



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Design Estrutural, Síntese e Determinação da Atividade Anti-*Trypanosoma cruzi* para uma  
Nova Série de Ariloxitiossemicarbazonas

ANA DAURA TRAVASSOS DE OLIVEIRA

Recife  
2013

Ana Daura Travassos de Oliveira

Design Estrutural, Síntese e Determinação da Atividade Anti-*Trypanosoma cruzi* para uma Nova Série de Ariloxitiossemicarbazonas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina Lima Leite  
Coorientador: Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira.

Recife  
2013

Catálogo na Publicação  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

O48d Oliveira, Ana Daura Travassos de.  
Design Estrutural, Síntese e Determinação da Atividade Anti-Trypanosoma cruzi para uma nova série de *ariloxitiossemicarbazonas* / Ana Daura Travassos de Oliveira. – Recife: O autor, 2013.  
95 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Doença de Chagas. 2. Doenças Negligenciadas. 3. Hidrazonas. 4. Trypanosoma cruzi. I. Leite, Ana Cristina Lima (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-218)



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Recife, 11 de setembro de 2013.

Defesa de Dissertação de Mestrado de Ana Daura Travassos de Oliveira defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 11 de setembro de 2013 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

---

**PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina Lima Leite**

(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

---

**SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO:**

**Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto**

(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

---

**EXAMINADOR EXTERNO:**

**Prof. Dr. Cláudio Fontes Souza**

(Pós-Doutorado em Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cristina Lima Leite

*Aos meus Pais(Inaldo e Valéria) pelo amor incondicional, apoio, incentivo e conselhos, que foram essenciais a minha formação e me ajudam a seguir atingindo meus objetivos.  
Amo Vocês!*

*Ao meu namorado Paulo André, por todo o amor, incentivo, companheirismo e cumplicidade, inclusive no decorrer desse trabalho, o qual se tornou muito mais tranquilo e divertido, graças ao seu imenso auxílio.  
Te amo meu Menininho!*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por absolutamente todas as coisas boas que aconteceram e continuam acontecendo na minha vida.
- À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina, pela orientação, compreensão, suporte e por ter me concedido a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM).
- Ao meu coorientador Dr. Diogo Rodrigo, pela amizade, pelos conselhos e pela orientação, que foi indispensável desde a elaboração até a concretização desse trabalho.
- Aos meus colegas do LpQM, em especial às minhas amigas Elany, Míria e Luciana, pelo carinho e apoio constantes.
- À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Pereira, e demais integrantes do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM, FIOCRUZ), pela contribuição com a avaliação das atividades biológicas das duas séries de compostos.
- Prof. Carlos Alberto Simone – USP – São Carlos - Cristalografia
- Prof.<sup>a</sup>. Rafaela Ferreira – UFMG - Ensaio na Cruzaína
- À FACEPE, por ter concedido a bolsa de mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF).
- Aos meus pais pelo eterno incentivo, amor, dedicação, confiança e pelos esforços realizados para minha formação pessoal e profissional.
- Ao meu namorado Paulo André, por todo o apoio, incentivo e paciência, me orientando e ajudando sempre que possível ao longo desse trabalho.

*Só há duas maneiras de viver a vida: A primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma infecção que causa aproximadamente 12 mil mortes a cada ano. O *T. cruzi* é susceptível às tiossemicarbazonas, e isso faz com que esta classe de compostos seja muito atraente para o desenvolvimento de drogas. Nesse trabalho é apresentado o planejamento estrutural, síntese e avaliação anti-*T. cruzi* de novas ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**. Para o planejamento dessa série foi utilizada a técnica de homologação, introduzindo-se um grupo espaçador entre o aril e a tiossemicarbazona. Os compostos foram obtidos em duas etapas, sendo a primeira a obtenção de ariloxicetonas **7a-x** e a segunda, a condensação dessas com a tiossemicarbazida, obtendo assim as ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**. Variando os substituintes ligados ao anel aril, observou-se substituintes que mantêm ou aumentam a atividade anti-*T. cruzi* em comparação com o derivado não substituído. Com poucas exceções, os substituintes hidrofóbicos ligados ao anel fenil reforçaram a atividade, tal como bromo, fenil e fenóxi. Especificamente, foram identificadas tiossemicarbazonas que inibem a proliferação epimastigota e são tóxicas para tripomastigotas metacíclicas, sem afetar a viabilidade de esplenócitos de ratos, e mais importante, com uma potência semelhante ou superior ao benznidazol e o nifurtimox. As tiossemicarbazonas mais potentes foram avaliadas em culturas de células para inibir a atividade da cruzaina, contudo nenhuma inibição destas enzimas foi observada, sugerindo que os compostos funcionam por meio de outro mecanismo. Em conclusão, o design estrutural da série de ariloxitiossemicarbazonas sintetizadas **9a-x** levou à identificação de novos potentes agentes anti-*T. cruzi*, tais como os compostos **9h**, **9r** e **9t**, os quais inibiram muito a proliferação de epimastigotas e foram seletivamente tóxicas para tripomastigotas. Mecanicamente esses compostos não inibem a cruzaina, mas induzem a morte das células *T. cruzi* por um processo necrótico.

**Palavras-Chave:** Doença de Chagas. Doenças Negligenciadas. Hidrazonas. *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a life-threatening infection with approximately 12000 deaths each year. *T. cruzi* is susceptible to thiosemicarbazones, and this makes this class of compounds very appealing for the drug development. Here, it is report the structural planning, synthesis and anti-*T. cruzi* evaluation of new **9a-x** aryloxythiosemicarbazones. For planning this series we used the technique of homologation, introducing a spacer group between the aryl and thiosemicarbazone. The compounds were obtained in two stages, the first being obtainment aryloxy ketones **7a-x** and the second step is the condensation of these with thiosemicarbazide, obtaining the **9a-x** aryloxythiosemicarbazones. By varying substituents attached to the aryl ring, it was observed substituents that retain or enhance the anti-*T. cruzi* activity in comparison to the nonsubstituted derivative. With few exceptions, hydrophobic substituents attached to the phenyl ring enhanced the activity, such as bromine, phenyl and phenoxy. Specifically, it was identified thiosemicarbazones that inhibit the epimastigote proliferation and are toxic for metacyclic trypomastigotes without affecting viability of mouse splenocytes, and importantly, with a potency similar or higher than benznidazole and nifurtimox. Most potent thiosemicarbazones in cell culture were evaluated to inhibit activity of cruzain, however no inhibition of this enzymes was observed, suggesting that the compounds work through another mechanism. In conclusion, the structural design performed within the series of **9a-x** aryloxythiosemicarbazones led to the identification of new potent anti-*T. cruzi* agents, such as compounds **9h**, **9r** and **9t**, which greatly inhibited epimastigote proliferation, are selectively toxic for trypomastigotes. Mechanistically, these compounds do not inhibit the cruzain, but induces *T. cruzi* cell death by a necrotic process.

**Keywords:** Chagas Disease. Hydrazones. Neglected Diseases. *Trypanosoma cruzi*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Visita de Einstein ao Instituto Oswaldo Cruz.....	<b>20</b>
<b>Figura 2:</b> Número estimado de imigrantes infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> vivendo em países não endêmicos.....	<b>21</b>
<b>Figura 3:</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 4:</b> Foto de hipertrofia maligna cardíaca e megacólon, respectivamente.....	<b>24</b>
<b>Figura 5:</b> Subestruturas químicas fundamentais de nitrocompostos empregados em terapêutica.....	<b>27</b>
<b>Figura 6:</b> Estrutura molecular da nitrofurazona.....	<b>28</b>
<b>Figura 7:</b> Fármacos utilizados na terapia antichagásica.....	<b>28</b>
<b>Figura 8:</b> Representação da Cruzaína.....	<b>32</b>
<b>Figura 9:</b> Estrutura química das tiossemicarbazonas.....	<b>33</b>
<b>Figura 10:</b> Representação das conformações das tiossemicarbazonas.....	<b>34</b>
<b>Figura 11:</b> Representação dos estereoisômeros <i>E</i> e <i>Z</i> das Tiossemicarbazonas.....	<b>34</b>
<b>Figura 12:</b> Mecanismo de inibição da TCC por derivados aril tiossemicarbazônicos proposta por Du <i>et al.</i> , 2002.....	<b>35</b>
<b>Figura 13:</b> Estrutura química das tiossemicarbazonas <b>1</b> e <b>2</b> e tiazolidinonas <b>3</b> e <b>4</b> identificadas previamente como agentes anti- <i>T. cruzi</i> .....	<b>38</b>
<b>Figure 14:</b> Restrição conformacional do composto <b>1</b> protótipo para o design do <b>9a</b> . Estrutura dos grupos aril empregados durante a série de ariloxitiossemicarbazonas <b>9a-x</b> .....	<b>39</b>
<b>Figura 15:</b> Síntese das ariloxitiossemicarbazonas <b>9a-x</b> .....	<b>40</b>
<b>Figura 16:</b> Estrutura dos grupos aril empregadas na série de ariloxitiossemicarbazonas <b>9a-x</b> .....	<b>41</b>
<b>Figura 17:</b> (A) Representações dos diastereoisômeros da tiossemicarbazona <b>9a</b> . (B) Diagrama Ortep-3 de <b>9a</b> e sua estrutura de célula unitária mostrando o dímero.....	<b>42</b>
<b>Figura 18:</b> Espectro de infravermelho da molécula <b>9i</b> .....	<b>43</b>
<b>Figura 19:</b> Espectro do RMN $H^1$ para a molécula <b>9i</b> .....	<b>44</b>
<b>Figura 20:</b> Espectro do RMN $C^{13}$ para a molécula <b>9i</b> .....	<b>45</b>
<b>Figura 21:</b> Estrutura dos compostos <b>9a</b> , <b>9f</b> , <b>9i</b> e <b>9j</b> .....	<b>46</b>
<b>Figura 22:</b> Estrutura dos compostos <b>9m</b> , <b>9p</b> , <b>9s</b> , <b>9u</b> e <b>9t</b> , comparados com o <b>9a</b> .....	<b>50</b>
<b>Figura 23:</b> Estrutura dos compostos <b>9c</b> , <b>9d</b> e <b>9o</b> .....	<b>50</b>
<b>Figura 24:</b> Compostos <b>9g</b> e <b>9h</b> , comparados com o <b>9a</b> .....	<b>51</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais efeitos colaterais observados na terapia específica da Doença de Chagas.....	<b>30</b>
<b>Tabela 2:</b> Atividade anti-T. cruzi e toxicidade em célula hospedeira por ariloxitiossemicarbazonas <b>9a-x</b> .....	<b>48</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**<sup>13</sup>C-RMN:** Ressonância Magnética Nuclear de Carbono;

**<sup>1</sup>H-RMN:** Ressonância Magnética Nuclear de Prótons;

**ACTH:** Adrenocorticotropic hormone;

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

**CCD:** Cromatografia de camada delgada;

**DCA:** Doença de Chagas Aguda;

**DCH:** Doença de Chagas Humana;

**DMSO:** Dimetilsulfóxido;

**DMSO-*d*6:** Dimetilsulfóxido deuterado;

**DNDi:** Drugs for Neglected Diseases *initiative*;

**ECG:** Eletrocardiograma;

**EUA:** Estados Unidos da América;

**HBV:** Hepatitis B Virus;

**HCV:** Hepatitis C Virus;

**HIV:** Human Immunodeficiency Virus;

**IC<sub>50</sub>:** Concentração inibitória para 50%;

**IV:** Infravermelho;

**LCMS:** Liquid chromatography–mass spectrometry;

**PF:** Ponto de fusão;

**REA:** Relação estrutura-atividade;

**Rf:** Razão de frente;

**TCC:** *T. cruzi* cruzain;

**TMS:** Trimetilsilano;

**TS:** Transialidase;

**WHO:** World Health Organization;

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>1.3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
1.3.1 DOENÇA DE CHAGAS.....	19
1.3.1.1 Histórico.....	19
1.3.1.2 Epidemiologia.....	20
1.3.1.3 Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	22
1.3.1.4 Manifestações Clínicas.....	23
1.3.1.5 Transmissão.....	25
1.3.1.6 Tratamento Clínico.....	26
1.3.1.7 Desenvolvimento de Novas Drogas.....	31
<b>1.3.2 TIOSSEMICARBAZONAS.....</b>	<b>33</b>
1.3.2.1 Aspectos Químicos.....	33
1.3.2.2 Atividade Antichagásica.....	35
<b>2 - PLANEJAMENTO DA SÉRIE QUÍMICA, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 PLANEJAMENTO DA SÉRIE QUÍMICA.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
2.2.1 PARTE QUÍMICA.....	40
2.2.1.1 Obtenção da Série Química.....	40
2.2.1.2 Caracterização Estrutural.....	41
2.2.1.2.1 Cristalografia de Raios-X (Composto 9a).....	41
2.2.1.2.2 Infravermelho (Composto 9i).....	43
2.2.1.2.3 RMN H <sup>1</sup> (Composto 9i).....	44
2.2.1.2.4 RMN C <sup>1</sup> (Composto 9i).....	45
2.2.2 PARTE BIOLÓGICA.....	46
<b>3 - SEÇÃO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
3.1.1 CROMATOGRAFIAS.....	54

3.1.2 PONTOS DE FUSÃO.....	54
3.1.3 ESPECTROSCOPIAS DE IV, RMN <sup>1</sup> H E RMN <sup>13</sup> C.....	54
3.1.4 EQUIPAMENTOS.....	55
3.1.5 REAGENTES E SOLVENTES.....	55
<b>3.2 PARTE QUÍMICA.....</b>	<b>56</b>
3.2.1 SÍNTESE.....	56
3.2.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	57
<b>3.3 PARTE BIOLÓGICA.....</b>	<b>81</b>
<b>4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

# **1 - INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DA LITERATURA**

## 1.1 INTRODUÇÃO

---

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 10 milhões de pessoas na América Latina (BARRETT *et al.*, 2003; RASSI *et al.*, 2010). O único fármaco utilizado é o nitro-heterociclo benznidazol (LAFEPE, Brasil), que é eficaz para a cura da doença na fase aguda, mas é menos eficaz em doentes que atingiram a fase crônica (URBINA, 2009; MACHADO *et al.*, 2012; MARIN-NETO *et al.*, 2009). Além disso, o benznidazol não é considerado adequado, uma vez que exibe efeitos secundários graves, conduzindo um grande número de pacientes a interromper o tratamento (PINAZO *et al.*, 2010). Na verdade, a doença de Chagas é considerada a doença tropical infecciosa mais preocupante em toda a América Latina (TARLETON & CURRAN, 2012). Assim, existe uma necessidade para a identificação de novos fármacos para o tratamento desta.

Para atender a essa necessidade, uma série de alvos moleculares para fármacos anti-*T. cruzi* têm sido investigados, aumentando a velocidade e qualidade de identificação de um medicamento para o tratamento da doença de Chagas. Exemplos de alvos moleculares de *T. cruzi* são lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase (BUCKNER & URBINA, 2012), tripanotiona redutase (LANTWIN *et al.*, 1994), cruzaina (ENGEL *et al.*, 1998), trans-sialidase (DC-RUBIN & SCHENKMAN, 2012) e fosfatidilinositol 3-quinase (WILKOWSKY, 2001). Por meio do planejamento de fármacos baseado na estrutura, dois novos candidatos a fármacos foram desenvolvidos recentemente: K11777, um derivado peptídico que inibe cruzaina (DOYLE *et al.*, 2007), e VNI, derivado oxadiazol inibidor da atividade da 14- $\alpha$ -desmetilase (VILLALTA *et al.*, 2013). Eles foram selecionados para iniciar ensaios clínicos, no entanto, as possibilidades de uma droga ser aprovada no estágio clínico são muito baixas; além disso, existe a necessidade de uma terapia de combinação de drogas a fim de evitar o desenvolvimento da resistência das cepas do *T. cruzi*. Portanto, o número de potenciais candidatos a fármacos deve ser reforçado. Tendo em vista os resultados observados para K11777 e VNI na inibição do *T. cruzi*, o design de compostos para inibir a atividade cruzaina e o lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase têm recebido atenção especial (MOREIRA *et al.*, 2009; RASCÓN *et al.*, 2013).

A enzima cruzaina, principal protease do *T. cruzi*, está envolvida no processo invasão, diferenciação e proliferação do parasita em células hospedeiras (DUSCHAK *et al.*, 2001). Especificamente, a cruzaina é responsável pela degradação de proteínas de macrófagos,

contribuindo para a evolução da infecção (DOYLE *et al.*, 2011). No que diz respeito à identificação de inibidores da cruzaina, a maior parte dos esforços tem sido feito por meio da investigação de peptídeos e compostos semelhantes a peptídeos, tais como a ureia (DU *et al.*, 2000), hidrazonas (SANTOS-FILHO *et al.*, 2009; ROMEIRO *et al.*, 2009; SANTOS-FILHO *et al.*, 2012), triazóis (BRAK *et al.*, 2008; BRAK *et al.*, 2010) e tiossemicarbazonas (DU *et al.*, 2002; GREENBAUM *et al.*, 2004; SILES *et al.*, 2006). Curiosamente, as tiossemicarbazonas foram originalmente desenvolvidas como potenciais inibidores da L-catepsina, uma das principais proteases relacionadas a células cancerígenas. No entanto, com base na homologia e propriedades bioquímicas semelhantes entre a L-catepsina e a cruzaina do *T. cruzi*, tiossemicarbazonas foram investigadas como uma classe de potenciais inibidores da cruzaina. De fato, as aril tiossemicarbazonas mostraram-se como uma classe de compostos anti-*T. cruzi*, capazes de inibir a atividade da cruzaina (DU *et al.*, 2002).

Um modelo geral para a ligação de aril tiossemicarbazonas à cruzaina é a ligação de um grupo tioamida covalentemente aos aminoácidos Cys25 e His159 e dos grupos aril a um profundo bolso hidrofóbico (DU *et al.*, 2002; GREENBAUM *et al.*, 2004; SILES *et al.*, 2006; LOZANO *et al.*, 2012). Este modelo considera que esta classe de compostos contém dois diferentes determinantes estruturais e sugere-se que a presença de um espaçador entre o grupo aril e a tiossemicarbazona é uma estratégia possível para aumentar a potência antichagásica frente à cruzaina (estratégia de homologação) (MOUSSA *et al.*, 2011; POMPEU *et al.*, 2013).

Nesse trabalho, usou-se o grupo espaçador alcóxi para preparar uma nova série de ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**. Uma variedade de substituintes foram ligados ao anel fenil de forma a examinar o papel de um substituinte em termos de contribuições eletrônicas para o atividade anti-*T. cruzi*. A avaliação da atividade anti-*T. cruzi* para os compostos **9a-x** serviu para a identificação da maioria dos determinantes estruturais para a atividade, assim como para encontrar ariloxitiossemicarbazonas com potência igual ou maior do que o benznidazol.

## 1.2 OBJETIVOS

---

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL

Visando-se à identificação de novos agentes tripanocidas, esse trabalho teve como objetivo realizar o planejamento e a síntese de novas ariloxitiossemicarbazonas quimicamente funcionalizadas, estruturalmente planejadas através da estratégia de homologação, e posterior avaliação das propriedades antichagásicas desses compostos.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar uma série de inéditas ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**;
- Caracterizar a estrutura de todos os compostos através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons ( $^1\text{H}$ -RMN) e Carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN), Infravermelho (IV) e LCMS;
- Analisar a citotoxicidade celular frente a células de mamíferos;
- Avaliar atividade anti-proliferativa “*in vitro*” frente à tripomastigotas e epimastigotas do *T. cruzi*, com determinação da concentração inibitória para 50% ( $\text{CI}_{50}$ );
- Avaliar quanto à inibição da atividade de cruzaina, as ariloxitiossemicarbazonas mais ativas frente à tripomastigota;
- Avaliar o processo de morte celular (necrose/apoptose) do *T. cruzi* quando exposto a essas ariloxitiossemicarbazonas.

## 1.3 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 1.3.1 DOENÇA DE CHAGAS

#### 1.3.1.1 Histórico

A doença de Chagas constitui-se um dos maiores problemas de Saúde Pública em países do cone sul das Américas, pela sua vasta distribuição, altos índices de prevalência e gravidade de evolução (REY, 2013; CERECETTO & GONZÁLEZ, 2008). Estima-se que sejam de 18 a 20 milhões os indivíduos infectados nessa região e que outros 100 milhões vivam em áreas de risco de contaminação (DIAS *et al.*, 2009).

O primeiro relato de doença de Chagas pode ter sido realizado pelo famoso cientista Charles Darwin, que possivelmente contraiu a infecção através do *T. cruzi* durante a sua expedição à América do Sul em 1835. Isto pôde ser sugerido por sua vívida descrição do contato com o barbeiro, triatomíneos, e por alguns de seus sintomas na vida adulta (BERNSTEIN, 1984).

Também conhecida como tripanossomíase americana, esta infecção permanente é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e foi descoberta em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas (1879-1934) (**Figura 1**). O relato original de Chagas (CHAGAS, 1909) é único na história da medicina, no sentido de que um único cientista descreveu detalhadamente tanto o ciclo de transmissão (vetores, hospedeiros, e um organismo infeccioso novo) quanto às manifestações clínicas agudas do primeiro caso humano. Desta forma, a descoberta da doença de Chagas passou a ser tratada pelos contemporâneos e pela memorialística médica, até o presente, como um mito glorificador da ciência brasileira (KROPF, 2013a)

**Figura 1:** Visita de Einstein ao Instituto Oswaldo Cruz. Da esquerda para a direita: Carlos Burle de Figueiredo, Antônio Eugênio de Arêa-Leão, não identificado, Nicanor Botafogo Gonçalves da Silva, Adolpho Lutz, Alcides Godoy, Carlos Chagas, Astrogildo Machado, Albert Einstein, José da Costa Cruz, não identificado, José Carneiro Felipe e Leocádio Chaves. Foto de J. Pinto. Rio de Janeiro, maio de 1925. Departamento de Arquivo e Documentação da Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz (KROPF, 2013b).



### 1.3.1.2. Epidemiologia

Um século depois de sua descoberta, a doença de Chagas permanece como uma doença tropical negligenciada na América Latina (COURA & DIAS, 2009; MONCAYO & SILVEIRA, 2009). Globalmente essa enfermidade é descrita como a terceira mais importante doença parasitária, sendo responsável por significativos encargos econômicos e de saúde pública na América Latina (CERECETTO & GONZÁLEZ, 2008).

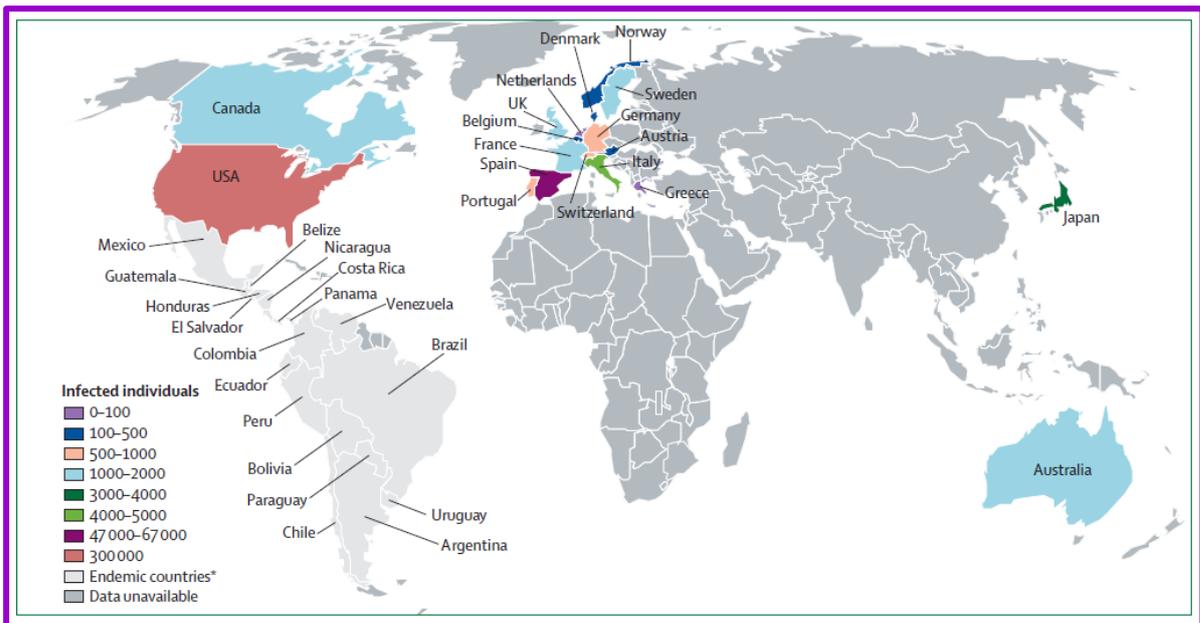
Estimativas informam que essa doença leva a óbito aproximadamente 14 mil pessoas por ano nessa região, matando mais do que qualquer outra doença negligenciada, inclusive a malária. Relata-se também que outros 100 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco de contaminação (DIAS *et al.*, 2009; HOTEZ, 2008).

Em pesquisas realizadas na década de 1980, estima-se que 100 milhões de pessoas (25% de todos os habitantes da América Latina) estavam em risco de infecção, e 17,4 milhões foram infectadas em 18 países endêmicos em 1980-85 (WHO, 2002).

Os dados mais recentes no Brasil apontam que a doença de Chagas segue como problema de saúde pública, sendo observados casos e surtos em diferentes estados (Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina, São Paulo), sendo sua maior a frequência na região da Amazônia Legal, que engloba os estados do Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará, Tocantins (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A doença de Chagas é a quarta causa de morte no Brasil entre as doenças infecto-parasitárias, sendo as faixas etárias mais atingidas acima de 45 anos. (ARAÚJO *et al.*, 2013).

Atualmente estudos mostraram um crescimento rápido e notável em países fora da América Latina, intitulados países não endêmicos (Austrália, Canadá, Espanha e E.U.A) (**Figura 2**). Isto se deve ao advento da migração de aproximadamente 15 milhões de pessoas vindas de áreas conhecidamente endêmicas (DNDi, 2013; SCHMUNIS, 2007).

**Figura 2:** Número estimado de imigrantes infectados pelo *Trypanosoma cruzi* vivendo em países não endêmicos.



Dados fornecidos pelo Canadá, Austrália e Japão em 2006 (SCHMUNIS, 2007); os EUA em 2005 (BERN & MONTGOMERY, 2009); Espanha em 2008 (GASCON *et al.*, 2009); e outros países da Europa em 2004 (GUERRI-GUTTENBERG *et al.*, 2009).

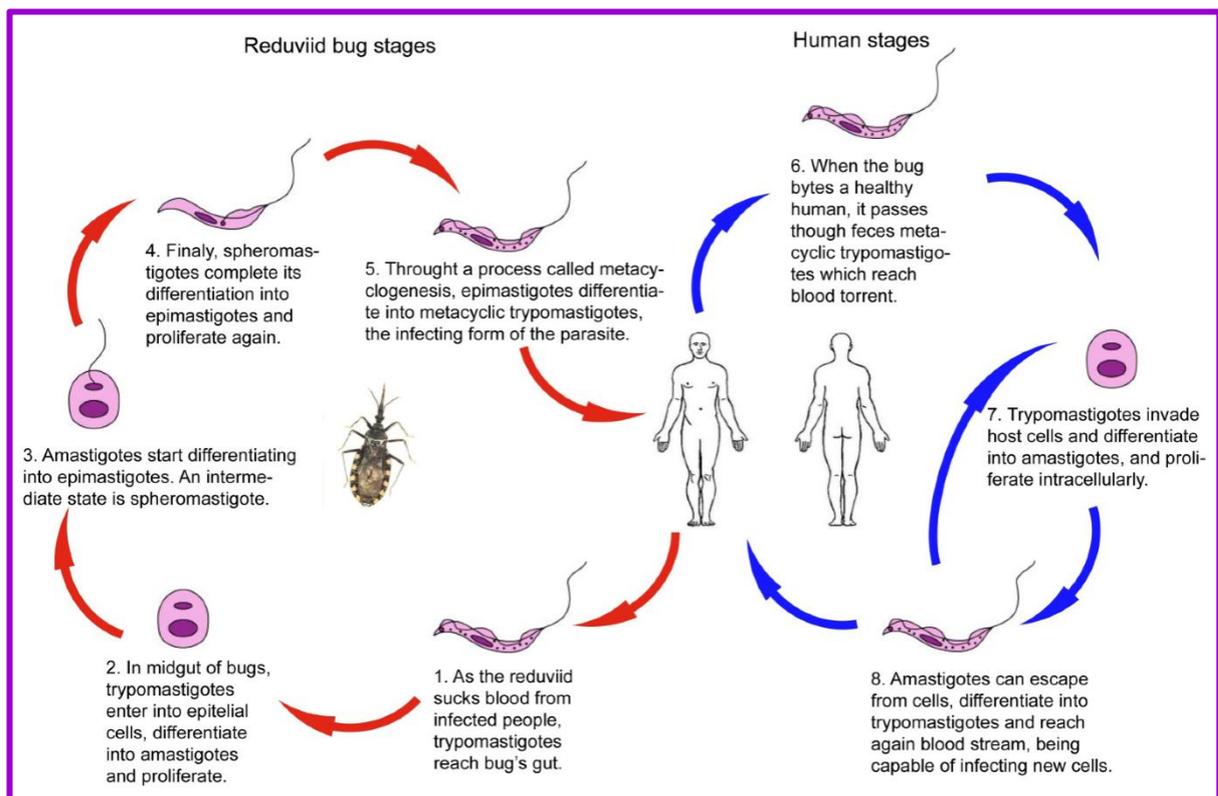
Estima-se que nos EUA existam 300.167 pessoas infectadas, sendo este valor aproximadamente seis vezes maior que os casos relatados na Espanha (BERN & MONTGOMERY, 2009; TARLETON *et al.*, 2007). Na Europa Ocidental, em 2008 foi relatado que o número total de pessoas infectadas vivendo nesta região é de 25 a 40 mil, tendendo a aumentar (CASTRO, 2009; JACKSON *et al.*, 2009; LÓPEZ-CHEJADE *et al.*, 2009; MILEI *et al.*, 2009).

### 1.3.1.3 Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, passando o parasito por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos pertencentes a sete ordens diferentes) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos) (NEVES *et al.*, 2005). Este ciclo compreende três estágios ou formas principais, dotadas de características morfológicas e biológicas distintas.

As formas evolutivas envolvidas nesse ciclo são a amastigota, tripomastigota e epimastigota. As formas tripomastigotas não replicativas são encontradas na corrente sanguínea. As amastigotas intracelulares replicativas são encontrados no tecido de hospedeiros mamíferos, enquanto epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicas infecciosas infectam o vetor triatomíneo (LEÃO *et al.*, 1997). A **Figura 3** (abaixo) descreve as formas evolutivas e o ciclo de vida do *T. cruzi*.

**Figura 3:** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Estágios do *T. cruzi* no inseto vetor – **1)** Tripomastigotas chegam ao intestino do triatomíneo ou “barbeiro”, no momento em que o mesmo faz um repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero infectado. **2)** No intestino médio do triatomíneo, as tripomastigotas invadem o interior das células epiteliais, diferenciando-se em amastigotas e se proliferando. **3)** Amastigotas iniciam a diferenciação em epimastigotas. O estágio intermediário entre essas duas formas é o de esferomastigota. **4)** Finalmente esferomastigotas completam a diferenciação em epimastigotas e se proliferam novamente. **5)** Através de um processo chamado metaciclôgênese, epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas (forma infectante do parasita).

Estágios do *T. cruzi* em humanos e outros mamíferos – 6) Quando o inseto pica um humano saudável, ele passa, através das fezes, tripomastigotas metacíclicas que alcançam a corrente sanguínea. 7) Tripomastigotas invadem as células hospedeiras se diferenciando em amastigotas e se proliferando intracelularmente. 8) As amastigotas podem escapar das células diferenciando-se em tripomastigotas e alcançando novamente a corrente sanguínea, sendo capazes de infectar novas células. (GONZÁLEZ *et al.*, 2013).

#### 1.3.1.4 Manifestações Clínicas

Duas fases da doença podem ser observadas: (1) fase aguda, transitariamente com alta concentração de parasitas nos tecidos e no sangue, sintomas não específicos, e uma incidência miocardite 5%, com uma duração de 4 - 8 semanas, e (2) fase crônica, que permanece ao longo da vida. A fase crônica pode se apresentar como forma indeterminada, caracterizada pela ausência de sintomas, ECG normal e exame radiográfico normal do tórax, esôfago e cólon. Aproximadamente 60 - 70% dos pacientes permanecem desta forma para o resto de suas vidas. Apenas 20 - 40% dos indivíduos infectados, 10 - 30 anos após a infecção aguda inicial, irá desenvolver forma crônica doença. Essa fase representa um substancial problema de saúde pública, devido à alta morbidade e mortalidade (MILEI *et al.*, 2009; RASSI *et al.*, 2000; RASSI *et al.*, 2010).

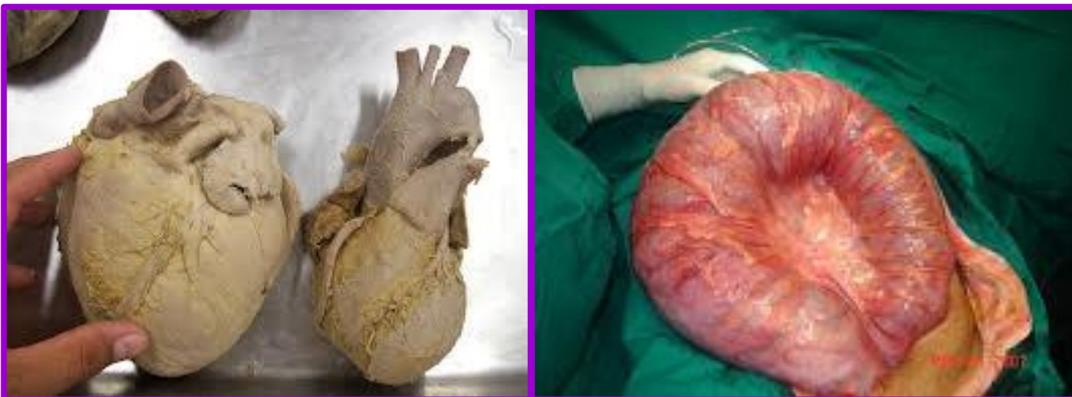
A fase aguda é comumente assintomática ou pode apresentar uma doença febril autolimitada. Os sintomas aparecem 1–2 semanas depois da exposição a triatomíneos infectados, ou até alguns meses após a transfusão de sangue infectado (PINTO *et al.*, 2009). As manifestações gerais são representadas por febre, mal-estar geral, dor de cabeça, perda do apetite, fraqueza, edema localizado ou generalizado, inchaço de gânglios linfáticos (adenopatia), hepatomegalia e esplenomegalia. Em alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeficientes, quadros meníngeos graves, alterações no eletrocardiograma e de IC (Insuficiência Cardíaca) podem estar associados, chegando a ocorrer óbito. É importante ressaltar que a gravidade da infecção depende também de outros fatores, como a virulência do parasito e o tamanho do inóculo (ALMEIDA-LEITE *et al.*, 2007; CÁRDENAS *et al.*, 2004; RASSI & MARIN-NETO, 2000).

Os sintomas da fase aguda resolvem-se espontaneamente em cerca de 90% dos indivíduos infectados quando a infecção não é tratada com fármacos tripanocidas. Uma reativação da doença de Chagas pode ocorrer em pacientes com infecção crônica que tornam-se imunologicamente comprometidos, tais como os que são coinfectados com HIV ou os que estão recebendo drogas imunossupressoras (BRAZ *et al.*, 2008.).

Após a fase aguda, a doença caracteriza-se por apresentar positividade de exames sorológicos e/ou parasitológicos, ausência de sintomas e/ou sinais da doença, eletrocardiograma convencional normal e coração, esôfago e cólon radiologicamente normais. Aproximadamente 50% dos pacientes chagásicos que tiveram a fase aguda evoluem para a fase indeterminada, que, apesar de assintomática e de apresentar lesões muito discretas, pode causar morte súbita de alguns pacientes mais debilitados (NEVES *et al.*, 2005).

Cerca de um terço dos casos agudos da doença de Chagas alcançam a fase crônica. Esta, em alguns casos, segue imediatamente para o período agudo. Em outros, instala-se depois da fase indeterminada, anteriormente descrita (BLACK, 2002; REY, 2001). Pacientes nessa fase da doença apresentam manifestações clínicas diversas, afetando de forma irreversível um ou mais órgãos. A cardiopatia chagásica crônica e o aparecimento dos “megavisceras” (megaesôfago e megacólon, principalmente) representam as formas clínicas de maior gravidade (**Figura 4**). (SZAJNMAN *et al.*, 2000; MONCAYO, 2003; CAZZULO *et al.*, 2001).

**Figura 4:** Foto de hipertrofia maligna cardíaca e megacólon, respectivamente (Informações Biomédicas, 2013).



Dentre os seus principais sintomas da fase crônica enquadram-se arritmias (75.000 casos/ano), insuficiência cardíaca, tromboembolismo, insônia, congestão visceral e edema dos membros inferiores. Na forma cardíaca, o coração mostra-se macroscopicamente aumentado de volume e mais pesado do que o normal (300 g), com peso de 550 g em média e hipertrofia das paredes. (NEVES *et al.*, 2005).

As manifestações digestivas são representadas principalmente no Brasil e na Argentina por alterações morfológicas e funcionais importantes, como, por exemplo, a incoordenação motora (aperistalse, discinesia) caracterizando o megaesôfago e o megacólon (NEVES *et al.*, 2005).

No caso do megaesôfago (45.000 casos/ano), observa-se o aumento do diâmetro do órgão e alterações na motilidade, além de sintomas como dores epigástricas, regurgitação, hipertrofia das glândulas salivares, disfagia, pirose, soluço, tosse e sialose. Acomete mais o sexo masculino do que o feminino, sendo mais frequente na zona rural endêmica. O megacólon (30.000 casos/ano) apresenta como principal característica a obstipação do órgão, podendo durar semanas, e a perfuração levando por vezes à peritonite (MONCAYO, 2003; NEVES *et al.*, 2005; RASSI, 1992).

### 1.3.1.5 Transmissão

As formas básicas de transmissão da doença de Chagas humana (DCH) correspondem à transmissão pelo inseto vetor (*Triatoma infestans*) e pela transfusão de sangue. Consideram-se alternativas as demais vias descritas como: oral, congênita e por transplantes de órgãos (DIAS *et al.*, 2011; CHIEFFI & AMATO NETO, 2000; DIAS & MACEDO, 2005). Relatos da literatura têm informado que a transmissão vetorial foi significativamente reduzida devido aos esforços de controle, como a Iniciativa do Cone Sul, um dos maiores programas de cooperação internacional contra a doença de Chagas, criada em Brasília em julho de 1991. (DIAS *et al.*, 2002; DIAS, 2006).

Levando em consideração este fato, as transfusões de sangue, transplantes de órgãos e as transmissões congênitas começam a representar riscos reais de transmissão da doença de Chagas (MILEI *et al.*, 2009).

A Triagem das gestantes para a doença de Chagas durante os cuidados de saúde pré-natal, especialmente quando eles nascem em uma área endêmica, tem importante papel para diminuir a incidência da transmissão de mãe para filho, a chamada congênita (DNDi, 2013). Este tipo de contaminação ocorre quando existem ninhos de amastigotas na placenta, que podem liberar tripomastigotas, chegando à circulação fetal (NEVES *et al.*, 2005).

Na América Latina, a doença de Chagas afeta cerca de dois milhões de mulheres em idades férteis, que são susceptíveis de transmiti-la para o seu feto (DAUBY *et al.*, 2009). Estimativas recentes indicam que na América do Norte, por ano, pelo menos 2.000 recém-nascidos estejam sujeitos a contraí-la (BUEKENS *et al.*, 2008).

A transmissão transfusional ganhou relativa importância epidemiológica nas duas últimas décadas em função da migração de indivíduos infectados para os centros urbanos e da

ineficiência no controle das transfusões nos bancos de sangue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A prevalência de sangue infectado para doação por *T. Cruzi* na Europa e América do Norte varia muito, chegando a 0,62% na Espanha (PIRON, 2008). Recentemente, E.U.A., Espanha e França implementaram medidas para reduzir o risco transfusional através da seleção dos doadores de sangue e as estratégias de exclusão (CASTRO, 2009).

O risco de transmissão transfusional da infecção chagásica no Brasil é 10-15 vezes aquela estimada para a infecção pelo HIV, HBV ou HCV, dependendo da região (GONTIJO & SANTOS, 2013).

Uma Nota Técnica da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) divulgada no Brasil em 2007 revelou que a transmissão via oral vem mostrando alguma relevância, principalmente devido ao surto em Santa Catarina no ano de 2005. Nesse episódio foram identificados 45 casos suspeitos de Doença de Chagas Aguda (DCA) relacionados à ingestão de caldo de cana, 31 com confirmação laboratorial, sendo que cinco pacientes evoluíram para óbito.

Nos anos de 2000, 2001 e 2004, ocorreram 57 casos de DCA por transmissão oral; no período de 2005 a 2007, esses números somaram 301 casos. No ano de 2006 houve a confirmação de 115 casos de DCA, na região Norte e Nordeste, sendo 94 casos de transmissão via oral, devido ao consumo na maioria dos casos de açaí contaminado. Registrou-se também neste período surto pela ingestão de bacaba e de cana-de-açúcar (ANVISA, 2008). Em 2008, foram diagnosticados 94 casos de DCA no estado do Pará, dos quais 57 (65%) estavam envolvidos em transmissão oral; 20, no estado do Amapá, todos por provável transmissão oral e 7 no estado do Tocantins, 4 por transmissão oral (80%) e 1 vetorial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

#### **1.3.1.6 Tratamento Clínico**

Mesmo após mais de 100 anos da descoberta da doença de Chagas, o tratamento específico anti-*T. cruzi* permanece inapropriado e irresoluto, permitindo efeitos supressivos, podendo apenas diminuir a parasitemia no curso do tratamento, não garantindo, portanto, a cura definitiva (TEIXEIRA, 2002).

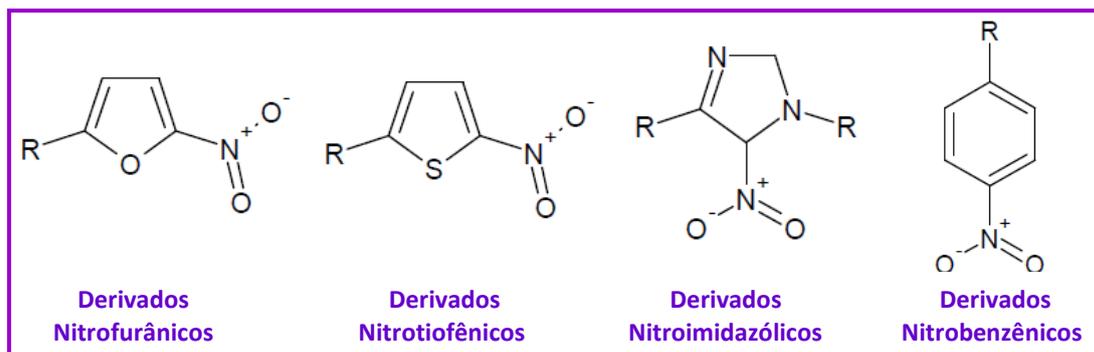
Os primeiros compostos desenvolvidos experimentalmente para o tratamento específico da tripanossomíase americana, após a sua descoberta em 1909, foram o atoxyl

(arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético (antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio. Todos estes compostos se mostraram ineficazes no tratamento proposto, além de exibirem uma alta toxicidade (COURA & CASTRO, 2002; CROFT, 1999).

Entre os anos de 1936 e 1960 diversos medicamentos foram testados na tentativa de obter-se êxito, porém estes apenas alcançaram resultados negativos ou duvidosos. Dentre os testados destacam-se os derivados de quinoleínas e vários outros antimaláricos, arsenobenzóis e outros arsenicais, fenantridinas, sais de ouro, bismuto, cobre e de zinco, iodeto de sódio, violeta de genciana, aminopterinas, ácido *para*-aminosalicílico, hidrazida do ácido nicotínico, sulfonamidas, anti-histamínicos, ACTH e cortisona, derivados da estilomicilina, anfotericina B e mais de 30 antibióticos, e alguns nitrofuranos (BRENER, 1968).

Maior atenção foi dada aos nitrocompostos a partir da década de 40 com sua introdução e emprego em terapêutica, período em que milhares de compostos desta classe foram sintetizados e testados frente a diversas doenças, dentre estas a doença de Chagas. Estes pareciam ter atividade biológica dependente da presença do grupo nitro ligado à molécula, que resultava basicamente em mudanças na estabilidade do mesmo, intermediada por interações entre o nitrocomposto e o seu alvo na biofase. Dentre estes nitrocompostos, destacam-se os derivados nitrotiofênicos, nitrofurânicos, nitrobenzênicos e nitroimidazólicos (**Figura 5**) (HORROCKS *et al.*, 2007).

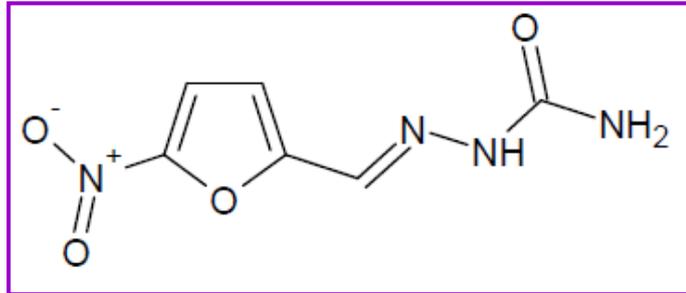
**Figura 5:** Subestruturas químicas fundamentais de nitrocompostos empregados em terapêutica.



A década de 60 trouxe diversos avanços na terapia da doença de chagas, com mudanças benéficas a nível de direcionamento para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes no tratamento antichagásico. O primeiro passo foi dado a partir da utilização de um derivado dos nitrofuranos, a Nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) (**Figura 6**), em esquema de duração prolongada (53 dias em média) na dose de 100mg/kg/dia, que curava mais de 95% dos camundongos cronicamente infectados. Entretanto, a conclusão final foi de que a Nitrofurazona poderia ser curativa, mas os pacientes não toleravam os efeitos colaterais

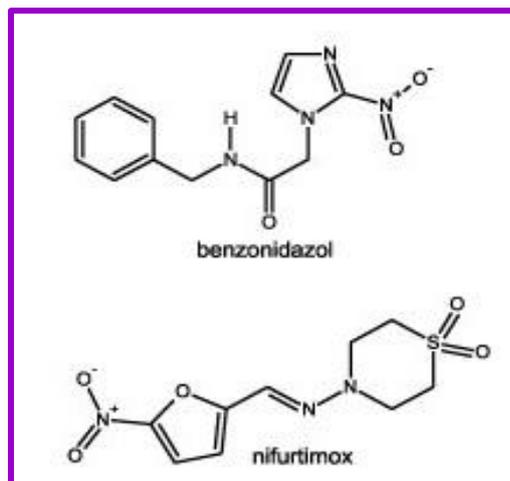
nas doses e no tempo necessário para a cura, devido a sua alta toxicidade (COURA & CANÇADO, 2013).

**Figura 6:** Estrutura molecular da nitrofurazona



No final da década de 1960 dois novos nitrocompostos (**Figura 7**), os quais são utilizados até hoje surgiram trazendo melhores perspectivas para o tratamento da doença de Chagas, tanto pelo potencial curativo, particularmente para a fase aguda, como também por exibirem uma melhor tolerância quando comparados aos anteriores. Esses dois fármacos são o nifurtimox, um derivado nitrofurfurânico: 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido (Bayer 2502) comercializado como nome de Lampit; e o benznidazol, um derivado 2-nitroimidazólico: N-benzil-2-nitroimidazol acetamida (RO 7-1051), comercializado com o nome de Rochagan® no Brasil e Radanil® na Argentina (DIAS *et al.*, 2009).

**Figura 7:** Fármacos utilizados na terapia antichagásica.



Ambos compostos têm sido principalmente utilizados no tratamento de pacientes agudos e crônicos recentes, nos quais se observam resultados positivos, principalmente em crianças (menos de 15 anos), calculando-se um percentual médio de cura em torno de 80%, no tratamento de infecções congênitas, transplantes de órgãos de doadores infectados, quadros de reagudização de pacientes imunossuprimidos (CASTRO & SOEIRO, 2013). O tratamento de

pacientes que estão no estágio crônico indeterminado ou sintomático da doença de Chagas tem sido debatido há anos, e a eficácia de fármacos no paciente nesta situação permanece incerta (MURCIA *et al.*, 2012). Apesar da maioria dos estudos revelar uma baixa eficiência destes fármacos durante a terapia de pacientes crônicos, avaliações recentes têm sugerido o tratamento de modo a retardar ou mesmo evitar a evolução da doença crônica (CASTRO & SOEIRO, 2013).

A ação destes fármacos é afetada diretamente por algumas condições, como a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica dos pacientes, entre outros. O grupamento nitro (NO<sub>2</sub>), considerado como parasitóforo, presente em ambas as moléculas, está diretamente relacionado nos seus mecanismos de ação, também contribuindo para a elevada toxicidade apresentada por estas (DIAS *et al.*, 2009).

O nifurtimox é tripanocida contra as formas amastigotas do *T. cruzi*. Seu mecanismo de ação envolve a redução parcial ao ânion radical seguida por auto-oxidação para regenerar o nitrofurano original e formar o radical ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. O *T. cruzi* mostra-se deficiente em mecanismos de detoxificação parametabólitos do oxigênio, particularmente o peróxido de hidrogênio, apresentando assim, mais sensível ao estresse oxidativo do que às células vertebradas (BERNARDES *et al.*, 2006).

A ação do benznidazol não envolve danos oxidativos, e seu mecanismo de ação parece envolver uma diminuição da síntese de proteínas, redução de incorporação dos precursores de RNA e diminuição da incorporação da timidina em DNA (ANANDAN, 1997; RODRIGUES & CASTRO, 2002). O radical nitro estaria envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi* (DÍAZ *et al.*, 1988).

Estudo com jovens crônicos tratados com benznidazol demonstrou cerca de 60% de negatificação da sorologia e que todos ficaram menos vulneráveis a desenvolver danos cardíacos em relação ao grupo não tratado. Apesar da recomendação do tratamento de todos os indivíduos (agudos e crônicos) com sorologia positiva para o parasito, há severas críticas relacionadas à generalização desta recomendação para os pacientes crônicos, pontuando-se a necessidade de se avaliar caso a caso (CASTRO & SOEIRO, 2013).

A duração média do tratamento é de cerca de sessenta dias, mas quando a doença crônica é reativada como em pacientes imunocomprometidos, este pode durar cinco meses ou mais. Apenas em tratamentos de pacientes contaminados acidentalmente, como por exemplo,

em um laboratório, a duração da profilaxia é aproximadamente dez dias (RODRIGUES & CASTRO, 2002).

Segundo requerimentos de 1997 da Organização Mundial de Saúde, um fármaco para ser considerada ideal no tratamento da doença de Chagas deve possuir algumas características peculiares, que são as seguintes:

- 1- Cura parasitológica na fase aguda e crônica da doença;**
- 2- Ser efetiva em uma ou poucas doses;**
- 3- Ser de baixo custo para o paciente;**
- 4- Não possuir efeitos colaterais nem teratogênicos;**
- 5- Não requerer internação para o tratamento e;**
- 6- Não induzir resistência.**

Por não cumprir vários desses pré-requisitos, principalmente as abordadas nos números 1 e 4, o Nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>) e o Benznidazol (Rochagan<sup>®</sup>) mesmo sendo apresentados como fármacos promissores, não podem ser considerados ideais para a terapia anti- *T. cruzi*. Ambos não possuem eficácia considerável na fase crônica da doença e os efeitos colaterais apresentados são o seu inconveniente principal (SZAJNMAN *et al.*, 2000; BOIANI *et al.*, 2008). A **Tabela 1** mostra os principais efeitos colaterais apresentados por ambas, representando as intensidades por cruzes.

**Tabela 1:** Principais efeitos colaterais observados na terapia específica da Doença de Chagas.

Sintoma/sinal	Benznidazol	Nifurtimox
Anorexia	++	+++
Cefaleia	+	++
Dermatopatia	+++	+
Excitação psíquica	-	+++
Gastralgia	+	+++
Insônia	+	++
Náusea	++	+++
Perda de peso	+	+++
Polineuropatia	+	++
Vômito	++	++

O benznidazol é considerado como o medicamento mais adequado na América Latina, e é o único autorizado no Brasil. Ele não está disponível comercialmente e deve ser solicitado através do Ministério da Saúde. Nifurtimox pode ser usado como uma alternativa ao tratamento com benznidazol através de programas de uso compassivo (CASTRO & SOEIRO, 2013).

Tendo em vista todo esse panorama que define a terapêutica da doença de Chagas como algo ineficaz, ultrapassado e inapropriado, têm-se cada vez mais intensificada a necessidade de recorrer a novas alternativas terapêuticas para a obtenção de fármacos mais seguros, ativos e com alvos biológicos mais específicos, principalmente para a fase crônica da doença. O desenvolvimento deste tipo de fármacos requer um melhor conhecimento do ciclo de vida e do metabolismo do *T. cruzi*.

### **1.3.1.7 Desenvolvimento de Novos Fármacos**

Devido ao alto custo dos investimentos e a falta de um mercado potencial e seguro nos países em desenvolvimento (onde a doença é endêmica), o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença de Chagas, assim como outras doenças negligenciadas, não é muito viável para as indústrias farmacêuticas. Das 1393 novas drogas desenvolvidas entre 1975 e 1999, menos de 1,1% foram dirigidas para doenças tropicais e tuberculose. Desta forma, a despeito da notável redução na incidência da transmissão, ainda existem desafios com dois problemas críticos: tratamento de pacientes na fase crônica, e ocorrência de novos casos agudos em algumas regiões da América Latina (FIOCRUZ, 2012).

De um modo geral, o desenvolvimento de uma quimioterapia antiparasitária ocorre pelo estabelecimento de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular, pela investigação de drogas já aprovadas para o tratamento de outras doenças, uma vez que elas já foram submetidas a ensaios clínicos muito dispendiosos, ou, através da determinação de alvo(s) específico(s) identificado(s) em vias metabólicas chave para o parasito. Estudos recentes têm permitido a identificação de alvos potenciais em *T. cruzi* e que incluem o metabolismo de esteróis, o DNA e diferentes enzimas como a cisteína protease (FIOCRUZ, 2012).

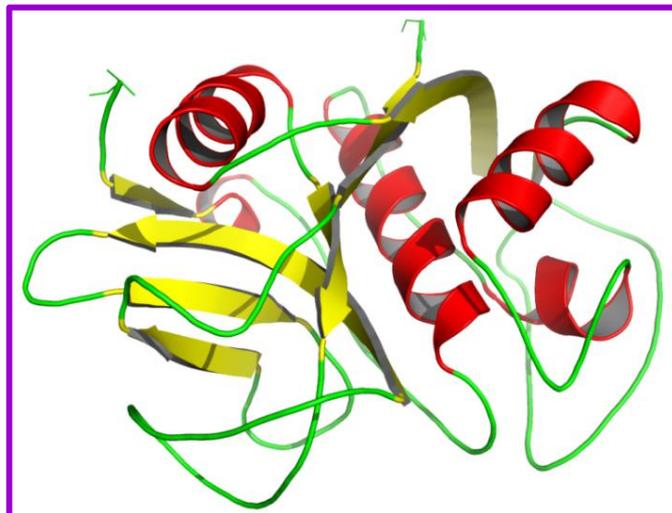
A transialidase (TS) é uma flavoenzima NADPH-dependente e tem sido considerada uma enzima chave no metabolismo oxidativo do parasito. Ocorre exclusivamente em

tripanosomatídeos, sendo indicada por este motivo como um dos mais promissores alvos na busca por fármacos tripanocidas (AGUIRRE *et al.*, 2004). Derivados nitrofurânicos, como a hidroximetilnitrofurazona, têm demonstrado produzirem, *in vitro*, inativação irreversível desta enzima em condições anaeróbicas (CHUNG *et al.*, 2003).

O *T. cruzi* requer esteróis específicos para a proliferação e a viabilidade de células em todos os estágios de seu ciclo, sendo este parasito extremamente susceptível a inibidores da biossíntese de esteróis. O principal esterol para o crescimento do *T. cruzi* é o ergosterol, o que torna, portanto, a via de biossíntese desse lipídeo um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos (URBINA, 2001). Atualmente, as enzimas mais bem estudadas desta cascata metabólica são a esterol 14-demetilase, lanosterol sintase, esqualeno epoxidase, esqualeno sintase, D-24 (25) esterol metiltransferase, farnesilpirofosfato sintase e a farnesiltransferase (DIAS *et al.*, 2009).

A cruzaina do *T. cruzi* (TCC) (**Figura 8**) é a principal cisteína protease do *T. cruzi*, sendo liberada em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, porém entregue em diferentes compartimentos celulares em cada estágio. É a enzima crucial para a atividade proteolítica do *T. cruzi* e essencial para a replicação intracelular do parasita, sendo um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos tripanomicidas (LEITE *et al.*, 2007). Recentemente, tem sido demonstrado que a infecção por este parasito pode ser curada em células de ratos e modelos de cães pelo tratamento com inibição irreversível da cruzaina (BRAK *et al.*, 2008). Diversos trabalhos têm descrito a atividade inibitória provocada por diversos grupos de compostos, como por exemplo, N-acilidrazidas, ureias, tioureias e tiossemicarbazonas (LEITE *et al.*, 2007).

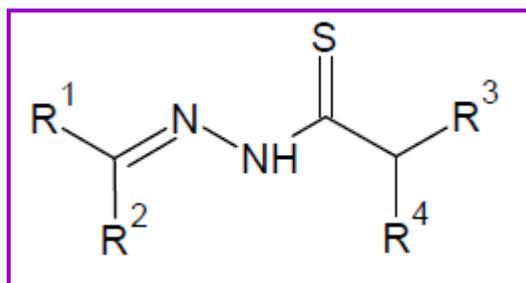
**Figura 8:** Representação da Cruzaina (KERR *et al.*, 2009).



### 1.3.2 TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas (**Figura 9**) apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma classe importante de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal. Dentre estas atividades, destacam-se a antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária e citotóxica (TENÓRIO *et al.*, 2005).

**Figura 9:** Estrutura química das tiossemicarbazonas



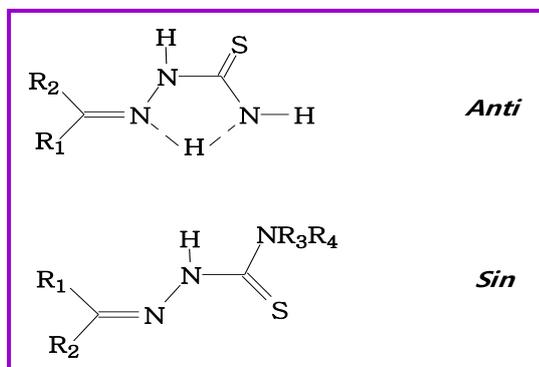
Focando-se nesta característica de alta versatilidade farmacológica desta classe de compostos, vários pesquisadores têm direcionado seus estudos na síntese de novas tiossemicarbazonas com a intenção de obter moléculas que sirvam como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos. Desde 2002 as aril-tiossemicarbazonas estão sendo descritas como potentes agentes tripanocidas e de baixa citotoxicidade (STEVERDING *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.1 Aspectos Químicos

As tiossemicarbazonas são compostos amplamente explorados na síntese orgânica, podendo ainda adquiri-las comercialmente com preços bastante acessíveis. Apresentam-se como sistemas com extrema deslocalização eletrônica, principalmente quando há grupos aromáticos ligados ao carbono da imina; aproximadamente planar, com o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina (**Figura 10**). Fatores eletrônicos e estéricos contribuem para este arranjo estrutural, sendo, possivelmente o fator mais importante, o átomo de enxofre em posição *anti*, que possibilita a ocorrência de ligação de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio da imina e os hidrogênios da tioamida, isso

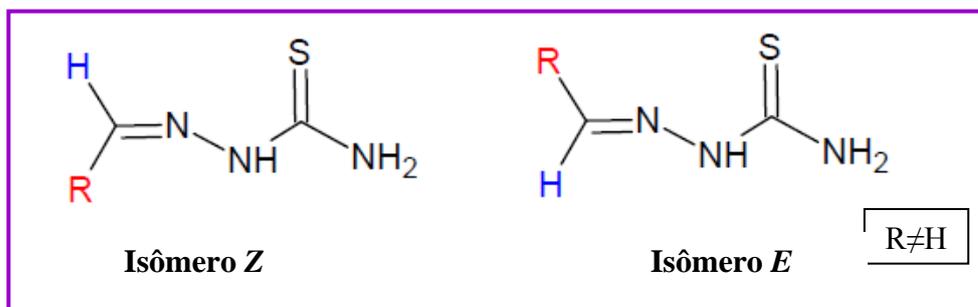
para as tiossemicarbazonas não substituídas em N-4. Levando em consideração as substituídas, a conformação *sin* é a preferida pela molécula (TENÓRIO *et al.*, 2005).

**Figura 10:** Representação das conformações das tiossemicarbazonas.



Devido à presença da ligação dupla na tiossemicarbazonas, podem ser encontrados diastereoisômeros conformacionais (*Z* e *E*) (**Figura11**). Mesmo a configuração *E* sendo teoricamente a mais favorável, estudos têm evidenciado a mudança de configuração de aril-tiossemicarbazonas quando complexadas com metais de transição, tornando difícil a determinação configuracional absoluta (TENÓRIO *et al.*, 2005).

**Figura 11:** Representação dos estereoisômeros *E* e *Z* das Tiossemicarbazonas

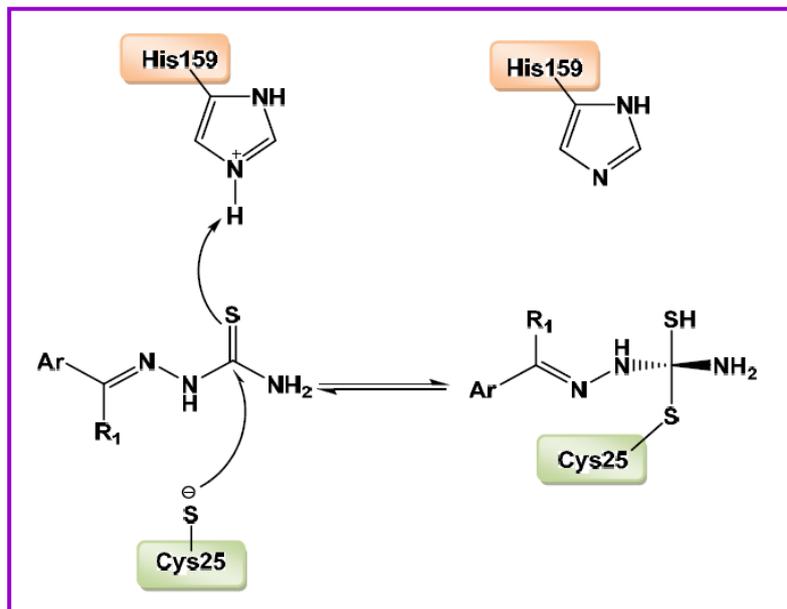


Do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal, sua versatilidade de obtenção, assim como sua aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Em geral, apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada em sua síntese, todos os outros átomos dos reagentes estarão presentes na molécula final (DU *et al.*, 2002).

### 1.3.2.2 Atividade Antichagásica

Para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos, as pesquisas têm sido focadas, como já citado anteriormente, na inibição da enzima TCC (TRAWICK *et al.*, 2006.) e da TR (AUGUSTYNS *et al.*, 2001). A porção tiossemicarbazona presente em alguns compostos descritos na literatura, tem sido evidenciada como um grupo farmacofórico que apresentam potencial atividade inibitória da enzima cruzaina (DU *et al.*, 2002; AGUIRRE *et al.*, 2004). Segundo Du e colaboradores a interação tiossemicarbazona TCC, acontece via ataque covalente do resíduo Cys25 da TCC em direção ao carbono da tiocarbonila e transferência de um próton do resíduo His159, formando um derivado tetraédrico. Em estudos de “docking” realizados em 2006 e 2007 Leite e colaboradores comprovaram a afinidade das aril-tiossemicarbazonas com a TCC, revelando a capacidade em inibir a TCC que moléculas com núcleo tiossemicarbazona possuem (LEITE *et al.*, 2007).

**Figura 12:** Mecanismo de inibição da TCC por derivados aril tiossemicarbazônicos proposta por Du *et al.*, 2002.



**2 - PLANEJAMENTO DA  
SÉRIE QUÍMICA,  
RESULTADOS E  
DISCUSSÃO**

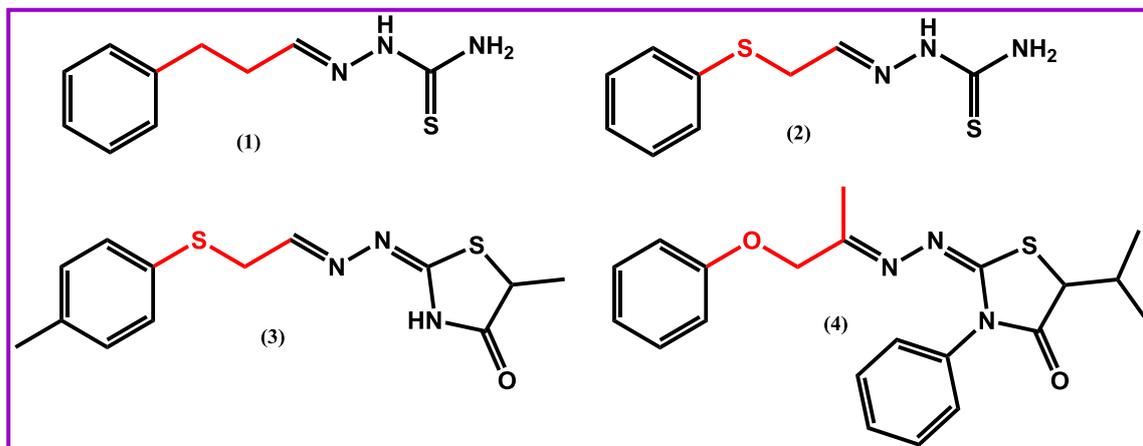
## 2.1 PLANEJAMENTO DA SÉRIE QUÍMICA

---

Para a obtenção da série **9a-x** foi escolhida a aril tiossemicarbazona por sua conhecida atividade antichagásica, tendo como principal mecanismo a inibição da cruzaina. Um modelo geral para a ligação de aril tiossemicarbazonas à cruzaina é a ligação de um grupo tioamida covalentemente aos aminoácidos Cys25 e His159 e dos grupos aril a um profundo bolso hidrofóbico (DU *et al.*, 2002; GREENBAUM *et al.*, 2004; SILES *et al.*, 2006; LOZANO *et al.*, 2012). Um grande número de modificações moleculares foram investigados por meio desse modelo de ligação, tais como a avaliação de bis-tiossemicarbazonas, derivados heterocíclicos tiossemicarbazônicos, tiossemicarbazonas contendo moléculas biorredutivas, bem como contendo complexos metálicos (SILES *et al.*, 2006; PORCAL *et al.*, 2008; CAPUTTO *et al.*, 2011; BLAU *et al.*, 2009; DEMORO *et al.*, 2012). Este modelo considera que esta classe de compostos contém dois diferentes determinantes estruturais e sugere-se que a presença de um espaçador entre o grupo aril e a tiossemicarbazona é uma estratégia possível para aumentar a potência antichagásica frente à cruzaina (estratégia de homologação) (MOUSSA *et al.*, 2011; POMPEU *et al.*, 2013).

O nosso grupo (LpQM) observou recentemente que o uso da estratégia de homologação produz tiossemicarbazonas com maior atividade anti-*T. cruzi* em comparação com tiossemicarbazonas sem um grupo espaçador (LEITE *et al.*, 2006; HERNANDES *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2012). As tiossemicarbazonas **1** e **2** exibiram atividade anti-*T. cruzi* mais elevada do que os seus análogos sem o grupo espaçador (LEITE *et al.*, 2006; HERNANDES *et al.*, 2010). No entanto, as tiossemicarbazonas **1** e **2** apresentaram baixa seletividade, sendo necessárias melhorias estruturais. Mais recentemente, a estratégia de homologação foi utilizada para aumentar a atividade de bioisómeros de tiossemicarbazonas, o que conduziu à identificação de potentes tiazolidinonas **3** e **4** anti-*T. cruzi* (**Figura 13**) (MOREIRA *et al.*, 2012).

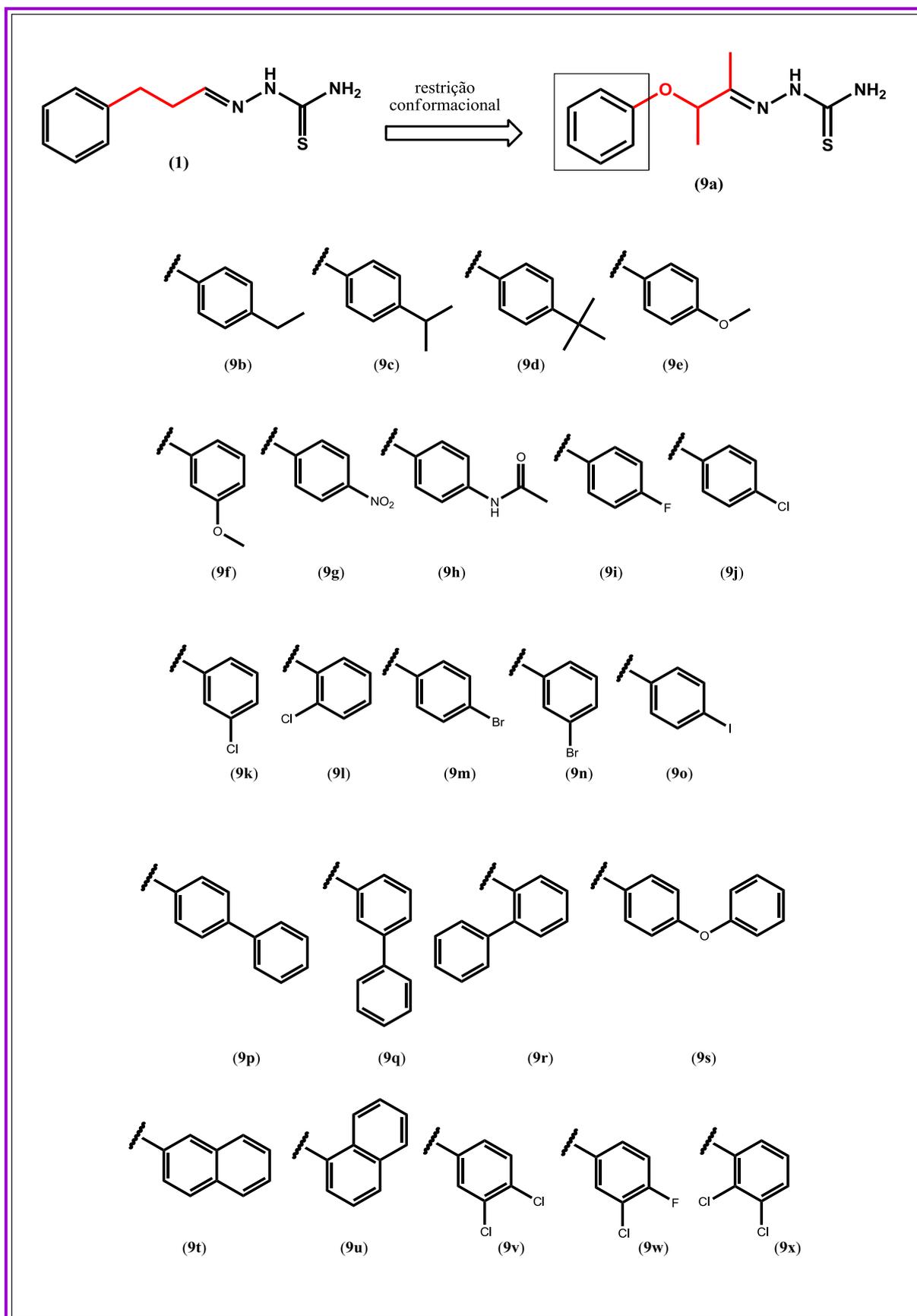
**Figura 13:** Estrutura química das tiossemicarbazonas **1** e **2** e tiazolidinonas **3** e **4** identificadas previamente como agentes anti-*T. cruzi*. A cor vermelha destaca os grupos espaçadores.



Na literatura, alguns exemplos da estratégia de homologação para a concepção de fármacos têm sido realizados usando grupos espaçadores com algum grau de restrição conformacional, isto é, elevada barreira de energia rotacional (DIMMOCK *et al.*, 1996; SELVAKUMAR *et al.*, 2003; BOJARSKI *et al.*, 2004; KAMAL *et al.*, 2011; YONEZAWA *et al.*, 2013). De fato, a preparação de N-acilidrazonas conformacionalmente mais restritas, tais como as tiossemicarbazonas, conseguiu produzir compostos com maior atividade antiparasitária (CARVALHO *et al.*, 2012; VITAL *et al.*, 2013). Com base nestes resultados da literatura, nós procuramos grupos espaçadores mais conformacionalmente restritos que o utilizado no composto **1** aumentando a atividade anti-*T. cruzi*. Por isso, foi escolhido o grupo alcóxi apresentado na **Figura 14** como um grupo espaçador para a homologação de aril tiossemicarbazonas porque este deve também aumentar a rigidez molecular, assim como permitir a síntese rápida de uma série de derivados.

Usou-se o grupo espaçador alcóxi para preparar uma nova série de ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**. Somando-se a esta técnica foi empregado o bioisosterismo, onde uma variedade de substituintes foram ligados ao anel fenil, tais como grupos metil, metóxi, nitro, halogênios, de forma a examinar o papel de um substituinte em termos de contribuições eletrônicas para o atividade anti-*T. cruzi*. Primeiramente, foram preparados derivados com fenil *para*-substituídos e este foi seguido de preparação de derivados com um substituinte na posição *meta* ou *orto* no anel fenil. Depois disso, derivados contendo dois substituintes ligados ao anel fenil, foram sintetizados, bem como a substituição de um grupo fenil por um anel naftil. A avaliação da atividade anti-*T. cruzi* para os compostos **9a-x** serviu para a identificação da maioria dos determinantes estruturais para a atividade, assim como para encontrar ariloxitiossemicarbazonas com potência igual ou maior do que o benznidazol.

**Figure 14:** Restrição conformacional do composto **1** protótipo para o design do **9a**. Estrutura dos grupos aril empregados durante a série de ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**. Os grupos espaçadores estão marcados em vermelho.



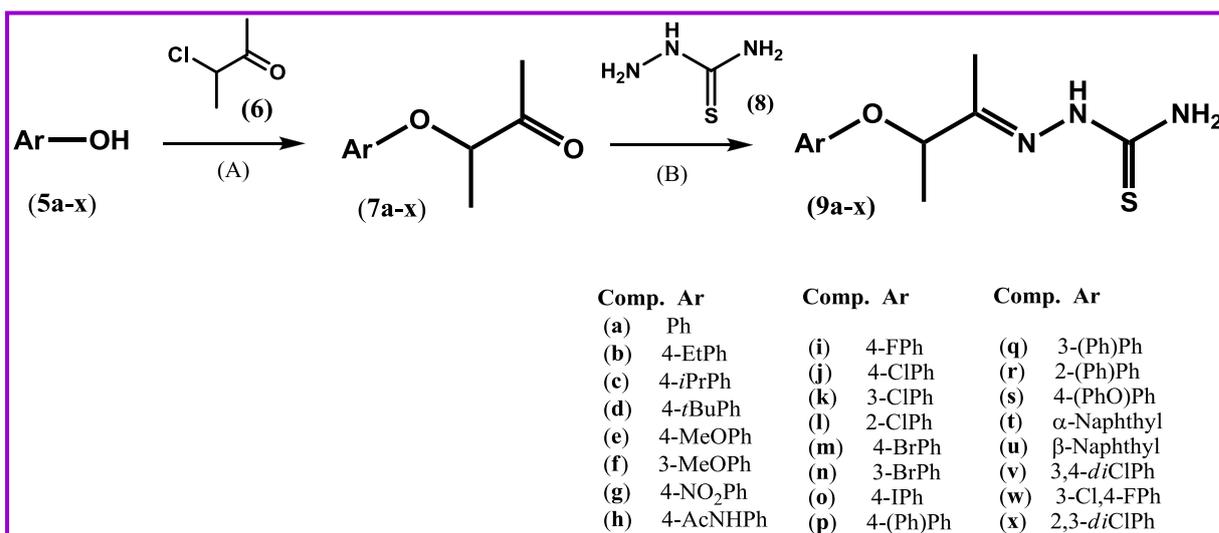
## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1 PARTE QUÍMICA

#### 2.2.1.1 Obtenção da Série Química

Os procedimentos sintéticos utilizados para preparar as 24 ariloxitiossemicarbazonas **9a-x** são mostrados no **Figura 15**. Inicialmente, reagiu-se os compostos fenólicos **5a-x** com 3-cloro-2-butanona (**6**) em condições básicas, à temperatura ambiente. Após 12 h de reação,  $\beta$ -cetonas **7a-x** foram obtidas, com rendimentos variando de 66-99%. Reagiu-se então as ariloxicetonas **7a-x** com tiossemicarbazida (**8**) e HCl catalítico em banho de ultrassom à temperatura ambiente. Após 2 horas, as ariloxitiossemicarbazonas **9a-x** precipitaram na mistura reacional e foram recolhidas por uma etapa de filtração simples. Todas as ariloxitiossemicarbazonas **9a-x** foram recristalizadas e obteve-se uma pureza aceitável (> 95%) com rendimentos variando entre 36 e 98%.

**Figura 15:** Síntese das ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**. Reagentes e condições: (A)  $K_2CO_3$ , KI, butanona, temperatura ambiente, 12h, rendimento 66-99%. (B) HCl, EtOH, banho de ultrassom, durante 2h, rendimentos de 36-98%. Ph = fenil, *i*Pr = isopropil, *t*Bu = terc-butil.

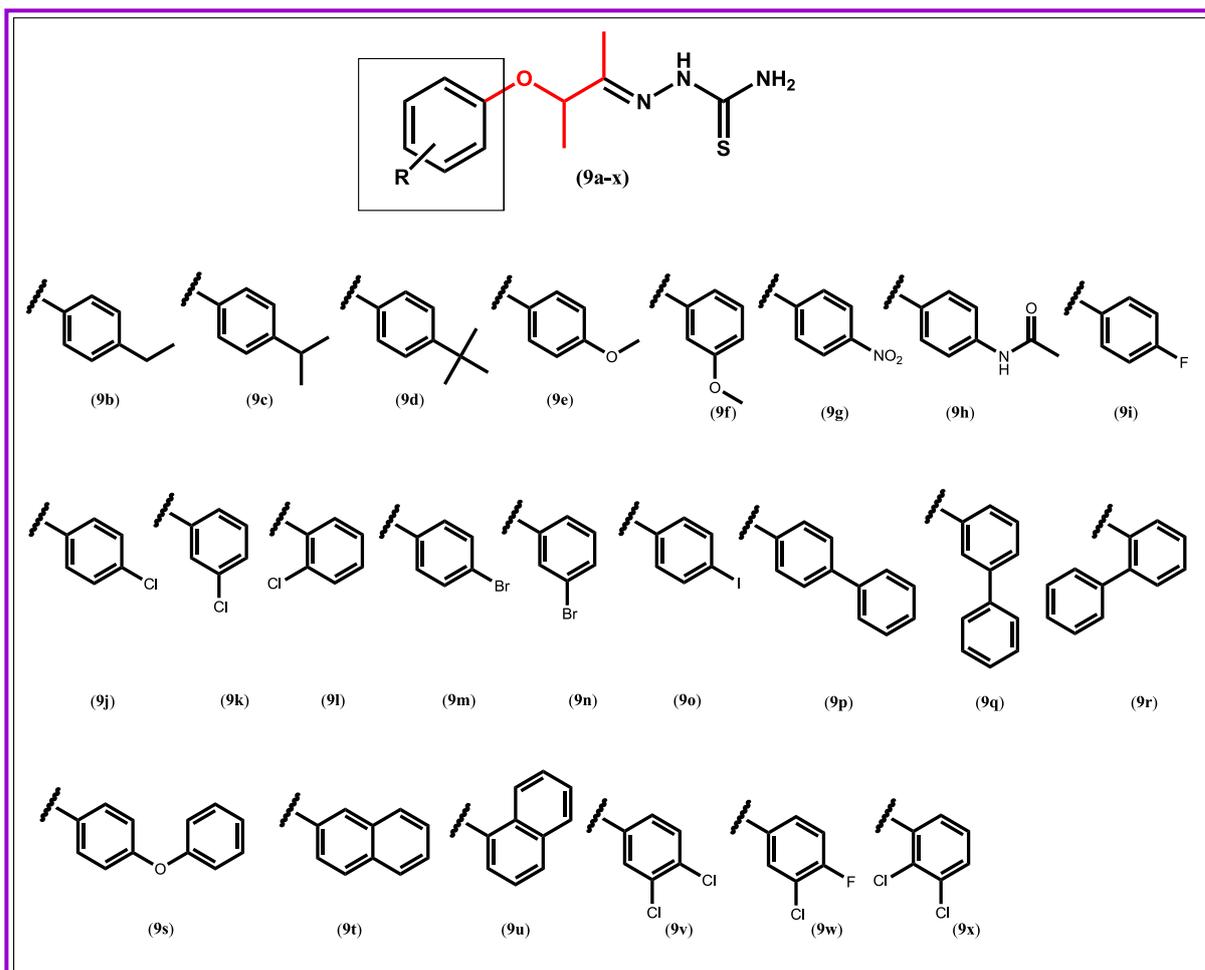


## 2.2.1.2 Caracterização Estrutural

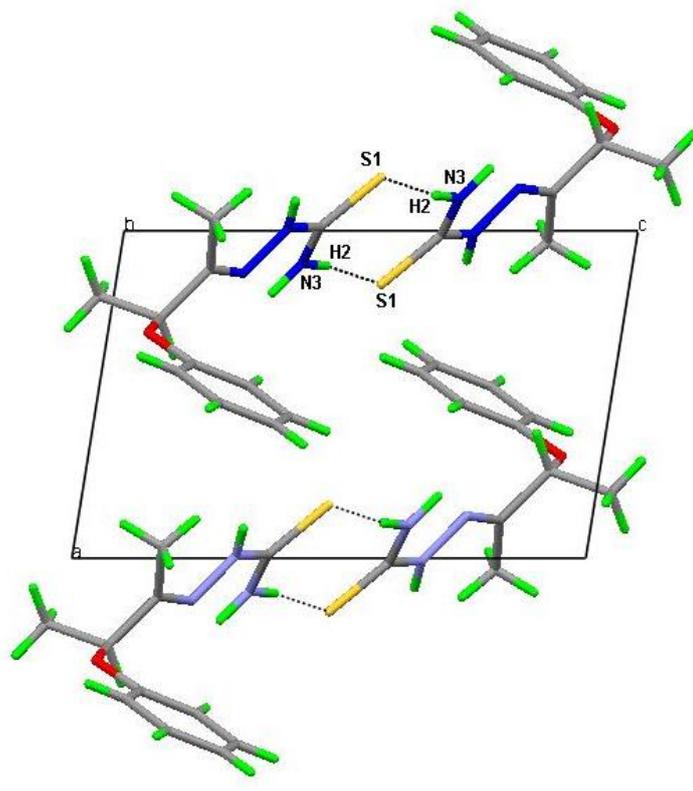
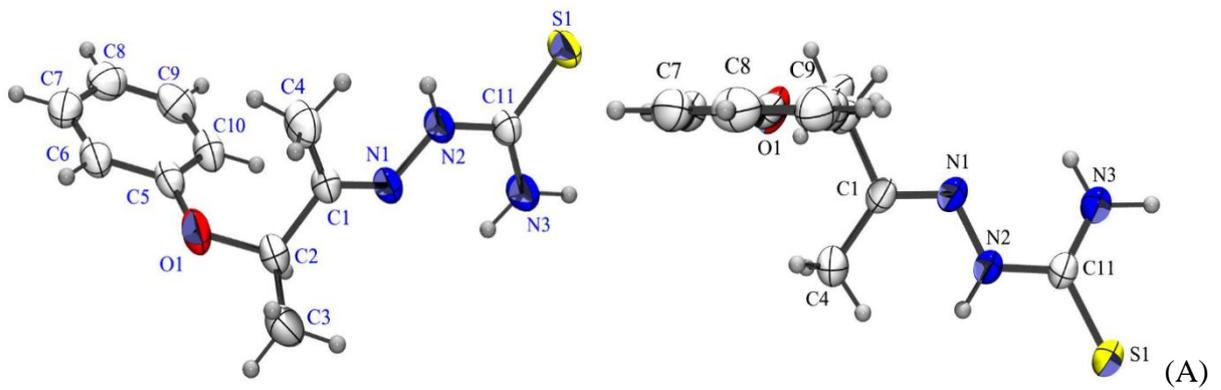
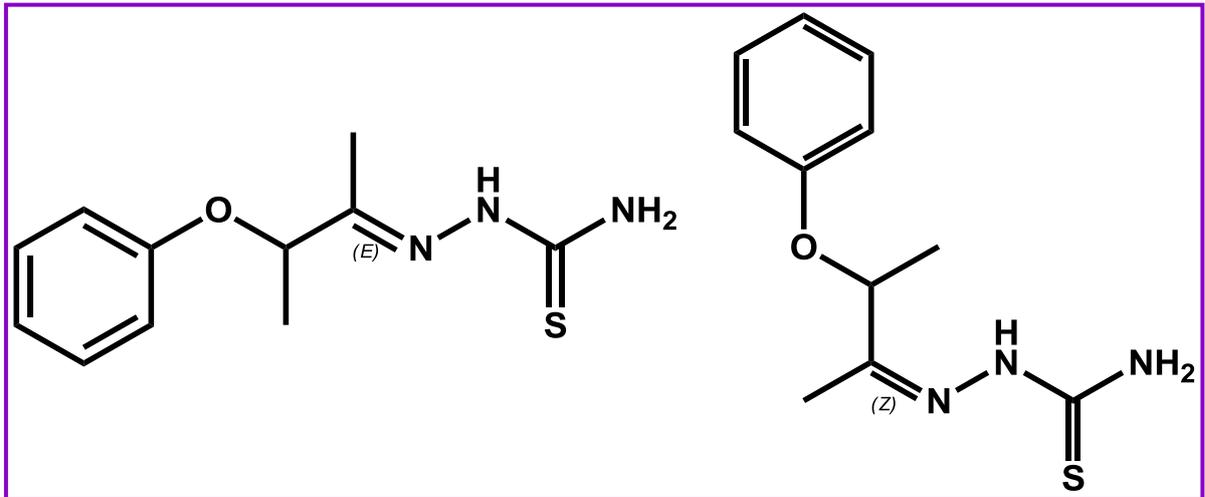
### 2.2.1.2.1 Cristalografia de Raios-X (Composto 9a)

Em teoria, os dois diastereoisômeros podem ser produzidos por estas ariloxitiossemicarbazonas (**Figura 16**). No entanto, quando se analisou os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , bem como a cromatografia de camada delgada, apenas a formação de um isômero é observada. Para determinar a sua configuração, um único cristal da tiossemicarbazona **9a** foi analisado por cristalografia de raios-X. Como podemos ver a partir do diagrama Ortep-3 na **Figura 17**, o átomo de C (2) é antiperiplanar do átomo N (2), portanto, a tiossemicarbazona **9a** tem uma geometria *E*. No RMN  $^1\text{H}$ , o deslocamento químico dos prótons do metino C (2) e metil C (4) não variou para todos os compostos **9a-x**. Com base nisso, sugere-se que as ariloxitiossemicarbazonas **9a-x** têm uma geometria *E*.

**Figura 16:** Estrutura dos grupos aril empregadas na série de ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**. O grupo espaçador está destacado em vermelho.



**Figura 17:** (A) Representações dos diastereoisômeros da tiossemicarbazona **9a**. (B) Diagrama Ortep-3 de **9a** e sua estrutura de célula unitária mostrando o dímero.

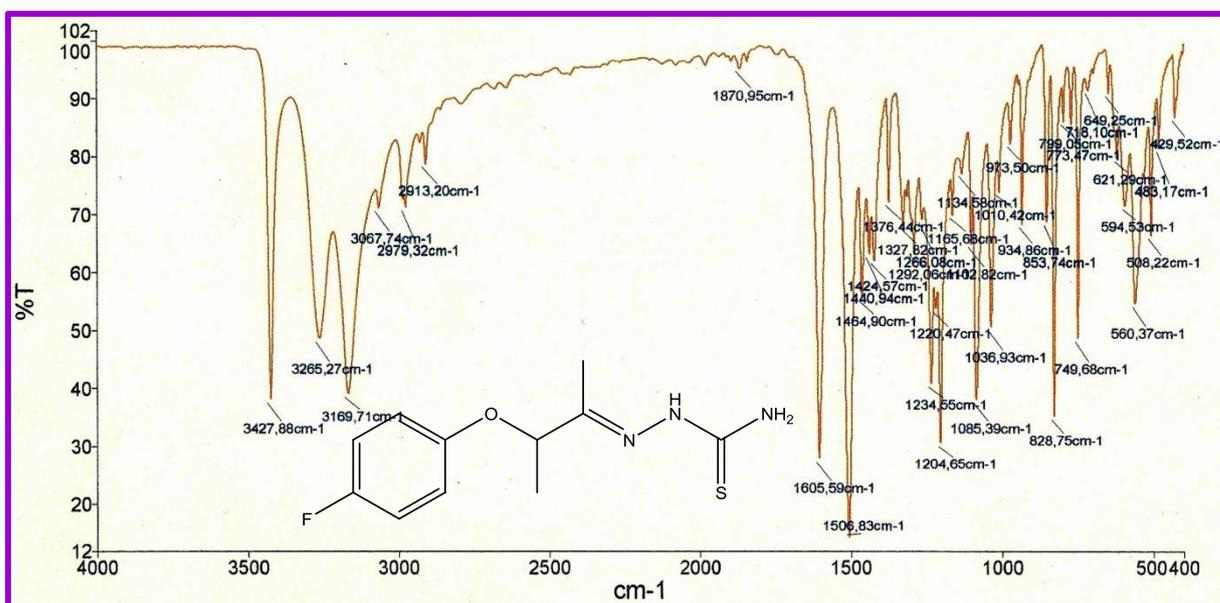


(B)

### 2.2.1.2.2 Infravermelho (Composto 9i)

A caracterização da série **9a-x** será exemplificada pela caracterização do composto **9i**. Através da análise espectroscópica na região do infravermelho foi possível constatar as principais bandas de absorção (**Figura 18**). A banda presente na frequência de  $3427.88\text{ cm}^{-1}$  é sugestivo de deformação axial N-H. As banda em  $3265.27\text{ cm}^{-1}$  e  $3169.71\text{ cm}^{-1}$  sugerem a presença do grupamento  $\text{NH}_2$ . Em  $1605.59\text{ cm}^{-1}$  observa-se a presença de banda característica para o estiramento  $\text{C}=\text{N}$ . Em  $1234.55\text{ cm}^{-1}$  observou-se a banda característica de  $\text{C}-\text{O}$  e em  $1085.39\text{ cm}^{-1}$  a banda sugestiva de  $\text{C}=\text{S}$ .

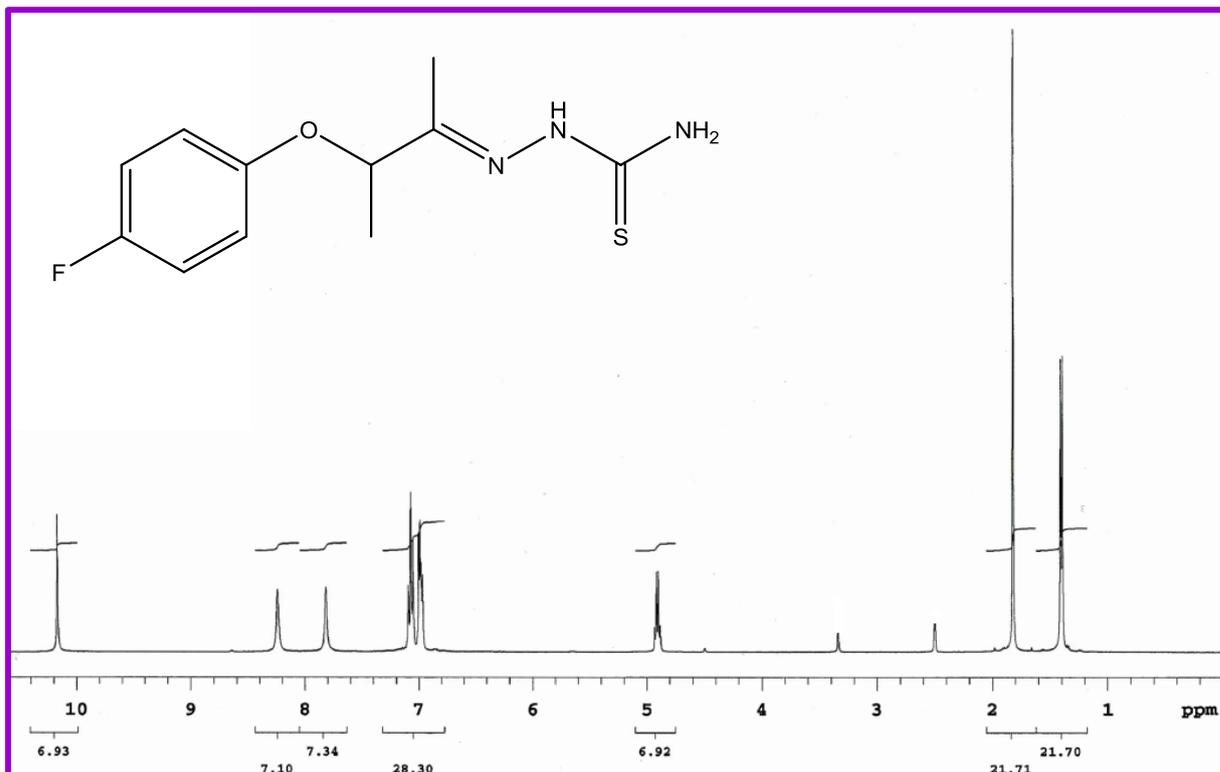
**Figura 18:** Espectro de infravermelho da molécula **9i**.



### 2.2.1.2.3 RMN $H^1$ (Composto 9i)

A **Figura 19** apresenta os valores do espectro de RMN $H^1$  do composto **9i**, onde foi constatada a presença de um dubleto em 1.40, integrando para três hidrogênios, referente a um grupo metila ligado ao grupo metino. Em 1.82 encontra-se um singlete referente à outra metila ligada à um carbono quaternário. O quarteto em 4.91 refere-se ao hidrogênio do metino ligado à metila. O multipletto entre 6.97 e 7.10 está relacionado aos quatro hidrogênios aromáticos. Os sinais em 7.81 e 8.24 referem-se aos dois hidrogênios da amina primária. O sinal em 10.17 caracteriza a presença da amina secundária.

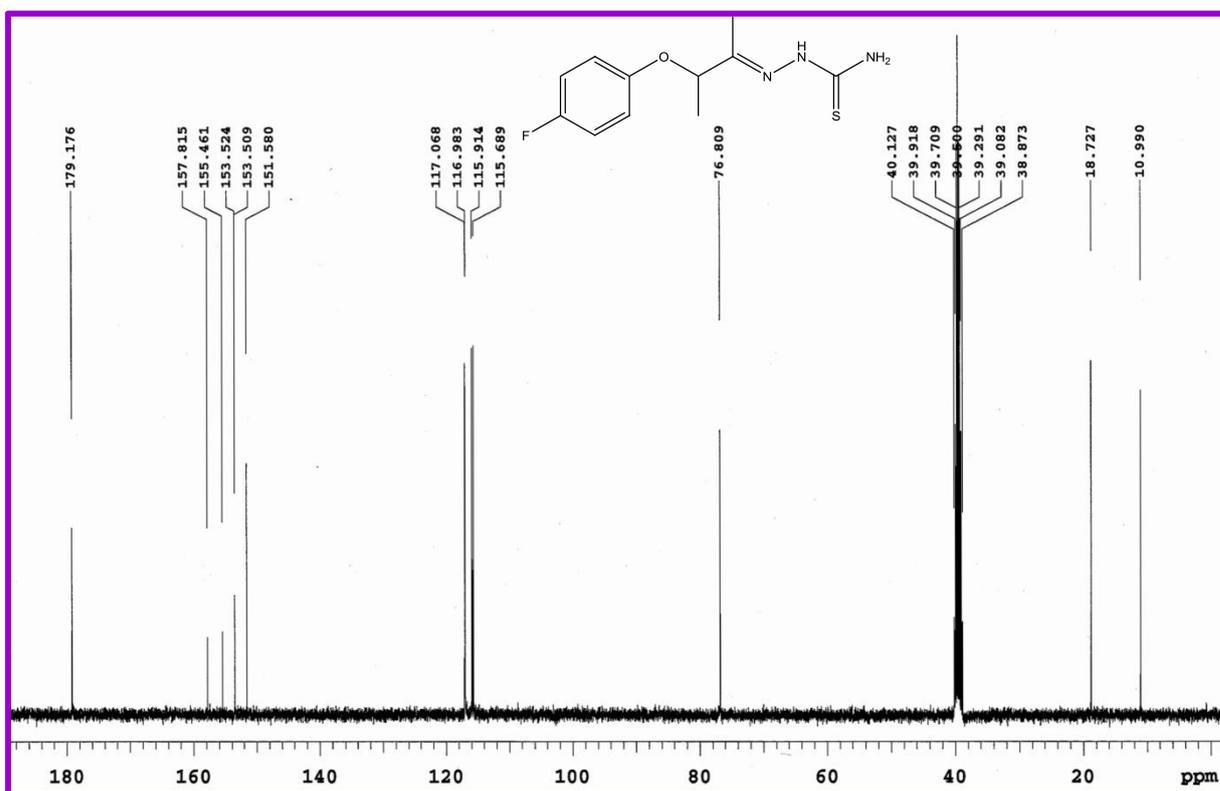
**Figura 19:** Espectro do RMN  $H^1$  para a molécula **9i**.



#### 2.2.1.2.4 RMN C<sup>1</sup> (Composto 9i).

Para confirmação dos carbonos presentes na molécula **9i**, foi utilizada a ressonância magnética nuclear de carbono 13 (**Figura 20**). Os picos em 10.99 e 18.73 referem-se às duas metilas presentes na molécula. O pico em 76.81 corresponde ao carbono do grupamento metino. Os picos em 115.69, 115.91, 116.98 e 117.07 correspondem aos carbonos aromáticos. O sinal em 151.58 corresponde ao carbono ligado ao oxigênio. O pico em 153.51 indica o carbono da função azo metílica. Em 155.46 observa-se o pico referente ao carbono aromático ligado ao flúor. Em 179.18 tem-se o pico referente ao carbono ligado ao enxofre.

**Figura 20:** Espectro do RMN C<sup>13</sup> para a molécula **9i**.



## 2.2.2 PARTE BIOLÓGICA

Após a caracterização estrutural de todas as ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**, a toxicidade celular e atividade antiparasitária foram determinadas (**Tabela 2**). Primeiro, os compostos foram avaliados quanto à inibição da proliferação de epimastigotas DM28c, bem como a toxicidade contra tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Os resultados foram expressos em termos de valores de  $CI_{50}$ . Após isso, a citotoxicidade foi determinada em esplenócitos de camundongos BALB/c e os resultados foram expressos como a concentração mais elevada não tóxica em  $\mu\text{M}$ . Benznidazol e nifurtimox foram usados como medicamentos de referência.

Em relação à atividade em tripomastigotas, a feniltiossemicarbazona não substituída **9a** ( $CI_{50} = 27.3 \mu\text{M}$ ) foi pouco ativa. A ligação de um grupo alquil na posição 4 do anel fenil reforça a atividade anti-*T. cruzi* em comparação com a feniltiossemicarbazona não substituída **9a**. Especificamente, o derivado 4-etilfenil, **9b** ( $CI_{50} = 4.6 \mu\text{M}$ ) é 4 vezes mais potente do que a **9a** e um pouco mais potente que benznidazol ( $CI_{50} = 6.2 \mu\text{M}$ ). Quando um substituinte 4-isopropil (**9c**,  $CI_{50} = 1.5 \mu\text{M}$ ) ou 4-terc-butil (**9d**,  $CI_{50} = 1.4 \mu\text{M}$ ) foi ligado no anel fenil, este produziu ariloxitiossemicarbazonas duas vezes mais potentes que o benznidazol. Em contraste, o derivado 4-metoxifenil (**9e**,  $CI_{50} = 26.8 \mu\text{M}$ ) foi pouco ativo, enquanto o seu isômero (3-metoxifenil (**9f**,  $CI_{50} = 6.2 \mu\text{M}$ ) foi ativo, mas não o suficiente para produzir compostos com índice de seletividade melhor que o benznidazol. Em comparação com a feniltiossemicarbazona não substituída **9a**, o derivado 4-nitrofenil, **9g** ( $CI_{50} = 5.9 \mu\text{M}$ ) reforçou a atividade anti-*T. cruzi*. A fixação de um grupo acetamida (**9h**,  $CI_{50} = 1.4 \mu\text{M}$ ) aumentou consideravelmente a atividade anti-*T. cruzi*. De fato, a potência do **9h** contra tripomastigotas foi duas vezes maior que o nifurtimox e quatro vezes mais ativo que o benznidazol.

Em seguida, foi avaliada a atividade em tripomastigotas por ariloxitiossemicarbazonas contendo halogênios ligados ao anel fenil. Os derivados 4-fluorofenil, **9i** ( $CI_{50} = 23.2 \mu\text{M}$ ) e 4-clorofenil, **9j** ( $CI_{50} = 22.8 \mu\text{M}$ ) foram pouco ativos. No entanto, quando a posição do átomo de cloro foi mudada, ocorreu o aumento da potência, produzindo a seguinte ordem: 2-Cl (**9l**,  $CI_{50} = 1.5 \mu\text{M}$ ) > 3-Cl (**9k**,  $CI_{50} = 5.5 \mu\text{M}$ ) > 4-Cl (**9j**,  $CI_{50} = 22.8 \mu\text{M}$ ). A fixação de um átomo de bromo aumentou a atividade independente da sua posição no fenil. Do mesmo modo, a introdução de um átomo de iodo (**9o**,  $CI_{50} = 1.1 \mu\text{M}$ ) aumentou a atividade em comparação com a feniltiossemicarbazona não substituída **9a**. Avaliou-se também compostos que contém grupo bifenil. A substituição de um fenil **9a** pelo grupo 4-(fenil) fenil **9p** ( $CI_{50} = 1.3 \mu\text{M}$ )

aumentou significativamente a atividade contra tripomastigotas. Analisando-se os valores de  $CI_{50}$  para os compostos 4-fenil **9p** e 3-fenil **9q** ( $CI_{50} = 1.3 \mu\text{M}$ ), observou-se que a posição do grupo bifenil não afeta a potência. Seguindo essa tendência, o grupamento 4-(fenóxi) fenil **9s** ( $CI_{50} = 1.3 \mu\text{M}$ ) foi preparado, avaliado e, como esperado, foi muito ativo em tripomastigotas.

Além de avaliar os compostos com um anel fenil monossustituído, testamos ariloxitiossemicarbazonas contendo um naftil em vez de um anel de fenil. Enquanto a fenil tiossemicarbazona não substituída **9a** é pouco ativa, a tiossemicarbazona  $\alpha$ -naftil **9t** ( $CI_{50} = 1.5 \mu\text{M}$ ) e a  $\beta$ -naftil **9u** ( $CI_{50} = 5.6 \mu\text{M}$ ) apresentaram atividades bastante significativas. Em seguida, testou-se as ariloxitiossemicarbazonas contendo dois substituintes ligados no anel fenil. Enquanto o 4-clorofenil **9j** foi pouco inativo, o derivado 3,4-dicloro-fenil **9v** ( $CI_{50} = 4.4 \mu\text{M}$ ) foi mais ativo. O mesmo foi observado para o derivado de 3-cloro-4-fluorofenil **9w** ( $CI_{50} = 3.5 \mu\text{M}$ ). No entanto, a ligação de dois átomos de cloro nas posições 2- e 3- **9x** ( $CI_{50} = 11.9 \mu\text{M}$ ) diminuiu a contra tripomastigotas.

Tendo verificado a atividade antiparasitária para tripomastigotas, foi analisada a atividade contra epimastigotas. Excetuando-se a **9h**, a maioria dos compostos ativos contra tripomastigotas foram capazes de reduzir a proliferação de epimastigota com a mesma potência. No que diz respeito à citotoxicidade em esplenócitos de rato, algumas das ariloxitiossemicarbazonas ativas contra *T. cruzi* exibiram baixa citotoxicidade. Por exemplo, os compostos **9h**, **9q**, **9s** e **9t** tiveram  $CI_{50} < 1,5 \mu\text{M}$  contra tripomastigotas, enquanto elas foram atóxicas para esplenócitos em concentrações acima de  $30 \mu\text{M}$ . Os compostos **9c**, **9d**, **9o**, **9p** e **9v** foram as ariloxitiossemicarbazonas mais citotóxicas para esplenócitos, porém, foram menos tóxicas que o nifurtimox.

Em seguida, foi avaliada se a atividade anti-*T. cruzi* das ariloxitiossemicarbazonas **9a-x** tem como mecanismo a inibição da cruzaina. Nós selecionamos ariloxitiossemicarbazonas com  $CI_{50} < 5,0 \mu\text{M}$  contra tripomastigotas (por exemplo, derivados **9g**, **9h**, **9k**, **9m**, **9n**, **9o**, **9p**, **9s**, **9t**). Para comparação, foi incluído o derivado fenil não substituída **9a**. Mediu-se a inibição da atividade enzimática da cruzaina usando um ensaio baseado na competição com Z-FR-AMC. Os compostos **9a**, **9h**, **9k**, **9m**, **9n**, **9o** e **9s** foram testados a  $100 \mu\text{M}$ , enquanto os compostos **9g**, **9p** e **9t** foram testados a  $50 \mu\text{M}$ . No entanto, não foi observada inibição da cruzaina por estes compostos, portanto, sugere-se que este não é o mecanismo para a atividade tripanocida desses compostos.

**Tabela 2:** Atividade anti-*T. cruzi* e toxicidade em célula hospedeira por ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**.

Compostos	Ar	T. cruzi, CI <sub>50</sub> (μM)		Toxicidade em células hospedeiras (μM) <sup>c</sup>
		Epimastigotas <sup>a</sup>	Tripomastigotas <sup>b</sup>	
<b>9a</b>	Ph	26.1	27.3	210.6
<b>9b</b>	4-EtPh	11.6	4.6	18.8
<b>9c</b>	4- <sup>i</sup> PrPh	5.9	1.5	17.9
<b>9d</b>	4- <sup>t</sup> BuPh	4.6	1.4	17.0
<b>9e</b>	4-MeOPh	27.6	26.8	93.5
<b>9f</b>	3-MeOPh	6.8	6.2	37.4
<b>9g</b>	4-NO <sub>2</sub> Ph	176.9	5.9	88.5
<b>9h</b>	4-AcNHPH	71.5	1.4	>339.7
<b>9i</b>	4-FPh	86.4	23.2	>391.8
<b>9j</b>	4-ClPh	13.5	22.8	92.0
<b>9k</b>	3-ClPh	45.8	5.5	36.8
<b>9l</b>	2-ClPh	10.3	1.5	36.8
<b>9m</b>	4-BrPh	20.1	3.9	31.6
<b>9n</b>	3-BrPh	5.8	4.5	31.6
<b>9o</b>	4-IPh	4.9	1.1	13.7
<b>9p</b>	4-(Ph)Ph	4.5	1.3	15.9
<b>9q</b>	3-(Ph)Ph	2.2	1.3	31.9
<b>9r</b>	2-(Ph)Ph	2.2	ND	31.9
<b>9s</b>	4-(PhO)Ph	ND	1.3	30.3
<b>9t</b>	α-Naphthyl	4.9	1.5	34.8
<b>9u</b>	β-Naphthyl	17.9	5.6	34.8
<b>9v</b>	3,4- <i>di</i> ClPh	4.4	4.4	16.3
<b>9w</b>	3-Cl-4-FPh	ND	3.5	34.5
<b>9x</b>	2,3- <i>di</i> ClPh	2.2	11.9	32.6
<b>Bdz</b>	-	48.8	6.2	96.0
<b>Nfx</b>	-	5.7	2.7	3.4

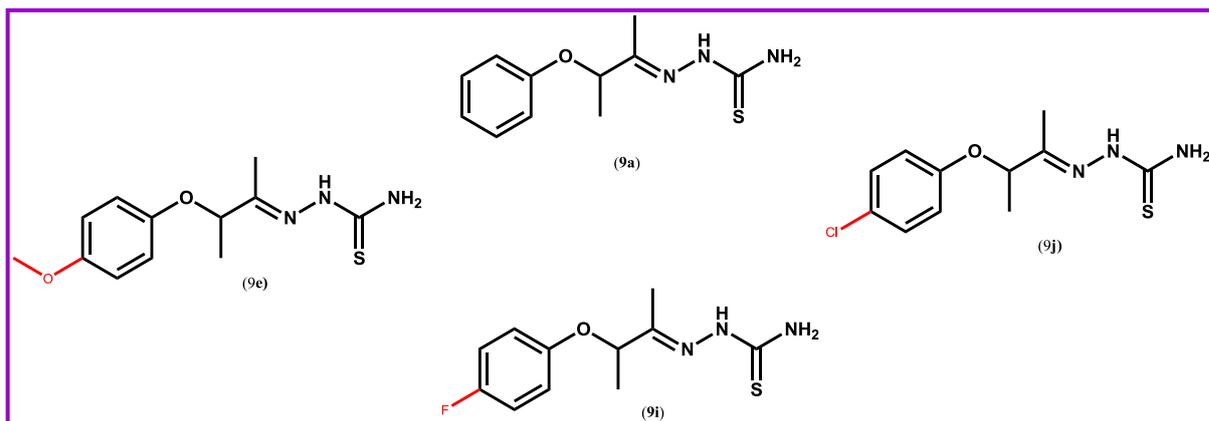
<sup>a</sup> Determinado 5 dias após a incubação com os compostos, utilizando epimastigotas DM28c.

<sup>b</sup> Determinado 24 h após a incubação com os compostos, utilizando tripomastigotas cepa Y. Os valores de CI<sub>50</sub> foram calculados utilizando-se concentrações em triplicata, e a experiência foi repetida, apenas CI<sub>50</sub> com desvio padrão <10% foi considerado significativo.

<sup>c</sup> Viabilidade das células de splenócitos de ratos Balb/c determinados 24 h após o tratamento, os resultados foram expressos como a concentração mais elevada não-tóxica. Bdz = benznidazol. Nfx = Nifurtimox. ND = não determinado.

Como pode ser observado com a utilização do grupo alcóxi seguida de variações no grupamento aril, foi possível localizar a maioria dos determinantes estruturais para a atividade anti-*T. cruzi*. A introdução dos grupos 4-metóxi, 4-fluoro e 4-cloro no fenil apresentaram uma baixa atividade semelhante a tiossemicarbazona não substituída. (**Figura 21**)

**Figura 21:** Estrutura dos compostos **9a**, **9f**, **9i** e **9j**.



Em seguida, verificou-se que os substituintes bromo, bifenil e fenóxi aumentam a atividade em comparação com a fenil tiossemicarbazona não substituída. De acordo com a atividade observada para os derivados de bifenil, a substituição de um grupo fenil por um grupo  $\alpha$ - ou  $\beta$ -naftil também aumentou a atividade (**Figura 22**). Estes resultados apontam que substituintes hidrofóbicos podem ser determinantes estruturais para alcançar a atividade anti-*T. cruzi*. Também foi observado que os derivados contendo grupos isopropil, terc-butil e iodo aumentaram a atividade anti-*T. cruzi*, entretanto, apresentaram alta citotoxicidade nas células hospedeiras (**Figura 23**).

Figura 22: Estrutura dos compostos 9m, 9p, 9s, 9u e 9t, comparados com o 9a.

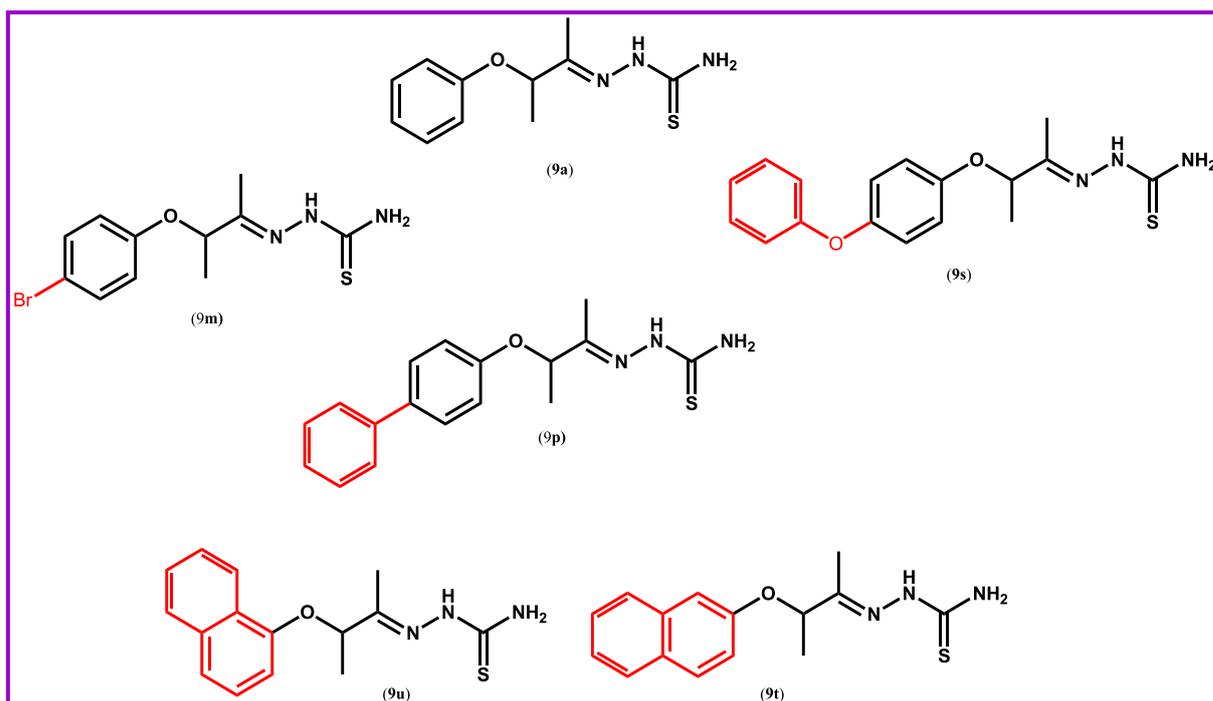
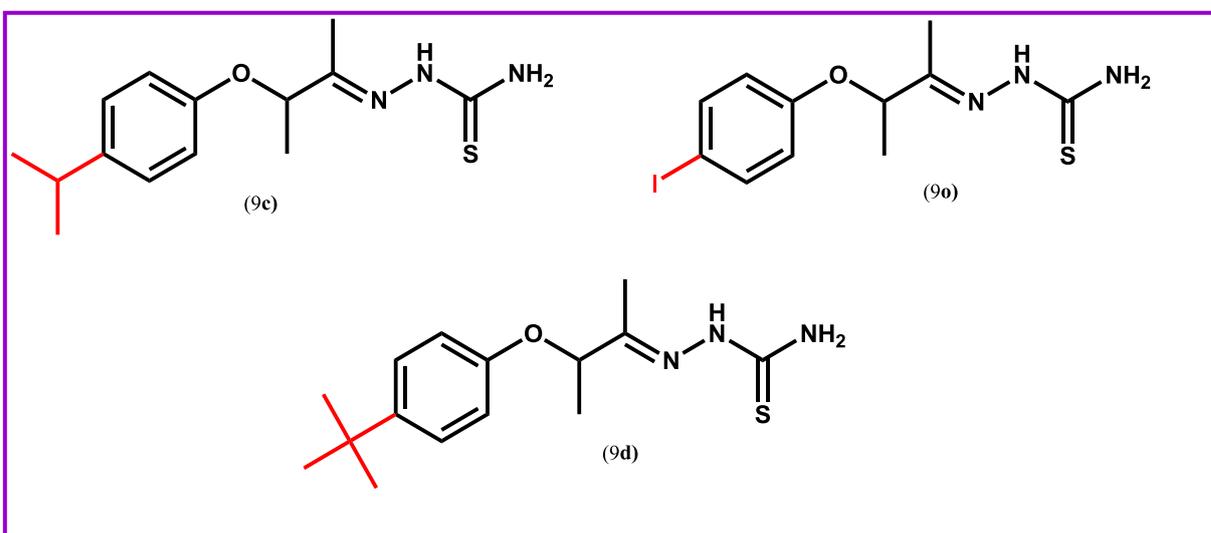
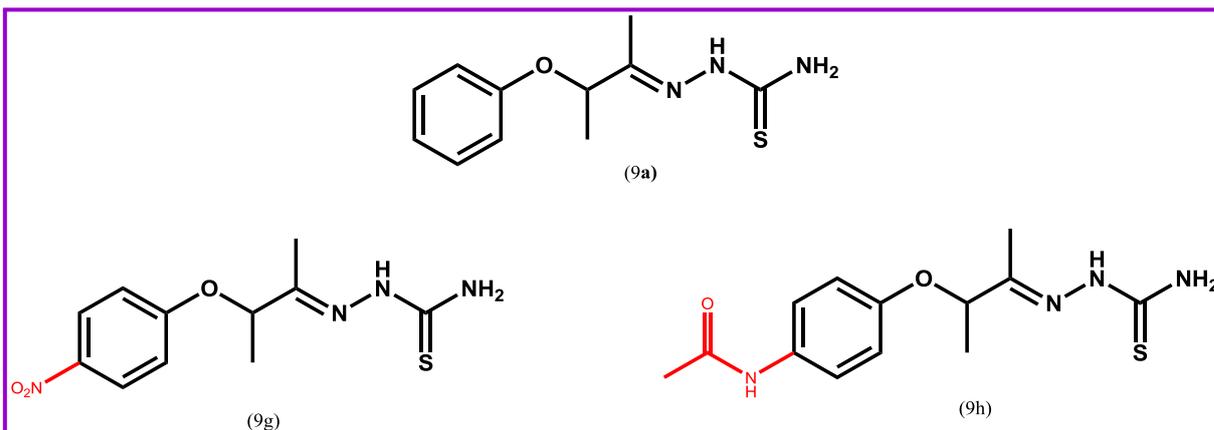


Figura 23: Estrutura dos compostos 9c, 9d e 9o.



Uma interessante relação estrutura-atividade (REA) foi observada pela comparação dos derivados 4-nitrofenil e 4-fenil-acetamida. Nitro é um grupo farmacofórico antiparasitário bem conhecido (MAYA *et al.*, 2003), mas aqui, sua ligação no anel fenil aumentou levemente a atividade. Em contraste, a adição de uma acetamida aumentou bastante a atividade em comparação com a fenil tiossemicarbazona não substituída. Na verdade, a inserção de um grupo acetamida produziu uma das ariloxitiossemicarbazonas mais potentes como agentes anti-*T. cruzi* descritas aqui (Figura 24).

Figura 24: Compostos 9g e 9h, comparados com o 9a.



Outra interessante REA foi observada através da comparação da posição dos substituintes (*orto*, *meta*, *para*). As variações na posição do átomo de cloro ligado ao fenil aumentou a atividade anti-*T. cruzi*, no entanto, isto ocorreu sem um ganho de seletividade. A posição dos substituintes bromo e bifenil no anel fenil não variou a potência, sendo esses compostos equipotentes na prática. Portanto, isto sugere que a natureza do substituinte é importante para a atividade, porém a sua posição ao longo do anel fenil tem menos importância.

O efeito dos substituintes em termos de doador de elétrons ou de retirador de elétrons para estas ariloxitiossemicarbazonas foi examinado. No que diz respeito aos substituintes doadores de elétrons moderados, o derivado 4-metóxi foi inativo, enquanto o 4-acetamida e o 4-fenóxi foram ativos. Substituintes que eram doadores de elétrons fracos, tais como alquil e fenil, também produziram compostos ativos. Em relação aos substituintes retiradores de elétrons, substituintes desativadores fortes, como o grupo nitro, produziu compostos ativos. No entanto, bromo e iodo, de que são substituintes retiradores fracos de elétrons, produziu compostos ativos mais potentes que o derivado nitro. Isto mostra que a atividade não pode ser explicada apenas pelo efeito do substituinte na reatividade do aril. Considerando-se que as ariloxitiossemicarbazonas que contém halogênios, bifenil ou fenóxi exibiram atividade anti-*T. cruzi* mais elevada, as propriedades hidrofóbicas, o volume efetivo e a polarizabilidade (no caso de halogênios) são possíveis fatores envolvidos na atividade observada (HERNANDES *et al.*, 2010). A limitação desta regra geral é o derivado acetamida, que foi um composto altamente potente e não partilha de tais propriedades.

Quanto ao mecanismo de ação, a literatura afirma que tiossemicarbazonas inibem a principal protease tripanossomal, a cruzaina. Além disso, alguns estudos sugerem que esta classe de compostos também inibe tripanotona redutase (PORCAL *et al.*, 2008). Aqui, observa-se que apesar do fato destes compostos terem mantido a atividade anti-*T. cruzi*, não foi observada nenhuma inibição da cruzaina. Isto indica que, em primeiro lugar, a restrição conformacional empregada para os compostos concebidos é deletéria para a afinidade entre a tiossemicarbazona e a cruzaina. Em segundo lugar, isso indica que um outro mecanismo de ação deve estar envolvido. Seria interessante realizar mais estudos farmacológicos com o objetivo de identificar o mecanismo de ação dessa classe de compostos.

# **3 - SEÇÃO EXPERIMENTAL**

### 3.1 MATERIAL E MÉTODOS

---

A maioria dos produtos químicos foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Merck (Berlin, Germany) ou Alfa-Aesar (Massachusetts, USA).

#### 3.1.1 CROMATOGRAFIAS

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em folhas de alumínio pré-revestidas de Sílica Gel 60 (F254, Merck, Alemanha) de 0,25 mm de espessura. A leitura das mesmas foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 254 nm.

#### 3.1.2 PONTOS DE FUSÃO

Os pontos de fusão foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover e os valores não foram posteriormente corrigidos.

#### 3.1.3 ESPECTROSCOPIAS DE IV, RMN $^1\text{H}$ E RMN $^{13}\text{C}$

Os espectros de IV foram obtidos em espectrofotômetro BRUKER IFS-66, em discos de KBr.

RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foram registrados em um espectrofotômetro UnityPlus 400 MHz ou Bruker AMX-300 MHz, usando DMSO-*d*<sub>6</sub> como solvente e trimetilsilano (TMS) como padrão interno. Padrões de desdobramento são designados como se segue: s, singlete; d, dublete; t, tripleto; m, multiplete. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram reportados em ppm.

Os espectros de massa de alta resolução por ionização por electrospray (HRESIMS) foram adquiridos em um nanoUPLC-Xevo G2 Tof (Waters) no modo de ionização positivo.

### 3.1.4 EQUIPAMENTOS

- Bomba de vácuo TECNAL TE 058;
- Câmara de Neubauer;
- Evaporador rotativo FISATON 802;
- Estufa FANEM 315/3;
- Espectrofotômetro BIORAD 3550;
- Balança semi-analítica BEL MARC 500 C;
- Placas de 96 poços;
- Balança analítica;
- Sinergy 2 (Biotek);
- Espátulas e pinças metálicas;
- Capela com exaustão;
- Freezer;
- Vidraria geral;
- Dessecador;
- Placas de agitação e aquecimento;
- FISATON 752<sup>a</sup>;
- Contador Beta de Cintilação;
- Filtros de 340nm e 440nm.

### 3.1.5 REAGENTES E SOLVENTES

- Acetato de etila;
- Acetona;
- Água destilada;
- DMSO-*d*<sub>6</sub>;
- Fenóis substituídos;
- 3-Cloro-2-Butanona;
- Tiossemicarbazida;
- Carbonato de potássio;
- Éter Dietílico;
- Iodeto de potássio;
- Etanol;
- Metanol;
- Ciclohexano;
- Toluol;
- Metil etil cetona;
- Hexano.
- Dimetil-sulfóxido (DMSO);
- Timidina tritiada;
- Meio de cultura RPMI 1640 com 10% de FBS e 50µg/mL de gentamicina;
- Acetato de sódio à 0,1M;
- *p*-Mercaptoetanol;
- Células LLC-MK2 infectadas;
- Ácido clorídrico concentrado;
- Nifurtimox;
- Benznidazol;
- Triton X-100;
- Cruzaína;
- Esplenócitos de ratos BALB/c;
- Epimastigotas (Dm28c);
- Tripomastigotas metacíclicas.

## 3.2 PARTE QUÍMICA

---

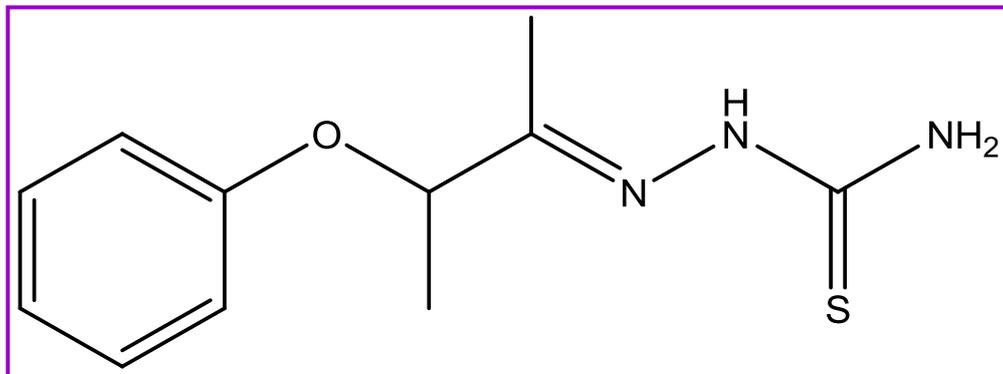
### 3.2.1 SÍNTESE

**Síntese de  $\beta$ -cetoéteres 7a–x. Exemplo para 3-fenoxibutano-2-ona 7a:** em um balão de fundo redondo de 100 ml, foi dissolvido (5,0 g, 53 mmol) de fenol (**5a**) em 30 mL de butanona sob agitação constante e à temperatura ambiente.  $K_2CO_3$  (11 g, 80 mmol) e KI (0,8 g, 5 mmol) foram adicionados à mistura como catalisadores, seguindo-se a adição de 3-cloro-2-butanona (6, 5,6 g, 53 mmol). A reação foi então mantida sob agitação durante 12 h. Após este tempo o precipitado foi removido sob filtração e lavado com acetona. Posteriormente a acetona foi completamente eliminada da fase orgânica. Foi adicionado éter dietílico à fase orgânica e esta foi lavada com água, e com a solução de KOH saturado até a completa remoção de fenol que não reagiu. Por fim, a fase orgânica foi seca em  $Na_2SO_4$  anidro e foi concentrada por meio de secagem à vácuo. O óleo resultante foi utilizado no passo seguinte sem purificação adicional.

**Síntese de ariloxitiossemicarbazonas 9a-x. Exemplo para o composto 9a:** em um balão de fundo redondo, 7,5 g (46 mmol) de  $\beta$ -cetoéter (**7a**) foi dissolvido em 15 mL de EtOH, seguindo-se a adição de duas gotas de HCl. O balão foi colocado num banho de ultrassom (40 kHz, 180 W) e sob sonicação, 4,2 g (46 mmol) de tiossemicarbazida (**8**) foram adicionados em porções à reação. Após 2 h, a mistura foi arrefecida a 0 ° C e o precipitado foi filtrado num funil de Buchner com um filtro de disco sinterizado, lavado com água fria, etanol e, em seguida, secou-se sobre  $SiO_2$ . O pó resultante foi recristalizado em EtOH para se obter 9,7 g (89%) de cristais incolores.

### 3.2.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

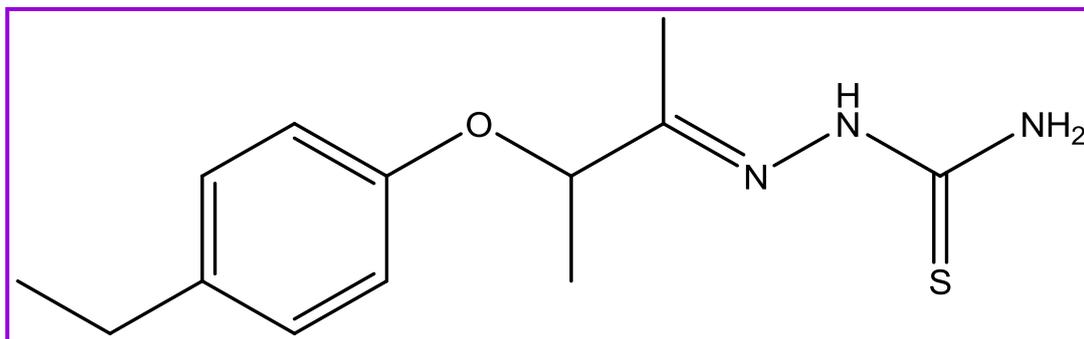
#### 2-(3-Fenoxi-2-butanilideno)tiossemicarbazida (**9a**).



A cristalização em etanol levou à obtenção de cristais brancos de **9a** adequados para a análise de raio-X.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{15}N_3OS$ .
- Parâmetros de Unidade Celular:  $a$  7.4240(4) Å,  $b$  7.8120(3) Å,  $c$  11.2780(5) Å; triclinic,  $P\bar{1}$ .
- Rendimento: 89 %.
- PF (°C): 160–162.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.46.
- IV (KBr): 3390 (NH), 3228 (NH<sub>2</sub>), 1598 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.41 (d, 3H,  $J$  6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.97 (q, 1H,  $J$  6 Hz, CHO), 6.89 (d, 2H,  $J$  6 Hz, ArH), 6.97 (d, 2H,  $J$  6 Hz, ArH), 7.25 (t, 1H,  $J$  8.1 Hz, ArH), 7.83 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.24 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.18 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.7 (CH<sub>3</sub>), 19.5 (CH<sub>3</sub>), 76.7 (CH), 116.2 (Ar), 121.6 (CH, Ar), 130.1 (Ar), 152.5 (C=N), 157.9 (C–O), 179.8 (C=S).
- HRESIMS: 238.0575 [M+H]<sup>+</sup>.

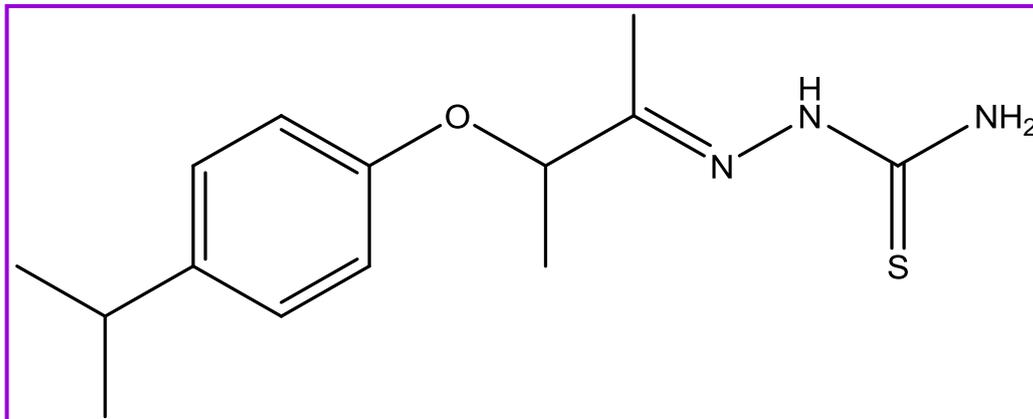
**2-(3-(4-Etilfenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9b).**



Através da recristalização em etanol foram obtidos cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{13}H_{19}N_3OS$ .
- Rendimento: 72 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 87–89.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.65.
- IV (KBr): 3491 (NH), 3192 ( $NH_2$ ), 1571 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.13 (t, 3H, *J* 7.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.40 (d, 3H, *J* 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.51 (q, 2H, *J* 7.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.92 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CH), 6.88 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, ArH), 7.07 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, ArH), 7.82 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.23 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.16 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  10.9 (CH<sub>3</sub>), 15.7 (CH<sub>3</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>), 27.2 (CH<sub>2</sub>), 76.2 (CH), 115.5 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 136.2 (Ar), 152.0 (C–O), 155.2 (C=N), 179.1 (C=S). HRESIMS: 266.1264 [M]<sup>+</sup>.

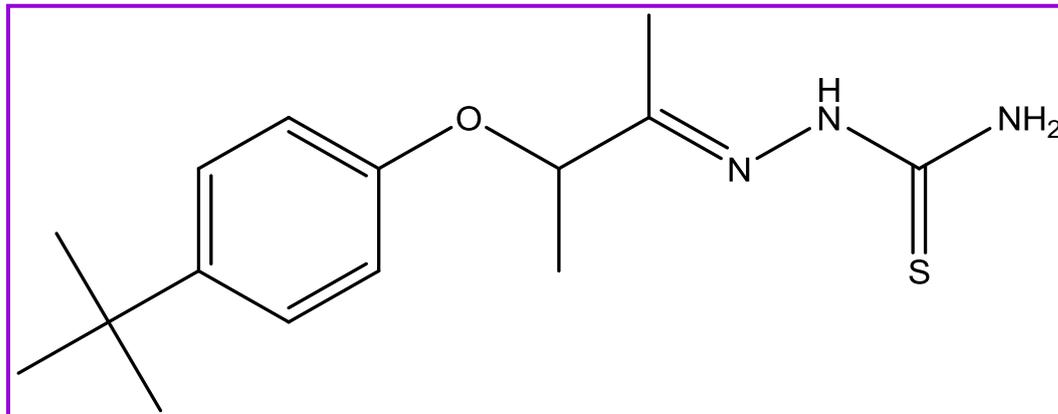
2-(3-(4-Isopropilfenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9c).



Através da recristalização em etanol foram obtidos cristais amarelados.

- Fórmula Molecular: C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>OS.
- Rendimento: 55 %.
- PF (°C): 106–108.
- R<sub>f</sub> (6:4 ciclohexano/acetona): 0.62
- IV (KBr): 3492 (NH), 3193 (NH<sub>2</sub>), 1571 (C=N) cm<sup>-1</sup>.
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.14 (d, 6H, *J* 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.39 (d, 3H, *J* 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.74-2.84 (m, 1H, CH), 4.91 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CHO), 6.88 (d, 2H, *J* 8.8 Hz, ArH), 7.10 (d, 2H, *J* 8.8 Hz, ArH), 7.81 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.23 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.16 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.9 (CH<sub>3</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>), 24.0 (CH<sub>3</sub>), 24.0 (CH<sub>3</sub>), 32.5 (CH), 76.1 (CHO), 115.3 (CH, Ar), 127.1 (CH, Ar), 140.7 (CH, Ar), 152.1 (C–O), 155.3 (C=N), 179.1 (C=S).
- HRESIMS: 280.1516 [M]<sup>+</sup>.

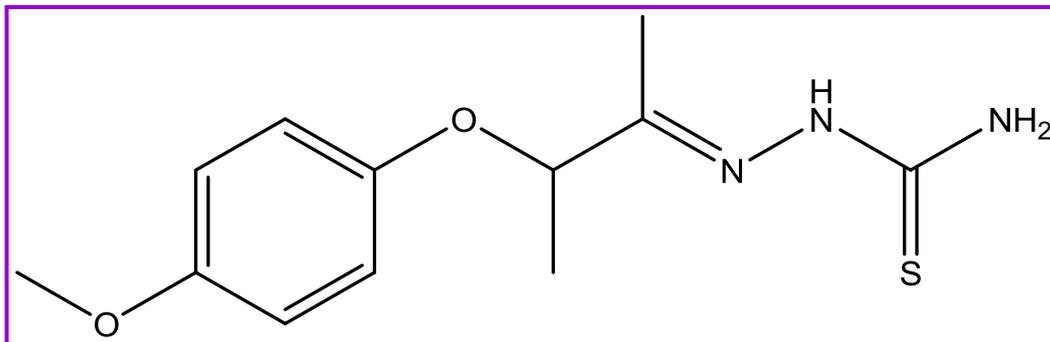
**2-(3-(4-*Tert*butilfenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9d).**



Através da recristalização em etanol obteve-se cristais incolores.

- Fórmula Molecular: C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>OS.
- Rendimento: 71 %.
- PF (°C): 69–71.
- R<sub>f</sub> (6:4 ciclohexano/acetona): 0.56
- IV (KBr): 3408 (NH), 3254 e 3156 (NH<sub>2</sub>), 1603 (C=N), cm<sup>-1</sup>.
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.23 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.40 (d, 3H, *J* 6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.92 (q, 1H, *J* 6 Hz, CH), 6.89 (d, 2H, *J* 9 Hz, ArH), 7.25 (d, 2H, *J* 9 Hz, ArH), 7.83 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.25 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.17 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 16.4 (CH<sub>3</sub>), 24.3 (CH<sub>3</sub>), 36.7 (CH<sub>3</sub>), 38.5 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 81.5 (CH), 120.4 (CH, Ar), 131.5 (CH, Ar), 148.5 (C, Ar), 157.3 (C–O), 160.4 (C=N), 183.90 (C=S).
- HRESIMS: 293.9266 [M]<sup>+</sup>.

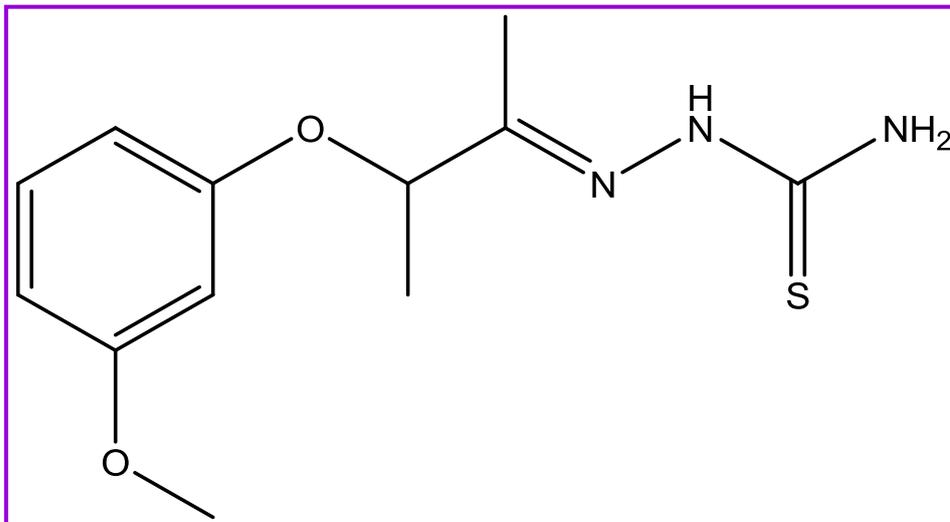
**2-(3-(4-Metoxifenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9e).**



Após recristalização em etanol obteve-se cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{12}H_{17}N_3O_2S$ .
- Rendimento: 92 %.
- PF (°C): 120–122.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.50
- IV (KBr): 3393 (NH), 3224 e 3149 ( $NH_2$ ), 1600 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.38 (d, 3H, *J* 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.85 (q, 1H, *J* 6.6 Hz, CH), 6.80 (d, 2H, *J* 9 Hz, ArH), 6.90 (d, 2H, *J* 9 Hz, ArH), 7.79 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.23 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.16 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  10.9 (CH<sub>3</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 76.7 (CHO), 114.4 (CH, Ar), 116.7 (CH, Ar), 151.0 (C–O), 152.1 (C–O), 153.5 (C=N), 179.1 (C=S).
- HRESIMS: 268.0632 [M+H]<sup>+</sup>.

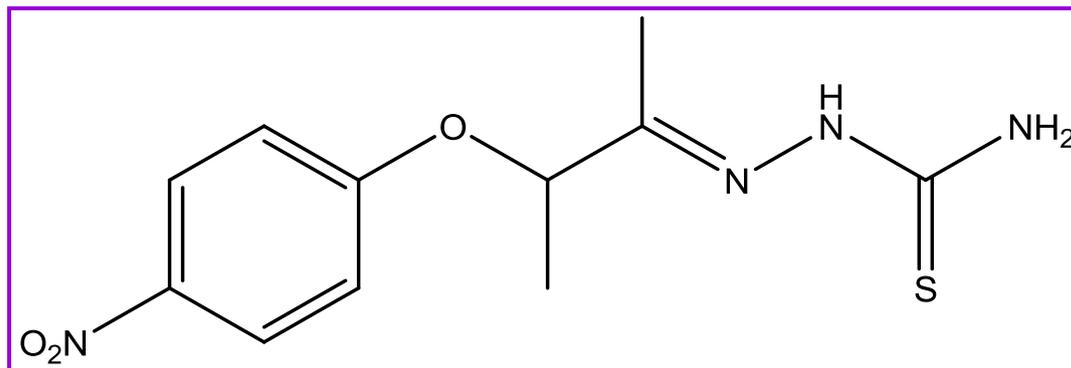
**2-(3-(3-Metoxifenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9f).**



Após uma recristalização em etanol obteve-se cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{12}H_{17}N_3O_2S$ .
- Rendimento: 52 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 110–112.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.44.
- IV (KBr): 3403 (NH), 3255 ( $NH_2$ ), 1596 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.40 (d, 3H,  $J$  6.6 Hz,  $CH_3$ ), 1.82 (s, 3H,  $CH_3$ ), 3.69 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 4.94 (q, 1H,  $J$  6.6 Hz, CH), 6.48–6.56 (m, 3H, ArH), 7.14 (t, 1H,  $J$  7.8 Hz, ArH), 7.82 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.20 (s, 1H,  $NH_2$ ), 10.16 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.9 ( $CH_3$ ), 18.7 ( $CH_3$ ), 54.9 ( $OCH_3$ ), 76.2 (CH), 101.6 (CH, Ar), 106.6 (CH, Ar), 107.7 (CH, Ar), 129.9 (CH, Ar), 151.7 (C=N), 158.4 (C–O), 160.3 (C–O), 179.16 (C=S).
- HRESIMS: 268.1216  $[M+H]^+$ .

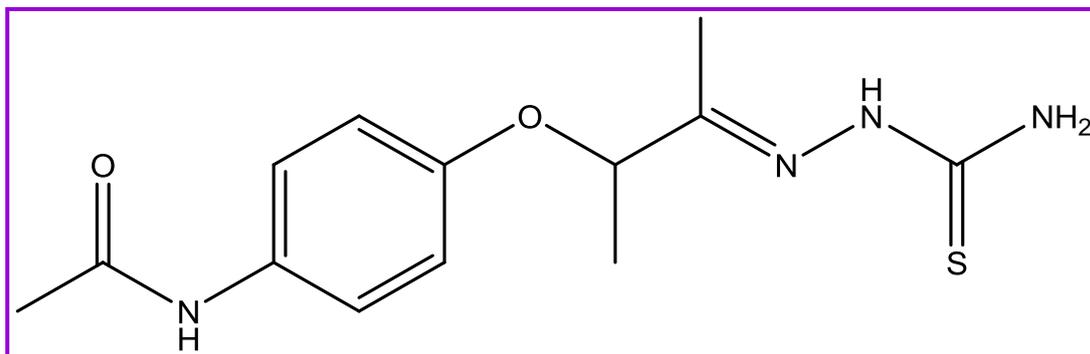
**2-(3-(4-Nitrofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9g).**



Após a recristalização em etanol obteve-se cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{14}N_4O_3S$ .
- Rendimento: 87 %.
- PF (°C): 160–162.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.32.
- IR (KBr): 3453 (NH), 3291 (NH<sub>2</sub>), 1589 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.47 (d, 3H, *J* 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.15 (q, 1H, *J* 6.6 Hz, CH), 7.20 (d, 2H, *J* 9.3 Hz, ArH), 7.82 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.16 (d, 2H, *J* 9.3 Hz, ArH), 8.26 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.21 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.1 (CH<sub>3</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>), 77.2 (CH), 116.0 (CH, Ar), 125.7 (CH, Ar), 141.0 (C–N, Ar), 150.2 (C=N), 162.6 (C–O), 179.3 (C=S).
- HRESIMS: 283.0980 [M+H]<sup>+</sup>.

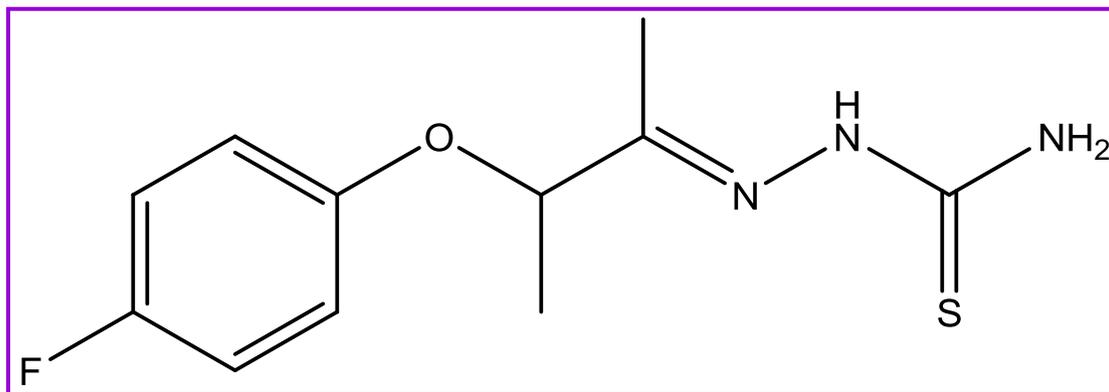
***N*-(4-((3-(tiosemicarbazida)-2-butanilideno)oxi)fenil)acetamida (9h).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais amarelados.

- Fórmula Molecular: C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S.
- Rendimento: 89 %.
- PF (°C): 177–179.
- R<sub>f</sub> (6:4 ciclohexano/acetona): 0.59.
- IV (KBr): 3406 (NH), 3270 (NH<sub>2</sub>), 1658 (C=N) cm<sup>-1</sup>.
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.39 (d, 3H, *J* 6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.89 (q, 1H, *J* 6.3 Hz, CH), 6.90 (d, 2H, *J* 8.7 Hz, ArH), 7.43 (d, 2H, *J* 8.7 Hz, ArH), 7.78 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.19 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 9.77 (s, 1H, NHCO), 10.11 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.0 (CH<sub>3</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>), 77.1 (CH), 116.5 (CH, Ar), 117.7 (CH, Ar), 122.9 (Ar), 130.9 (CH, Ar), 131.55 (Ar), 150.5 (C=N), 156.7 (C–O), 179.3 (S=C).
- HRESIMS: 295.0880 [M+H]<sup>+</sup>.

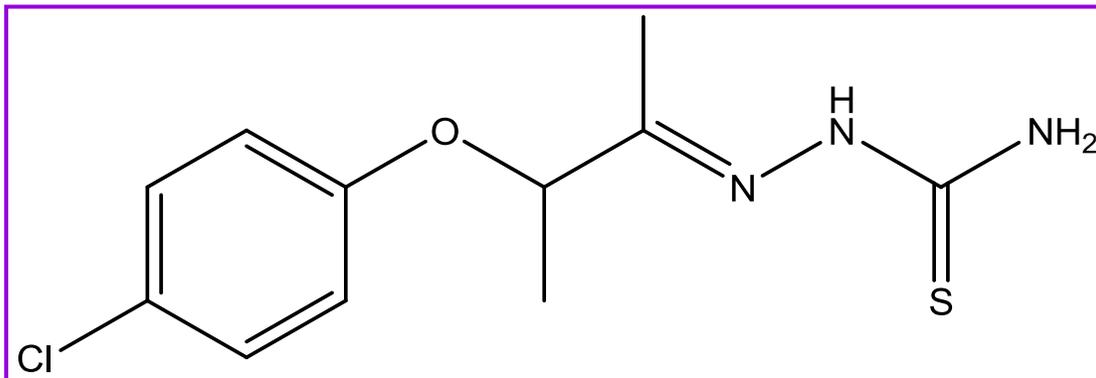
**2-(3-(4-Fluorofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9i).**



Após a recristalização em etanol obteve-se cristais incolores.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{14}N_3OS$ .
- Rendimento: 83 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 148–150.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.45.
- IV (KBr): 3427 (NH), 3265 e 3169 ( $NH_2$ ), 1605 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .
- RMN $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1.40 (d, 3H,  $J$  6.8 Hz,  $CH_3$ ), 1.82 (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.91 (q, 1H,  $J$  6.4 Hz, CHO), 6.97–7.10 (m, 4H, ArH), 7.81 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.24 (s, 1H,  $NH_2$ ), 10.17 (s, 1H, NH).
- RMN $^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ 10.9 ( $CH_3$ ), 18.7 ( $CH_3$ ), 76.8 (CH), 115.6 (CH, Ar), 115.9 (CH, Ar), 116.9 (CH, Ar), 117.0 (CH, Ar), 151.5 (C–O), 153.5 (C=N), 155.4 (C–F, Ar), 157.8 (C–F, Ar), 179.1 (C=S).
- HRESIMS: 256.0987  $[M+H]^+$ .

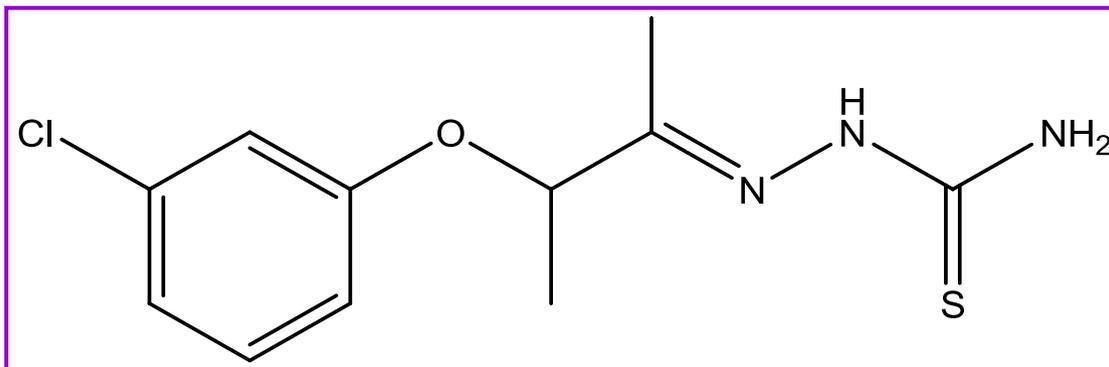
**2-(3-(4-Clorofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9j).**



Após recristalização em etanol obteve-se cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{14}ClN_3OS$ .
- Rendimento: 59 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 119–121.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.50.
- IV (KBr): 3400 (NH), 3353 e 3246 ( $NH_2$ ), 1608 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.42 (d, 3H,  $J$  6.6 Hz,  $CH_3$ ), 1.82 (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.96 (q, 1H,  $J$  6.6 Hz, CH), 7.01 (d, 2H,  $J$  6.6 Hz, ArH), 7.29 (d, 2H,  $J$  6.6 Hz, ArH), 7.85 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.27 (s, 1H,  $NH_2$ ), 10.21 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.0 ( $CH_3$ ), 18.6 ( $CH_3$ ), 76.5 (CH), 117.4 (CH, Ar), 124.6 (Ar), 129.2 (CH, Ar), 151.2 ( $C=N$ ), 156.0 (C–O, Ar), 179.1 (C=S).
- HRESIMS: 272.0127  $[M]^+$ .

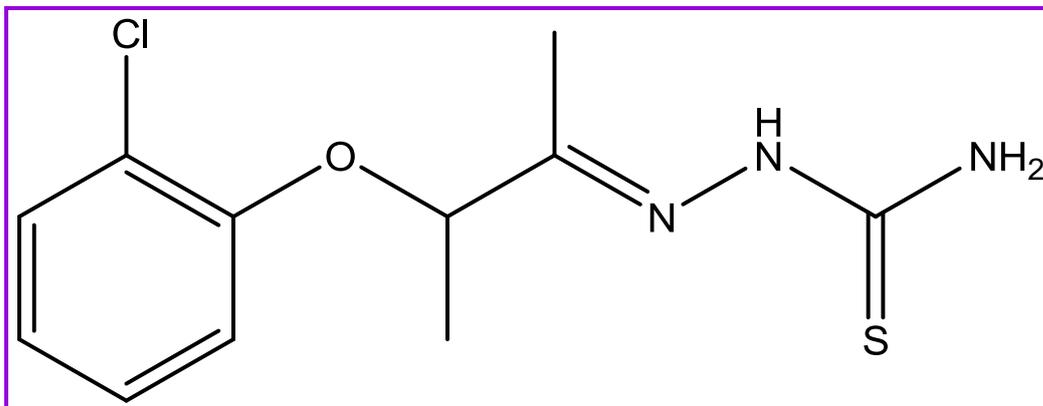
**2-(3-(3-Clorofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9k).**



Após recristalização em etanol obteve-se cristais marrons.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{14}ClN_3OS$ .
- Rendimento: 89 %.
- PF (°C): 96–98.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.37.
- IV (KBr): 3323 (NH), 3256 e 3141 (NH<sub>2</sub>), 1603 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.41 (d, 3H, *J* 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.00 (q, 1H, *J* 6.6 Hz, CH), 6.94-6.99 (m, 2H, Ar), 7.04-7.06 (m, 1H, Ar), 7.27 (t, 1H, *J* 8.1 Hz, Ar), 7.84 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.23 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.18 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.0 (CH<sub>3</sub>), 18.5 (CH<sub>3</sub>), 76.6 (CH), 114.5 (CH, Ar), 115.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 130.8 (CH, Ar), 133.6 (C–Cl), 150.9 (C=N), 158.1 (C–O, Ar), 179.2 (C=S).
- HRESIMS: 272.0702 [M+H]<sup>+</sup>.

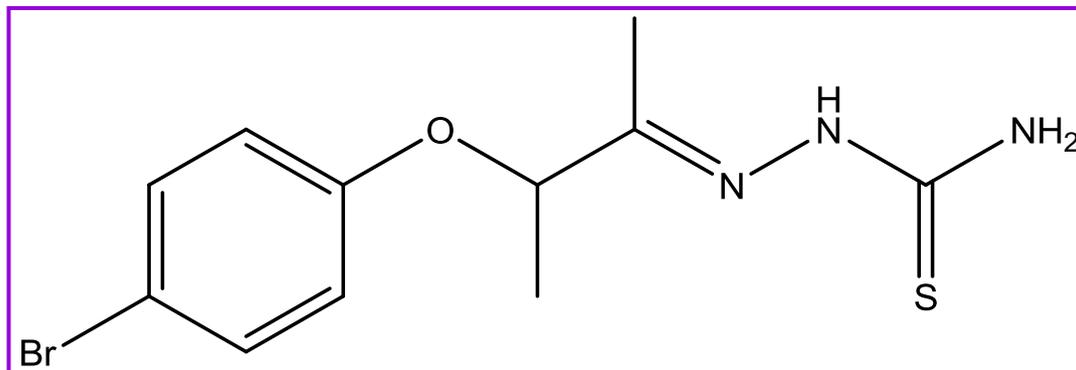
**2-(3-(2-Clorofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9I).**



Após recristalização em etanol obteve-se cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{14}ClN_3OS$ .
- Rendimento: 69 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 139–141.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.55.
- IV (KBr): 3410 (NH), 3240 (NH<sub>2</sub>), 1595 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.46 (d, 3H, *J* 6.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.06 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CH), 6.92-6.96 (m, 1H, ArH), 7.21-7.26 (m, 2H, ArH), 7.41 (d, *J* 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.822 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.256 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.210 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  10.9 (CH<sub>3</sub>), 18.5 (CH<sub>3</sub>), 77.3 (CH), 115.8 (CH, Ar), 121.9 (CH, Ar), 122.0 (Ar), 128.1 (CH, Ar), 130.0 (CH, Ar), 150.8 (C–O, Ar), 152.5 (C=N), 179.2 (C=S).
- HRESIMS: 272.0702 [M+H]<sup>+</sup>.

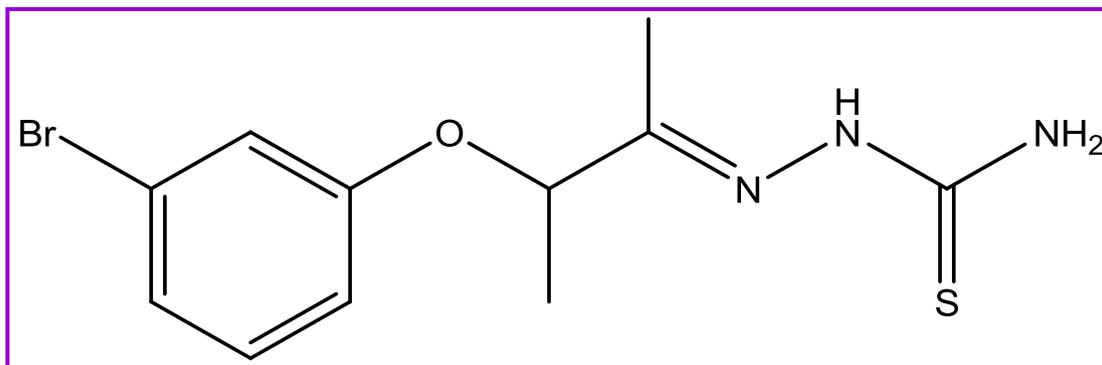
**2-(3-(4-Bromofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9m).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{14}BrN_3OS$ .
- Rendimento: 70 %.
- PF (°C): 141–143.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.50.
- IR (KBr): 3393 (NH), 3224 e 3149 (NH<sub>2</sub>), 1600 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.41 (d, 3H, *J* 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.95 (q, 1H, *J* 6.6 Hz, CH), 6.95 (d, 1H, *J* 9 Hz, ArH), 7.40 (d, 1H, *J* 9 Hz, ArH), 7.83 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.26 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.20 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.0 (CH<sub>3</sub>), 18.6 (CH<sub>3</sub>), 76.5 (CH), 112.44 (Ar), 117.9 (CH, Ar), 132.1 (CH, Ar), 151.2 (C=N), 156.5 (C–O), 179.1 (C=S).
- HRESIMS: 315.9171 [M+H]<sup>+</sup>.

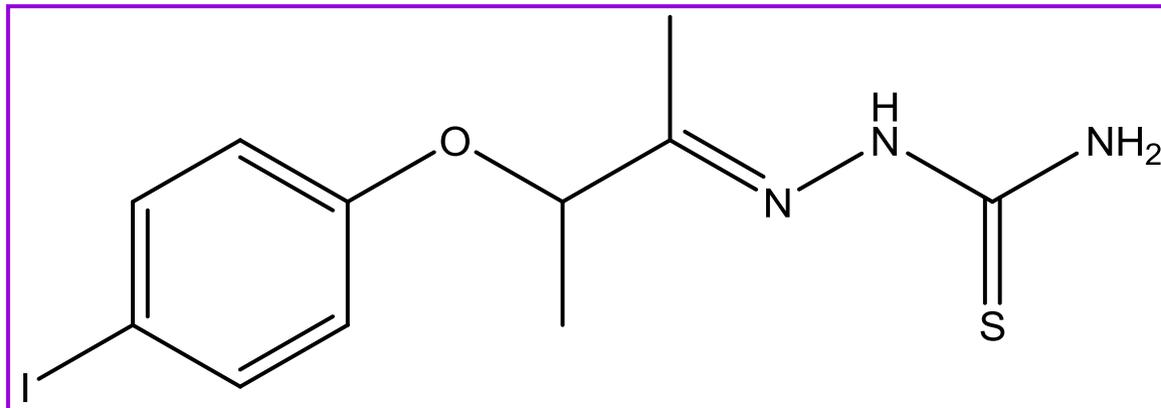
**2-(3-(3-Bromofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9n).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{14}BrN_3OS$ .
- Rendimento: 36%.
- PF (°C): 121–123.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.46.
- IV (KBr): 3393 (NH), 3224 e 3149 (NH<sub>2</sub>), 1600 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.41 (d, 3H, *J* 6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.00 (q, 1H, *J* 6.3 Hz, CH), 7.00 (d, 1H, *J* 8.4 Hz, ArH), 7.11 (d, 1H, *J* 8.4 Hz, ArH), 7.18 (s, 1H, ArH), 7.21 (t, 1H, *J* 8.1 Hz, ArH), 7.86 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.27 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.22 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.0 (CH<sub>3</sub>), 18.5 (CH<sub>3</sub>), 76.6 (CH), 114.9 (CH, Ar), 118.6 (CH, Ar), 121.9 (Ar), 123.9 (CH, Ar), 131.2 (CH, Ar), 150.9 (C=N), 158.2 (C–O), 179.2 (C=S).
- HRESIMS: 315.962 [M+H]<sup>+</sup>.

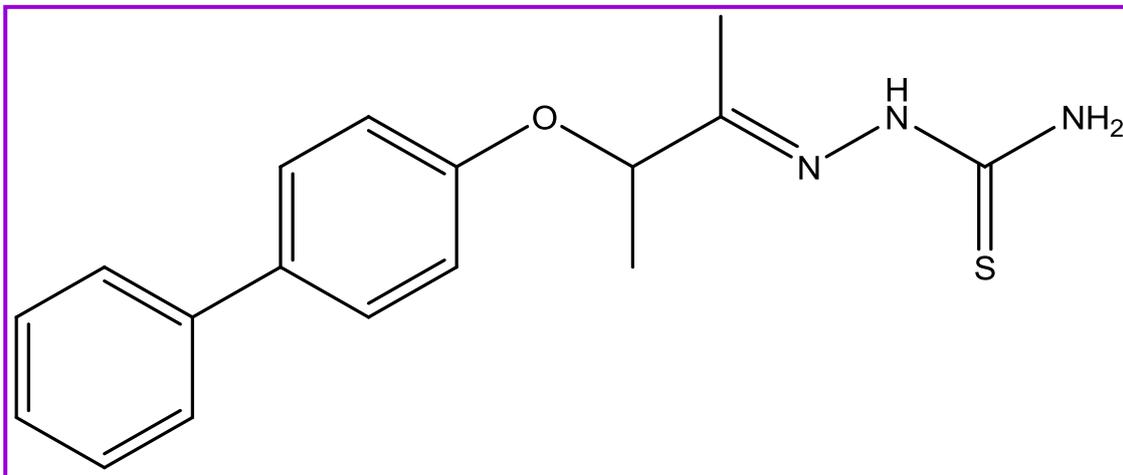
**2-(3-(4-Iodofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9o).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{14}IN_3OS$
- Rendimento: 83 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 154–156.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.51.
- IV (KBr): 3347 (NH), 3243 ( $NH_2$ ), 1579 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.41 (d, 3H,  $J$  6.4 Hz,  $CH_3$ ), 1.81 (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.94 (q, 1H,  $J$  6.4 Hz, CHO), 6.83 (d, 2H,  $J$  8.4 Hz, CH, ArH), 7.55 (d, 2H,  $J$  8.4 Hz, 2CH, ArH), 7.81 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.24 (s, 1H,  $NH_2$ ), 10.18 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.0 ( $CH_3$ ), 18.6 ( $CH_3$ ), 76.3 (CH), 83.8 (Ar), 118.4 (CH, Ar), 137.9 (CH, Ar), 151.2 ( $C=N$ ), 157.1 (C–O), 179.1 (C=S).
- HRESIMS: 364.0118  $[M]^+$ .

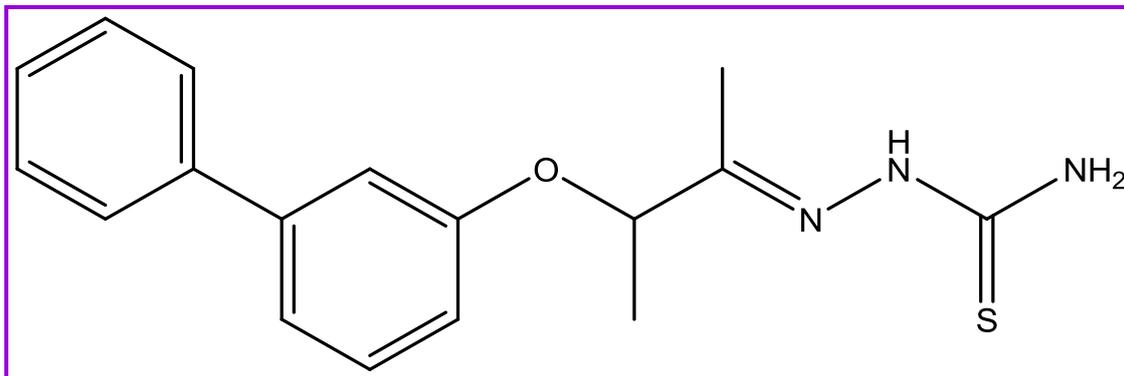
**2-(3-(4-Fenilfenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9p).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais brancos.

- Fórmula Molecular:  $C_{17}H_{19}N_3OS$ .
- Rendimento: 91 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 164–166.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.44.
- IV (KBr): 3404 (NH), 3236 (NH<sub>2</sub>), 1592 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.46 (d, 3H, *J* 6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.04 (q, 1H, *J* 6 Hz, CH), 7.09 (d, 2H, *J* 9 Hz, ArH), 7.20–7.47 (m, 1H, ArH), 7.49–7.73 (m, 2H, ArH), 7.78–7.99 (m, 4H, ArH), 7.89 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.30 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.24 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.7 (CH<sub>3</sub>), 19.5 (CH<sub>3</sub>), 81.7 (CH), 116.7 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 129.1 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 133.6 (CH, Ar), 140.4 (C, Ar), 152.4 (C=N), 157.6 (C–O), 179.8 (C=S).
- HRESIMS: 314.1336 [M+H]<sup>+</sup>.

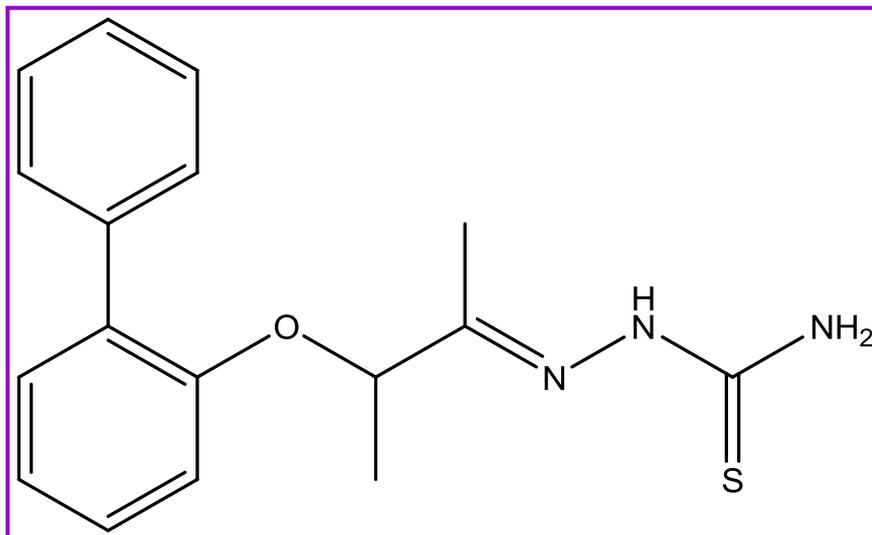
**2-(3-(3-Fenilfenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9q).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais brancos.

- Fórmula Molecular: C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>OS.
- Rendimento: 79 %.
- PF (°C): 138–140.
- R<sub>f</sub> (6:4 ciclohexano/acetona): 0.39.
- IV (KBr): 3437 (NH), 3324 (NH<sub>2</sub>), 1586 (C=N) cm<sup>-1</sup>.
- RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.45 (d, 3H, *J* 8.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.09 (q, 1H, *J* 8.8 Hz, CH), 6.96 (d, 1H, ArH), 7.20–7.26 (m, 2H, ArH), 7.31–7.37 (m, 1H, ArH), 7.45 (t, 2H, ArH), 7.62 (d, 2H, ArH), 7.90 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.26 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.20 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.0 (CH<sub>3</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>), 76.4 (CH), 113.9 (CH, Ar), 114.8 (CH, Ar), 119.4 (CH, Ar), 126.7 (2CH, Ar), 127.6 (CH, Ar), 128.9 (2CH, Ar), 130.0 (CH, Ar), 139.8 (C, Ar), 141.6 (C, Ar), 151.7 (C=N), 157.8 (C–O), 179.3 (C=S).
- HRESIMS: 314.1422 [M+H]<sup>+</sup>.

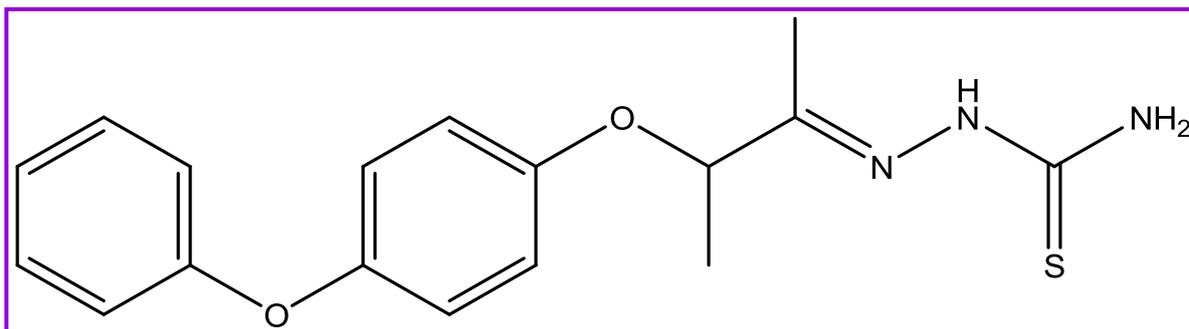
**2-(3-(2-Fenilfenoxi)butano-2-ilideno)tiossemicarbazida (9r).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais brancos.

- Fórmula Molecular:  $C_{17}H_{19}N_3OS$ .
- Rendimento: 83 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 179–181.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.50.
- IV (KBr): 3416 (NH), 3226 e 3156 ( $NH_2$ ), 1596 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.32 (d, 3H,  $J$  6.0 Hz,  $CH_3$ ), 1.76 (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.97 (q, 1H,  $J$  6.4 Hz, CH), 7.02 (t, 1H,  $J$  7.6 Hz, ArH), 7.14 (d, 2H,  $J$  8.4 Hz, ArH), 7.25-7.34 (m, 3H, ArH), 7.41 (t, 2H,  $J$  7.2 Hz, ArH), 7.49 (d, 2H,  $J$  7.2 Hz, ArH), 7.73 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.22 (s, 1H,  $NH_2$ ), 10.16 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C e DEPT (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.7 ( $CH_3$ ), 19.0 ( $CH_3$ ), 77.2 (CH), 114.8 (CH, Ar), 121.8 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 129.7 (CH, Ar), 130.9 (C, Ar), 131.1 (CH, Ar), 138.6 (C, Ar), 152.2 (C–O), 154.4 (C=N), 179.6 (C=S).
- HRESIMS: 314.1336  $[M+H]^+$ .

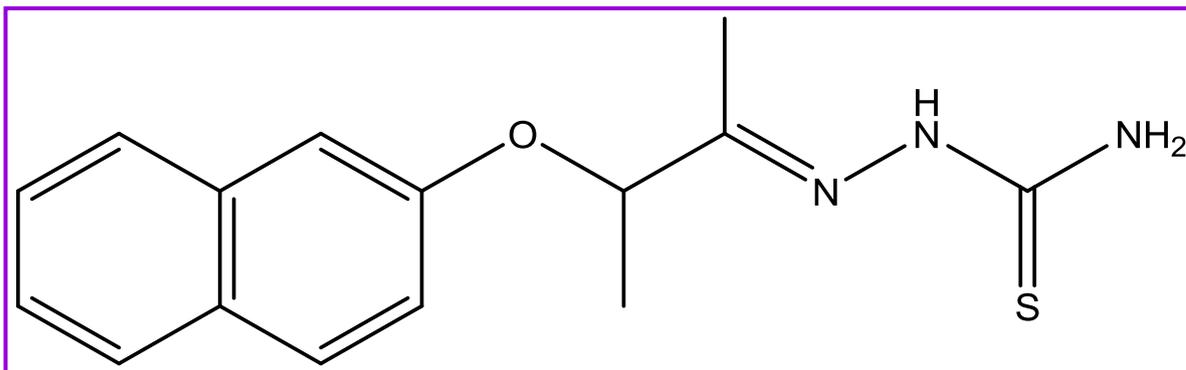
**2-(3-(4-Fenoxifenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9s).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais amarelos.

- Fórmula Molecular:  $C_{17}H_{19}N_3O_2S$
- Rendimento: 71 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 111–112.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.53.
- IV (KBr): 3423 (NH), 3238 (N–H<sub>2</sub>), 1593 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.42 (d, 3H, *J* 6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.93 (q, 1H, *J* 6 Hz, CH), 6.90–6.95 (m, 4H, ArH), 7.00–7.05 (m, 3H, ArH), 7.32–7.38 (m, 2H, ArH), 7.81 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.26 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.20 (s, 1H, NH).
- RMN <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.8 (CH<sub>3</sub>), 19.5 (CH<sub>3</sub>), 77.3 (CH), 117.6 (CH, Ar), 118.2 (CH, Ar), 121.0 (CH, Ar), 123.4 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 133.6 (CH, Ar), 150.5 (C–O, Ar), 152.5 (C=N), 154.2 (C–O, Ar), 158.3 (C–O), 179.8 (C=S).
- HRESIMS: 330.0697 [M+H]<sup>+</sup>.

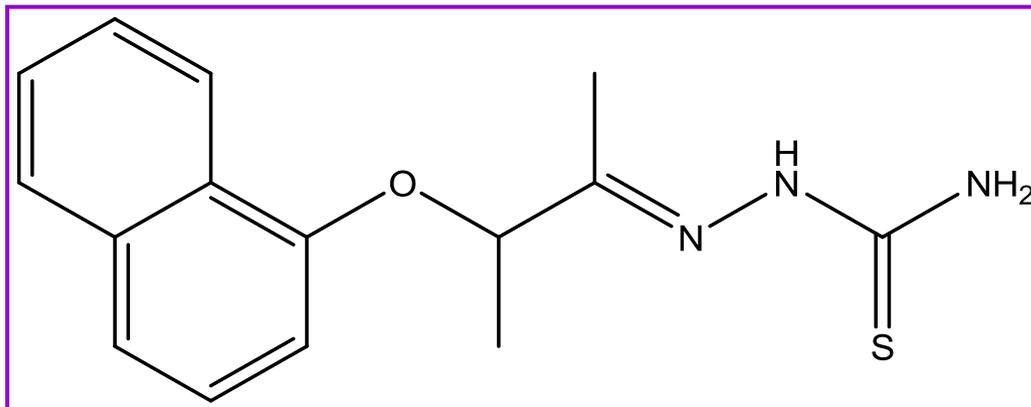
**2-(3-(1-Naftaleniloxi)-2-butanilidene)tiossemicarbazida (9t).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais brancos.

- Fórmula Molecular:  $C_{15}H_{17}N_3OS$
- Rendimento: 98 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 158–160.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.49.
- IV (KBr): 3408 (NH), 3228 ( $NH_2$ ), 1597 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.56 (d, 3H,  $J$  6.8 Hz,  $CH_3$ ), 1.86 (s, 3H,  $CH_3$ ), 5.18 (q, 1H,  $J$  6.4 Hz, CH), 7.05 (d, 1H,  $J$  8 Hz, ArH), 7.36 (t, 1H,  $J$  7.6 Hz, ArH), 7.45–7.53 (m, 3H, ArH), 7.84–7.86 (m, 1H, ArH), 7.88 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.19–8.22 (m, 1H, ArH), 8.26 (s, 1H,  $NH_2$ ), 10.20 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.4 ( $CH_3$ ), 18.3 ( $CH_3$ ), 76.0 (CH), 106.6 (CH, Ar), 119.8 (CH, Ar), 121.0 (CH, Ar), 124.7 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 125.6 (CH, Ar), 125.9 (CH, Ar), 127.0 (CH, Ar), 133.6 (CH, Ar), 151.3 (C=N), 152.0 (C–O, Ar), 179.7 (C=S).
- HRESIMS: 288.1283 [M+H]<sup>+</sup>.

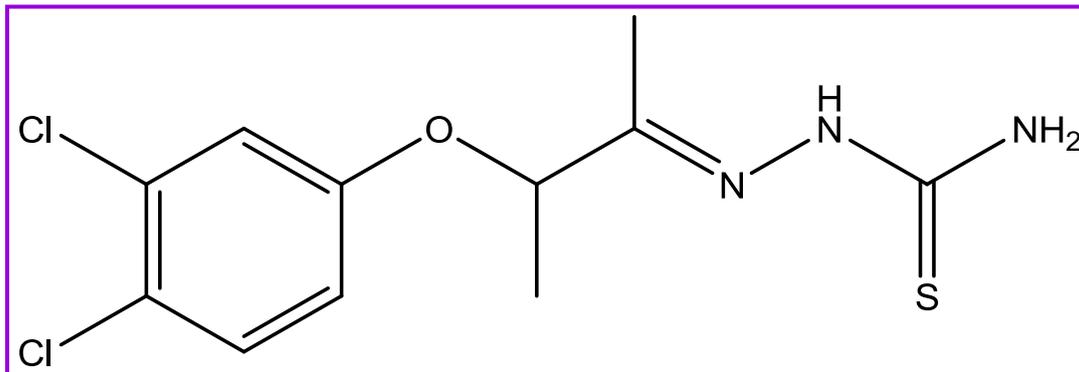
**2-(3-(2-Naftaleniloxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9u).**



Após a recristalização em etanol foram obtidos cristais brancos.

- Fórmula Molecular:  $C_{15}H_{17}N_3OS$
- Porcentagem: 89 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 150–152.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.51.
- IV (KBr): 3341 (NH), 3270 ( $NH_2$ ), 1614 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.49 (d, 3H, *J* 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.13 (q, 1H, *J* 6.3 Hz, CH), 7.19 (d, 1H, *J* 9.2 Hz, ArH), 7.19 (d, 1H, *J* 9.2 Hz, ArH), 7.33 (t, 1H, *J* 7.6 Hz, ArH), 7.41–7.46 (m, 2H, ArH), 7.74 (d, 1H, *J* 8.4 Hz, ArH), 7.80 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, ArH), 7.98 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.27 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.20 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  10.9 (CH<sub>3</sub>), 18.6 (CH<sub>3</sub>), 76.2 (CH), 108.9 (CH, Ar), 118.9 (CH, Ar), 123.7 (CH, Ar), 126.3 (CH, Ar), 126.7 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 134.0 (CH, Ar), 151.6 ( $C=N$ ), 154.9 (C–O, Ar), 179.2 (C=S).
- HRESIMS: 288.1283 [M+H]<sup>+</sup>.

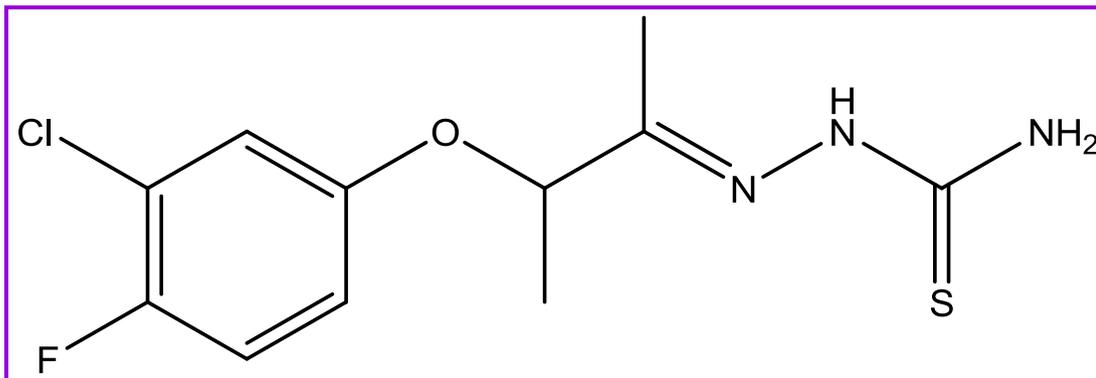
**2-(3-(3,4-Diclorofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9v).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais brancos.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{13}Cl_2N_3OS$
- Rendimento: 74 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 154–156.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.34.
- IV (KBr): 3420 (NH), 3259 e 3155 ( $NH_2$ ), 1593 (C=N)  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.42 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.00 (q, 1H,  $J 6.6$  Hz, CH), 7.00 (dd, 1H,  $J 9.0$  Hz,  $^4J 3.0$  Hz, ArH), 7.27 (d, 1H,  $^4J 3.0$  Hz, ArH), 7.47 (d, 1H,  $J 9.0$  Hz, ArH), 7.85 (s largo, 1H, NH<sub>2</sub>), 8.24 (s largo, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.19 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.0 (CH<sub>3</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>), 77.1 (CH), 116.5 (CH, Ar), 117.7 (CH, Ar), 122.9 (C–Cl, Ar), 130.9 (CH, Ar), 131.5 (Ar), 150.5 (C=N), 156.7 (C–O), 179.3 (C=S).
- HRESIMS: 306.0320 [M+H]<sup>+</sup>.

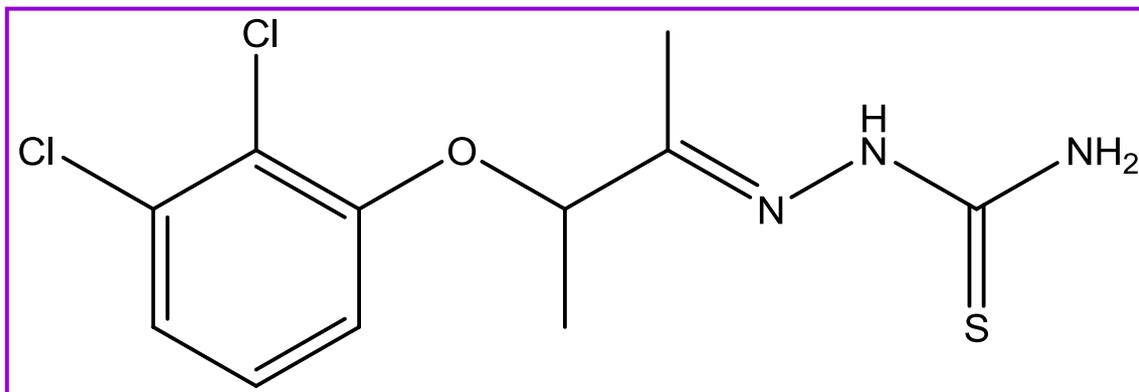
**2-(3-(3-Cloro-4-fluorofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9w).**



Após recristalização em etanol foram obtidos cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{13}ClFN_3OS$
- Rendimento: 91 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 134–136.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0. Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.62.
- IV (KBr): 3423 (NH), 3236 ( $NH_2$ ), 1579 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ 1.41 (d, 3H,  $J$  6.4 Hz,  $CH_3$ ), 1.82 (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.96 (q, 1H,  $J$  6.4 Hz, CH), 6.97-7.01 (m, 1H, ArH), 7.20-7.22 (m, 1H, ArH), 7.28 (t, 1H,  $J$  9.2 Hz, ArH), 7.88 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.26 (s, 1H,  $NH_2$ ), 10.21 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ 11.0 ( $CH_3$ ), 18.5 ( $CH_3$ ), 77.1 (CH), 116.0 (CH, Ar), 117.0 (CH, Ar), 117.4 (CH, Ar), 119.7 (Ar), 150.7 (C-F, Ar), 153.1 (C-O), 153.8 (C=N), 179.2 (C=S).
- HRESIMS: 290.0551  $[M+H]^+$ .

**2-(3-(2,3-Diclorofenoxi)-2-butanilideno)tiossemicarbazida (9x).**



Após a recristalização em etanol obteve-se cristais amarelados.

- Fórmula Molecular:  $C_{11}H_{13}Cl_2N_3OS$
- Rendimento: 55 %.
- PF ( $^{\circ}C$ ): 132–134.
- Rf (6:4 ciclohexano/acetona): 0.50.
- IV (KBr): 3423 (NH), 3236 ( $NH_2$ ), 1507 (C=N),  $cm^{-1}$ .
- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.47 (d, 3H,  $J$  6.0 Hz,  $CH_3$ ), 1.85 (s, 3H,  $CH_3$ ), 5.09 (q, 1H,  $J$  6.0 Hz, CH), 7.18–7.27 (m, 3H, ArH), 7.84 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.28 (s, 1H,  $NH_2$ ), 10.23 (s, 1H, NH).
- RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.9 ( $CH_3$ ), 18.5 ( $CH_3$ ), 78.0 (CH), 114.1 (CH, Ar), 120.6 (CH, Ar), 122.5 (Ar), 128.3 (CH, Ar), 132.3 (Ar), 150.33 (C–O, Ar), 154.0 (C=N), 179.2 (C=S).
- HRESIMS: 306.0235  $[M+H]^+$ .

### 3.3 PARTE BIOLÓGICA

---

**Toxicidade da célula hospedeira:** esplenócitos de ratos BALB/c foram colocados em placas de 96 poços, a um número de células de  $5 \times 10^6$  células/poço em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS e 50 $\mu$ g/mL de gentamicina. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio RPMI-1640 em cinco concentrações diferentes (1,23, 3,70, 11,11, 33,33 e 100 $\mu$ g / mL) e adicionado às respectivas cavidades, em triplicata. A placa foi incubada durante 24h a 37 °C e CO<sub>2</sub> a 5%, contendo 1,0 $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina (Perkin-Elmer, Waltham, MA). A placa foi, em seguida, transferidos para um contador de  $\beta$ -radiação (Multilabel Reader, Finlândia) e a porcentagem de <sup>3</sup>H-timidina foi determinada. A concentração mais elevada não tóxico foi determinado para cada composto.

**Atividade anti-T. cruzi (epimastigotas):** Epimastigotas (Dm28c) foram contadas em um hemocítmetro e depois vertidas em placas de 96 poços, a um número de células de 106 células/poço. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio LIT em cinco concentrações diferentes (1, 23, 3, 70, 11, 11, 33, 33 e 100  $\mu$ g / mL) e adicionado às respectivas cavidades, em triplicata. A placa foi incubada durante 5 dias a 26°C, foram recolhidas alíquotas de cada poço, e o número de parasitas viáveis foram contadas numa câmara de Neubauer e comparados com cultura parasitária não tratada. CI<sub>50</sub>s foram calculados por meio de regressão não-linear no software GraphPad Prism 4.0. Benznidazol e nifurtimox foram utilizados como fármacos de referência.

**Atividade anti-T. cruzi (tripomastigotas):** tripomastigotas metacíclicas foram recolhidas a partir do sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas e, em seguida, distribuídas em placas de 96 poços a uma série de células de 4.105 células/poço em meio RPMI-1640. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio RPMI-1640 em cinco concentrações diferentes (1, 23, 3, 70, 11, 11, 33, 33 e 100 $\mu$ g/mL) e adicionado às respectivas cavidades, em triplicata. A placa foi incubada durante 24h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Alíquotas de cada poço foram recolhidas, e o número de parasitas viáveis foi contado numa câmara de Neubauer. A porcentagem de inibição foi calculada em relação às culturas não tratadas. CI<sub>50</sub> cálculo também foi realizada por meio de regressão não-linear com o software GraphPad Prism 4.0. Benznidazol e nifurtimox foram utilizados como os fármacos de referência.

**Inibição da atividade catalítica da cruzaína recombinante:** cruzaína recombinante foi fornecida por Allison Doak e Dr. Brian Shoichet, da Universidade da Califórnia em San Francisco. A atividade da Cruzaína foi medida através da monitorização da clivagem do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-aminometilcumarina (Z-FR-AMC) em um Sinergy 2 (Biotek), a partir do Centro de Citometria de Fluxo e Fluorimetria no Departamento de Bioquímica e Imunologia (UFMG), usando filtros de 340 nm para excitação e 440 nm para emissão. Os ensaios foram realizados em acetato de sódio à 0,1M, pH 5,5 e na presença de 1mM de p-mercaptoetanol e 0,01% de Triton X-100. A concentração final da cruzaína foi de 0,5nM e a concentração de substrato foi de 2,5  $\mu$ M ( $K_m = 1 \mu$ M). Os compostos **9a**, **9h**, **9k**, **9m**, **9n**, **9o** e **9s** foram rastreados a 100  $\mu$ M, enquanto **9g**, **9p** e **9t** foram testados a 50  $\mu$ M. A triagem foi realizada em duas condições: sem pré-incubação com a enzima e depois de uma pré-incubação de 10 minutos com a enzima. Todos os compostos foram testados em dois experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. Os ensaios foram acompanhados durante 5 min, e a atividade foi calculada a partir de um controle de DMSO.

## **4 - Considerações Finais**

## 4.1 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

---

- Uma série inédita de 24 ariloxitiossemicarbazonas foi estruturalmente concebida empregando-se a estratégia de homologação, bem como a restrição conformacional. Estas modificações moleculares produziram as ariloxitiossemicarbazonas **9a-x**.
- Essa série foi obtida empregando-se uma metodologia simples com bons rendimentos, sendo, em seguida, avaliada quanto à atividade anti-*T. cruzi* frente às formas epimastigota e tripomastigota.
- Todos os compostos apresentaram atividade tripanocida para duas formas evolutivas. No estudo de relação estrutura-atividade pode-se observar que a atividade anti-*T. cruzi* dessa série é dependente da natureza do substituinte presente no anel fenil, mas a posição de tal substituinte ao longo do anel tem menos importância.
- As ariloxitiossemicarbazonas **9h**, **9r** e **9t** foram identificadas como potentes e seletivos agentes anti-*T. cruzi* semelhantes ao benznidazol.
- A molécula **9h** foi eleita como a melhor candidata à fármaco anti-*T. cruzi*, uma vez que apresentou atividade cerca de 4 vezes maior e toxicidade aproximadamente 3 vezes menor que o benznidazol frente a forma tripomastigota do parasito.
- Esses compostos mais ativos foram testados quanto à inibição da atividade da cruzaina, no intuito de identificar um provável mecanismo de ação dessa série. No entanto, nenhum apresentou propriedades inibitórias contra tal enzima, o que sugere que a potente atividade de tais compostos envolve outro mecanismo de ação.
- Com base nos resultados obtidos novas modificações estruturais em ariloxitiossemicarbazonas poderão ser planejadas no intuito de otimizar a atividade, bem como reduzir a toxicidade de tais compostos.

- Além disso, seria importante obter mais informações com relação ao mecanismo de ação de tais compostos, investigando-se outros possíveis alvos para a atividade anti-*T. cruzi* dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

---

- AGUIRRE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; GAMBINO, D.; OTERO, L.; OLEA-AZAR, C.; RIGOL, C.; DENICOLA., In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**.12, 4885 – 4893.
- ALMEIDA-LEITE, C.M.; GALVÃO, L.M.C.; AFONSO, L.C.C.; CUNHA, F.Q.; ARANTES, R.M.E. Interferon- $\gamma$  induced nitric oxide mediates *in vitro* neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Neurobiol. Dis.***2007**.25, 170-178.
- ANANDAN, J. V. Parasitic disease. In: DIPIRO, J. T. (Ed.). *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach*. 3rd ed. London: Appleton & Lange. **1997**. 2161-2172.
- ANVISA. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Informe técnico, n. 35, **2008**.
- ARAÚJO, A. J. G.; SABROZA, P. C.; SILVA, L. F. R. F. Epidemiologia: situação atual. Disponível em:  
<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=131>. Acesso em 12 de jun. de **2013**.
- AUGUSTYNS, K.; AMSSOMS, K.; YAMANI, A.; RAJAN, P.K.; HAEMERS, A. Trypanothione as a target in the design of antitrypanosomal and antileishmanial agents. *Curr Pharm Des.* **2001**. 7, 117-1141.
- BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. *Lancet***2003**.362, 1469–1480.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis.* **2009**.49, 52–54.
- BERNARDES, L.S. C.; KATO, M.J.; ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4- bis(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. *Bioorg. Med. Chem.***2006**. 14, 7075-7082.
- BLACK, J.G. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. 4ªed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, **2002**.657.
- BLAU, L.; MENEGON, R. F.; TROSSINI, G. H. G.; (D) VIEITES, M.; OTERO, L.; SANTOS, D.; OLEA-AZAR, C.; NORAMBUENA, E.; AGUIRRE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; KEMMERLING, U.; MORELLO, A.; DIEGO MAYA, J.; GAMBINO, D. *J. Inorg. Biochem.***2009**, 103, 411–418.

- BOJARSKI, A. J.; DUSZYŃSKA, B.; KOŁACZKOWSKI, M.; KOWALSKI, P.; KOWALSKA, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5863–5866.
- BOIANI, L.; DAVIES, C.; ARREDONDO, C.; PORCAL, W.; MERLINO, A.; GERPE, A.; BOIANI, M.; PACHECO, J.P.; BASOMBRÍO, M. A.; CERECETTO, H.; GONZÁLES, M. In vivo studies of 5-arylethenylbenzofuroxans in acute murine models of Chagas' disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, 43, 2229–2237.
- BRAK, K.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ELLMAN, J. A. Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6404–6410.
- BRAK, K.; KERR, I. D.; BARRETT, K. T.; FUCHI, N.; DEBNATH, M.; ANG, K.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; DOYLE, P. S.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 1763–1773.
- BRAZ, L. M.; AMATO NETO, V.; OKAY, T. S. Reactivation of Trypanosoma cruzi infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **2008**, 50, 65–66.
- BRENER, Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. In: CANÇADO J.R. Doença de Chagas. *Imprensa Oficial de Minas Gerais*, Belo Horizonte. **1968**, 510–16,
- BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug. Resist.* **2012**, 2, 236–242.
- BUEKENS, P.; ALMENDARES, O.; CARLIER, Y.; DUMONTEIL, E.; EBERHARD, M.; GAMBOA-LEON, R.; JAMES, M.; PADILLA, N.; WESSON, D.; XIONG, X. Mother-to-child transmission of Chagas' disease in North America: why don't we do more? *Matern. Child Health Journal*. **2008**, 12, 283–286.
- CAPUTTO, M. E.; FABIAN, L. E.; BENÍTEZ, D.; MERLINO, A.; RÍOS, N.; CERECETTO, H.; MOLTRASIO, G. Y.; MOGLIONI, A. G.; GONZÁLEZ, M.; FINKIELSZTEIN, L. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 6818–6826.
- CÁRDENAS, R.C.; GÓMEZ, F.E.; RODRÍGUEZ, A.M.; LÓPEZ, P.A.R.; VIERA, M.H.; LARIOS, F.R. Active Transmission of Human Chagas Disease in Colima México. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **2004**, 9, 363–368.
- CARVALHO, S. A.; FEITOSA, L. O.; SOARES, M.; COSTA, T. E.; HENRIQUES, M. G.; SALOMÃO, K.; DE CASTRO, S. L.; KAISER, M.; BRUN, R.; WARDELL, J. L.; WARDELL, S. M.; TROSSINI, G. H.; ANDRICOPULO, A. D.; DA SILVA, E. F.; FRAGA, C. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 54, 512–721.
- CASTRO, E. Chagas disease: lessons from routine donation testing, *Transfus. Med.* **2009**, 19, 16–23.

- CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. A Pesquisa de Novas Drogas para o Tratamento da Doença de Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>, acessado em 12 de jun. de **2013**.
- CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas Disease. *Current Pharmaceutical Design*.**2001**. 7, 1143-1156.
- CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Anti-*T. cruzi*agents: our experience in the evaluation of more than five hundred compounds. *Mini Rev. Med. Chem.***2008**.8, 1355-1383.
- CHIEFFI, P. P.; AMATO NETO, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; **2000**.
- CHUNG, M. C.; GUIDO, R. V. C.; MARTINELLI, T. F.; GONCALVES, M. F.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C. A.; VARANDA, E. A.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T.; FERREIRA, E. I. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): A new nitrofurazone prodrug. *Bioorg. Med.Chem.* **2003**. 11, 4779–4783.
- COURA, J.R.; CANÇADO, J.R. A história da terapêutica da doença de Chagas. Disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=124>. Acesso em: 18, jun. **2013**.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its Discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2009**. 104, 31-40.
- COURA, J. R.; CASTRO, S.L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2002**. 97, 3-24.
- CROFT, S. L. Pharmacological Approaches to Antitrypanosomal Chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1999**. 94, 215-220.
- DAUBY, N.; ALONSO-VEGA, C.; SUAREZ, E.; FLORES, A.; HERMANN, E.; CÓRDOVA M.; TELLEZ, T.; TORRICO, F.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Maternal Infection with *Trypanosoma cruzi* and Congenital Chagas Disease Induce a Trend to a Type 1 Polarization of Infant Immune Responses to Vaccines. *Neglected Tropical Diseases.* **2009**.3, 1-9.
- DC-RUBIN, S. S.; SCHENKMAN, S. *Cell. Microbiol.***2012**, 14, 1522–1530.
- DEMORO, B.; SARNIGUET, C.; SÁNCHEZ-DELGADO, R.; ROSSI, M.; LIEBOWITZ, D.; CARUSO, F.; OLEA-AZAR, C.; MORENO, V.; MEDEIROS, A.; COMINI, M. A.; OTERO, L.; GAMBINO, D. *Dalton Trans.***2012**, 41, 1534–1543.

- DIAS, J.C. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2006**. 102, 11–18.
- DIAS, J. C.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review, *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2002**. 97, 603–612.
- DIAS, J. C. P.; MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA JR, editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; **2005**. 557-594.
- DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **2011**. 44, 375-379.
- DIAS, L. C.; DESSOY, M.A.; SILVA, J.J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim. Nova*. **2009**. 32, 2444-2457.
- DÍAZ, E.G. T.; CASTRO, J. A.; CAZZULO, F.B.M.; CAZZULO, J.J.; *Experientia*. **1988**. 44, 880.
- DIMMOCK, J. R.; PUTHUCODE, R. N.; SMITH, J. M.; HETHERINGTON, M.; QUAIL, J. W.; PUGAZHENTHI, U.; LECHLER, T.; STABLES, J. P. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3984–3997.
- DOYLE, P. S.; ZHOU, Y. M.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**. 51, 3932–3939.
- DOYLE, P. S.; ZHOU, Y. M.; HSIEH, I.; GREENBAUM, D. C.; MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C. *Plos Pathog.* **2011**. 7, e1002139.
- DPDx, American Trypanosomiasis, Laboratory Identifications of Parasites of Public Health Concern. Disponível em: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm) Acesso em: 15 jun. **2013**.
- DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES *INIATIVE* (DNDi), Research on neglected disease. Disponível em: [http://www.treatchagas.org/cp\\_chagas\\_globalview.aspx](http://www.treatchagas.org/cp_chagas_globalview.aspx). Acesso em: 12 jun. **2013**.
- DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity Relationship Study of potent Trypanocidal Thio semicarbazone inhibitors of the Trypanosomal Cysteine protease Cruzain. *J. Med. Chem.* **2002**. 45, 2695–2707.

- DU, X.; HANSELL, E.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R.; COHEN, F. E.; MCKERROW, J. H. *Chem. Biol.* **2000**, 7, 733–742.
- DUSCHAK, V. G.; CIACCIO, M.; NASSERT, J. R.; BASOMBRIIO, M. A. *J. Parasitol.* **2001**, 87, 1016–1022.
- ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. *J. Exp. Med.* **1998**, 188, 725–734.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* **2009**. Published online July 29. DOI:10.1016/j.actatropica.2009.07.019.
- GONTIJO, E.D.; SANTOS, S.E. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=25>. Acesso em: 18 de Junho de **2013**.
- GONZÁLEZ, J.; AZZATO, F.; AMBROSIO, G.; MILEI J. Pathogenesis of Chronic Chagasic Myocarditis. *INTECH.* **2013**. 5, 105-133.
- GREENBAUM, D. C.; MACKKEY, Z.; HANSELL, E.; DOYLE, P.; GUT, J.; CAFFREY, C. R.; LEHRMAN, J.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; CHIBALE, K. *J. Med. Chem.* **2004**. 47, 3212–3219.
- GUERRI-GUTTENBERG, R. A.; GRANA, D. R.; AMBROSIO, G.; MILEI, J. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! *Eur Heart J*; 29: 2587–91; **2008**.
- HERNANDES, M. Z.; RABELLO, M. M.; LEITE, A. C. L.; CARDOSO, M. V.; MOREIRA, D. R. M.; BRONDANI, D. J.; SIMONE, C. A.; REIS, L. C.; SOUZA, M. A.; PEREIRA, V. R. A.; FERREIRA, R. S.; MCKERROW, J. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 7826–7835.
- HORROCKS, S. M.; JUNG, Y. S.; HUWE, J. K.; HARVEY, R. B.; RICKE, S. C.; CARSTENS, G. E.; CALLAWAY, T. R.; ANDERSON, R. C.; RAMLACHAN, N.; NISBET, D. J., Effects of short-chain nitrocompounds against campylobacter jejuni and campylobacter coli in vitro. *J. Food sci.* **2007**. 72, M50-M55.
- INFORMAÇÕES BIOMÉDICAS. Doença de Chagas. Disponível em: [http://informacoesbiomedicas.blogspot.com.br/2012\\_09\\_01\\_archive.html](http://informacoesbiomedicas.blogspot.com.br/2012_09_01_archive.html) Acesso em: 21 jun. 2013.
- JACKSON, Y.; MYERS, C.; DIANA, A.; MARTI, H.P.; WOLFF, H., CHAPPUIS, F.; LOUTAN, L.; GERVAIX, A. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, 15, 601–603.
- KAMAL, A.; PRABHAKAR, S.; JANAKI RAMAIAH, M.; VENKAT REDDY, P.; RATNA REDDY, C.; MALLAREDDY, A.; SHANKARAIAH, N.; REDDY, T. L. N.; PUSHPAVALLI, S. N. C. V.; PAL-BHADRA, M. *Eur. J. Med Chem.* **2011**, 46, 3820–3831.

- KERR, I. D.; LEE, J. H.; FARADY, C. J.; MARION, R.; RICKERT, M.; SAJID, M.; PANDEY, K. C.; CAFFREY, C. R.; LEGAC, J.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; ROSENTHAL, P. J.; BRINEN, L. S. Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25697-703.
- KROPF, S. P. Carlos Chagas e a descoberta de uma nova tripanossomíase humana. Casa de Oswaldo Cruz, *Fiocruz*, Expansão, 20040-361, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=33>. Acessado em: 03 jun. **2013**.
- KROPF, S. P. Carlos Chagas na direção do Instituto Oswaldo Cruz e do Departamento Nacional de Saúde Pública. Casa de Oswaldo Cruz, *Fiocruz*, Expansão, 20040-361, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=44>. Acessado em: 12 jun. **2013**.
- LANTWIN, C. B.; SCHLICHTING, I.; KABSCH, W.; PAI, E. F.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. *Proteins* **1994**, *18*, 161–173.
- LEÃO, R. N. Q.; VALENTE, S. A. S.; NETO, H. F.; MILES, M. A. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico, *Instituto Evandro Chagas*, Belém, **1997**.
- LEITE, A. C. L.; DE LIMA, R. S.; MOREIRA, D. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; BRITO, A. C. G.; SANTOS, L. M. F.; HERNANDES, M. Z.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, R. S.; SOARES, M. B. P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3749–3457.
- LEITE, A. C. L.; SANTOS, L.M.F.; MOREIRA, D.R.M.; BRONDANI, D.J. Synthesis and characterization of new acyl-4-thiazolidones. *Quim. Nova.* **2007**, *30*, 284 – 286.
- LÓPEZ-CHEJADE, P.; RIBERA, O.; MOLINA, L.; SANZ, S.; PINAZO, M. J.; RIERA, C.; POSADA, E. J.; SANZ, G.; PORTÚS, M.; GASCON, J. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain), *Acta. Trop.* **2009**, *111*, 51–55.
- LOZANO, N. B.; MALTAROLLO, V. G.; WEBER, K. C.; HONORIO, K. M.; GUIDO, R. V.; ANDRICOPULO, A. D.; SILVA, A. B. *Med. Chem.* **2012**, *8*, 1045–1056.
- MACHADO, F. S.; JELICKS, L. A.; KIRCHHOFF, L. V.; SHIRANI, J.; NAGAJYOTHI, F.; MUKHERJEE, S.; NELSON, R.; COYLE, C. M.; SPRAY, D. C.; DE CARVALHO, A. C.; GUAN, F.; PRADO, C. M.; LISANTI, M. P.; WEISS, L. M.; MONTGOMERY, S. P.; TANOWITZ, H. B. *Cardiol. Rev.* **2012**, *20*, 53–65.
- MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A., JR.; AVEZUM, A., JR.; MATTOS, A. C.; RASSI, A. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 319–324.

- MILEI, J.; GUERRI-GUTTENBERG, R.A.; GRANA, D.R.; STORINO, R. Prognostic Impact of Chagas Disease in the United States. *Am. Heart. J.* 2009, 157, 22–29.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Guia de Vigilância Epidemiológica*, 7ª. Edição, Brasília, 2009. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf). Acessado em: 09 jun. 2013.
- MOLINO, J. V. D.; VITAL, D. G.; CICARELLI, R. M. B.; PASSERINI, G. D.; BOSQUESI, P. L.; MANCHIN, C. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 67, 142–151.
- MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2003, 98, 577-591.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009, 104, 17-30.
- MOREIRA, D. R. M.; COSTA, S. P.; HERNANDES, M. Z.; RABELLO, M. M.; FILHO, G. B. O.; DE MELO, C. M.; DA ROCHA, L. F.; DE SIMONE, C. A.; FERREIRA, R. S.; FRADICO, J. R.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SRIVASTAVA, R. M.; PEREIRA, V. R.; SOARES, M. B. P.; LEITE, A. C. L. *J. Med. Chem.* 2012, 55, 10918–10936.
- MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. *Curr. Drug Targets* 2009, 10, 212–231.
- MOUSSA, I. A.; BANISTER, S. D.; AKLADIOS, F. N.; CHUA, S. W.; KASSIOU, M. Effects of Linker Elongation in a Series of N-(2-benzofuranylmethyl)-N'-(methoxyphenylalkyl)piperazine  $\sigma$ 1 Receptor Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 5707–5710.
- MURCIA, L; CARRILERO, B; VIÑAS, P. A.; SEGOVIA, M. Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated Trypanosoma cruzi infected patients. *Rev Esp Quimioter.* 25, 74-75, 2012.
- NEVES, D. P.; MELO, A.L.; LINARD, P.M.; VITOR, R.W.A. *Parasitologia Humana*. 11ª. Edição, Ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- PINAZO, M. J.; MUÑOZ, J.; POSADA, E.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; GÁLLEGO, M.; AYALA, E.; DEL CACHO, E.; SOY, D.; GASCON, J. *Agents Chemother.* 2010, 54, 4896–4899.
- PINTO, A. Y.; FERREIRA, A. G. Jr; VALENTE V. da C.; HARADA, G. S.; VALENTE, S. A. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev. Panam. Salud Publica.* 2009, 25, 77-83.

- PIRON, M.; VERGES, M.; MUNOZ, J.; CASAMITJANA, N.; SANZ, S.; MAYMÓ, R. M.; HERNÁNDEZ, J. M.; PUIG, L.; PORTÚS, M.; GASCÓN, J.; SAULEDA, S. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion*. 2008. 48, 1862–1868.
- POMPEU, T. E.; ALVES, F. R.; FIGUEIREDO, C. D.; ANTONIO, C. B.; HERZFELDT, V.; MOURA, B. C.; RATES, S. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; NOËL, F. Synthesis and Pharmacological Evaluation of New N-phenylpiperazine Derivatives Designed as Homologues of the Antipsychotic lead Compound LASSBio-579. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 66, 122–134.
- PORCAL, W.; HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, L.; BOIANI, M.; FERREIRA, A.; CHIDICHIMO, A.; CAZZULO, J. J.; OLEA-AZAR, C.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 6995–7004.
- RASCÓN, A. A. JR; MCKERROW, J. H. *Curr. Med. Chem.* **2013**.
- RASSI, J.A.; MARIN-NETO, J.A. Cardiopatia chagásica crônica: estado da arte. *Rev Soc Cardiol. SãoPaulo*. **2000**. v. 10.
- RASSI, A., Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. *Lancet*. **2010**. 375, 1388–1402.
- RASSI, A., Jr.; RASSI, A.; LITTLE, W. C.; Chagas' Heart Disease. *Clinical Cardiology*. **2000**. 23, 883–889.
- REY, L. Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3ªed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*. **2001**. 151- 171.
- RODRIGUES, C. J.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **2002**. 97, 3-24.
- ROMEIRO, N. C.; AGUIRRE, G.; HERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; ALDANA, I.; PÉREZ-SILANES, S.; MONGE, A.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 641–652.
- SANTOS FILHO, J. M.; LEITE, A. C. L.; DE OLIVEIRA, B. G.; MOREIRA, D. R. M.; LIMA, M. S.; SOARES, M. B. P.; LEITE, L. F. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6682–6691.
- SANTOS-FILHO, J. M.; MOREIRA, D. R.; DE SIMONE, C. A.; FERREIRA, R. S.; MCKERROW, J. H.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SOARES, M. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 6423–6433.
- SCHMUNIS G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **2007**, 102, 75–85.

- SELVAKUMAR, N.; RAHEEM, M. A.; KHERA, M. K.; RAJALE, T. V.; KUMAR, M. S.; KANDEPU, S.; DAS, J.; RAJAGOPALAN, R.; IQBAL, J.; TREHAN, S. *Bioorg Med Chem Lett.* **2003**, *13*, 4169–4172.
- SILES, R.; CHEN, S. E.; ZHOU, M.; PINNEY, K. G.; TRAWICK, M. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4405–4409.
- SILES, R.; CHEN, S. E.; ZHOU, M.; PINNEY, K. G.; TRAWICK, M. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4405–4409.
- STEVERDING, CAFFREY & SAJID. Cysteine proteinase inhibitors as therapy for parasitic diseases: advances in inhibitor design. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1025 – 1032.
- SZAJNMAN, S.H.; YAN, W.; BAILEY, B. N.; DO CAMPO, R.; ELHALEM, E.; RODRÍGUEZ, J.B. Design and Synthesis of Aryloxythyl Thiocyanate Derivatives as Potent Inhibitors of trypanosoma cruzi Proliferation. *J. Med Chem.* **2000**, *43*, 1826–1840.
- TARLETON, R. L.; CURRAN, J. W. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1861.
- TEIXEIRA, R. Amebicidas. Tricomonicidas. Giardicidas. Tripanosomicidas. Leishmanicidas. Em: PENILDON, S. *Farmacologia*. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. **2002**. 1146.
- TENÓRIO, R. P.; Góes, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas Importância Biológica. *Química Nova*. **2005**, *28*, 1030-1037.
- TRAWICK, M.L.; CHEN, S.E.; ARISPE, M.; SILES, R.; ZHOU, M.; PINNEY, K.G. Inhibitors of cruzipain and cathepsin L. *Federation Amer Soc Exp Biol.* **2006**, *20*, A51-A51.
- URBINA, J.A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin Infect Dis.* **2001**, *14*, 733–741.
- URBINA, J. A. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *49*, 1685–1687.
- VILLALTA, F.; DOBISH, M. C.; NDE, P. N.; KLESHCHENKO, Y. Y.; HARGROVE, T. Y.; JOHNSON, C. A.; WATERMAN, M. R.; JOHNSTON, J. N.; LEPESHEVA, G. I. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 504–511.
- WENDEL, S. Historical aspects. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. *Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. Rio de Janeiro, **1992**.

- WHO (World Health Organization). Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Technical report series no 905. Geneva: *World Health Organization*, **2002**.
- WILKOWSKY, S. E.; BARBIERI, M. A.; STAHL, P.; Isola, E. L. *Exp. Cell. Res.* **2001**, *264*, 211–218.
- YONEZAWA, S.; YAMAKAWA, H.; MUTO, C.; HOSONO, M.; YAMAMOTO, T.; HATTORI, K.; SAKAGAMI, M.; TOGAME, H.; TANAKA, Y.; NAKANO, T.; TAKEMOTO, H.; ARISAWA, M.; SHUTO, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2912–2915.