procurando compreender o respectivo mecanismo de ação e os efeitos tóxicos. Trabalho recente⁵⁷ com diamidinas identificou duas delas (compostos 17 e 18) com atividade promissora e baixa toxicidade, sendo o derivado (17) o mais ativo deles.

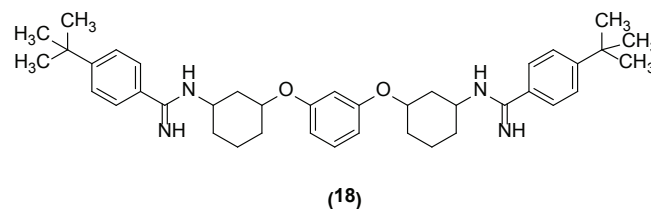
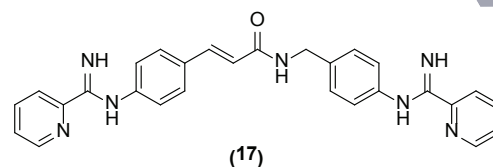


Figura 9. Diamidinas com atividade tripanomicida promissora.

Compostos derivados da Bioinorgânica também fazem parte do universo de contribuições da Química Medicinal no País. Nessa direção, Silva e colaboradores⁵⁸ sintetizaram e ensaiaram complexos de rutênio com doadores de óxido nítrico identificando compostos promissores, como os derivados (19-20) (Figura 10). Tais complexos mostraram atividade in vivo, sendo um dos mecanismos propostos a S-nitrosilação da Cys 166 do sítio ativo da GAPDH. Inibição da tripanotona redutase e da cruzaina também são cogitados e necessitam elucidação.

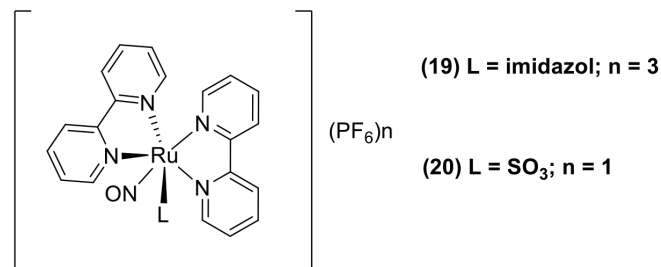


Figura 10. Complexos de rutênio com atividade in vivo. L-ligante.

Patente de farmacóforo de cruzaina para ligação covalente de inibidores foi solicitada, em 2008, por Amaral, Malvezzi e Rezende. Tal farmacóforo (Figura 11), aplicado em triagem virtual,⁵⁹ selecionou o inibidor (21).

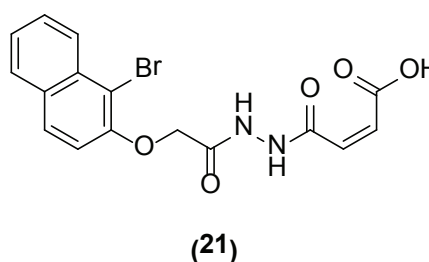


Figura 11. Farmacóforo de cruzaina – modelo de ligação covalente.

Chalconas (22) e N-acilidrazonas (23), sintetizadas por Borchhardt e colaboradores, em uma parceria entre a Universidade de São Paulo e a Universidade Federal de Santa Catarina, mostraram-se ativas como inibidores da cruzaiína⁶⁰ (Figura 12), com IC₅₀ na faixa de 20 a 60 µM, o que as torna compostos promissores para o prosseguimento dos trabalhos de busca de compostos líderes para a doença de Chagas.

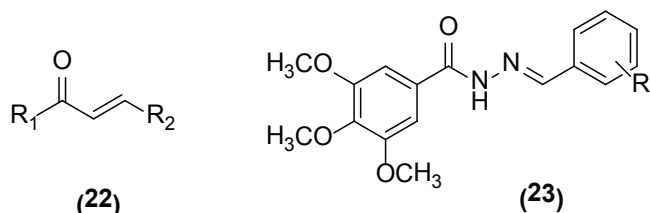


Figura 12. Chalconas e N-acilidrazonas inibidoras de cruzaiína.

Nitrocompostos despertam interesse também por parte dos grupos de pesquisadores brasileiros. Diferentes classes desses compostos foram sintetizadas e vêm sendo estudadas sob diferentes aspectos pelo grupo de Tavares,^{61,62} em razão de sua atividade tripanomicida promissora (Figura 13). Entre os derivados 3-acetil-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol substituídos em 2 e 5 (24)⁶¹ foram ensaiados em epimastigotas da cepa Y, o derivado (23) mostrou-se o mais ativo, com IC₅₀ de 7,91 µM.

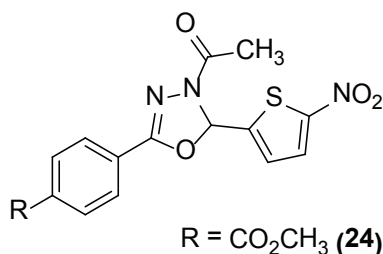


Figura 13. Nitrocompostos de atividade tripanomicida potencial. Boechat e colaboradores também sintetizaram e ensaiaram derivados nitro-heterocíclicos como tripanocidas potenciais.^{63,64} Entre os nitroimidazóis sintetizados, o derivado 5-N-(1-pirazolil)1-metil-4-nitroimidazol (25) (Figura 14) inibiu 100% dos parasitas na concentração de 0,3 mg/mL.

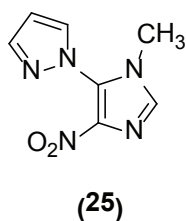


Figura 14. Nitroimidazóis de atividade tripanomicida promissora.

A lapachona (26) constitui-se em naftoquinona natural e apresenta atividade tripanomicida e alta toxicidade.⁶⁵ Com o objetivo de obter derivados mais potentes e menos tóxicos, modificações moleculares em diferentes partes da estrutura foram desenvolvidas pelo grupo do Dr. Vitor Ferreira.⁶⁶ Tais modificações incluem alterações no anel oxirano, nas carbonilas, no centro redox, entre outras, e os derivados obtidos se constituem em prováveis protótipos para o desenvolvimento de estudos complementares *in vitro* e *in vivo* (Figura 15). O composto mais potente, que incluiu modificação da carbonila, foi o derivado (27), que apresentou IC₅₀ de 1,3 µM. Por outro lado, o mais potente da série de 16 análogos sintetizados, com modificações no anel oxirânico (28) foi o derivado (29).

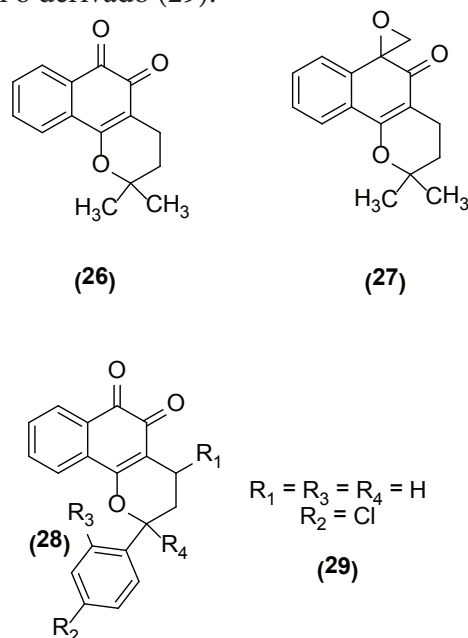


Figura 15. Lapachona (26) e seus derivados obtidos de modificação molecular.

Outros compostos de origem natural e seus derivados constituem-se em fonte de novos protótipos para a doença de Chagas.⁶⁷ A cubebina (30), por exemplo, e seus derivados semissintéticos hinoquinina (31) e dinitroinoquinina (32)^{68,69} (Figura 16) mostraram atividade tripanomicida, sendo a primeira considerada candidato potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contra a parasitose. Os três compostos interferiram no processo de trans-splicing de RNA dos parasitos.⁷⁰

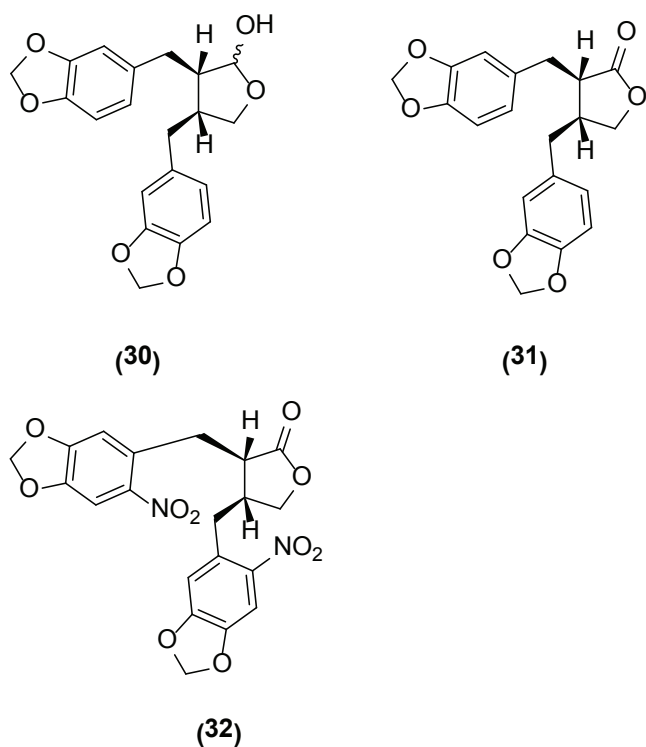


Figura 16. Cubebina (30) e derivados semissintéticos.

Entre outras contribuições de grupos brasileiros que militam na área de Química Medicinal voltada para as doenças negligenciadas, pode-se citar o estudo com outro alvo, como a trans-sialidase de *T. cruzi*.⁷¹ Biblioteca de compostos glicosídicos 1,2,3-triazólicos dos tipos (33) e (34), sintetizados por click chemistry são potencialmente protótipos para modificações moleculares com vistas a aumentar a atividade tripanomicida que apresentam (Figura 17). O composto (33a) foi o mais ativo da série, constituindo-se em candidato para estudos adicionais.

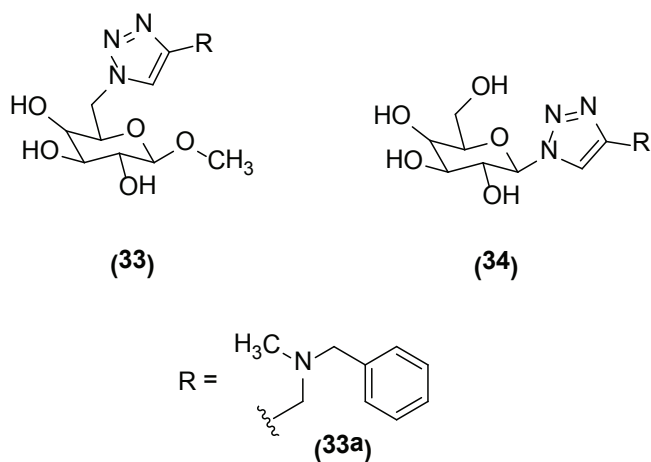


Figura 17. Compostos glicosídicos 1,2,3-triazólicos de ação em trans-sialidase de *T. cruzi*.

Série de benzilideno-carboiidrazidas do ácido 2-fenil-3-(1-fenil-1H-pirazol-4-il)acrílico (35) fo-

ram sintetizadas, ensaiadas *in vitro* e estudadas por 4D-QSAR por Vera-DiVaio e colaboradores.⁷² Dos compostos sintetizados, o derivado (35a) mostrou-se o mais promissor, candidato a composto líder, com alta potência e baixa toxicidade (Figura 18).

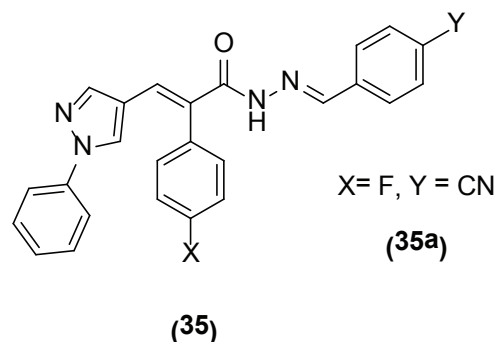


Figura 18. Candidato a composto líder da série das benzilideno-carboiidrazidas.

2.3.2.1 - CONTRIBUIÇÕES DO LABORATÓRIO DE PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE QUIMIOTERÁPICOS POTENCIALMENTE ATIVOS EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, LAPEN, FCF, USP

O grupo do LAPEN, coordenado pela Dra. Elizabeth Igne Ferreira, dedica-se ao planejamento e síntese de quimioterápicos potenciais contra doenças negligenciadas, entre elas, a doença de Chagas. O método mais utilizado pelo grupo é o processo de modificação molecular conhecido como latenciação^{73,74} e as formas latentes mais estudadas são os pró-fármacos clássicos, recíprocos e fármacos dirigidos. Processos de modelagem molecular complementam os trabalhos e estudos de QSAR são desenvolvidos com outros tipos de processos. Algumas das pesquisas no campo dos agentes tripanomicidas desenvolvidos pelo Laboratório e colaboradores encontram-se a seguir.

Iniciado no princípio da década de 1990, os trabalhos com compostos potenciais para a doença de Chagas, com a parceria de número significativo de colaboradores da USP e de outras Universidades, nacionais e estrangeiras, deram origem a diversos compostos interessantes, dentre eles o hidroximetilnitrofuril (NFOH) (36), o mais promissor.^{75,76} Intermediário de síntese de pró-fármacos recíprocos dipeptídicos de nitrofuril (37) e primaquina (38), um dos exemplos o derivado de Lys-Arg (39), o mais ativo (Figura 19),⁷⁷ esse derivado deu origem a trabalhos multidisciplinares com o intuito de

explicar a baixa toxicidade em relação ao protótipo e a alta eficácia, comparativamente ao fármaco de partida.^{78,79} O planejamento dos pró-fármacos recíprocos mencionados⁷⁵ teve como objetivo obter mecanismo múltiplo de ação, ou seja, inibição da tripanotona, pelo nitro-heterociclo,³¹ formação de radicais

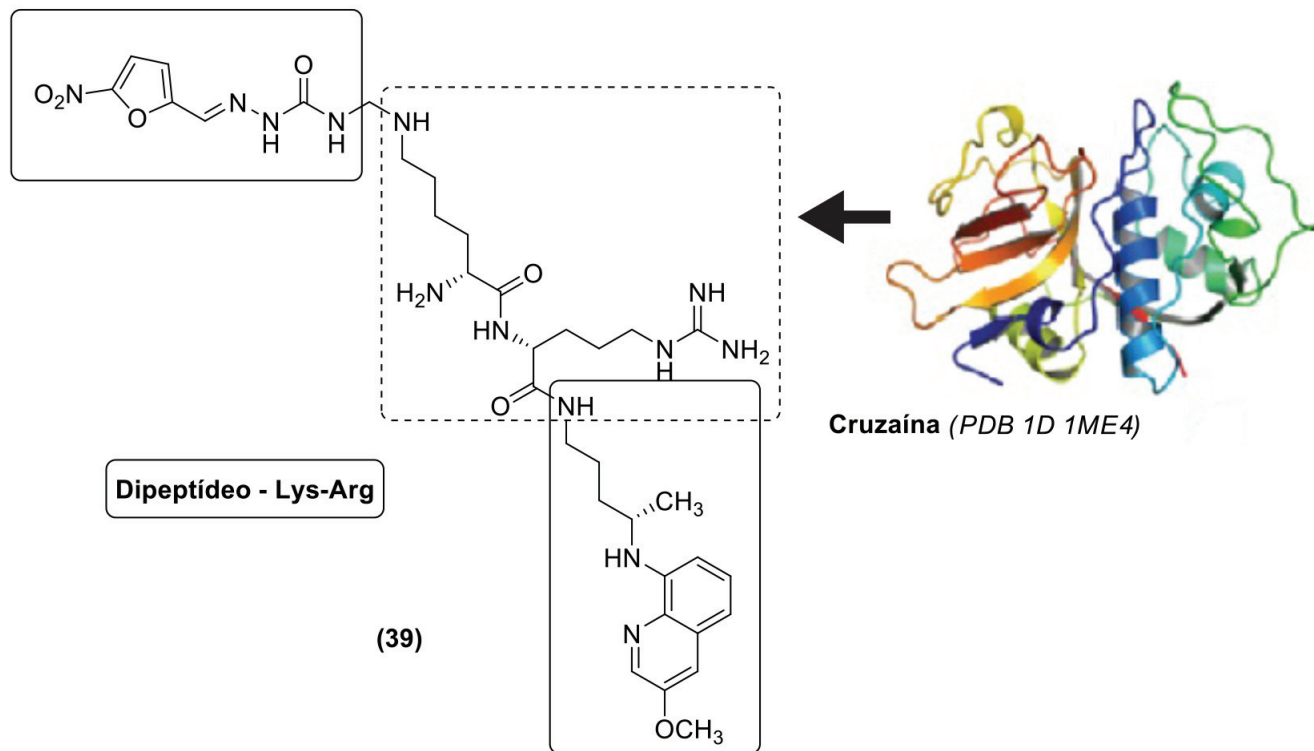


Figura 19. Pró-fármacos recíprocos de compostos 36 de 38, utilizando espaçantes peptídicos, no caso, Lys-Arg, para cisão específica pela cruzaina.

É importante mencionar que os pró-fármacos dipeptídicos da primaquina (40-42) e a aminoacilprimaquinas, dentre elas a Arg-PQ (42), também intermediários de síntese, mostraram-se ativos em tripomastigotas e em amastigotas (Figura 20).⁷⁷ A modelagem molecular efetuada com tais compostos sugeriu a especificidade da cruzaina pelos derivados e confirmou a maior atividade do derivado Lys-Arg-primaquina.

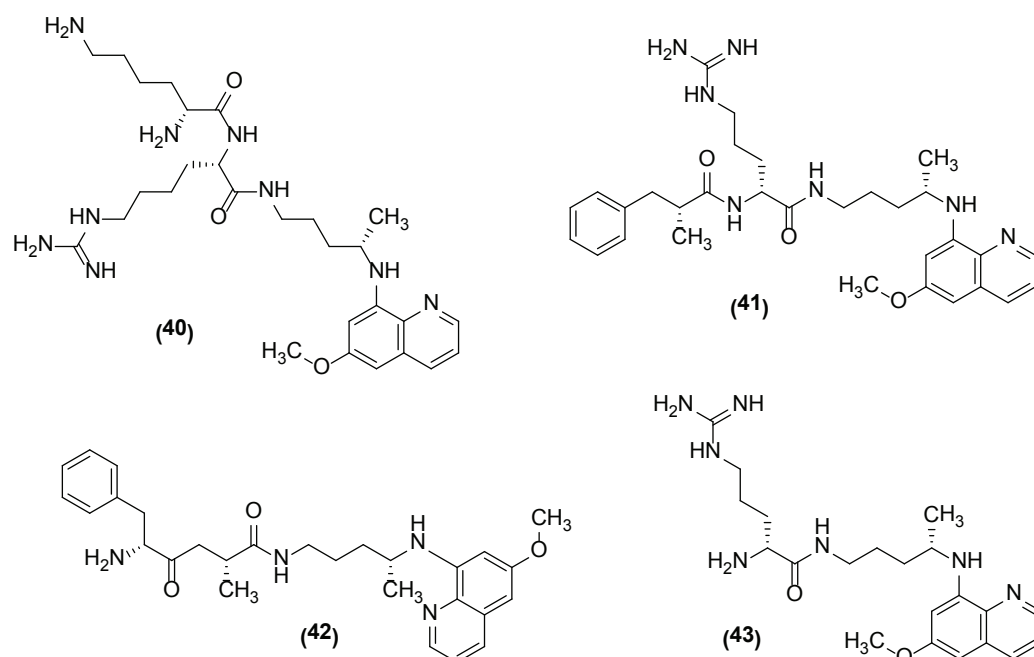


Figura 20. Derivados peptídicos de primaquina de ação tripanomicida.

O intuito de otimizar a síntese do composto 36 para o prosseguimento das pesquisas em torno desse derivado conduziu ao planejamento fatorial 3^2 , que permitiu o aumento do rendimento de 59% para próximo a 85%.⁸³

Estudos de cinética enzimática desenvolvidos com o composto 36, comparativamente ao nitrofurural, mostraram que ambos os compostos inibem a cruzaina.⁸⁴ A modelagem molecular a partir da estrutura cristalográfica desse derivado,⁸⁵ indicou, por sua vez, que a carbonila do composto 36 como mais disponível para o ataque nucleofílico da Cys25 da cruzaina e confirmou o potencial de formação de ânion nitro radical. Dessa forma, o composto 36 poderia atuar por dois mecanismos: inibição de cruzaina e de tripanotona redutase. Adicionalmente, ensaios com RNAm mostraram atividade desse composto no processamento desse ácido nucléico, embora não tenha sido observada ação completa na reação de trans-splicing.⁸⁶ A atividade foi maior no composto 36 do que no seu protótipo.

Métodos eletroquímicos também foram empregados para o estudo da formação do ânion nitro radical pelo composto 36,^{87,88} e indicaram que essa capacidade é igual para o pró-fármaco e seu protótipo. Esses estudos foram estendidos para derivados bioisostéricos do composto 36 (compostos 44-46), comparativamente aos derivados bioisostéricos do protótipo NF (compostos 47-49) (Figura 21), sintetizados por Trossini em sua tese de doutorado.⁸⁹ A Figura 21 mostra tais derivados.

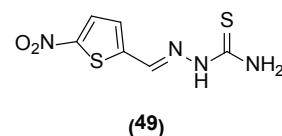
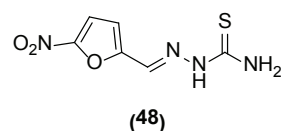
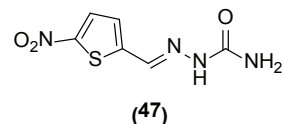
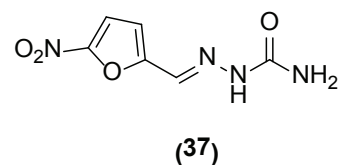
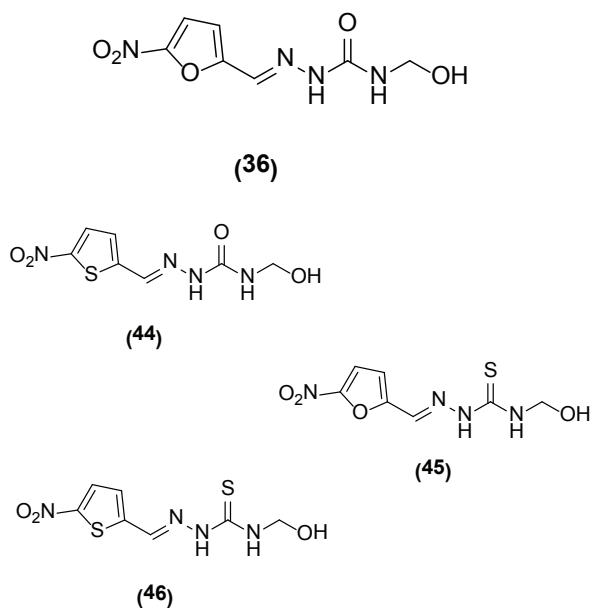


Figura 21. Derivados bioisostéricos de NFOH e de NF, potencialmente ativos contra o T. cruzi.

Tais bioisósteros, sintetizados com o propósito de estudar a influência do anel (furânico ou tiofênico) e do grupo da cadeia lateral (semicarbazona e tiosemicarbazona),⁸⁹ se mostraram ativos na inibição à cruzaina. Os IC₅₀ determinados permitiram concluir que os derivados bioisostéricos do composto 37 foram mais ativos que o protótipo enquanto que dois dos três derivados correspondentes ao composto 36 se apresentaram mais ativos e um deles de atividade praticamente igual à do composto 36. Esses mesmos derivados bioisostéricos foram objeto de estudo para a agregação de grupos doadores de óxido nítrico (NO), na forma dos pró-fármacos ésteres nitrato correspondentes.⁹⁰ O óxido nítrico apresenta atividade tripanomicida, entre outras atividades,⁹¹ e o propósito foi, dessa forma, obter compostos de mecanismos de ação mistos, aumentando, assim, a eficácia do produto obtido.

Compostos com modificações bioisostéricas no anel -- derivados imidazólicos e triazólicos correspondentes -- foram alvo de síntese,⁹² mas os derivados propostos possuíam como objetivo outro enzima, a 14 OH-colesterol desmetilase.

Ainda com relação ao composto 36, ensaios in vivo em modelo murino, comprovaram sua atividade e a DL₅₀ de 2 g/kg de peso.⁷⁹ Tais fatos respondem pelo caráter altamente promissor desse composto como candidato a fármaco.

As características atraentes para um composto de

POLÍMEROS DIRIGIDOS FORMADORES DE MICELAS

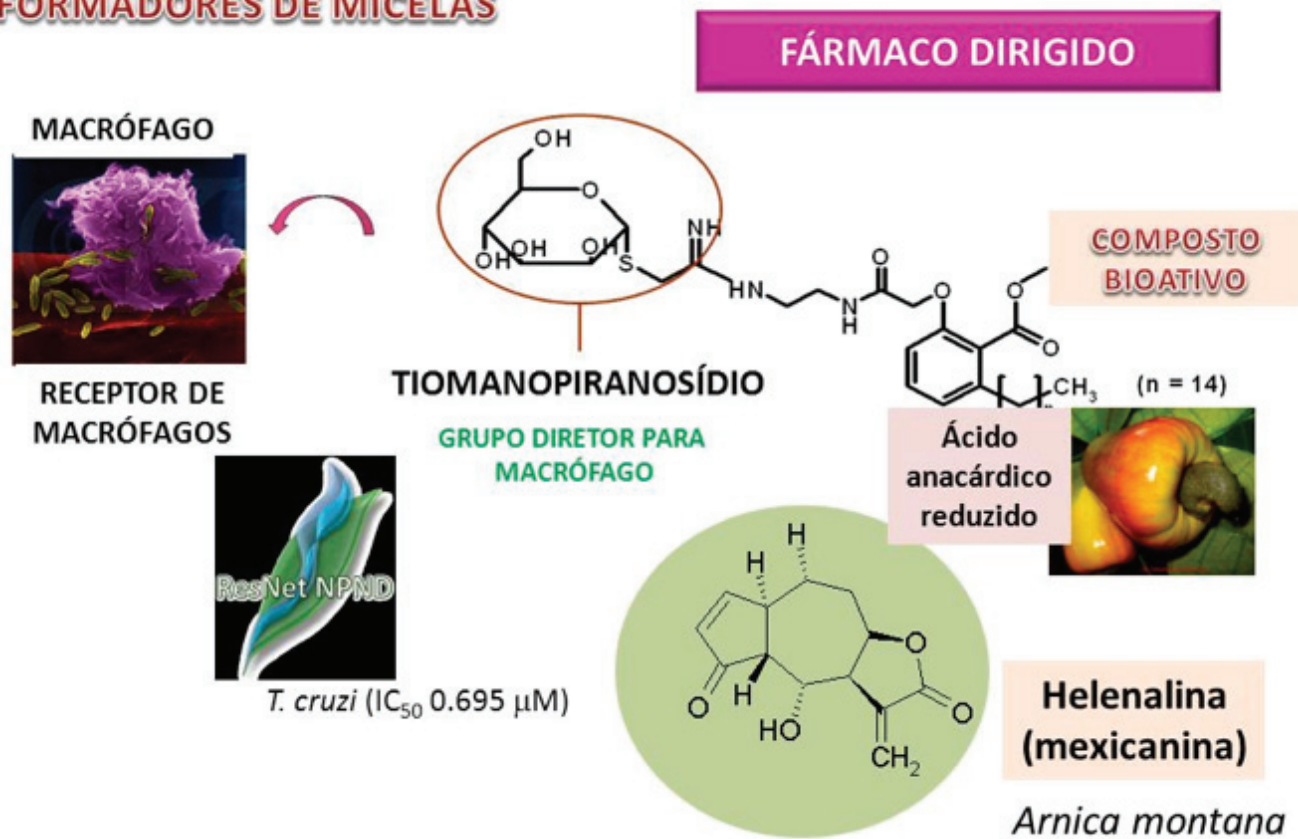


Figura 23. Fármacos dirigidos formadores de micelas com helenalina e mexicanina e composto 36, utilizando ácido anacárdico reduzido como transportador e tiomanopiranosídeo, como grupo diretor da ação a macrófagos.

Também com o objetivo de se obter fármacos dirigidos do composto 36 para liberação no interior de macrófagos, dissertação de mestrado compreende a síntese de derivados de manana, polímero de manose, com esse derivado hidroximetilado. O próprio transportador, portanto, leva intrinsecamente o grupo diretor manose.¹⁰⁸

Os interesses pelo composto 36, em razão de suas características anteriormente mencionadas de alta atividade, baixa toxicidade e baixa solubilidade aquosa motivaram a extensão da área de planejamento para outras áreas de estudo, como a de formulações. Derivados de ciclodextrina mostraram-se mais solúveis e menos tóxicos que o composto bioativo.^{109,110,111,112,113}

Tais estudos e outros que se encontram em desenvolvimento com o composto 36, bem como as parcerias estabelecidas permitiram a criação de verdadeira rede de contribuições, que se encontra resumida à Figura 24



Figura 24. Rede de estudos e colaborações criada pelo composto 36 (NFOH) (Der. LAPEN)

Outros compostos nitro-heterocíclicos, como hidrazidas benzilidênicas derivadas de anel furânico e tiofênico, (50, 51, 51a-51d) bem como chalconas (52, 52a-52f) (Figura 25), que se mostraram potencialmente leishmanicidas, apresentaram atividade inibitória em ensaios *in vitro* com cruzaina de *T. cruzi*, com IC₅₀ na faixa de 0,19 a >100 μM e 0,29 a >100 μM , respectivamente. Estudos em cultura do parasito serão realizados proximamente.

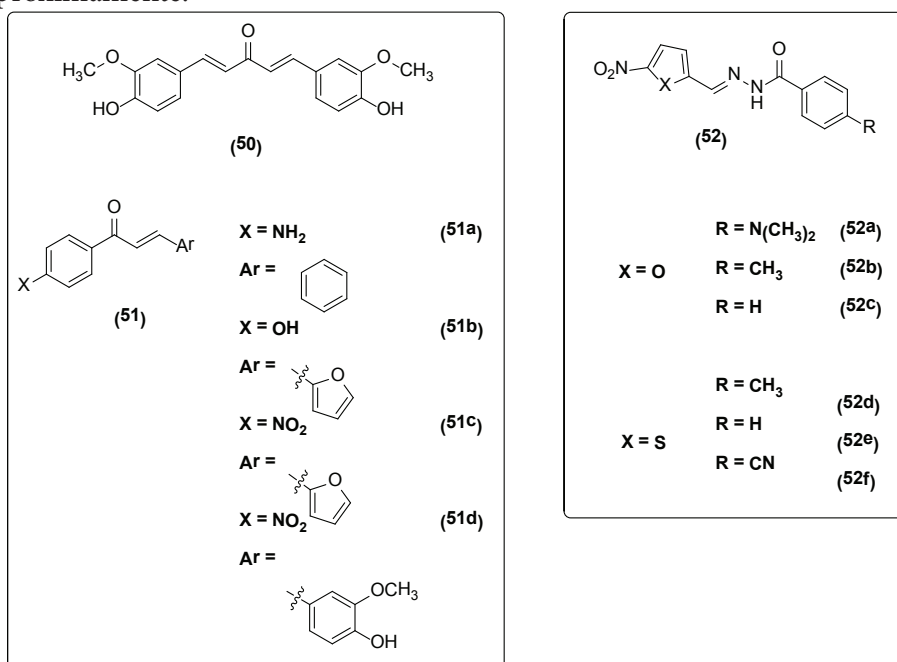


Figura 25. Hidrazidas benzilidênicas e chalconas como inibidores de cruzaina.

Também com o objetivo de compreender mais sobre a atividade inibitória de (tio)semicarbazonas na cruzaina, Trossini e colaboradores¹¹⁷ realizaram estudos de docking e de QSAR 3D, utilizando CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) e CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis), aplicada a duas séries (53, 54), compreendendo 55 derivados (Figura 26). As atividades foram determinadas, em IC_{50} , por Du e colaboradores.¹¹⁸ Os modelos robustos obtidos permitiram a identificação de propriedades eletrostáticas, estéricas e hidrofóbicas, além das ligações de hidrogênio com a enzima, envolvidas na atividade inibitória desses derivados, importantes para dirigir a síntese de derivados mais potentes dessas séries. Ademais, o estudo integrado com o docking, utilizando a estrutura cristalográfica da proteína, constituiu-se em essência para o planejamento tipo SBDD.

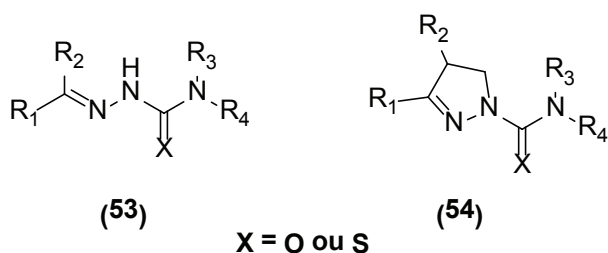


Figura 26. Tio(semicarbazonas) inibidoras de cruzaina.

A triagem virtual de bibliotecas de compostos químicos de várias classes estruturais tem despertado interesse cada vez maior por parte de pesquisadores na área de planejamento de novos fármacos.¹¹⁹ Utilizando a base Chemdiv, com 700.000 compostos, a triagem virtual baseada em farmacóforos da cruzaina selecionou 20 compostos, 11 dos quais disponíveis comercialmente.¹²⁰ Ensaíados em cruzaina *in vitro*, alguns dos compostos apresentaram IC_{50} da ordem de nM,¹²¹ o que leva à necessidade do ensaio em culturas de parasitos, a ser realizado. A Figura 27 mostra dois dos compostos selecionados e as respectivas curvas de inibição de cruzaina.

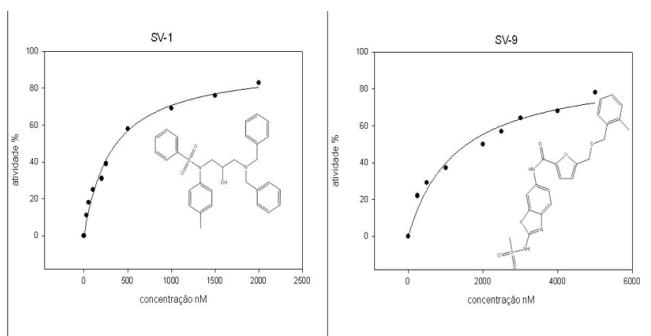


Figura 27. Inibidores de cruzaina selecionados por triagem virtual e as respectivas curvas de inibição da cruzaina.

O interesse por fontes naturais de compostos potencialmente tripanomicidas conduziu ao estudo quimiométrico utilizando o programa VolSurf de série de 40 derivados de origem natural de atividade inibitória em NADH-oxidase de plasmódios utilizando PCA (Principal Component Analysis), CPCA (Consensus PCA) e PLS (Partial Least Square).¹²² Os resultados apontam para a relevância do perfil hidrofóbico à atividade biológica estudada.

O LAPEN prossegue, por meio de técnicas clássicas e avançadas, na busca por compostos líderes e candidatos tripanomicidas, na tentativa de contribuir para o tratamento da doença de Chagas.

2.4 - MOTIVAÇÃO PARA A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Introduzir um novo fármaco na terapêutica é tarefa cada vez mais árdua. Desde a descoberta de novas moléculas até o seu lançamento na terapêutica consomem-se de 10 a 12 anos e, em torno de 1 bilhão de dólares.¹²⁴ A etapa mais onerosa é a que compreende os ensaios clínicos.

Apesar do investimento em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) ser cada vez mais alto, face às exigências cada vez maiores para que um novo composto chegue à terapêutica, sobretudo em razão da toxicidade, a taxa de insucesso é significativa.¹²⁵ Os ensaios pré-clínicos e especialmente os ensaios clínicos são barreiras que contribuem para tal insucesso. Por exemplo, dos fármacos que entram em ensaios clínicos nos Estados Unidos, apenas 20% são aprovados.¹²⁶ Essa porcentagem depende da classe de fármaco em desenvolvimento, sendo os agentes para problemas gastrintestinais e de metabolismo os que apresentam as menores taxas de sucesso. Dessa forma, o número de novos compostos vem caindo, dependendo da região considerada a intensidade da queda. É interessante, no entanto, que países emergentes registram situação oposta, com crescimento substantivo ao longo do tempo. Assim é que levantamento de 20 anos, compreendendo o período de 1989 a 2008, mostra diminuição expressiva de novos compostos químicos ou biológicos na Europa, no Japão, certa estabilidade em baixa, nos Estados Unidos, e, ao mesmo tempo, crescimento em países emergentes.¹²⁷

Considerando-se esse cenário, é de se deduzir a redução drástica das pesquisas de novos fármacos no plano das doenças negligenciadas. Merece realçar que, por definição, esse tipo de doença envolve as regiões mais pobres do planeta e, por essa razão, não há interesse por parte das indústrias em desenvolver alternativas terapêuticas para as mesmas.¹²⁸

No entanto, a indústria farmacêutica no plano mundial vem, gradualmente, mudando o seu paradigma – a inovação aberta ou open innovation¹²⁹ é importante sinal dessa mudança --, sensibilizando-se para a necessidade premente de se introduzir novos fármacos para as doenças negligenciadas. Apesar desse fato, a área ainda necessita de mais investimentos. É importante ressaltar que, em 2008, o Brasil ficou em sexta posição em investimentos em doenças negligenciadas. EUA ficou em primeiro lugar, com US\$ 1,2 bilhão (70%), seguidos pela União Europeia como um todo, e Inglaterra, Holanda, Irlanda, respectivamente. O Brasil investiu US\$ 21,9 milhões (1,24%).¹³⁰ Tais doenças carecem de atenção e de apoio substancial por parte da academia e do segmento produtivo.¹³¹

Para o representante da DNDi, o Brasil se destaca no cenário internacional: “é o sexto no mundo em investimentos em pesquisa de doenças negligenciadas e o primeiro dentre os países em desenvolvimento”. Há grande lacuna translacional de inovação no caso de doenças negligenciadas,¹³² que estão diretamente relacionadas com o aumento dos investimentos no desenvolvimento de novos fármacos e reduzido potencial lucrativo. Estes fatores conduzem a taxa de sobrevivência expressivamente reduzida de programas de P&D²⁴. A passagem de compostos ativos para líderes, a otimização desses líderes até o início dos ensaios clínicos é acompanhada de taxa de insucesso significativa. Merece realce a área de novos agentes tripanomicidas, em que já se parte de número reduzido de programas dedicados a essa busca.

A parceria entre a academia e a indústria farmacêutica integra a open innovation e a estratégia inovadora, preconizada para a descoberta de novos líderes para doenças negligenciada. Tal estratégia se apoia em redes de pesquisa nos diferentes segmentos que compõem a busca por protótipos com potencial para se tornarem fármacos. Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde vem adotando a prática de buscar entre os pesquisadores dos paí-

ses acometidos por doenças negligenciadas aqueles que podem integrar as redes que compõem a estratégia inovadora mencionada. Como exemplo, a rede de Química Medicinal para agentes tripanomicidas tem como laboratório de referência o coordenado pelo Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.¹³⁴

Algumas iniciativas como o Programa Prospecta lançado por indústrias farmacêuticas, como a Sanofi-Aventis e a GlaxoSmithKline, por meio da Fundação Biominas Brasil consideraram entre outras classes terapêuticas de interesse, a busca por moléculas bioativas para doenças negligenciadas. Tais iniciativas merecem ser saudadas, assim como aquelas permanentes, capitaneadas pela DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative)¹³⁵, que apoia projetos para doença de Chagas, malária e leishmaniose visceral e cutânea, e pela Organização Mundial da Saúde, como a Medicines for Malaria Ventures,¹¹⁶ ambas com a parceria de indústrias transnacionais.

Considera-se que a introdução de novos fármacos para doenças negligenciadas, incluindo as extremamente negligenciadas como a doença de Chagas, depende do funcionamento pleno de uma engrenagem (Figura 28). Esta envolve a academia, representada pelas universidades e institutos de pesquisa, destacando-se entre eles Farmanguinhos, apoiados por órgãos governamentais e agências de fomento, e as indústrias farmacêuticas, com o concurso de fundações ou organismos como, por exemplo, a Biominas Brasil, anteriormente mencionada.

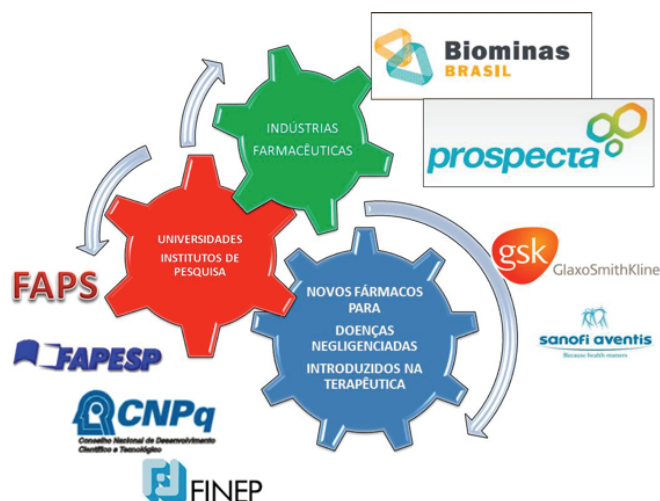


Figura 28. Parcerias que formam a engrenagem para a introdução de novos fármacos para doenças negligenciadas.

Cumpra-se destacar que a indústria nacional tem o seu papel nessa engrenagem, que merece ser azeitada pela maior aproximação com grupos que desenvolvem pesquisa na área. Além disso, merece realçar a importância da participação de outros Institutos de Pesquisa oficiais, financiados pelo governo, tendo-se em vista que as doenças negligenciadas que acometem o País são gerenciadas por órgãos da Saúde, com os quais tais instituições devem estar intimamente ligadas.

3 - PERSPECTIVAS

Embora o panorama com relação à pesquisa de novos fármacos contra doenças negligenciadas em geral, venha se modificando gradualmente, ainda há necessidade de se enfrentar os desafios mencionados. As grandes lacunas translacionais para a inovação ainda comprometem o desenvolvimento de novos fármacos como os agentes tripanomicidas, sendo responsáveis pela baixa taxa de sobrevivência dos projetos que se iniciam na área. Esse cenário é estendido para outras doenças negligenciadas como tripanossomíase africana humana, leishmaniose, malária, helmintíases e tuberculose, dentre outras.

É fundamental que se estreitem os laços entre a academia, representada, basicamente, por Institutos de pesquisa e Universidades, e o setor privado. Em razão de que esses dois segmentos desenvolvem pesquisas complementares¹³⁶ é possível racionalizar o investimento de recursos e vencer o desafio do aprimoramento da pesquisa translacional, o que conduzirá a maior sucesso na inovação na área.

A mudança gradual de paradigma, inovações científicas e tecnológicas que refletiram em processos modernos de P&D, resultaram no aumento do investimento e interesse na área de doenças negligenciadas^{24,137} não só por parte de indústrias transnacionais por meio da open innovation buscando parcerias com a academia, mas também por parte de órgãos governamentais de fomento, levando a perspectivas maiores nesse início de século.

No Brasil, é preciso estimular a indústria nacional para que invista significativamente na área, em conjunto com as grandes universidades, sobretudo as públicas, que desenvolvem pesquisa de qualidade.

Espera-se que a sensibilidade ante o fato de que de nada adianta haver ilhas de riqueza no mundo em meio a grandes continentes de pobreza, de alta morbidade e mortalidade causadas por doenças negligenciadas, entre outras, seja a mola propulsora para que se tenham alternativas quimioterápicas realmente eficazes para essas doenças, incluindo novos e melhores agentes tripanomicidas.

Enfrentando os desafios que se interpuseram até o momento para que o cenário com relação à busca de novos agentes tripanomicidas,¹³⁸ será possível reverter o cenário de uma doença que se perpetua há mais de um século, desde a sua descoberta por Carlos Chagas.

As palavras do poeta sevilhano, Antonio Machado, “Caminhante, não há caminho! Se faz caminho ao andar”, nos estimulam a enfrentar esses desafios e construir o caminho na direção de melhores condições de saúde para que não tenhamos mais populações “negligenciadas”.

4 - AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP, pelas bolsas de estudo e, especialmente, pelo apoio ao projeto temático “Antichagásicos potenciais derivados de compostos nitro-heterocíclicos”, processo 2001/01192-3; à CAPES, pelas bolsas de estudo e ao CNPq, pelos auxílios e pelas bolsas de estudo, incluindo a Bolsa de Produtividade em Pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹WHO. First report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: WHO, 2010.

²DNDi. Diseases and Projects. Disponível em: <<http://www.dndi.org>>. Acesso em: 20 dez 2011.

³Hotez, P. J.; Fenwick, A.; Savioli, L.; Molyneux, D. H. Lancet 2009, 373, 1570.

⁴PAYNE, L.; FITCHETT, J.R. Trends Parasitol. 2010, 26, 421.

⁵WHO Technical Report Series. Research priorities for Chagas disease, human african trypanosomiasis

and leishmaniasis. Genova: WHO, 2012.

⁶Chagas. Global view. Disponível em: <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html>
Acesso em: 15 jan 2013.

⁷Clayton, J., Nature 2010, 465, s4.

⁸França, C. F. C.; Andrejus Korolkovas Dicionário Terapêutico Guanabara, 2010/2011 ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.

⁹Ministério da Saúde. Brasil dobrará produção de remédios contra mal de Chagas para atender outros países, 2011. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2011/10/19/brasil-dobrar-a-producao-de-medicamento-contra-chagas>
Acesso em: 15 jan 2013.

¹⁰Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. Pure Appl. Chem. 1998, 70, 1129.

¹¹Diretório de Grupos de Pesquisa CNPq. Disponível em: www.cnpq.br. Acesso em: 16 jan 2013.

¹²Vanderelst, D.; Speybroeck, N. PLoS Negl. Trop. Dis. 2010, 4, e576.

¹³Web of Science. Disponível em: apps.webofknowledge.com Acesso em 16 jan 2013.

¹⁴Pubmed. Disponível em: WWW.pubmed.com
Acesso em: 16 jan 2013.

¹⁵Hopkins, A. L.; Groom, C. R. Nat. Rev. Drug Discov. 2002, 1, 727.

¹⁶Kubinyi, H. Nat. Rev. Drug Discov. 2003, 2, 665.

¹⁷Brown, D. Drug Discov. Today 2007, 12, 1007.

¹⁸Cavalli, A.; Bolognesi, M. L. J. Med. Chem. 2009, 52, 7339.

¹⁹Zingales, B.; Colli, W. Curr. Top. Microbiol. Immunobiol. 1985, 117, 129.

²⁰Alves, M. J. M.; Mortara, R. A. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2009, 104(Suppl. I), 76.

²¹Zingales, B.; Rondinelli, E.; Degrave, W.; Da Silveira, J. F.; Levin, M.; Le Paslier, D.; Modabber, F;

Dobrokhotov, B.; Swindle, J.; Kelly, J. M.; Aslund, L.; Hoheisel, J. D.; Ruiz, A. M.; Cazzulo, J. J.; Pettersson, U.; Frasc, A. C. Parasitol. Today 1997, 13, 16.

²²Duschak, V. G.; Couto, A. S. Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc. 2007, 2, 19.

²³Szöör, B. Mol. Biochem. Parasitol. 2010, 173, 53.

²⁴Dias, L. C.; Dessoy, M. A.; Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Quim. Nova 2009, 32, 2444.

²⁵Lepesheva, G. I.; Waterman, M. R. Curr. Top. Med. Chem. 2011, 11, 2060.

²⁶Inaoka, D. K.; Sakamoto, K.; Shimizu, H.; Shiba, T.; Kurisu, G.; Nara, T.; Aoki, T.; Kita, K.; Harada, S. Biochemistry 2008, 47, 10881

²⁷Coura, J. R.; Castro, S. L. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2002, 97, 3.

²⁸Reguera, R. M.; Redondo, C. M.; De Prado, G.; Pérez-Pertejo, Y.; Balaña-Fouce, R. Biochim. Biophys. Acta 2006, 1759, 117.

²⁹Jacobs, R.T.; Ding, C. Annu Rep Med Chem 2010, 45, 277.

³⁰McKerrow, J. H.; McGrath, M. E.; Engel, J. C. Parasitol. Today 1995, 11, 279.

³¹Fairlamb, A. H. Medicina 1999, 59(Supl. II), 179.

³²Tempone, A.G.; Sartorelli, P.; Mady, C.; Fernandes, F. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem 2007, 5, 222.

³³Souza, D. H. F.; Garratt, R. C.; Araújo, A. P. U.; Guimarães, B. G.; Jesus, W. D. P.; Michels, P. A. M.; Hannaert, V.; Oliva, G. FEBS Lett. 1998, 424, 131.

³⁴Freitas, R. F.; Prokopczyk, I. M.; Zottis, A.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; Trevisan, M. T. S.; Vilegas, W.; Silva, M. G. V.; Montanari, C. A.; Bioorg. Med. Chem. 2009, 17, 2476.

³⁵Brown, D.; Superti-Furga, G. Drug Discov. Today 2003, 8, 1067.

³⁶Ferreira, R. S.; Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. Expert Opin. Drug Discov. 2011, 6, 481.

- ³⁷Guido, R. V. C.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Curr. Med. Chem.* 2008, 15, 37.
- ³⁸Armstrong, J. W. *Combinatorial Chemistry Review* 1999, 26.
- ³⁹Swinney, D. C.; Anthony, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011, 10, 507.
- ⁴⁰Ekins, S.; Williams, A. J.; Krasowski, M. D.; Freundlich, J. S. *Drug Discov. Today* 2011, 16, 298.
- ⁴¹DNDI América Latina. Portfólio de Projetos-2011. Disponível em <http://www.dndi.org.br/pt/portfolio.html>. Acesso em: 16 jan 2013.
- ⁴²Eakin, A. E.; Mills, A. A.; Harth, G.; McKerrow, J. H.; Craik, C. S. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 7411.
- ⁴³Cerecetto, H.; González, M. *Mini Rev. Med. Chem.* 2008, 8, 1355.
- ⁴⁴Caputto, M. E.; Fabian, L. E.; Benítez, D.; Merlino, A.; Ríos, N.; Cerecetto, H.; Moltrasio, G. Y.; Moglioni, A. G.; González, M.; Finkielstein, L. M. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 6818.
- ⁴⁵Chung, M. C.; Ferreira, E. I.; Santos, J. L.; Giarolla, J.; Rando, D. G.; Almeida, A. E.; Bosquesi, P. L.; Menezon, R. F.; Blau, L. *Molecules*, 2008, 13, 616.
- ⁴⁶Elizondo, S.; Chena, M. A.; Rodríguez-Páez, L.; Nogueira, B.; Baeza, I.; Wong, C. J. *Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2003, 18, 265.
- ⁴⁷Viegas Jr., C.; Bolzani, V. S. Barreiro, E. J. *Quim. Nova* 2006, 29, 326.
- ⁴⁸Uchiyama, N. *J. Health Sci.* 2009, 55, 31.
- ⁴⁹Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T.J.; Tosun, F.; Rüedi, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50, 1352.
- ⁵⁰Cavalli, A.; Lizzi, F.; Bongarzone, S.; Belluti, F.; Piazzini, L.; Bolognesi, M. L. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010, 58, 51.
- ⁵¹Souza, D. H. F.; Garratt, R. C.; Araujo, A. P. U.; Guimarães, B. G.; Jesus, W. D. P.; Michels, P. A. M.; Hannaert, V.; Oliva, G. *FEBBS Lett.* 1998, 424, 131.
- ⁵²Freitas, R. F.; Prokopczyk, I. M.; Zottis, A.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; Trevisan, M. T. S.; Vilegas, W.; Silva, M. G. V.; Montanari, C. A. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 2476.
- ⁵³Ferreira, R. S.; Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. *Expert Opin Drug Discov* 2011, 6, 481.
- ⁵⁴Pereira, J. M.; Severino, R. P.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; Zottis, A.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. *Correa, A. G. Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 8889.
- ⁵⁵Dias, L. C.; Dessoy, M. A.; Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; *Quim. Nova* 2009, 32, 2444.
- ⁵⁶Soeiro, M. N. C.; De Castro, S. L. *Expert Opin. Ther. Targets* 2009, 13, 105.
- ⁵⁷De Souza, E. M.; Da Silva, P. B.; Nefertiti, A. S. G.; Ismail, M. A.; Arafa, R. K.; Tao, B.; Nixon-Smith, C. K.; Boykin, D. W.; Soeiro, M. N. C. *Exp. Parasitol.* 2011, 127, 429.
- ⁵⁸Silva, J. J. N.; Guedes, P. M. M.; Zottis, A.; Balliano, T. L.; Silva, F. O. N.; Lopes, L. G. F.; Ellena, J.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; Franco, D. W.; Silva, J. S. *Br. J. Pharmacol.* 2010, 160, 260.
- ⁵⁹Malvezzi, A.; De Rezende, L.; T-do Amaral, A. *QSAR Comb. Sci.* 2009, 28, 781.
- ⁶⁰Borchhardt, D. M.; Mascarello, A.; Chiaradia, L. D.; Nunes, R. J.; Oliva, G.; Yunes, R. A.; Andricopulo, A. D. *J. Braz. Chem. Soc.* 2010, 21, 142.
- ⁶¹Paula, F. R.; Trossini, G. H. G.; Ferreira, E. I.; Serano, S. H. P.; Menezes, C. M. S.; Tavares, L. C. J. *Braz. Chem. Soc.* 2010, 21, 740.
- ⁶²Ishii, M.; Jorge, S. D.; De Oliveira, A. A.; Palace-Berl, F.; Sonehara, I. Y.; Pasqualoto, K. F. M.; Tavares, L. C. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 6292.
- ⁶³Boechat, N.; Carvalho, A. S.; Fernandez-Ferreira, E.; Soares, R. O. A.; Souza, A. S.; Gibaldi, D.; Bozza, M.; Pinto, A. C. *Cytobios* 2001, 105, 83.
- ⁶⁴Carvalho, A. S.; Gibaldi, D.; Pinto, A. C.; Bozza, M.; Boechat, N. *Lett. Drug Des. Disc.* 2006, 3, 98.

- ⁶⁵Paulino, M.; Alvareda, E. M.; Denis, P. A.; Barreiro, E. J.; Da Silva, G. M. S.; Dubin, M.; Gastellú, C.; Aguilera, S.; Tapia, O. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, 43, 2238.
- ⁶⁶Ferreira, S. B.; Salomão, K.; Da Silva, F. C.; Pinto, A. V.; Kaiser, C. R.; Pinto, A. C.; Ferreira, V. F.; De Castro, S. L. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 3071.
- ⁶⁷Pupo, M. T.; Gallo, M. B. C.; Vieira, P. C. *Quim. Nova* 2007, 30, 1446.
- ⁶⁸Bastos, J. K.; Albuquerque, S.; Silva, M. L. A. *Planta Med.* 1999, 65, 541.
- ⁶⁹Silva, R.; Souza, G. H. B.; Silva, A. A.; Souza, V. A.; Pereira, A. C.; Royo, V. A.; Silva, M. L. A.; Donate, P. M.; Araújo, A. L. S. M.; Carvalho, J. T. C.; Bastos, J. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 1033.
- ⁷⁰Silva, M. L. A.; Cicarelli, R. M. B.; Pauletti, P. M.; Luz, P. P.; Rezende, K. C. S.; Janiário, A. H.; Silva, R.; Pereira, A. C.; Bastos, J. K.; Albuquerque, S.; Magalhães, L. G.; Cunha, W. R. *Parasitol. Res.* 2011, 109, 445.
- ⁷¹Carvalho, I.; Andrade, P.; Campo, V. L.; Guedes, P. M. M.; Sesti-Costa, R.; Silva, J. S.; Schenkman, S.; Dedola, S.; Hill, L.; Rejzek, M.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 2412.
- ⁷²Vera-DiVaio, M. A. F.; Freitas, A. C. C.; Castro, H. C.; De Albuquerque, S.; Cabral, L. M.; Rodrigues, C. R.; Albuquerque, M. G.; Martins, R. C. A.; Henriques, M. G. M. O.; Dias, L. R. S. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 295.
- ⁷³Chung, M. C.; Silva, A. T. A.; Castro, L. F.; Guido, R. V. C.; Nassute, J. C.; Ferreira, E. I.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2005, 41, 155.
- ⁷⁴Silva, A. T. A.; Chung, M. C.; Castro, L. F.; Guido, R. V. C.; Ferreira, E. I. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2005, 5, 893.
- ⁷⁵Chung, M. C. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 1996.
- ⁷⁶Chung, M. C.; Guido, R. V. C.; Martinelli, T. F.; Gonçalves, M. F.; Polli, M. C.; Botelho, K. C. A.; Varanda, E. A.; Colli, W.; Miranda, M. T. M.; Ferreira, E. I. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 4779.
- ⁷⁷Chung, M. C.; Goncalves, M. F.; Colli, W.; Ferreira, E. I.; Miranda, M. T. M. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 1127.
- ⁷⁸Grove, J. I.; Searle, P. F.; Weedon, S. J.; Green, N. K.; Mcneish, I. A.; Kerr, D. J.; Guido, R. V. C.; Ferreira, E. I.; Nassute, J. C.; Varanda, E. A.; Chung, M. C. *Rev. Ciên. Farm.* 2001, 22, 319.
- ⁷⁹Davies, C.; Cardozo, R. M.; Negrette, O. S.; Mora, M. C.; Chung, M. C.; Basombrío, M. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54, 3584.
- ⁸⁰Vale, N.; Moreira, R.; Gomes, P. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 937.
- ⁸¹Cazzulo, J.; Stoka, V.; Turk, V. *Curr. Pharm. Des.* 2001, 7, 1143.
- ⁸²Trossini, G. H. G.; Chung, M. C.; Menezes, C. M. S.; Ferreira, E. I. *Lett. Drug Design Disc.* 2010, 7, 528.
- ⁸³Trossini, G. H. G.; Giarolla, J.; De Rezende, L.; T-do Amaral, A.; Zaim, M. H.; Bruns, R. E.; Ferreira, E. I. *Lett. Org. Chem.* 2010, 7, 191.
- ⁸⁴Trossini, G. H. G.; Malvezzi, A.; T-do Amaral, A.; Rangel-Yagui, C. O.; Izidoro, M. A.; Cezari, M. H. S.; Juliano, L.; Chung, M. C.; Menezes, C. M. S.; Ferreira, E. I. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2010, 25, 62.
- ⁸⁵Doriguetto, A. C.; Silva, C. H. T. P.; Ellena, J.; Trossini, G. H. G.; Chung, M. C.; Ferreira, E. I. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* 2005, 61, o2099.
- ⁸⁶Barbosa, C. F.; Okuda, E. S.; Chung, M. C.; Ferreira, E. I.; Cicarelli, R. M. B. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007, 40, 33.
- ⁸⁷La-Scalea, M. A.; Menezes, C. M. S.; Julião, M. S.; Ferreira, E. I. *J. Braz. Chem. Soc.* 2005, 16, 774.
- ⁸⁸La-Scalea, M. A.; Trossini, G. H. G.; Menezes, C. M. S.; Ferreira, E. I. *J. Electrochem. Soc.* 2009, 156, F93.
- ⁸⁹Trossini, G. H. G. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.

- ⁹⁰Serafim, R. A. M. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.
- ⁹¹Serafim, R. A. M.; Primi, M. C.; Trossini, G. H. G.; Ferreira, E. I. *Curr. Med. Chem.* 2012, 19, 386.
- ⁹²Bigatão, H. M.; Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.
- ⁹³Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 138.
- ⁹⁴Svenson S; Tomalia D. A. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2005, 57, 2106.
- ⁹⁵Yang, H.; Kao, W. J. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2006, 17, 3.
- ⁹⁶Menjoge, A.R.; Kannan, M.; Tomalia, D.A. *Drug Discov Today* 2010, 15, 171.
- ⁹⁷Mintzer, M. A.; Grinstaff, M. W. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 173.
- ⁹⁸Liu, M.; Fréchet, J.M.J. *Designing dendrimers for drug delivery. Pharm. Sci. Technol. Today* 1999, 2, 393.
- ⁹⁹D'emanuele, A.D.; Attwood, D. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2005, 257, 2147.
- ¹⁰⁰Najlah, M.; Freeman, S.; Attwood, D.; D'emanuele, A. *Int J Pharm* 2007, 336, 183.
- ¹⁰¹Najlah, M.; Freeman, S.; Attwood, D.; D'emanuele, A. *Bioconjug. Chem.* 2007, 18; 937.
- ¹⁰²Giarolla, J.; Rando, D. G.; Pasqualoto, K. F. M.; Zaim, M. H.; Ferreira, E. I. *J. Mol. Struct. TEO-CHEM.* 2010, 939, 133.
- ¹⁰³Giarolla, J.; Pasqualoto, K. F. M.; Rando, D. G.; Zaim, M. H.; Ferreira, E. I.; *J. Mol. Model.* 2012, 18, 2257.
- ¹⁰⁴Santos, S. S.; Giarolla, J.; Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, E. I. *Mol Simul* (accepted).
- ¹⁰⁵Giarolla, J.; Ferreira, E. I. *Rev. Prop. Ind.* 2006, 51-52, 2009.
- ¹⁰⁶Santos, S. S.; Giarolla, J.; Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, E. I. *Abstracts of the 5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Ouro Preto, Brasil, 2010.*
- ¹⁰⁷Otelo, V. A.; Pasqualoto, K. F. M.; Zaim, M. H.; Rangel-Yagui, C. O.; Ferreira, E. I. *Abstracts of 241st American Chemical Society Meeting, Anaheim, Estados Unidos, 2011.*
- ¹⁰⁸Primi, M.C. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil (em andamento).
- ¹⁰⁹Grillo, R.; De Mello, N. F. S.; Moraes, C. M.; De Lima, R.; Menezes, C. M. S.; Ferreira, E. I.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 47, 295.
- ¹¹⁰De Melo, N. F. S.; Grillo, R.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 47, 865.
- ¹¹¹Grillo, R.; De Melo, N. F. S.; Moraes, C. M.; Rosa, A. H.; Roveda, J. A. F.; Menezes, C. M. S.; Ferreira, E. I.; Fraceto, L. F. *J. Biol. Phys.* 2007, 33, 445.
- ¹¹²Grillo, R.; De Melo, N. F. S.; Fraceto, L. F.; Brito, C. L.; Trossini, G. H. G.; Menezes, C. M. S.; Ferreira, E. I.; Moraes, C. M. *Quim. Nova* 2008, 31, 290.
- ¹¹³Grillo, R.; De Melo, N. F. S.; De Araújo, D. R.; Trossini, G. H. G.; Da Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C.; Fraceto, L. F. *Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2010, 66, 417.
- ¹¹⁴Rando, D. G.; Avery, M. A.; Tekwani, B. L.; Khan, S. I.; Ferreira, E. I. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 6724.
- ¹¹⁵Rando, D. G.; Giarolla, J.; Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, E. I. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2010, 46, 311.
- ¹¹⁶Leite, M.; Trossini, G. H. G.; Andricopulo, A. D.; Ferreira, E. I.; Rando, D. G. *Resumos da 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, Brasil, 2011.*
- ¹¹⁷Trossini, G. H. G.; Guido, R. V. C.; Oliva, G.; Ferreira, E. I.; Andricopulo, A. D. *J. Mol. Graph. Model.* 2009, 28, 3.
- ¹¹⁸Du, X.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; Mckerrow, J. H.; Cohen, F. E. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 2695.

- ¹¹⁹Ripphausen, P.; Nisius, B.; Peltason, L.; Bajorath, J. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 8461.
- ¹²⁰Trossini, G. H. G.; Leitão, A.; Oprea, T. I.; Andricopulo, A. D.; Ferreira, E. I. Resumos da 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil, 2010.
- ¹²¹Trossini, G. H. G.; Krogh, R.; Oprea, T. I.; Andricopulo, A. D.; Ferreira, E. I. Resumos da 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, Brasil, 2011.
- ¹²²Scotti, L.; Ferreira, E. I.; Da Silva, M. S.; Scotti, M. *T. Molecules* 2010, 15, 7363.
- ¹²³Leeson, P. D.; Empfield, J. R. *Annu. Rep. Med. Chem.* 2010, 45, 393.
- ¹²⁴DiMasi, J. A.; Grabowski, H. *Manage. Decis. Econ.* 2007, 28, 469.
- ¹²⁵Kaitin, K. I. Tufts Center for the Study of Drug Development Impact Report 2006, 8.
- ¹²⁶Cladwell, G. W.; Ritchie, D. M.; Masucci, J. A.; Hageman, W.; Yan, Z. *Curr. Top. Med. Chem.* 2001, 1, 353.
- ¹²⁷European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations. *The Pharmaceutical Industry in Figures, EFPIA: Brussels, 2009.*
- ¹²⁸Pink, R.; Hudson, A.; Mouriès, M.-A.; Bendig, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 727.
- ¹²⁹Kar, S. *Future Med. Chem.* 2010, 2, 1411.
- ¹³⁰Assad, L. *Cienc. Cult.* 2010, 62, 6.
- ¹³¹Kishore, S. P.; Tavera, G.; Hotez, P. J. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010, 4, e635.
- ¹³²Nwaka, S.; Ramirez, B.; Brun, B.; Maes, L.; Douglas, F.; Ridley, R. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009, 3, e440.
- ¹³³Nwaka, S.; Hudson, A. *Nat. Rev. Drug Disc.* 2006, 5, 941.
- ¹³⁴Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. *Estud. Av.* 2010, 24, 81.
- ¹³⁵Pécoul, B. *PLoS Med.* 2004, 1, e6.
- ¹³⁶Zerhouni, E. A. Transforming health: NIH and the Promise of Research, november 2007 (presentation). Disponível em http://www.innovation.org/index.cfm/newscenter/briefings/Transforming_Health:_Fulfilling_the_Promise_of_Research Acesso em: 16 jan 2013.
- ¹³⁷Leslie, M. *Science* 2011, 333, 933.
- ¹³⁸Lannes-Vieira, J.; Araújo-Jorge, T. C.; Soeiro, M. N. C.; Gadelha, P.; Corrêa-Oliveira, R. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010, 4, e645.

