

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS
COMPOSTOS DAS SÉRIES LAPDES FUR-PQ E LAPDES
FUR-TS CONTRA *Trypanosoma cruzi***

DIEGO EIDY CHIBA

ARARAQUARA - SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS
COMPOSTOS DAS SÉRIES LAPDESF FUR-PQ E LAPDESF
FUR-TS CONTRA *Trypanosoma cruzi***

DIEGO EIDY CHIBA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof^a. Dra. Chung Man Chin
CO-ORIENTADOR: Dra. Priscila Longhin Bosquesi

ARARAQUARA - SP

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C532s

Chiba, Diego Eidy

Síntese e avaliação biológica de novos compostos das séries LAPDESF FUR-PQ e LAPDESF FUR-TS contra *Trypanosoma cruzi* / Diego Eidy Chiba – Araraquara, 2015
141 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Chung Man Chin

Coorientador: Priscila Longhin Bosquesi

1. Furoxanos. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Doença de chagas. 4. Bioisósteros. 5. Nitrofurais
I. Chin, Chung Man, orient. II. Bosquesi, Priscila Longhin, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Valdomiro e Geralda, pela educação que me deram, por sempre me apoiarem e me oferecer às condições para que eu pudesse estudar e chegar cada vez mais longe.

A minha orientadora, prof.^a Dra. Chung Man Chin, pelos ensinamentos, orientação, apoio e pela confiança em meu trabalho.

Ao prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, pela ajuda e colaboração para a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. João Aristeu da Rosa e a Prof^ª. Márcia Graminha e a todos do Laboratório de Parasitologia por permitir a utilização de seu laboratório para a realização de ensaios biológicos.

A minha co-orientadora Dra. Priscila Longhin Bosquesi, por toda a ajuda e orientação para a realização deste projeto.

Aos companheiros do laboratório, alunos de iniciação científica e pós-graduação, Paulo, Rafael, Daniela, Thais, Guilherme, Cauê, Karina, Luiz, Juliana, Aylime, Marcella, Maurício, João, Esther, Maria, Aline, Silvio, Zé Ricardo, e outros que passaram por aqui, pela ajuda oferecida e também pelos momentos de amizade.

Ao técnico Matheus Scontri e Marileide pela ajuda e suporte no laboratório e pela amizade.

Ao laboratório Farmanguinhos, pela doação do reagente difosfato de primaquina, fundamental no desenvolvimento desse trabalho

Agradecimentos

Aos Professores Dr. Eduardo Perez e a Dra. Adélia Emília de Almeida, por terem aceitado fazer parte da minha banca de qualificação e aos Professores Dr. Rafael Guido e Dr. João Aristeu da Rosa, que foram parte da minha banca de defesa, por todo o ensinamento e apoio oferecidos.

À CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro, através do oferecimento de bolsa de estudos.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas,
mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito,
que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta,
onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

(Theodore Roosevelt)

Resumo

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é tipicamente endêmica em países das Américas Central e Latina, mas devido ao processo de migração, a doença já atinge outros países como Estados Unidos e alguns países europeus. Estima-se que haja aproximadamente 7 – 8 milhões de pessoas infectadas no mundo e mais de 25 milhões correm risco de infecção. Os fármacos aprovados para o tratamento da doença são o benznidazol e o nifurtimox, ambos ativos somente na fase aguda da doença. No Brasil, apenas o benznidazol está disponível na terapêutica. Neste sentido, o presente projeto propõe a obtenção de duas séries de compostos. A série 1 é constituída de sete derivados inéditos híbridos de furoxanos e primaquina. Já a série 2 constitui-se de seis derivados inéditos bioisósteros de nitrofural, substituindo o núcleo nitrofurânico pelo núcleo furoxânico. Os derivados furoxânicos apresentam a capacidade de doação de NO, propriedade anti-inflamatória e tem demonstrado atividade antiparasitária interessante. A primaquina é um fármaco antimalárico, que foi previamente avaliado e demonstrou potencial atividade tripanossomicida. Foram obtidos seis derivados furoxânicos intermediários e caracterizados por espectrometria de infravermelho (IV) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e seis compostos finais, sendo caracterizados por espectrometria de infravermelho (IV) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os compostos finais obtidos foram avaliados quanto a atividade tripanossomicida em formas epimastigotas e amastigotas, a capacidade de doação de óxido nítrico e quanto a mutagenicidade *in vivo*. Os compostos apresentaram boa atividade tripanossomicida contra as formas epimastigotas e também se mostraram não mutagênicos no ensaio realizado.

Abstract

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, caused by the hemoflagellate parasite *Trypanosoma cruzi*, is typically endemic in countries of Central and Latin America. However, due to the migration process, this disease has already reached other countries like the United States and some European countries. It is estimated that there are approximately 7 - 8 million people infected worldwide and more than 25 million are at risk of infection. The drugs approved for the treatment are benznidazole and nifurtimox, both active only in the acute phase of the disease. In Brazil, only benznidazole is available. Due to the above, this project proposes to obtain two series of compounds. The Series 1 consists of seven new compounds derived from furoxanos and primaquine. The second series consists of six new bioisosters of nitrofurazone, replacing the nitrofuran group with furoxan. Furoxans derivatives have the ability to donate NO, anti-inflammatory properties and have shown interesting anti-parasitic activity. Primaquine is an antimalarial drug, which was previously demonstrated to have potential trypanocidal activity. Six furoxans intermediates and six finals derivatives were synthesized and characterized by infrared spectrometry (IR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Was evaluated the trypanocidal activity against epimastigote form of *T. cruzi*, the capability of NO donation and the mutagenicity in an *in vivo* assay. They presented good activity against epimastigote forms of parasite and show no mutagenicity in the *in vivo* assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial de casos de infecção por <i>T. cruzi</i>	12
Figura 2 - Rota migratória da América Latina e estimativa de infectados pelo <i>T. cruzi</i> em áreas não endêmicas.....	13
Figura 3 - <i>Triatoma infestans</i>	14
Figura 4 - Formas do parasito <i>T. cruzi</i>	16
Figura 5 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	18
Figura 6 - Sinal de Romaña.....	19
Figura 7 - Estruturas químicas do nifurtimox e benznidazol	21
Figura 8 - Portifólio DNDi para Doença de Chagas	23
Figura 9 - Alvos terapêuticos da via da biossíntese de ergosterol.....	24
Figura 10 - Estrutura química da lovastatina	25
Figura 11 - Estruturas química dos inibidores de FPFS	26
Figura 12 - Estrutura química dos compostos E5700 e ER-119884	27
Figura 13 - Estrutura química do posaconazol.....	27
Figura 14 - Estrutura química do K777.....	29
Figura 15 - Estrutura química dos compostos Cz007 e Cz008	30
Figura 16 - Estrutura química do nitrofural	31
Figura 17 - Estrutura química do NFOH.....	32
Figura 18 - Compostos que apresentaram melhor inibição na forma epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	36
Figura 19 - Compostos furoxânicos inibidores de crescimento do <i>T. cruzi</i> e <i>P. falciparum</i>	36
Figura 20 - Pró-fármaco sintetizado por Chung (1996)	42
Figura 21 - Planejamento dos compostos propostos	43
Figura 22 - Estruturas químicas dos compostos da série 1.....	44
Figura 23 - Estruturas químicas dos compostos da série 2.....	44
Figura 24 - Representação da placa utilizada para ensaio de atividade	61
Figura 25 - Efeito protetor em C2 devido a presença da subunidade N-óxido	72
Figura 26 - Fragmento m/z 250.....	100
Figura 27 - Gráfico de Absorbância X Concentração de nitrito.....	120
Figura 28 - Reticulócitos normais e reticulócito micronucleado	122
Figura 29 - Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão (DP) dos controles utilizados.....	125
Figura 30 - Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão (DP) dos compostos obtidos em diferentes concentrações.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de supressão em ratos infectados com cepas brasileiras de <i>T. cruzi</i>	34
Tabela 2 - Bioisosterismo clássico e não-clássico.....	39
Tabela 3 - Condições reacionais testadas	55
Tabela 4 - Deslocamentos químicos dos compostos 19a e 21a no RMN ^1H e RMN ^{13}C	97
Tabela 5 - Deslocamentos químicos dos compostos 19b e 21b no RMN ^1H e RMN ^{13}C	103
Tabela 6 - Deslocamentos químicos dos compostos 19b e 21b no RMN ^1H e RMN ^{13}C	110
Tabela 7 - Valores de IC_{50} dos compostos contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	116
Tabela 8 - Resultado da citotoxicidade em macrófagos	117
Tabela 9 - Valores de porcentagem de doação de NO dos compostos obtidos	121
Tabela 10 - Número de células micronucleadas em cada animal.....	124

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Síntese do intermediário (2)	50
Esquema 2 - Síntese do intermediário 5	51
Esquema 3 - Síntese dos compostos 10a-c	52
Esquema 4 - Síntese do composto 13	54
Esquema 5 - Síntese do composto 15	55
Esquema 6 - Síntese do composto 16	56
Esquema 7 - Síntese do composto 17	57
Esquema 8 - Síntese dos compostos 19a, 19b e 19c	58
Esquema 9 - Síntese do composto 21a, 21b e 21c	59
Esquema 10 - Mecanismo de formação de iminas a partir da reação entre aldeídos e aminas	69
Esquema 11 - Mecanismo de formação do composto 2	70
Esquema 12 - Mecanismo de formação do composto 4	73
Esquema 13 - Mecanismo de oxidação utilizando PCC	76
Esquema 14 - Mecanismo de formação do composto (7)	79
Esquema 15 - Mecanismo de reação dos compostos 10a-c	83
Esquema 16 - Mecanismo de síntese do composto 13	92
Esquema 17 - Mecanismo cisteína-dependente de doação de NO pelo núcleo furoxano	120

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 - Espectro de RMN ^1H do composto 2 (300MHz; acetona).....	71
Espectro 2 - Espectro do RMN ^{13}C do composto 2 (75MHz, acetona).....	72
Espectro 3 - RMN ^1H do composto 4 (400 MHz; acetona).....	74
Espectro 4 - Espectro ^{13}C do composto 4 (100 MHz, acetona).....	75
Espectro 5 - Espectro RMN de ^1H do composto 5 (300 MHz; clorofórmio).....	77
Espectro 6 - Espectro de infravermelho do composto 5.....	78
Espectro 7 - Espectro de RMN ^1H do composto 7 (300 MHz, DMSO).....	80
Espectro 8 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8 (300MHz, DMSO).....	81
Espectro 9 - Espectro de RMN de ^1H do composto 9 (300MHz, DMSO).....	82
Espectro 10 - Espectro de RMN de ^1H composto 10a (300MHz, clorofórmio).....	84
Espectro 11 - Ampliação do espectro de ^1H do composto 10a.....	85
Espectro 12 - Espectro de RMN de ^1H do composto 10b (300MHz, clorofórmio).....	86
Espectro 13 - Espectro de RMN de ^1H do composto 10c (300MHz, clorofórmio).....	87
Espectro 14 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10a (75MHz, clorofórmio).....	89
Espectro 15 - Espectro de ^{13}C do composto 10b (75MHz, clorofórmio).....	90
Espectro 16 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10c (75MHz, clorofórmio).....	91
Espectro 17 - Espectro de RMN de ^1H do composto 13 (300MHz, DMSO).....	93
Espectro 18 - Espectro de RMN de ^1H do composto 19a (300MHz, DMSO).....	98
Espectro 19 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 19a (75MHz, DMSO).....	98
Espectro 20 - Espectro de RMN de ^1H do composto 21a (300MHz, DMSO).....	99
Espectro 21 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 19a (75MHz, DMSO).....	99
Espectro 22 - Espectro de Massas do composto 19a.....	100
Espectro 23 - Espectro de Massas do composto 21a.....	101
Espectro 24 - Espectro de RMN ^1H do composto 19b (300 MHz; DMSO).....	104
Espectro 25 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 19b (75 MHz; DMSO).....	104
Espectro 26 - Espectro de RMN de ^1H do composto 21b (300 MHz; DMSO).....	105
Espectro 27 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 21b (75 MHz; DMSO).....	105
Espectro 28 - Espectro de Massas do composto 19b.....	106
Espectro 29 - Espectro de Massas do composto 21b.....	107
Espectro 30 - Espectro de infravermelho do composto 19b.....	108
Espectro 31 - Espectro de infravermelho do composto 21b.....	108
Espectro 32 - Espectro de RMN de ^1H do composto 19c (300 MHz; DMSO).....	111
Espectro 33 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 19c (75 MHz; DMSO).....	111
Espectro 34 - Espectro de RMN de ^1H do composto 21c (300 MHz; DMSO).....	112
Espectro 35 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 21c (75MHz; DMSO).....	112
Espectro 36 - Espectro de Massas do composto 19c.....	113
Espectro 37 - Espectro de Massas do composto 21c.....	114
Espectro 38 - Espectro de infravermelho do composto 19c.....	115
Espectro 39 - Espectro de infravermelho composto 21c.....	115

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1.	Doença de Chagas	12
1.2.	Nitrofural (NF) e hidroximetilnitrofural (NFOH).....	31
1.3.	Primaquina	32
1.4.	Derivados furoxânicos e benzofuroxânicos	35
1.5.	Planejamento de novos fármacos	37
2.	OBJETIVOS	41
3.	Planejamento estrutural	42
4.	Materiais e métodos	45
4.1.	Reagents e Solventes	45
4.2.	Equipamentos utilizados	46
4.3.	Métodos Sintéticos.....	47
4.4.	Métodos Analíticos.....	47
5.	PROCEDIMENTO Experimental	50
5.1.	Procedimento sintético	50
5.2.	Ensaio.....	60
6.	RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO	69
6.1.	Síntese dos compostos da série 1 e série 2.....	69
6.2.	Ensaio.....	116
7.	Conclusões	127
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

1. INTRODUÇÃO

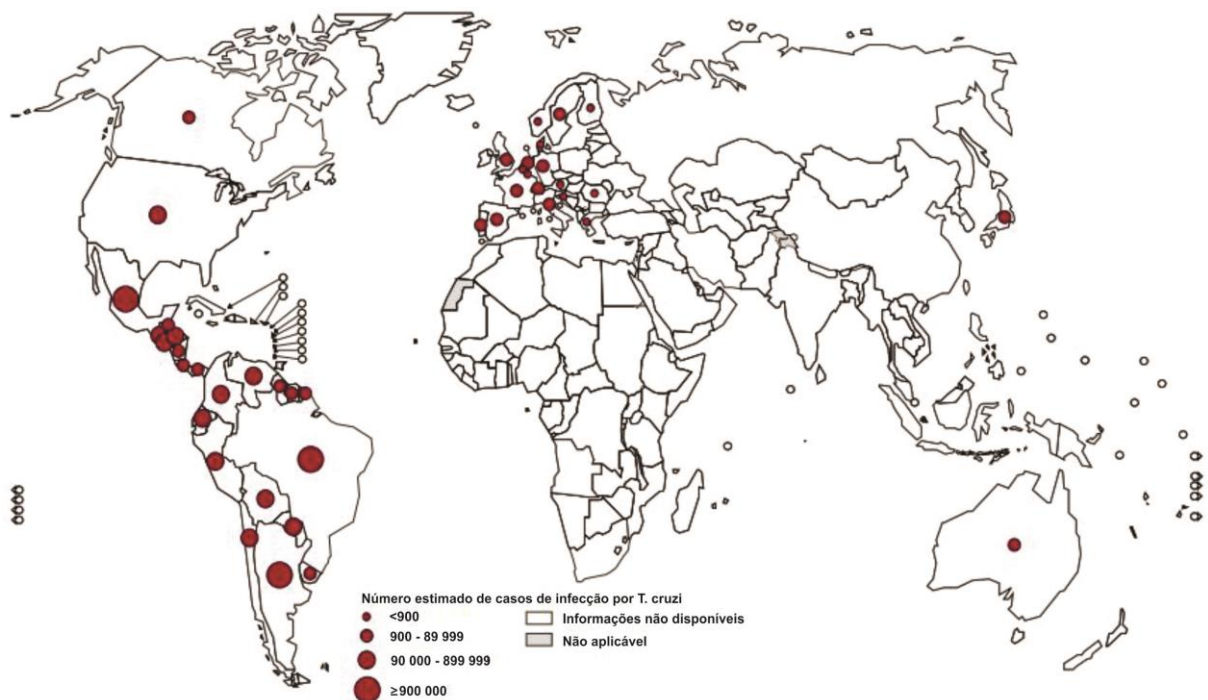
Doenças negligenciadas (DN) é um grupo de doenças infecciosas que afetam principalmente países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. As DN são endêmicas em aproximadamente 149 países, afetando mais de 1,4 bilhões de pessoas, além de custar bilhões de dólares por ano. A classificação é decorrente de duas características que essas doenças apresentam. A primeira é que são predominantes em países tropicais, principalmente em regiões onde há população rural de baixa renda. A segunda característica é que se trata de doenças na qual os investimentos para o desenvolvimento de novos medicamentos e no controle são baixos, devido ao limitado orçamento destinado à saúde dos países em desenvolvimento e ao desinteresse das instituições privadas na pesquisa de novos tratamentos para este grupo de doenças. Nos últimos anos, diversas parcerias público-privadas, sem fins lucrativos, foram criadas para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento das DN, como, por exemplo, o *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (DNDi). Além disso, os investimentos públicos no combate dessas doenças também aumentaram (FEASEY et al., 2010; COHEN, et al., 2014; WHO, 2015).

Cohen e colaboradores (2014) avaliaram o número de novos medicamentos lançados para o tratamento de doenças negligenciadas, sendo levados em consideração, novos fármacos, vacinas e novas indicações aprovadas e os que estão em fase clínica (fase III), no período de 2000 a 2013. O estudo levou em consideração também HIV/AIDS, tuberculose e malária, que não são consideradas doenças tropicais negligenciadas pela OMS. Neste período, foram aprovados 43 novos produtos, sendo que 67% destes são destinados ao tratamento de HIV/AIDS, tuberculose e malária. Em estudo clínico de fase III, foram encontrados 18 produtos, sendo também mais da metade voltados para as três doenças citadas anteriormente. Para DN foram apenas três novas aprovações e cinco estão em estudo clínico de fase III.

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, foi descrita pelo médico brasileiro Carlos Chagas, em 1909. É uma doença crônica causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* que tem como vetor os insetos triatomíneos da subfamília Triatominae. A doença é principalmente endêmica nos 21 países da América Central e Latina, uma vez que a presença do vetor está restrita apenas ao continente americano (Figura 1) (WHO, 2015; BRASIL, 2015).

Figura 1 - Distribuição mundial de casos de infecção por *T. cruzi*

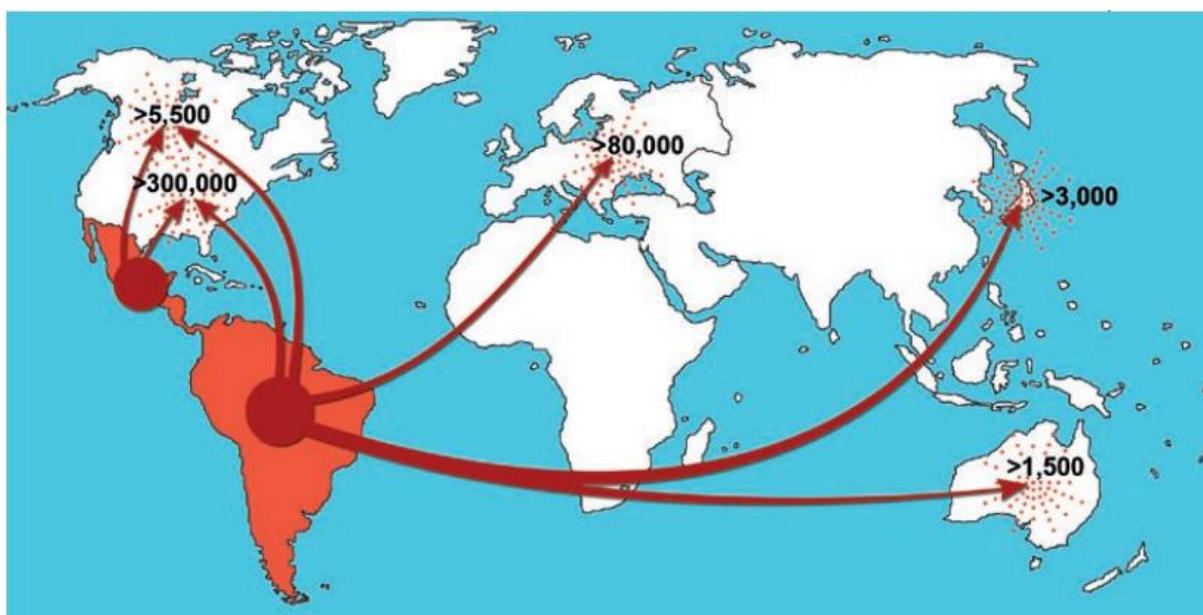


Fonte: Extraído e adaptado de WHO, 2013

No entanto, devido ao processo migratório de pessoas oriundas de áreas endêmicas para outras regiões do mundo e a outros mecanismos de transmissão, há casos da doença em

países não endêmicos, como Estados Unidos, Canadá, alguns países europeus e alguns localizados no oeste do oceano pacífico (Figura 2) (COURA, VIÑAS, 2010).

Figura 2 - Rota migratória da América Latina e estimativa de infectados pelo *T. cruzi* em áreas não endêmicas



Fonte: Extraído de COURA; VIÑAS, 2010

Há cerca de 7-8 milhões de pessoas infectadas no mundo. No Brasil os casos crônicos da doença de Chagas são predominantes, com um número aproximado de 3 milhões de indivíduos contaminados. Devido a ações sistematizadas de controle do inseto vetor, houve uma diminuição expressiva da presença do *Triatoma infestans*, consequentemente levando a diminuição da transmissão do parasito por esta via. Alguns casos da doença de Chagas na fase aguda ocorrem, atualmente, principalmente na região da Amazônia Legal, por contaminação por via vetorial ou ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros) (BRASIL, 2015).

1.1.1. Vias de Transmissão

O principal meio de transmissão do *T. cruzi* para o homem é através do vetor, que constituem insetos hematófagos da família *Reduviidae*, da subfamília *Triatominae* (Figura 3). Diversas espécies podem ser hospedeiras do parasito, sendo as mais importantes *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (WHO, 2002). O *T. infestans* é o principal vetor, encontrado em regiões endêmicas subamazônicas (sul da América do Sul). As espécies *R. prolixus* e *T. dimidiata* são encontradas normalmente na região norte da América do Sul e na América Central, sendo a segunda encontrada também mais ao norte no México. No Brasil, além da espécie *T. infestans*, a *P. megistus* possui grande importância, devido a sua extensa distribuição geográfica no país (SHERLOCK, 1999; RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010). A infecção ocorre através da eliminação do parasito nas fezes do vetor e posterior inoculação na pele (BARRETT, 2003).

Figura 3 - *Triatoma infestans*



Fonte: Extraído de

<http://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2004/Trypanosomiasis/vector.htm> (acesso em 27/11/2014)

Além da forma vetorial, existem outras formas de infecção, como transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplante de órgãos e ingestão de alimentos contaminados (RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010).

O risco de transmissão por transfusão sanguínea ocorre na proporção de 10 a 20% e ocorre através da transfusão do próprio sangue ou derivados, decorrentes de pessoas infectadas com o *T. cruzi*. A chance de infecção por este meio depende de diversos fatores, como a concentração de parasitas, o componente sanguíneo utilizado e a linhagem do protozoário. As plaquetas apresentam o maior risco de infecção, uma vez que os parasitos decantam juntamente com as plaquetas no processo de centrifugação (RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010; WENDEL, 2010).

Já foram relatados casos de infecção através de transplante de órgãos sólidos e de medula óssea (VILLALBA et al., 1992; CDC, 2006). Possivelmente, a infecção ocorre devido a presença do parasito na sua forma amastigota nas células do órgão transplantado que, por sua vez, se transformam na sua forma tripomastigota e infectam outras células do receptor (KIRCHHOFF, 2011).

A transmissão congênita também pode ocorrer e estudos demonstram percentuais entre 1 a 10% de bebês que nascem infectados pelas mães que apresentam a doença na fase crônica. Quanto maior o número de formas tripomastigotas circulantes na mãe, maior pode ser o risco de infecção (WENDEL, 2010; BERN, 2009; BRUTUS et al, 2010).

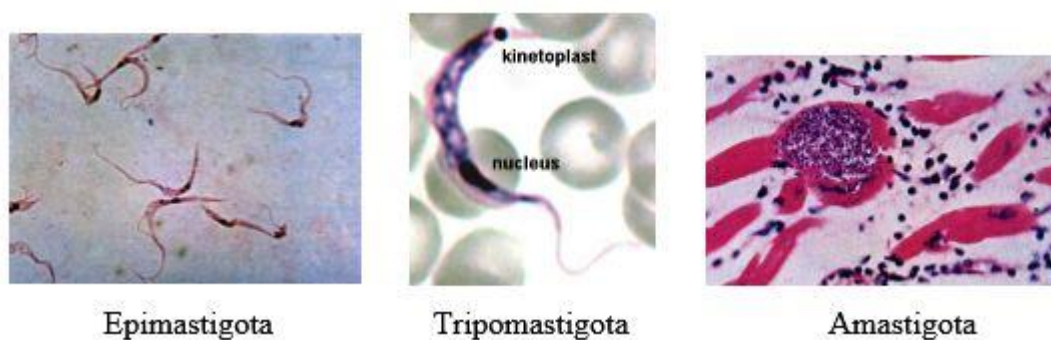
A infecção oral ocorre através da ingestão alimentos contaminados, como o açaí, cana de açúcar e também carne crua e foi demonstrada experimental e clinicamente, constituindo relevante importância nos casos de morbidade e mortalidade nos casos de infecção aguda da doença associada a elevadas concentrações de parasito (RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010; BRASIL; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2006). Apesar de ter sido relatados casos em diversas regiões endêmicas da doença, este tipo de transmissão apresenta maior frequência e

visibilidade na região amazônica. Em 2005, houve um surto de contaminação oral na região Sul do Brasil, atingindo atenção internacional, uma vez que afetou um grupo de turistas e apresentou alta morbidade e mortalidade (PÉREZ-GUTIÉRREZ et al., 2006)

1.1.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, com diversas etapas de multiplicação no vetor e no hospedeiro vertebrado. No vetor, o parasito se encontra nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica. Já no hospedeiro vertebrado, o parasito encontra-se na sua forma infectante, a tripomastigota e sua forma intracelular, amastigota (Figura 4). Durante a fase aguda, qualquer célula nucleada pode ser infectada (RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010).

Figura 4 - Formas do parasito *T. cruzi*



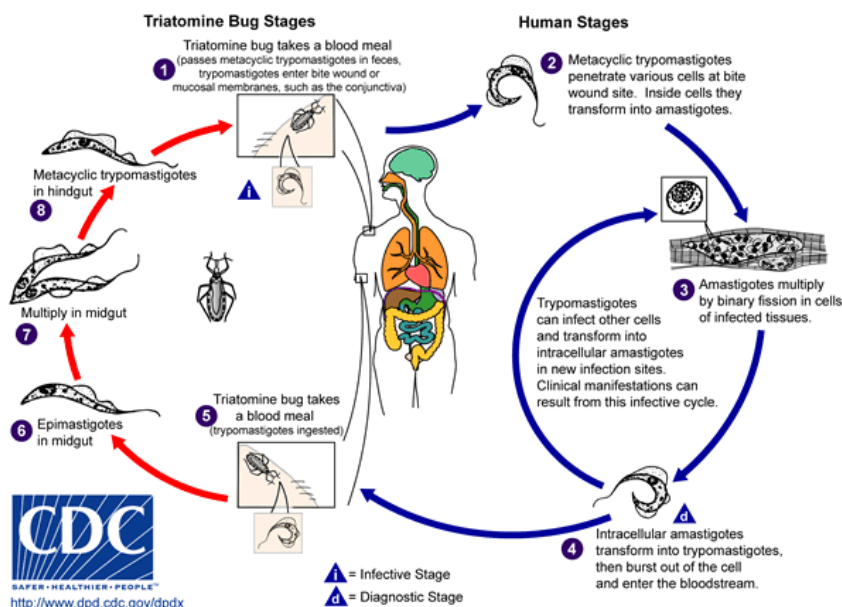
Fonte: <http://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2004/Trypanosomiasis/morphology.htm>

(acesso em 10/01/2015)

A Figura 5 apresenta o ciclo de vida do *T. cruzi* no vetor e no hospedeiro vertebrado. No vetor, o ciclo se inicia quando o inseto se alimenta com sangue de animais infectados, ingerindo o parasito na sua forma tripomastigota metacíclica. No estômago do inseto, a forma

tripomastigota se transforma nas formas esferomastigotas e epimastigotas. Ambas são formas arredondadas, mas a primeira apresenta um longo flagelo colado ao corpo e a segunda um curto flagelo. Após a transformação, os parasitos migram para o intestino e se multiplicam como formas epimastigotas. Em seguida, migram-se para o reto e se transformam na forma tripomastigota, que são eliminadas com as fezes do triatomíneo (SOUZA, 1999).

No hospedeiro vertebrado, o ciclo inicia-se quando as formas tripomastigostas eliminadas pelo triatomíneo são inoculadas no hospedeiro vertebrado. Essa forma do parasito tem a capacidade de penetrar em qualquer célula nucleada e desenvolver-se. Após aderir-se a membrana da célula, o parasito é fagocitado e começa a se transformar na forma amastigota e simultaneamente destrói a membrana do fagócito. Já no citoplasma, a forma amastigota inicia divisão celular binária e continua nesse processo por vários dias no interior da célula. Após, aproximadamente cinco dias, as formas amastigotas iniciam o processo de transformação na forma tripomastigota. Nesta forma, o parasito movimenta seus flagelos de maneira intensa, levando ao rompimento da célula, liberando os parasitos no meio extracelular. Tanto as formas amastigotas quanto as formas em transição e formas tripomastigotas têm a capacidade de infectar outras células do ambiente ou atingir a corrente sanguínea e distribuir-se por todo o organismo (SOUZA, 1999).

Figura 5 - Ciclo de vida do *T. cruzi*

Fonte: Extraído de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> (acesso em 10/01/2015)

1.1.3. Patogênese e manifestações clínicas

A infecção pelo *T. cruzi* apresenta-se em duas fases. A fase inicial, conhecida como fase aguda, tem duração média entre 4 a 8 semanas e normalmente ocorre de forma assintomática, principalmente em adultos. Quando há ocorrência de sintomas, que está diretamente relacionada a parasitemia no indivíduo infectado, eles incluem febre prolongada, mal-estar, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, miocardite, eletrocardiograma alterado e edema subcutâneo localizado ou generalizado. Cerca de 90% das manifestações clínicas da fase aguda se resolvem espontaneamente, mesmo sem nenhuma intervenção. No caso da infecção por via vetorial, o paciente pode apresentar sinais no local de entrada do parasito, que são conhecidos como Chagoma, quando ocorre pela pele, ou sinal de Romaña, quando a infecção ocorre nas membranas oculares (Figura 6). Casos de fase aguda sintomática ocorre mais frequentemente em crianças (até os 10 anos de idade) e podem levar a óbito devido à

miocardite severa, meningoencefalite ou ambos (COURA, 2007; DIAS et al., 2009; RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010).

Figura 6 - Sinal de Romaña



Fonte: Extraído de http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/Doenca_de_chagas.htm (acesso em 10/01/15)

Após o período de fase aguda, cerca de 70-80% dos indivíduos infectados atingem a fase crônica da doença que persiste por toda a vida do indivíduo infectado. Nesta etapa, normalmente não é detectado a presença do parasito na corrente sanguínea. Esse período de latência, que dura de 10-30 anos, é conhecida como fase indeterminada da doença e apresenta-se de forma assintomática. Após o período de latência, em aproximadamente 20-30% dos indivíduos na fase crônica latente, podem ser observados o desenvolvimento de manifestações clínicas que afetam certos órgãos, como coração, intestino, esôfago e sistema nervoso central (DIAS, 1995; PRATA, 2001; BERN et al., 2007; RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010).

A forma cardíaca da Doença de Chagas é a manifestação crônica mais severa e frequente da doença, acometendo 20 – 30% dos casos com manifestações na fase crônica. Há duas hipóteses para explicar a patogenia que envolve o desenvolvimento da forma cardíaca. A

primeira é que os danos no tecido do coração são causados por um processo imune, devido a presença de parasitos intracelulares. Na segunda, o próprio parasitismo permanente nas células cardíacas causam os danos teciduais (BERN et al., 2007; DIAS et al., 2009). A forma cardíaca apresenta como principais sintomas a arritmia, dilatação das paredes do coração, levando a insuficiência cardíaca e tromboembolismo (PRATA, 2001; BERN et al., 2007). Morte súbita é a principal causa de morte em indivíduos com a forma cardíaca da doença (aproximadamente dois terços das mortes), seguida de insuficiência cardíaca e tromboembolismo (RASSI JR; RASSI, S.; RASSI, A., 2001; RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2009).

Outra manifestação importante da fase crônica da doença é a forma digestiva (10-15% dos indivíduos na fase crônica), caracterizada principalmente por megacólon, megaesôfago ou ambos. No caso do megaesôfago, observa-se o aumento do diâmetro do órgão, alteração na motilidade, dores epigástricas, regurgitação e hipertrofia das glândulas salivares. O megacólon tem como principais sintomas obstipação do órgão e distensão abdominal (RASSI JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010).

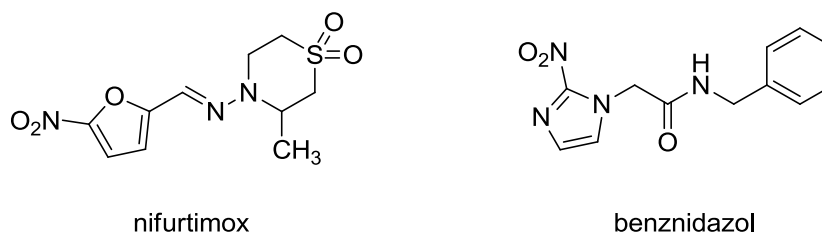
1.1.4. Tratamento da Doença de Chagas

Após a descrição da doença de Chagas em 1909, os primeiros fármacos testados foram arsênico, tartarato de antimônio potássico, fucsina e cloreto de mercúrio. No entanto, nenhum dos fármacos se mostraram eficazes. Outras substâncias foram testadas até meados de 1960, como alguns antimaláricos, antibióticos, sais de ouro, outros arsênicos, entre outras (COURA; CASTRO, 2002).

Desde meados de 1960 a 1970 até hoje apenas dois fármacos são aprovados no mundo para o tratamento da doença, o nifurtimox [3-metil-4(nitrofurfurilideneamino)tetrahidro-4H-

1,4-tiozina-1,1-dióxido], um derivado nitrofurânico o e benznidazol [*N*-benzil- 2-nitroimidazol acetamide], um derivado nitroimidazólico (Figura 7) (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006; WHO, 2015).

Figura 7 - Estruturas químicas do nifurtimox e benznidazol



Fonte: Autor

O nifurtimox tem como mecanismo de ação a formação dos radicais livres superóxido e também de hidróxido de hidrogênio após ação das nitrorredutases e outras reações redox no meio intracelular. Os radicais formados causam danos as macromoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA (MAYA et al., 2007).

Já o benznidazol não tem seu mecanismo dependente da formação de radicais livres, como o nifurtimox. Acredita-se que o mecanismo de ação está relacionado com a ligação covalente dos metabólitos formados da redução pelas nitrorredutases às macromoléculas citadas anteriormente. Foi demonstrado também que o benznidazol melhora a fagocitose e aumenta a atividade do interferon gama (IFN- γ) contra o parasito, além de inibir a enzima NADH-fumarato redutase do *T. cruzi*. ((DÍAZ DE TORANZO et al., 1988; MAYA et al., 2007).

Uma questão importante que deve ser considerada no tratamento com ambos os fármacos, é o fato da eficácia variar de acordo com a região geográfica que o paciente se encontra, uma vez que as diferentes cepas existentes do parasito podem apresentar resistência a um ou outro fármaco (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006).

Diversos inconvenientes existem quando se trata da utilização desses fármacos. Ambos são eficazes durante a fase aguda da doença e ineficazes em pacientes que se encontram na fase crônica. Além disso, apresentam diversos efeitos adversos indesejáveis, alguns causando até mesmo a interrupção do tratamento. Os efeitos adversos mais comuns do nifurtimox são anorexia, perda de peso, distúrbios gastrointestinais (náusea, vômito, cólicas intestinais e diarreia) e distúrbios no sistema nervoso (excitabilidade e insônia). O benznidazol pode apresentar efeitos adversos de hipersensibilidade (dermatite, erupção cutânea, edema generalizado, febre), dores musculares e articulares, depressão da medula óssea, polineuropatia, parestesia e agranulose, sendo o último o efeito mais severo que pode ocorrer (COURA; CASTRO, S., 2002, URBINA et al., 2003; CASTRO, J.; MECCA; BARTEL, 2006).

Apesar dos inconvenientes, até o momento não existe fármacos aprovados com eficácia superior ao nifurtimox e ao benznidazol (MAYA, 2010).

A necessidade de novos tratamentos para a doença de Chagas é de extrema importância. Diferentes abordagens estão sendo utilizadas para este intuito, tais como: alteração de regime posológico dos fármacos aprovados, combinações terapêuticas e a busca de novos candidatos a fármacos e novos alvos terapêuticos. Uma variedade de classes terapêuticas e novos alvos estão sendo testados, *in vitro* e *in vivo*, em modelos experimentais, demonstrando boa eficácia (BAHIA; DINIZ; MOSQUIERA, 2014; BUSTAMANTE; TARLETON, 2014).

Muitos desses novos desenvolvimentos são resultados de parcerias de desenvolvimento de novos produtos sem fins lucrativos, como o DNDi, que auxilia e incentiva a busca de novos tratamentos para a doença de Chagas e outras doenças negligenciadas (BAHIA; DINIZ; MOSQUIERA, 2014). O Figura 8 apresenta a situação no desenvolvimento de novos produtos para DTN, incentivados pelo DNDi.

Figura 8 - Portifólio DNDi para Doença de Chagas

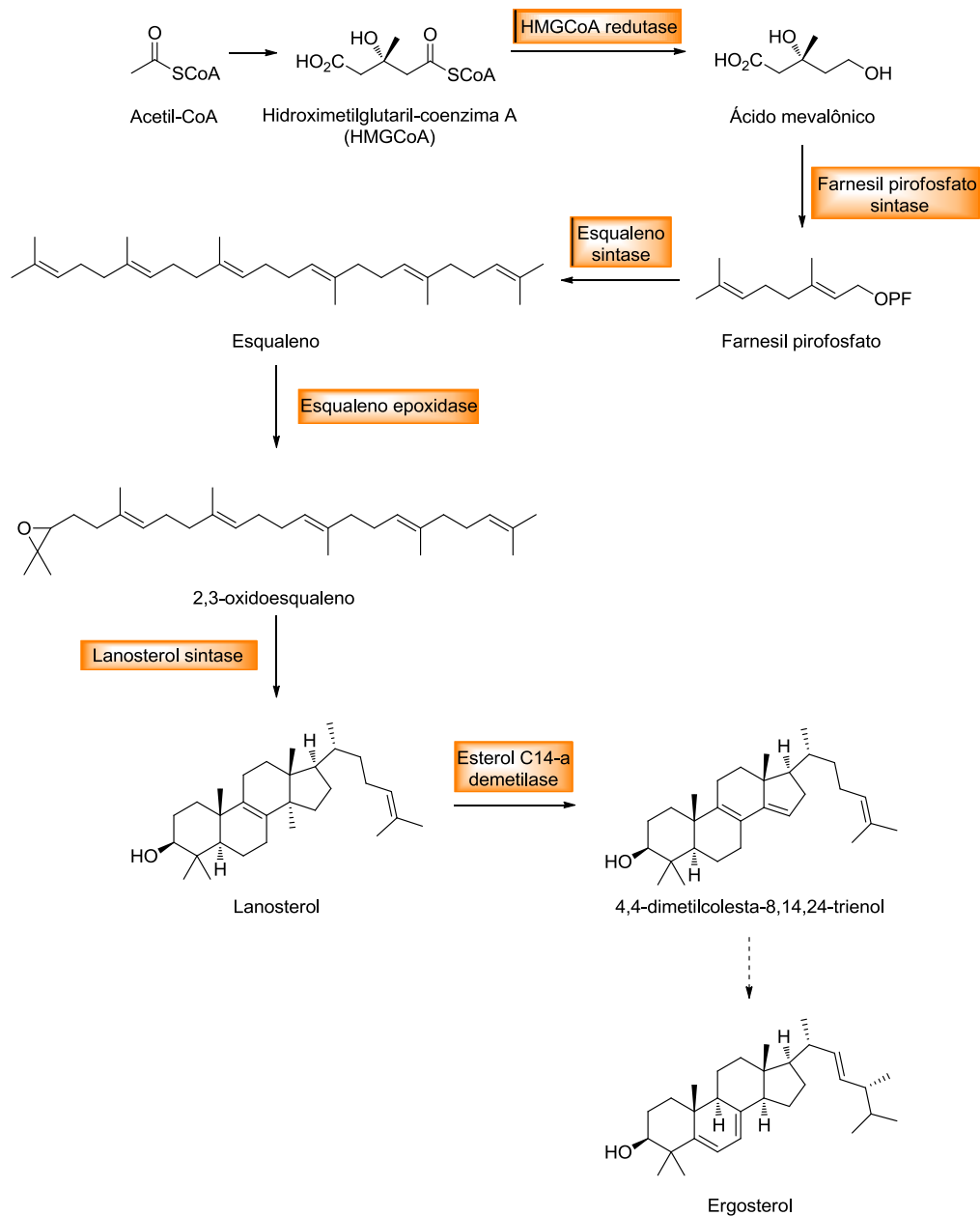
Fonte: Adaptado de <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio.html>

1.1.5. Alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos contra doença de Chagas

A seguir encontram-se os alvos das rotas metabólicas e alvos terapêuticos explorados no planejamento de novos fármacos antichagásicos:

Biossíntese de Ergosterol:

Para seu desenvolvimento e proliferação, o *T. cruzi* necessita de uma variedade de esteróis específicos. Esses esteróis, como o ergosterol, são estruturas essenciais para a formação de membranas, responsáveis por sua estabilização, fluidez e permeabilidade, além de modular a atividade de receptores e canais iônicos (LEPESHEVA et al., 2007). A Figura 9 apresenta os principais alvos dessa via metabólica.

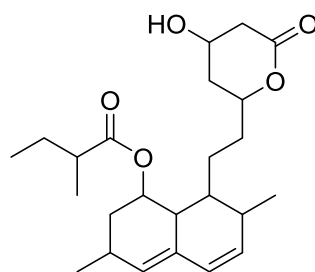
Figura 9 - Alvos terapêuticos da via da biossíntese de ergosterol

Fonte: Adaptado de SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010

Um exemplo de fármaco estudado na inibição da enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase no *T. cruzi* foi a lovastatina (Figura 10). Urbina et al. (1993) realizaram a avaliação da atividade in vitro e in vivo da lovastatina e também de sua associação com cetoconazol, que também atua na inibição da biossíntese de ergosterol, inibindo a enzima CYP450. Foi observada a inibição total do crescimento nas doses de 50 μM e 70 μM , com o tempo de

exposição de 144h e 96h, respectivamente. A associação de 7,5 μM de lovastatina com 0,1 μM de cetoconazol promoveu a inibição total em 144 h de exposição. Na avaliação contra a forma intracelular amastigota, a lovastatina não se mostrou muito efetiva, com inibição menor de 30% em doses até 1 μM . Acima dessa concentração, a substância foi citotóxica para as células utilizadas. A associação de 0,75 μM de lovastatina com 1 nM de cetoconazol demonstrou inibição total após 192 horas de exposição. No modelo in vivo, no qual foi avaliado a taxa de sobrevivência após inoculação de quantidade letal de parasita, a lovastatina sozinha apresentou sobrevivência de 50% dos animais, na dose de 20 mg/Kg/dia. A associação com cetoconazol (15 mg/Kg/dia) apresentou sobrevivência de 100%. Em trabalho mais recente, Kessler et al. (2013) determinou experimentalmente a concentração do fármacos que produz inibição de crescimento em 100% como 100 μM de lovastatina, quando exposto por 24 horas.

Figura 10 - Estrutura química da lovastatina



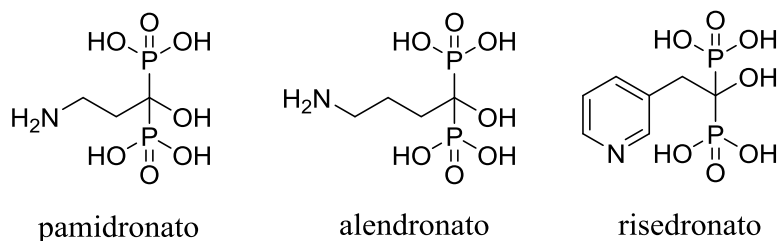
lovastatina

Fonte: autor

Derivados bifosfonados foram avaliados como inibidores da enzima farnesil pirofosfato sintase (FPFS). Montalvetti et al. (2001) avaliou a inibição de FPSP de *T. cruzi* *in vitro*. Os compostos residronato, alendronato e pamidronato (Figura11) apresentaram boa atividade inibitória, apresentando IC₅₀ de 0,037±0,003 μM , 0,77±0,0 μM e 1,08±0,4 μM , respectivamente. Posteriormente, Garzoni et al. (2004) avaliaram a atividade tripanossomicida *in vitro* do residronato, em formas epimastigotas e amastigotas. Contra a forma epimastigota

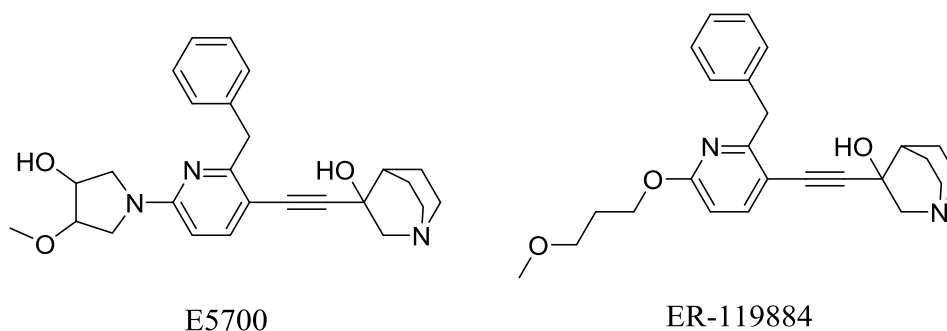
foi observado ação inibitória dependente da dose na faixa de 25 – 400 μM , apresentando um IC_{50} de $30,3 \pm 3,3$ μM no ensaio utilizando cepa Y de *T. cruzi*. Contra as formas amastigotas, foram avaliados tempos distintos de início do tratamento e também de exposição. Começando o tratamento após duas horas do início da infecção, foi observado diminuição do número de células infectadas dose dependente. Não foi observada nenhuma célula infectada nas concentrações de 100 μM , 150 μM e 200 μM , após 144, 120 e 96 horas de exposição, respectivamente. Não foram observados efeitos tóxicos para as células hospedeiras utilizadas. Em outro estudo, Garzoni et al. (2004) avaliaram a atividade antiparasitária do residronato em modelo in vivo agudo. O tratamento com o fármaco na dose de 10 mg/Kg/dia durante 7 dias levou a diminuição de 96,6% da parasitemia em relação ao controle e também a diminuição da mortalidade de 90% para 10%, comparando os grupos controle e tratado.

Figura 11 - Estruturas química dos inibidores de FPFS



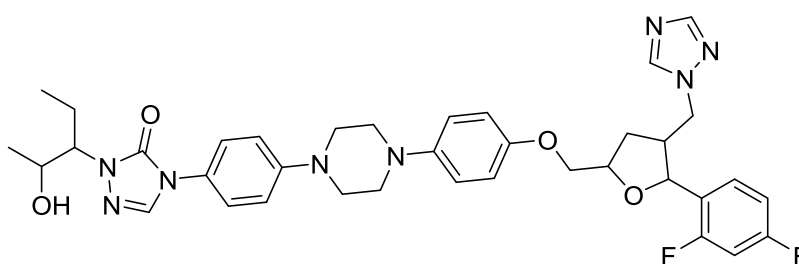
Fonte: autor

Dois potentes inibidores foram avaliados para a enzima esqualeno sintase E5700 e ER-119884 (dois derivados quinuclidínicos) (Figura 12), ambos com IC_{50} na faixa de nanomolar. Na avaliação in vitro contra formas epimastigotas, os compostos apresentaram boa atividade ($\text{IC}_{50} = 8$ nM do E5700 e $\text{IC}_{50} = 11$ nM do ER-119884) (URBINA, 2004).

Figura 12 - Estrutura química dos compostos E5700 e ER-119884

Fonte: autor

A esterol C14- α demetilase é uma enzima da família da CYP51. A classe dos antifúngicos azóis (cetoconazol, itraconazol, posaconazol) são os principais representantes de inibidores dessa classe. Dados da literatura demonstram que o posaconazol (Figura 13) possui atividade contra o *T. cruzi* em estudos *in vivo* em modelo crônico, sendo até utilizado em estudos de fase clínica para o tratamento da doença (SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010).

Figura 13 - Estrutura química do posaconazol

posaconazol

Fonte: autor

Glicólise:

Esta via metabólica representa grande potencial, uma vez que é essencial para o fornecimento de energia para o parasito, além de possuir enzimas que possuem estruturas diferentes das enzimas envolvidas no processo no ser humano, ou seja, há possibilidade do

desenvolvimento de inibidores específicos (SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010). Algumas das enzimas já utilizadas como alvos são:

- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;
- Hexoquinase.

Absorção de purinas:

Diferente dos mamíferos, o *T. cruzi* não possui a capacidade de sintetizar purinas, necessitando de um sistema de absorção dessas substâncias do hospedeiro. Isso faz com que esta via seja um interessante alvo para novos fármacos (SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010). Como alvo desta via pode-se destacar a hipoxantina/guanidina fosforibosiltransferase.

Outras vias e alvos:

- *Biossíntese de lipídeos;*
- *Metabolismo de poliaminas;*
- *Via da pentose fosfato;*
- *Ligantes de DNA;*
- *Ácido Siálico transferase.*

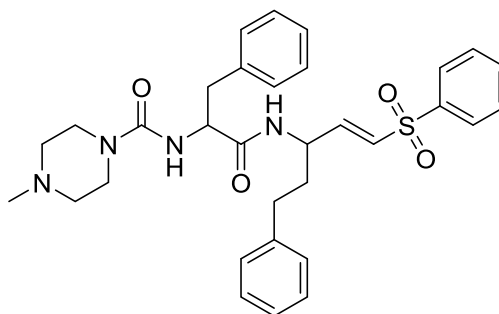
Cisteína protease

A utilização de cisteínas proteases como alvo foi validada a partir de diversos estudos que demonstraram resultados consistentes que a perda da atividade dessa enzima, por inibição ou por deleção de genes, causa diminuição significativa da capacidade infectante e da sobrevivência do parasito. A cruzipaina ou cruzaina é a cisteína protease encontrada no *T. cruzi* (LIMA, A; REIS; COSTA, 2013).

Diversos estudos demonstram a atividade de diferentes classes de moléculas, como dipeptídeos, tiossemicarbazona, vinilsulfonas e vifilsulfonatos, na inibição de cisteínas proteases em diversos parasitos (LIMA, A.; REIS; COSTA, 2013).

O inibidor irreversível de cruzipaina K-777 (Figura 14), um derivado vinil sulfona, apresentou atividade contra formas epimastigota e amastigota de *T. cruzi*, além de apresentar diminuição de parasitos no sangue e prolongar a sobrevivência em modelos animais (ENGEL et al., 1998; BARR et al., 2005).

Figura 14 - Estrutura química do K777



K777

Fonte: autor

Ndao et al. (2014) sintetizaram e avaliaram derivados contendo grupamentos nitrila em sua estrutura. Os derivados Cz-007 e Cz-008 (Figura 15) demonstraram excelentes valores de IC₅₀ na inibição da enzima (1,1 – 1,8 nM) e taxa de cura de 78-90% em modelo animal, utilizando imunossupressão como método padrão para avaliar a cura.

Cz007

Cz008

Tripanotiona reductase

A atividade da enzima tripanotiona redutase é a conversão da forma oxidada da tripanotiona para a forma reduzida, através de um mecanismo NADPH dependente (FAIRLAMB et al., 1985; PITA; PASCUTTI, 2012).

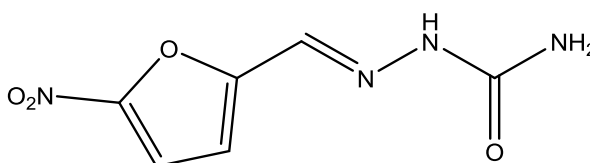
Diversas classes de substâncias, como derivados tricíclicos, derivados difenilssulfetos, poliaminas e alguns derivados heterocíclicos, tem demonstrado atividade inibitória dessa enzima (BERNARDES; ZANI; CARVALHO, 2013). Em 1888, Henderson comprovou a atividade inibitória dessa enzima do nitrofural.

1.2. Nitrofurural (NF) e hidroximetilnitrofurural (NFOH)

Compostos nitro-heterocíclicos, que incluem nitroimidazóis e nitrofuranos, tem sido bastante utilizados como compostos biologicamente contra protozoários (benznidazol e nifurtimox) e bactérias (furazolidona, metronidazol, secnidazol, ornidazol e tinidazol), todos com amplo espectro de ação (RAETHER; HÄNEL, 2003)

O nitrofurural (NF) (5-nitro-2-furaldeído semicarbazona) (Figura 16) foi sintetizado em 1944 por Dodd e Stilman, sendo o primeiro derivado nitrofurânico introduzido na terapia. Em 1961, Brener demonstrou que o nitrofurural era eficaz na inativação do *T. cruzi* em um experimento *in vivo*.

Figura 16 - Estrutura química do nitrofurural

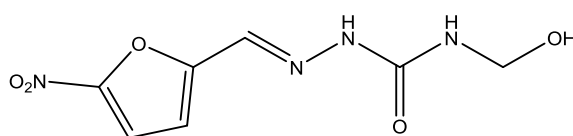


Fonte: autor

O mecanismo pelo qual o nitrofurural atua é pela geração de estresse oxidativo, através da redução do grupo nitro por enzimas nitrorredutases, e levando a formação de espécies reativas de oxigênio. O *T. cruzi* é altamente sensível aos radicais livres de oxigênio, causando um desequilíbrio nas defesas antioxidante do parasito. Além disso, age inibindo a enzima tripanotiona redutase e a enzima cruzipaína (HENDERSON et al., 1988; LA SCALEA, 2005; IGOILLO-ESTEVE et al., 2007; TROSSINI et al., 2010). No entanto, a toxicidade do nitrofurural por via oral é elevada, gerando neuropatia grave e hemólise. É utilizado somente por via tópica, como antibiótico.

Chung (1996) sintetizou uma série de pró-fármacos de nitrofural com primaquina, baseando-se no processo de latenciação como estratégia de modificação celular. O intermediário da síntese dos pró-fármacos, o hidroximetilnitrofural (NFOH) (Figura 17). O derivado de nitrofural apresentou atividade *in vitro* em formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo superior quando comparado ao benznidazol (CHUNG et al., 2003). Além disso, o NFOH foi avaliado quanto sua segurança em testes de mutagenicidade e de toxicidade aguda. A mutagenicidade foi avaliada e comparada ao nitrofural por dois ensaios, o teste de Ames e micronúcleo. Em ambos, foi demonstrado que NFOH é quatro vezes menos mutagênico que seu composto de partida. Já no teste de toxicidade aguda, o derivado foi considerado pouco tóxico, segundo critérios da OMS, com DL50 (dose letal para 50%) superior a 2000mg/Kg (MELO, 2006).

Figura 17 - Estrutura química do NFOH



Fonte: autor

Trossini et al. (2010) avaliaram o NF e o NFOH quanto a ação inibitória da cruzipaina, em um ensaio *in vitro*. Foi observado que ambos possuíam a capacidade de inibir a enzima ($IC_{50} = 22.83 \pm 1.2 \mu M$ do NF e $IC_{50} = 10.55 \pm 0.81 \mu M$ do NFOH).

1.3. Primaquina

A primaquina, 4-*N*-(6-metoxiquinolin-8-il)pentano-1,4-diamina, composto da classe da 8-aminoquinolina, foi descoberta na década de 1940 e é indicada para o tratamento da

malária. Possui indicação na profilaxia contra todas as espécies de malária, na cura radical do *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale* e na prevenção de recaída para pessoas extensivamente expostas ao *P. vivax* e *P. ovale* (VALE et al., 2009). Possui ação contra as formas latentes do parasita no fígado e nos gametócitos de todas as espécies que causam malária em humanos, inclusive contra o *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (GOMES et al., 2004). É utilizada em áreas endêmicas como prevenção da transmissão do protozoário do humano para o vetor, inibindo assim a disseminação da doença (VALE et al., 2009).

O mecanismo de ação pelo qual a primaquina atua na eliminação dos parasitas não está esclarecido. Acredita-se que o metabolismo na mitocôndria do parasita seja comprometido através da interferência na função da ubiquinona como carreador de elétrons na cadeia respiratória. Outro mecanismo potencial é a produção de metabólitos altamente reativos, que gera potencial oxidativo intracelular (VALE et al., 2009).

Na década de 70, Kinnamon e Steck (1977) avaliaram a atividade tripanossomicida de 25 compostos. Dentre estes compostos, a primaquina e seus análogos mostraram possuir atividade igual ou superior ao controle nifurtimox, em teste com ratos infectados. Os resultados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados de supressão em ratos infectados com cepas brasileiras de *T. cruzi*

Compostos	% supressão na dose(mg/kg/dia)					*SD ₉₀ (mg/kg/dia)
	104	52	26	13	3.25	
primaquina	100	97		80		21.8
dicloridrato de 2-metilprimaquinamonoidratada	-	-	82	86	38	10.5
difosfato de 3-metilprimaquina	-	-	99	98	92	<3.25
nifurtimox	99	92		57	-	41,5-54,0

*SD₉₀ (Dose de supressão de 90%): dose de supressão determinada graficamente, da dosagem necessária para supressão de 90% de crescimento dos compostos comparado ao nifurtimox.

Fonte: Adaptado de KINNAMON; STECK, 1977

Augusto et al. (1986) utilizou extratos de *T. cruzi* com primaquina para evidenciar a geração de radicais livres mediada pelo fármaco em ensaio *in vitro*. Os autores concluiu que a ação antiprotozoária da primaquina provavelmente estaria relacionada a participação do ciclo redox, formando radicais de oxigênio.

Chung et al. (1997) avaliaram a eficácia de pró-fármacos de primaquina *in vitro* nas formas tripomastigotas e amastigotas do parasita, no qual foi possível observar a atividade tripanossomicida da primaquina e de seus pró-fármacos. Foram utilizadas cepas Y de *T. cruzi* na forma tripomastigota e a atividade da primaquina e seus derivados no desenvolvimento dessa forma para a forma amastigota foi acompanhado depois de 6, 7, 8, 12, 14 e 15 dias após a infecção. A primaquina e seus derivados demonstraram uma significativa inibição no desenvolvimento da forma tripomastigota. Tanto a quantidade de parasitas na forma tripomastigota como na amastigota foi menor que 10% no final dos 15 dias com a utilização da primaquina na concentração de 10 µM.

A metemoglobinemia é um dos efeitos adversos mais relevantes da primaquina. Trata-se de acúmulo anormal de metemoglobina, produto da auto-oxidação do núcleo de ferro da

hemoglobina. A metemoglobina não consegue transportar oxigênio, podendo ocasionar cianose caso sua porcentagem no sangue seja elevada. Em indivíduos que possuem deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, a primaquina pode causar anemia hemolítica. Outros efeitos adversos da primaquina consistem em sintomas gastrointestinais, como cólica, dor abdominal, náusea e vômito (VALE et al., 2009).

1.4. Derivados furoxânicos e benzofuroxânicos

Os derivados com núcleo furoxânico (1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido) e benzofuroxânico (benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol-1-*N*-óxido) tem atraído muita atenção de pesquisadores pois é uma importante classe de compostos com diferentes propriedades químicas e biológicas (CERECETTO; PORCAL, 2005).

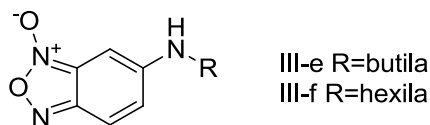
Esses derivados são doadores de óxido nítrico (NO) e também produzem espécies reativas de oxigênio. O óxido nítrico está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos e algumas das atividades biológicas de seus derivados estão relacionadas com esta característica, como as atividades antiplaquetária, vasodilatadora, em respostas imunes, e também na neurotransmissão (CERECETTO; PORCAL, 2005) e neuroproteção (SCHIEFER et al., 2012). Também há relatos que estes compostos podem possuir atividade antiparasitária (*P. falciparum* e *T. cruzi*), antimicrobiana e antineoplásica. Galli et al., (2005) atribuíram a atividade contra *P. falciparum* de alguns compostos sintetizados (derivados furoxânicos) à capacidade destes em doar óxido nítrico. Boiani et al., (2006) realizaram estudos *in vitro* para avaliar a atividade tripanossomicida de derivados benzofuroxânicos. Os resultados obtidos neste estudo mostraram atividade equivalente ao fármaco de referência benznidazol.

Os compostos furoxânicos são metabolizados principalmente no fígado, pelas enzimas do citocromo P450, e são produzidas grande quantidade de NO e de espécies reativas de

oxigênio (CHEN, 2008). Acredita-se que essas espécies reativas são responsáveis por gerar estresse oxidativo e causar o dano celular ao parasita (CERECETTO; PORCAL, 2005). Além disso, sabe-se que o NO endógeno é conhecido por ser um potente antimicrobiano e é responsável por mediar a toxicidade celular através da geração de espécies reativas ou da inibição de enzimas essenciais (FANG, 1997).

Cerecetto et al., (1999) realizaram um estudo com diversos derivados furoxânicos, benzofuroxânicos e quinoxalínicos. Dentre os todos os compostos, os derivados benzofuroxânicos (Figura 18), demonstraram os melhores resultados, inibindo 90% (III-e) e 79% (III-f) do crescimento do de cepas Tulahuen de *T. cruzi*, na forma epimastigota.

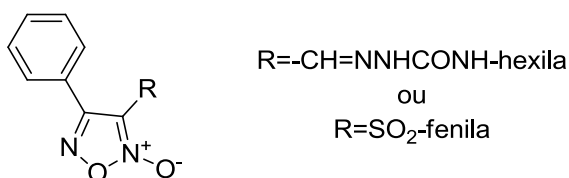
Figura 18 - Compostos que apresentaram melhor inibição na forma epimastigotas de *T. cruzi*



Fonte: CERECETTO et al., 1999

A Figura 19 apresenta dois derivados furoxânicos com potencial atividade em inibir o crescimento de *T.cruzi* e *P. falciparum*. Essa atividade foi atribuída provavelmente à capacidade doadora de óxido nítrico por esses compostos (BOIANI et al., 2008).

Figura 19 - Compostos furoxânicos inibidores de crescimento do *T.cruzi* e *P. falciparum*



Fonte: BOIANI, 2008

Estudo recente realizado por Hernandez et al., (2013) avaliou a atividade tripanossomicida nas formas epimastigota e amastigota de derivados furoxânicos, sendo que os derivados que possuíam o grupamento fenil ligado no núcleo furoxânico apresentaram maior atividade, maior seletividade e menor mutagenicidade que o nifurtimox, fármaco referência no estudo.

1.5. Planejamento de novos fármacos

O planejamento racional de fármacos tem como objetivo desenvolver novos compostos que apresentem melhor eficácia e segurança, através de melhores propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas e da redução de efeitos adversos (VIEGAS-JUNIOR, 2007). Sabe-se que o processo de planejamento envolve diversas etapas e conhecimento multidisciplinar, além da estimativa de que a descoberta de um novo fármaco leva em média 12 anos e requer investimento de milhões de dólares (DIMASI, HANSEN & GRABOWSKI, 2003).

Através de uma análise retrospectiva, podem-se observar quatro maneiras distintas na busca de novos compostos. A primeira é a modificação de fármacos conhecidos, buscando melhoria na eficácia e/ou segurança. A segunda consiste em uma busca sistemática de conjuntos de compostos escolhidos por meio de ensaios biológicos. O terceiro consiste na exploração retroativa de informações de novas descobertas da medicina e biologia ou de observações casuais. E a quarta estratégia é o planejamento racional baseado no conhecimento molecular da causa da patologia (WERMUTH, 2004).

A hibridação molecular é a estratégia racional que consiste no reconhecimento e na ligação, de forma adequada, de duas ou mais subunidades farmacofóricas, formando um composto híbrido com as características previamente selecionadas das moléculas originais

(VIEGAS-JUNIOR, 2007). Foi proposto atualmente o termo de múltiplos ligantes, que se refere a fármacos que foram racionalmente desenhados para múltiplos alvos de uma determinada doença (MORPHY & RANKOVIC, 2005).

Os compostos híbridos têm sido classificados de três formas diferentes: conjugados, pré-fundidos e fundidos. Os híbridos conjugados possuem as unidades farmacofóricas ligadas por um espaçador estável e não necessitam de ação enzimática ou química para apresentar atividade. Quando as unidades farmacofóricas estão ligadas sem a presença de um espaçador, são considerados híbridos fundidos (MORPHY & RANKOVIC, 2005).

Os fármacos planejados para atuar em mais de um alvo terapêutico frequentemente apresentam melhor eficácia, principalmente em etiologias complexas, do que compostos que visam à atuação em um único alvo. Outra vantagem é que compostos híbridos podem possuir melhores propriedades farmacocinéticas do que medicamentos que utilizam a associação de diferentes fármacos (MORPHY, KAY & RANKOVIC, 2004). Portanto, na prática clínica, os compostos híbridos podem diminuir a politerapia e também melhorar a adesão do paciente ao tratamento (WERMUTH, 2004).

O bioisosterismo é um processo racional de modificação molecular na qual baseia-se em um composto líder. Essa estratégia tem sido bastante utilizada em Química Medicinal e em grandes indústrias com sucesso no desenvolvimento de novos fármacos de diversas classes terapêuticas (LIMA; BARREIRO, 2005).

Em 1919, Langmuir estudou o comportamento e a reatividade de moléculas isoeletrônicas, surgindo o conceito de isosterismo, que foi definido como átomos e moléculas orgânicas e inorgânicas que apresentam a mesma quantidade de elétrons. Em 1932, Erlenmeyer propôs que o termo tivesse uma abrangência maior, considerando isósteros como moléculas e átomos que apresentam o mesmo número de elétrons na camada de valência (LIMA; BARREIRO, 2005).

O termo bioisosterismo somente apareceu em 1950, no trabalho de Friedman, que definiu como bioisósteros moléculas que são isósteras e que apresentam atividade biológica similar (LIMA; BARREIRO, 2005; MEANWELL, 2011).

Em 1970, o pesquisador Alfred Burger classificou os bioisósteros em duas categorias: clássicos e não-clássicos. Os bioisósteros clássicos são os átomos, grupos funcionais e subunidade moleculares que apresentam a mesma valência ou que são anéis equivalente. Os bioisósteros que não entram na nessa classificação são considerados não-clássicos (Tabela 2) (LIMA; BARREIRO, 2005).

Tabela 2 - Bioisosterismo clássico e não-clássico

GRUPOS E ÁTOMOS BIOISÓSTEROS CLÁSSICOS						
Monovalentes		Divalentes	Trivalentes	Tetravalentes		
F, OH, NH2, CH3,						
OR, Cl	-CH2-	CH-	C=			
SH, PH2, SiH3, SR	O-	N-	Si=			
Br	S-	P-	N ⁺ =			
I	Se-	As-	P ⁺ =			
	Te-	Sb-	As ⁺ =			
			Sb ⁺ =			
BIOISÓSTEROS NÃO-CLÁSSICOS						
-CO-	-COOH -	-SO2NH2	-H	-CONH-	-COOR-	-
-CO2-	SO3H	-	-F	-NHCO-	-ROCO-	CONH2
-SO-	Tetrazol -	PO(OH)NH2				-
-SO2NR-	SO2NHR		-OH -		catecol	CSNH2
-CON-			CH2OH		-	
-CH(CN)-					Benzimidazol	
-R-S-R-	=N-	-NHCONH2 -				
(R-O-R´)	-C(CN)=	NH-CS-				-C5H4N
R-N(CN)-	-	NH2				-C4H4N
R´	Halogênio					
	-CF3 -CN					

Fonte: BARREIRO; FRAGA, 2008

Essa estratégia de modificação molecular é utilizada visando melhor eficácia terapêutica, seletividade, modificações em propriedades farmacocinéticas e diminuição de toxicidade, através do desenvolvimento de novas substâncias bioativas que apresentam similaridades nas propriedades biológicas do composto líder (BARREIRO; FRAGA, 2008; GALDINO; PITTA, 2011).

2. OBJETIVOS

Este projeto propõe a síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade biológica e mutagênica de compostos inéditos derivados furoxânicos com primaquina (série 1) e derivados furoxânicos com semicarbazida e tiossemicarbazida (série 2) planejados como fármacos com potencial atividade antichagásica.

- Síntese e caracterização estrutural de compostos da série 1 e série 2;
- Avaliação da capacidade de doação de óxido nítrico dos compostos sintetizados;
- Avaliação da citotoxicidade;
- Avaliação *in vitro* da atividade tripanossomicida nas formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*;
- Avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos compostos obtidos;

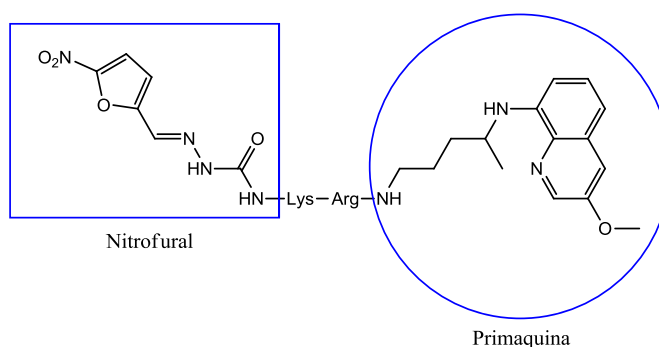
3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

O planejamento estrutural dos compostos das duas séries estão apresentadas na Figura 13. As figuras 14 e 15 mostram as estruturas químicas dos compostos da série 1 e 2, respectivamente.

Série 1:

A porção *N*-óxido dos derivados furoxânicos e benzofuroxânicos é responsável pela atividade biológica de numerosos compostos (tais como antitumoral, antibacteriano, antiparasitário, entre outros) através da capacidade deste de doar óxido nítrico e gerar espécies de radicais livres (CERECETTO et al., 1999). Com base na atividade da primaquina como composto antiparasitário e potencialmente tripanossomicida, este projeto propõe a síntese de novos compostos que apresentam similaridades com pró-fármaco recíproco de primaquina com nitrofural (Figura 20) sintetizado por Chung (1996).

Figura 20 - Pró-fármaco sintetizado por Chung (1996)

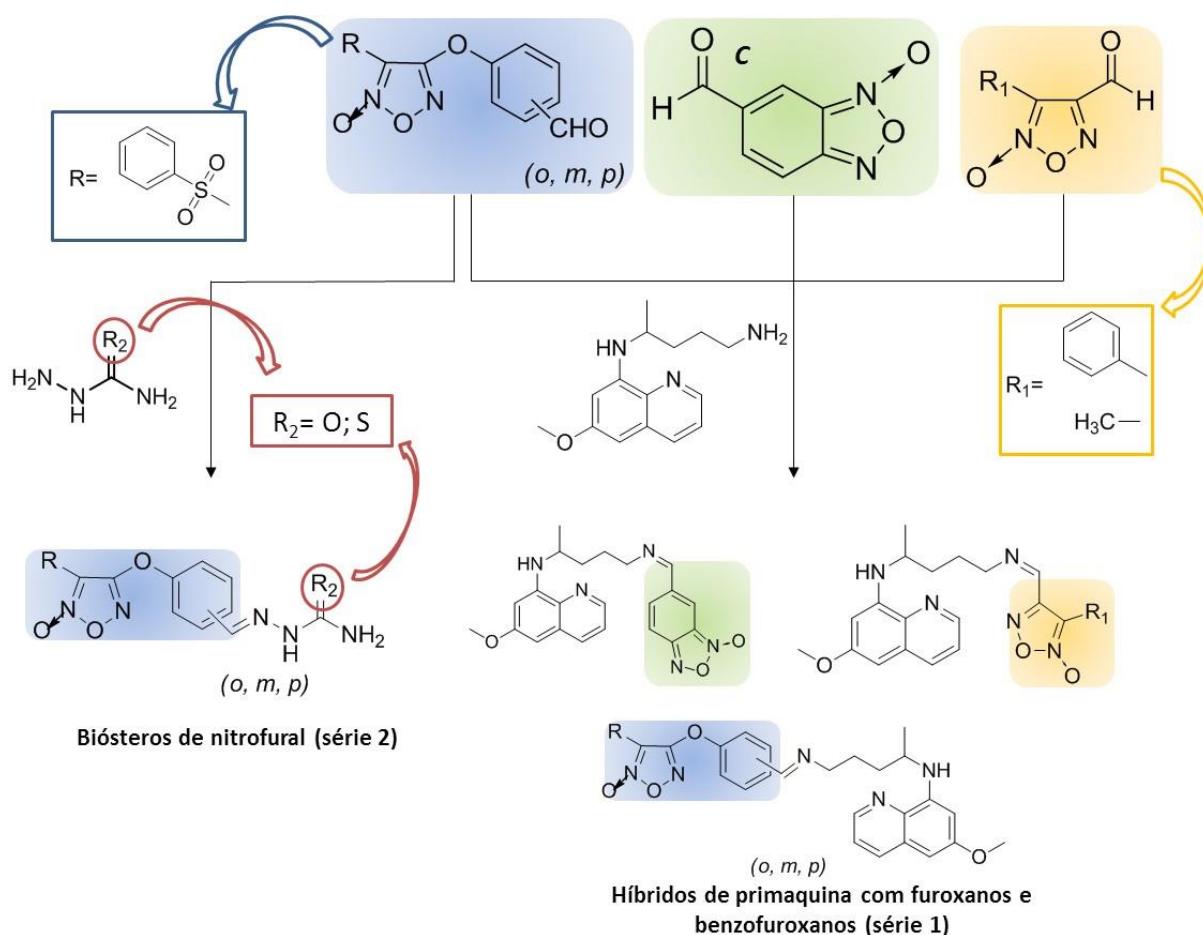


Nos compostos propostos para a série 1, serão substituídos nitrofural pelos furoxânicos e benzofuroxânicos. Esses derivados furoxânicos e benzofuroxânicos serão ligados diretamente na primaquina.

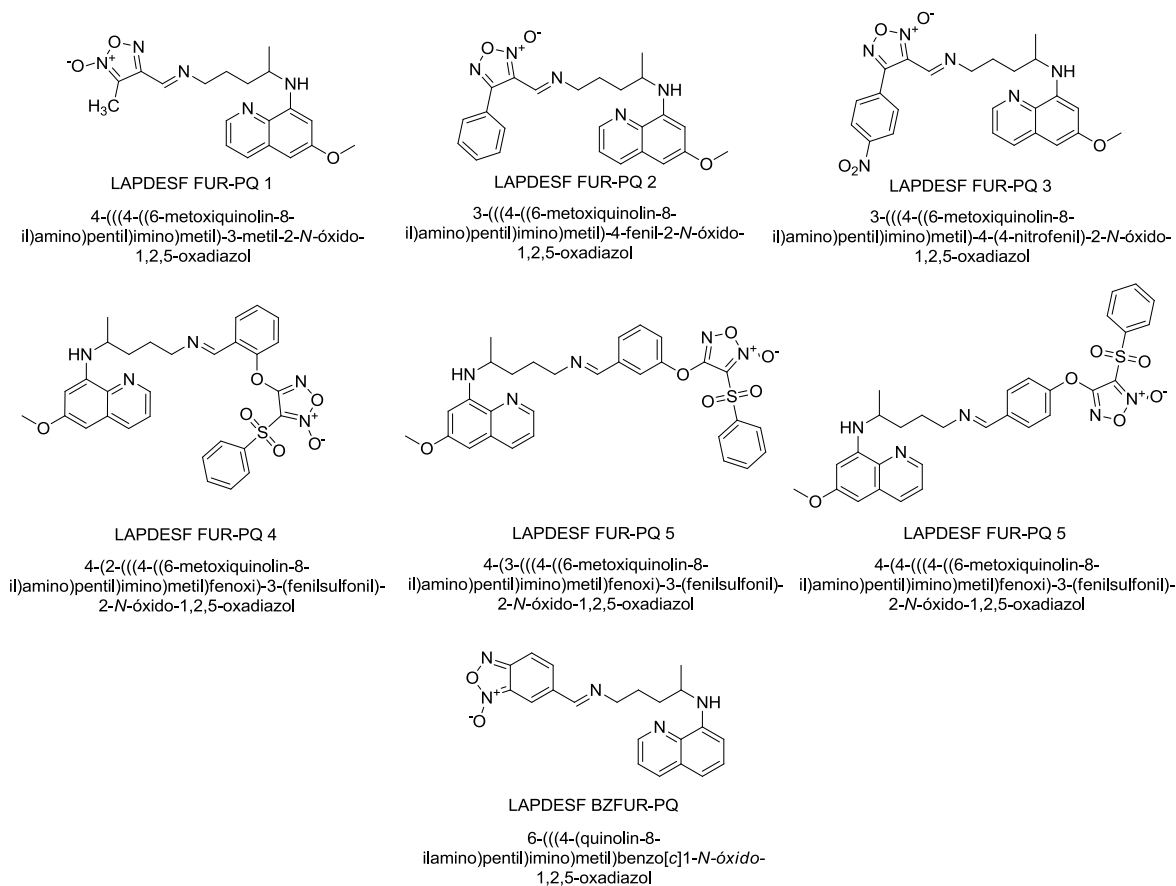
Série 2:

No trabalho de Bosquesi (2013), compostos biosósteros de nitrofurais apresentaram potencial atividade tripanossomicida em formas epimastigota e amastigota do *T. cruzi*. A inclusão de seis compostos no projeto baseou-se no planejamento estrutural utilizando como estratégia de modificação molecular o bioisosterismo, por meio da substituição do núcleo furânico do nitrofurais pelo núcleo 3-(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol, constituindo a série 2.

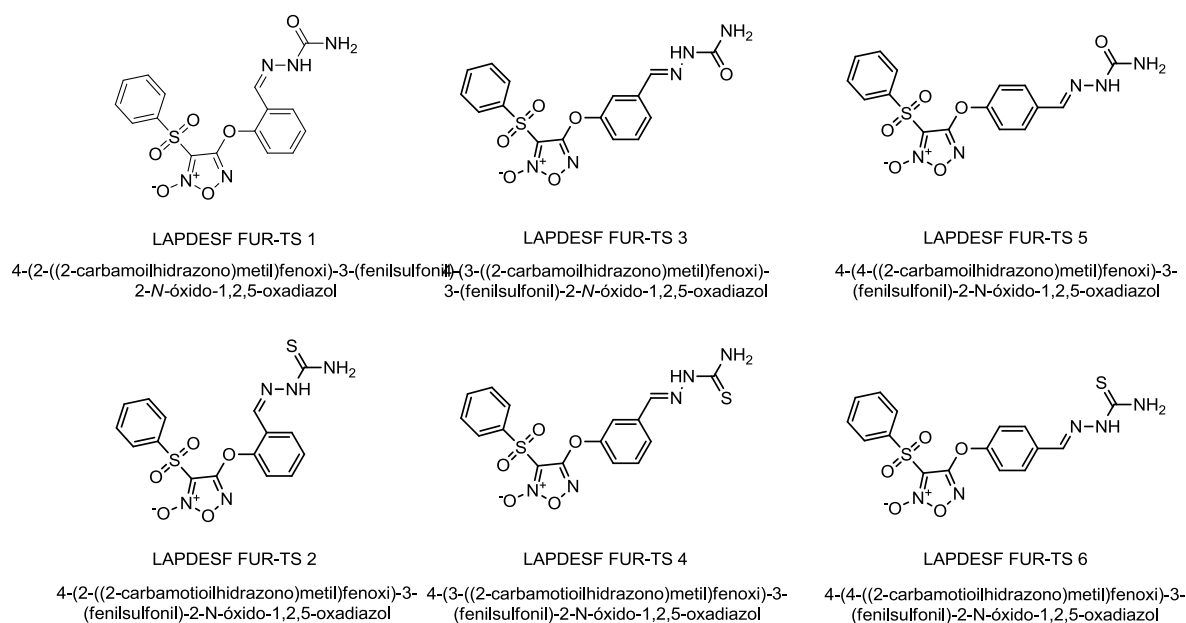
Figura 21 - Planejamento dos compostos propostos



Fonte: Autor

Figura 22 - Estruturas químicas dos compostos da série 1

Fonte: Autor

Figura 23 - Estruturas químicas dos compostos da série 2

Fonte: Autor

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagents e Solventes

- 1,8-diazabicycloundec-7-ene (DBU) (Sigma Aldrich)
- 2,4-dinitrofenilhidrazina (Across)
- 2-hidroxi-benzaldeído (Sigma Aldrich)
- 3-hidroxi-benzaldeído (Sigma Aldrich)
- 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (Sigma Aldrich)
- 4-hidroxi-benzaldeído (Sigma Aldrich)
- acetato de etila P.A. (Quemis)
- acetato de sódio (J.T. Baker)
- ácido acético glacial P.A. (Synth)
- ácido clorídrico P.A. (HCl) (Synth)
- ácido monocloroacético (Fluka)
- ácido nítrico 98% (Vetec)
- água destilada
- álcool cinâmico (Fluka)
- álcool nitrocinâmico (Sigma Aldrich)
- azida de sódio (Merck)
- bicarbonato de sódio (Across)
- cisteína (Sigma Aldrich)
- cloreto de sódio (NaCl) (Sigma Aldrich)
- cloridrato de semicarbazida (Fluka)
- clorocromato de piridíno (PCC) (Sigma Aldrich)

- clorofórmio (CHCl₃) (Quemis)
- crotonaldeído P.A. (Sigma Aldrich)
- diclorometano P.A. (DCM) (Quemis)
- dimetilformamida (DMF) (Quemis)
- dimetilsulfóxido P.A. (DMSO) (Vetec)
- etanol P.A. (Synth)
- éter de petróleo P.A. (Synth)
- éter etílico P.A. (Quemis)
- hexano P.A. (Synth)
- hidróxido de sódio (Merck)
- metanol P.A. (Synth)
- nitrito de sódio (Across)
- primaquina difosfato (Farmanguinhos)
- sílica gel para cromatografia em coluna 40-60 µm (Sigma Aldrich)
- sílica gel para cromatografia em coluna 63-200 µm (Sigma Aldrich)
- sulfato de sódio anidro (Synth)
- tiofenol (Across);
- tiosemicarbazida (Sigma Aldrich)
- tolueno P.A. (Synth)
- trietilamina (J.T. Baker);

4.2. Equipamentos utilizados

- Agitador magnético IKA® modelo C-Mag HS4
- Aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific®

- Balança analítica Marte® - modelo AY 220
- Balança semi-analítica Gehaka® modelo BG 200
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker® modelo DPX-300 operando a 300MHz para ¹H e 75MHz para ¹³C
- Espectrofotômetro no infravermelho Shimadzu® modelo IR Prestige-21; Microscópio
- Rotaevaporador Ika® modelo RV10
- Sonicador Unique® modelo UltraSonic Cleaner

4.3. Métodos Sintéticos

As sínteses dos derivados intermediários furoxânicos (1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido) e benzofuroxânicos (benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol-1-*N*-óxido) foram baseadas nos trabalhos de Cerecetto et al., 2005, Santos, 2009, Bosquesi, 2013 e Dutra, 2013. A metodologia de síntese dos compostos finais de ambas as séries seguem o mecanismo de formação de Bases de Schiff, a qual envolve a reação entre um aldeído e uma amina.

4.4. Métodos Analíticos

4.4.1. Análise cromatográfica em camada delgada

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F₂₅₄ Sigma[®], para o acompanhamento das reações e avaliação dos produtos sintetizados. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm).

4.4.2. Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão (ou decomposição) foram determinadas em aparelho capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific®.

4.4.3. Análise de espectrofotometria de absorção no infravermelho (I.V.)

Os espectros de absorção no infravermelho na região de 4.000 a 400 cm^{-1} , foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro infravermelho IR Prestige-21 da SHIMADZU Corporation.

4.4.4. Análise de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN unidimensionais foram obtidos a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C , utilizando-se solventes deuterados no preparo das amostras (ex. CDCl_3 , DMSO-d_6). Os valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos foram comparados ao de compostos ou subestruturas semelhantes encontrados na literatura, além de analisados sob a ótica dos conhecimentos da Química Orgânica.

4.4.5. Análise de Espectrometria de Massas

As análises de Espectrometria de Massas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo René Pérez González, do Departamento de Física, Química e Biologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente – UNESP. Os espectros de massas com ionização por elétrons (EI-MS) foram obtidos por espectrômetro de massas GC-

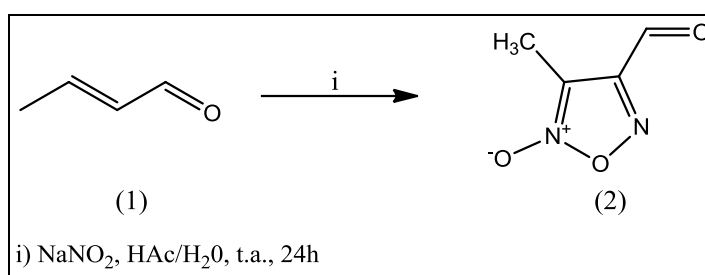
MS Shimadzu QP-2010 plus. Os parâmetros de análise foram: Temperatura da interface: 240°C; Temperatura da câmara de ionização: 300°C; Tempo de corte do solvente: 0.25 min; Tempo inicial da análise: 0.30 min; Tempo final da análise: 25.0 min; Programa de temperatura do introdutor direto: Temperatura inicial: ~ 50°C, taxa de aquecimento de 20°C min⁻¹ até 350°C. As análises foram feitas usando clorofórmio como solvente ou em estado sólido. Os espectros foram obtidos com energia de ionização de 70, 40 ou 30 eV.

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. Procedimento sintético

5.1.1. Síntese do intermediário 4-formil-3-metil-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (2)

Esquema 1 - Síntese do intermediário (2)

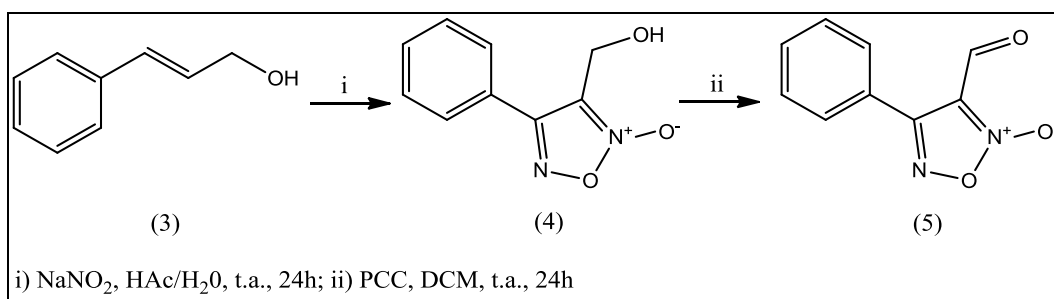


Procedimento:

Em balão de 125 mL foram adicionados 0,071 mol de crotonaldeído (1) e 10 mL de ácido acético glacial e o balão colocado em banho de gelo. Com o auxílio de um funil de adição, foi adicionada a mistura reacional uma solução saturada de nitrito de sódio (0,248 mol), gota a gota, mantendo a temperatura abaixo de 8°C. A reação foi retirada do banho de gelo e mantida sob agitação à temperatura ambiente por 12 horas. Para o isolamento o produto foi diluído em 100 mL de água destilada e foram realizadas extrações com acetato de etila (6 x 50 mL), onde a FO foi seca com sulfato de sódio anidro. A purificação do produto obtido em cada reação foi realizada em cromatografia em coluna (CC) utilizando como fase estacionário: sílica e como fase móvel um sistema solvente gradiente: 100% hexano, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50% hexano:acetato de etila (v/v), 60:40, 70:30, 80:20%, acetato de etila:hexano (v/v), 100% acetato de etila, 50:50% acetato de etila:metanol (v/v), 100% metanol.

5.1.2. Síntese do intermediário 3-formil-4-fenil-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (5)

Esquema 2 - Síntese do intermediário 5



Procedimento:

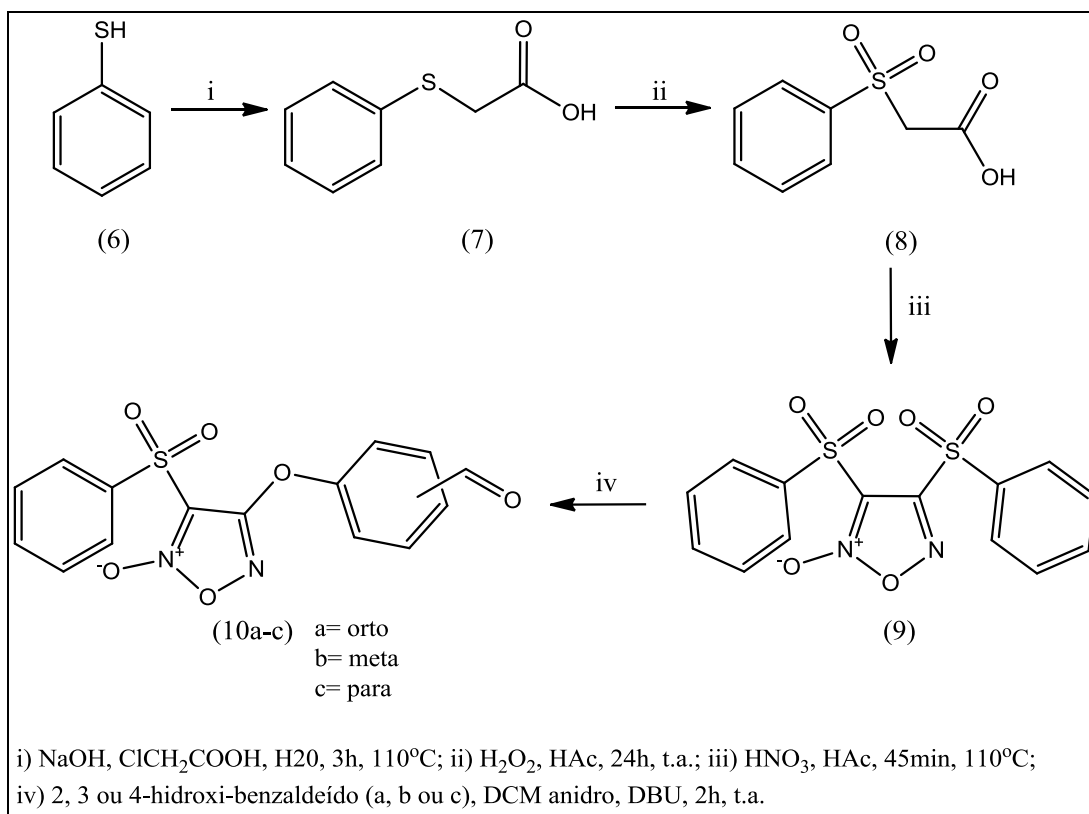
- i) A uma solução de 0,08 mol de álcool trans-cinâmico (3) em 8 mL de ácido acético glacial foi adicionada uma solução saturada de nitrito de sódio (0,22 mol em 35 mL de água), gota a gota, com o auxílio de um funil de adição. Durante a adição, a reação foi mantida em banho de gelo, mantendo a temperatura abaixo de 10° C e posteriormente mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. O produto foi isolado realizando extrações com acetato de etila (7 x 60 mL). Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro a fim de remover resquícios de água, a qual posteriormente foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O intermediário (4) (3-(hidroximetil)-4-fenil-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol) foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como FE sílica gel e FM 5:5 hexano:acetato de etila (v/v). O produto obtido 3-(hidroximetil)-4-fenil-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (4), apresentou-se como um óleo laranja-acastanhado.
- ii) Para a segunda etapa de reação, em um balão de 250mL contendo o intermediário (4) e 20mL de diclorometano anidro foi adicionado 1,45 mol de clorocromato de piridínio (PCC). O meio reacional foi mantido sob agitação magnética por 24 horas a temperatura ambiente. O produto foi isolado diluindo a mistura reacional em 30 mL de água, a qual foi filtrada e extraída com clorofórmio (6 x 50 mL). Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro para remover resquícios de água, a qual posteriormente foi filtrada e o

solvente evaporado. O intermediário (5) foi purificado por cromatografia por coluna, utilizando como fase estacionária sílica gel e fase móvel diclorometano:éter de petróleo 5:5 (v:v) e apresentou-se como um sólido amarelo claro.

iii)

5.1.3. Síntese dos intermediários 4-(formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (10a-c)

Esquema 3 - Síntese dos compostos 10a-c



Procedimento:

- i) Em um balão de duas bocas de 250mL adicionou-se tiofenol (6) (90,7mmol) em 40mL de água destilada. Adicionou-se então 191mmol de hidróxido de sódio (NaOH) e a mistura foi mantida sob agitação por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado lentamente o ácido monocloroacético (99,8mmol). A reação foi mantida em refluxo, a 110°C, sob agitação por 2 horas. Após decorrido o tempo, o meio reacional foi resfriado em banho de gelo e o

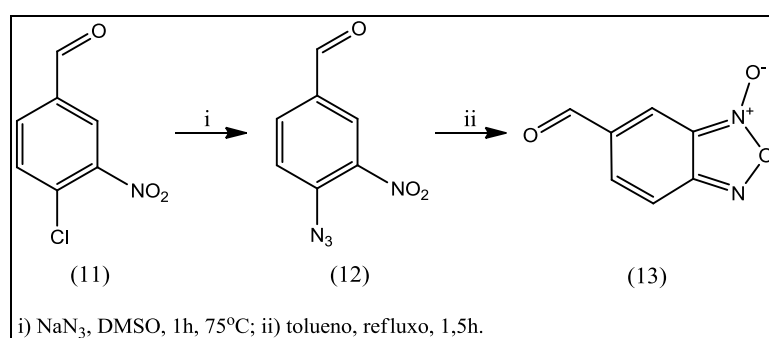
produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado em abundância com etanol gelado. O produto formado foi solubilizado em água destilada e adicionado ácido clorídrico 3M, observando-se a precipitação de um pó branco.

- ii) Em um balão de 250mL foi adicionado 29,7mmol de ácido feniltioacético (7) em 20,0mL de ácido acético glacial. O meio reacional foi mantido em banho de gelo e foi adicionado vagarosamente 15,0mL de peróxido de hidrogênio 30%. A reação foi mantida sob agitação constante e temperatura ambiente por 24 horas. Para o isolamento do produto, 100mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) foi adicionado ao meio reacional e realizada extrações utilizando acetato de etila (4 x 15mL). Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro para retirar resíduos de água e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida.
- iii) Foi adicionado em um balão de 125mL, 16,03mmol do ácido fenilsulfonilacético (8) e 10mL de ácido acético glacial. A reação foi resfriada a 0°C e mantida em banho de gelo. Após, adicionou-se lentamente 5mL de ácido nítrico fumegante 85,7%. A mistura foi mantida em agitação no banho de gelo durante 5 minutos e depois em refluxo a 110°C por 45 minutos. Decorrido o tempo de reação, o meio reacional foi esfriado e adicionou-se água destilada gelada. Houve formação de precipitado que foi filtrado e lavado com água destilada gelada. O precipitado foi recristalizado em uma mistura de acetato de etila/diclorometano/hexano (1:1:1).
- iv) Foi adicionado em um balão de 50ml, 5,46mmol de 2, 3 ou 4-hidroxi-benzaldeído em 15ml de diclorometano anidro. Após, adicionou-se 5,46mmol de 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU) e o meio reacional mantido sob agitação por 15 minutos. Decorrido o tempo, foi adicionado 2,73 mmol do 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (9), mantendo-se sob agitação constante a temperatura ambiente por 2 horas. Para o isolamento do produto, realizou-se extração com solução saturada de bicarbonato de

sódio (NaHCO_3) (5x30ml). A purificação foi realizada com cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária sílica gel e fase móvel diclorometano:éter de petróleo (8:2).

5.1.4. Síntese do intermediário 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (13)

Esquema 4 - Síntese do composto 13



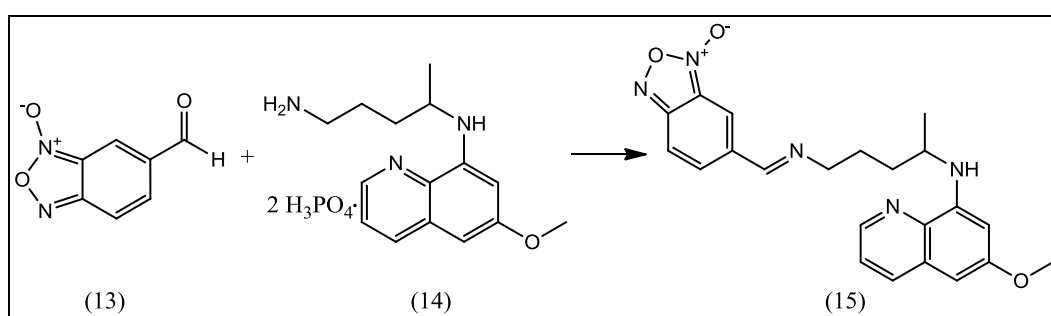
Procedimento:

- i) Em um balão reacional, foi adicionado a uma solução contendo 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (11) (0,054 mol) e 30mL de dimetilsulfóxido (DMSO) azida de sódio (0,054 mol) em pequenas porções para que a temperatura não ultrapassasse 80° C. Ao término da adição, a mistura foi aquecida a 75° C e deixou-se reagir por 1 hora. Decorrido este tempo, adicionou-se gelo à mistura reacional e a fase aquosa foi extraída com éter etílico (6 x 70mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, para eliminação de resquícios de água, que foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O produto 4-azido-3-nitrobenzaldeído (12) foi obtido e apresentou-se como um sólido amarelo acastanhado.
- ii) O composto 12 foi dissolvido em 50mL de tolueno e permaneceu em refluxo por 90 minutos. O solvente foi evaporado e foi adicionado 40mL de acetato de etila juntamente

com carvão ativado. A mistura foi filtrada, o volume do solvente foi diminuído e então acrescentou-se 50mL de éter de petróleo, ocasionando a precipitação do produto. O produto foi filtrado apresentando-se como um sólido amarelo ouro.

5.1.5. Síntese do composto final LAPDESF BZFUR-PQ (15)

Esquema 5 - Síntese do composto 15



Procedimento:

Tabela 3 - Condições reacionais testadas

Reação	Solvente	pH solução de primaquina	pH mistura reacional	Temperatura
A	Etanol	8,0	4,5	Ambiente
B	Diclorometano	8,0	4,5	Ambiente
C	Diclorometano	10,0	4,5	Ambiente
D	Diclorometano	10,0	8,0	Ambiente
E	Dimetilformamida	8,0	4,5	Ambiente

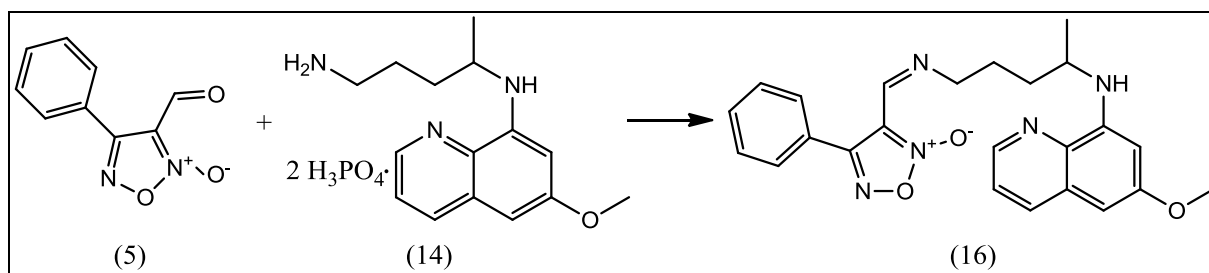
Fonte: dados da pesquisa

Em um balão reacional foi adicionado 1,22mmol do intermediário 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (13) e 5ml de solvente (etanol, diclorometano ou dimetilformamida). Separadamente, suspender 1,44mmol de primaquina difosfato (14) em 15ml de solvente. A essa suspensão foi adicionado trietilamina até o pH desejado (8 ou 10). A mistura foi adicionada, gota a gota, no balão reacional. Ao fim da adição, o pH foi ajustado para 4,5 utilizando-se ácido acético glacial. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada

delgada (CCD) utilizado como fase estacionária sílica gel e diferentes fases móveis. O tempo de reação foi de 48h.

5.1.6. Síntese do composto final LAPDESF FUR-PQ 2 (16)

Esquema 6 - Síntese do composto 16



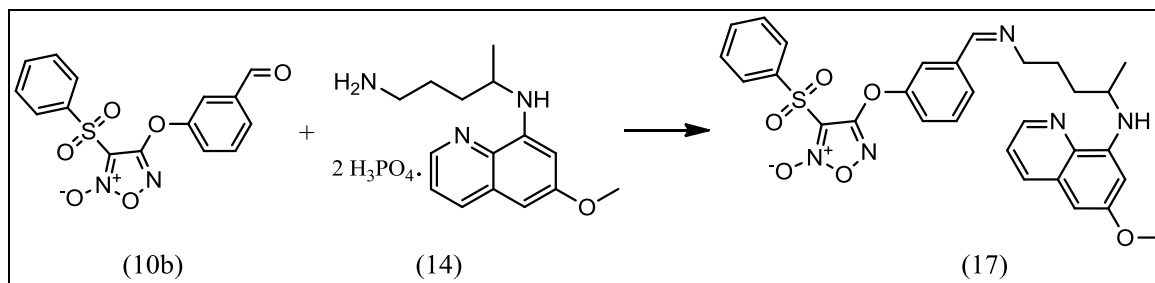
Procedimento:

Para a tentativa de síntese do composto (16), utilizou-se as condições da reação C, descrita na Tabela 3.

Foi adicionado em um balão reacional 1,22mmol do intermediário 3-formil-4-fenil-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (5) e 5ml de diclorometano. Separadamente, foi preparada uma suspensão de 1,44mmol de primaquina difosfato (14) e 15ml de solvente, na qual foi adicionado trietilamina até o pH 10. A solução obtida foi adicionada, gota a gota, no balão reacional. Ao fim da adição, o pH foi ajustado para 4,5 utilizando-se ácido acético glacial. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizado como fase estacionária sílica gel e diferentes fases móveis. O tempo de reação foi de 48h.

5.1.7. Síntese do composto final LAPDESF FUR-PQ 6 (17)

Esquema 7 - Síntese do composto 17



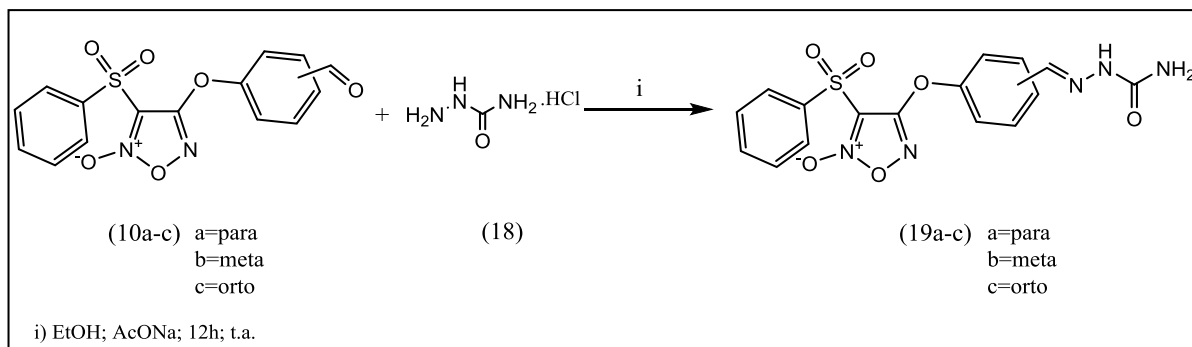
Procedimento:

Para a tentativa de síntese do composto (16), utilizou-se as condições da reação C, descrita na Tabela 3.

Foi adicionado em um balão reacional 1,22mmol do intermediário 4-(3-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (10b) e 5ml de diclorometano. Separadamente, foi preparada uma suspensão de 1,44mmol de primaquina difosfato (14) e 15ml de diclorometano, na qual foi adicionado trietilamina até o pH 10. A solução obtida foi adicionada, gota a gota, no balão reacional. Ao fim da adição, o pH foi ajustado para 4,5 utilizando-se ácido acético glacial. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizado como fase estacionária sílica gel e diferentes fases móveis. O tempo de reação foi de 48h.

5.1.8. Síntese dos compostos finais LAPDESF FUR-TS 1, FUR-TS 3 e FUR-TS 5 (19a-c)

Esquema 8 - Síntese dos compostos 19a, 19b e 19c

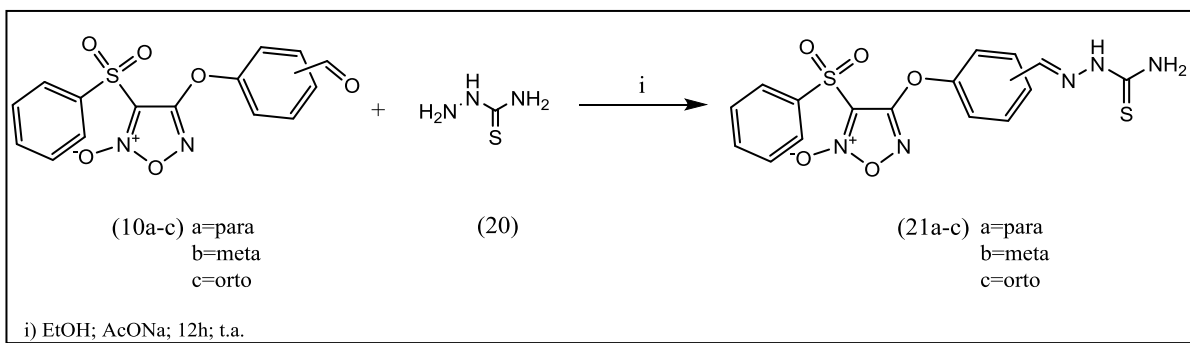


Procedimento:

Adicionou-se em um balão reacional de 25ml 0,58mmol dos intermediários 10a, 10b ou 10c e 15ml de etanol para formar uma suspensão. Separadamente, 0,87mmol de cloridrato de semicarbazida (18) foi solubilizada em 2ml de água destilada. A solução foi adicionada lentamente ao balão. Ao fim da adição, o pH do meio reacional foi ajustado entre 4,5 – 5 adicionando-se acetato de sódio (CH_3COONa). A reação acompanhada por CCD utilizando sílica gel como fase estacionária e fase móvel diclorometano:metanol 98:2 (v/v) e mantida sob agitação por 12h. O produto formado foi filtrado a vácuo e lavado com etanol gelado.

5.1.9. Síntese dos compostos finais LAPDESF FUR-TS 2, FUR-TS 4 e FUR-TS 6 (21a-c)

Esquema 9 - Síntese do composto 21a, 21b e 21c



Procedimento:

Em um balão de 25ml, foi adicionado 0,58mmol dos intermediários 10a, 10b ou 10c em 15 ml de etanol para formar uma suspensão. Separadamente, 0,87mmol de tiossemicarbazida (20) foi solubilizada em 2ml de água destilada e duas gotas de ácido clorídrico 37%. A solução foi adicionada lentamente ao balão. Ao fim da adição, o pH do meio reacional foi ajustado entre 4,5 – 5 adicionando-se acetato de sódio (AcONa). A reação foi acompanhada por CCD utilizando sílica gel como fase estacionária e fase móvel diclorometano:metanol 98:2 (v/v) e mantida sob agitação por 12h. O produto formado foi filtrado a vácuo e lavado com etanol gelado.

5.2. Ensaaios

5.2.1. Avaliação *in vitro* da atividade tripanossomicida em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A avaliação da atividade tripanossomicida em formas epimastigotas de *T. cruzi* dos compostos sintetizados foi realizada no laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Departamento de Ciências Biológicas, com a colaboração da Prof. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli.

5.2.1.1. Cultivo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A cultura cepa Y de *T. cruzi* foi mantida em meio LIT (Liver Infusion Tryptose), cuja composição era: NaCl 68,4 mM KCl 5,4 mM; Na₂HPO₄ 56,3 mM; dextrose 111 mM e infusão de fígado Broth 0,3%, Tryptose 0,5% e Haemin 25 mg/L. Após observar ausência de contaminação na cultura de *T. cruzi*, os parasitas foram tratados, adicionando em tubo de 1,5 mL, 0,5 µL de formol (imobilização dos parasitas), 19 µL de meio de cultura; 1 µL de parasita (diluição 1:20) para contagem em câmara de Neubauer.

5.2.1.2. Preparo das soluções dos compostos a serem testados pelo método colorimétrico utilizando MTT

O teste colorimétrico utilizando MTT foi descrito por Muelas-Serrano et al. (2000), utilizando formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y).

Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno (placas de Elisa)

com 96 poços estéreis e com tampa (placas de Elisa), na câmara de fluxo laminar. Para cada placa foram ensaiados 2 compostos. A Figura 24 representa a placa de Elisa de 96 poços.

Figura 24 - Representação da placa utilizada para ensaio de atividade

	Composto 1						Composto 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	substância, meio de cultura com parasita (10^7 parasitas por mL)
	substância e meio de cultura (branco)
	parasitas
	meio de cultura

Para o teste foram colocados 3 μ L da substância em cada concentração desejada (concentrações finais): A= 100 μ g/mL; B= 50 μ g/mL; C=25 μ g/mL; D=10 μ g/mL; E=5 μ g/mL; F=2,5 μ g/mL; G=1 μ g/mL; H= controle sem substância, não ultrapassando o

limite de 3% de DMSO, uma vez que porcentagens superiores mostram-se tóxicas para o parasita.

Foram adicionados 3 µL de cada uma das concentrações nos poços (fileiras A a G, colunas 1 a 6). A seguir adiciona-se 97 µl de meio LIT contendo as formas epimastigotas de *T. cruzi* (fase log) nas colunas 1, 2 e 3 e apenas 97 µl de meio LIT nas colunas 4, 5 e 6. A fileira H corresponde aos seguintes controles: colunas 1 a 3 contendo somente parasitas, sem substância; colunas 4 a 6 contendo somente meio de cultura, sem substância.

A placa foi incubada em câmara úmida a 28 °C por 72 horas. A seguir, adicionou-se 10µL de solução MTT/PMS (2,5 mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS) em todos os poços e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 75 minutos a 28° C, quando ocorre a redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] em um produto colorido, formazan, através da ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias. O PMS (metanossulfonato de fenazina) foi empregado como carregador intermediário de elétrons para intensificar a reação de redução durante a incubação, e consequentemente, o desenvolvimento de coloração (DUTTA et al., 2005).

Colocou-se então 100 µL da solução 10% SDS-0,01N HCl, com o objetivo de dissolver os cristais de formazan, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz.

A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA – BioRad) a 595 nm e os resultados foram obtidos em absorvância. O IC₅₀ (concentração capaz de matar 50% dos parasitas) foi calculado a partir da regressão linear dos valores obtidos espectrofotometricamente.

5.2.2. Avaliação da citotoxicidade em macrófagos e atividade tripanossomicida em formas amastigota intracelular de *Trypanosoma cruzi*

5.2.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos adultos *Swiss albino* (20 – 35 g). Eles estavam alojados em gaiolas sobre ciclo claro-escuro (12h/12h) em um biotério com temperatura controlada (22±2°C). Os animais não foram privados de ração e água. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os guias atuais de cuidados de animais de laboratório e guias éticos para experimentos em animais.

5.2.2.2. Obtenção de macrófagos

Os animais foram previamente inoculados, por via intraperitoneal (IP), com 3mL de solução de tioglicolato de sódio a 3%. Decorridas 72 horas de estímulo, os animais foram eutanasiados, em câmara de CO₂. O peritônio foi então exposto em fluxo laminar para a retirada do exsudato peritoneal. Em seguida, foram administrados 5,0mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. Após aguardar cinco minutos, massageando por um minuto o peritônio, para desprendimento dos macrófagos, e o exsudato foi coletado com uma pipeta de Pasteur e dispensado em tubo cônico estéril para preparo da suspensão celular.

As células retiradas do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5,0mL de solução PBS e centrifugadas (400xg/10 minutos), em temperatura ambiente. As células sedimentadas foram então ressuspensas em meio de cultura RPMI completo, contendo 10% de FBS, 2-mercaptoetanol (2x10⁻⁵M), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100UI/mL). O número de células foi determinado utilizando-se câmara hemocitométrica de Neubauer, e azul

de tripan como corante.

5.2.2.3. Determinação da citotoxicidade em macrófagos (SANTOS, 2012)

Utilizou-se como ensaio para determinação da viabilidade celular pelo método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em microplaca de 96 poços. As células obtidas no exsudato peritoneal dos camundongos foram incubadas na microplaca de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células, no meio RPMI completo, durante 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse tempo, foi realizada a troca do meio e adicionado os compostos LAPDES Fur-TS 1-5 em diferentes concentrações e nova incubação por 24 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, 100µL de solução de MTT (2.5 mg/mL) foi adicionado em cada um dos poços. A placa é então incubada por 3 horas a sob as mesmas condições. Após esse período, os cristais de formazan foram dissolvidos em 100µL de álcool isopropílico e a leitura da absorbância foi realizada utilizando-se espectrofotômetro UV/Visível com comprimento de onda (λ) de 595 nm. Utiliza-se como controle positivo células e controle negativo meio de cultura. Os resultados foram apresentados como IC₅₀, que é a concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%.

5.2.2.4. Cultura de parasita

As formas tripomastigotas do *T. cruzi*, cepa Y são mantidas “in vitro” em meio de cultura liver-infusion tryptose (LIT) e “in vivo” em camundongos Swiss, no laboratório de parasitologia da Faculdade de Ciencias Farmacêuticas – UNESP – Araraquara.

5.2.2.5. Avaliação da atividade tripanossomicida em formas amastigotas intracelular de *T. cruzi*

Os macrófagos obtidos foram plaqueados na concentração de 3×10^5 células por poço, em lamínulas redondas (13 mm de diâmetro), previamente colocadas em placas de 24 poços, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS. As placas foram deixadas para aderência do macrófago por 4 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após, os macrófagos aderidos foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* em fase estacionária de crescimento, na proporção de 10:1 (parasitas:macrófago) e incubados por 24 horas nas mesmas condições descritas anteriormente. O meio foi descartado e adicionado 500 µL de meio RPMI e tratados com diferentes concentrações dos compostos LAPDES Fur-TS 1 – 6, sendo incubados por 24 horas nas condições já descritas. Após decorrido o tempo, o meio foi descartado, foi feita uma lavagem com PBS e então adicionado 300 µL de metanol, para fixar os macrófagos nas lamínulas por cinco minutos, retirado e depois as lamínulas foram coradas com corante Giemsa. Após secagem, as lamínulas foram fixadas em lâminas com resina.

O índice de infecção é determinado pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pela média de amastigotas intracelular por célula infectada. A concentração que causa diminuição de 50% no índice de infecção comparado ao controle é determinada por análise de regressão linear dos dados transformados em logarítimo.

5.2.3. Detecção quantitativa de nitrito (SORBA et al., 1997)

Uma solução dos respectivos compostos finais, intermediários e padrão (20 µL) em DMSO foi adicionada a tubos contendo 3 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) na na

presença de 5 mM de cisteína. A concentração final do composto em cada tubo foi de $10^{-4}M$. Estas soluções foram mantidas a uma temperatura de 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, essas soluções foram tratadas com 750 µL do reagente de Griess. Após 10 minutos a temperatura ambiente para que ocorresse a reação, mediu-se a absorbância em 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes em dias distintos. Os resultados foram expressos como porcentagem nitrito (NO_2^-) mol/mol $\pm$ erro padrão da média.

5.2.3.1. Preparação do tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) contendo 5 mM de cisteína

Em 80 mL de água destilada solubilizou-se 0,68 g de fosfato de potássio monobásico e 600 mg (5 mM) de cisteína. O pH da solução foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio 10% ou ácido clorídrico 10%. O volume foi completado, em balão volumétrico, para 100 mL com água destilada e o balão foi protegido da luz.

5.2.3.2. Preparação do reagente de Griess

Em balão volumétrico de 50 mL adicionou-se 2 g de sulfonamida, 0,1 g de dicloridrato de *N*-naftiletilenodiamina, 10 mL de água destilada e 5 mL de ácido fosfórico. O volume final do balão foi completado para 50 mL.

5.2.3.3. Preparação da curva analítica

Para construção da curva analítica foram preparadas soluções-padrão de nitrito de sódio nas concentrações de 0,5-80 nmol/mL. Após adição de reagente de Griess, a mistura foi

mantida em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. Os valores de absorbância foram medidos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

5.2.4. Avaliação in vivo da mutagenicidade dos compostos sintetizados pelo teste de micronúcleo

Para a avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos compostos sintetizados e padrões utilizou-se camundongos machos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino) com aproximadamente 30g de peso corpóreo, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – Unesp. Os animais foram mantidos em gaiolas durante o período de tratamento, com água e alimento *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23 ± 2 °C.

Para os tratamentos foram utilizados grupos de 5 animais. Cada grupo recebeu 25, 50 e 100 mg/Kg dos compostos sintetizados via gavagem. Foi estabelecido um grupo controle positivo, no qual os animais foram tratados via intraperitoneal com ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.). O grupo controle negativo recebeu via gavagem 0,3 ml da suspensão de goma arábica 5% e o grupo controle branco foi tratado apenas com água.

5.2.4.1. Preparo das lâminas com laranja de acridina (acridine orange)

As lâminas (bem limpas) foram aquecidas em uma placa aquecedora a aproximadamente 70 °C. Com as lâminas quentes, colocou-se 10 µL de solução de laranja de acridina (1 mg/ml) sobre a lâmina e fez-se o espalhamento utilizando a extremidade de outra lâmina bem limpa. As lâminas foram secas ao ar e guardadas em caixa apropriada, a temperatura ambiente, em local escuro, por pelo menos 24h.

5.2.4.2. Obtenção do sangue e preparo das células

Com o auxílio de uma agulha, perfurou-se a cauda do animal, coletando-se 10 µL de sangue (uma gota) e depositando-o no centro da lâmina previamente preparada com laranja de acridina, cobrindo-a com lamínula. As lâminas com o material biológico foram mantidas a – 20 °C e no escuro por no mínimo 24 horas antes da análise citológica, propiciando uma melhor ação do corante.

A análise citológica das lâminas contendo o sangue periférico dos animais foi efetuada o mais rápido possível, para evitar a deterioração do material. Esta análise deve ser realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488 nm) e filtro amarelo. Foram contados 2000 reticulócitos por animal e anotadas as frequências de células micronucleadas.

5.2.4.3. Análise estatística dos resultados

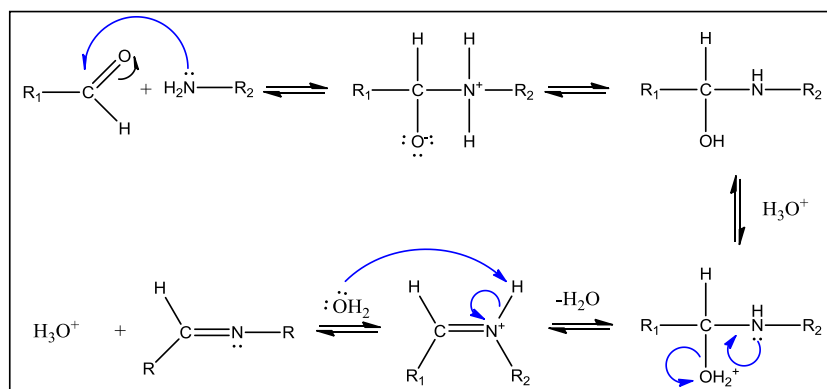
Após a análise citológica das lâminas contendo amostras do sangue periférico dos camundongos tratados com os compostos, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios padrão para cada um dos grupos de tratamento. A partir destes resultados foi aplicado um teste de Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico PRISMA.

6. RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

6.1. Síntese dos compostos da série 1 e série 2

A formação dos compostos das séries 1 e 2 baseou-se no mecanismo de formação de Bases de Schiff, ou seja, formação do grupamento imina. O método mais utilizado para a síntese de iminas é através da reação de aldeídos e aminas primárias. É uma reação catalisada por ácido que ocorre em duas etapas. A primeira etapa consiste no ataque nucleofílico a carbonila da função aldeído pela amina, formando um intermediário tetraédrico neutro, chamado de carbonilamina, que se mantém em equilíbrio entre suas duas formas protonadas. A segunda etapa consiste em uma reação de eliminação, na qual o intermediário quaternário perde uma molécula de água (SOLOMONS, 2011; BRUICE, 2004) (Esquema 10).

Esquema 10 - Mecanismo de formação de iminas a partir da reação entre aldeídos e aminas



Fonte: Adaptado de Solomons, 2011

Para a síntese dos compostos propostos, prepararam-se os respectivos intermediários aldeídos previamente sintetizados e caracterizados por Santos (2009), Bosquesi (2013) e Dutra (2013), sendo a identificação estrutural dos compostos comparada com os dados obtidos da literatura.

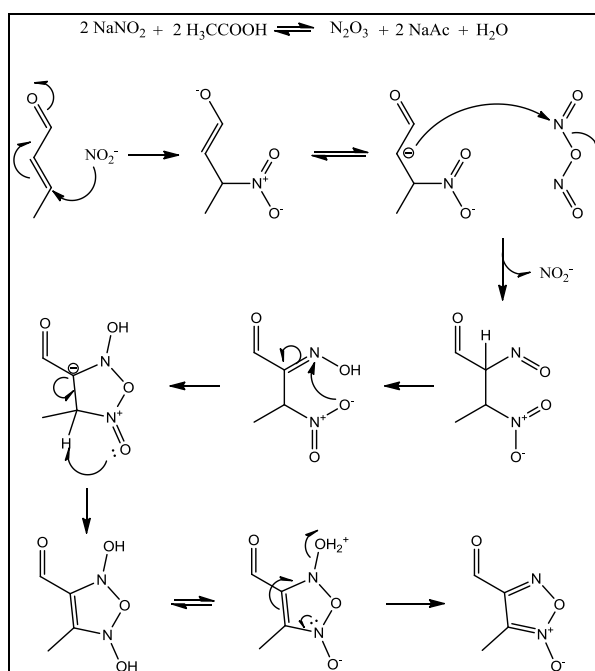
6.1.1. Síntese dos derivados furoxânicos e benzofuroxânicos

Schonaefinger (1999), descreve que as vias sintéticas mais frequentemente utilizadas para preparação do núcleo N-óxido-1,2,5-oxadiazol são: a) Oxidação de [KS2][KS3]dioximas com reagentes como hipoclorito de sódio ou $K_3Fe(CN)_6$; b) Termólise de o-nitrozidas; c) dimerização de nitrilas N-óxidos; d) Oxidação de o-amino-nitroderivados; e) Reação de alcenos com N_2O_3 .

6.1.1.1. Síntese do intermediário 4-formil-3-metil-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (2)

O mecanismo de formação do núcleo furoxânico neste composto está descrito no Esquema 11, segundo Santos (2009). A síntese ocorreu da reação do crotonaldeído com nitrito de sódio em ácido acético glacial, conforme metodologia descrita no item 5.1.1.

Esquema 11 - Mecanismo de formação do composto 2

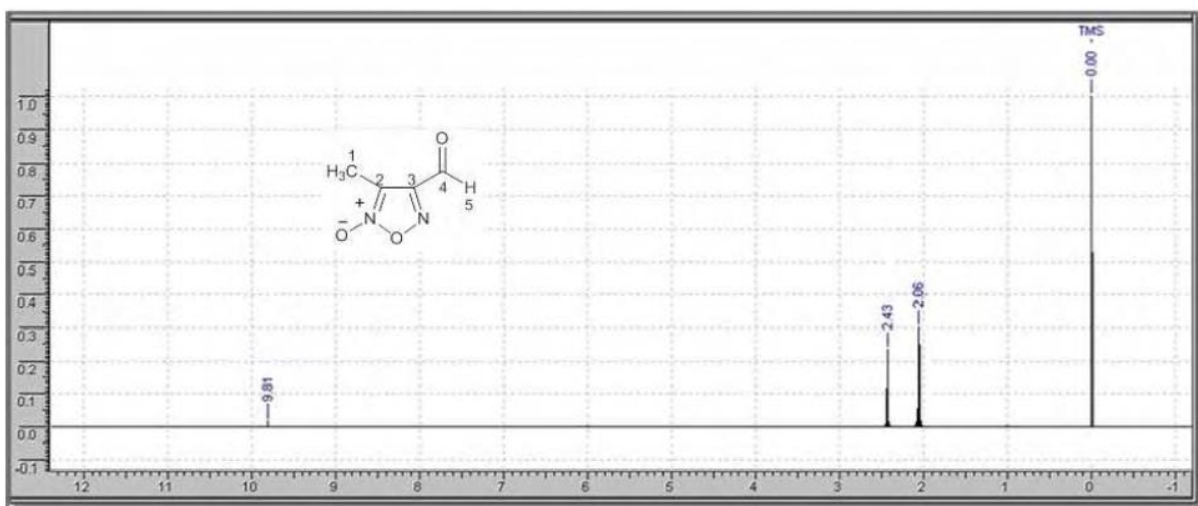


Fonte: Adaptado de Santos, 2009

O produto formado foi obtido como um óleo laranja acastanhado e apresentou baixos rendimentos globais, abaixo de 20%, após purificação por cromatografia por coluna. O baixo rendimento pode ser explicado pelo fato dos subprodutos formados durante a reação possuir fator de retenção (R_f) muito próximo do produto formado, que apresenta um $R_f = 0,125$, sendo o mesmo revelado com 2,4- dinitrofenilhidrazina (Revelador de Brady), que reage com aldeídos por condensação, sendo o produto formado de cor amarela alaranjado. Após a purificação, o produto foi caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C .

O espectro de RMN ^1H (Espectro 1) apresentou um singlete com deslocamento em δ 9,81 ppm, integrando para um hidrogênio, referente ao hidrogênio 5 da função aldeído. Também apresentou um singlete com deslocamento em δ 2,43, integrando para três hidrogênios, referente aos hidrogênios da metila, na posição 1.

Espectro 1 - Espectro de RMN ^1H do composto 2 (300MHz; acetona)

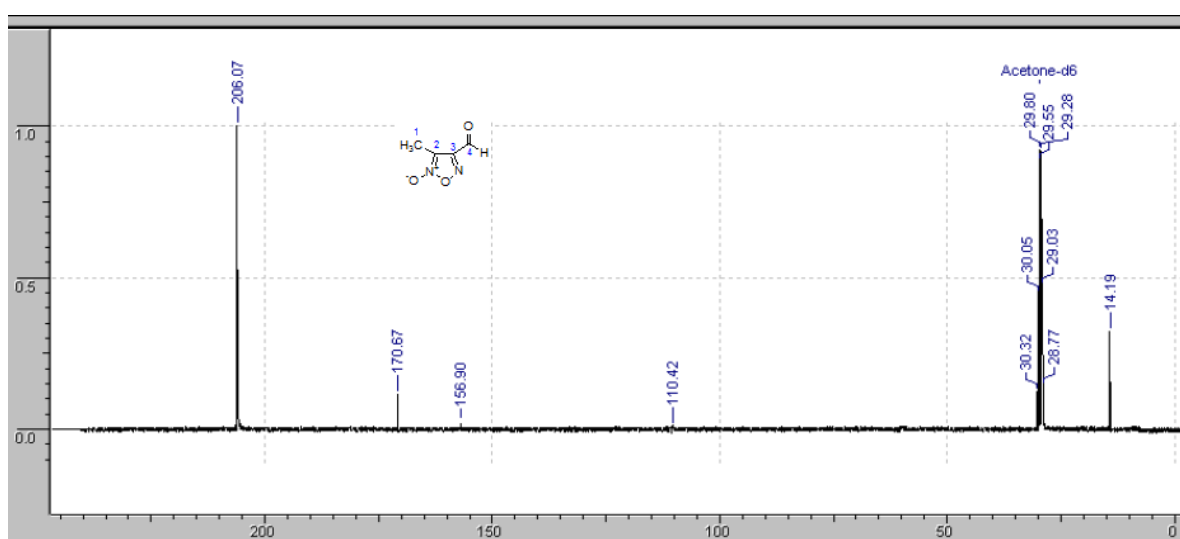


Fonte: dados da pesquisa

No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 2) observa-se os seguintes sinais e seus respectivos carbonos: δ 170,67 (C4); 156,9 (C3); 110,42 (C2); 14,19(C1) ppm. Destacam-se os sinais referentes ao deslocamento químico da carbonila do aldeído (C4) e o carbono da

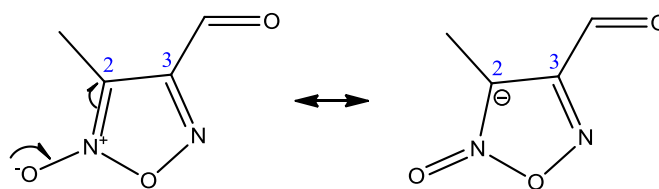
metila (C1). Os sinais observados nos deslocamentos químicos referentes ao C2 e C3 correspondem aos carbonos do anel furoxânico. Essa diferença de deslocamento químico entre esses carbonos existe devido ao efeito protetor que o oxigênio da subunidade *N*-óxido realiza no carbono 2, que ocorre pelo efeito ressonante, conforme mostrado na Figura 25 (CERECETTO et al., 1999; SANTOS, 2009).

Espectro 2 - Espectro do RMN ^{13}C do composto 2 (75MHz, acetona)



Fonte: dados da pesquisa

Figura 25 - Efeito protetor em C2 devido a presença da subunidade *N*-óxido

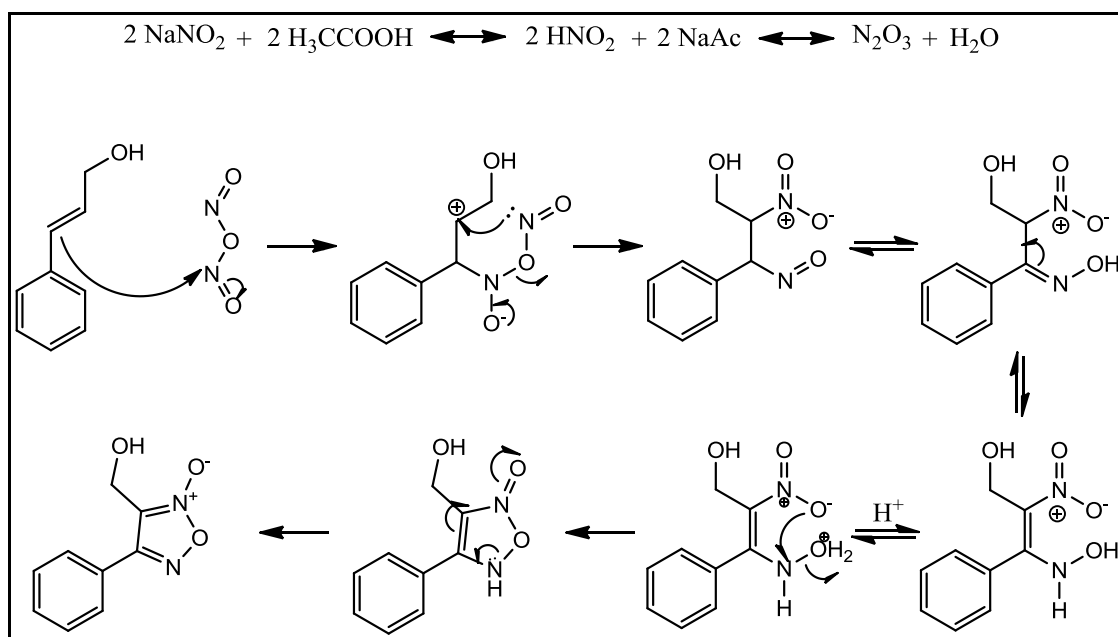


Fonte: Adaptado de Santos, 2009

6.1.1.2. Síntese do intermediário 3-formil-4-fenil-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (5)

A síntese para obtenção do composto 5 ocorreu através de duas etapas sintéticas. Na primeira, o álcool cinâmico foi reagido com o nitrito de sódio em meio ácido para a formação do composto 4, conforme descrito no sub-item (i) do item 5.2. O mecanismo da formação do núcleo furoxânico, de acordo com Santos (2009), ocorre da mesma maneira do composto 2, por reações entre um alceno e o trióxido de nitrogênio (N_2O_3). A hidroxila presente auxilia na estabilização da carga negativa do oxigênio, através de ligação de hidrogênio intramolecular (Esquema 12).

Esquema 12 - Mecanismo de formação do composto 4

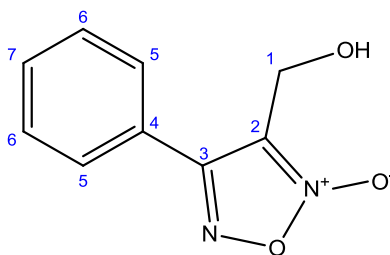


Fonte: Adaptado de Santos, 2009

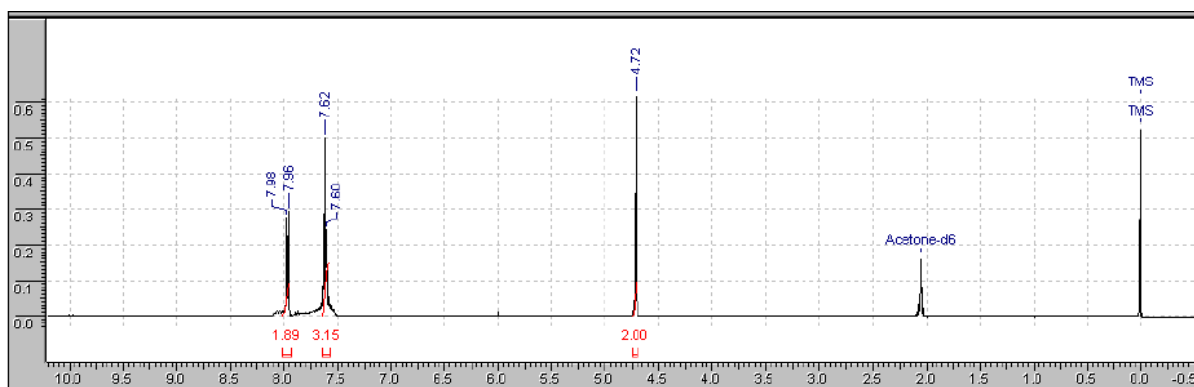
O produto foi purificado por cromatografia em coluna e o produto apresentou-se com sólido amarelo. O rendimento após a purificação foi de 70%. O composto foi analisado por

CCD e apresentou $R_f=0,8$. A caracterização química foi realizada através de espectrometria de RMN ^1H e ^{13}C .

O espectro de RMN de ^1H (Espectro 3) apresenta deslocamentos químicos em δ 7,97 (m; H5; 2H); 7,81 (m; H6 e H7; 3H); 4,72 (s; H1; 2H) ppm.

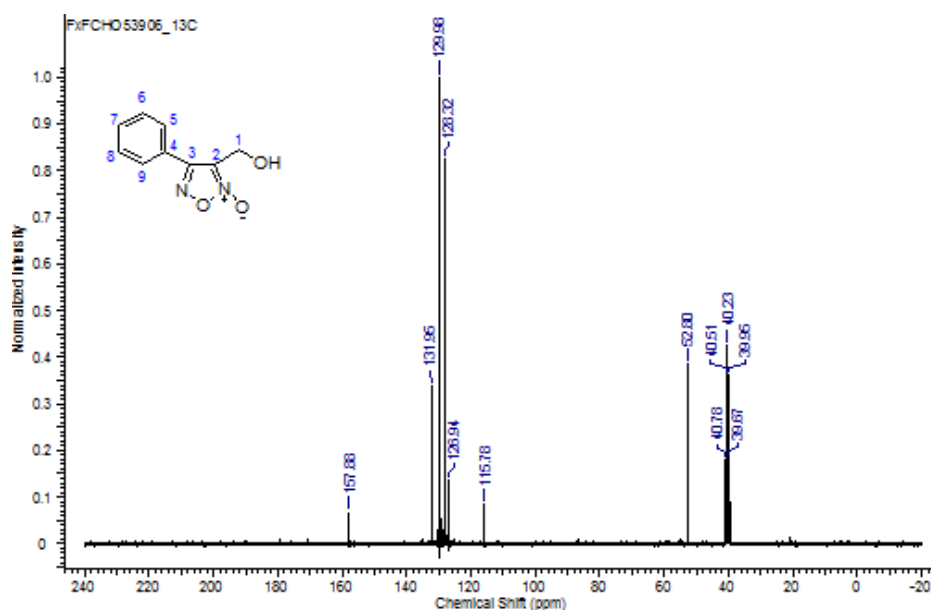


Espectro 3 - RMN ^1H do composto 4 (400 MHz; acetona)



Fonte: dados da pesquisa

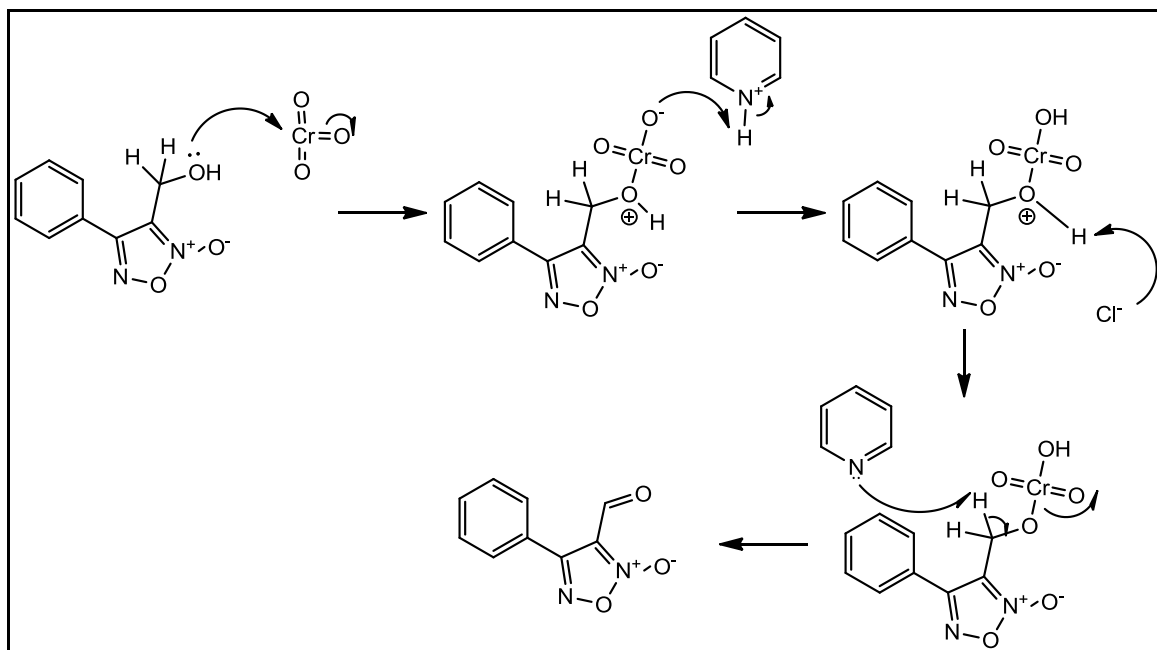
O espectro de RMN ^{13}C obtido para o composto 4 (Espectro 4) apresenta sinais de deslocamentos químicos referentes aos carbonos do anel aromático em δ 126,9 (C4), 128,3 (C5 e C9), 129,9 (C8 e C6), 131,9 (C7), além do deslocamento em 52,8 referente ao carbono metilênico (C1). Destacam a diferença de deslocamento entre o carbono 2 que apresenta a subunidade N-óxido e o carbono 3 (δ 115,78 e 157,8 ppm, respectivamente), explicado pelo mecanismo de proteção do carbono 2 pela subunidade N-óxido, efeito não observado no carbono 3.

Espectro 4 - Espectro ^{13}C do composto 4 (100 MHz, acetona)

Fonte: dados da pesquisa

Posteriormente, o composto 4 foi oxidado para a formação do composto 5. A função foi oxidada a função aldeído utilizando o agente oxidante clorocromato de piridíneo (PCC), utilizando como solvente para reação diclorometano anidro, conforme descrito no subitem (ii) do item 5.2. O PCC é um agente oxidante utilizado quando se busca uma oxidação branda, ou seja, a oxidação da função álcool ocorre até a função aldeído. O mecanismo de oxidação está descrito no Esquema 13.

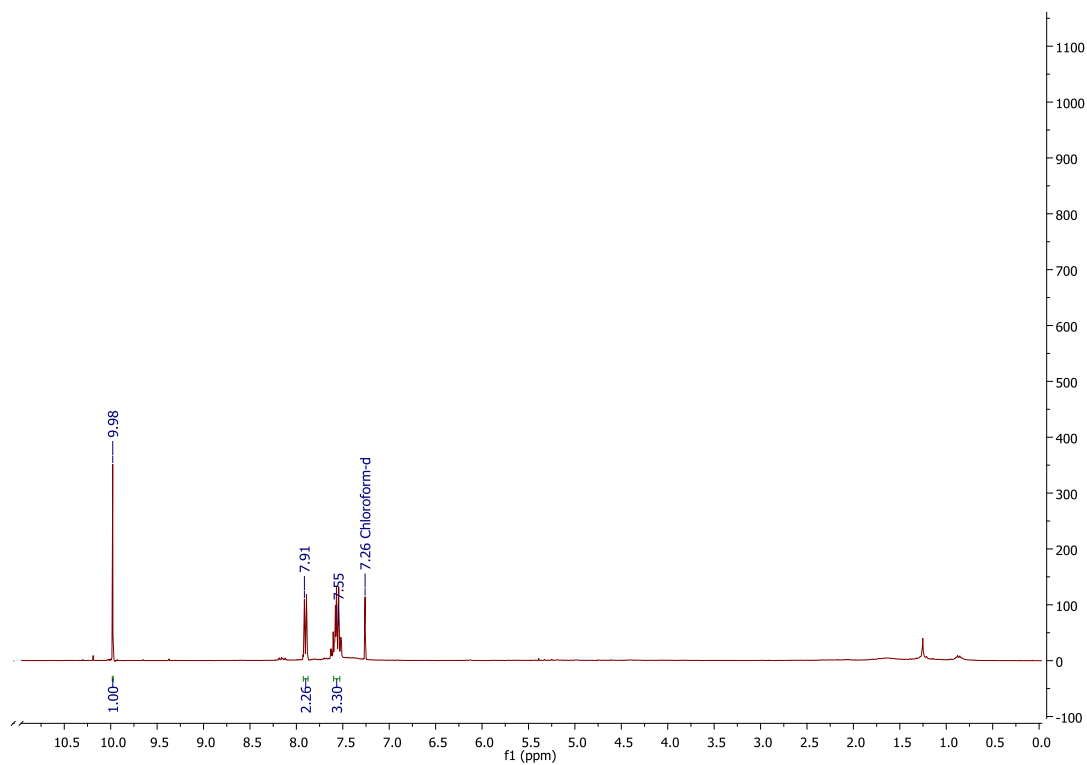
Esquema 13 - Mecanismo de oxidação utilizando PCC



Fonte: Adaptado de Solomons, 2011

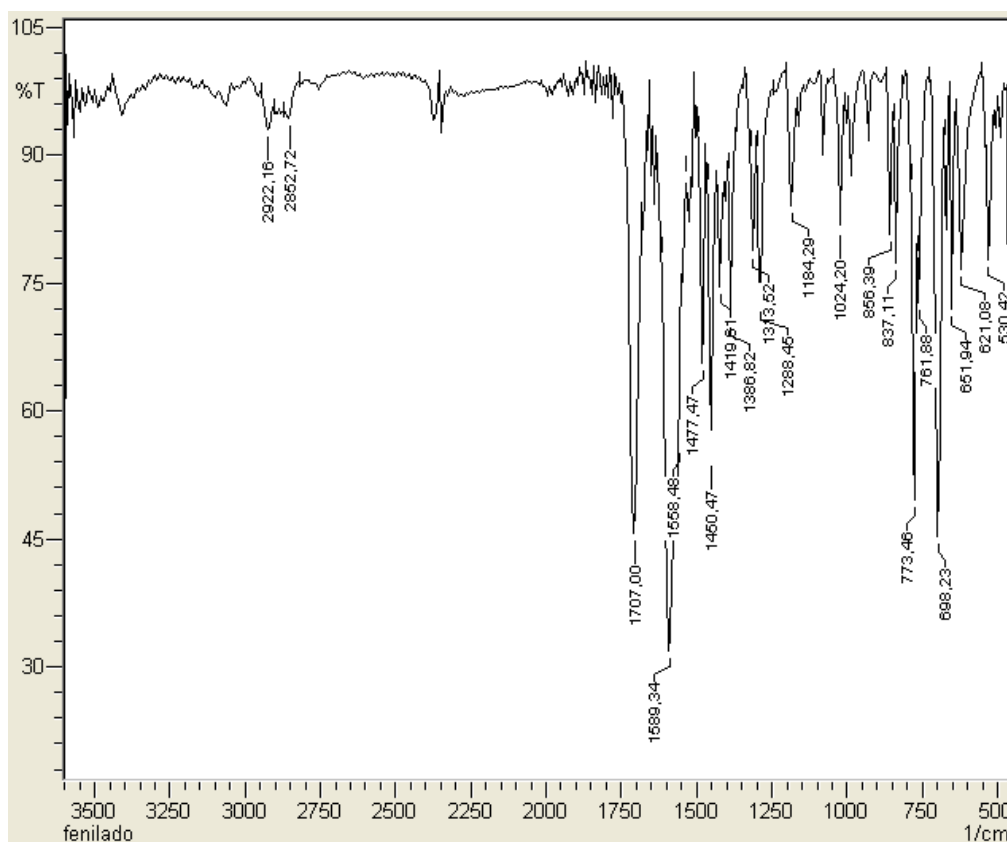
Após purificação por cromatografia em coluna, obteve-se um produto sólido de cor amarelo claro, com rendimento global de 22%. O produto apresentou $R_f = 0,8$ em CCD, utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila 5:5 (v/v) e para confirmação a mancha foi revelada com Revelador de Brady.

A caracterização química foi realizada por espectrometria de RMN de ^1H e por espectrofotometria de IV. No espectro de RMN ^1H (Espectro 5) foi observado o desaparecimento do deslocamento químico do carbono metilênico e o aparecimento do deslocamento em δ 9,98 que aparece como um simpleto, integrando para um hidrogênio, o qual foi atribuído ao hidrogênio da função aldeído e os deslocamentos químicos em δ 7,91 (dubleto; $J_{orto} = 8,6$ Hz) referentes ao hidrogênio H5, os quais integram para dois hidrogênios e o deslocamento químico em δ 7,55 (multiplete; $J_{orto} = 8,2$ Hz) foi atribuído para os hidrogênios H6 e H7 e integram para três hidrogênios.

Espectro 5 - Espectro RMN de ^1H do composto 5 (300 MHz; clorofórmio)

Fonte: dados da pesquisa

No espectro de IV (Espectro 6), é possível observar a banda do estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ da função aldeído em 1707 cm^{-1} e também a banda da ligação $\text{C}-\text{H}$ aldeídica, na região de 2852 cm^{-1} .

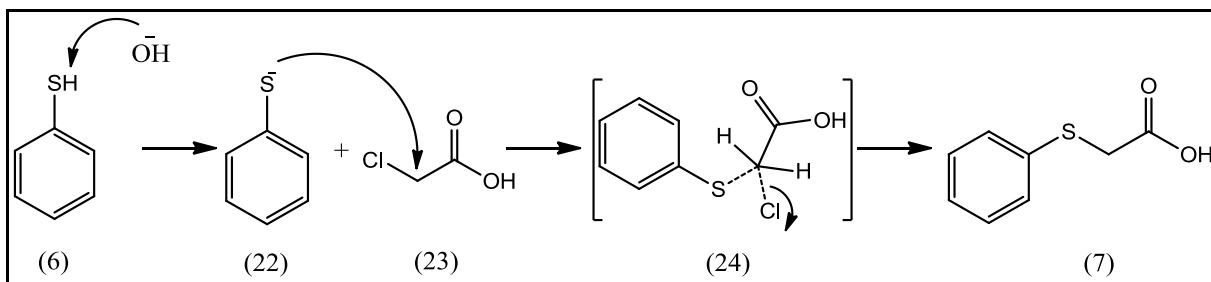
Espectro 6 - Espectro de infravermelho do composto 5

Fonte: dados da pesquisa

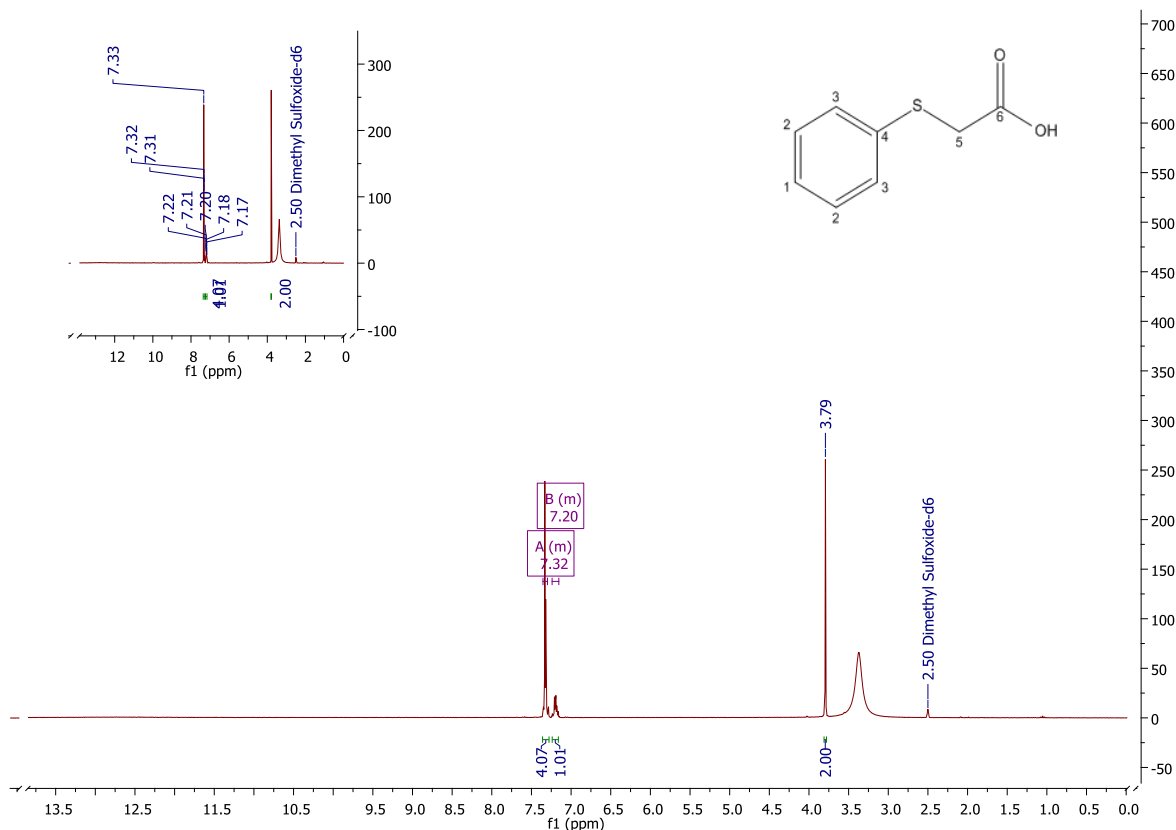
6.1.1.3. Síntese dos intermediários 4-(formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (10a-c)

A primeira etapa de formação dos compostos 10a-c é a síntese do ácido feniltioacético (7). A primeira etapa da reação consiste na desprotonação do tiofenol, com o auxílio de uma base, para a formação do ânion tiofenóxido (22), um bom nucleófilo. O ânion ataca o carbono sp³ do ácido monocloraacético (23), formando o composto intermediário (24), que após a saída do átomo de cloro, forma o composto (7), por uma reação de substituição nucleofílica S_N2 (Esquema 14). A reação apresentou rendimento de 87%.

Esquema 14 - Mecanismo de formação do composto (7)

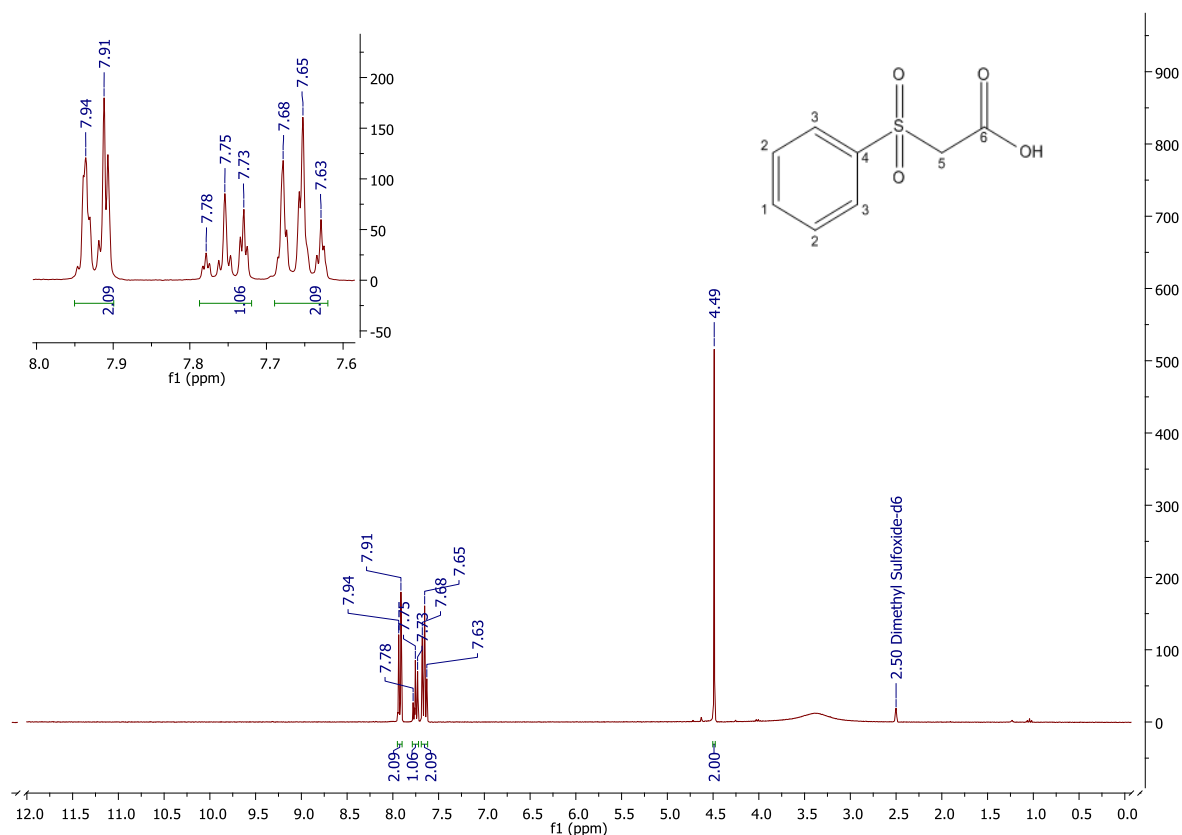


O composto (7) foi caracterizado quimicamente por RMN de ^1H (Espectro 7), que apresenta deslocamentos químicos em δ 7,32 integrando para 4 hidrogênios (multiplete; H2 e H3), δ 7,20 integrando para 1 hidrogênio (multiplete; H1) e δ 3,79 integrando para 2 hidrogênios (singleto; H5). Segundo Santos (2009), o sinal referente dos hidrogênios da metila do ácido monocloroacético (23) apresentam deslocamento químico em δ 4,32 ppm. No composto formado, o sinal destes hidrogênios encontra-se em δ 3,79. A mudança de deslocamento ocorre devido a maior desproteção dos hidrogênios no composto 23, ocasionado pela maior eletronegatividade do átomo de cloro.

Espectro 7 - Espectro de RMN ^1H do composto 7 (300 MHz, DMSO)

Fonte: dados da pesquisa

Após, o composto (7) foi oxidado para formação do grupamento sulfona, originando o ácido fenilsulfonilacético (8). A oxidação ocorreu utilizando o peróxido de hidrogênio a 30% em ácido acético glacial, conforme procedimento descrito no item 5.3. O rendimento da reação foi de 94%. O composto formado foi identificado por RMN ^1H (Espectro 8). Os hidrogênios da metila na posição 5 apresentam deslocamento em δ 4,49 ppm, o que difere do deslocamento dos hidrogênios desta posição do composto (7). Essa diferença ocorre pelo fato da maior desproteção destes hidrogênios, devido a presença dos átomos de oxigênio do grupo sulfona.

Espectro 8 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8 (300MHz, DMSO)

Fonte: dados da pesquisa

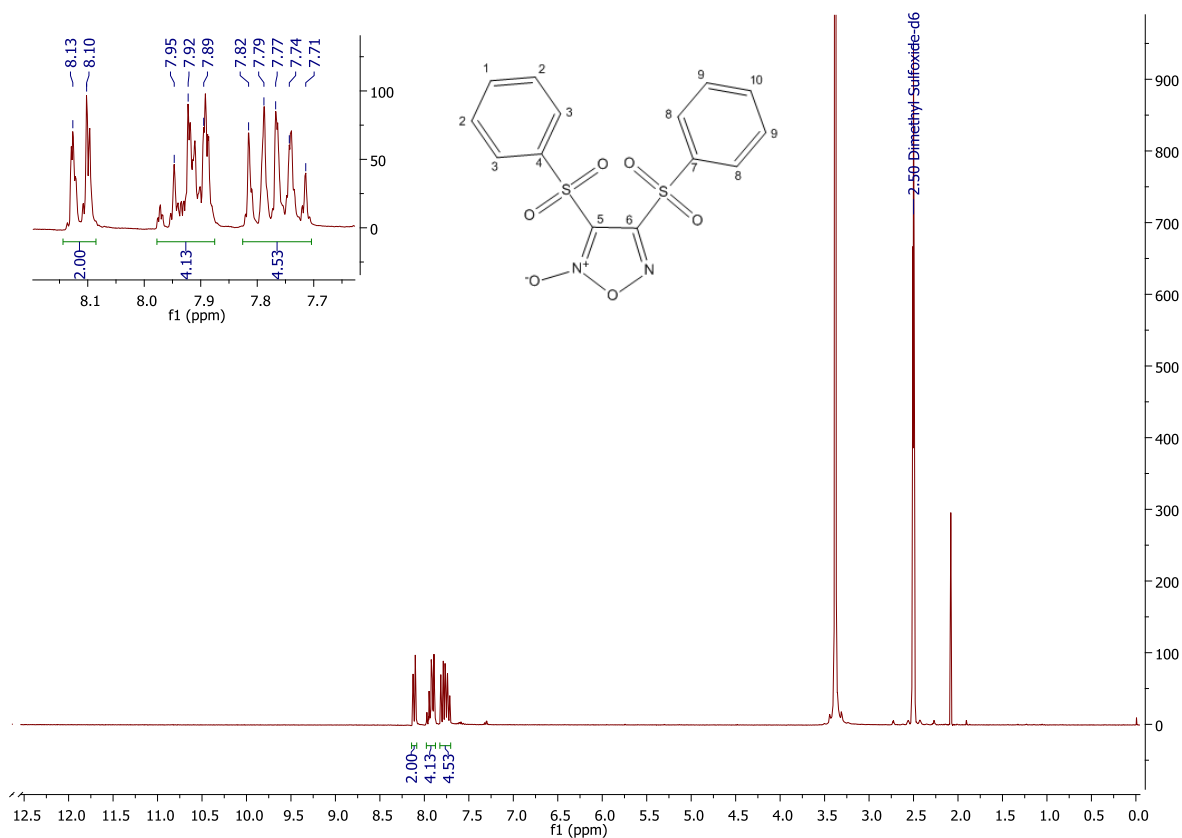
O composto (8) então foi reagido seguindo-se a metodologia descrita por Farrar (1964), na qual utiliza-se ácido acético glacial e ácido nítrico 98% para a obtenção do composto 3,4-bis(fenilsulfonyl)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (9). Embora não existam relatos do mecanismo dessa reação na literatura, acredita-se que a reatividade do carbono metilênico deva ser explorada, através de uma reação de descarboxilação e com mecanismo semelhante às reações pericíclicas (SANTOS, 2009).

A reação apresentou rendimento de 37%, sendo o produto um sólido branco esverdeado com faixa de fusão de 140°C – 142°C.

No espectro de RMN ^1H (Espectro 9), apenas há a presença dos deslocamentos químicos na região comum aos hidrogênios aromáticos e heteroaromáticos (9,0 a 6,0ppm), o

que indica a ausência de hidrogênios alifáticos neste espectro. Os deslocamentos químicos presentes são δ 8,13-8,09 ppm (H3 e H8), δ 7,96-7,88 ppm (H1 e H10) e δ 7,80-7,60ppm (H2 e H9).

Espectro 9 - Espectro de RMN de ^1H do composto 9 (300MHz, DMSO)

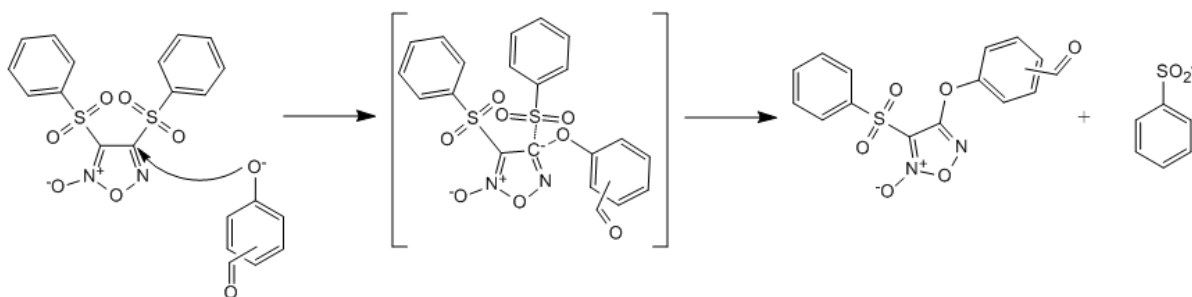


Fonte: dados da pesquisa

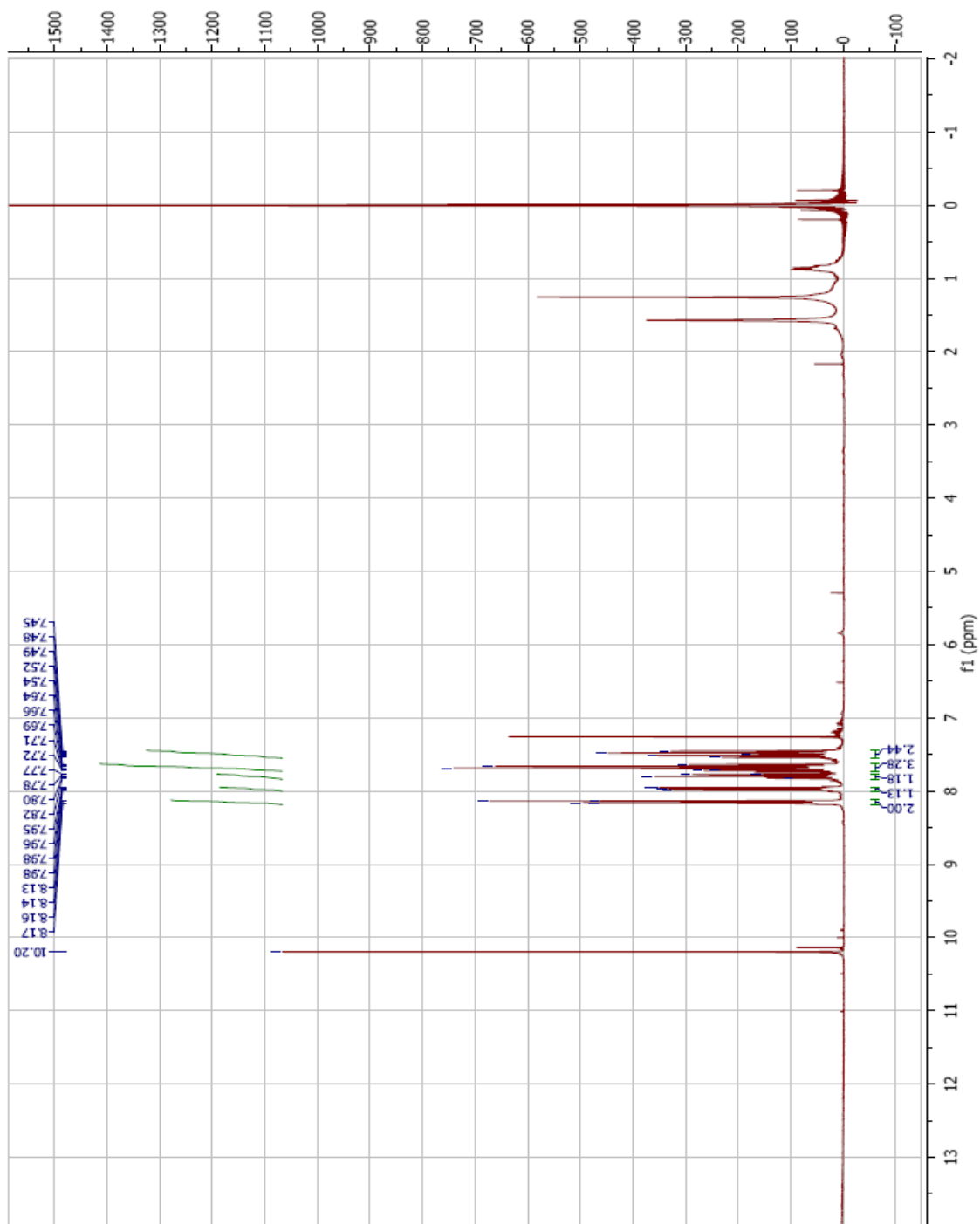
O 3,4-bis(fenilsulfonyl)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (9) foi reagido com o 2-hidroxibenzaldeído, em meio básico, para formação do composto 4-(2-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonyl)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (10a), com o 3-hidroxibenzaldeído para formação do 4-(3-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonyl)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (10b) e com o composto 4-hidroxibenzaldeído para formação do composto 4-(4-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonyl)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (10c). A função fenol é desprotonado com o auxílio de uma base forte,

como o DBU, transformando-se em ânion fenóxido que atua como nucleófilo, inicialmente se adicionando ao carbono heteroarômico, para posteriormente eliminar o grupamento sulfona que pode se decompor em SO_2 e benzeno. A reação ocorre por um mecanismo de adição-eliminação e envolve a formação de carbânion com elétrons delocalizados (complexo de Meisenheimer) (Esquema 15).

Esquema 15 - Mecanismo de reação dos compostos 10a-c



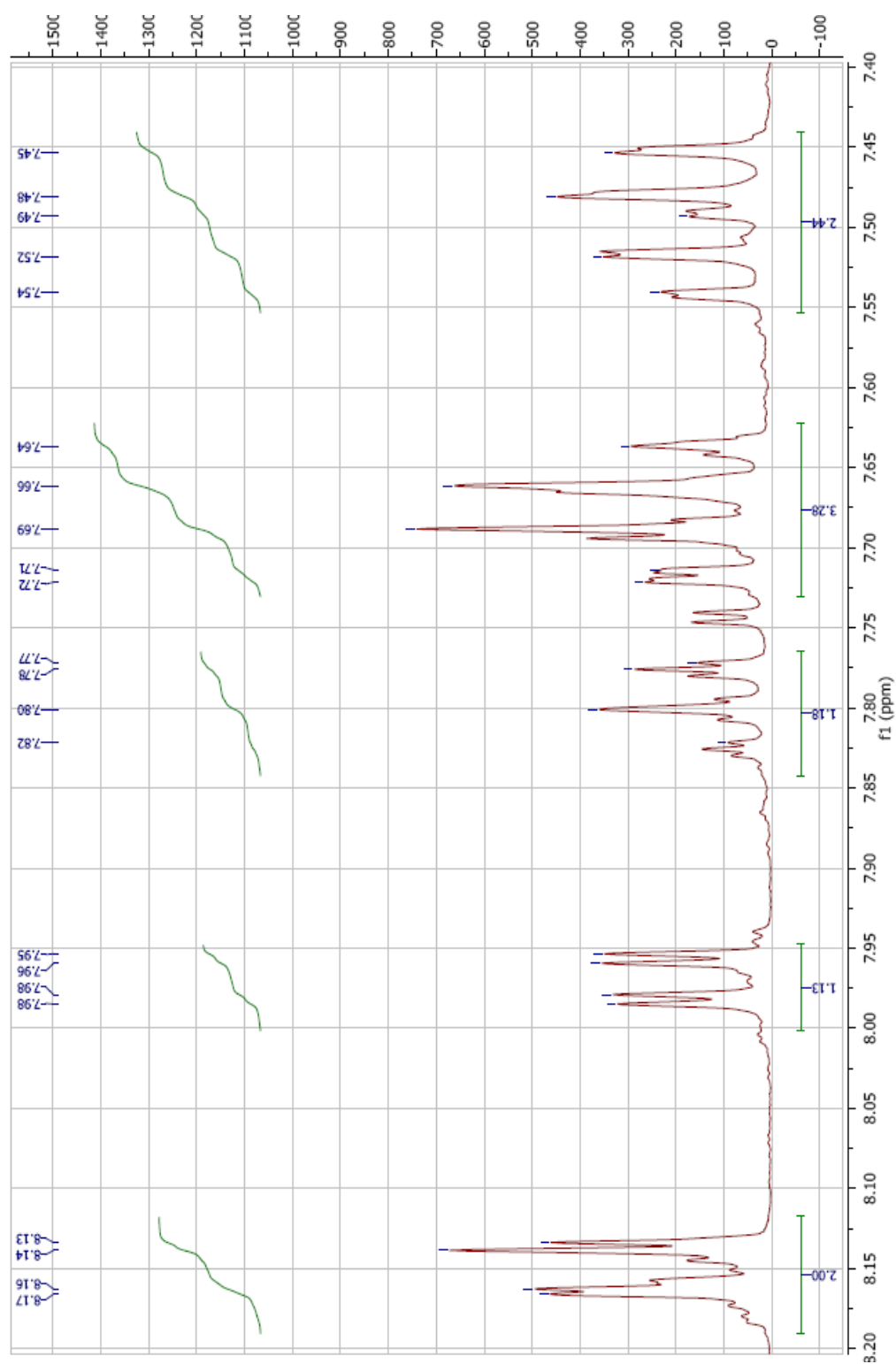
Os espectros de ^1H dos intermediários 10a-c (Espectros 10, 11, 12 e 13) apresentaram sinais de hidrogênios aromáticos e os singletos que representam o sinal dos hidrogênios da função aldeído (δ 10,20ppm, δ 10,03ppm e δ 10,03ppm, respectivamente).

Espectro 10 – Espectro de RMN de ^1H composto 10a (300MHz, clorofórmio)

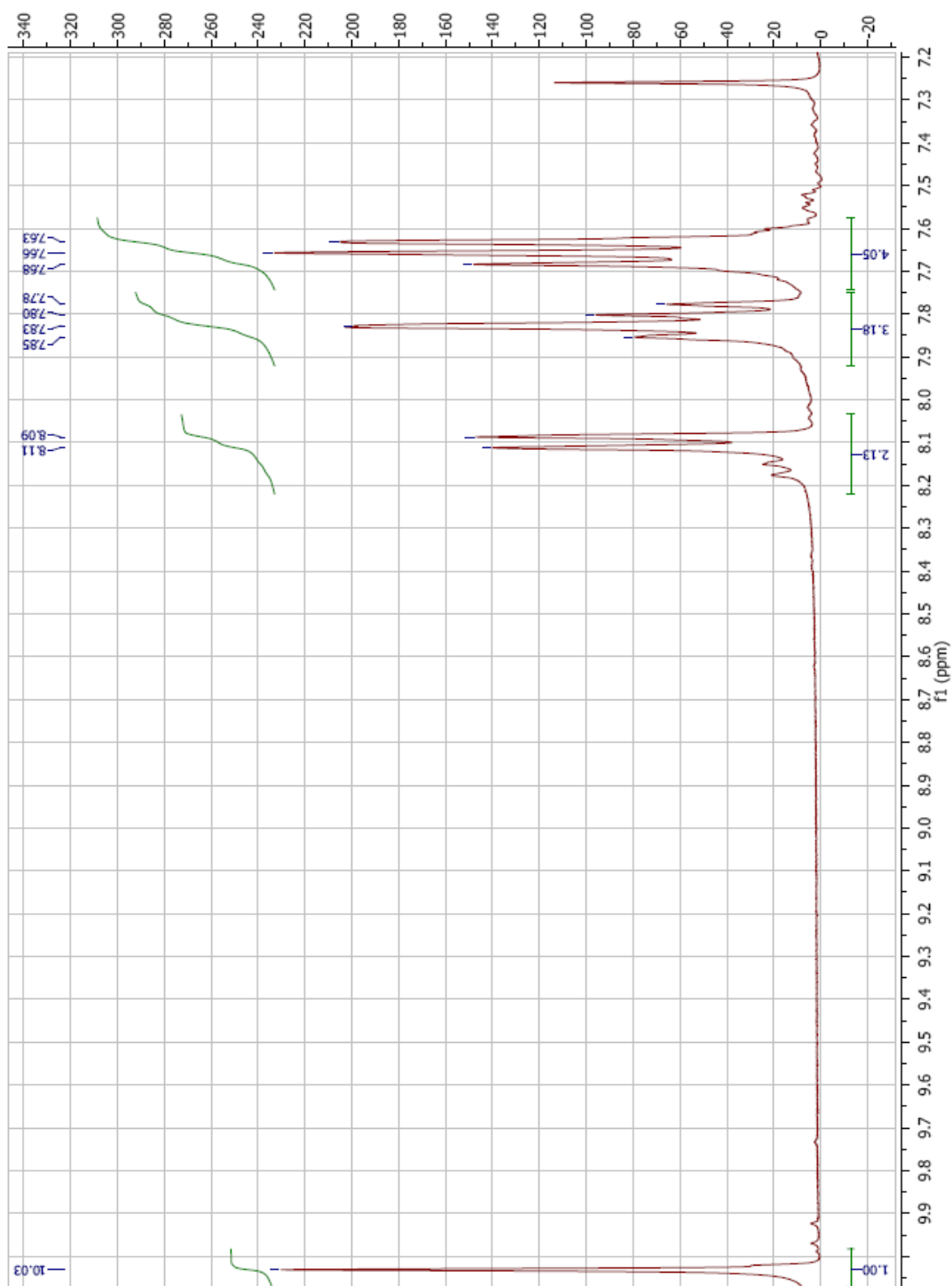
Fonte: dados da pesquisa

RMN ^1H do composto 10a: δ 10,20ppm (H1; s); δ 8,15 (H11 e H15; dd) δ 7,97ppm (H3; dd);

δ 7,80ppm (H13; tt); δ 7,69ppm (H5, H12, H14;m); δ 7,49ppm (H4 e H6)

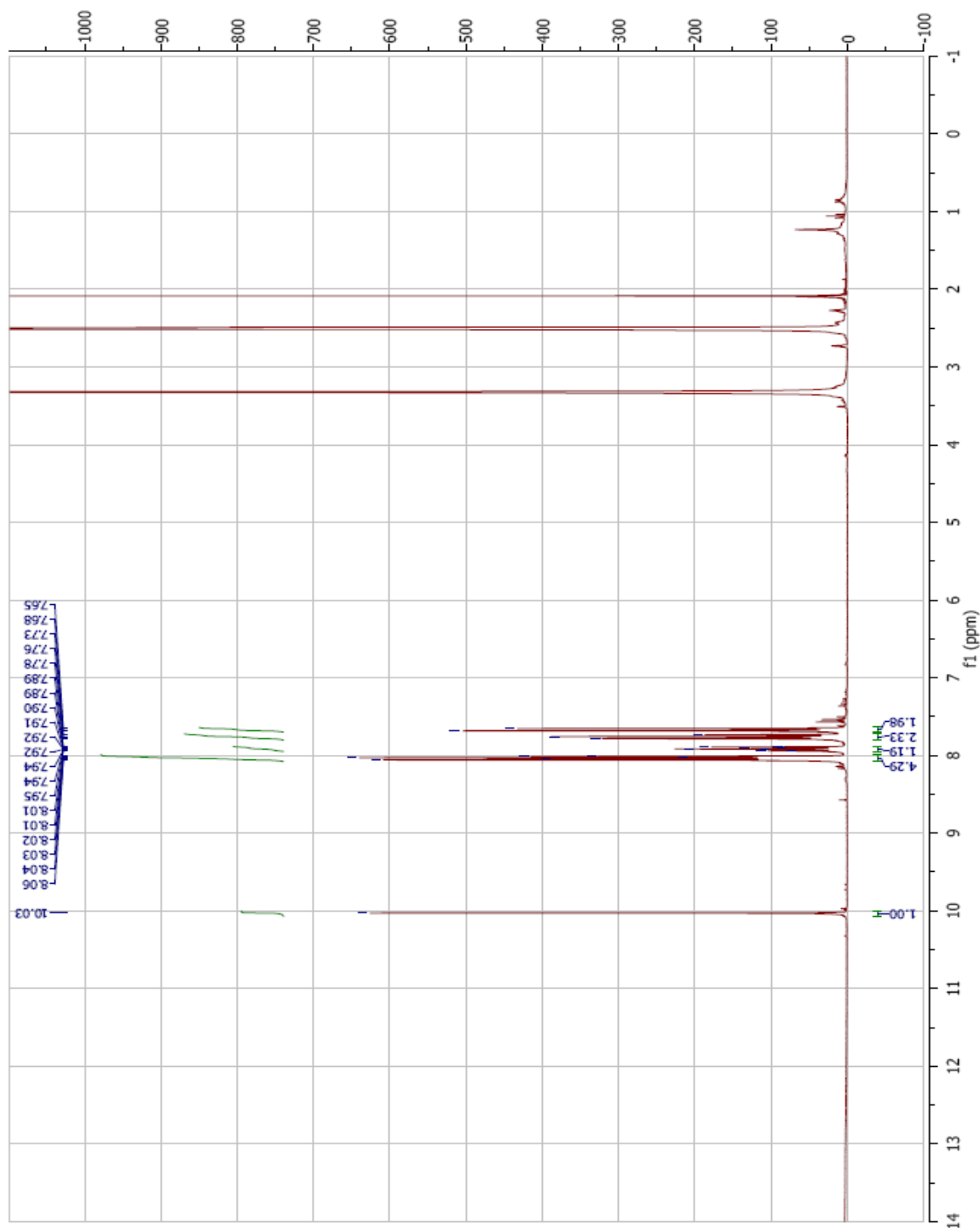
Espectro 11 - Ampliação do espectro de ^1H do composto 10a

Fonte: dados da pesquisa

Espectro 12 - Espectro de RMN de ^1H do composto 10b (300MHz, clorofórmio)

Fonte: dados da pesquisa

RMN ^1H do composto 10b: δ 10,03ppm (H1; s); δ 8,10 (H11 e H15; d) δ 7,86ppm (H3; m); δ 7,83ppm (H12, H13, H14 ; t); δ 7,66ppm (H5, H6, H7;t).

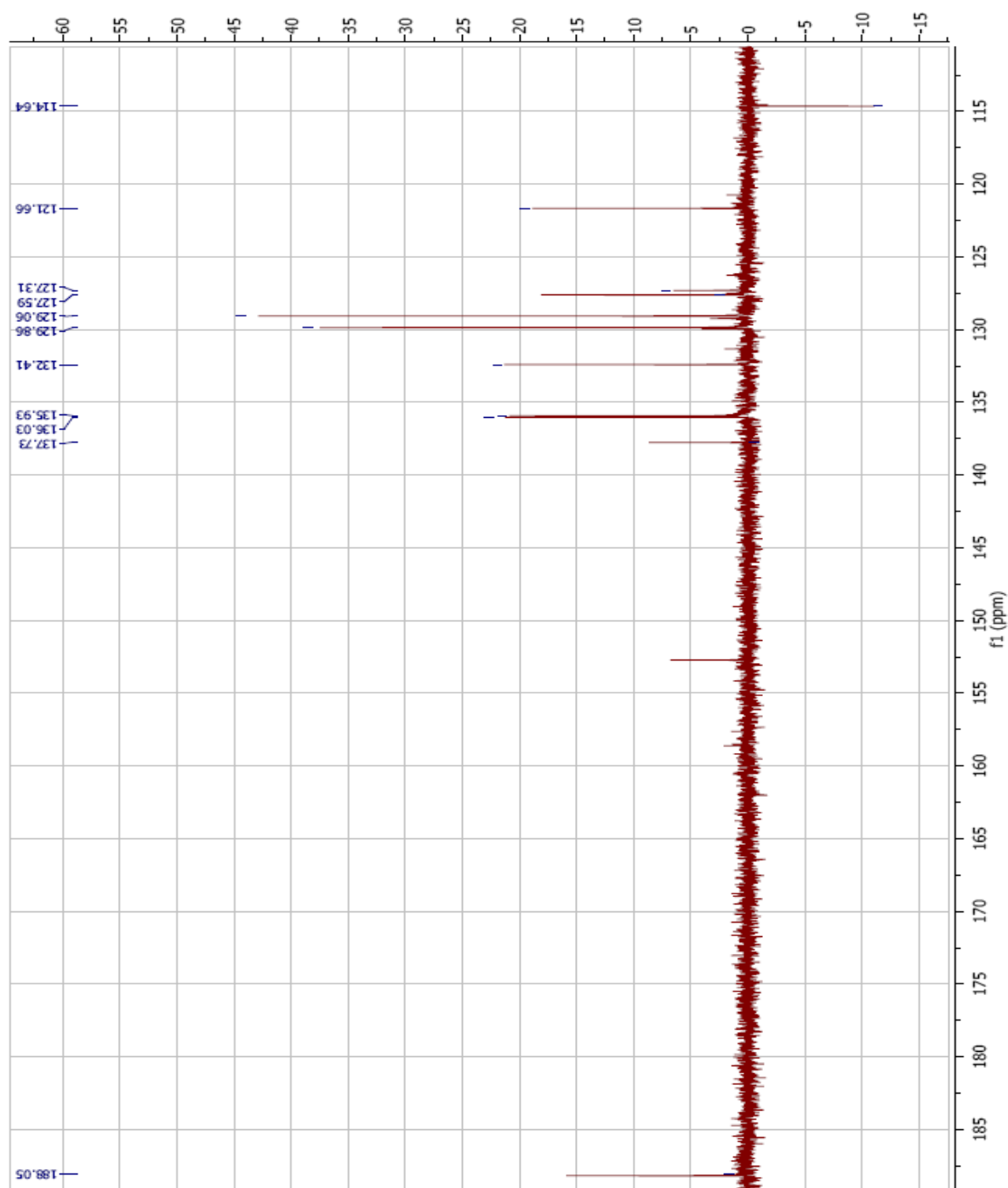
Espectro 13 - Espectro de RMN de ^1H do composto 10c (300MHz, clorofórmio)

Fonte: dados da pesquisa

RMN ^1H do composto 10c: δ 10,03ppm (H1; s); δ 8,03 (H3, H7, H11 e H15; m) δ 7,92ppm (H13; tt); δ 7,75ppm (H12, H14; tt); δ 7,66ppm (H4 e H6; d).

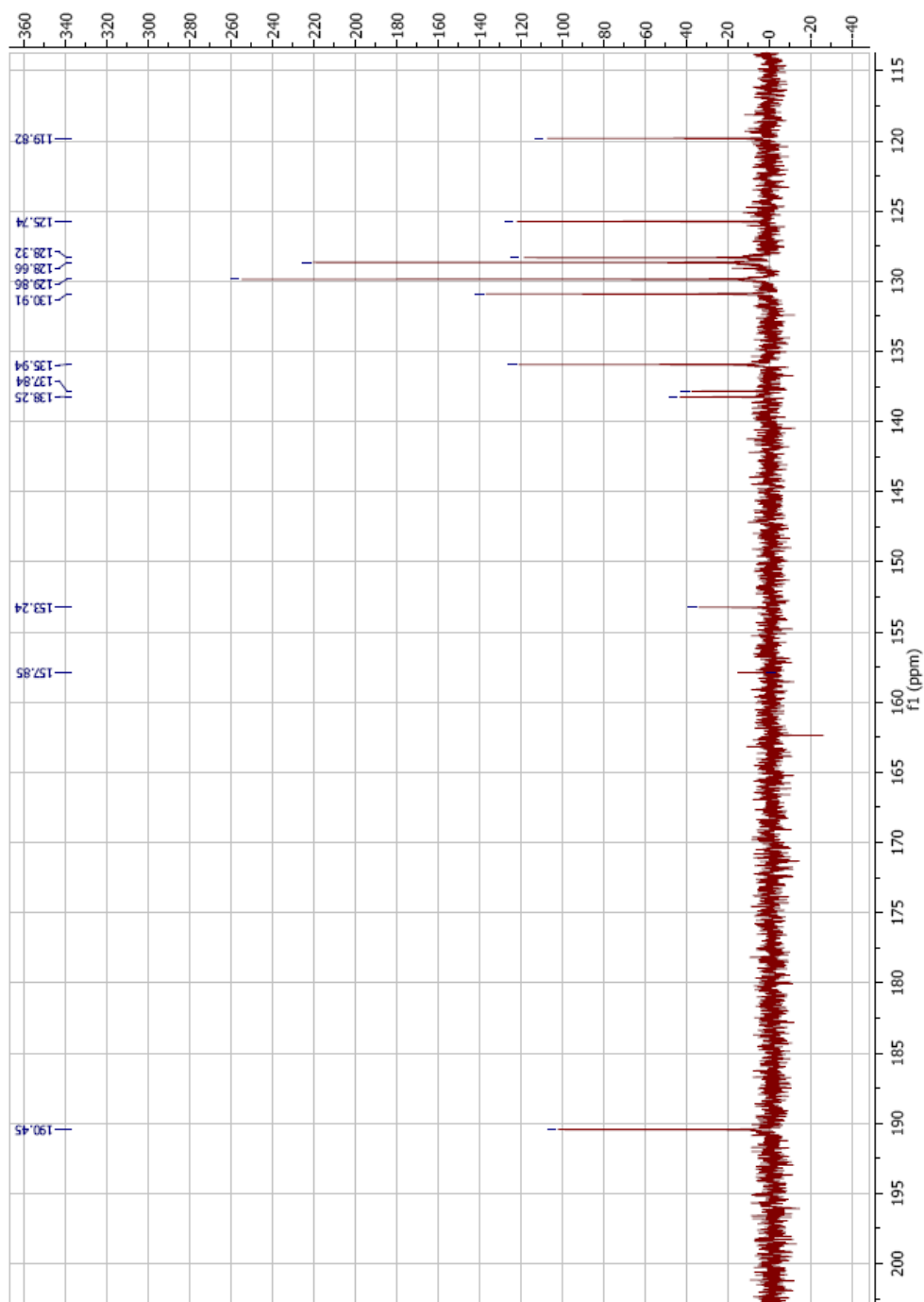
Nos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos 10a-c (Espectros 14, 15 e 16), destacam-se os sinais dos carbonos das carbonilas da função aldeído (δ 188ppm, δ 190,5ppm e δ 193,5ppm, respectivamente) e também os sinais referentes aos carbonos do anel furoxânico, C8 (δ 152,6ppm, δ 153,3ppm e δ 158,65ppm, respectivamente) e C9 (δ 114,6ppm, δ 110,6ppm e δ 112,9ppm, respectivamente).

Espectro 14 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10a (75MHz, clorofórmio)



Fonte: dados da pesquisa

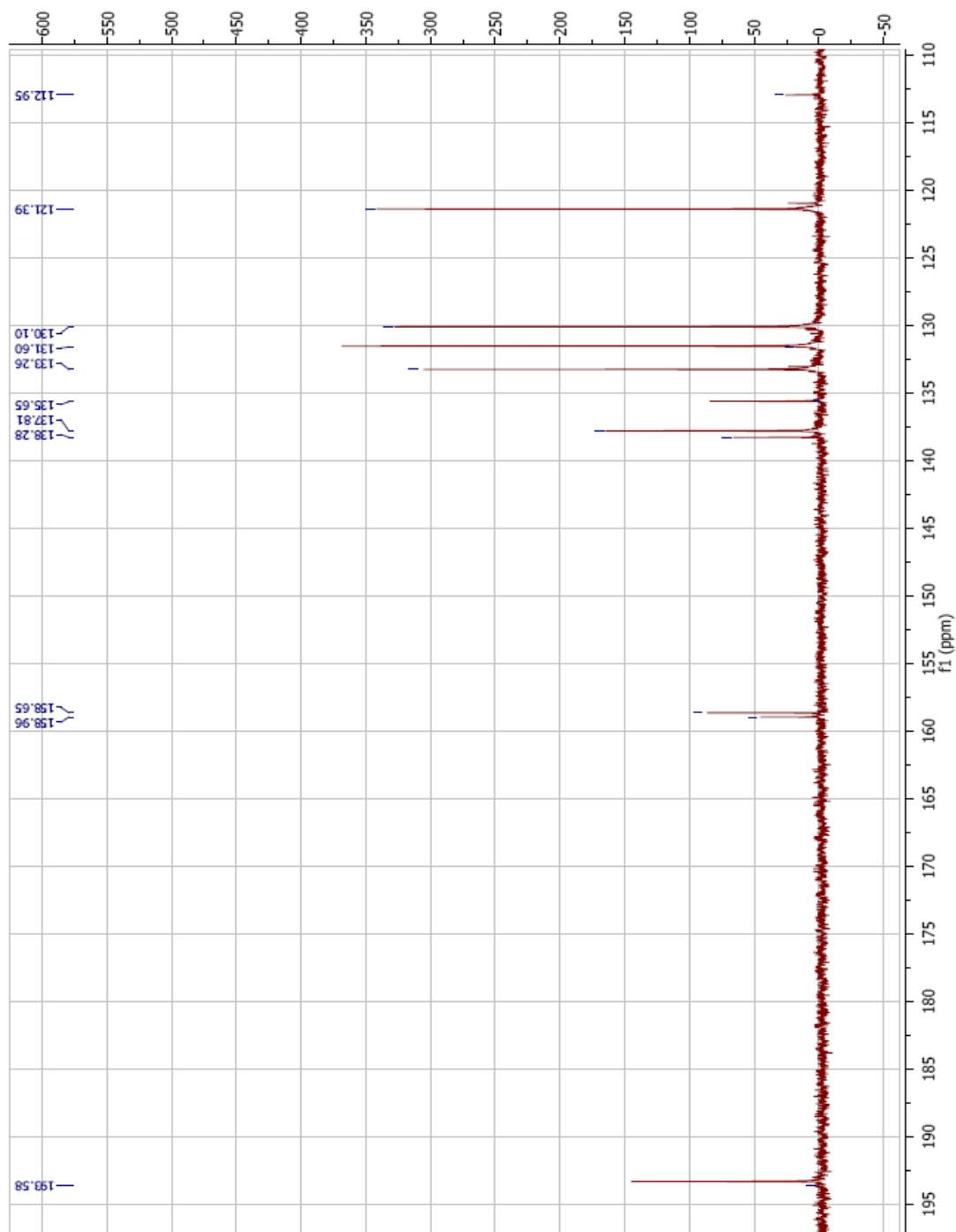
RMN de ^{13}C do composto 10a: δ 188ppm (C1); δ 158,6ppm (C7); δ 152,6ppm (C8); δ 137,7 (C10); δ 136ppm (C13); δ 135,9ppm (C2); δ 132,4ppm (C3), δ 129,8ppm (C11 e C15); δ 129ppm (C12 e C14); δ 127,5ppm (C5); δ 127,3ppm (C4); δ 121,6ppm (C6); δ 114,6ppm (C9)

Espectro 15 - Espectro de ^{13}C do composto 10b (75MHz, clorofórmio)

Fonte: dados da pesquisa

RMN de ^{13}C do composto 10b: $\delta 190,5\text{ppm}$ (C1); $\delta 157,8\text{ppm}$ (C4); $\delta 153,3\text{ppm}$ (C8); $\delta 138,2$ (C10); $\delta 137,8\text{ppm}$ (C2); $\delta 135,8\text{ppm}$ (C13); $\delta 130,9\text{ppm}$ (C6), $\delta 129,8\text{ppm}$ (C11 e C15); $\delta 128,6\text{ppm}$ (C12 e C14); $\delta 128,3\text{ppm}$ (C7); $\delta 125,7\text{ppm}$ (C4); $\delta 119,8\text{ppm}$ (C3); $\delta 110,6\text{ppm}$ (C9).

Espectro 16 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10c (75MHz, clorofórmio)



Fonte: dados da pesquisa

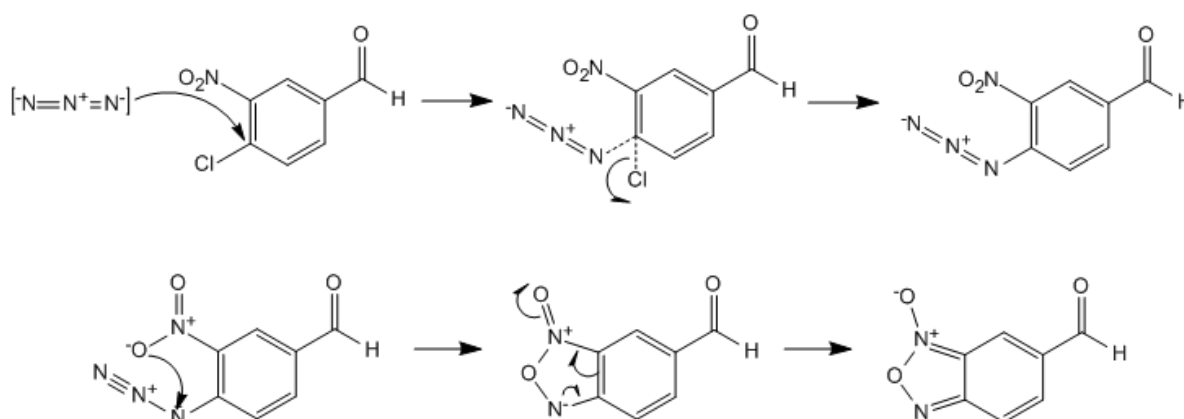
RMN de ^{13}C do composto 10c: δ 193,5ppm (C1); δ 158,9ppm (C5); δ 158,65ppm (C8); δ 138,2 (C10); δ 137,8ppm (C13); δ 135,6ppm (C2); δ 133,2ppm (C3 e C7), δ 131,6ppm (C11 e C15); δ 130,1ppm (C12 e C14); δ 121,3ppm (C4 e C6); δ 112,9ppm (C9).

6.1.1.4. Síntese do intermediário 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (13)

A formação do composto 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (13) ocorreu em duas etapas, onde a primeira consiste na reação entre 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (11) e azida de sódio, obtendo-se o composto 4-azido-3-nitrobenzaldeído (12) que, após refluxo em tolueno, forneceu o intermediário (13).

A primeira etapa da síntese do núcleo benzofuroxano ocorre através de uma reação de substituição nucleofílica aromática onde o átomo de cloro do composto (11) é substituído por um grupo azido. A segunda etapa envolve um rearranjo molecular (ciclocondensação), que ocorre com aquecimento, com liberação de nitrogênio gasoso (MARCH, 2007). O Esquema 16 demonstra o mecanismo de obtenção do derivado benzofuroxânico.

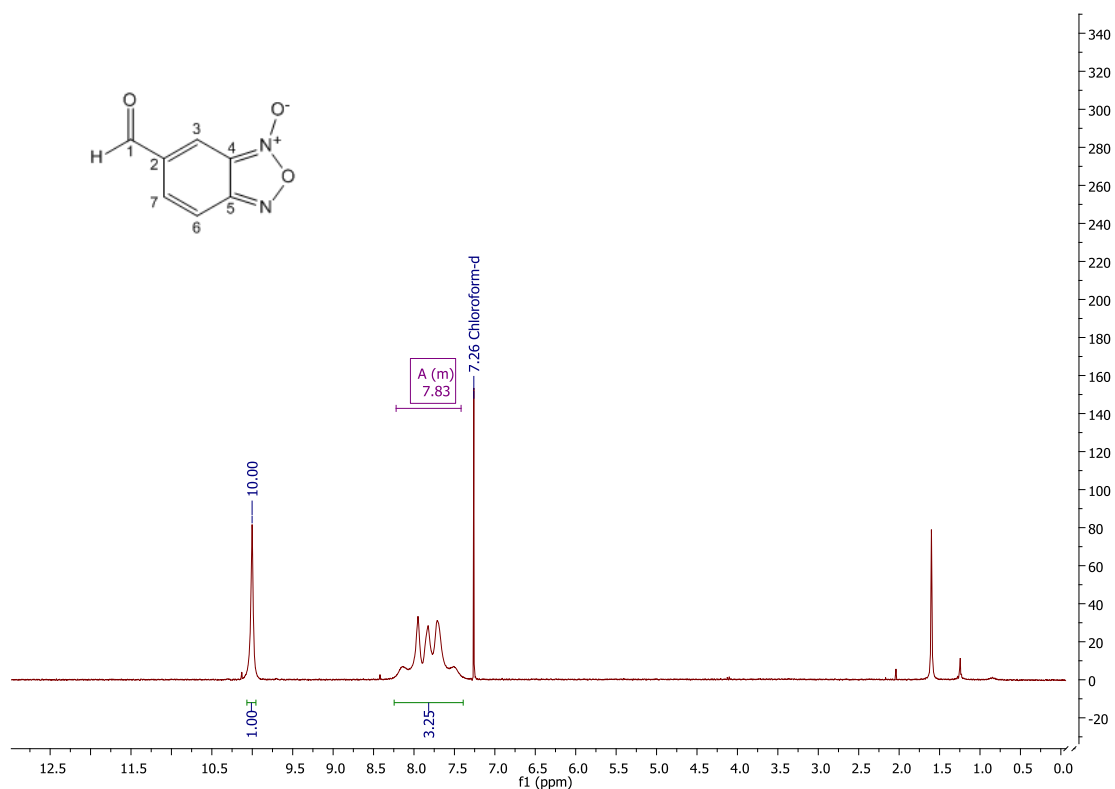
Esquema 16 - Mecanismo de síntese do composto 13



O produto obtido apresentou-se como um sólido amarelo ouro e foi identificado por CCD, apresentando uma mancha com R_f de 0,75, faixa de fusão entre 69 – 72,3° C, com rendimento de 78%.

O composto foi caracterizado por RMN de ^1H . No espectro (Espectro 17) é possível observar o sinal referente ao hidrogênio do aldeído em δ 10,00ppm (s; H1) e também os hidrogênios dos carbonos aromáticos em δ 7,83ppm (m; H3, H6 e H7).

Espectro 17 - Espectro de RMN de ^1H do composto 13 (300MHz, DMSO)



Fonte: dados da pesquisa

6.1.2. Síntese do composto da série 1 - LAPDESF BZFUR-PQ (15), LAPDESF FUR PQ 2 (16) E LAPDESF FUR-PQ 6 (17)

Para a formação da imina, o controle do pH do meio é importante. Este deve estar suficientemente ácido para que ocorra a protonação do intermediário tetraédrico, permitindo a eliminação de uma molécula de água. No entanto, o excesso de ácido pode impedir a

formação do produto, uma vez que pode protonar a amina primária, impedindo a primeira etapa da reação (ataque nucleofílico) (SOLOMONS, 2011; BRUICE, 2004).

Desta forma, foram realizadas feitas diversas tentativas sintéticas, com as condições relacionadas na Tabela 3. Como a primaquina se encontra na forma de sal difosfato, é necessário que ocorra a desprotonação da mesma, para que a amina fique disponível para realizar o ataque nucleofílico. A base utilizada foi a trietilamina e observou-se que o pH na qual ocorre a completa solubilização da primaquina nos solventes utilizados (etanol, diclorometano e dimetilformamida) foi igual ou superior a 10. A escolha deste como solvente deve-se ao fato do etanol não ser capaz de manter a forma molecular da primaquina solúvel pelo tempo de reação. Quando o solvente utilizado foi dimetilformamida, o pH é mais baixo (8). Inicialmente buscou-se controlar o pH em 4,5, com ácido acético após a solubilização da primaquina. No entanto, nas tentativas reacionais A, B e C não foi possível observar a formação do produto. Para averiguar a possibilidade da reação ocorrer sem a catálise ácida, o pH do meio reacional foi mantido em 8. Mesmo assim, não foi possível observar a formação dos produtos desejados nem o consumo dos reagentes de partida (CCD, até 48 horas. Uma possível explicação para o fato é o valor de pKa da amina primária da primaquina, que é igual a 9,9. Devido ao pKa elevado, o ataque nucleofílico fica impedido em pH de formação de iminas, pois a amina pode estar protonada. Nas condições reacionais D, em que o pH está mais elevado, a formação não ocorre possivelmente devido a necessidade da catálise ácido. As condições reacionais C também foram repetidas na tentativa de formar os produtos LAPDES FUR-PQ 2 e LAPDES FUR-PQ 6, porém, sem sucesso.

6.1.3. Síntese dos compostos da série 2

O mecanismo de formação dos compostos da série 2 também é o de formação de iminas, demonstrado no Esquema 10.

6.1.3.1. Síntese dos compostos LAPDES FUR-TS 1 (19a) e LAPDES FUR-TS 2 (21a)

Os compostos LAPDES FUR-TS 1 (19a) e LAPDES FUR-TS 2 (21a) foram sintetizados pela reação do intermediário 4-(2-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (10a) com cloridrato de semicarbazida (LAPDES FUR-TS 1) e tiosemicarbazida (LAPDES FUR-TS 2). O composto 19a apresentou-se como um sólido branco, com rendimento de reação de 79.3% e faixa de fusão de fusão de 183°C – 185°C (provável degradação do composto nessa temperatura). Já o composto 21a foi isolado como um sólido amarelo claro, apresentando rendimento de 65.7% e faixa de fusão de 185°C (provável degradação do composto nessa temperatura). Os compostos foram caracterizados por RMN de ^1H e de ^{13}C .

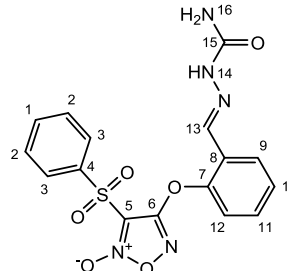
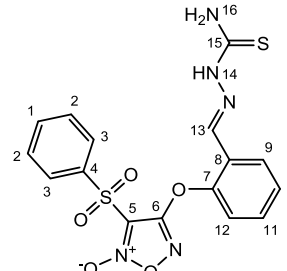
Nos espectros de RMN de ^1H (Espectros 18 e 20) destacam-se os sinais referentes aos hidrogênios da posição em δ 10,26ppm (composto 19a) e δ 11,34ppm (composto 21a), o sinal do hidrogênio do carbono da imina em δ 8,00ppm (Composto 19a) e δ 8,21ppm (composto 21a), ambos sendo simpletos.

Nos espectros de RMN de ^{13}C (Espectros 19 e 21) é possível observar os deslocamentos dos sinais dos carbonos carbonílicos e tiocarbonílico da posição 15 dos compostos 19a e 21a em δ 158,60ppm e δ 178,17, respectivamente. Além disso, os carbonos das posições 5 e 6 do anel furoxânico também podem ser observados em δ 111,25ppm e δ 156,58ppm, respectivamente (composto 19a) e δ 111,19ppm e δ 158,61ppm, respectivamente

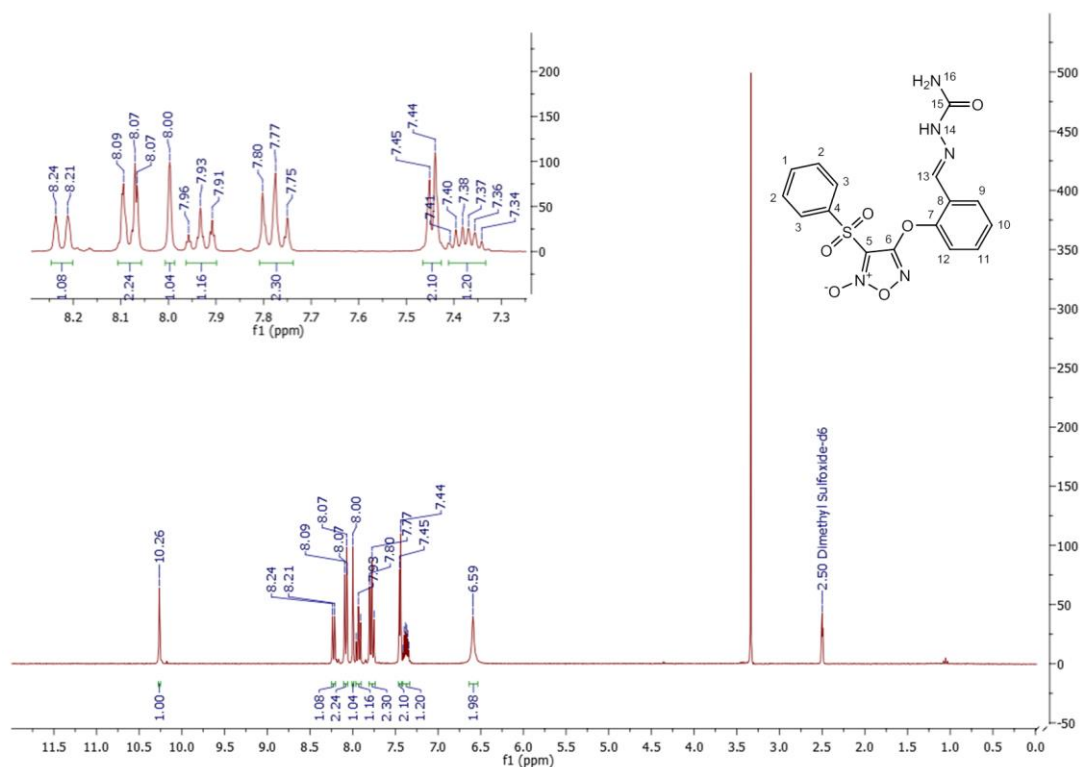
(composto 21a). Também estão presentes os sinais dos carbonos da ligação imina, posição 13, nos deslocamentos δ 130,50ppm (composto 19a) e δ 131,42ppm (composto 21a).

A Tabela 4 mostra os deslocamentos químicos nos RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos.

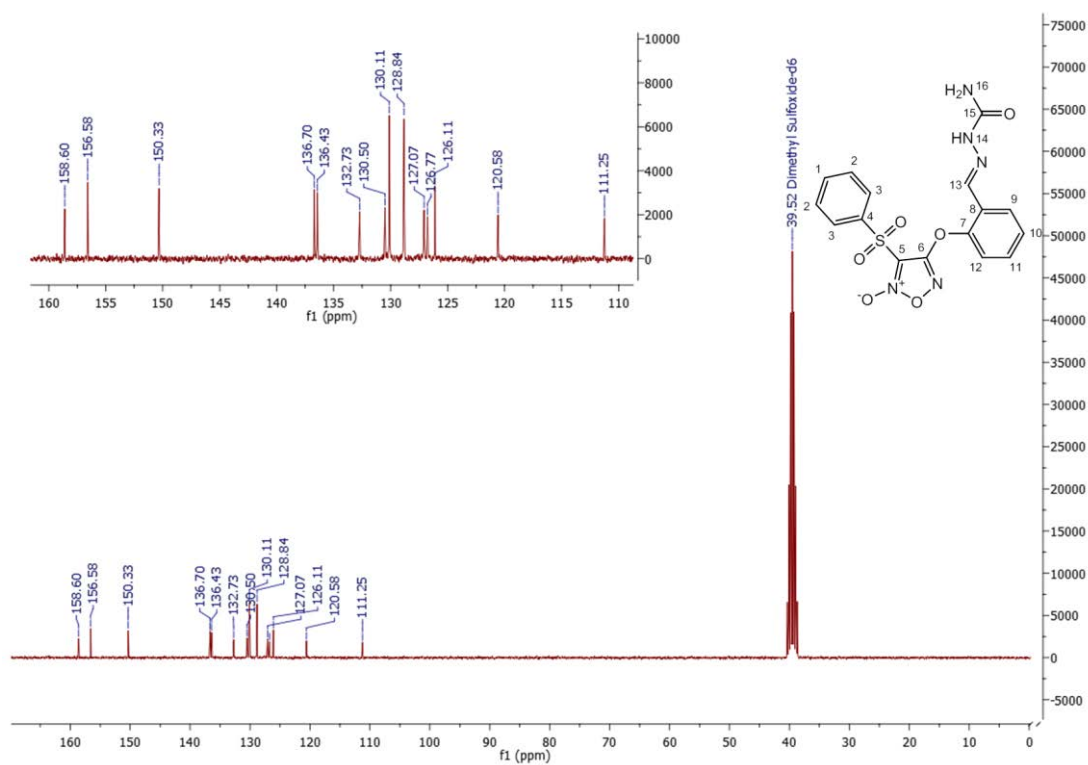
Tabela 4 - Deslocamentos químicos dos compostos 19a e 21a no RMN ^1H e RMN ^{13}C

 19a  21a				
Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	7,93 (m; 1H)	132,73	7,92 (m; 2H)	135,82
2	7,77 (dd; 2H)	128,84	7,78 (t; 2H)	130,11
3	8,08 (m; 2H)	130,11	8,34 (m; 2H)	128,86
4	-	136,70	-	136,68
5	-	111,25	-	111,19
6	-	156,58	-	158,61
7	-	150,33	-	150,92
8	-	136,43	-	136,46
9	7,37 (m; 1H)	127,07	8,10 (m; 3H)	128,50
10	7,45 (m; 2H)	126,11	7,4 (m; 2H)	125,65
11	7,45 (m; 2H)	126,77	7,92 (m; 2H)	127,11
12	8,22 (d; 1H)	120,58	8,10 (m; 3H)	120,72
13	8,00 (s; 1H)	130,50	8,21 (s; 1H)	131,42
14	10,26 (s; 1H)	-	11,56 (s; 1H)	-
15	-	158,60	-	178,17
16	6,59 (s; 2H)	-	8,10 (s; 1H)/7,42 (s; 1H)	-

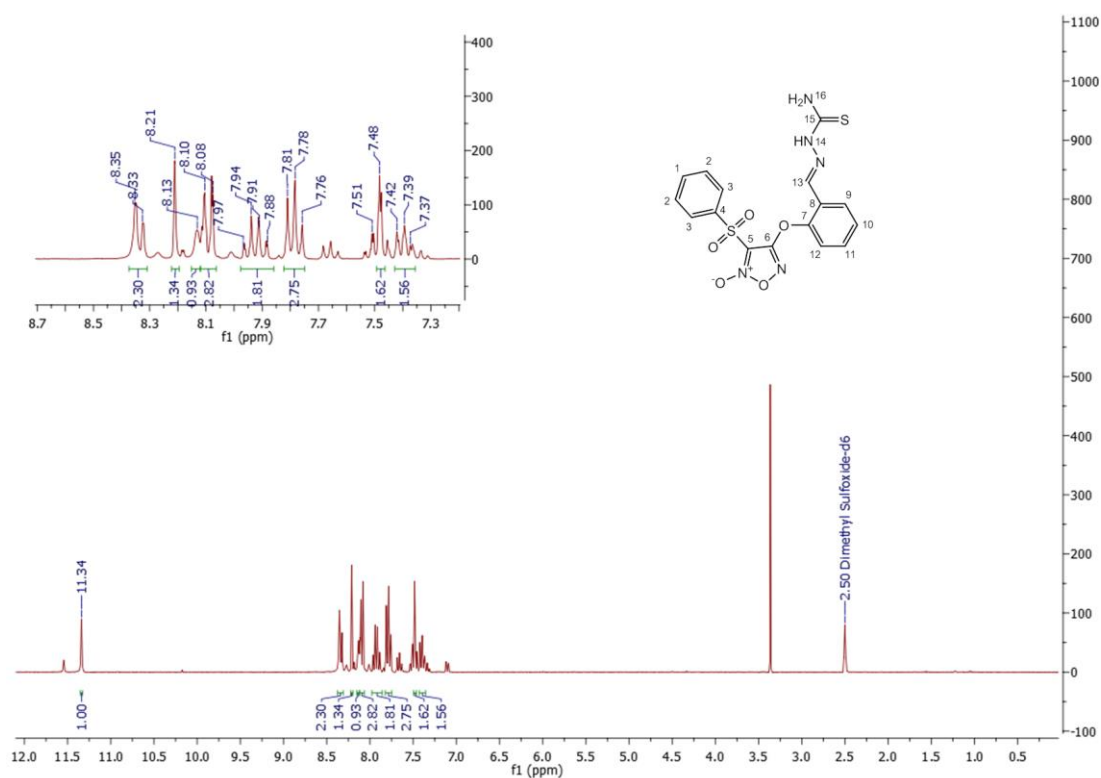
Fonte: dados da pesquisa

Espectro 18 - Espectro de RMN de ^1H do composto 19a (300MHz, DMSO)

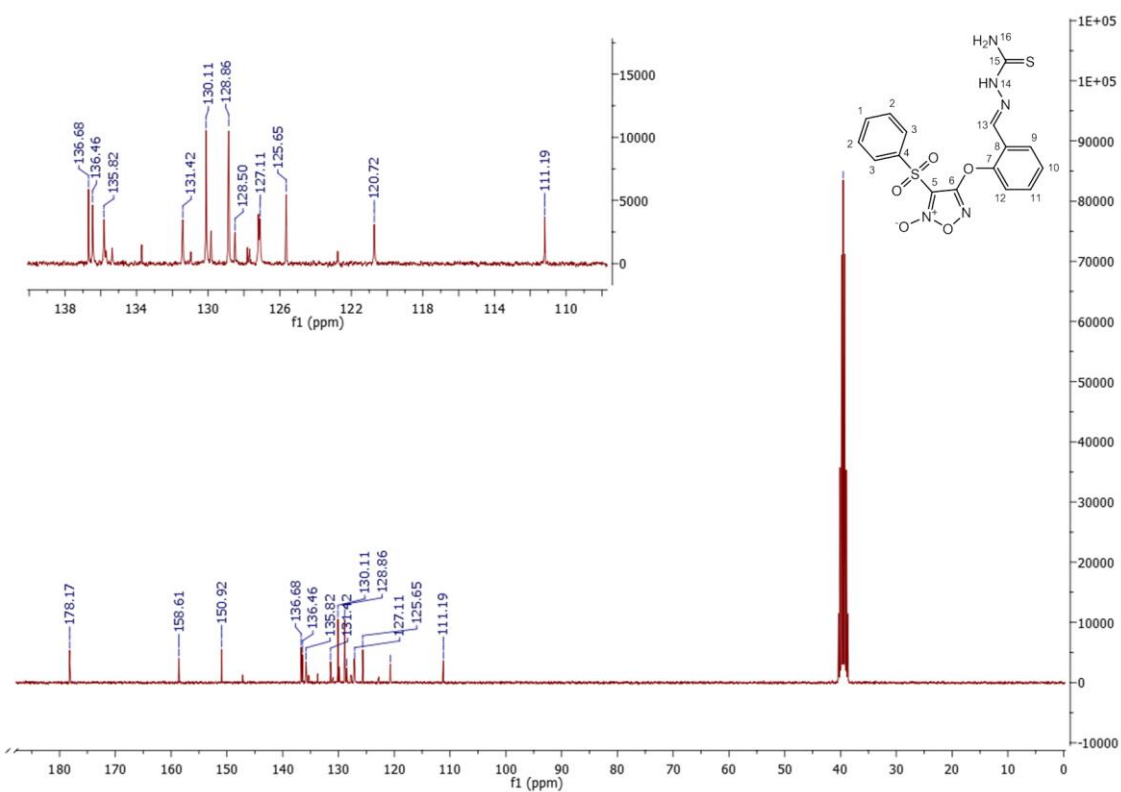
Fonte: dados da pesquisa

Espectro 19 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 19a (75MHz, DMSO)

Fonte: dados da pesquisa

Espectro 20 - Espectro de RMN de ^1H do composto 21a (300MHz, DMSO)

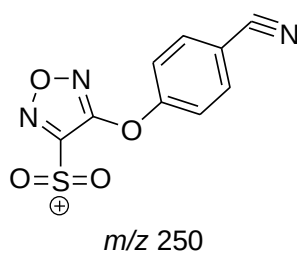
Fonte: dados da pesquisa

Espectro 21 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 19a (75MHz, DMSO)

Fonte: dados da pesquisa

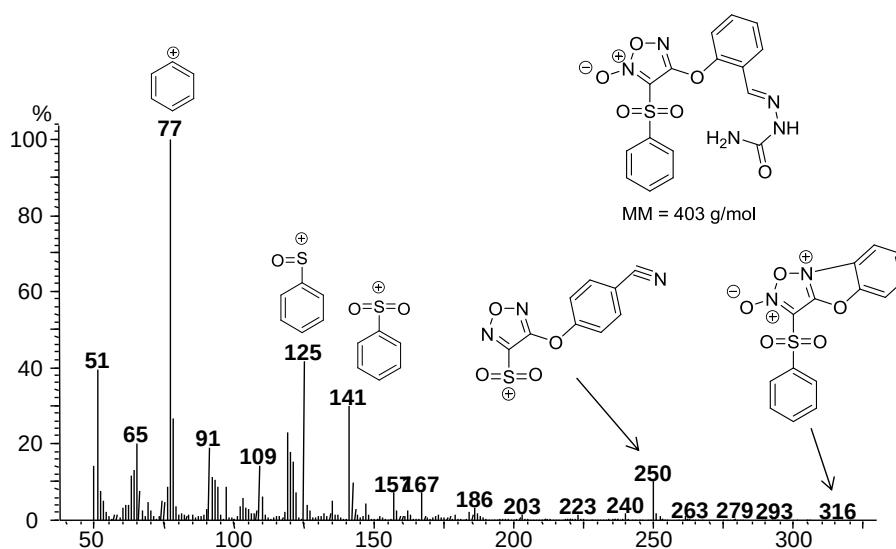
Os espectros de massas dos compostos 19a e 21a são apresentados nos Espectros 22 e 23, respectivamente. O íon molecular do composto 19a não foi observado no espectro, mas a presença do fragmento de m/z 250 comprova a formação do produto (Espectro 22). Estudos realizados com os compostos finais 19b e 21b e com seu intermediário 10b mostraram que o fragmento m/z 250 (Figura 26) é um fragmento chave na formação dos compostos finais, inclusive quando não é possível observar a formação do íon molecular. A presença do íon molecular de m/z 420 e a observação do fragmento chave de m/z 250 comprovam a formação do composto 21a (Espectro 23).

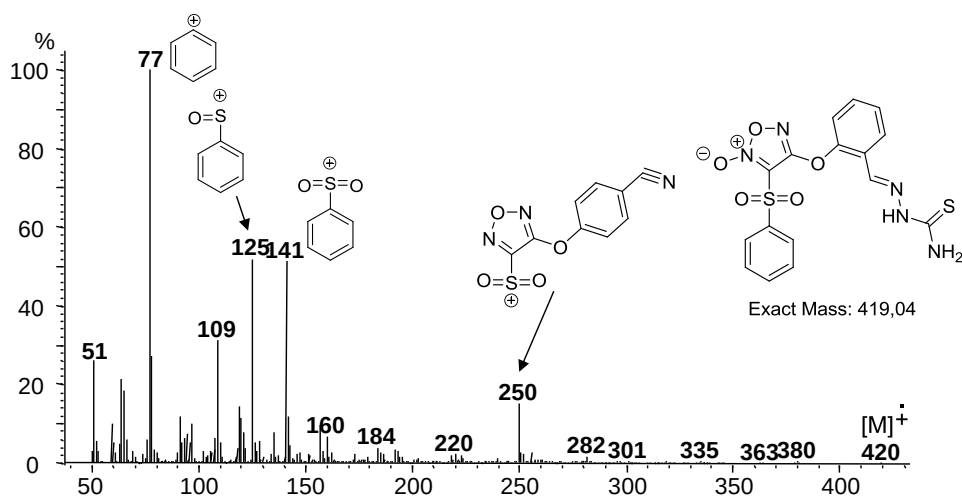
Figura 26 - Fragmento m/z 250



Fonte: dados da pesquisa

Espectro 22- Espectro de Massas do composto 19a



Espectro 23 - Espectro de Massas do composto 21a

Fonte: dados da pesquisa

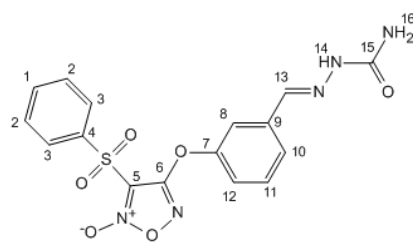
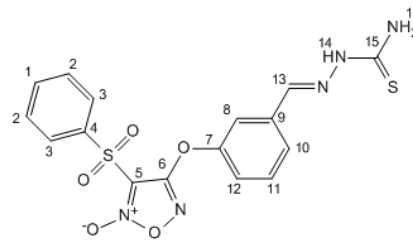
6.1.3.2. Síntese dos compostos LAPDESF FUR-TS 3 (19b) e LAPDESF FUR-TS 4 (21b)

Os compostos LAPDESF FUR-TS 3 (19b) e LAPDESF FUR-TS 4 (21b) foram sintetizados pela reação do intermediário 4-(3-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (10b) com cloridrato de semicarbazida (LAPDESF FUR-TS 3) e tiossemicarbazida (LAPDESF FUR-TS 4). O composto 19b apresentou-se como um sólido branco, com rendimento de reação de 64,4% e faixa de fusão de fusão de 193,8°C – 197,3°C. Já o composto 21b foi isolado como um sólido branco, apresentando rendimento de 42,9% e faixa de fusão de 163°C – 172°C. Os compostos foram caracterizados por infravermelho e RMN de ^1H e de ^{13}C .

Nos espectros de RMN de ^1H (Espectros 24 e 26) destacam-se os sinais referentes aos hidrogênios da posição em δ 10,47ppm (composto 19b) e δ 11,56ppm (composto 21b), o sinal do hidrogênio do carbono da imina em δ 7,79ppm (Composto 19b) e δ 8,31ppm (composto 21b), ambos sendo simpletos.

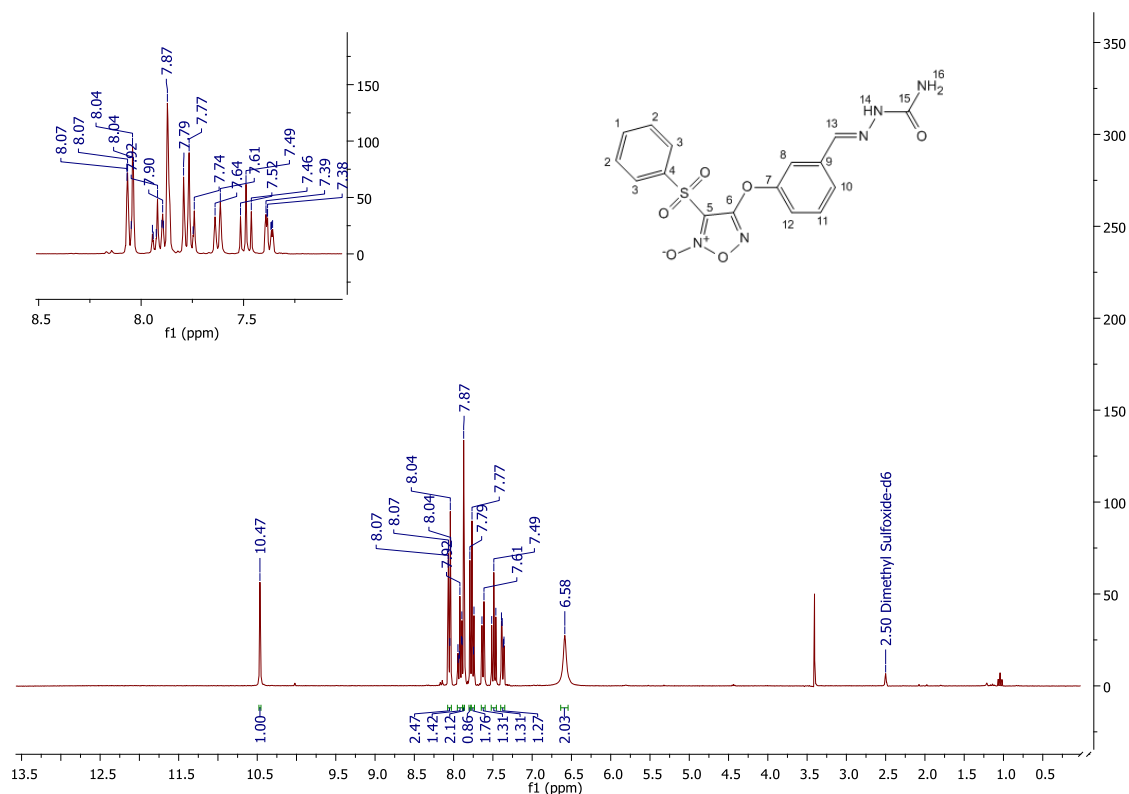
Nos espectros de RMN de ^{13}C (Espectros 25 e 27) é possível observar os deslocamentos dos sinais dos carbonos da posição 15 dos compostos 19b e 21b em δ 158,56ppm e δ 178,18, respectivamente. Além disso, os carbonos das posições 5 e 6, do anel furoxânico também podem ser observados. Também estão presentes os sinais dos carbonos da ligação imina, posição 13, nos deslocamentos δ 130,46ppm (composto 19b) e δ 130,50ppm (composto 21b).

A Tabela 5 mostra os deslocamentos químicos nos RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos.

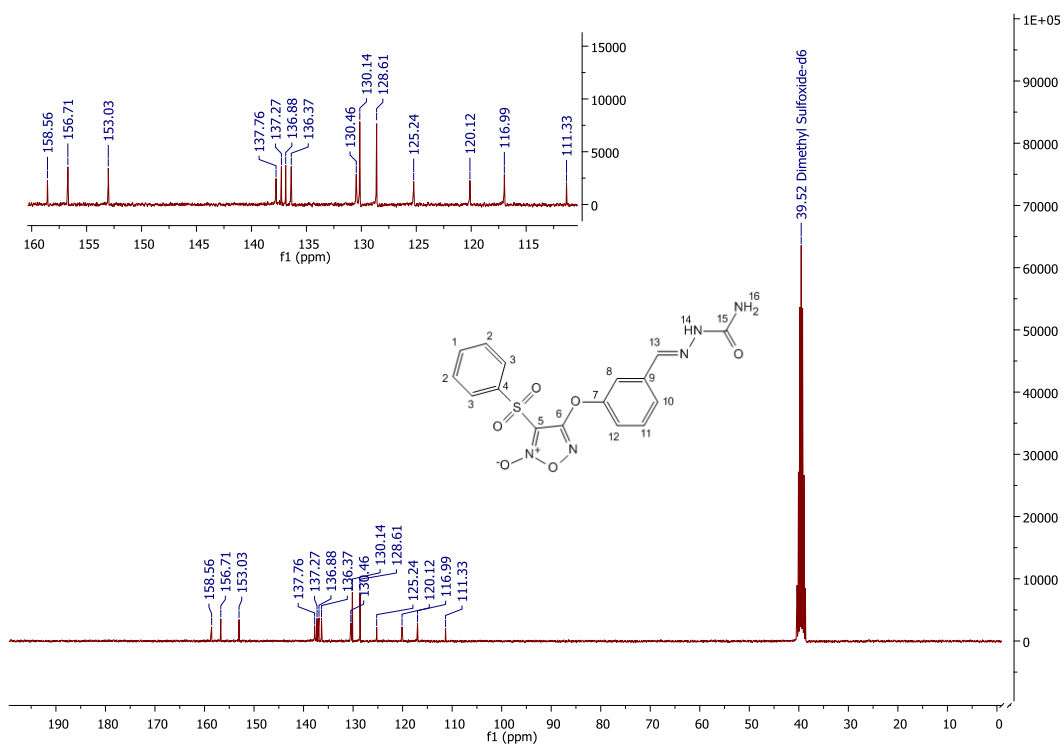
Tabela 5 - Deslocamentos químicos dos compostos 19b e 21b no RMN ^1H e RMN ^{13}C **19b****21b**

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	7,91 (m; 3H)	136,88	7,92 (tt; 1H)	136,63
2	7,91 (m; 3H)	128, 61	7,78 (m; 2H)	128,58
3	8,05 (m; 2H)	130,14	8,05 (m; 3H)	130,09
4	-	137,76	-	140,57
5	-	111,33	-	111,31
6	-	156,71	-	158,51
7	-	153,03	-	153,04
8	7,75 (m; 1H)	136,37	8,05 (m; 3H)	136,33
9	-	137,27	-	136,87
10	7,49 (t; 1H)	120,12	7,43 (m; 1H)	120,87
11	7,37 (m; 1H)	116,99	7,52 (t; 1H)	117,61
12	7,63 (d; 1H)	125, 24	7,73 (m; 1H)	126,01
13	7,79 (s; 1H)	130,46	8,31 (s; 1H)	130,50
14	10,47 (s; 1H)	-	11,56 (s; 1H)	-
15	-	158,56	-	178,18
16	6,58 (s; 2H)	-	8,12 (s; 1H)/7,98 (s; 1H)	-

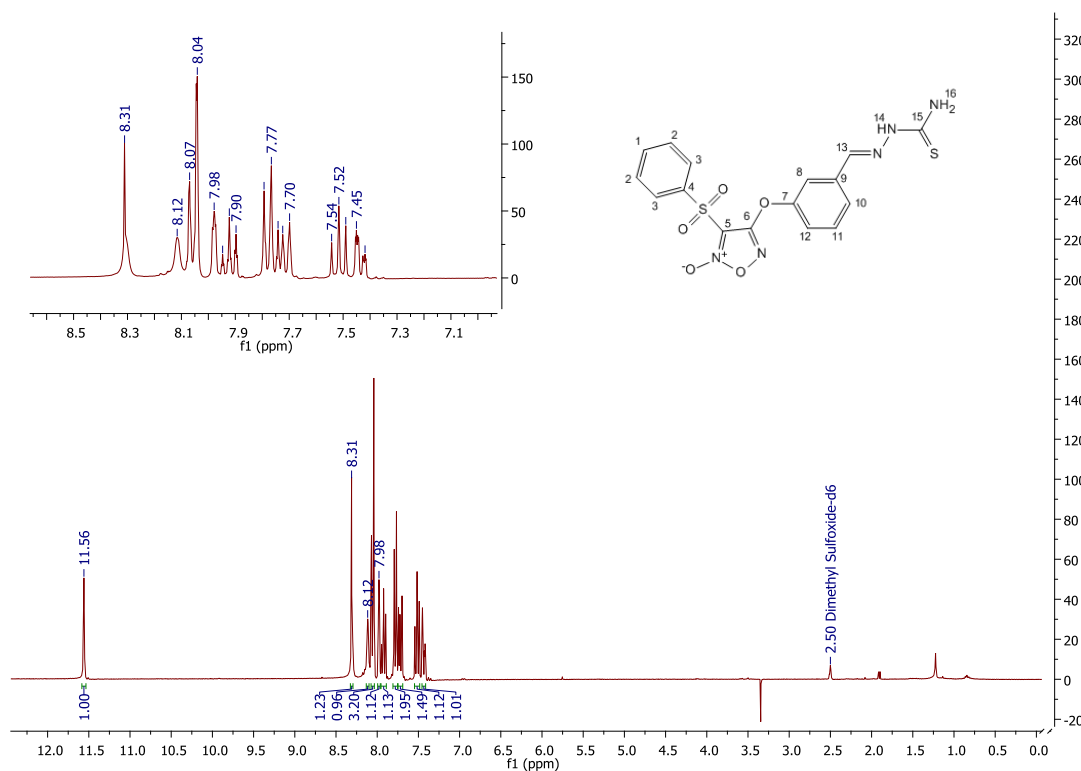
Fonte: dados da pesquisa

Espectro 24 - Espectro de RMN ^1H do composto 19b (300 MHz; DMSO)

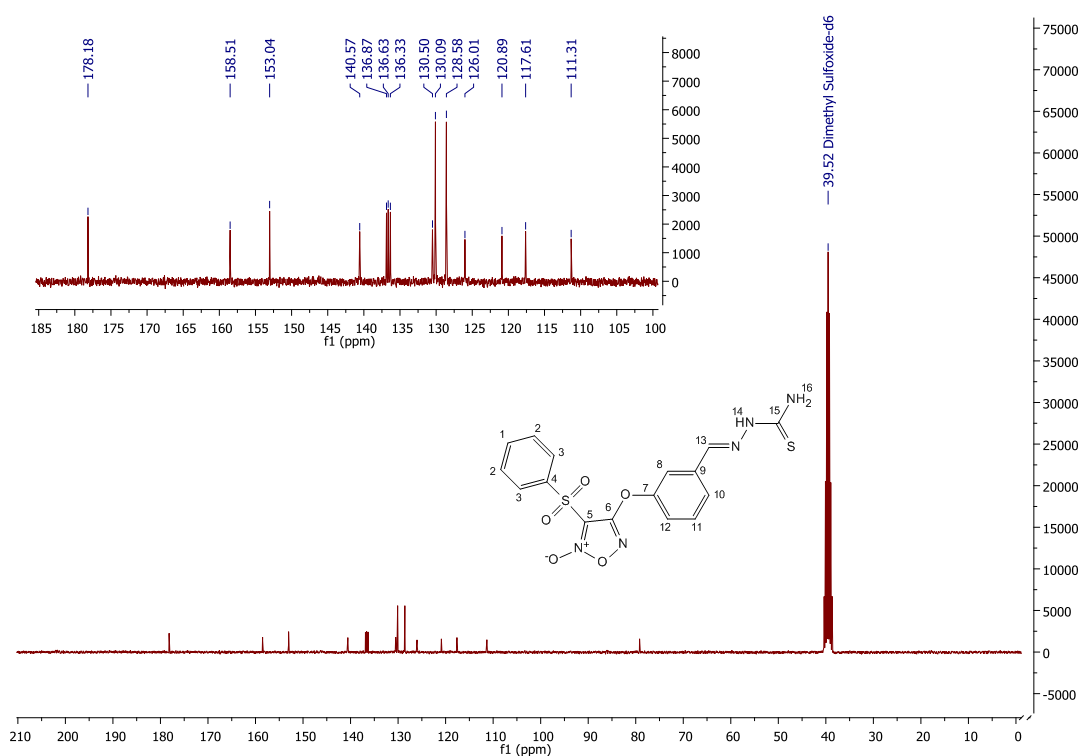
Fonte: dados da pesquisa

Espectro 25 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 19b (75 MHz; DMSO)

Fonte: dados da pesquisa

Espectro 26 - Espectro de RMN de ^1H do composto 21b (300 MHz; DMSO)

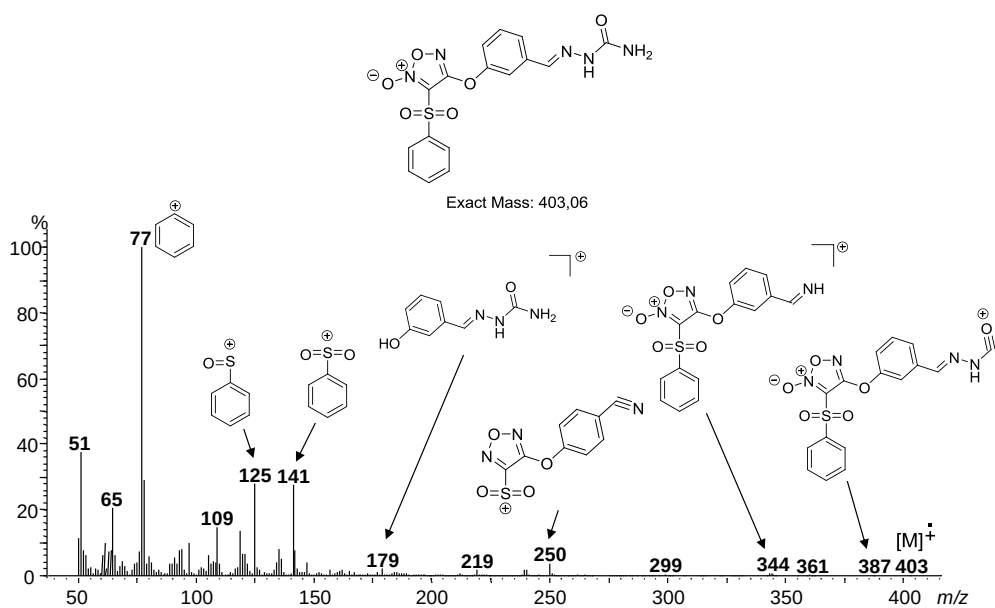
Fonte: dados da pesquisa

Espectro 27 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 21b (75 MHz; DMSO)

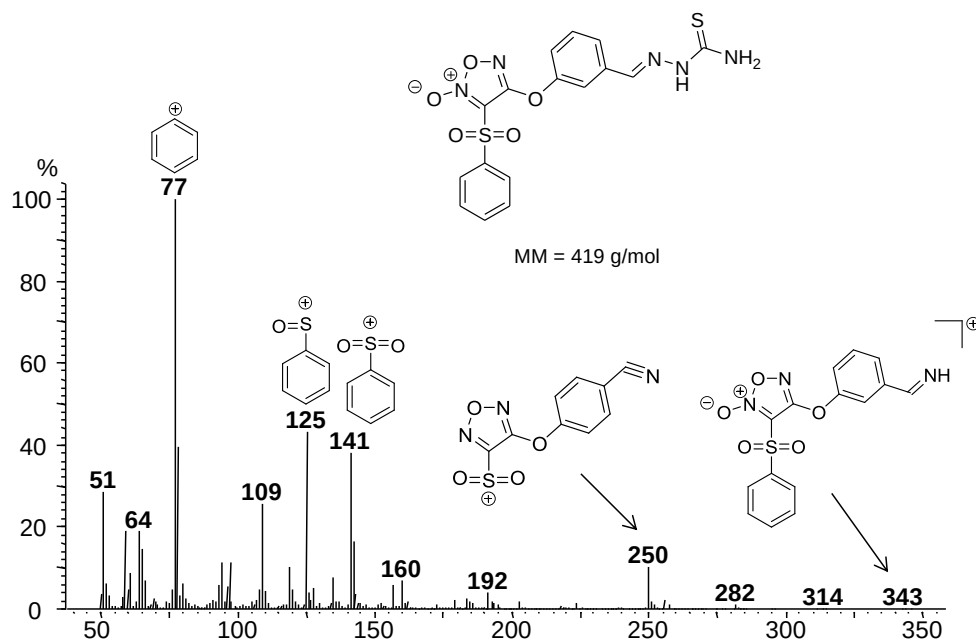
Fonte: dados da pesquisa

Os espectros de massas dos compostos 19b e 21b são apresentados nos Espectros 28 e 29, respectivamente. Para o composto 19b, a presença do íon molecular de m/z 403, e os fragmentos de m/z 387, 344, 250 e 179 comprovam a formação do produto (Espectro 28). O íon molecular do FUR-TS4 não foi observado (Espectro 29), mas a presença do fragmento chave de m/z 250 e também do fragmento de m/z 343 comprovam a formação do produto.

Espectro 28 - Espectro de Massas do composto 19b

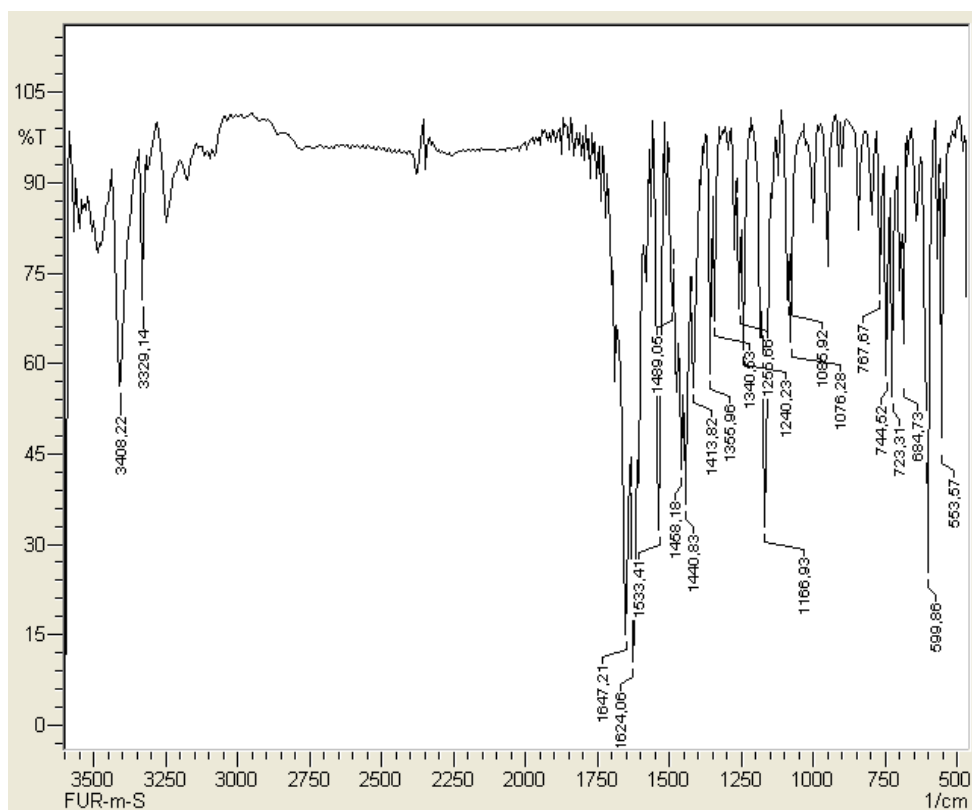


Fonte: dados da pesquisa

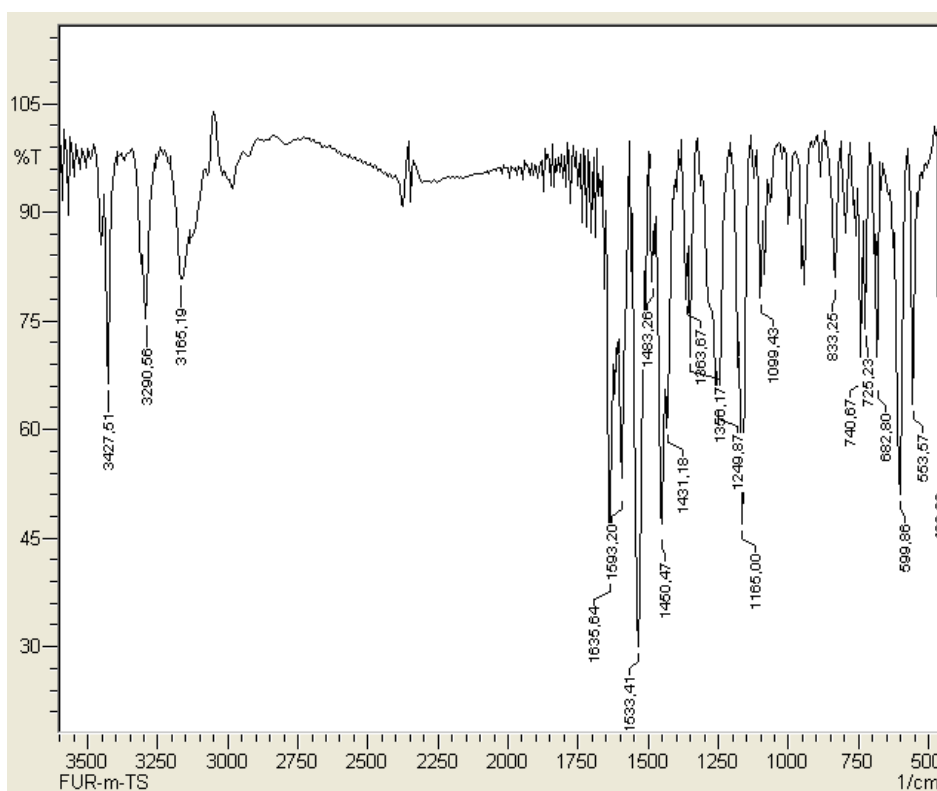
Espectro 29 - Espectro de Massas do composto 21b

Fonte: dados da pesquisa

O espectro de infravermelho (Espectro 30) do composto LAPDES FUR-TS 3 apresenta os estiramentos de N-H_{primária} em 3408 cm⁻¹ (simétrico) e 3329 cm⁻¹ (assimétrico), N-H_{secundária} em 3250 cm⁻¹, C=O em 1647 cm⁻¹, C-N_{imina} = 1624 cm⁻¹ e N-O em 1533 cm⁻¹ referente ao núcleo furoxânico. Já o espectro do composto LAPDES FUR-TS 4 (Espectro 31) apresenta os estiramentos de N-H_{primária} em 3427 cm⁻¹ (simétrico) e 3290 cm⁻¹ (assimétrico), N-H_{secundária} em 3165 cm⁻¹, C-N_{imina} = 1590 cm⁻¹ e N-O em 1533 cm⁻¹.

Espectro 30 - Espectro de infravermelho do composto 19b.

Fonte: dados da pesquisa

Espectro 31 - Espectro de infravermelho do composto 21b

Fonte: dados da pesquisa

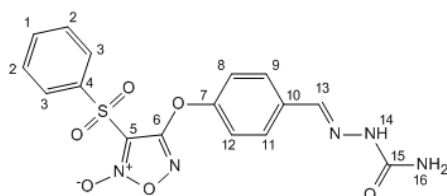
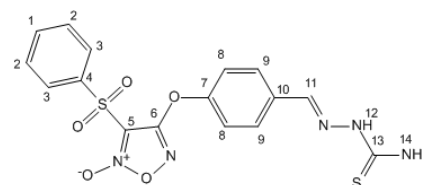
6.1.3.3. Síntese dos compostos LAPDESF FUR-TS 5 (19c) e LAPDESF FUR-TS 6 (21c)

A síntese dos compostos LAPDESF FUR-TS 5 (19c) e LAPDESF FUR-TS 6 (21c) ocorreu pela reação do intermediário 4-(4-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (10c) com cloridrato de semicarbazida (LAPDESF FUR-TS 5) e tiossemicarbazida (LAPDESF FUR-TS 6). O composto (19c) foi obtido como um sólido branco, com rendimento de reação de 55,7% e faixa de fusão de fusão de 207°C – 219°C. Já o composto (21c) apresentou-se como um sólido branco, com rendimento de 51,6% e faixa de fusão de 190°C – 193°C. Os compostos foram caracterizados por infravermelho e RMN de ^1H e de ^{13}C .

Nos espectros de RMN de ^1H (Espectros 32 e 34) destacam-se os sinais referentes aos hidrogênios da posição em δ 10,33ppm (composto 19c) e δ 11,51ppm (composto 21c), o sinal do hidrogênio do carbono da imina em δ 7,83ppm (composto 19c) e δ 8,26ppm (composto 21c), ambos sendo simpletos.

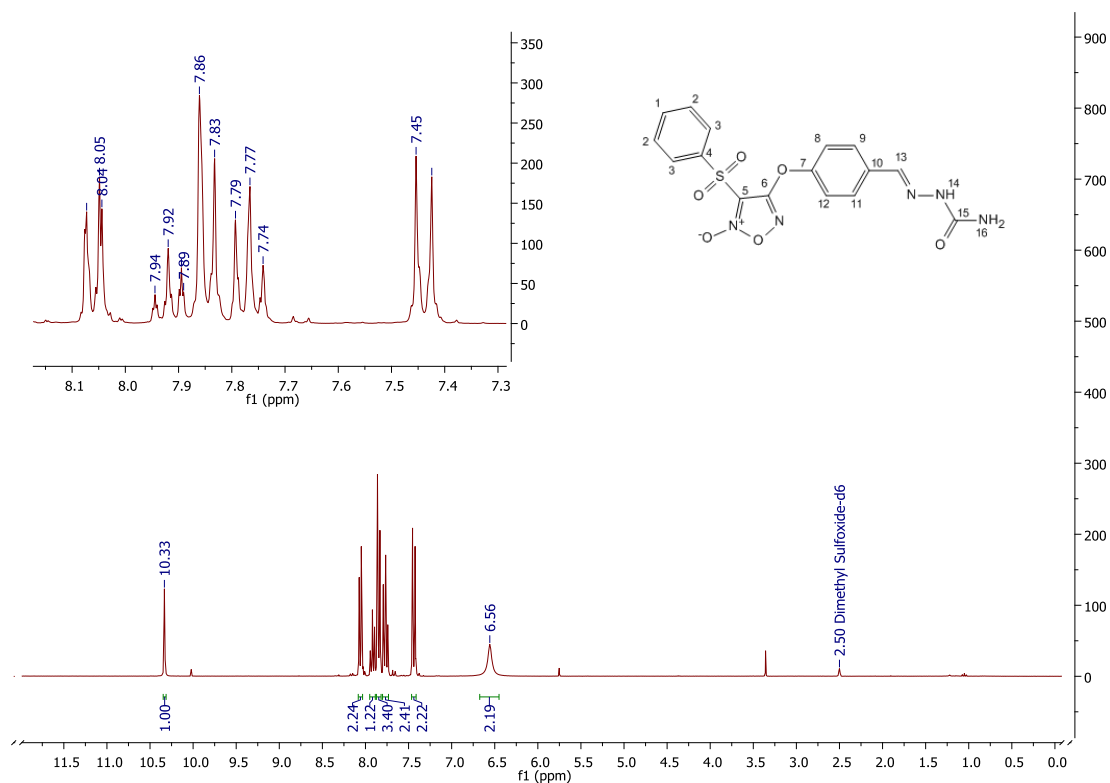
Nos espectros de RMN de ^{13}C (Espectros 33 e 35) é possível observar os deslocamentos dos sinais dos carbonos da posição 13 dos compostos LAPDESF FUR-TS 5 e LAPDESF FUR-TS 6 em δ 158,38ppm e δ 178,08, respectivamente. Além disso, os carbonos das posições 5 e 6, do anel furoxânico também podem ser observados. Também estão presentes os sinais dos carbonos da ligação imina, posição 11, nos deslocamentos δ 133,32ppm (composto 19c) e δ 132,65ppm (composto 21c).

A Tabela 6 mostra os deslocamentos químicos nos RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos.

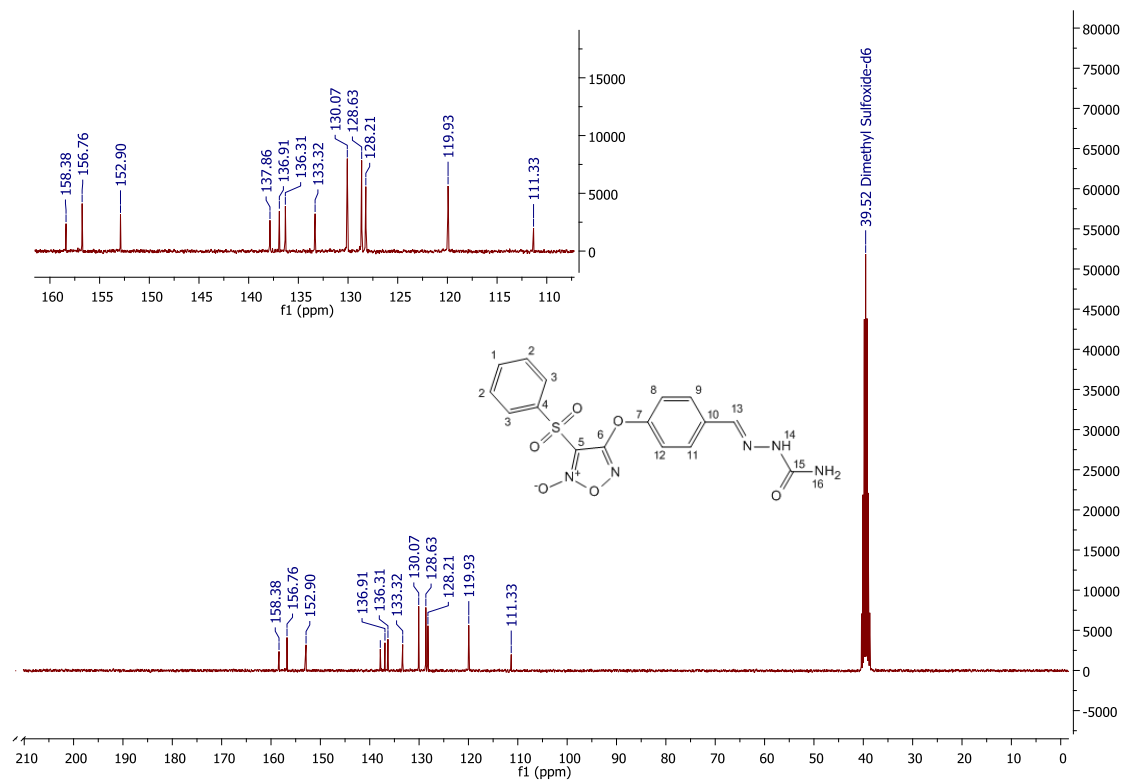
Tabela 6 - Deslocamentos químicos dos compostos 19b e 21b no RMN ^1H e RMN ^{13}C **19c****21c**

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	7,90 (m; 3H)	136,91	7,92 (m; 3H)	136,88
2	7,90 (m; 3H)	128,63	7,92 (m; 3H)	129,63
3	8,06 (m; 2H)	130,07	8,05 (m; 3H)	130,06
4	-	137,86	-	140,84
5	-	111,33	-	111,35
6	-	156,76	-	158,25
7	-	152,90	-	153,54
8	7,77 (m; 2H)	128,21	7,76 (dd; 2H)	128,63
9	7,44 (m; 2H)	119,93	7,46 (m; 2H)	119,94
10	-	136,31	-	136,30
11	7,83 (s; 1H)	133,32	8,26 (s; 1H)	132,65
12	10,33 (s; 1H)	-	11,51 (s; 1H)	-
13	-	158,38	-	178,08
14	6,56 (s; 2H)	-	8,09 (s; 1H)/8,05 (m; 3H)	-

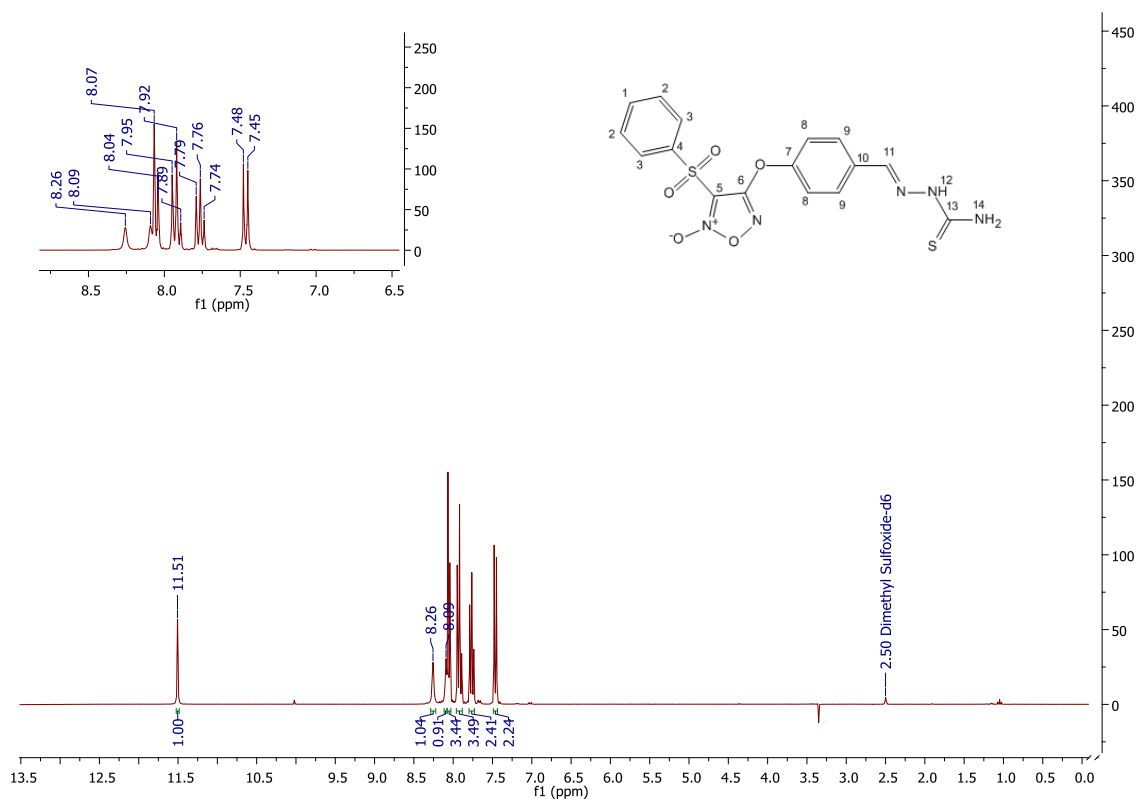
Fonte: dados da pesquisa

Espectro 32 - Espectro de RMN de ^1H do composto 19c (300 MHz; DMSO)

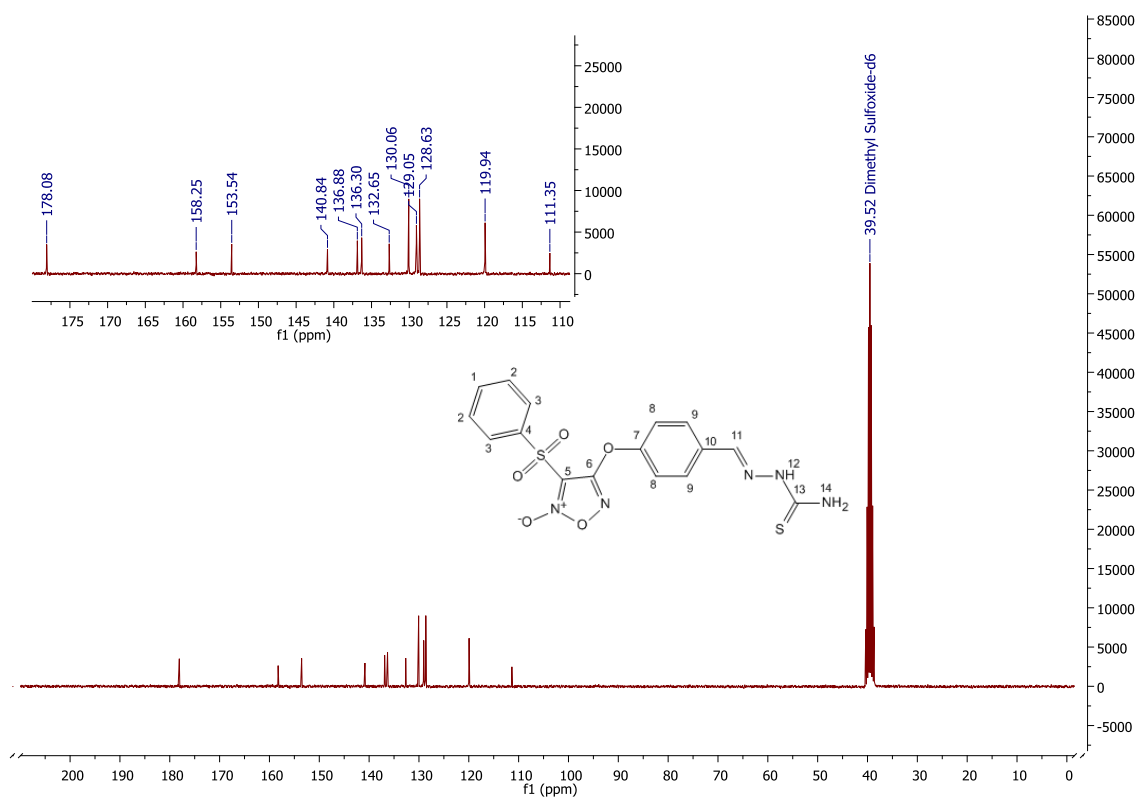
Fonte: dados da pesquisa

Espectro 33 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 19c (75 MHz; DMSO)

Fonte: dados da pesquisa

Espectro 34 - Espectro de RMN de ^1H do composto 21c (300 MHz; DMSO)

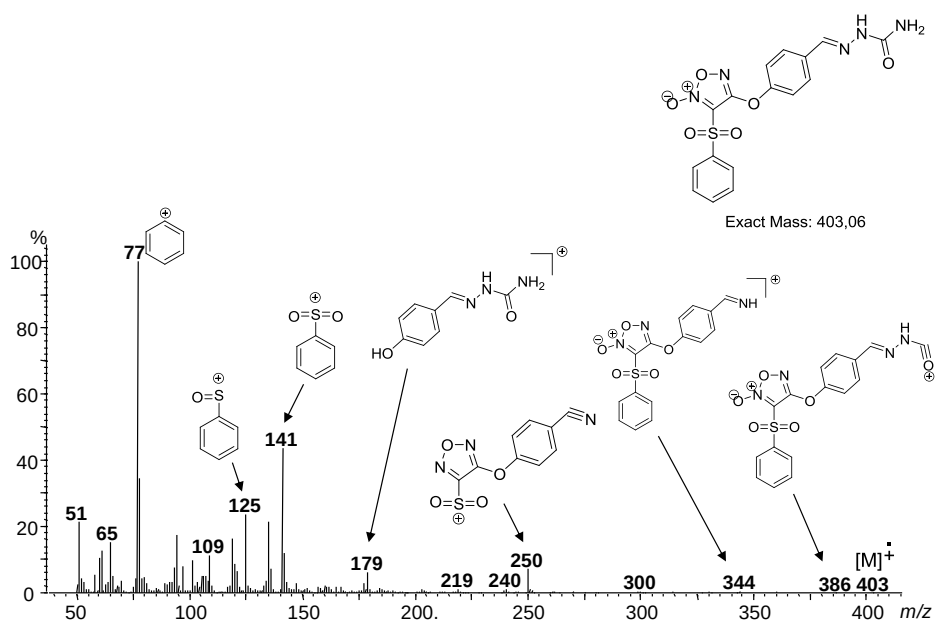
Fonte: dados da pesquisa

Espectro 35 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 21c (75MHz; DMSO)

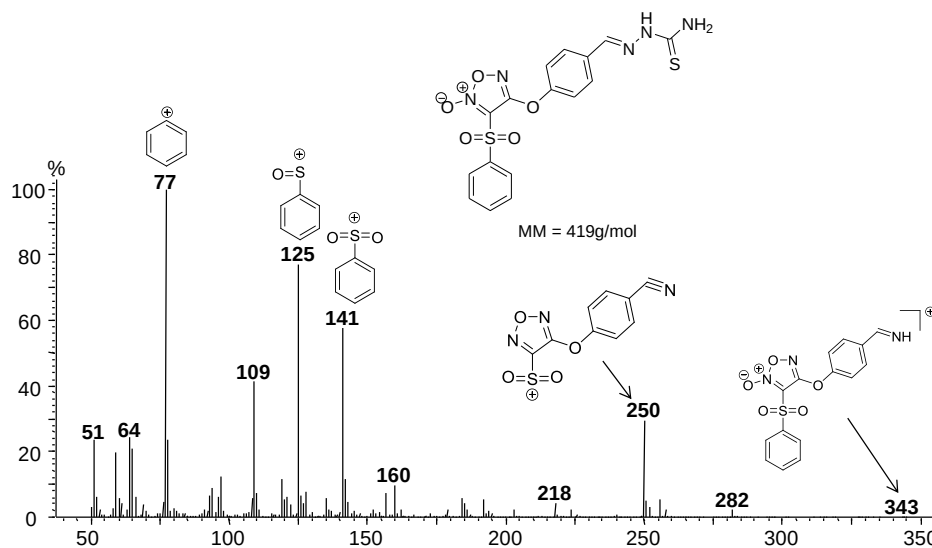
Fonte: dados da pesquisa

Os espectros de massas dos compostos 19c e 21c são apresentados nos Espectros 36 e 37, respectivamente. A presença do íon molecular de m/z 403 e a observação dos íons fragmentos de m/z 386, 344, 250 e 179 comprovam a formação do composto 19c (Espectro 36). O íon molecular do composto 21c não foi observado (Espectro 37), mas a presença do fragmento chave de m/z 250 e também do fragmento de m/z 343 comprovam a formação do produto.

Espectro 36 - Espectro de Massas do composto 19c

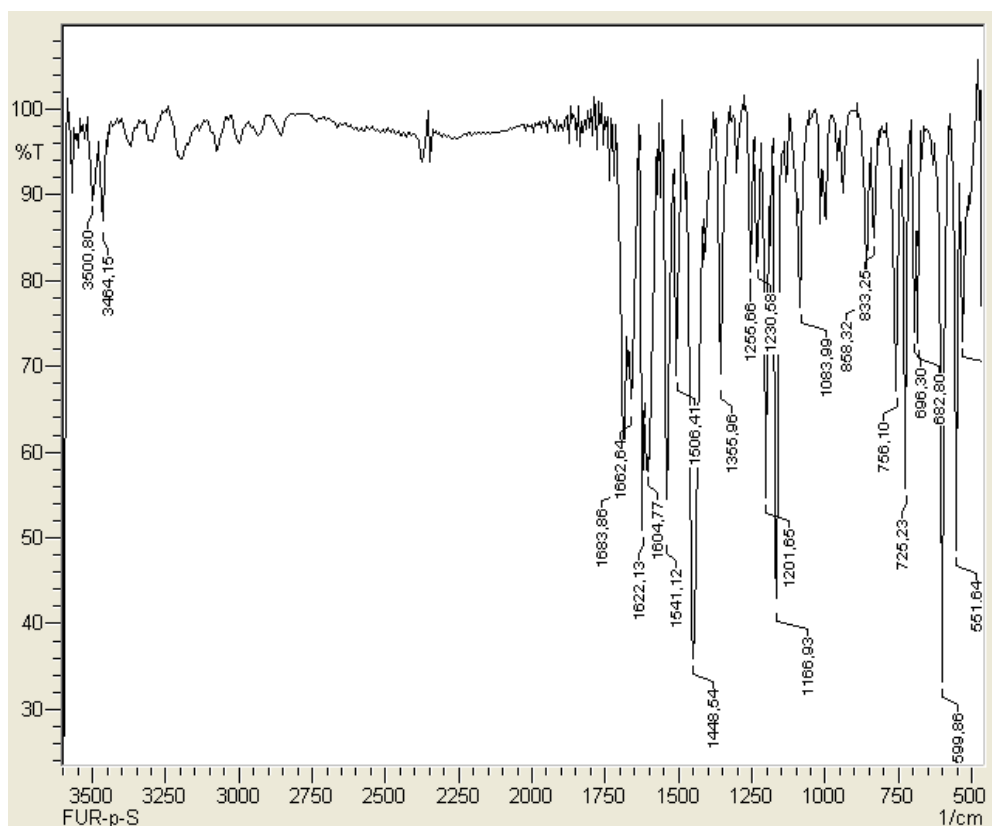


Fonte: dados da pesquisa

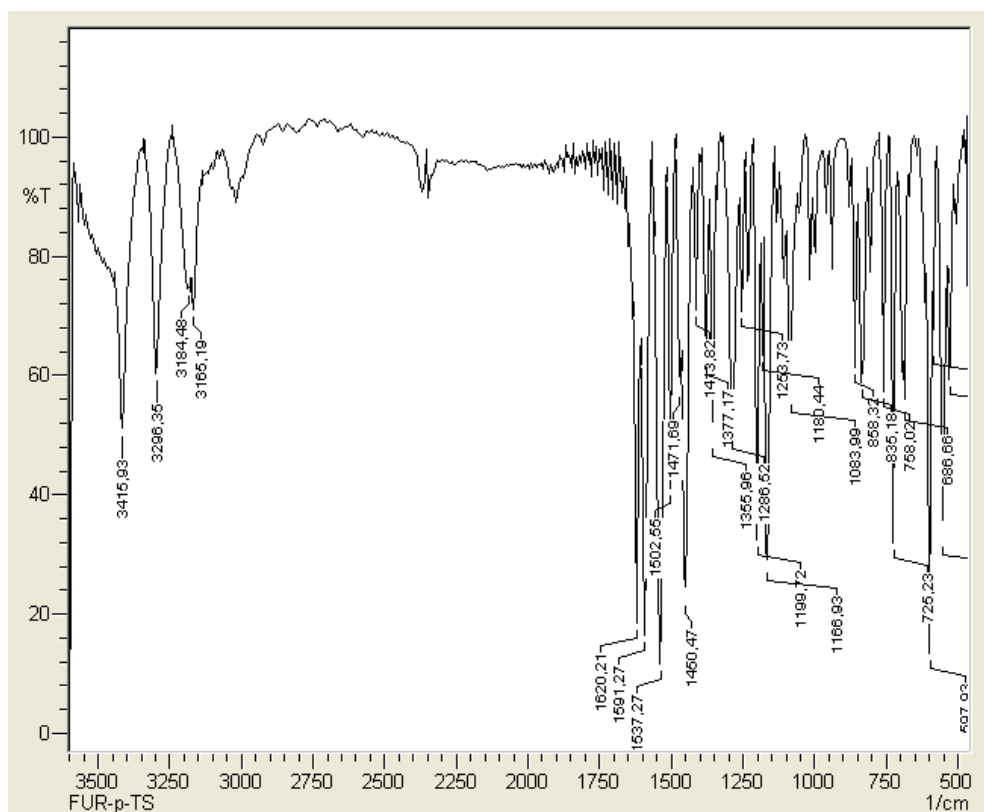
Espectro 37- Espectro de Massas do composto 21c

Fonte: dados da pesquisa

O espectro de infravermelho (Espectro 38) do composto LAPDES FUR-TS 5 apresenta os estiramentos de N-H_{primária} em 3500 cm⁻¹ (simétrico) e 3464 cm⁻¹ (assimétrico), C=O em 1683 cm⁻¹, C-N_{imina} em 1622 cm⁻¹ e N-O em 1541 cm⁻¹ referente ao núcleo furoxânico. Já o espectro do composto LAPDES FUR-TS 6 (Espectro 39) apresenta os estiramentos de N-H_{primária} em 3415 cm⁻¹ (simétrico) e 3296 cm⁻¹ (assimétrico), N-H_{secundária} em 3165 cm⁻¹, C-N_{imina} em 1620 cm⁻¹ e N-O em 1537 cm⁻¹.

Espectro 38 - Espectro de infravermelho do composto 19c

Fonte: dados da pesquisa

Espectro 39 - Espectro de infravermelho composto 21c

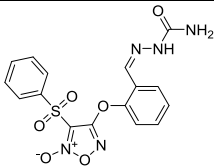
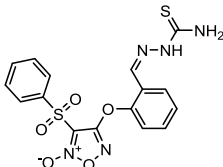
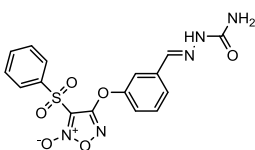
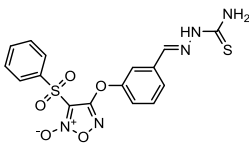
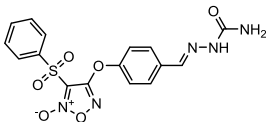
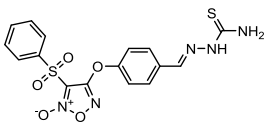
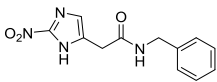
Fonte: dados da pesquisa

6.2. Ensaios

6.2.1. Avaliação *in vitro* da atividade tripanossomicida em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Os compostos sintetizados foram avaliados quanto à atividade tripanossomicida em formas epimastigotas de cepas Y do *T. cruzi*, em um ensaio *in vitro*. Os resultados de IC₅₀, demonstrados na Tabela 7, foram comparados com o fármaco benznidazol (substância padrão).

Tabela 7 - Valores de IC₅₀ dos compostos contra formas epimastigotas de *T. cruzi*

Substâncias	Estrutura	IC ₅₀ µM
Fur-TS 1		<2,5
Fur-TS 2		<2,4
Fur-TS 3		91,5
Fur-TS 4		<2,4
Fur-TS 5		<2,5
Fur-TS 6		<2,4
benznidazol		34,8

Fonte: dados da pesquisa

Não foi possível obter resultados conclusivos de IC₅₀ dos compostos LAPDES FUR-TS 1, 2, 4, 5, 6. Apenas foi possível calcular o resultado do composto LAPDES FUR-TS 3, que mostrou um IC₅₀ de 91,5 µM. Considerando que os demais compostos apresentaram IC₅₀ abaixo de 2,5 µM, pode-se sugerir atividade superior ao fármaco benznidazol (34,8 µM). No entanto, é importante ressaltar que houve formação de cristais no meio de cultura, o que pode ter influenciado os resultados.

6.2.2. Avaliação da citotoxicidade em macrófagos e atividade tripanossomicida em formas amastigota intracelular de *Trypanosoma cruzi*

6.2.2.1. Avaliação da citotoxicidade em macrófagos

A avaliação da citotoxicidade em macrófagos foi realizada para os compostos LAPDES FUR-TS 1,3, 4, 5 e 6. Os resultados estão demonstrados na forma de IC₅₀, conforme descrito na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultado da citotoxicidade em macrófagos

Composto	Citotoxicidade (µM)
	IC ₅₀
LAPDES FUR-TS 1	26,5 ± 0,8
LAPDES FUR-TS 2	ND
LAPDES FUR-TS 3	11,6 ± 0,4
LAPDES FUR-TS 4	59,0 ± 4,5
LAPDES FUR-TS 5	12,6 ± 0,1
LAPDES FUR-TS 6	10,32 ± 0,3

*ND = não determinado

Fonte: dados da pesquisa Os compostos apresentaram valores de IC_{50} relativamente baixos, o que sugere toxicidade aos macrófagos em baixas concentrações. Dentre os compostos obtidos, o LAPDESF FUR-TS 4 apresentou menor toxicidade ($IC_{50} = 59 \mu M$) e o composto LAPDESF FUR-TS 6 apresentou-se o mais citotóxico ($IC_{50} = 10,32 \mu M$).

6.2.2.2. Atividade tripanossomicida em formas amastigota intracelular de *Trypanosoma cruzi*

Quando a doença de Chagas atinge sua forma crônica não são encontrados parasitos na forma tripomastigota na corrente sanguínea. O parasito fica alojado em células na forma amastigota. Devido a isso, a avaliação da atividade tripanossomicida dos compostos em formas intracelular é importante indicativo da atividade dos compostos durante a fase crônica da doença.

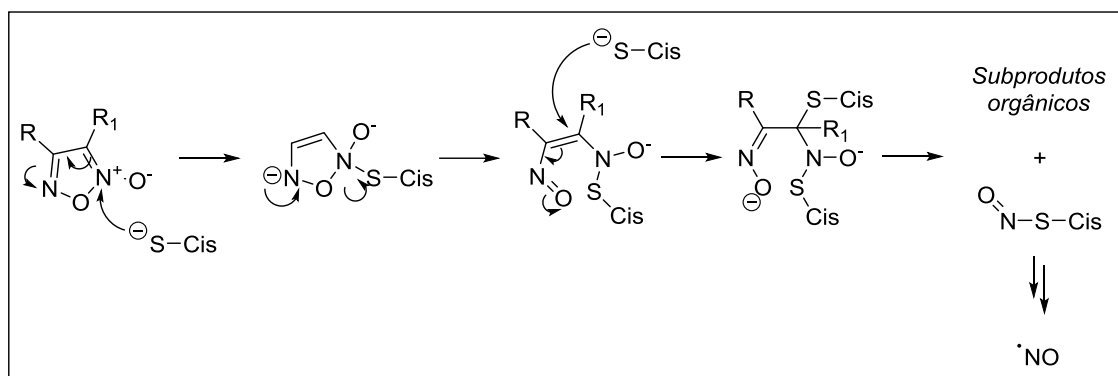
O ensaio para a avaliação tripanossomicida em formas amastigotas foi realizado no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara. As etapas de obtenção de macrófagos, infecção do parasita, tratamento e fixação foram realizadas com sucesso. No entanto, não foi possível realizar a leitura dos resultados, uma vez que os macrófagos estavam lisados nas lamínulas, inclusive do controle branco (contendo apenas macrófagos, sem infecção e sem tratamento). Acredita-se que o motivo da lise das células ocorreu devido a uma contaminação bacteriana em algum momento do procedimento experimental, apesar de todo cuidado asséptico utilizado pelos manipuladores.

6.2.3. Detecção quantitativa de nitrito

Os doadores de óxido nítrico (NO) são uma classe de compostos com atividades de ação muito ampla, uma vez que o óxido nítrico está envolvido em uma série de processos fisiopatológicos. Os derivados furoxânicos são um exemplo de doadores de NO e devido a isso algumas atividades biológicas desses compostos estão relacionadas com esse mecanismo, como atividade antiplaquetária, vasodilatadora, neuroproteção e também a atividade antiparasitária (CERECETTO; PORCAL, 2005; HERNÁNDEZ et al., 2013; SCHIEFER et al., 2012), alvo explorado neste projeto.

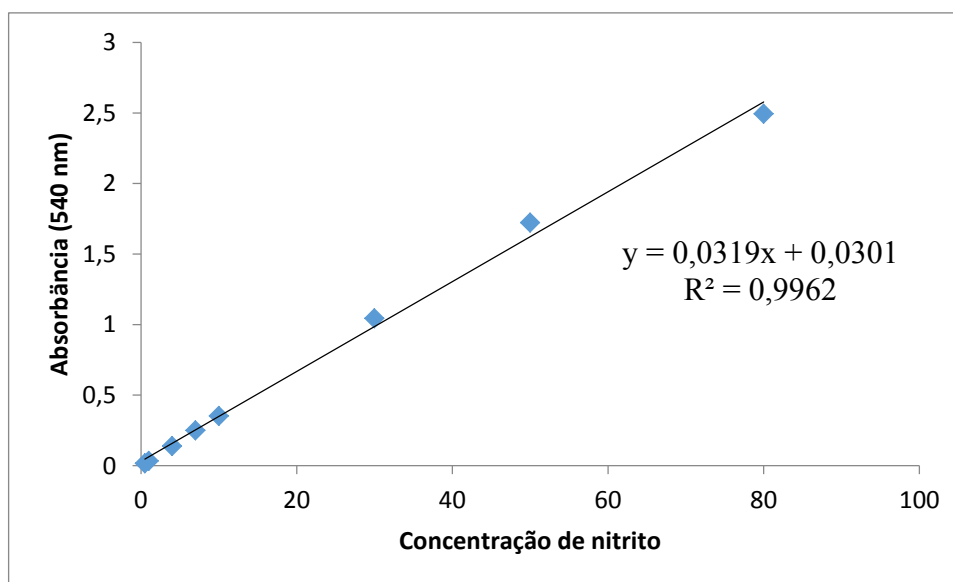
Devido à concentração pequena e a baixa estabilidade do NO, pois reage rapidamente com a água formando nitrato e nitrito, a detecção dessa substância é um desafio (DUSSE, 2003). Uma forma de avaliar a capacidade de doação de NO por um determinado composto é através da quantificação de nitrito em uma solução aquosa. Sorba et al., (1997) descreveu um dos principais métodos para a detecção de nitrito para a avaliação de derivados furoxânicos, que foi utilizado para a avaliação dos compostos obtidos neste trabalho.

A doação de óxido nítrico pode ocorrer de duas maneiras em geral: químico ou enzimático. Na literatura é proposto que a doação de NO pelo núcleo furoxânico ocorre por mecanismo químico, através da reação do núcleo furoxânico com grupamentos tióis, onde os carbonos do anel sofrem ataque nucleofílico dos grupamentos tióis (FEELISCH; SCHÖNAFINGER; NOACK, 1992; GASCO, et al., 2004). Santos (2009) propõe em seu trabalho que o mecanismo de doação dos furoxanos é cisteína-dependente, na qual o ataque nucleofílico não ocorre nos carbonos do anel, mas diretamente na porção N-óxido, conforme demonstrado no Esquema 17.

Esquema 17 - Mecanismo cisteína-dependente de doação de NO pelo núcleo furoxano

Fonte: Adaptado de SANTOS, 2009

As concentrações de nitrito foram quantificadas a partir da equação da reta da curva padrão preparada a partir de soluções padrões de nitrito de sódio em concentrações de 0,5 – 80 nmol/ml (Figura 27).

Figura 27 - Gráfico de Absorbância X Concentração de nitrito

Fonte: dados da pesquisa

A capacidade de doação de NO foi expressa por porcentagem de nitrito (NO₂⁻ mol/mol). Os resultados estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de porcentagem de doação de NO dos compostos obtidos

COMPOSTO	DOAÇÃO DE NO (%)
LAPDES FUR-TS 1	20,01±1,4
LAPDES FUR-TS 2	19,93±0,3
LAPDES FUR-TS 3	19,46±0,8
LAPDES FUR-TS 4	17,98±1,1
LAPDES FUR-TS 5	18,99±0,1
LAPDES FUR-TS 6	19,43±1,9
Dinitrato de isossorbida	10,71±1

Fonte: dados da pesquisa

Podemos observar através dos resultados apresentados que todos os compostos apresentam a capacidade de doação de NO, apresentando doação maior que o composto utilizado como controle positivo, o dinitrato de isossorbida.

6.2.4. Avaliação *in vivo* da mutagenicidade dos compostos sintetizados pelo teste de micronúcleo

Para a avaliação da mutagenicidade neste trabalho foi utilizado o ensaio de micronúcleo (MN), que avalia a frequência de reticulócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos utilizando lâminas pré-coradas com laranja de acridina (acridine orange), um corante fluorescente, com metodologia descrita por Hayashi et al. (1999).

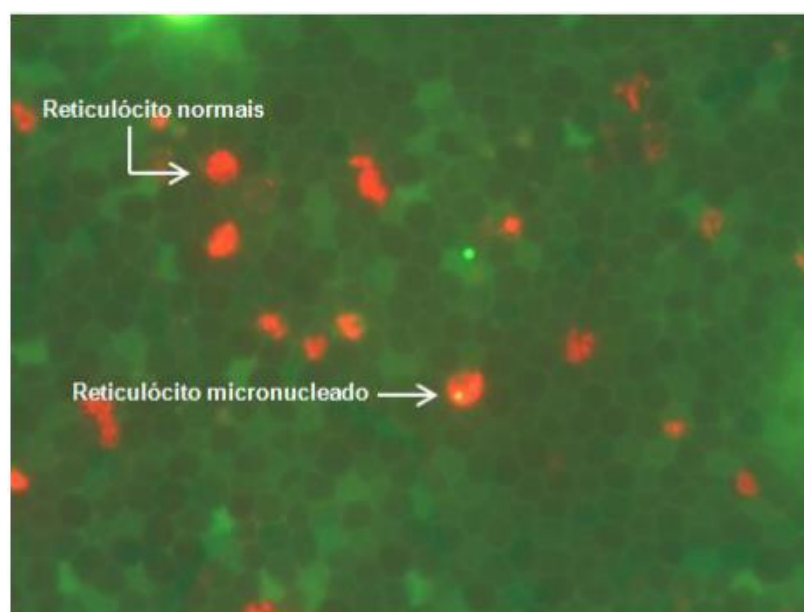
O teste de micronúcleo *in vivo* em sangue periférico de roedores, dentre os testes preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, é extensamente aceito e recomendado para a avaliação da mutagenicidade durante o registro de novos

produtos químicos e farmacêuticos para sua entrada no mercado mundial (CHOY, 2001; RIBEIRO et al., 2003).

O teste é capaz de detectar tanto lesões induzidas na estrutura dos cromossomos (efeitos clastogênicos) como também alterações na distribuição desses cromossomos durante o processo de divisão celular (efeitos aneugênicos), induzidos por substâncias químicas, através da formação de micronúcleos com fragmentos de DNA ou cromossomos inteiros (RABELO-GAY et al., 1991; HEDDLE et al., 1991).

Durante a formação de eritrócitos policromáticos, o núcleo principal é expulso, se transformando assim em células anucleadas. Dessa forma, quando ocorre a formação de um micronúcleo, este pode permanecer no citoplasma dessas células. O aumento na frequência desses eritrócitos micronucleados em animais tratados indica a ocorrência de danos cromossômicos induzidos (HEDDLE et al., 1983; MACGREGOR et al., 1990). O corante utilizado nas lâminas permite a identificação de eritrócitos policromáticos (reticulócitos) ricos em RNA, por proporcionar coloração vermelha ao RNA e amarela ao DNA (Figura 22).

Figura 28 - Reticulócitos normais e reticulócito micronucleado



Fonte: Extraído de CHELUCCI, 2013

Há relatos na literatura que compostos com a capacidade de geração de óxido nítrico (NO) possam gerar danos ao DNA, podendo levar até a morte celular. A citotoxicidade e genotoxicidade do NO estão relatados em uma série de estudos, sendo associados também a carcinogenicidade desse composto. Além disso, também é relatada a capacidade do NO em induzir mutações cromossômicas, sendo mutagênico em diversos tipos de células, desde bactérias a modelos *in vivo* (BALBO et al., 2008; LIU; HOTCHKISS, 1995; OHSHIMA; BARTSCH, 1994; WINK et al., 1998). O NO pode reagir com o DNA por diferentes vias, ocasionando desaminação, formação de *N*-nitrosaminas e principalmente a formação de espécies reativas, como o ONOO⁻ (peroxinitrito), ocasionando danos oxidativos (BURNEY et al., 1999; WINK et al., 1998).

As moléculas obtidas na série dois deste trabalho apresentam o núcleo *N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (furoxano), conhecido e explorado neste trabalho pela sua capacidade de doação de NO e devido ao exposto acima se faz necessária a investigação da mutagenicidade dos mesmos, através do ensaio de micronúcleo *in vivo*, em sangue periférico de camundongos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

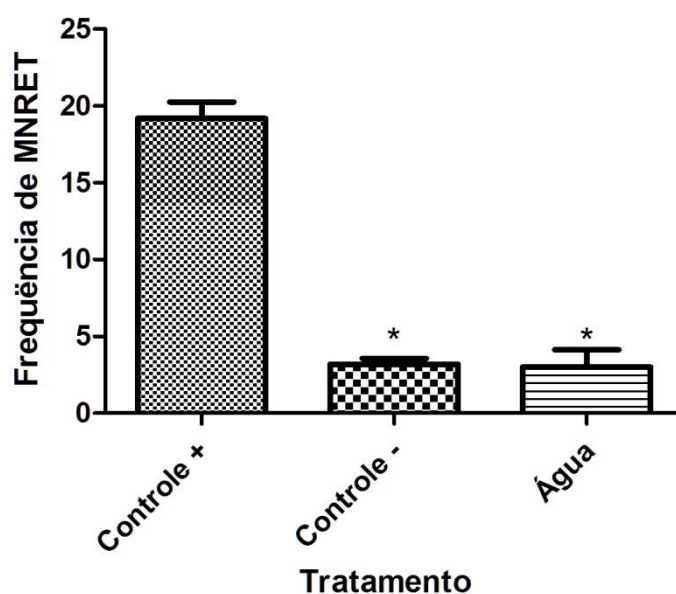
Tabela 10 - Número de células micronucleadas em cada animal

Tratamento (mg/Kg)	Animais					Média
	1	2	3	4	5	
Água	3	0	5	6	1	3±3
Controle -	3	2	3	4	4	3±1
Controle +	21	16	22	19	18	19±2
Fur-TS 1						
25	4	2	1	2	2	2±1
50	3	0	4	1	2	2±2
100	5	2	5	2	3	3±2
Fur-TS 2						
25	2	1	1	1	4	2±1
50	4	8	6	8	3	6±2
100	6	2	2	0	3	3±2
Fur-TS 3						
25	3	3	3	2	5	3±1
50	3	3	4	4	3	3±1
100	12	0	4	5	6	5±4
Fur-TS 4						
25	2	4	8	2	2	4±3
50	4	3	9	6	5	5±2
100	1	3	5	5	3	3±2
Fur-TS 5						
25	5	6	6	4	6	5±1
50	2	3	5	1	3	3±1
100	5	7	3	3	10	6±3
Fur-TS 6						
25	2	6	0	2	7	3±3
50	1	5	3	4	4	3±2
100	2	1	1	5	1	2±2

Fonte: dados da pesquisa

Os resultados dos controles (positivo, negativo e água) demonstraram que a frequência de micronúcleos no grupo exposto à ação do agente genotóxico ciclofosfamida foi significativamente maior em comparação aos grupos negativo (veículo: goma arábica 5%) e água, conforme visto anteriormente na literatura (RIBEIRO, 2003). A Figura 29 apresenta os resultados obtidos.

Figura 29 - Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão (DP) dos controles utilizados



* $p < 0,05$ (em relação ao controle positivo)

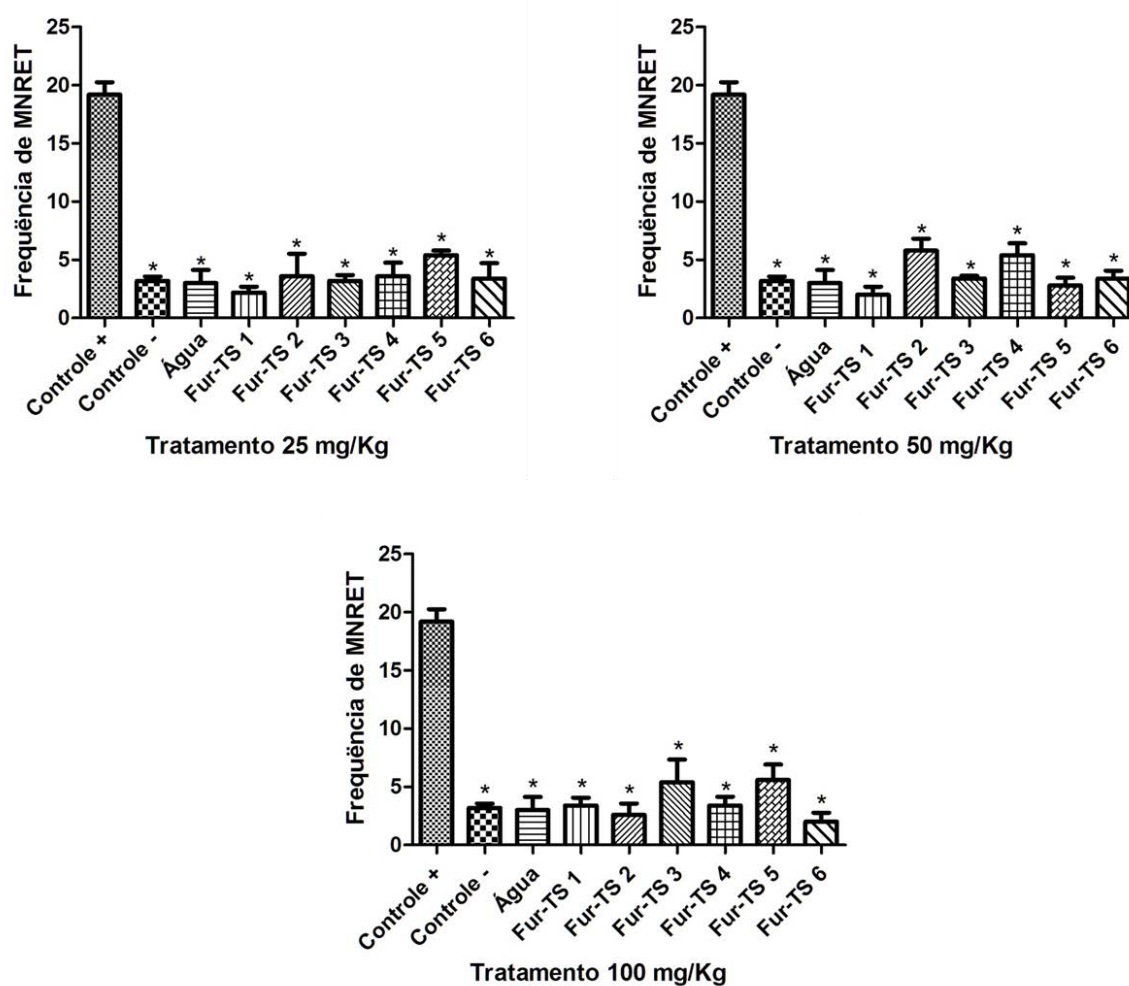
Fonte: dados da pesquisa

A Figura 30 apresenta os resultados obtidos da formação de micronúcleos nos grupos de animais expostos aos diferentes tratamentos ($p < 0,05$). Nos gráficos estão apresentadas as frequências médias de reticulócitos micronucleados dos compostos LAPDES Fur-TS 1-6, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/Kg, da água e dos controles positivo e negativo.

Os resultados demonstram que os compostos LAPDES Fur-TS 1-6 apresentaram frequência de células micronucleadas significativamente menor que o controle positivo

ciclofosfamida. Também não foi observado diferenças significativa entre a frequência dos compostos obtidos quando comparados com o controle negativo e água, ou quando comparados entre eles mesmos nas diferentes concentrações.

Figura 30 - Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão (DP) dos compostos obtidos em diferentes concentrações



* $p < 0,05$ (em relação ao controle positivo)

Fonte: dados da pesquisa

7. CONCLUSÕES

Foram sintetizados seis compostos intermediários (2, 5, 10a, 10b, 10c e 13) e caracterizados segundo dados da literatura.

Os compostos propostos para a série 1 de compostos não foram obtidos, apesar das diversas tentativas sintéticas.

Os seis compostos propostos para a série 2 (compostos LAPDESF FUR-TS 1 – 6) foram obtidos a partir das metodologias desenvolvidas, identificados e caracterizados por técnicas espectrométricas adequadas. Além disso, esses compostos foram avaliados quanto à capacidade de doação de óxido nítrico e atividade tripanossomicida em formas epimastigotas. Também foram avaliados quanto à citotoxicidade e mutagenicidade.

Os resultados do ensaio *in vitro* demonstram que os compostos apresentaram atividade contra as formas epimastigota de *T. cruzi*, sendo que os compostos LAPDESF FUR-TS 1, 2, 4, 5 e 6 apresentaram $IC_{50} < 2,5 \mu M$, eficácia superior ao benznidazol ($IC_{50} = 34,8 \mu M$), e o composto LAPDESF FUR-TS 3 $91,5 \mu M$.

O ensaio que avaliou a capacidade das substâncias em doar óxido nítrico, por meio da detecção quantitativa de nitrito, demonstrou que os compostos obtidos apresentam uma porcentagem de doação de óxido nítrico maior que do composto utilizado como controle, o dinitrato de isossorbida (10,71%).

Na avaliação de citotoxicidade em macrófagos, os compostos que se apresentaram menos tóxicos as células foram os compostos LAPDESF FUR-TS 4 e LAPDESF FUR-TS 1 (IC_{50} de $59 \mu M$ e $26,5 \mu M$, respectivamente). Os demais compostos, exceto o LAPDESF FUR-TS 2 que não foi determinado, apresentaram IC_{50} inferior a $13 \mu M$.

Todos os compostos não foram mutagênicos no ensaio *in vivo* realizado, não apresentando diferença significativa na frequência de reticulócitos micronucleados em relação aos controles negativo e branco.

Considerando os resultados apresentados e também levando em consideração a escassez de fármacos para o tratamento da doença de Chagas, principalmente em sua fase crônica, a continuação na investigação dos candidatos a fármacos obtidos na série 2 deste trabalho, na realização do ensaio *in vitro* em formas amastigotas e posterior avaliação *in vivo*, se faz necessária.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUGUSTO, O.; ALVES, M. J. M.; COLLI, W.; FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Primaquine can mediate hydroxyl radical generation by *Trypanosoma cruzi* Extracts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 135, n. 3, p. 1029–1034, 1986.

BAHIA, M. T.; DINIZ, L. D. F.; MOSQUEIRA, V. C. F. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 23, n. 9, p. 1225–37, 2014. <doi:10.1517/13543784.2014.922952>.

BALBO, S. et al. Studies of the potential genotoxic effects of furoxans: The case of CAS 1609 and of the water-soluble analogue of CHF 2363. **Toxicology Letters**, v. 178, n. 1, p. 44–51, 2008.

BARR, S. C.; WARNER, K. L.; KORNREIC, B. G.; et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5160–1, 2005. <doi:10.1128/AAC.49.12.5160-5161.2005>.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; et al. The trypanosomiasis. **Lancet**, v. 362, p. 1469–1480, 2003. <doi: 10.1016/S0140-6736(03)14694-6>.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; HERWALDT, B. L.; et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States A Systematic Review. **Clinical Review**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007.

BERN, C.; VERASTEGUI, M.; GILMAN, R. H.; et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. **Clinical infectious diseases : an official publication of**

the **Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 11, p. 1667–74, 2009. <doi:10.1086/648070>.

BERNARDES, L. S. C.; ZANI, C. L.; CARVALHO, I. Trypanosomatidae Diseases: From the Current Therapy to the Efficacious Role of Trypanothione Reductase in Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 2673–2696, 2013. <doi:10.2174/0929867311320210005>.

BOIANI, M. et al. 2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. **J. Med. Chem.**, v. 49, n.11, p. 3215-3224, 2006.

BOIANI, L. et al. Furoxan-, alkylnitrate-derivatives and related compounds as anti-trypanosomatid agents: mechanism of action studies. **Bioorg.Med. Chem.**, v. 16, n.17, p. 7900-7907, 2008.

BOSQUESI, P. L. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos potencialmente antichagásicos**. 2013. 146f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Descrição da Doença de Chagas**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/646-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doenca-de-chagas/l2-doenca-de-chagas/11113-descricao-da-doenca-de-chagas>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015

BRUICE, P. Y. Carbonyl Compounds II. In: **Organic Chemistry**. 4th ed. Cleveland: Prentice Hall, 2004. p. 747-749.

BRUTUS, L.; CASTILLO, H.; BERNAL, C.; et al. Detectable Trypanosoma cruzi parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital Chagas disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1044–7, 2010. <doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0326>.

BURNEY, S., CAULFIELD, J.L.; NILES, J.C.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutat. Res.**, v. 424, 37–49, 1999.

BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. Potential new clinical therapies for Chagas disease. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 317–25, 2014. <doi:10.1586/17512433.2014.909282>.

CASTRO, J. A.; MECCA, M. M. DE; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas ' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471–479, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Chagas Disease After Organ Transplantation. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5529a3.htm>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

CERECETTO, H.; MAIO, R. DI; GONZA, M.; et al. 1 , 2 , 5-Oxadiazole N -Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs : Structure - Activity Relationships. **Journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 11, p. 1941–1950, 1999. <doi:10.1021/jm9805790>.

CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, n. 1, p. 57-71, 2005.

CHELUCCI, R. C. **Obtenção de híbridos LAPDES FUR-FD e atividade anti-inflamatória com potencial atividade neuroprotetora.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2013.

CHEN, L. et al. Design, synthesis, and antihepatocellular carcinoma activity of nitric oxide releasing derivatives of oleanolic acid. **J. Med. Chem.**, v. 51, n. 15, p. 4834-4838, 2008.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment (Choy, W. N.ed.), Marcel Dekker, Inc, New York,, 2001.

CHUNG, M.C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos derivados de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos**. São Paulo, 1996. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

CHUNG, M. C. et al. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic dipeptideprodrugs of primaquine. **J. Pharm. Sci.**, v. 86, n. 10, p. 1127-1131, 1997.

CHUNG, M. C.; GÜIDO, R. V. C.; MARTINELLI, T. F.; et al. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4779–4783, 2003. <doi:10.1016/j.bmc.2003.07.004>.

COHEN, J. P.; STURGEON, G.; COHEN, A. Measuring progress in neglected disease drug development. **Clinical therapeutics**, v. 36, n. 7, p. 1037–42, 2014. <doi:10.1016/j.clinthera.2014.05.004>.

COURA, J. R. Chagas disease : what is known and what is needed – A background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. I, p. 113–122, 2007.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6–7, 2010. <doi:10.1038/nature09221>.

DIAS, J. C. P. História Natural da Doença de Chagas. , v. 65, n. 4, p. 359–366, 1995.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, G. O.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

DÍAZ DE TORANZO, E.G.; CASTRO, J.A.; FRANKE DE CAZZULO, B.M., CAZZULO, J.J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v.44, n. 10, p. 880-881, 1988.

DIMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **J. Health. Econ.**, v.22, p.151–185, 2003.

DODD, MC. The chemotherapeutic properties of 5-nitro-2furaldehyde semicarbazone (Furacin). **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 86, p. 311-323, 1946.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras.Pat. Med. Lab.**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

DUTRA, L. A. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos compostos 1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido úteis como preventivos de aterotrombose**. 2013. 164f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2013.

DUTTA, A., BANDYOPADHYAY, S., MANDAL, C., CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolated of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitol. Internat.**, v. 54, p. 119-122, 2005.

ENGEL, B. J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 4, p. 725–734, 1998.

FAIRLAMB, A.H.; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B.T.; CERAMI A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science**, v. 227, n. 4693, p. 1485-1487, 1985.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplast. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 695–729, 1992.

FANG, F.C. Mechanisms of nitric oxide–related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 12, p. 2818-2825, 1997.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British medical bulletin**, v. 93, n.1, p. 179–200, 2010.

FEELISCH, M.; SCHONAFINGER, K.; NOACK, E. Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for the vasodilator action of furoxans. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 1149–1157, 1992.

FLOHÉ, L. The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n.4-5, p. 216–220, 2012. <doi:10.1016/j.ijmm.2012.07.008>.

GALLI, U.; LAZZARATO, L.; BERTINARIA, M.; et al. Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. **European journal of medicinal chemistry**, v. 40, n. 12, p. 1335–40, 2005. <doi:10.1016/j.ejmech.2005.05.001>.

GALDINO, S.L.; PITTA, I.R. Descoberta de fármacos. In: MONTANARI, C.A. **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011, p.34.

GARZONI, L. R. et al. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 286-290, 2004.

GARZONI, L. R. et al. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 273-285, 2004.

GASCO, A. et al. NO donors: Focus on furoxan derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 973–981, 2004.

GOMES, P. et al. Synthesis of imidazolidin-4-one and 1H-imidazo[2,1-a]isoindole-2,5(3H,9bH)-dione derivatives of primaquine: Scope and limitations. **Tetrahedron**, v. 60, n. 26, p. 5551–5562, 2004.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNDI, T.; ISHIDATE JR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutat. Res.**, v. 245, 1990.

HENDERSON, G. B.; ULRICH, P.; FAIRLAMBT, A. H.; et al. “ Subversive ” substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: Alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, n.15 p. 5374–5378, 1988.

HEDDLE, J. A et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation research**, v. 123, n. 1, p. 61–118, 1983.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**, v. 18, 1991

HERNÁNDEZ, P. et al. Hybrid furoxanyl N-acylhydrazones derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 59, p. 64-74, 2013.

IGOILLO-ESTEVE, M.; MAUGERI, D.; STERN, A. L.; BELUARDI, P.; CAZZULO, J. J. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*: a potential target for the chemotherapy of Chagas disease. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 649–663, 2007

KESSLER, R. L.; SOARES, M. J.; PROBST, C.M.; KRIEGER, M.A. *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. **Plos one**, v. 8, n. 1, p. e55497, 2013.

KINNAMON, K. E.; STECK, E. A. In search of anti-trypanosomacruzi drugs: new leads from a mouse model. **J. Med. Chem.**, v. 20, n. 6, p. 741-744, 1977.

KIRCHHOFF, L. V. Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). **Advances in parasitology**, v. 75, p. 1-18, 2011. <doi:10.1016/B978-0-12-385863-4.00001-0>.

LA-SCALEA, M. A.; MARIA, C.; MENEZES, D. S.; et al. Voltammetric Behavior of Nitrofurazone and its Hydroxymethyl Prodrug with potential anti-Chagas activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 4, p. 774-782, 2005.

LEPESHEVA, G. I. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? **Expert Opin Drug Discov**, v. 8, n. 12, p. 1-17, 2014. <doi:10.1517/17460441.2013.845554.Design>.

LEPESHEVA, G. I.; OTT, R. D.; HARGROVE, T. Y.; et al. Sterol 14 α -demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. **Chemistry & biology**, v. 14, n. 11, p. 1283-1293, 2007.

LIMA, A.; REIS, F.; COSTA, T. Cysteine Peptidase Inhibitors in Trypanosomatid Parasites. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 25, p. 3152-3173, 2013. <doi:10.2174/0929867311320250009>.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005. <doi:10.2174/0929867053363540>.

LIU, R. H.; HOTCHKISS, J. H. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. **Mutation research**, v. 339, n. 2, p. 73-89, 1995.

MACGREGOR, J.T., WEHR, C.M., HENIKA, P.R., AND SHELBY, M.E.; The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. **Fund. Appl. Toxicol.**, 14, 513-522, 1990.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative biochemistry and physiology. Part A**, v. 146, n. 4, p. 601–20, 2007.

MAYA, J. D.; ORELLANA, M.; FERREIRA, J.; et al. Chagas disease : Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biol. Res.**, v. 43, n. 4, p. 323–331, 2010.

MEANWELL, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2529–91, 2011. <doi:10.1021/jm1013693>.

MELO, M.F.F. Preparação e determinação da atividade toxicológica do pró-fármaco hidroximetilnitrofuril, potencialmente antichagásico. **Dissertação. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2006.**

MONTALVETTI, A.; BAILEY, B.N.; MARTIN, M.B.; SEVERIN, G.W.; OLDFIELD, E.; DOCAMPO, R. Bisphosphonates Are Potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Farnesyl Pyrophosphate Synthase. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33930–33937, 2001.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. **J. Med. Chem.**, v.48, n.21, p. 6523-6543, 2005.

NDAO, M.; BEAULIEU, C.; BLACK, W. C.; et al. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1167–78, 2014. <doi:10.1128/AAC.01855-13>.

OHSHIMA, H.; BARTSCH, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors : possible role of nitric oxide in carcinogenesis t. **Mutation research**, v. 305, p. 253–264, 1994.

PÉREZ-GUTIÉRREZ, E.; AGRELO, R. S.; FIGUEROA, R. Consulta Técnica em Epidemiologia , Prevenção e Manejo da Transmissão da Doença de Chagas como Doença Transmitida por Alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 512–514, 2006.

PITA, S.; PASCUTTI, P. Análise Farmacofórica da Tripanotona Redutase (TR) de *Trypanosoma cruzi* Complexada com Inibidores Peptídeo Miméticos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 788–804, 2012.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **THE LANCET Infectious Diseases**, v. 1, n. September, p. 92–100, 2001.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: **Rev. Bras. Genet.**, 1991.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology research**, v. 90, n. Supp 1, p. S19–39, 2003. <doi:10.1007/s00436-002-0754-9>.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease : pathophysiologic mechanisms , prognostic factors and risk stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. I, p. 152–158, 2009.

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

RASSI JR, A.; RASSI, S. G.; RASSI, A. Sudden Death in Chagas ' Disease. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 76, n. 1, p. 86–96, 2001.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA, Edição Única, 173-198, 2003.

SÁNCHEZ-SANCHO, F.; CAMPILLO, N. E.; PÁEZ, J. A. Chagas Disease : Progress and New Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 423–452, 2010.

SANTOS, JL **Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos à fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme**. 2009. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

SANTOS, V.A. et. al. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **J. Nat. Prod.**, v.75, n. 5, p. 991-995, 2012.

SCHIEFER, I. T. et al. Furoxans (1,2,5-oxadiazole-N-oxides) as novel NO mimetic neuroprotective and procognitive agents. **J. Med. Chem.**, v. 55, n. 7, p. 3076-3087, 2012.

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

SHERLOCK, I. A. Epidemiology and Dynamics of the Vectorial Transmission of Chagas Disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. I, p. 385–386, 1999.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Aldehydes and Ketones. In: Organic Chemistry. 10th ed. Wiley, 2011. p. 751-752.

SORBA, G.; MEDANA, C.; FRUTTERO, R.; CENA, C.; DI STILO, A.; GALLI, U.; GASCO, A. Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. **J. Med. Chem.**, v. 40, n. 4, p. 463-469, 1997.

SOUZA, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z. et al. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 88-123.

TROSSINI, G. H. G.; MALVEZZI, A.; T-DO AMARAL, A.; et al. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 25, n. 1, p. 62–7, 2010. <doi:10.3109/14756360902941058>.

URBINA, J. A. et al. Mevinolin (Lovastatin) Potentiates the Antiproliferative Effects of Ketoconazole and Terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In Vitro and In Vivo Studies. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 37, n. 3, p. 580-591, 1993.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003. <doi:10.1016/j.pt.2003.09.001>.

URBINA, J. A. et al. In Vitro and In Vivo Activities of E5700 and ER-119884, Two Novel Orally Active Squalene Synthase Inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2379-2387, 2004.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Primaquine revisited six decades after its discovery. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 937–953, 2009.

VIEGAS-JUNIOR, C.; et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Curr. Med. Chem.**, v.14, n.17, p.1829-52, 2007.

VILLALBA, R.; FORNÉS, G.; ALVAREZ, M.A.; ROMÁN, J.; RUBIO, V.; FERNÁNDEZ, M. et al. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, n. 2, p. 594-595, 1992.

WENDEL, S. Transfusion transmitted Chagas disease: is it really under control? **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 28–34, 2010. Elsevier B.V. <doi:10.1016/j.actatropica.2009.12.006>.

WERMUTH, C. G. Multitargeted drugs: the end of the "one-target-one-disease" philosophy? **Drug. Discov. Today**, v. 9, n. 19, p. 826-827, 2004.

WINK, D. A. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 5, p. 711–721, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **CONTROL OF CHAGAS DISEASE Second report of the WHO Expert Committee World Health Organization**. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. 2013.