



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa De Pós-Graduação Em Inovação Terapêutica



PAULO ANDRÉ TEIXEIRA DE MORAES GOMES

Síntese e Avaliação da Atividade Anti-*Trypanosoma cruzi* de Inéditas Tiazolil-Hidrazonas

Recife  
2012

Paulo André Teixeira de Moraes Gomes

Síntese e Avaliação da Atividade Anti-*Trypanosoma cruzi* de Inéditas Tiazolil-Hidrazonas

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

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

Recife

2012

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Gomes, Paulo André Teixeira de Moraes**

**Síntese e avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de inéditas Tiazolil-Hidrazonas/ – Recife: O Autor, 2012.**

**107 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Ana Cristina Lima Leite**

**Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,  
Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2012.**

**Inclui bibliografia e anexos**

1. Tiazóis 2. Doença de Chagas 3. *Trypanosoma cruzi* I. Leite, Ana Cristina Lima (orientadora) II. Título

**615.1**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2014- 285**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Recife, 02 de agosto de 2012.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 02 de agosto de 2012, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

**PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite** (Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura:

**SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira**  
(Departamento de Imunologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães)

Assinatura:

**PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro** (Departamento de Química Fundamental – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura:

À minha mãe, Cristina Teixeira de Morais,  
pelo amor incondicional, apoio, conselhos e  
orações que me ajudam a seguir atingindo  
meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

- À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina, pela orientação e por ter me concedido a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM).
- Aos meus amigos do LpQM e aos que passaram pelo LpQM, Diogo, Marcos, Gevanio, Wan, Lucas, Suellen, Míria, Lucianna, Elany, Edna, Jeyson, Arsênio, Lívia e Daura, pela agradável convivência diária e pelos conselhos. Principalmente esta última, que, no futuro, será minha namorada e esposa.
- Gostaria de destacar meus agradecimentos às alunas de iniciação científica Míria e Lucianna, e ao doutorando Diogo, que me auxiliaram na concretização desse trabalho.
- 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.
- À FACEPE, por ter concedido a bolsa de mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT).
- Aos meus familiares, que fizeram parte de minha história e que, de uma forma ou de outra, têm ajudado no meu amadurecimento pessoal. Em especial à minha mãe (Cristina) a quem dedico esse trabalho.
- A Deus, que tem me guiado e me agraciado com muita sorte.

## RESUMO

A doença de Chagas é reconhecida pela OMS como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. O atual tratamento da doença é feito basicamente com Benznidazol. No entanto, tal medicamento não é ideal, principalmente por apresentar sérios efeitos colaterais e por não ser ativo na fase crônica da doença. Por esse motivo torna-se necessário o desenvolvimento de novos protótipos a fármacos anti-*T. cruzi*. Trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa têm revelado que as tiossemicarbazonas e derivados heterocíclicos do tipo tiazol tem revelado potencial atividade frente ao *T. cruzi*. Estes trabalhos nos motivaram a síntese de inéditos candidatos a fármacos antichagásicos. Para o planejamento das séries foram escolhidos grupamentos farmacofóricos com conhecida atividade antichagásica. A primeira série **PM01-10** utiliza a técnica de hibridação molecular, juntando dois grupos farmacofóricos, o anel ftalimida e a tiazolil-hidrazona (bioisómero cíclico da tiossemicarbazona). A segunda série **PT01.2-14** são bioisómeros da 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona (**1i**) contendo o anel tiazol. Dez inéditos derivados da ftalimida (**PM01-10** e **PA01**) e dez inéditos derivados da **1i** (**PT01.2-14**) do tipo tiazolil-hidrazonas foram obtidos e caracterizados estruturalmente. Os compostos (**PM01-10** e **PA01**) foram avaliados quanto as suas atividades tripanocidas “in vitro” frente à forma evolutiva epimastigota e quanto a citotoxicidade frente a células de mamíferos. Os compostos (**PT01.2-14**) foram avaliados quanto a atividade tripanocida frente à forma tripomastigota e epimastigota e quanto a citotoxicidade em células de mamíferos. Da série **PM01-10**, foi possível identificar os tiazóis **PM04**, **PM05** e **PM06** como os mais potentes da série, que apresentam propriedades tripanocidas, para a forma epimastigota, melhores que o BDZ. Da série **PT01.2-14**, foi possível identificar os tiazóis **PT01.2**, **PT01.4** e **PT01.5** como os mais potentes da série, que apresentam propriedades tripanocidas similares ao BDZ. As duas séries de compostos também foram avaliadas quanto as propriedade leishmanicidas. Da série **PM01-10**, foi possível identificar os tiazóis **PM02** e **PM10** como os mais potentes da série. Já entre os tiazóis da série **PT01.2-14**, foi possível identificar os tiazóis **PT01.7** e **PT01.9** como os mais seletivos da série, sendo o **PT01.7** três vezes mais seletivo e o **PT01.9** quatro vezes mais seletivo, quando comparado com a tiossemicarbazona **PT01**.

**Palavras-chaves:** Doença de Chagas, Cisteína, Ftalimidas e tiazolil-hidrazonas.

## ABSTRACT

Chagas disease is recognized by WHO as one of the 13 most neglected tropical diseases in the world. The current treatment of the disease is basically done with Benznidazole. However, this medicine is not ideal, especially for presenting serious side effects and for not being active in the chronic phase. For this reason it is necessary to develop new prototypes anti-T. cruzi. Works developed by our research group have shown that thiosemicarbazones and heterocyclic derivatives of the type thiazole has revealed the potential activity against T. cruzi. This works motivated the synthesis of novel drug candidates for anti-Chagas. For the planning of the series were chosen pharmacophoric groups with known Chagas activity. The first series PM01-10 uses the technique of molecular hybridization, by joining two groups pharmacophore, phthalimide ring and thiazolyl-hydrazone (cyclical thiosemicarbazone bioisoster). The second series PT01.2-14 are 3'-bromopropilfenona thiosemicarbazone (1i) bioisoster containing a thiazole ring. Ten novel derivatives of phthalimide (PM01-10 and PA01) and ten novel derivatives 1i (PT01.2-14), of the type thiazolyl-hydrazones, were obtained and characterized structurally. The compounds (PM01-10 and PA01) were evaluated for their trypanocidal activity "in vitro" forward to the way evolutionary epimastigote and the cytotoxicity against mammalian cells. Compounds (PT01.2-14) were assessed for activity against trypanocidal to epimastigote and trypomastigote forms and the cytotoxicity in mammalian cells. Series PM01-10, it was possible to identify the thiazoles PM04, PM05 and PM06 as the most potent of the series, which have trypanocidal properties for the epimastigote form, better than the BDZ. PT01.2-14 series, it was possible to identify thiazoles PT01.2, PT01.4 and PT01.5 as the most potent of the series, which have properties similar to trypanocidal BDZ. The two series of compounds were also evaluated for the antileishmanial property. Series PM01-10, it was possible to identify the thiazoles PM02 and PM10 as the most potent of the series. Among the thiazoles PT01.2-14 series, it was possible to identify thiazoles PT01.7 and PT01.9 as the most selective of the series, being the PT01.7 three times more selective and PT01.9 four times more selective compared to the thiosemicarbazone PT01.

**Keywords:** Chagas disease, Cysteine, Phthalimides and Thiazolyl-hydrazones.

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Planejamento da série química PM01-10 e PA01.....	49
<b>Esquema 2:</b> Sínteses dos compostos PM01-10 e PA01.....	50
<b>Esquema 3:</b> Reação do intermediário 1.....	51
<b>Esquema 4:</b> Reação do intermediário 2.....	51
<b>Esquema 5:</b> Reação dos intermediários 3a e 3b.....	52
<b>Esquema 6:</b> Reação do PA01.....	53
<b>Esquema 7:</b> Reação da Série PM01-10.....	54
<b>Esquema 8:</b> Planejamento da série química PT01.2-14.....	77
<b>Esquema 9:</b> Sínteses dos compostos PT01.2-14.....	78
<b>Esquema 10:</b> Reação do PT01.....	79
<b>Esquema 11:</b> Reação da série PT01.2-14.....	80

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1:</b> Carlos Chagas (©Oswaldo Cruz House – Fiocruz).....	20
<b>Fig. 2:</b> Número estimado de imigrantes infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> vivendo em países não endêmicos (Dados fornecidos pelo Canadá, Austrália e Japão em 2006 [26]; os EUA em 2005 [24]; Espanha em 2008 [25]; e outros países da Europa em 2004–06 [23]).....	22
<b>Fig. 3:</b> Transmissão pelo vetor e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> (Imagem do sinal de Romaña foi reproduzido de Rassi e colegas; [33] direitos autorais 2009 Editora Roca).....	25
<b>Fig. 4:</b> História natural da doença de Chagas no homem [40].....	27
<b>Fig. 5:</b> Resultados comuns na doença de Chagas crônica ([33] direitos autorais Editora Roca 2009).....	32
<b>Fig. 6:</b> Formas tripomastigotas sanguíneas do <i>Trypanosoma cruzi</i> (Fonte: Ministério da Saúde, 2005 [74]).....	33
<b>Fig. 7:</b> Fluxograma para a realização de testes laboratoriais para a doença de Chagas na fase crônica (PCR, Polymerase Chain Reaction; WB, Western Blot. Fonte: Ministério da Saúde, 2005 [74]).....	34
<b>Fig. 8:</b> Fluxograma para avaliação da transmissão vertical do <i>T. cruzi</i> (Ministério da Saúde, 2005 [74]).....	35
<b>Fig. 09:</b> Estruturas do Nifurtimox (Nfx) e Benznidazol (Bdz). (Arquivo pessoal).....	35
<b>Fig. 10:</b> Representação da Cruzaína [77].....	38
<b>Fig. 11:</b> Representação estrutural em 3D da 3'-Bromopropilfenona-tiossemicarbazona (Arquivo pessoal).....	39
<b>Fig. 12:</b> Melhor cálculo de orientação do composto 1i no sítio ativo da cruzaína [14].....	40
<b>Fig. 13:</b> Representação em 3D do anel 1,3-tiazol (Arquivo pessoal).....	41
<b>Fig. 14:</b> Exemplos de produtos bioativos naturais contendo tiazol [80].....	42
<b>Fig. 15:</b> Proposta de mecanismo da reação de Hantzsch.....	43
<b>Fig. 16:</b> Estrutura do 2-aminotiazol e das tiazolil-hidrazonas 3b e 3j [13].....	43
<b>Fig. 17:</b> Representação ilustrativa dos enantiômeros da talidomida [86].....	45
<b>Fig. 18:</b> Espectro de infravermelho da molécula PA01.....	55

<b>Fig. 19:</b> Espectro do RMN <sup>1</sup> H para a molécula PA01.....	56
<b>Fig. 20:</b> Espectro do RMN <sup>13</sup> C para a molécula PA01.....	57
<b>Fig. 21:</b> Espectro de infravermelho da molécula PM08.....	58
<b>Fig. 22:</b> Espectro do RMN <sup>1</sup> H para a molécula PM08.....	58
<b>Fig. 23:</b> Espectro do RMN- <sup>13</sup> C para a molécula PM08.....	59
<b>Fig. 24:</b> DEPT 135° de <sup>13</sup> C da molécula PM08.....	60
<b>Fig. 25:</b> Espectro do RMN- <sup>13</sup> C para a molécula Int3b.....	60
<b>Fig. 26:</b> Compostos da série PM01-10 que apresentaram melhor atividade tripanocida frente à forma epimastigota (Arquivo pessoal).....	63
<b>Fig. 27:</b> Compostos da série PM01-10 que apresentaram melhor atividade leishmanicida frente à forma promastigota (Arquivo pessoal).....	65
<b>Fig. 28:</b> Espectro de infravermelho da molécula PT01.4.....	81
<b>Fig. 29:</b> Espectro do RMN <sup>1</sup> H para a molécula PT01.4.....	82
<b>Fig. 30:</b> Espectro do RMN <sup>13</sup> C para a molécula PT01.4.....	83
<b>Fig. 31:</b> Espectro do RMN <sup>13</sup> C para a molécula PT01.....	83
<b>Fig.32:</b> Compostos da série PT01.2-14 com melhor atividade tripanocida frente a forma tripomastigota (Arquivo pessoal).....	87
<b>Fig.33:</b> Compostos da série PT01.2-14 com maior seletividade para a forma promastigota do <i>Leishmania amazonensis</i> (Arquivo pessoal).....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tab. 1:</b> Citotoxicidade e atividade tripanocida frente às formas epimastigota da série PM01-10 e PA01.....	62
<b>Tab. 2:</b> Atividade leishmanicida frente à forma promastigota da série PM01-10 e PA01.....	64
<b>Tab. 3:</b> Citotoxicidade e atividade tripanocida frente às formas epimastigota e tripomastigota da série PT01.2-14.....	85
<b>Tab. 4:</b> Atividade leishmanicida frente à forma promastigota da série PT01.2-14.....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

**CCD:** Cromatografia de camada delgada;

**DMAP:** Dimetil-amino-piridina;

**DMF:** Dimetilformamida;

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

**ECG:** Eletrocardiograma;

**ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay;

**FDA:** Food and Drug Administration;

**HAI:** Hemaglutinação;

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

**IFI:** Imunofluorescência indireta;

**IFN- $\gamma$ :** Interferon  $\gamma$ ;

**IgA:** Imunoglobulina A;

**IgG:** Imunoglobulina G;

**IgM:** Imunoglobulina M;

**IV:** Infravermelho;

**IV:** Infra-vermelho;

**LPS:** Lipopolissacarídeos;

**NCI:** National Cancer Institute;

**NO:** Óxido Nítrico;

**OMS:** Organização Mundial de Saúde;

**PCR:** Polymerase chain reaction;

**PF:** Ponto de fusão;

**q.s.p.s.:** Quantidade suficiente para solubilizar;

**Rf:** Razão de frente;

**SAR:** Relação estrutura-atividade.

**SI:** Índice de seletividade;

**TNF- $\alpha$ :** Tumor necrosis factor  $\alpha$ ;

**TPP:** Pirofosfato de tiamina;

**WB:** Western blot;

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 (Introdução, Objetivos e Revisão da Literatura).....</b>	<b>16</b>
1.1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 OBJETIVO.....	19
1.2.1 Objetivo Geral.....	19
1.2.2 Objetivos Específicos.....	19
1.3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
1.3.1 Doença de Chagas.....	20
1.3.1.1 História.....	20
1.3.1.2 Epidemiologia.....	21
1.3.1.3 Mecanismos principais e atípicos de transmissão.....	22
1.3.1.3.1 Transmissão vetorial.....	22
1.3.1.3.2 Outros mecanismos de transmissão.....	23
1.3.1.4 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	24
1.3.1.5 A diversidade genética do <i>T. cruzi</i> .....	25
1.3.1.6 Fases, formas e evolução clínica.....	26
1.3.1.7 Patogênese e mecanismos patológicos.....	27
1.3.1.8 Manifestações clínicas.....	29
1.3.1.8.1 Doença de Chagas aguda.....	29
1.3.1.8.2 Doença de Chagas crônica.....	30
1.3.1.9 Diagnóstico laboratorial.....	32
1.3.1.9.1 Fase aguda.....	33
1.3.1.9.2 Fase crônica.....	33
1.3.1.9.3 Transmissão vertical.....	34
1.3.1.10 Tratamento clínico.....	35
1.3.1.11 Desenvolvimento de novas drogas.....	37
1.3.1.12 Cisteína protease.....	38
1.3.2 3'-Bromopropilfenona-tiossemicarbazona.....	39
1.3.3 Tiazóis.....	41
1.3.4 Talidomida.....	43
1.3.5 Atividade da Ftalimida sobre parasitos.....	46

	<b>CAPÍTULO 2 (Ftalil-Hidrazona-Tiazóis).....</b>	<b>48</b>
2.1	PLANEJAMENTO DA SÉRIE QUÍMICA.....	49
2.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
2.2.1	Parte Química.....	50
2.2.1.1	Obtenção da Série Química.....	50
2.2.1.1.1	Intermediários (Int1, Int2, Int3a e Int3b).....	51
2.2.1.1.2	PA01.....	52
2.2.1.1.3	Série PM01-10.....	54
2.2.1.2	Caracterização Estrutural.....	55
2.2.1.2.1	PA01.....	55
2.2.1.2.2	Série PM01-10.....	57
2.2.2	Parte Biológica.....	61
2.2.2.1	Citotoxicidade e atividade antichagásica.....	62
2.2.2.2	Atividade leishmanicida.....	64
2.3	SESSÃO EXPERIMENTAL.....	66
2.3.1	Parte Química.....	66
2.3.1.1	Metodologia de Síntese.....	66
2.3.1.1.1	Síntese do composto intermediário 1 (Int1), 2-(2,2-dietoxietil)isoindolina-1,3-diona.....	66
2.3.1.1.2	Síntese do composto intermediário 2 (Int2), 2-(1,3-dioxoisoindol-2-il)acetaldeído.....	67
2.3.1.1.3	Síntese dos compostos intermediários 3a (Int3a), 2-(2-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)etilideno)hidrazinacarbotioamida, e 3b (Int3b), 2-(2-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)etilideno)-N-fenilhidrazina carbotioamida.....	67
2.3.1.1.4	Síntese do PA01, 2-(2-(2-(4-(clorometil)thiazol-2-il)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-diona.....	67
2.3.1.1.5	Síntese da série ftalil-hidrazona-tiazóis (PM01-10).....	68
2.3.1.2	Dados Físico-Químicos e Elucidação Estrutural.....	68
2.3.2	Parte Biológica.....	74
2.3.2.1	Toxicidade para esplenócitos.....	74
2.3.2.2	Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota.....	74
2.3.2.3	Atividade contra formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i> .....	74

	<b>CAPÍTULO 3 (3-Bromo-Fenil-propil-Hidrazona-Tiazóis).....</b>	<b>76</b>
3.1	PLANEJAMENTO DA SÉRIE QUÍMICA.....	77
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
3.2.1	Parte Química.....	78
3.2.1.1	Obtenção da Série Química.....	78
3.2.1.1.1	Síntese do PT01.....	79
3.2.1.1.2	Série PT01.2-14.....	79
3.2.1.2	Caracterização Estrutural.....	80
3.2.1.2.1	Série PT01.2-14.....	80
3.2.1.2.1.1	PT01.4.....	80
3.2.2	Parte Biológica.....	84
3.2.2.1	Citotoxicidade e atividade antichagásica.....	85
3.2.2.2	Atividade leishmanicida.....	87
3.3	SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	90
3.3.1	Parte Química.....	90
3.3.1.1	Metodologia de Síntese.....	90
3.3.1.1.1	Síntese do composto intermediário PT01, 2-(1-(3-bromofenil)propilideno) hidrazinacarbotoamida.....	90
3.3.1.1.2	Síntese da série 3-Br-fenil-propil-hidrazona-tiazóis (PT01.2-14).....	91
3.3.1.2	Dados Físico-Químicos e Elucidação Estrutural.....	91
3.3.2	Parte Biológica.....	96
3.3.2.1	Toxicidade para esplenócitos.....	96
3.3.2.2	Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota.....	97
3.3.2.3	Toxicidade para a forma tripomastigota.....	97
3.3.2.4	Atividade contra formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i> .....	97
4	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>

# **Capítulo 1**

## **Introdução, Objetivos e Revisão da Literatura**

## 1.1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, inicialmente conhecida como tripanossomíase americana, teve seu nome posteriormente modificado em homenagem a Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, pesquisador brasileiro que primeiro descobriu a doença em 1909 [1]. Trata-se de uma importante doença parasitária resultante da infecção pelo protozoário parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, tendo insetos triatomíneos como vetores. As formas mais importantes de transmissão da doença de Chagas ainda são as vetoriais (seja via lesão resultante da picada, seja pela mucosa ocular ou oral), contudo apresentam também importância epidemiológica a transmissão transfusional e congênita [2].

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. Mais de 25 milhões de pessoas estão em risco da doença. E estima-se que em 2008 a doença de Chagas matou mais de 10 000 pessoas [1]. No Brasil, é compulsória a notificação de casos agudos da doença de Chagas, segundo a Portaria 5, de 21 de fevereiro de 2006 da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde.

A doença de Chagas é uma zoonose transmitida em foco natural ou em unidades ecológicas dentro de um ambiente geográfico bem definido. A unidade ecológica é composta por mamíferos silvestres e domésticos e por triatomíneos silvestres, ambos infectados com *T. cruzi*. A transmissão contínua é garantida com ou sem o envolvimento do homem. Existem dois estágios da doença humana: A fase aguda, que aparece logo após a infecção, e na fase crônica, que pode durar muitos anos. Após vários anos de um período assintomático, 25% dos infectados desenvolvem sintomas cardíacos que podem levar a insuficiência cardíaca crônica e morte súbita, 6% desenvolvem danos digestivos, principalmente de mega-cólon e mega-esôfago, e 3% sofrem envolvimento dos nervos periféricos [3].

Nifurtimox e benznidazol foram introduzidos na clínica nas décadas de 60-70 como tratamento para a doença de Chagas, mas atualmente não se encontram disponíveis comercialmente no Brasil. Nenhum destes compostos é ideal, principalmente por apresentarem sérios efeitos colaterais e por não serem ativos na fase crônica [4]. Por esse motivo torna-se necessário o desenvolvimento de novos protótipos a fármacos anti-*T. cruzi*.

O crescente conhecimento da biologia básica de *T. cruzi*, o agente etiológico causador da doença de Chagas, permite o desenvolvimento de novas abordagens racionalmente desenvolvidas para quimioterapia específica. A calepsina L-cisteína protease, também denominada cruzipaína ou cruzaina é responsável pela principal atividade proteolítica de

todas as fases do ciclo de vida do parasito e representa um alvo interessante para o desenvolvimento de potenciais terapêuticos para o tratamento da doença [5]. Cruzipaina é expressa diferencialmente em quatro fases principais do ciclo biológico do parasito; está localizada em diferentes compartimentos celulares e é essencial para a sobrevivência do *T. cruzi* dentro das células hospedeiras [6]. Embora a sua função exata seja desconhecida, está provavelmente envolvida na degradação de proteínas eliminadas a partir do repasto sanguíneo do inseto vetor [7].

O heterociclo ftalimida (IUPAC: 1,3-isoindolinadiona) é um importante protótipo estrutural, estando entre as 40 estruturas farmacofóricas mais promissoras para o desenvolvimento de drogas antitumorais, imunomoduladoras e anti-inflamatórias, segundo a “National Cancer Institute” (NCI, USA) [8]. Considerando os aspectos clínicos da doença, a ação imunomodulatória e anti-inflamatória de derivados ftalimidicos pode ser importante para o tratamento da doença de Chagas tanto na fase aguda quanto na doença crônica. A ftalimida atua tanto em determinadas cepas do *T. cruzi* quanto em outros parasitos [9].

Tiossemicarbazonas e seus bioisómeros (como, por exemplo, o heterociclo tiazol) também vêm apresentando bons resultados de inibição do *T. cruzi*. Estudos realizados em nosso laboratório (LpQM), com o auxílio de colaboradores, comprovaram a atividade antichagásica de compostos aril-tiossemicarbazonas e tiazolinonas, onde os resultados obtidos dos estudos de “docking” indicaram a possibilidade de inibição da cruzipaina do *T. cruzi* [10, 11, 12, 13]. Du e colaboradores (2002) descreveram inicialmente alguns derivados tiossemicarbazônicos com potente atividade antichagásica *in vitro*, destacando-se o composto **1i** (3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona) [14].

Este trabalho apresenta a síntese de duas séries de inéditas tiazolil-hidrazonas (uma série de análogos estruturais da **talidomida** e outra série de análogos da **3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona**) candidatas a fármacos antichagásicos, planejadas por estratégias de bioisosterismo e hibridação molecular.

## **1.2 OBJETIVO**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

No âmbito de um programa de pesquisas que visa à identificação de novos agentes tripanocidas e inibidores da cruzaina, objetivou-se realizar o planejamento e a síntese de novas hidrazona-tiazóis quimicamente funcionalizadas, estruturalmente planejadas através das estratégias de hibridação e bioisosterismo molecular, e posterior avaliação das propriedades antichagásicas desses compostos.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Sintetizar uma série de compostos (**PM01-10 e PA01**) constituída por inéditos derivados da ftalimida;
- Sintetizar uma série de compostos (**PT01.2-14**) constituída por inéditos derivados da 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona;
- Caracterizar quimicamente e elucidar estruturalmente todos os compostos através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (<sup>1</sup>H-RMN) e Carbono (<sup>13</sup>C-RMN), Infravermelho (IV) e Análise Elementar;
- Analisar 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% (IC<sub>50</sub>) e do índice de seletividade (SI) (em comparação com o Benznidazol);

## 1.3 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.3.1 Doença de Chagas

#### 1.3.1.1 História

Reconhecida pela OMS como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo [15], a doença de Chagas tem sido uma calamidade para a humanidade desde a Antiguidade, e continua a ser um relevante problema social e econômico em muitos países da América Latina [16, 3].

Esta infecção permanente, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e foi descoberto em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas (1879-1934) (**Fig. 1**). O relato original de Chagas [17] 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.

As conclusões dos estudos de paleoparasitologia, que recuperaram DNA do *T. cruzi* de múmias humanas, mostraram que a doença de Chagas já afligia o homem há 9000 anos [18].

Notavelmente, o primeiro caso relatado de doença de Chagas pode ter precedido a descoberta de Carlos Chagas - Charles Darwin possivelmente contraiu *T. cruzi* durante a sua expedição à América do Sul em 1835, como sugerido por sua vívida descrição de contato com o barbeiro, triatomíneos, e por alguns de seus sintomas na vida adulta [19].

**Figura 1 - Carlos Chagas**



### 1.3.1.2 Epidemiologia

A doença de Chagas era originalmente confinada em áreas pobres, rurais da América Central e do Sul, em que ocorre a transmissão por vetores ao homem. Nos últimos 20 anos, houve uma melhora nos programas de controle vetoriais (como as Iniciativas Cone Sul, Pacto de Andina e América Central para controlar/eliminar a doença de Chagas), e a triagem obrigatória nos bancos de sangue reduziram substancialmente novos casos de infecção e diminuíram a carga da doença de Chagas na América Latina [20].

Em pesquisas realizadas na década de 1980, 100 milhões de pessoas (25% de todos os habitantes da América Latina) estima-se que estavam em risco de infecção, e 17,4 milhões foram infectadas em 18 países endêmicos em 1980-85 [21].

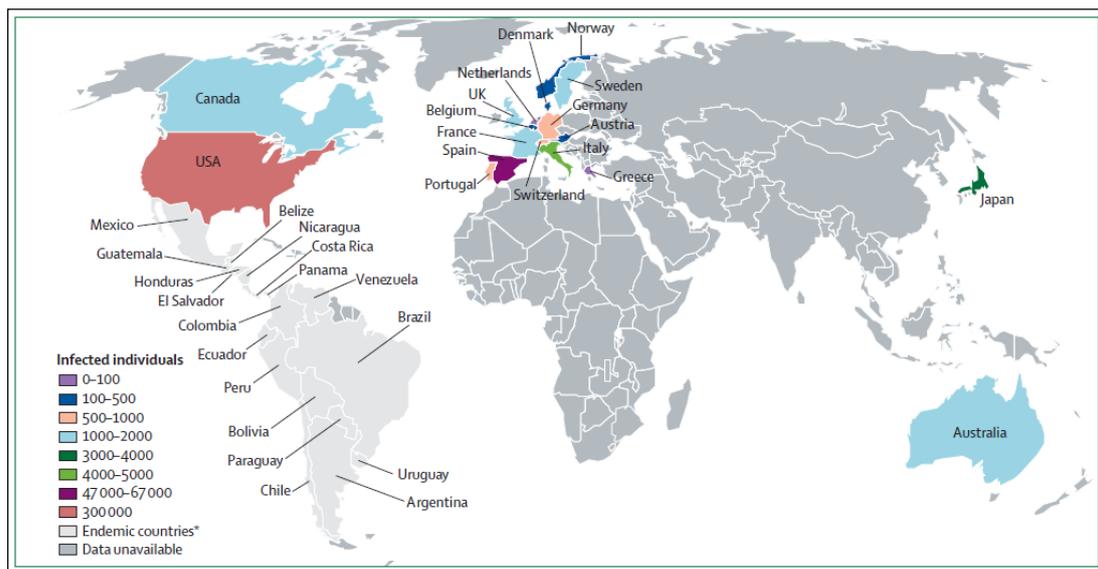
De acordo com estimativas da Pan American Health Organization [22], 20% da população da América Latina estavam em risco (109 milhões de indivíduos) e quase 7,7 milhões de indivíduos foram infectados em 2005 [22]. Além disso, a transmissão de *T. cruzi* pelas principais espécies de vetores domiciliares, *T. infestans*, foi estacionada no Uruguai em 1997, no Chile em 1999, e no Brasil em 2006. De acordo com a legislação federal, vários países endêmicos estão agora fazendo a triagem para *T. cruzi* em praticamente todas as doações de sangue [3], e o número de amostras de sangue infectado diminuiu substancialmente em todos os países da América Latina [21, 22].

Outras realizações importantes foram as reduções na incidência de novos casos da doença de Chagas (700.000 por ano em 1990 vs 41.200 por ano em 2006) e do número de mortes pela doença de Chagas (cerca de 50.000 por ano vs 12.500 por ano) [3]. Contudo, o recente influxo de imigrantes de países endêmicos para a doença Chagas, está fazendo com que a mesma se torne um importante problema de saúde nos EUA e Canadá e em muitas partes da Europa e no oeste do Pacífico, onde tem sido identificado um número crescente de indivíduos infectados (**Fig. 3**) [23]. O destino mais comum dos imigrantes da América Latina são os EUA, onde um número estimado de 300.167 indivíduos (principalmente do México) está infectado com o *T. cruzi* [24]. A Espanha tem o segundo maior número de imigrantes infectados, uma estimativa de 47.738–67.423, a maioria oriundos do Equador, Argentina, Bolívia e Peru [25].

Os dados mais recentes no Brasil apontam que a doença de Chagas segue como problema de saúde pública, sobretudo nas grandes cidades para onde convergiram pessoas infectadas pelo parasito, sejam aquelas assintomáticas ou oligossintomáticas em busca de trabalho, ou doentes em busca de tratamento. 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. Vê-se que é nas grandes cidades que se concentram os pacientes, especialmente na região sudeste. Por isso, não se pode negligenciar na atenção à transmissão e cuidados com pessoas infectadas pelo parasito, estejam elas com manifestações clínicas ou não, mesmo que a transmissão domiciliar por *Triatoma infestans* tenha sido interrompida com sucesso [2].

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



Dados fornecidos pelo Canadá, Austrália e Japão em 2006 [26]; os EUA em 2005 [24]; Espanha em 2008 [25]; e outros países da Europa em 2004–06 [23].

### 1.3.1.3 Mecanismos principais e atípicos de transmissão

#### 1.3.1.3.1 Transmissão vetorial

Doença de Chagas é transmitida aos seres humanos e mais de 150 espécies de animais domésticos e mamíferos selvagens (por exemplo, roedores, marsupiais e tatus), principalmente pelos insetos triatomíneos da subfamília *Triatominae*, no prazo de três ciclos sobrepostos: doméstico, peridoméstico e silvestre. Embora mais de 130 espécies de triatomíneos tenham sido identificadas, apenas uma parte delas são vetores competentes para *T. cruzi* [27].

*Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as três espécies de vetores mais importantes na transmissão do *T. cruzi* para o homem [21]. Historicamente, *T.*

*infestans* têm sido, de longe, o vetor mais importante e o principal em sub-regiões endêmicas da Amazônia (América do Sul). *R. prolixus* normalmente é relatado no norte da América do Sul e Central e *T. dimidiata* ocupa uma área similar, mas também se estende para o norte até o México. Triatomíneos têm cinco fases ninfais e adultos de ambos os sexos, e todos eles podem abrigar e transmitir o *T. cruzi*. A probabilidade de um triatomíneo estar infectado com *T. cruzi* aumenta em conformidade com o número de repastos tomados, de modo que ínstares mais velhos e adultos tendem a ter maiores taxas de infecção.

#### **1.3.1.3.2 Outros mecanismos de transmissão**

A doença de Chagas pode ser transmitida para o homem por mecanismos não vetoriais, como por transfusão de sangue e verticalmente da mãe para o feto. O risco de adquirir a doença de Chagas após transfusão de uma unidade de sangue de um doador infectado é menos de 10-20%, e depende de vários fatores, incluindo a concentração de parasitos no sangue do doador, a composição do sangue transfusionado, e, talvez, a estirpe do parasito [28, 29]. O risco de transmissão aparenta ser mais elevado para transfusão de plaquetas do que para outros componentes do sangue. A transmissão congênita ocorre em 5% ou mais das mulheres grávidas com infecção crônica em algumas regiões da Bolívia, Chile e Paraguai, e em 1-2% ou menos em muitos outros países endêmicos [30].

Estas diferenças podem ser atribuídas à estirpe do parasito, o estado imunológico da mãe, fatores placentários, e as diferentes metodologias empregadas para detecção dos casos congênitos. As transmissões por transfusão e congênitas são as principais formas de infecção de humanos em zonas urbanas e em países não endêmicos.

A transmissão de infecção por meio de transplante de um órgão sólido ou da medula óssea de um doador com infecção crônica é algo possível e tem sido bem documentado na América Latina. Em regiões não endêmicas, como os EUA e o Canadá, e muitas partes da Europa, poucos casos de infecção mediada por transfusão e transplante tem sido documentado [31], porém o atual número de casos pode ser substancialmente aumentado devido ao grande número de imigrantes de áreas endêmicas da América Latina.

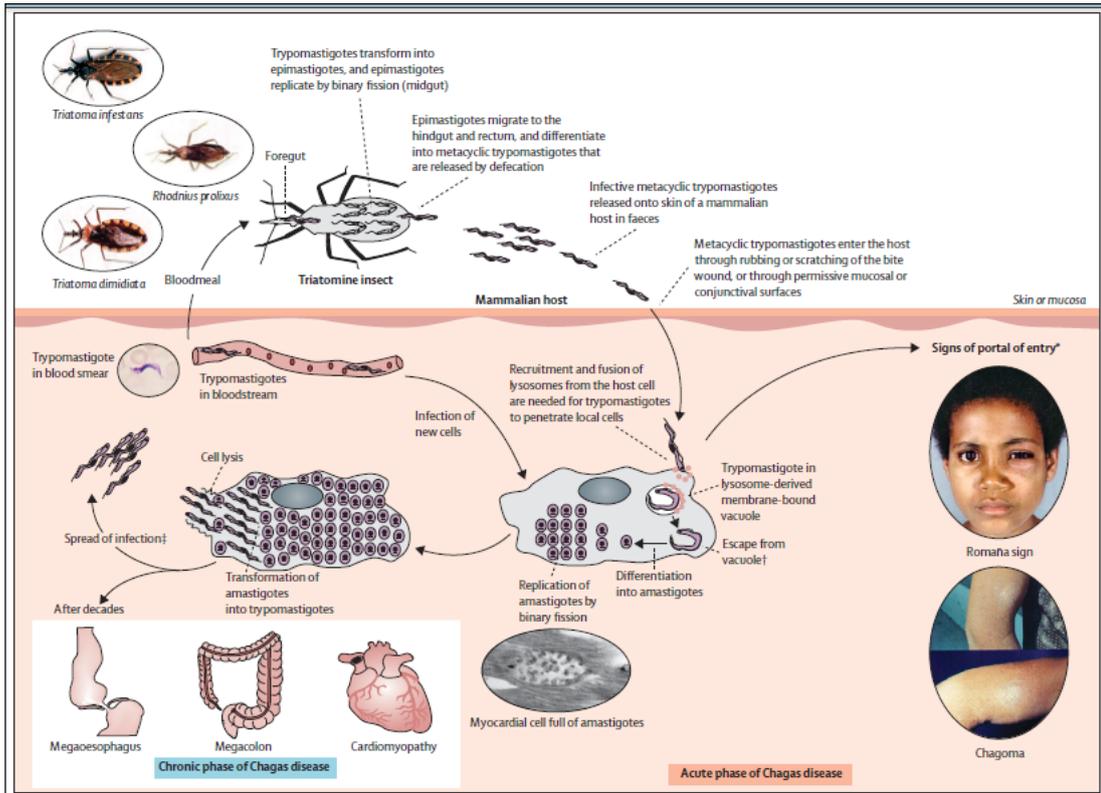
Raramente, a doença de Chagas pode ser contraída por ingestão de comidas ou líquidos contaminados com *T. cruzi*, e por acidentes em laboratórios que tratam parasitos vivos. A transmissão oral da doença de Chagas é comumente responsável por surtos de infecção aguda em áreas desprovidas de insetos vetores domiciliados. A ingestão de comida contaminada, como o suco da cana-de-açúcar, suco da fruta do açaí, ou carne crua, é

geralmente associada com uma massiva infecção parasitária, resultando na mais grave apresentação clínica aguda e com alta mortalidade [32].

#### **1.3.1.4 Ciclo de vida do *T. cruzi***

O ciclo de vida de *T. cruzi* é complexo, com vários estágios de desenvolvimento em insetos vetores e mamíferos hospedeiros. Tripomastigotas não replicativos, na corrente sanguínea, e amastigotas intracelulares replicativos, são as formas típicas do organismo, que são identificadas em hospedeiros mamíferos, enquanto epimastigotas replicativos e tripomastigotas metacíclicos infecciosos infectam o vetor triatomíneo (**Fig. 3**) [33].

Durante a fase aguda, todos os tipos de células nucleadas no hospedeiro humano são alvos potenciais para a infecção. Com o desenvolvimento da resposta imunológica, a parasitemia reduz-se a uma concentração subpatente e o número de parasitos nos tecidos diminui substancialmente, indicando o fim da fase aguda. No entanto, uma vez que o parasito não é completamente eliminado, a infecção de tecidos específicos, tais como o músculo ou gânglio entérico, persiste indefinidamente na vida do hospedeiro [34].

Figura 3 - Transmissão pelo vetor e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Penetração da membrana mucosa intacta do olho por tripomastigotas infecciosos leva a uma reação indolor da conjuntiva, com edema unilateral de ambas as pálpebras e linfadenite do gânglio da pré-auricular (sinal de Romaña); uma picada em qualquer outra parte da pele pode conduzir a uma reação no tecido subcutâneo com edema local e endurecimento, congestão vascular e infiltração celular (chagoma). † tripomastigotas na célula hospedeira escapam a partir do vacúolo parasitóforo e são libertados para o citoplasma por um mecanismo não usual: tripomastigotas transformam-se em amastigotas esféricas que começam a replicação, e quando a célula local fica inchada com amastigotas, transformam-se de volta para tripomastigotas com crescimento de flagelos. ‡ As tripomastigotas lisam as células infectadas, invadem os tecidos adjacentes e se espalham através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para locais distantes, principalmente células musculares (cardíaca, lisa e esquelética) e as células ganglionares, onde se submetem a novos ciclos de multiplicação intracelular. (Imagem do sinal de Romaña foi reproduzido de Rassi e colegas; [33] direitos autorais 2009 Editora Roca).

### 1.3.1.5 A diversidade genética do *T. cruzi*

*T. cruzi* pertence a espécies heterogêneas, constituídas por um conjunto de cepas, reunidas ou isoladas que circulam entre hospedeiros mamíferos e insetos vetores. A heterogeneidade do parasito tem sido extensivamente estudada por métodos biológicos, bioquímicos e moleculares, e poderia explicar as manifestações clínicas variadas da doença de Chagas e as diferenças geográficas na morbidade e mortalidade [35].

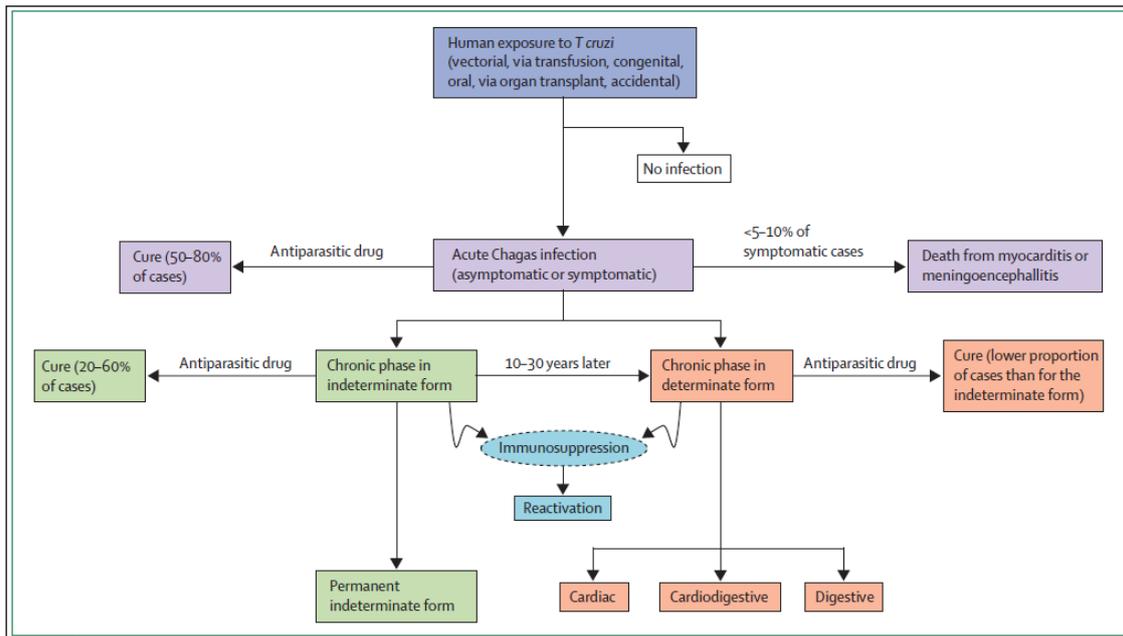
Em 1999, chegou-se a um consenso sobre as cepas de *T. cruzi* e duas linhagens principais foram descritas [36]. *T. cruzi I*, que predomina no ciclo de transmissão silvestre, aparenta ser menos resistente a drogas tripanocidas, e está associado à doença humana em todos os países endêmicos ao norte da bacia amazônica. *T. cruzi II*, que predomina no ambiente doméstico em todos os países do Cone Sul, aparentemente aumentou a resistência aos medicamentos tripanocidas e, ao menos no Brasil e na Argentina, foi comprovadamente relacionado com o dano tecidual causado pela doença de Chagas [37]. A linhagem *T. cruzi II* é subdividida em cinco unidades: IIa, IIb, IIc, IId, e IIe [38]. Em 2006, a existência de uma linhagem *T. cruzi III* foi relatada [39]. Não foi estabelecida nenhuma correlação entre a gravidade da doença e a linhagem do parasito.

O sequenciamento do genoma da cepa do *T. cruzi* CL Brener [40] (um membro da unidade IIe) abre perspectivas para o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas e terapêuticas, e poderia aumentar a compreensão dos mecanismos da doença.

#### **1.3.1.6 Fases, formas e evolução clínica**

A fase inicial da infecção com *T. cruzi* dura por 4–8 semanas e a fase crônica persiste por tempo de vida do hospedeiro [21]. A fase aguda é comumente assintomática ou pode apresentar uma doença febril auto-limitada. Os sintomas aparecem 1–2 semanas depois da exposição a triatomíneos infectados, ou até alguns meses após a transfusão de sangue infectado. O tratamento com uma droga antiparasitária, como o benznidazol, geralmente cura a infecção aguda [41] e previne as manifestações crônicas. Ocasionalmente pode ocorrer óbito na fase aguda (<5–10% dos casos sintomáticos) como um resultado de uma severa miocardite ou meningoencefalite, ou ambos (Fig. 4).

Figura 4 - História natural da doença de Chagas no homem [34].



As manifestações da fase aguda resolvem-se espontaneamente em cerca de 90% dos indivíduos infectados quando a infecção não é tratada com drogas tripanocidas. Cerca de 60–70% desses pacientes não desenvolvem doença clínica aparente. Esses pacientes têm a forma indeterminada da doença crônica, que é caracterizada pelo resultado positivo para anticorpos contra o *T. cruzi* no soro, eletrocardiograma (ECG) normal e exame radiológico normal do tórax, esôfago e cólon. Os restantes 30-40% de pacientes irão posteriormente desenvolver uma determinada forma da doença crônica — ou seja, cardíaca, digestiva (megaesofago e megacolon), ou cardiodigestiva — geralmente 10–30 anos após a infecção inicial (**Fig. 4**) [42]. Uma progressão direta da fase aguda para a forma clínica da doença de Chagas pode ser registrado em alguns pacientes (5–10%). 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 [43].

### 1.3.1.7 Patogênese e mecanismos patológicos

A patologia é principalmente caracterizada pela forma cardíaca, com cardiomiopatia dilatada associada com miocardite, fibrose e disfunção cardíaca. Cerca de 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma gastrointestinal que pode resultar em megacólon e/ou

megaesôfago, que são frequentemente associadas à forma cardíaca, constituindo a forma crônica mista [2].

Os danos nos órgãos e tecidos durante a infecção aguda pelo *T. cruzi* é causado pelo próprio parasito e pela resposta imuno-inflamatória aguda do hospedeiro, que é induzida pela presença do parasito [44]. As conclusões dos vários estudos em modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi* têm sugerido que a forte resposta imune T-helper-1 com células CD4 e CD8, e caracterizada pela produção de algumas citocinas específicas – como interferon  $\gamma$ , fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), e interleucina 12 – é importante no controle da parasitemia [45]. Por comparação, a produção de interleucina 10 e o fator de crescimento  $\beta$  estão relacionados com a replicação do parasito pela inibição da atividade do macrófago tripanocida [46]. A resposta imune T-helper-1 tem um papel protetor principalmente através da síntese de óxido nítrico (NO), que exerce uma potente ação tripanocida [47]. Durante a infecção crônica, o balanço entre contenção imunomediada do parasita e a inflamação prejudicial dos tecidos do hospedeiro provavelmente determina o curso da doença. Uma resposta imune bem executada, em que a carga parasitária é diminuída e as consequências inflamatórias são mantidas a um nível mínimo, resulta em dano tecidual reduzido [48].

Embora a patogênese da doença de Chagas crônica não seja completamente compreendida, um crescente consenso indica que a persistência do parasito é necessária para o desenvolvimento da doença [49]. No entanto, ainda não se sabe se o dano tecidual é causado principalmente por fatores diretos dos parasitos ou é acionado indiretamente através de mecanismos imunopatológicos impulsionados pelos parasitos ou mesmo autoimune [50]. Autoimunidade é observada em alguns pacientes e em modelos animais, e pode surgir a partir da ativação policlonal [51], automimetização molecular por antígenos do parasita [52], ou epítomos ocultos compartilhados pelo hospedeiro e parasito [53]. No entanto, para se confirmar um papel patogênico predominante de auto-imunidade na doença de Chagas, é preciso mostrar, inequivocamente, que a transferência de anticorpos ou células T de animais infectados com *T. cruzi* para células nativas resulta em miocardite, emulando o curso clínico da cardiopatia chagásica crônica. Inversamente, o estabelecimento da infecção crônica pelo *T. cruzi* está relacionado com a depressão da resposta de células T (T-cell) [54].

Na doença de Chagas crônica do coração, uma miocardite de intensidade baixa, lentamente progressiva, mas incessante leva ao comprometimento da função contrátil e da dilatação das quatro câmaras. Um aneurisma apical no ventrículo esquerdo e outras anormalidades semelhantes aos observados na doença cardíaca coronária, são comuns e costumam aparecer em estágios iniciais [55]. O exame histológico mostra a destruição

generalizada de células miocárdicas, fibrose difusa, edema, infiltração de células mononucleares no miocárdio, e cicatrizes no sistema de condução [56]. Tais danos, explicam a frequente ocorrência de bloqueios atrioventriculares, bloqueios intraventriculares e disfunção do nodo sinusal na cardiopatia chagásica. A destruição progressiva das fibras cardíacas e a intensa fibrose de substituição de miócitos mortos predisõem o paciente à insuficiência cardíaca e arritmias ventriculares [57]. Anormalidades na microvasculatura coronariana e hipoperfusão focal podem contribuir para o dano miocárdico [58]. A doença de Chagas gastrointestinal é causada pela destruição dos gânglios autonômicos intramurais, que afeta predominantemente o esôfago, o cólon ou ambos [59].

Marcante despovoamento neuronal pode ocorrer no coração, e a chamada teoria neurogênica para a patogênese da cardiomiopatia chagásica postula que a perturbação do sistema parassimpático permite a hiperatividade simpática [59]. Entretanto, esta teoria é falha, com muitos obstáculos conceituais e experimentais, que incluem a sutileza e a variabilidade da intensidade da deservação cardíaca em pacientes com cardiopatia chagásica, a ausência de correlação entre deservação parassimpática e da extensão da disfunção miocárdica, e o fato de que a deservação simpática (principalmente no nodo sinusal e no miocárdio) também ocorre durante as fases iniciais da doença [50].

### **1.3.1.8 Manifestações clínicas**

#### **1.3.1.8.1 Doença de Chagas aguda**

Em muitos indivíduos, independentemente do mecanismo de transmissão, a infecção aguda da doença de Chagas é comumente assintomática, provavelmente porque a carga parasitária é bastante pequena. Quando ocorrem sintomas, eles incluem: febre prolongada; mal-estar; aumento do fígado, baço e linfonodos; edemas subcutâneos (localizados ou generalizados); e, no caso particular de transmissão por vetor, os sinais de portal de entrada do *T. cruzi* através da pele (chagoma) ou através das membranas mucosas oculares (sinal de Romana; **Fig. 2**). Um ECG pode mostrar taquicardia sinusal, bloqueio atrioventricular em primeiro grau, baixa tensão de QRS, ou mudanças primárias da onda T, e uma radiografia de tórax pode mostrar graus variáveis de cardiomegalia [21, 60].

Repetição do ECG e radiografia de tórax é fundamental para a detecção dessas anormalidades. Em crianças congenitamente infectadas, os sintomas mais comuns, que podem ser aparentes no nascimento ou se desenvolver dentro de semanas após o parto, são febre,

hipotonicidade, hepatoesplenomegalia e anemia. Outros resultados incluem prematuridade, baixo peso ao nascer e índice de Apgar baixo [61]. Uma mulher infectada com *T. cruzi*, em qualquer fase da doença, pode dar à luz um feto infectado, em qualquer uma de suas gestações [34].

#### **1.3.1.8.2 Doença de Chagas crônica**

A evolução clínica da fase crônica da doença de Chagas vai desde a ausência de sinais e sintomas da doença (forma indeterminada) para doença grave e morte prematura. Manifestações clínicas típicas dessa fase estão relacionadas com envolvimento patológico do coração, esôfago, cólon, ou a combinação desses sintomas, e estão agrupados em três formas majoritárias: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva [62].

A forma digestiva é vista quase que exclusivamente ao sul da bacia amazônica (principalmente na Argentina, Brasil, Chile e Bolívia), e é rara no norte da América do Sul, América Central e México. Esta distribuição geográfica é provavelmente devido a diferenças nas linhagens do parasita [63]. Disfunção gastrointestinal (principalmente megaesôfago, megacólon, ou ambos) desenvolve-se em cerca de 10-15% dos pacientes infectados cronicamente [64]. Megaesôfago provoca disfagia com odinofagia, combinadas com dor epigástrica, regurgitação, sialorréia e desnutrição em casos graves. Megacólon muitas vezes afeta o segmento sigmóide, reto ou cólon descendente, ou uma combinação, e produz obstipação prolongada, distensão abdominal, e ocasionalmente grande obstrução intestinal devido ao fecaloma ou ao volvo sigmoide. Pacientes portadores de megaesôfago têm uma prevalência maior de câncer do esôfago [65]. Por outro lado, a maior frequência de câncer colorretal não tem sido relatada em pacientes com megacólon chagásico [66].

A forma cardíaca é a mais séria e a mais frequente manifestação da doença de Chagas crônica. Ela se desenvolve em 20-30% dos indivíduos e, normalmente, leva a alterações do sistema de condução, bradiarritmias e taquiarritmias, aneurismas apicais, insuficiência cardíaca, tromboembolismo e morte súbita [62]. As anomalias mais comuns no ECG são bloqueio de ramo direito, bloqueio divisional anterior esquerdo, extra-sístoles ventriculares, alterações ST-T, ondas Q anormais e baixa tensão de QRS. A combinação de bloqueio de ramo direito e bloqueio divisional anterior esquerdo é muito comum na cardiopatia chagásica [34].

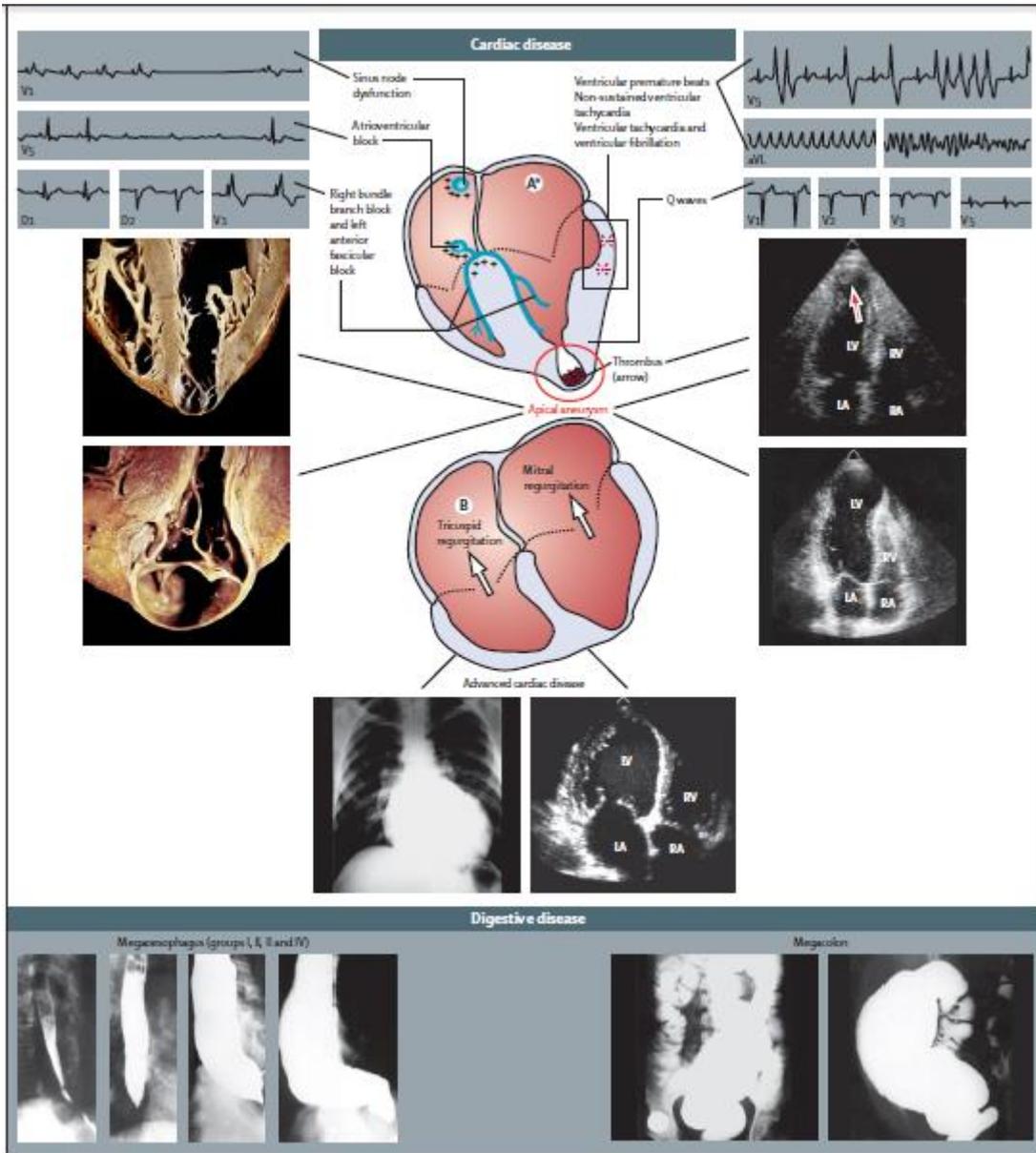
A insuficiência cardíaca é frequentemente uma manifestação tardia da cardiopatia chagásica. Geralmente é biventricular, com predomínio de insuficiência direita (edema

periférico, hepatomegalia e ascite mais proeminentes do que congestão pulmonar) em estágios avançados. Insuficiência cardíaca esquerda isolada pode estar presente nas fases iniciais da descompensação cardíaca [62]. A insuficiência cardíaca de etiologia chagásica está associada a maior mortalidade do que a insuficiência cardíaca de outras causas [67]. Embolias sistêmicas e pulmonares decorrentes de trombo mural nas câmaras cardíacas são bastante frequentes [68]. Clinicamente, o cérebro é, de longe, o local onde são mais frequentemente reconhecidas embolias (seguido de membros e pulmões), mas as embolias em necropsias são encontradas com mais frequência nos pulmões, rins e baço. A doença de Chagas é um fator de risco independente para acidente vascular cerebral em países endêmicos [69]. A morte súbita é a principal causa de morte em pacientes com cardiopatia chagásica, o que representa quase dois terços de todas as mortes, seguido de insuficiência cardíaca refratária (25-30%) e tromboembolismo (10-15%) [70].

A morte cardíaca súbita pode ocorrer mesmo em pacientes previamente assintomáticos. É geralmente associada com taquicardia ventricular e fibrilação ou, mais raramente, com bloqueio atrioventricular total ou disfunção do nodo sinusal. As principais causas de morte variam dependente do estágio da doença, com uma clara predominância de morte súbita nas fases iniciais, e um ligeiro predomínio de morte por insuficiência cardíaca em estágios avançados [34].

A associação de doença cardíaca com megaesofago ou megacólon, ou ambos, define a forma cardiodigestiva da doença de Chagas. Na maioria dos países o desenvolvimento de megaesofago geralmente precede a doença cardíaca e do cólon, mas a prevalência exata da forma cardiodigestiva não é conhecida por causa da escassez de estudos adequados. Os indivíduos com AIDS ou que recebem tratamento imunossupressor podem experimentar uma exacerbação de infecção crônica, levando a aumentos de parasitemia e replicação do parasita intracelular. Miocardite, febre, paniculite e lesões na pele são comuns em transplantados de órgãos sólidos ou de medula óssea [71, 72], enquanto que em pacientes com AIDS as manifestações mais comuns são meningoencefalite e lesões no sistema nervoso central que se assemelham às lesões de toxoplasmose cerebral [73]. A **Figura 5** resume as manifestações clínicas comuns associadas com a fase crônica da doença de Chagas.

Figura 5 - Resultados comuns na doença de Chagas crônica



(A) forma cardíaca segmentar. (B) forma global cardíaca dilatada. LV = ventrículo esquerdo. VD = ventrículo direito. LA = átrio esquerdo. RA = átrio direito. Partes deste valor foram reproduzidas a partir de Rassi e colegas [33]; direitos autorais Editora Roca 2009.

### 1.3.1.9 Diagnóstico laboratorial

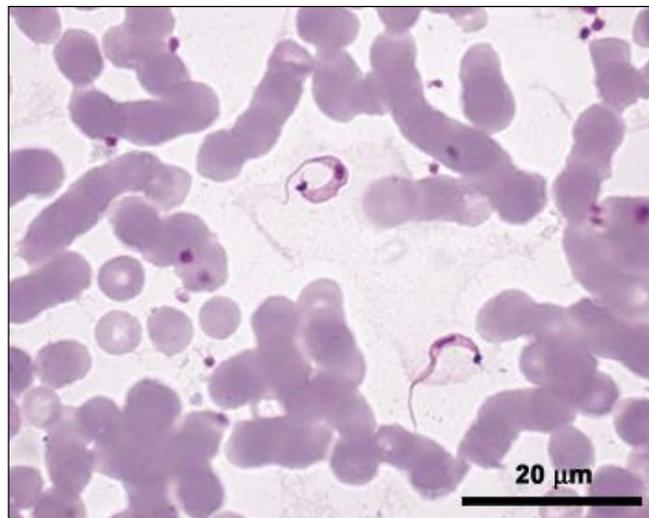
Na fase aguda e nas formas crônicas da doença de Chagas o diagnóstico etiológico poderá ser realizado pela detecção do parasito através de métodos parasitológicos (diretos ou indiretos) e pela presença de anticorpos no soro, através de testes sorológicos sendo os mais utilizados a imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação (HAI) e *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Testes de maiores complexidades como o teste molecular,

utilizando *polymerase chain reaction* (PCR) acoplado à hibridização com sondas moleculares, e o *Western blot* (WB) têm apresentado resultados promissores e poderão ser utilizados como teste confirmatório tanto na fase aguda como nas formas crônicas da doença [74].

#### **1.3.1.9.1 Fase aguda**

Na fase aguda da doença de Chagas o diagnóstico laboratorial é baseado na observação do parasito presente no sangue dos indivíduos infectados, através de testes parasitológicos diretos como exame de sangue a fresco, esfregaço e gota espessa (**Fig. 6**). O teste direto a fresco é mais sensível que o esfregaço corado e deve ser o método de escolha para a fase aguda. Caso estes testes sejam negativos, devem ser usados métodos de concentração. Os testes de concentração (micro-hematócrito) apresentam 80 a 90% de positividade e são recomendados no caso de forte suspeita de doença de Chagas aguda e negatividade do teste direto a fresco. Em casos sintomáticos por mais de 30 dias, devem ser os testes de escolha, uma vez que a parasitemia começa a declinar [74].

**Figura 6 - Formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*.**



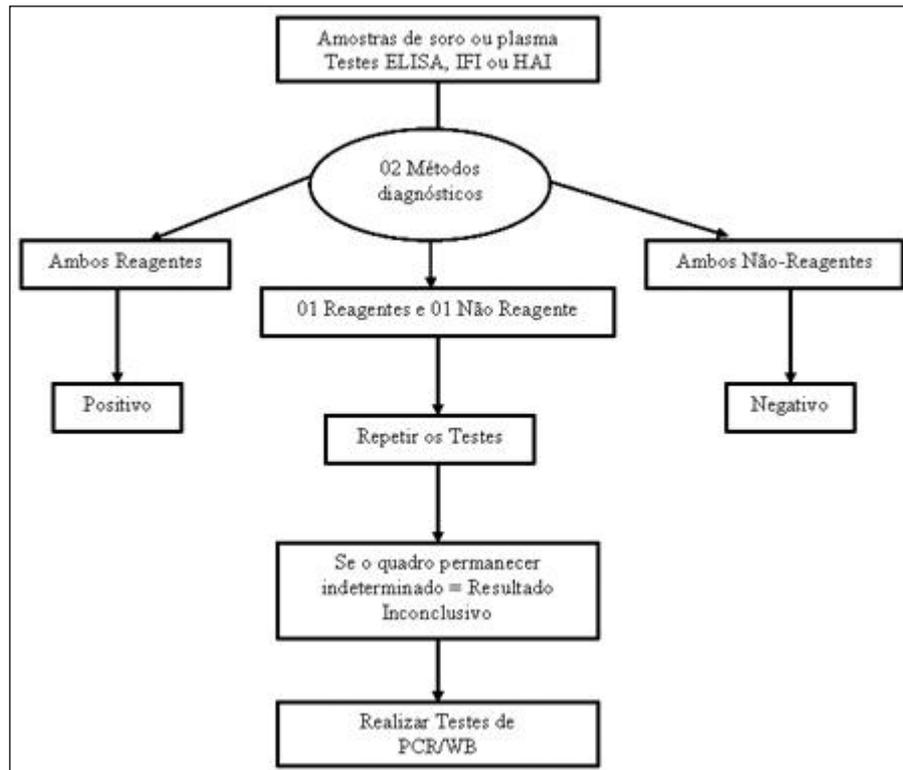
**Fonte:** Ministério da Saúde, 2005 [74].

#### **1.3.1.9.2 Fase crônica**

Na fase crônica da doença o diagnóstico parasitológico direto torna-se comprometido em virtude da ausência de parasitemia. Os métodos parasitológicos indiretos (xenodiagnóstico ou hemocultivo) que podem ser utilizados, apresentam baixa sensibilidade (20-50%). Sendo

assim, o diagnóstico na fase crônica é essencialmente sorológico e deve ser realizado utilizando-se dois testes de princípios metodológicos diferentes: um teste de elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou frações semi-purificadas do parasito ou a IFI) e outro de alta especificidade (ELISA, utilizando antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi*), conforme descrito no fluxograma apresentado na **Figura 7** [74].

**Figura 7 - Fluxograma para a realização de testes laboratoriais para a doença de Chagas na fase crônica**



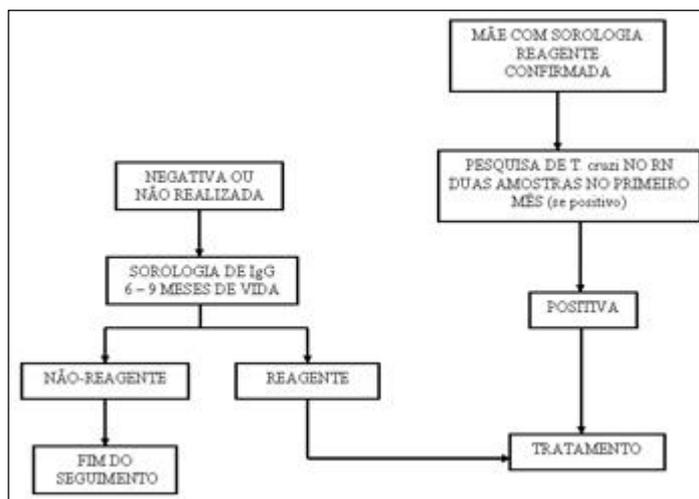
(Ministério da Saúde, 2005). PCR, Polymerase Chain Reaction; WB, Western Blot. **Fonte:** Ministério da Saúde, 2005 [74].

### 1.3.1.9.3 Transmissão vertical

Em casos suspeitos de transmissão congênita, é importante confirmar o diagnóstico sorológico da mãe. Caso a infecção materna seja confirmada, deve-se realizar o exame parasitológico no recém-nascido. Se for positivo, a criança deve ser submetida ao tratamento etiológico imediatamente. Os filhos de mães chagásicas com exame parasitológico negativo ou sem exame devem retornar entre seis e nove meses, a fim de realizarem testes sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG. Se a sorologia for negativa, descarta-se a transmissão vertical. A **Figura 8** apresenta o fluxograma de diagnóstico em casos suspeitos de transmissão vertical. Os casos positivos devem ser tratados, considerando-se a

alta taxa de cura nesta fase. Em virtude do elevado número de falso-negativos em transmissão congênita, não se recomenda a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* das classes IgM e IgA [74].

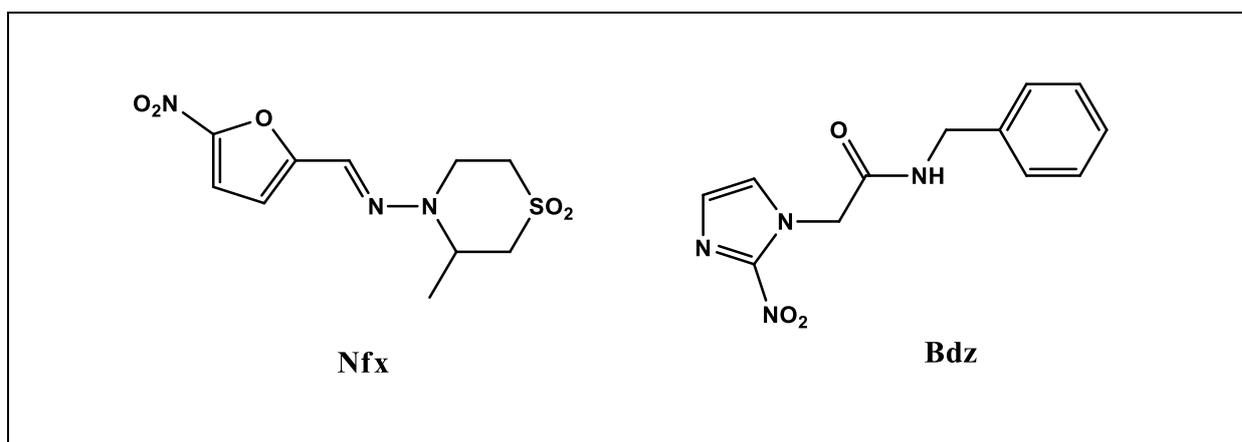
Figura 8 - Fluxograma para avaliação da transmissão vertical do *T. cruzi*.



(Ministério da Saúde, 2005) [74].

### 1.3.1.10 Tratamento clínico

Figura 09 - Estruturas do Nifurtimox (Nfx) e Benznidazol (Bdz). (Arquivo pessoal).



Nifurtimox e benznidazol (**Fig. 09**), cuja atividade anti-*T. cruzi* foi descoberta empiricamente há mais de três décadas atrás, são os dois únicos medicamentos disponíveis para o tratamento etiológico da doença de Chagas [75]. Nenhum destes compostos é ideal porque:

- não são ativos durante a fase crônica da doença e apresentam sérios efeitos colaterais;

- requerem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica;
- há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasito a ação destas drogas;
- populações de parasitos resistentes a ambos compostos têm sido relatadas e
- apresentam alto custo.

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 [4]. 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 drogas no paciente nesta situação permanece incerta [75]. 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 [4].

Estudo com jovens crônicos tratados com benznidazol demonstrou cerca de 60% de negatização 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 [4].

O consenso atual de autores latino-americanos é tratar todas as pessoas infectadas com o *T. cruzi* com benznidazol ou nifurtimox até 18 anos de idade. Benznidazole 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. No entanto, como foi dito anteriormente, ambas as drogas podem ter efeitos secundários numerosos em adultos. Os mais frequentes descritos no caso do nifurtimox são dor abdominal, anorexia, perda de peso, náuseas e vômitos. As possíveis reações neurológicas são inquietação, desorientação, esquecimento, insônia, espasmos, parestesias, polineurite e crise convulsiva, que desaparecem através da redução da dose ou após a suspensão do tratamento [75].

Não havia formulações pediátricas, apesar do fato de que crianças até 12 anos possuírem maiores chances de se beneficiarem com o tratamento por não apresentarem ainda

a sintomatologia crônica da doença. Porém, uma concentração pediátrica do benznidazol para a doença de Chagas – desenvolvida pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), em parceria com a DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative)– já está disponível para compra via Fundo Estratégico da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) ou por contato direto com o laboratório. O novo medicamento será utilizado em crianças com até dois anos de idade [76].

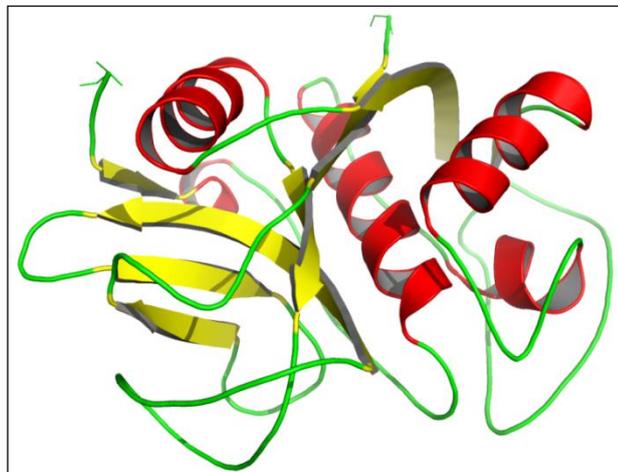
### **1.3.1.11 Desenvolvimento de novas drogas**

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 drogas para o tratamento da doença de Chagas, assim como outras doenças negligenciadas, não é muito viável para as indústrias farmacêuticas. Entre 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 [4].

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 [4].

### 1.3.1.12 Cisteína protease

Figura 10 - Representação da Cruzaína [77].



*T. cruzi* possui uma cisteína proteinase semelhante a L-catepsina denominada de cruzipaína (ou cruzaína) (**Fig. 10**), que é a principal responsável pela atividade proteolítica em todas as fases do ciclo evolutivo do parasito. Inibidores irreversíveis de cruzipaína do tipo peptidil tais como diazometilcetonas, fluorometilcetonas, alilsulfonas, vinilsulfonas e vinilsulfonamidas, foram investigados como potenciais agentes anti-*T. cruzi*. Em epimastigotas, inibidores do tipo peptidil bloquearam a maturação de cruzipaína e seu transporte para lisosomas, levando ao acúmulo da sua proteína precursora no complexo de Golgi e à interferência na via de secreção [4].

Utilizando N-piperazinil-F-Ala-homoF-Ala-vinilsulfona-fenila observa-se um aumento no número de vesículas que se dirigem do Golgi para a bolsa flagelar do parasito, interferindo na função do Golgi. Tratamento de camundongos infectados com a peptidil vinilsulfona, N-metilpiperazina-F-homoF-vinilsulfona-fenila, leva à redução da carga parasitária e das lesões cardíacas. O mesmo composto foi utilizado em cães, sendo observada uma regressão do dano do miocárdio induzido pela infecção por *T. cruzi*. Certo número de inibidores da cruzaína estruturalmente diversos tem sido relatado [4].

Uma ênfase especial tem sido aplicada para identificar inibidores não peptídicos. Com base na relação bioisostérica conhecida entre ligações peptídicas e ureias, os primeiros inibidores não peptídicos da cruzaína identificados foram aril-ureias e tioureias, que exibiram uma afinidade moderada contra cruzaína e atividade antiproliferativa em culturas de formas amastigotas [78]. Após estas constatações, tiossemicarbazonas e seus pirazolina-1-tiocarboxiamida bioisosteres foram explorados como inibidores potenciais da cruzaína, uma

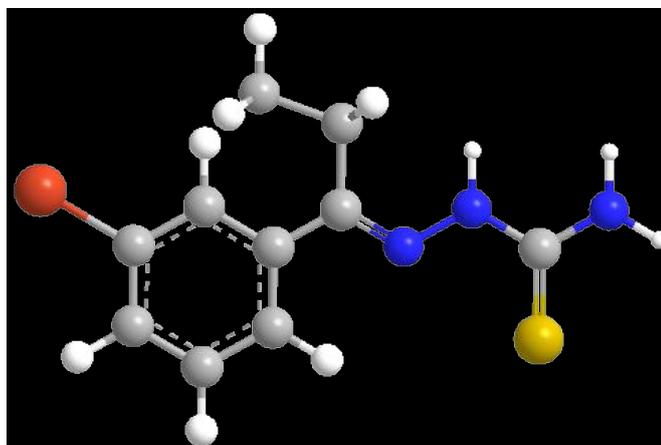
vez que tioureias e tiossemicarbazonas são classicamente consideradas como bioisósteres. Esta abordagem rendeu agentes altamente eficazes contra a enzima e as culturas de células do parasito. Inspiradas pela potência de tiossemicarbazonas, outras classes de inibidores não peptídicos cruzafina têm sido desenvolvidas, explorando amidas funcionalizadas, hidrazonas e triazoles/triazinas, N-acylhydrazones, vinilsulfonas, e chalconas como protótipos estruturais [13].

### 1.3.2 3'-Bromopropilfenona-tiossemicarbazona

Du e colaboradores (2002) identificaram uma nova série de pequenas moléculas que inibem fortemente a infecção pelo *T. cruzi* e servem como promissores agentes para a terapia tripanocida [14].

Dentre as tiossemicarbazonas inicialmente obtidas por Du e colaboradores, o composto **1i** (3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona) (**Fig. 11**) apresentou atividade tripanocida significativa sem causar toxicidade para células hospedeiras ou problemas de solubilidade. As células infectadas tratadas com **1i** a 10  $\mu\text{M}$  foram curadas da infecção tripanossoma. Para confirmar a actividade tripanocida, as células infectadas foram tratadas com **1i** durante três semanas e, em seguida, **1i** foi removido da cultura de células. Nenhum parasito foi observado em qualquer um dos sobrenadantes da cultura ou nas células hospedeiras. As células estavam saudáveis e livres do parasito até o experimento ser encerrado em 6,5 semanas após infecção [14].

**Figura 11** - Representação estrutural em 3D da 3'-Bromopropilfenona-tiossemicarbazona.



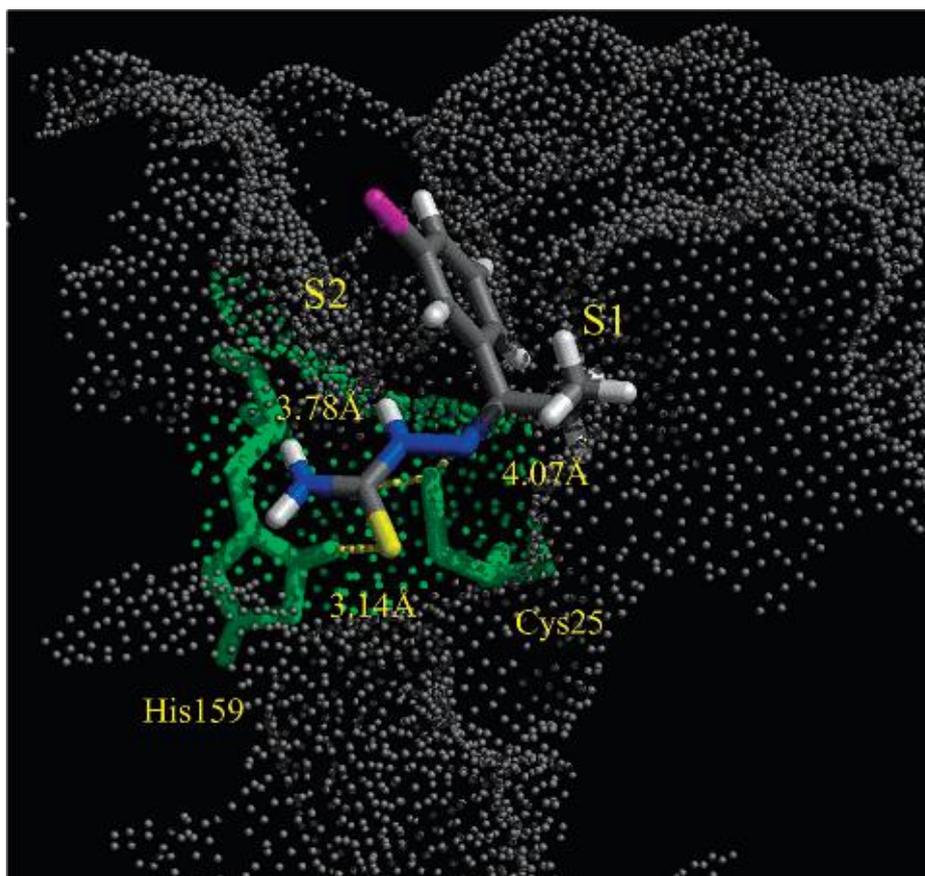
Vermelho, bromo; carbono, cinza; hidrogênio, branco; nitrogênio, azul; enxofre, amarelo (Arquivo pessoal).

O composto **1i** apresentou melhor resultado de inibição da atividade da Cruzaína dentre as 14 tiosemicarbazonas testadas, com um valor de IC<sub>50</sub> de 100nm (**Fig. 12**).

Seguindo esta linha, mais de 100 compostos foram desenhados e sintetizados. Relação estrutura-atividade específica (SAR) foi estabelecida, e muitos análogos potentes com valores de IC<sub>50</sub> na faixa de nanomolar foram identificados. Oito análogos adicionais apresentaram atividade tripanocida em um ensaio de cultura de células, e isso indica que ariltiosemicarbazona é uma importante estrutura para matar os parasitos. Os estudos cinéticos mostram que estes são inibidores dependentes do tempo [14].

Estudos de modelagem molecular do complexo enzima-inibidor tem levado a uma proposta de mecanismo de interação, bem como avaliação de SAR da série tiosemicarbazona. A natureza não-peptídico desta série, a pequena dimensão e custo extremamente baixo de produção sugerem que esta é uma direção promissora para o desenvolvimento de nova quimioterapia antitripanosoma [14].

**Figura 12** - Melhor cálculo de orientação do composto **1i** no sítio ativo da cruzaína.

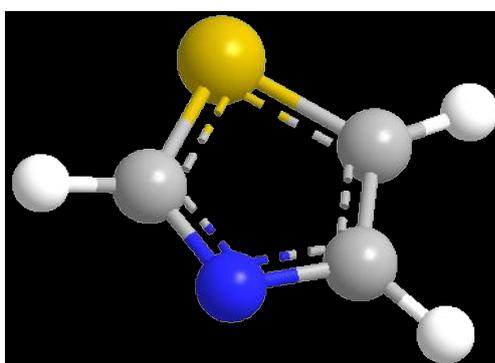


A superfície do sítio ativo da cruzaína é representado por pontos cinzentos. O composto **1i** é colorido de acordo com os tipos de átomos: magenta, bromo; carbono, cinza; hidrogênio, branco; nitrogênio, azul; enxofre, amarelo [14].

### 1.3.3 Tiazóis

Tiazóis (**Fig. 13**) e seus derivados têm atraído um interesse contínuo ao longo dos anos devido à suas atividades biológicas variadas, a aplicação encontrada no desenvolvimento de drogas para o tratamento de alergias, hipertensão, inflamação, esquizofrenia, infecções bacterianas, por HIV, hipnóticos, para o tratamento da dor, como antagonistas dos receptores de fibrinogênio com atividade antitrombótica, e inibidores da DNA girase bacteriana B [79].

**Figura 13** - Representação em 3D do anel 1,3-tiazol



O anel está colorido de acordo com o tipo de átomo: enxofre, amarelo; nitrogênio, azul; carbono, cinza; hidrogênio, branco (Arquivo pessoal).

Biólogos estão familiarizados com o tiazol pelo seu papel chave na atividade catalítica do pirofosfato de tiamina (TPP), uma coenzima importante na respiração no ciclo de Krebs (**Fig. 14**). O anel de tiazol, além disso, é um protótipo estrutural que está presente em numerosos compostos bioativos naturais. Epotilonas (**Fig. 14**) e a grande família de antibióticos macrocíclicos tiopeptídios, dos quais o protótipo estrutural é a tiostreptona (**Fig. 14**), são exemplos bem conhecidos de biomoléculas contendo tiazol. Outro exemplo notável de produto natural contendo tiazol é a micrococcina P1 (**Fig. 14**), um antibiótico tiopeptídio ativo contra microrganismos resistentes à vancomicina, cuja estrutura foi estabelecida por síntese total, cerca de 60 anos após o seu isolamento [80].

Frequentemente estas substâncias são caracterizadas como tiazóis 2,4-dissubstituídos, muitos dos quais são isolados a partir de fontes naturais. Vários exemplos desta família têm estimulado esforços para a síntese orgânica. Os químicos medicinais têm procurado incorporar o heterociclo tiazol no desenvolvimento de drogas e estudos de relação estrutura-atividade. São geralmente preparados pela síntese de Hantzsch (**Fig. 15**), baseada na condensação de compostos  $\alpha$ -halocarbonílicos com tioamidas ou tiouréias substituídas ou

não, sendo um dos primeiros e mais amplos métodos sintéticos empregados para obtenção de tiazóis substituídos [81].

Sabe-se que o 2-aminotiazol (Fig. 16) é um composto biologicamente ativo com uma ampla gama de atividade e também é um intermediário na síntese de antibióticos e corantes [82].

Outro importante grupamento farmacofórico em que o anel tiazol está presente é a tiazolil-hidrazona. Como resultado de trabalhos anteriores em nosso laboratório (LpQM), novos potentes inibidores da cruzaina e inibidores do crescimento do *T. cruzi* foram identificados, tais como as tiazolil-hidrazonas 3b e 3j (Fig. 16). O composto 3j exibiu uma seletividade pelo menos 30 vezes maior para o parasito do que contra células de mamíferos, merecendo uma avaliação mais aprofundada em modelo animal [13].

Figura 14 - Exemplos de produtos bioativos naturais contendo tiazol [80]

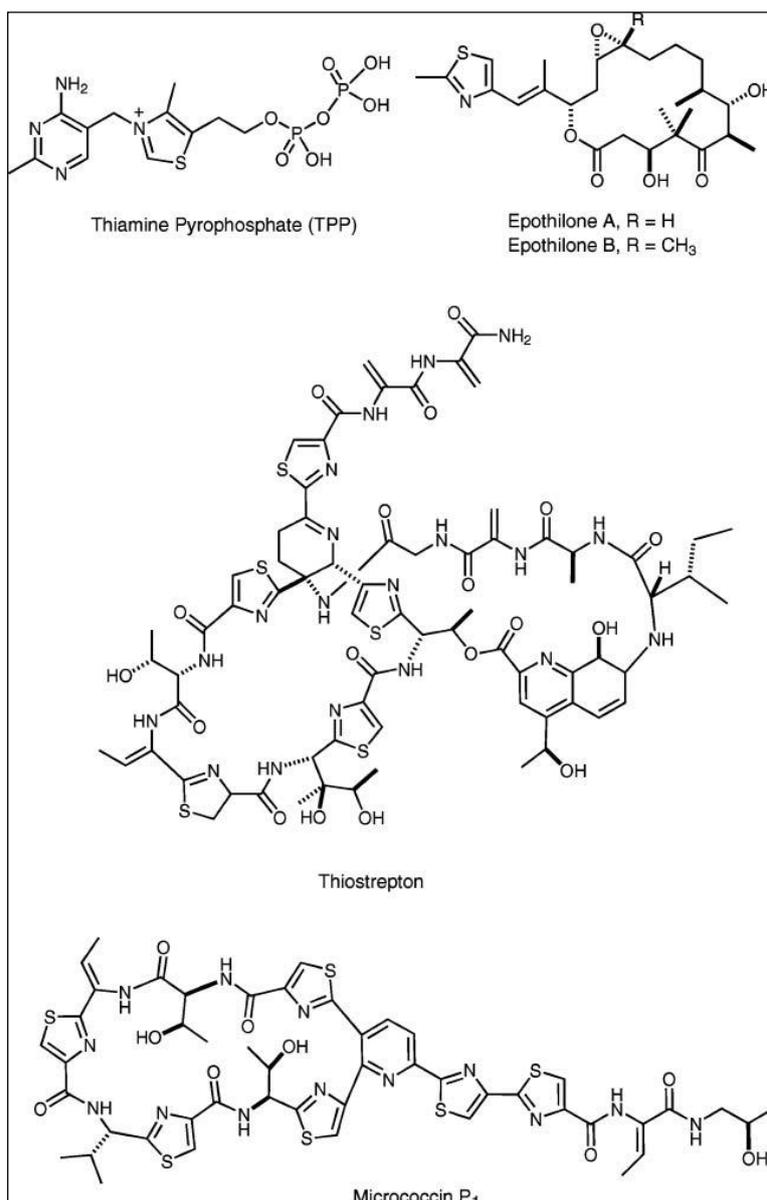


Figura 15 - Proposta de mecanismo da reação de Hantzsch

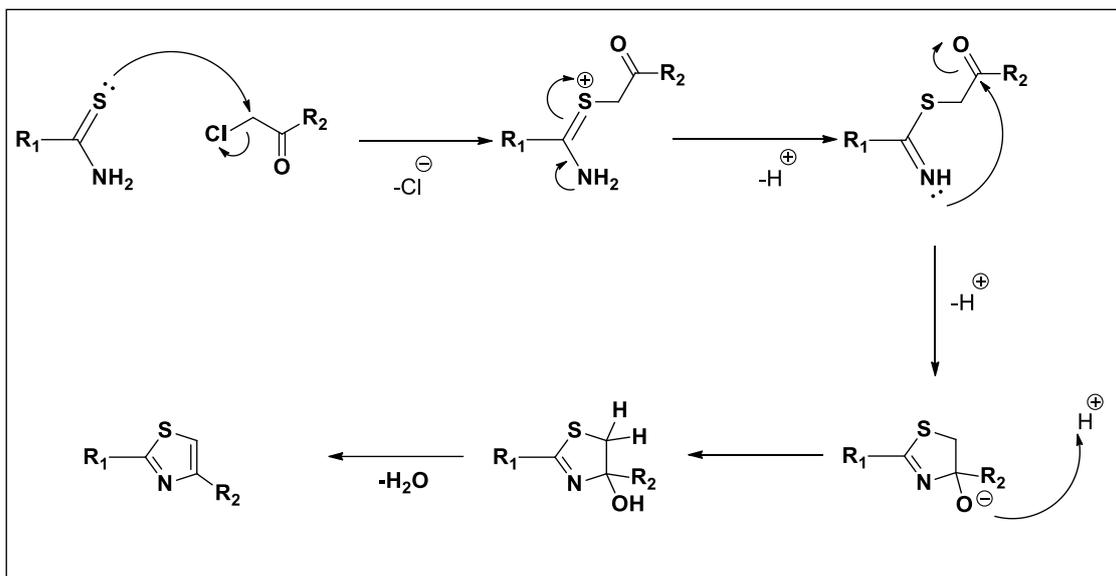
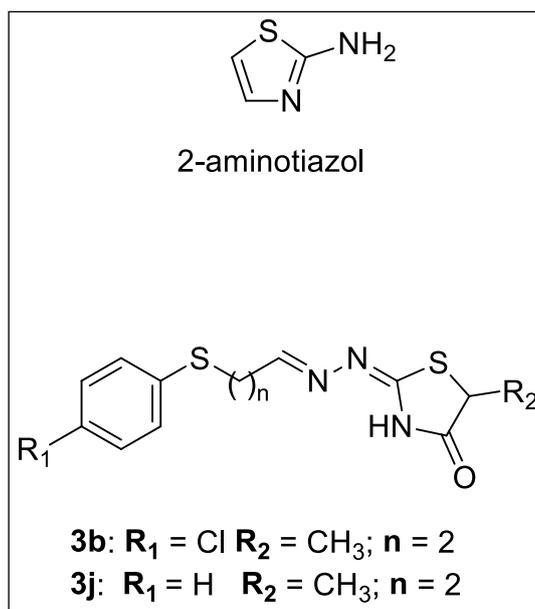


Figura 16 - Estrutura do 2-aminotiazol e das tiazolil-hidrazonas 3b e 3j [13]



### 1.3.4 Talidomida

A talidomida ((±)*N*-ftalimidoglutarimida) ou ((±)2-(2,6-dioxo-3-piperidinil)-1*H*-isoindol-1,3-(2*H*)-diona) foi introduzida no mercado farmacêutico em 1956, pela indústria farmacêutica alemã “Chemie Grünenthal”, como sedativo e hipnótico, tornando-se em pouco tempo o medicamento mundialmente mais popular para o tratamento da insônia, devido à notável ausência de toxicidade aguda [83].

Neste período, evidenciou-se um aumento pronunciado no número de casos de más formações congênitas na Europa e na Ásia, destacando-se a focomelia, uma alteração no desenvolvimento fetal dos ossos longos, resultando em encurtamento dos membros, podendo ou não ser observada a manutenção das extremidades [84].

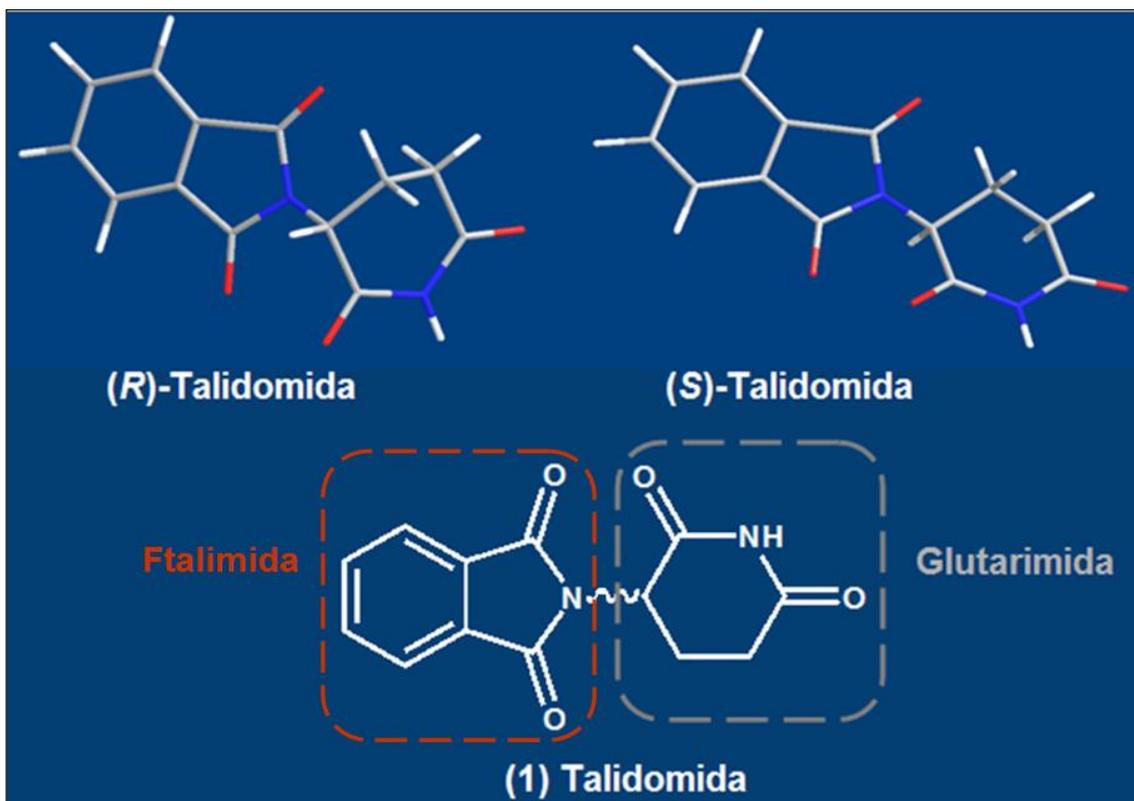
No início da década de 60, foi descrito o perfil teratogênico da talidomida, associando a utilização deste composto, durante o primeiro semestre de gestação, a taxas alarmantes de alterações congênitas [85], incluindo focomelia, ausência de orelhas, ocorrência de lábio leporino e fenda palatina, más formações cardíacas e gastrointestinais [86]. Aproximadamente 12.000 crianças em todo mundo nasceram com anomalias relacionadas ao uso da talidomida por gestantes entre as décadas de 1950 e 1960, resultando no cancelamento da licença de comercialização deste fármaco no mercado mundial em 1962 [87].

A identificação das propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras promissoras da talidomida culminaram na renovação do interesse por este composto. Como consequência, em julho de 1998, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou, sob rígido controle, o emprego da talidomida para tratamento das manifestações cutâneas moderadas a severas da lepra lepromatosa, marcando de forma definitiva o renascimento deste fármaco [88]. Após aprovação da talidomida pelo FDA, para o tratamento do eritema nodoso leproso, uma série de ensaios clínicos foi iniciada visando a avaliação do potencial terapêutico da talidomida no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes relacionadas ao aumento da concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , tais como artrite reumatoide e doença de Crohn [89].

Em 2006, a talidomida foi aprovada pelo FDA para o tratamento do mieloma múltiplo, tendo sido demonstrada a sua eficácia sobre um amplo espectro de doenças malignas e não-malignas [86].

A talidomida consiste em uma bis-imida, contendo um anel ftalimídico ligado à subunidade glutarimídica quirais. No anel glutarimídico existe um único centro estereogênico, fornecendo uma mistura racêmica dos enantiômeros dextrorrotatório (*R*) e levorrotatório (*S*) (Fig. 17) [86].

Figura 17 - Representação ilustrativa dos enantiômeros da talidomida [86].



A resolução cromatográfica dos isômeros e administração das espécies enantiopuras sugeriram inicialmente que o efeito teratogênico da talidomida era proveniente do emprego do enantiômero (*S*), enquanto seu antípoda era desprovido de ação embriotóxica [90]. No entanto, a validade desta afirmativa é questionável, uma vez demonstrado que a estereoespecificidade da ação teratogênica da talidomida é dependente da espécie animal estudada [86].

Embora várias hipóteses tenham sido postuladas para explicar os efeitos teratogênicos da talidomida, o mecanismo bioquímico responsável pela resposta embriotóxica em humanos e cobaias permanece obscuro e contraditório [91]. A dificuldade na conclusão sobre o mecanismo de indução de teratogenicidade pela talidomida se deve, entre outros fatores, à sua baixa solubilidade e instabilidade na biofase [92]. Por outro lado, as diferenças significativas encontradas nos processos farmacocinéticos de absorção, metabolização, bioativação e eliminação e na embriotoxicidade, quando avaliados em diferentes modelos animais, dificultam a extrapolação dos resultados para a espécie humana [93]. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que o efeito sedativo da talidomida está associado ao enantiômero (*R*), enquanto o perfil imunomodulatório é relacionado à capacidade do enantiômero (*S*) em inibir a produção e liberação de TNF- $\alpha$  [88].

Objetivando aprimorar as propriedades farmacocinéticas da talidomida e reduzir seus efeitos teratogênicos, inúmeros esforços de pesquisa têm sido feitos na busca de análogos otimizados, com melhor perfil farmacoterapêutico, partindo-se da premissa de que se poderiam identificar e excluir os grupamentos toxicofóricos presentes na talidomida, resguardando-se os grupamentos farmacofóricos [94].

A primeira abordagem do planejamento e síntese de novos análogos da talidomida fundamentou-se em estudos prévios da relação entre a estrutura química e a atividade (SAR), visando identificar os grupamentos farmacofóricos necessários à atividade farmacológica pretendida. Com este intuito, modificações nas subunidades glutarimida e ftalimida foram realizadas.

Modificações estruturais da subunidade glutarimida demonstraram a irrelevância do grupamento glutarimídico na atividade anti-TNF- $\alpha$  da talidomida [95]. A substituição do grupamento glutarimida por um anel fenílico reduz a atividade anti-TNF- $\alpha$ . [96].

Derivados *N*-fenilftalimídicos funcionalizados demonstraram que substituições nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel fenila, por grupos alquilas, contribuem para o aumento da atividade anti-TNF- $\alpha$ . Modificações na subunidade ftalimida são acompanhadas por decréscimo na atividade farmacológica [97]. Esses resultados revelam o potencial farmacofórico do anel ftalimídico e denotam a irrelevância do grupamento glutarimida na atividade anti-TNF- $\alpha$ .

### 1.3.5 Atividade da Ftalimida sobre parasitos

A atividade de compostos contendo como grupamento farmacofórico a ftalimida, tanto sobre bactérias quanto sobre parasitos patogênicos, é muito relatada na literatura. Compostos derivados da *N*-hidroximetilftalimida inibem o desenvolvimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Aerobacter aerogenes* em meio de cultura. Ésteres derivados da *N*-hidroximetilftalimida demonstram atividade sobre o desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti* e sobre o molusco *Biomphalaria glabrata*. [9].

Derivados *N*-aquil e *N*-arilftalimidas apresentam atividade sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*, demonstrando comportamento diferenciado em relação às cepas com características morfológicas diferentes. *N*-clorometilftalimida, *N*-hidroxietilftalimida e *N*-hidroxiftalimida apresentam atividade “in vitro” sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* de diferentes cepas. Algumas aminas alifáticas e aromáticas derivadas da *N*-aminometilftalimida, apresentam atividade significativa sobre a cepa Y de *T.*

*cruzi* na forma tripomastigota. Derivados da N-aminometilftalimida possuem considerável potencial tripanocida frente às formas tripomastigotas e epimastigotas “in vitro” [9].

Sabe-se que os derivados da ftalimida influenciam na produção de TNF- $\alpha$ , desempenhando um importante papel no controle da infecção através da regulação dos níveis de macrófagos e de NO (Óxido Nítrio).

O NO está envolvido em uma variedade de funções biológicas em diferentes sistemas, como a vasodilatação sanguínea, agregação plaquetária e neurotransmissão [98]. É considerada também como uma importante molécula efetora antimicrobicida em macrófagos contra patógenos intracelulares, incluindo: *Leishmania major* [99], *Toxoplasma gondii* [100] e *Trypanosoma cruzi* [101].

Apesar da participação positiva das citocinas no processo de controle da infecção por *T. cruzi*, estas não conferem uma resistência completa, podendo alguns microrganismos persistir ou induzirem uma infecção subpatente, possivelmente resultando em uma doença crônica [102].

Sabe-se que altos níveis de NO podem desempenhar uma ação patogênica ao indivíduo infectado, incluindo a depressão da função do miocárdio e causar morte celular, podendo estar relacionado com a patologia da doença de Chagas na fase crônica [104]. Entretanto, o aumento dos níveis da produção de NO pelos macrófagos pode induzir a elevação da destruição e até mesmo a eliminação total dos parasitos intracelulares [102]. O aumento dos níveis da produção do NO, está relacionado com a redução da parasitemia em camundongos experimentalmente infectados. [103].

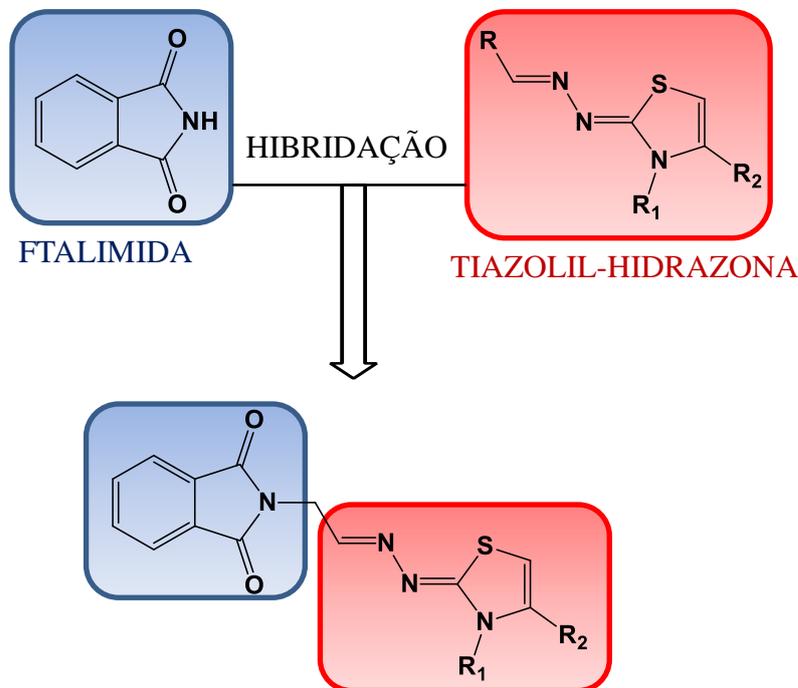
Derivados N-aminometilftalimidás aumentaram a indução da produção de NO por macrófagos peritoneais, obtidos de *Mus musculus*, quando comparados com IFN- $\gamma$  e LPS (lipopolissacarídeos) [9].

# **Capítulo 2**

## **Ftalil-Hidrazona-Tiazóis**

## 2.1 PLANEJAMENTO DA SÉRIE QUÍMICA

Esquema 1 - Planejamento da série química PM01-10 e PA01



Para a obtenção da série **PM01-10** foram inicialmente selecionados grupos farmacofóricos destacados por suas propriedades biológicas. Assim, o anel ftalimida foi escolhido por apresentar relatos na literatura de sua atividade sobre parasitos patogênicos [9]. Outro grupo farmacofórico escolhido foi a tiazolil-hidrazona (bioisómero cíclico da tiossemicarbazona) que está presente em compostos que, em trabalhos anteriormente realizados em nosso laboratório (LpQM), se mostraram potentes inibidores da cruzaina e inibidores do crescimento do *T. cruzi* [13]. De posse dos grupos farmacofóricos de base, foi utilizada a ferramenta química de hibridação molecular (**Esquema 1**).

Somando-se a esta técnica foi empregado o bioisosterismo, onde foram utilizados variados substituintes químicos como grupo metil, metóxi, nitro, halogênios (F, Cl, Br), para as moléculas da série aqui proposta. Esta técnica permite uma posterior análise da relação estrutura-atividade (SAR) e assim apurar a especificidade das moléculas. A utilização dos substituintes halogenados foram selecionados devido à possibilidade de melhoria da absorção oral, da permeabilidade, da estabilidade metabólica e química, formação de ligação halogênio no alvo farmacológico contribuindo para a estabilidade da ligação fármaco-receptor, além das contribuições estéricas dessa classe na interação com alvos farmacológicos [105].

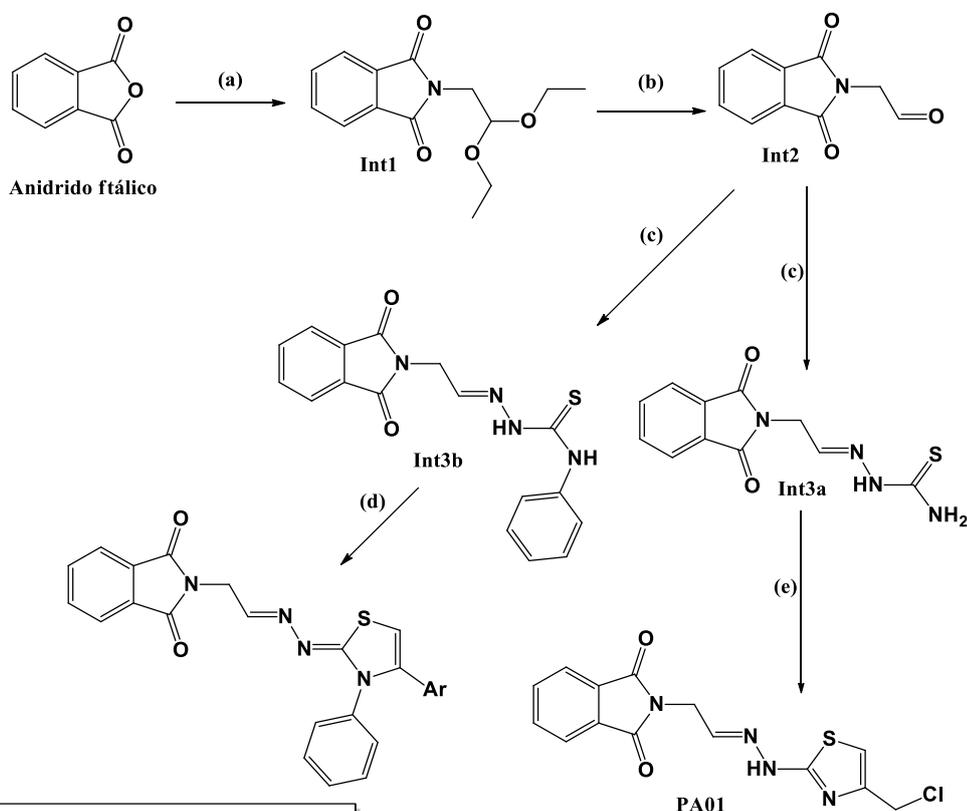
As metodologias de síntese propostas foram eficazes na obtenção dos produtos desejados em bons rendimentos, com tempo reacional variando em torno de três horas. Além de serem utilizados reagentes economicamente viáveis.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1 Parte Química

#### 2.2.1.1 Obtenção da Série Química:

Esquema 2 - Sínteses dos compostos PM01-10 e PA01



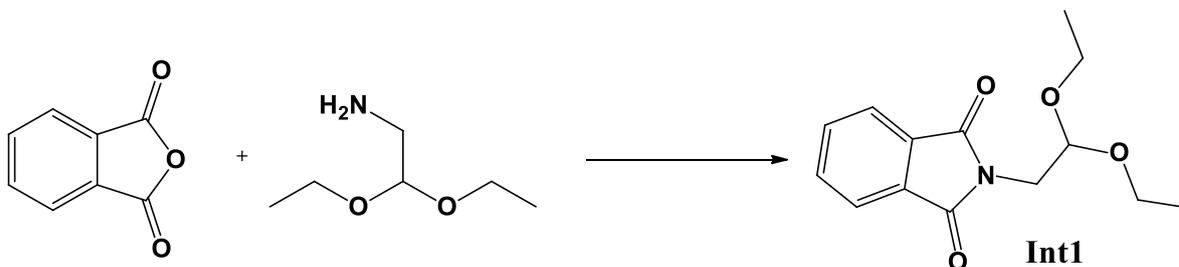
Código da amostra	Ar
PM01	Ph
PM02	4-Me-Ph
PM03	4-MeO-Ph
PM04	3-NO <sub>2</sub> -Ph
PM05	4-NO <sub>2</sub> -Ph
PM06	4-Cl-Ph
PM07	4-Br-Ph
PM08	4-F-Ph
PM10	3,4-Cl-Ph

Reagentes e condições: (a):1-aminoacetaldeído dietil acetal, tolueno, refluxo, 4hs; (b) Água, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, refluxo, 1h.; (c) tiossemicarbazida (para obtenção do Int3a) ou 4-fenil-3-tiossemicarbazida (para obtenção do Int3b), EtOH, HCl, refluxo, 3hs; (d) respectiva acetofenona, isopropanol, ultrassom; (e) 1,3-dicloroacetona, DMF, t.a.

### 2.2.1.1.1 Intermediários (Int1, Int2, Int3a e Int3b):

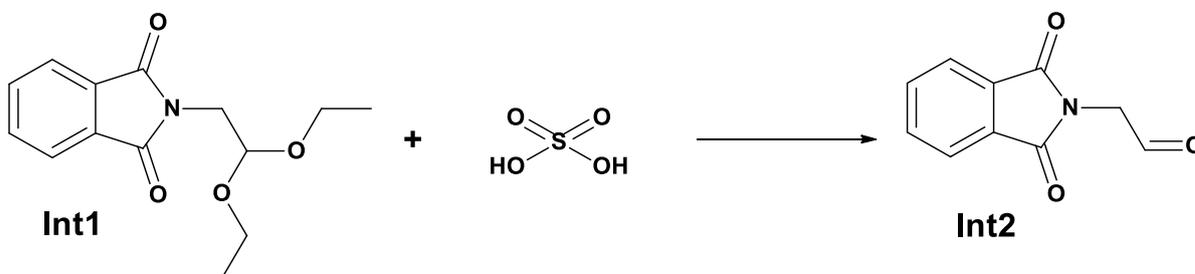
A partir do anidrido ftálico, obtido comercialmente, foi sintetizado primeiramente o produto intermediário **Int1** com função dietóxi através de uma reação de imidificação com o reagente aminoacetaldeído-dietil-acetal (**esquema 3**).

Esquema 3 - Reação do intermediário 1



Em etapa subsequente foi sintetizado o segundo produto intermediário (**Int2**), o 2-(1,3-dioxoisindol-2-il)acetaldeído, através da hidrólise em meio ácido catalítico do 2-(2,2-dietoxietil)isoindolina-1,3-diona (**Int1**), como pode ser observado no **esquema 4**.

Esquema 4 - Reação do intermediário 2

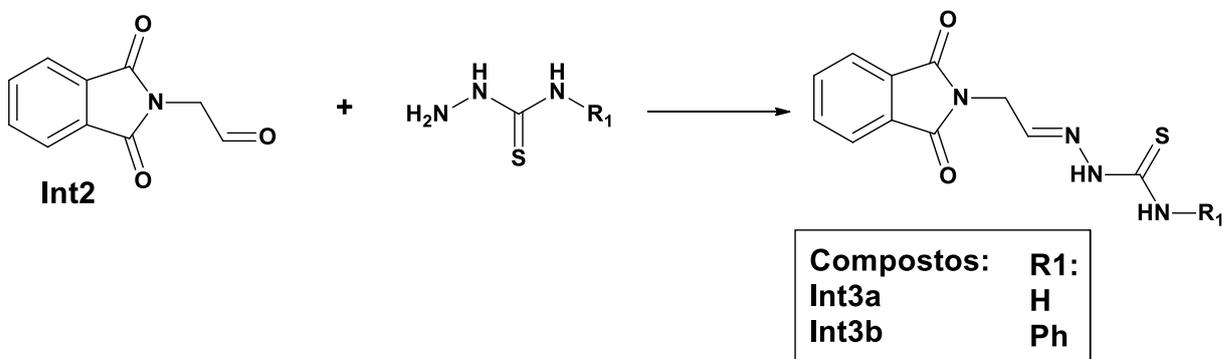


A reação do **Int1** foi realizada em tolueno, com posterior extração, utilizando-se água destilada. O rendimento final foi de 33,35% e o tempo reacional foi de 2 horas. A reação do **Int2** foi realizada em água, onde o tempo reacional foi de 2 horas com rendimento de 86,82%.

Os intermediários **Int3a** e **Int3b** foram obtidos através de uma reação de aminação em meio ácido com etanol como solvente, onde o nitrogênio 4 da tiossemicabazida (para obtenção do **Int3a**) ou da 4-fenil-3-tiossemicarbazida (para obtenção do **Int3b**) ataca o carbono da carbonila do 2-(1,3-dioxoisindol-2-il)acetaldeído (**Int2**) e como resultado da desidratação subsequente obtém-se as ftalil-tiossemicarbazonas, como demonstrado no **esquema 5**.

Os dois produtos apresentaram tempos reacionais de até 6 horas e rendimentos superiores a 54%.

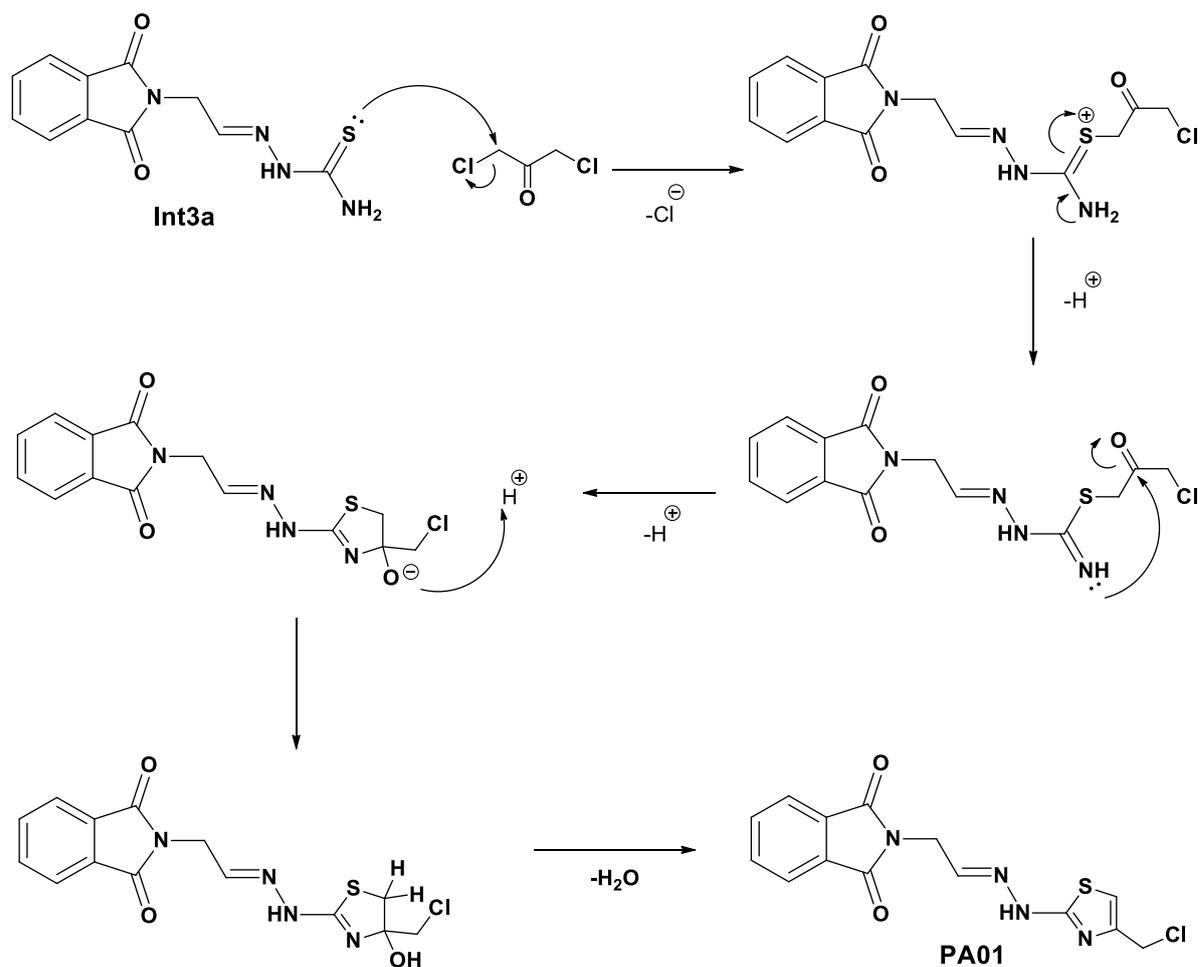
Esquema 5 - Reação dos intermediários 3a e 3b



#### 2.2.1.1.2 PA01

Na síntese do produto **PA01** o enxofre do **Int3a** faz ataque nucleofílico ao carbono ligado ao halogênio. Posteriormente ocorre um rearranjo eletrônico da estrutura formada, após perda do hidrogênio ligado ao nitrogênio. Em seguida, ocorre um ataque nucleofílico do nitrogênio ao carbono da carbonila. Esta etapa é finalizada com perda de uma molécula de água e o carbono vizinho perde um hidrogênio. Como resultado, ocorre a formação de uma ligação  $\pi$  entre carbonos e ciclização do anel. (**esquema 6**).

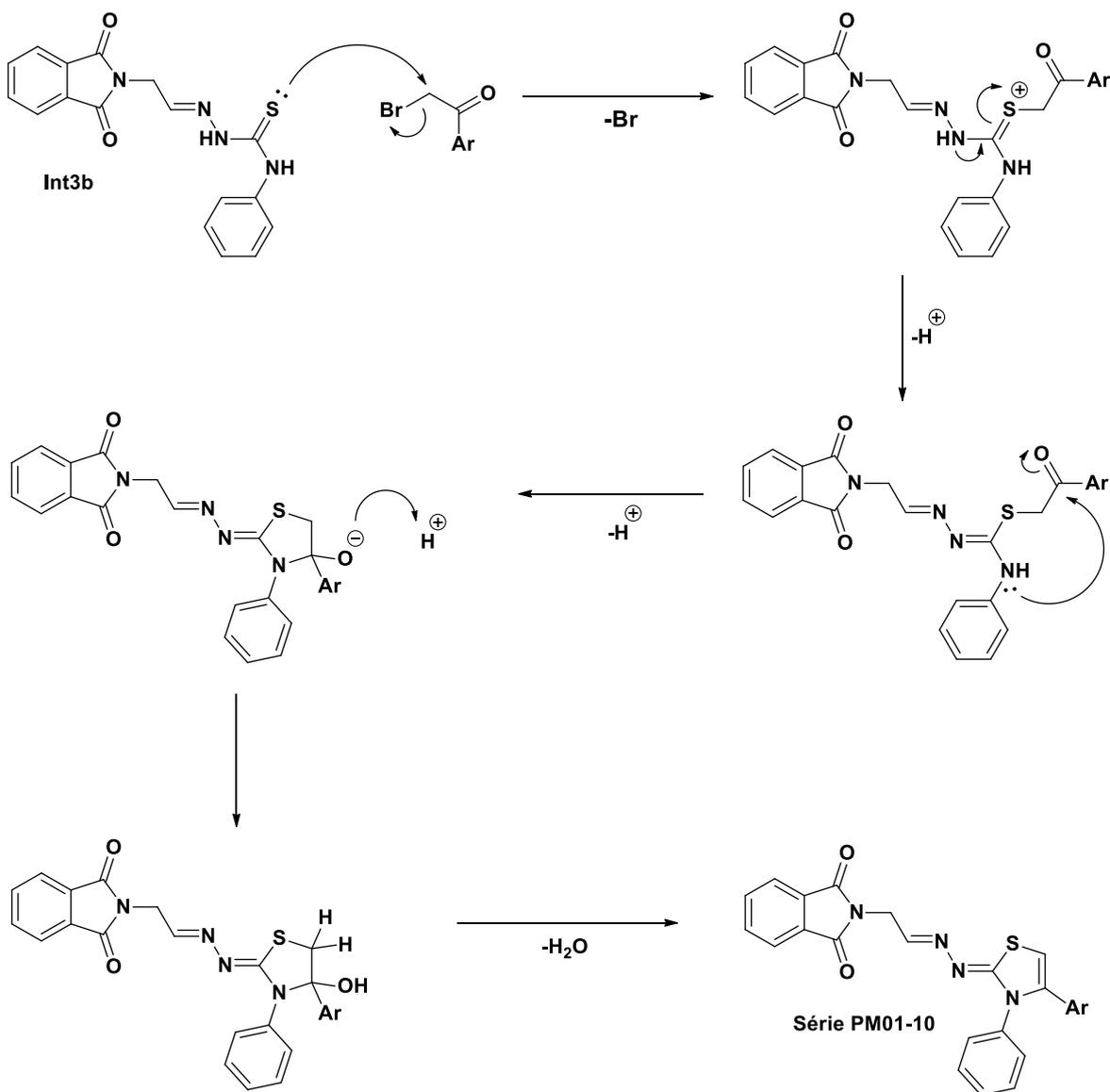
Esquema 6 - Reação do PA01



## 2.2.1.1.3 Série PM01-10

Na síntese da série **PM01-10** (Fig. 16) o mecanismo é semelhante ao da obtenção do **PA01** (Esquema 7).

Esquema 7 - Reação da Série PM01-10



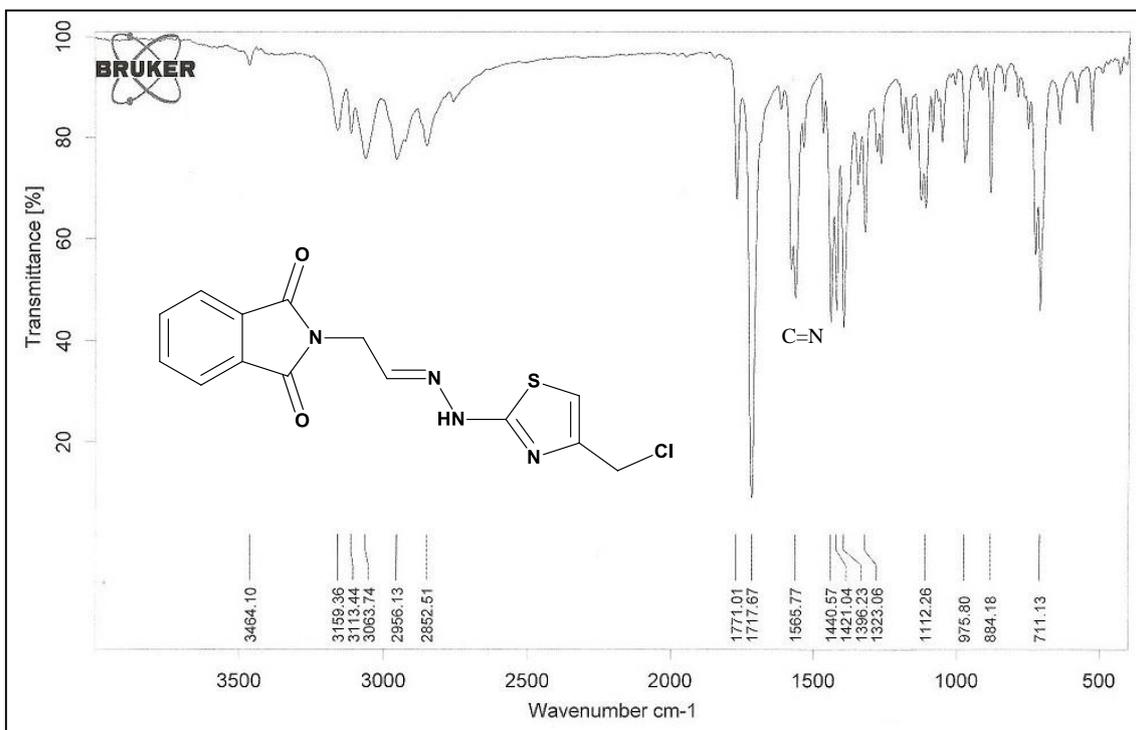
Código da amostra	Ar
PM01	Ph
PM02	4-Me-Ph
PM03	4-MeO-Ph
PM04	3-NO <sub>2</sub> -Ph
PM05	4-NO <sub>2</sub> -Ph
PM06	4-Cl-Ph
PM07	4-Br-Ph
PM08	4-F-Ph
PM10	3,4-Cl-Ph

## 2.2.1.2 Caracterização Estrutural

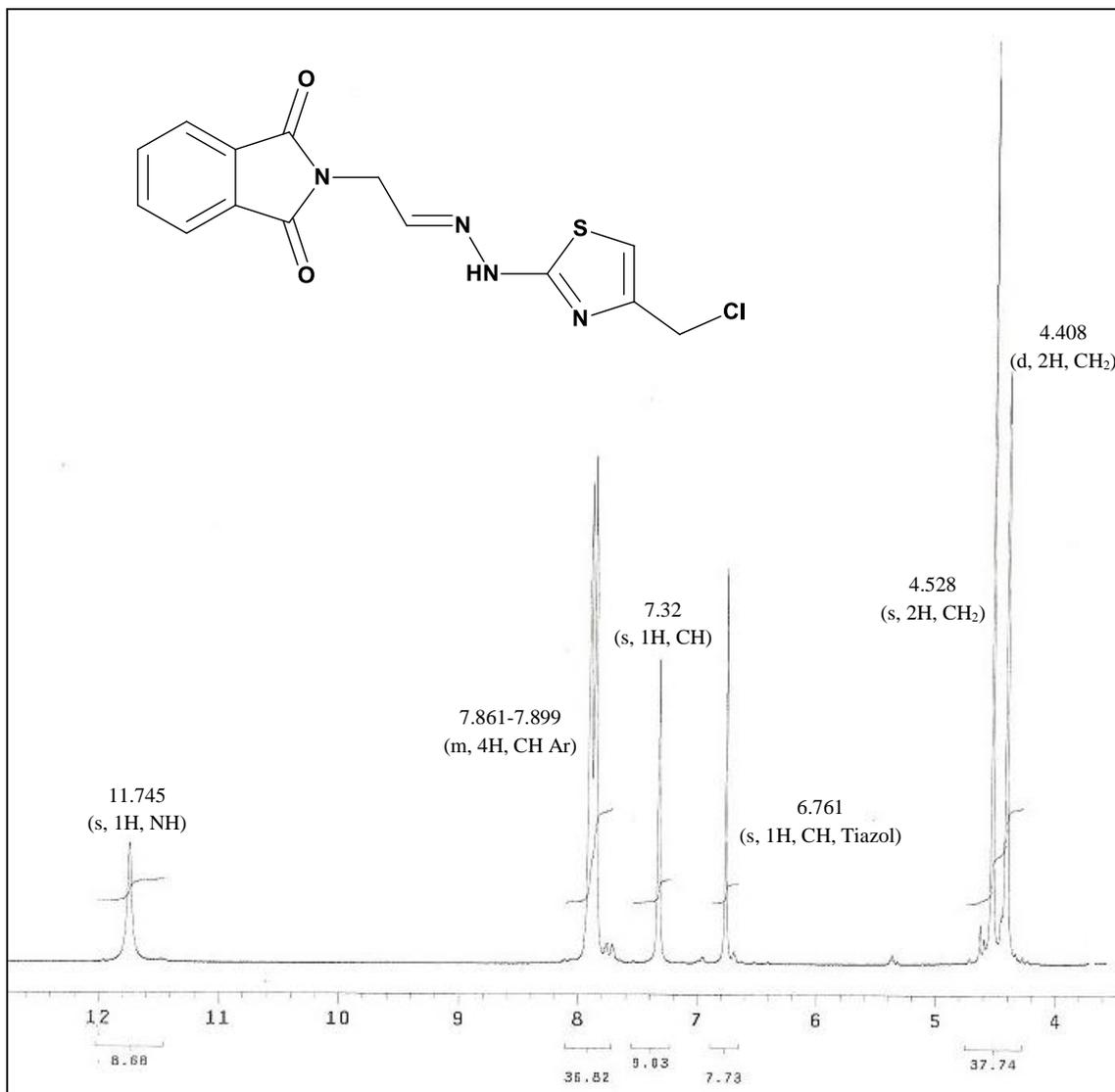
### 2.2.1.2.1 PA01

Através da análise espectroscópica na região do infravermelho foi possível constatar as principais bandas de absorção (**Fig. 18**). As frequências de 3159.36 e 3113.44  $\text{cm}^{-1}$  sugerem a deformação axial N-H. Em 1771.01 e 1717.67  $\text{cm}^{-1}$  são caracterizados estiramentos de C=O de imida cíclica e 1565.77  $\text{cm}^{-1}$  para o estiramento C=N.

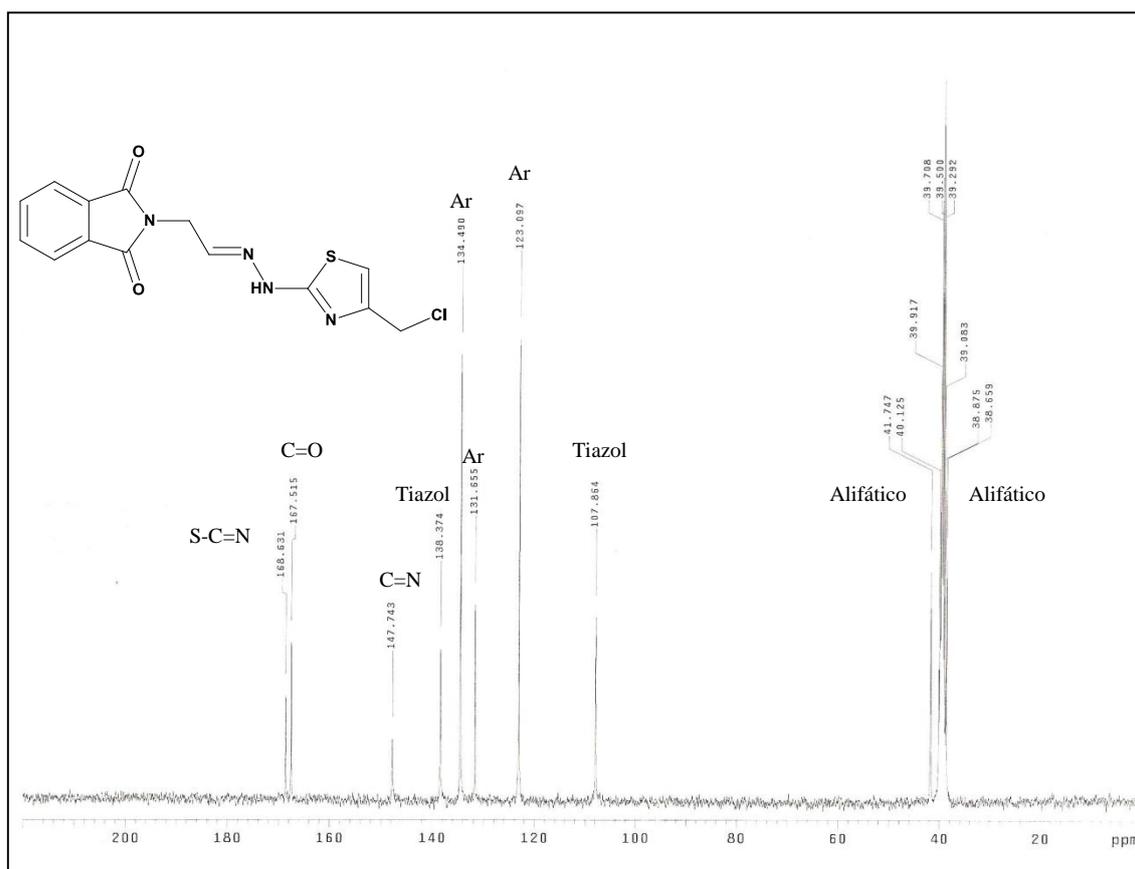
**Figura 18** - Espectro de infravermelho da molécula PA01.



A **Figura 19** apresenta os valores do espectro de RMN<sup>1</sup>H do composto PA01, onde foi constatada a presença de um duplete em torno de 4.410, integrando para dois hidrogênios, referente a um grupo metileno diretamente ligado à ftalimida. O grupamento metileno ligado ao cloro foi confirmado por um singleto em 4.528 ppm integrando para dois hidrogênios. O singleto em 6.761 ppm corresponde ao hidrogênio do anel tiazol. O hidrogênio da função azometilica (CH=N) apareceu em 7.32 ppm. A presença do anel aromático do grupo ftalimida foi confirmado por um multiplete entre 7.861 e 7.899 ppm. Um singleto com deslocamento químico de 11.745 ppm indicou a presença do NH hidrazínico.

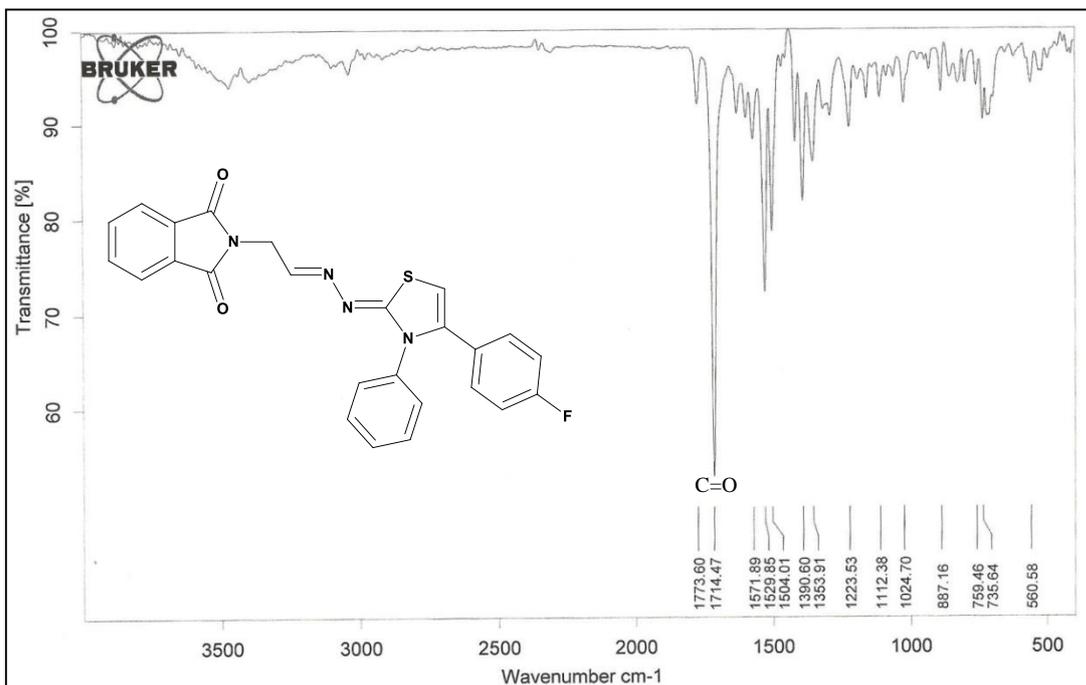
Figura 19 - Espectro do RMN<sup>1</sup>H para a molécula PA01.

Para confirmação dos carbonos presentes na molécula PA01 (**Fig. 20**), foi utilizada a ressonância magnética nuclear de carbono 13. O pico em torno de 38.0 ppm e o em 41.747 ppm confirmam a presença dos dois metilenos (CH<sub>2</sub>). Picos de carbonos do anel tiazol aparecem em 107.879 ppm e 138.382 ppm. Os carbonos aromáticos são confirmados por picos em 123.104 ppm, 131.662 ppm e 134.512 ppm. O pico em 147.773 ppm indica o carbono da função azometilica (HC=N). As carbonilas (C=O) estão representadas por picos em 167.522 ppm e 168.631 ppm.

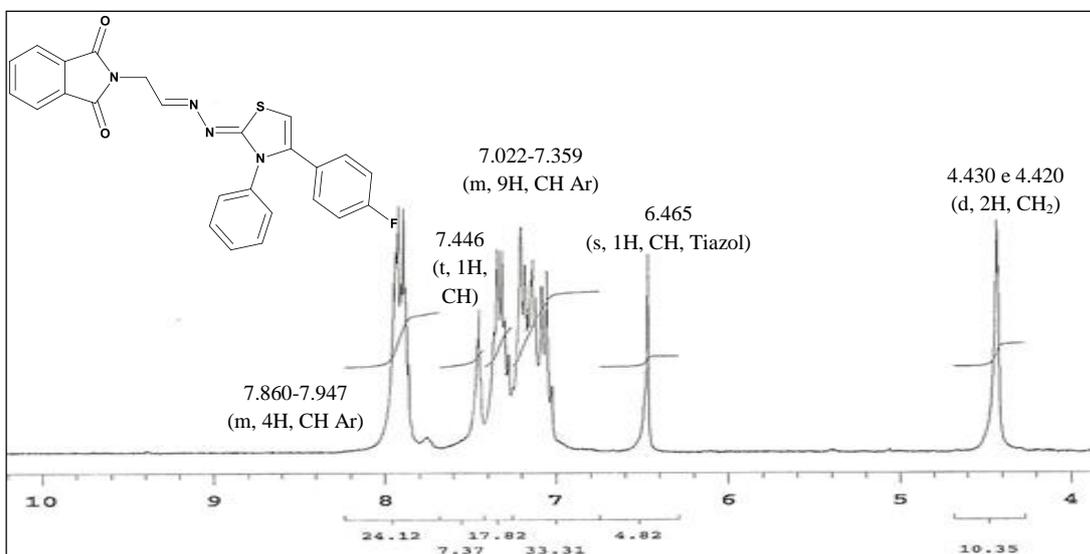
Figura 20 - Espectro do RMN<sup>13</sup>C para a molécula PA01.

#### 2.2.1.2.2 Série PM01-10

A caracterização da série **PM01-10** será exemplificada pela caracterização do composto **PM08**. Através da análise espectroscópica na região do infravermelho (**Fig. 21**) foi possível constatar apenas a banda na frequência de  $1714.47\text{ cm}^{-1}$  que sugere o estiramento de C=O.

Figura 21 - Espectro de infravermelho da molécula **PM08**.

A **Figura 22** apresenta os valores do espectro de RMN<sup>1</sup>H do composto **PM08**, onde foi constatada a presença de um duplete em torno de 4.425, integrando para dois hidrogênios, referente ao grupo metileno diretamente ligado à ftalimida. O singlete em 6.465 ppm corresponde ao hidrogênio do anel tiazol. O hidrogênio da função azometílica (CH=N) apareceu como um tripleto em torno de 7.446 ppm. A presença do anel aromático do grupo ftalimida foi confirmado por um multipletto entre 7.860 e 7.947 ppm. Os hidrogênios dos outros dois anéis aromáticos apareceram como multipletto entre 7.022 e 7.359 ppm.

Figura 22 - Espectro do RMN<sup>1</sup>H para a molécula **PM08**.

Para a confirmação dos carbonos presentes na molécula **PM08**, foi utilizada a ressonância magnética nuclear de carbono 13 (**Fig. 23**). O pico em 38.875 (identificado no DEPT 135°) corresponde ao metileno ligado à ftalimida (**Fig. 24**). O pico em 101.279 é característico do C-H do anel tiazol. Fazendo-se uma comparação com a hidrazona de partida (**Int3b**) pode-se observar que esse pico característico, que aparece em torno de 103 ppm, não aparece no espectro de carbono 13 do **Int3b** (**Fig. 25**). Os picos entre 115.045 e 138.304 correspondem aos carbonos aromáticos. O pico em 148.316 indica o carbono da função azometílica (C=N). Em 167.583 corresponde às carbonilas (C=O). Os sinais em 163.417 e 160.151 provavelmente correspondem ao carbono aromático ligado ao flúor presente apenas no **PM08**. Em 169.933 temos o pico do carbono do anel tiazol que está diretamente ligado a dois nitrogênios e um enxofre.

**Figura 23** - Espectro do RMN-C<sup>13</sup> para a molécula **PM08**.

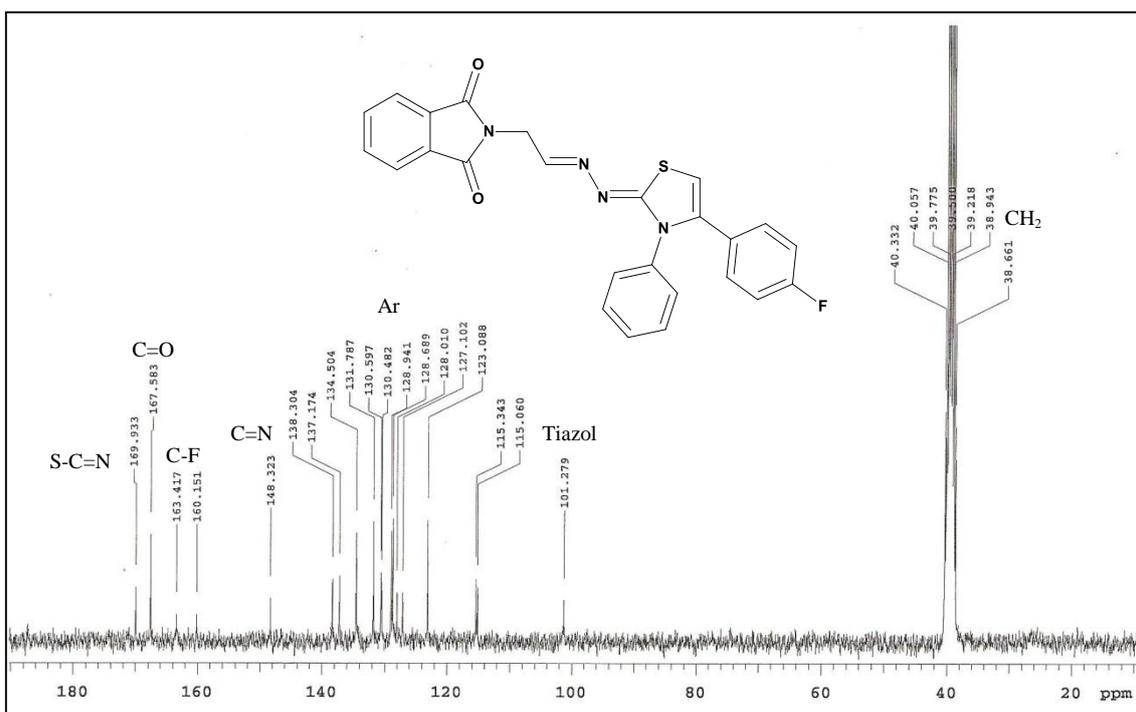
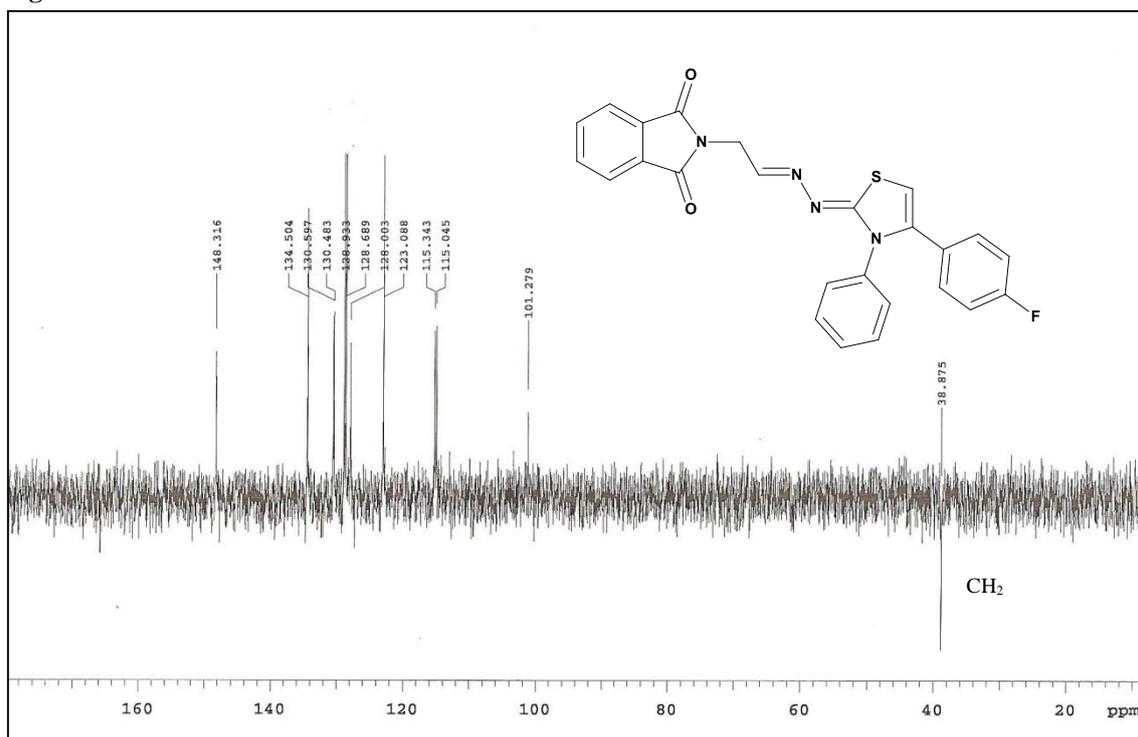
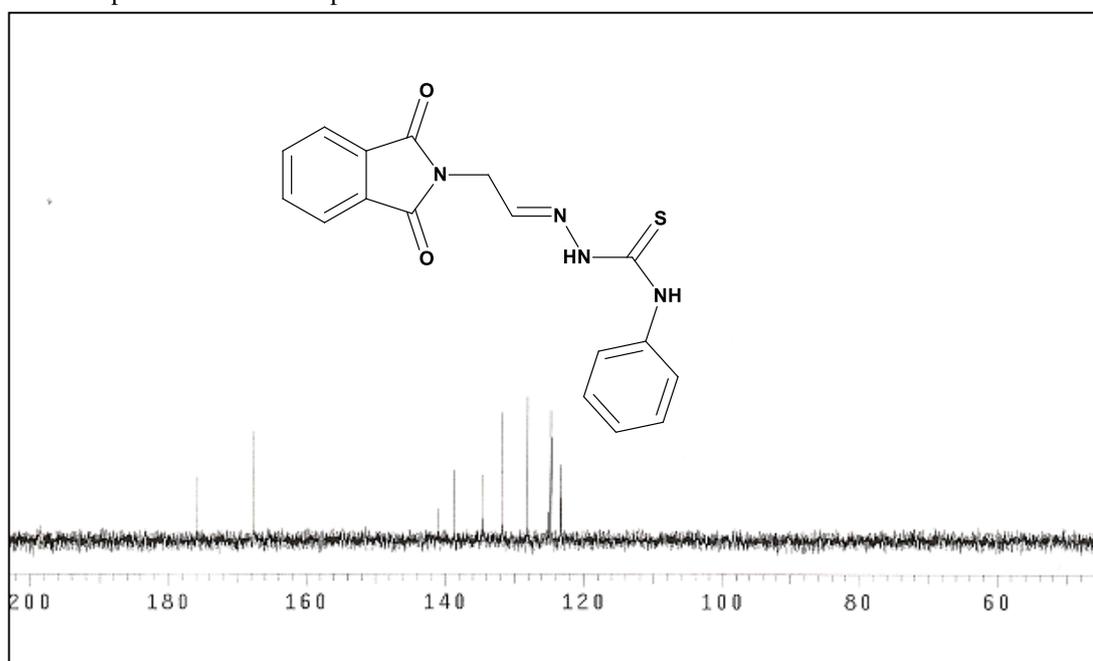


Figura 24 - DEPT 135° de C<sup>13</sup> da molécula PM08.Figura 25 - Espectro do RMN-C<sup>13</sup> para a molécula Int3b.

### **2.2.2 Parte Biológica**

Todos os compostos da série (**PM01-10**) e o composto (**PA01**) foram avaliados, *in vitro*, quanto às propriedades tripanocidas em modelos experimentais frente à forma evolutiva epimastigota da cepa Dm28c do *T. cruzi*. Nestes ensaios, os valores de CI<sub>50</sub> (μM) foram calculados.

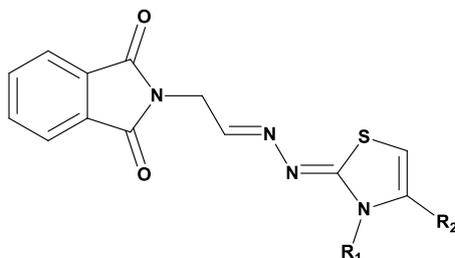
Nos ensaios com epimastigotas, o valor da CI<sub>50</sub> reflete a capacidade do composto em inibir a proliferação celular do parasita quando comparado com a cultura celular não tratada (controle negativo). Os compostos (**PM01-10**) e (**PA01**) foram incubados na presença de epimastigotas por cinco (cepa Dm28c).

Para determinar a seletividade, os compostos (**PM01-10**) e (**PA01**) foram testados em ensaios com células de mamíferos. O efeito na viabilidade celular (toxicidade) destes compostos em esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c foi avaliado. Como este ensaio é de viabilidade celular, os esplenócitos foram incubados na presença dos compostos (**PM01-10**) e (**PA01**) por vinte e quatro horas. A toxicidade em esplenócitos foi quantificada como a maior concentração não-tóxica para as células, e quando necessário, os valores de CI<sub>50</sub> (em μM) foram determinados.

Todos os valores encontrados para os compostos foram comparados com o Nifurtimox (NFX), com o Benznidazol (BZD) e com a tiossemicarbazona (PT01). Os resultados das atividades antichagásicas e de citotoxicidade em esplenócitos estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Citotoxicidade e atividade tripanocida frente às formas epimastigota da série PM01-10 e PA01

Código	R1	R2	Citotoxicidade		CI <sub>50</sub> epimastigotas - μM (cepa DM28)	IS Citotoxicidade/ CI <sub>50</sub> epimastigotas
			μg/ml <sup>a</sup>	μM		
PM 01	Ph	Ph	>100	228.05	ND	-
PM 02	Ph	4-Me-Ph	>100	221.17	57.83	<b>3.82</b>
PM 03	Ph	4-Me-O-Ph	>100	213.43	ND	-
PM 04	Ph	3-NO <sub>2</sub>	50	103.41	5.99	<b>17.26</b>
PM 05	Ph	4-NO <sub>2</sub>	>100	206.82	12.18	<b>16.98</b>
PM 06	Ph	4-Cl-Ph	>100	211.44	10.57	<b>20.00</b>
PM 07	Ph	4-Br-Ph	50	96.63	ND	-
PM 08	Ph	4-F-Ph	>100	219.06	ND	-
PM 10	Ph	3,4-diCl-Ph	>100	197.09	ND	-
PA01	H	Cl-Me	25	73.67	85.67	<b>0.86</b>
Int3b			50	147.76	36.94	<b>4.00</b>
BZD			25	96.07	48.80	<b>1.97</b>
NFX			1	3.48	5.71	<b>0.61</b>



<sup>a</sup> = maior concentração atóxica em células esplênicas de camundongos BALB/c; BZD = Benznidazol; NFX = Nifurtimox; ND = Não Determinado; \* Os valores ND ("Não Determinado") significam medidas que foram feitas, mas não foi possível fazer a regressão para determinar o CI<sub>50</sub>. Isto significa que, apesar dos valores de IC<sub>50</sub> não terem sido determinados, os dados de atividade para a curva dose-resposta foram adquiridos.

### 2.2.2.1 Citotoxicidade e atividade antichagásica

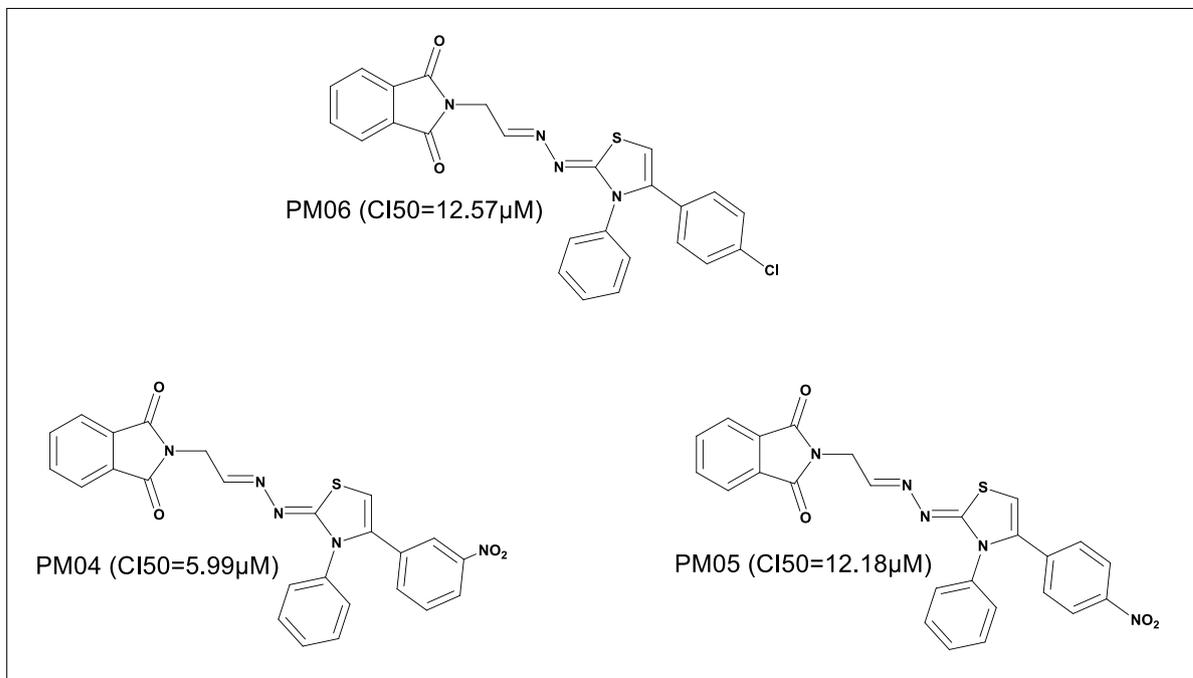
Todos os compostos da série **PM01-10** foram menos tóxicos para células esplênicas de camundongos BALB/c quando comparados com o Benznidazol (BZD, 25μg/ml) e com o Nifurtimox (NFX, 1μg/ml). Os dois compostos que apresentam grupo nitro no anel aromático adjacente ao tiazol (**PM04** e **PM05**) apresentaram significativa atividade para a forma epimastigota do *T. cruzi*. **PM04** apresentou CI<sub>50</sub> (5.99μM) semelhante ao NFX (5.71μM), com a vantagem de o **PM04** ser cerca de 30 vezes menos tóxico que o NFX para células de mamíferos.

Comparando-se os compostos **PM04** e **PM05**, pode-se observar que a mudança do grupo nitro do anel aromático adjacente ao tiazol da posição meta para a posição para leva a uma significativa diminuição da toxicidade em células de mamíferos (50 $\mu$ g/ml para **PM04** e 100 $\mu$ g/ml para **PM05**). No entanto também ocorre diminuição da atividade tripanocida (5.99 para **PM04** e 12.18 **PM05**), de modo que o Índice de Seletividade (IS) para epimastigotas de *T. cruzi* de ambos os compostos se mantem em torno de 17.

Dos compostos avaliados o **PM06** foi o mais seletivo para o parasito (20.00), sendo cinco vezes mais seletivo que a tiossemicarbazona (**Int3b**), dez vezes mais seletivo que o BZD e trinta vezes mais que o NFX.

Portanto, entre os tiazóis da série **PM01-10**, foi possível identificar os tiazóis **PM04**, **PM05** e **PM06** como os mais potentes da serie, que apresentam propriedades tripanocidas, para a forma epimastigota, melhores que o BDZ. O **PM04** apresentou atividade tripanocida similar ao NFX, porém com a vantagem de ser menos citotóxico. E o **PM06** foi composto mais seletivo para o parasito (**Fig. 26**).

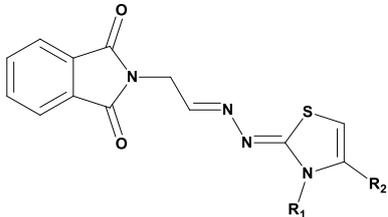
**Fig. 26** - Compostos da série PM01-10 que apresentaram melhor atividade tripanocida frente à forma epimastigota (Arquivo pessoal)



### 2.2.2.2 Atividade leishmanicida

Teve-se a oportunidade de avaliar também a atividade dos compostos da série (**PM01-10** e **PA01**) frente a outro parasito, *Leishmania amazonensis*. Os resultados são descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade leishmanicida frente à forma promastigota da série PM01-10 e PA01.

Código	R1	R2	IC <sub>50</sub> promastigotas - μM ( <i>L.</i> <i>amazonensis</i> )	IS (Citotoxicidade/I C <sub>50</sub> promastigotas)
				
PM01	Ph	Ph	6.95	<b>32.81</b>
PM02	Ph	4-Me-Ph	2.14	<b>103.35</b>
PM03	Ph	4-Me-O-Ph	7.96	<b>26.81</b>
PM04	Ph	3-NO <sub>2</sub>	2.42	<b>42.73</b>
PM05	Ph	4-NO <sub>2</sub>	3.39	<b>61.00</b>
PM06	Ph	4-Cl-Ph	4.71	<b>44.89</b>
PM07	Ph	4-Br-Ph	6.00	<b>17.62</b>
PM08	Ph	4-F-Ph	6.22	<b>35.22</b>
PM10	Ph	3,4-diCl-Ph	1.73	<b>113.92</b>
PA01	H	Cl-Me	69.39	<b>1.08</b>
Int3b			42.85	<b>3.45</b>

ND = Não Determinado; \*Os valores ND ("Não Determinado") significam medidas que foram feitas, mas não foi possível fazer a regressão para determinar o CI<sub>50</sub>. Isto significa que, apesar dos valores de IC<sub>50</sub> não terem sido determinados, os dados de atividade para a curva dose-resposta foram adquiridos.

Todos os compostos da série (**PM01-10**) apresentaram significativa atividade leishmanicida. O composto **PA01** teve uma baixa atividade leishmanicida para a forma promastigota do parasito (69.39μM). Tendo em vista que a principal diferença entre o **PA01** e os compostos da série **PM01-10** é a ausência dos anéis aromáticos adjacentes ao tiazol, a baixa atividade leishmanicida do **PA01** pode ser um indicativo de importância da presença de grupos volumosos adjacentes ao anel tiazol.

O composto **PM01** foi 33 vezes mais seletivo para o parasito que para as células de mamíferos, sendo 30 vezes mais seletivo que o **PA1** e dez vezes mais seletivo que a

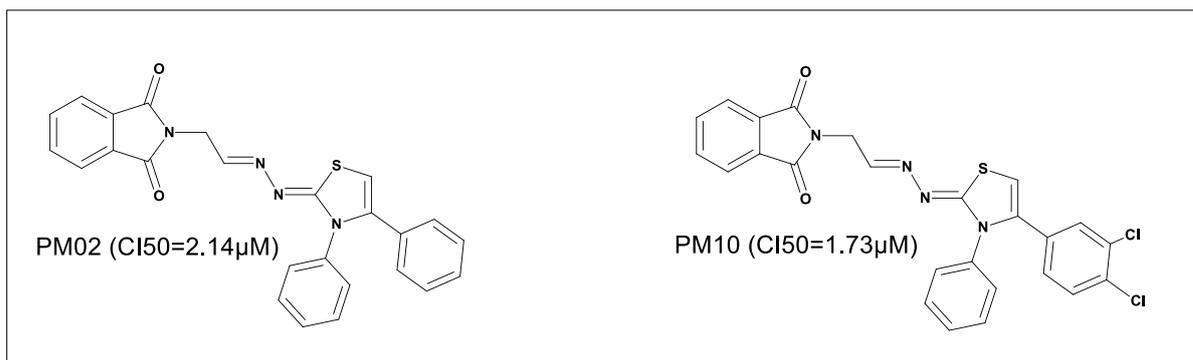
tiossemicarbazona de partida (**Int3b**). A mudança de tiossemicarbazona para tiazolil-hidrazona mostrou-se ser uma válida estratégia de otimização para atividade leishmanicida.

A introdução de um grupo metila no anel aromático adjacente ao anel tiazol (**PM02**) aumentou a seletividade pelo parasito (103.35). A introdução de grupo nitro no anel aromático adjacente ao tiazol (**PM04** e **PM05**) também levou a um aumento na atividade leishmanicida (2.42 $\mu$ M para o **PM04** e 3.39 $\mu$ M para o **PM05**), quando comparados ao **PM01** (6.95 $\mu$ M).

O composto que apresentou a mais potente atividade leishmanicida foi o **PM10** (1.73 $\mu$ M), tendo dois Cloros nas posições meta e para no anel aromático adjacente ao tiazol. O **PM10** foi cerca de cem vezes mais seletivo para o parasito que para células de mamíferos.

Portanto, entre os tiazóis da série **PM01-10**, foi possível identificar os tiazóis **PM02** e **PM10** como os mais potentes da série, que apresentaram melhores propriedades leishmanicidas (**Fig. 27**).

**Figura 27** - Compostos da série PM01-10 que apresentaram melhor atividade leishmanicida frente à forma promastigota (Arquivo pessoal).



## 2.3 SESSÃO EXPERIMENTAL

### 2.3.1 Parte Química

Os reagentes foram adquiridos da Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma-Aldrich, enquanto que os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica. Os solventes deuterados (DMSO- $d_6$ ,  $CDCl_3$ ,  $D_2O$ ) são da marca CIL (Tédia Brazil).

As reações foram acompanhadas em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente  $F_{254}$ . As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm).

As reações mediadas pela irradiação no ultrassom foram realizadas em banho de ultrassom modelo Unique EM-804 TGR usando frequência de 40 KHz (180 W). Em todas as reações no ultrassom, não houve aquecimento externo.

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

Para todos os compostos inéditos, foram feitas as análises de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  e quando necessário, análises bidimensionais (DEPT) bem como a adição de  $D_2O$  para a localização dos sinais de NH. Todos os compostos foram solubilizados em DMSO- $d_6$ . Os espectros de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  foram adquiridos nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para  $^1H$ ; 100 MHz para  $^{13}C$ ) ou Bruker AMX (300 MHz para  $^1H$  e 75.5 MHz para o  $^{13}C$ ), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN  $^1H$  foram designadas da seguinte forma: s / singleto; d / dubleto; t / tripleto; dd / duplo dubleto; q / quarteto; m / multipeto. Para os espectros no infravermelho, utilizou-se o instrumento Bruker (Modelo IFS 66) usando pastilhas de KBr.

#### 2.3.1.1 Metodologia de Síntese

**2.3.1.1.1 Síntese do composto intermediário 1 (Int1), 2-(2,2-dietoxietil)isoindolina-1,3-diona:** Em balão de fundo redondo, adicionou-se o anidrido ftálico, o aminoacetaldeído dietil acetal, dimetil-amino-piridina (DMAP) e quantidade suficiente para solubilizar (q.s.p.s.) de tolueno como solvente. A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 2 horas. A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o término da reação, foram realizadas três extrações tendo como fase orgânica o tolueno. Em

seguida realizou-se uma secagem do tolueno com sulfato de sódio anidro. Por fim, o tolueno foi evaporado à vácuo, obtendo-se o precipitado puro.

- **Int1** = 13,5mmols de anidrido ftálico, 16,2mmols de aminoacetaldeído dietil acetal, 0,82mmols dimetil-amino-piridina (DMAP)

**2.3.1.1.2 Síntese do composto intermediário 2 (Int2), 2-(1,3-dioxoisindol-2-il)acetaldeído:** Em balão de fundo redondo, adicionou-se 2-(2,2-dietoxietil)isoindolina-1,3-diona (**Int1**), ácido sulfúrico catalítico e q.s.p.s. de água como solvente. A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 2 horas. A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, aguardou-se atingir a temperatura ambiente e foi colocada sob resfriamento para indução da precipitação. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com água destilada, obtendo-se o produto puro.

- **Int2** = 4,5mmols de **Int1**, 7 gotas H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**2.3.1.1.3 Síntese dos compostos intermediários 3a (Int3a), 2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)etilideno)hidrazinacarbotoamida, e 3b (Int3b), 2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)etilideno)-N-fenilhidrazinacarbotoamida:** Em balão de fundo redondo, adicionou-se o aldeído 2-(1,3-dioxoisindol-2-il)acetaldeído (**Int2**), a tiossemicabazida (na proporção 1:1), etanol (q.s.p.s.) e HCl (cat.). A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 4 horas. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com etanol, obtendo-se o produto puro.

- **Int3a** = 3,85mmols **Int2**, 3,85mmols tiossemicarbazida, 7 gotas HCl;
- **Int3b** = 3,85mmols **Int2**, 3,85mmols 4-fenil-3-tiosemicarbazida, 7 gotas HCl.

**2.3.1.1.4 Síntese do PA01, 2-(2-(2-(4-(clorometil)tiazol-2-il)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-diona:** Em um balão de fundo redondo, adicionou-se o 2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)etilideno)hidrazinacarbotoamida (**Int3a**), a 1,3-dicloro-acetona e DMF (dimetilformamida) (q.s.p.s.). A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por cerca de 1 hora. A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após adição de água destilada ocorre a precipitação do produto puro.

- **PA01** = 3 mmol de **Int3a**, 3 mmol de 1,3-dicloroacetona.

**2.3.1.1.5 Síntese da série ftalil-hidrazona-tiazóis (PM01-10):** Em balão de fundo redondo, adicionou-se o 2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)etilideno)-N-fenilhidrazinacarbotoamida (**Int3b**), a respectiva cetona halogenada e isopropanol (q.s.p.s.). A mistura reacional foi mantida em ultrassom por 1-2 horas. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com água destilada, obtendo-se o produto puro.

- **PM01** = 1,14 mmol de **Int3b**, 1,14 mmol de 2-bromo-acetofenona;
- **PM02** = 1,14 mmol de **Int3b**, 1,14 mmol de 2-bromo-4'-metil-acetofenona;
- **PM03** = 1,14 mmol de **Int3b**, 1,14 mmol de 2-bromo-4'-metoxi-acetofenona;
- **PM04** = 1,14 mmol de **Int3b**, 1,14 mmol de 2-bromo-3'-nitro-acetofenona;
- **PM05** = 1,14 mmol de **Int3b**, 1,14 mmol de 2-bromo-4'-nitro-acetofenona;
- **PM06** = 1,14 mmol de **Int3b**, 1,14 mmol de 2-bromo-4'-cloro-acetofenona;
- **PM07** = 1,14 mmol de **Int3b**, 1,14 mmol de 2,4'-dibromo-acetofenona;
- **PM08** = 1,14 mmol de **Int3b**, 1,14 mmol de 2-bromo-4'-fluor-acetofenona;
- **PM10** = 1,14 mmol de **Int3b**, 1,14 mmol de 2-bromo-3',4'-dicloro-acetofenona.

### 2.3.1.2 Dados Físico-Químicos e Elucidação Estrutural

#### **Int1: 2-(2,2-dietoxietil)isoindolina-1,3-diona:**

$C_{14}H_{17}NO_4$ ; 263g/mol; Rend. 33,35%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,82; PF 74 a 76°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1772 e 1717 (C=O), 1070 (C-O).

#### **Int2: 2-(1,3-dioxoisindol-2-il)acetaldeído:**

$C_{10}H_7NO_3$ ; 189g/mol; Rend. 86,82%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,65; PF: 93°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1774 e 1699 (C=O).

#### **Int3a: 2-(2-(1,3-dioxoisindol-2-il)etilideno)hidrazinacarbotoamida:**

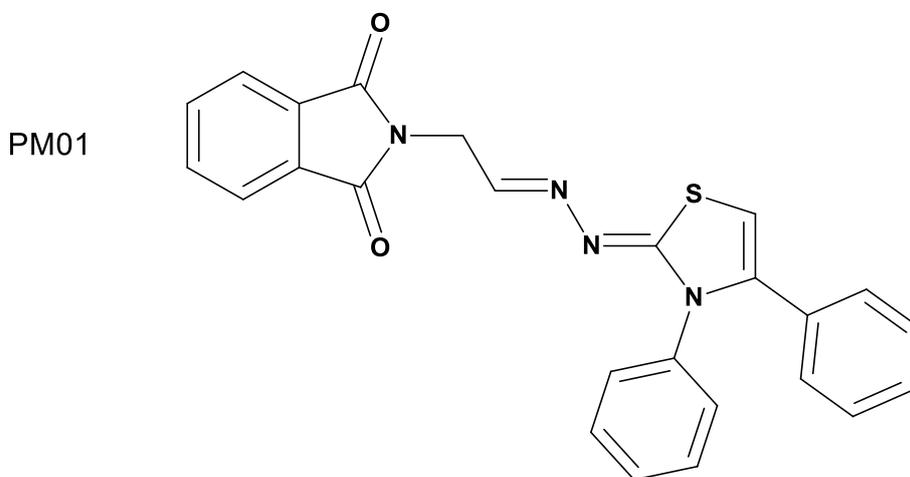
$C_{11}H_{10}N_4O_2S$ ; 262 g/mol; Rend. 76%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,45; PF: 220 a 224°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3423 e 3308 (N-H), 1769 e 1713 (C=O), 1602 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 6.61 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 7.54-7.68 (m, 4H, Ar), 9.13 (s, 1H, NH); RMN -  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 122.5 (Ar), 123.2 (Ar), 129.6 (Ar), 130.3 (Ar), 174.5 (C=O), 176.9 (C=O).

**Int3b: 2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)etilideno)-N-fenilhidrazinacarbotioamida:**

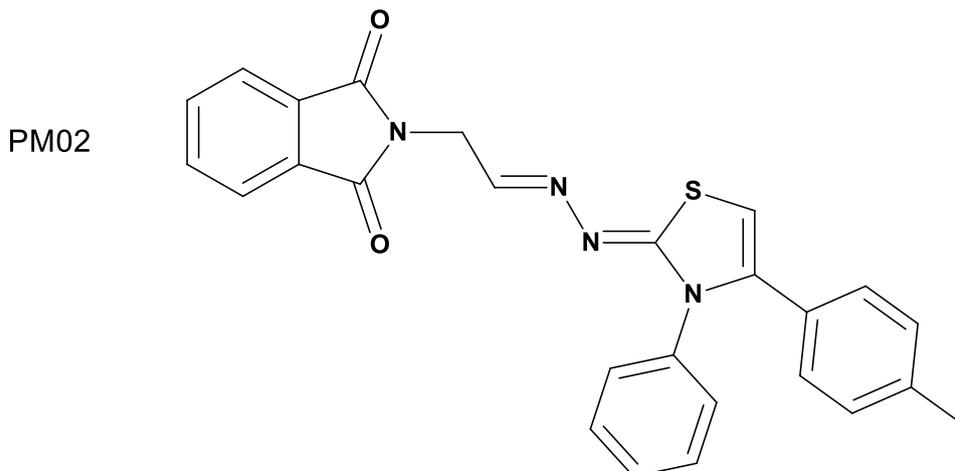
$C_{17}H_{14}N_4O_2S$ ; 338,38 g/mol; Rend. 70%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,52; PF: 173-176°C; RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 4.454 e 4.468 (d, 2H,  $CH_3$ ), 7.144 (t, 1H, Ar), 7.297 (t, 2H, Ar), 7.481 (t, 2H), 7.518 (t, 1H, Ar), 7.845-7.999 (m, 4H, Ar), 9.660 (s, 1H, NH), 11.718 (s, 1H, NH); RMN -  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 40 (Alif), 129.228-138.711 (Ar), 140.917 (C=N), 167.610 (C=O), 175.790 ((NH) $_2$ C=S).

**PA01: 2-(2-(2-(4-(clorometil)tiazol-2-il)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-dione:**

$C_{11}H_{11}ClN_4O_2S$ ; 334,78g/mol; Rend. 82%; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3159.36 e 3113.44 (N-H), 1771.01 e 1717.67 (C=O), 1565.77 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 4.408 e 4.416 (d, 2H,  $CH_2$ ), 4.528 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.761 (s, 1H, CH, tiazol), 7.32 (s, 1H, CH), 7.861-7.899 (m, 4H, CH Ar), 11.745 (s, 1H, NH); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 38 (Alif), 41.747 (Alif), 107.879 (Tiazol), 123.104 (Ar), 131.662 (Ar), 134.512 (Ar), 138.382 (Tiazol), 147.773 (C=N), 167.522 (C=O), 168.631 (C=O).

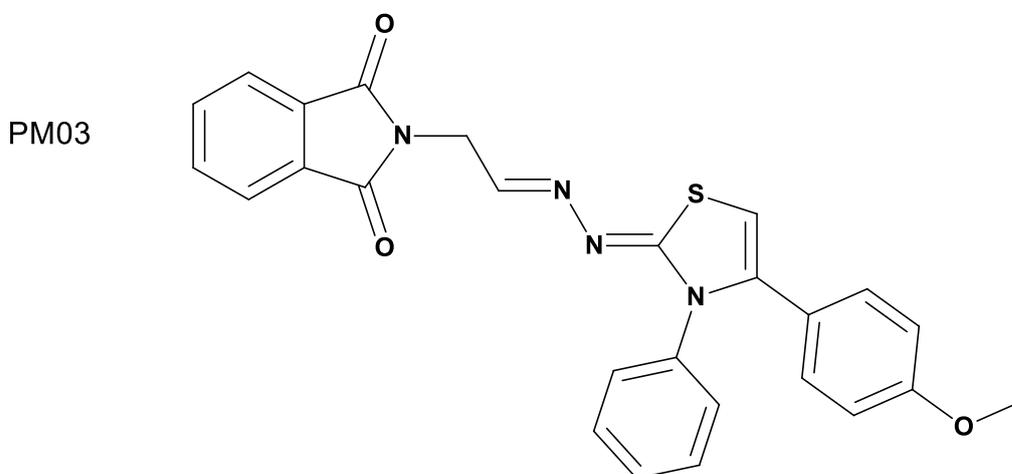
**PM01: 2-(2-((3,4-difeniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-diona:**

$C_{25}H_{18}N_4O_2S$ ; 438,50g/mol; Rend. 56%; RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 4.419 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.450 (s, 1H, CH, tiazol), 7.091-7.320 (m, 10H, CH Ar), 7.442 (t, 1H, HC=N), 7.912-7.883 (m, 4H, CH Ar, ftalimida); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 40.057 ( $CH_2$ ), 104.240 (Tiazol), 128.124-144.561 (CH, Ar), 148.239 (Tiazol), 165.965 (Tiazol), 167.514 (C=N), 169.987 (C=O).



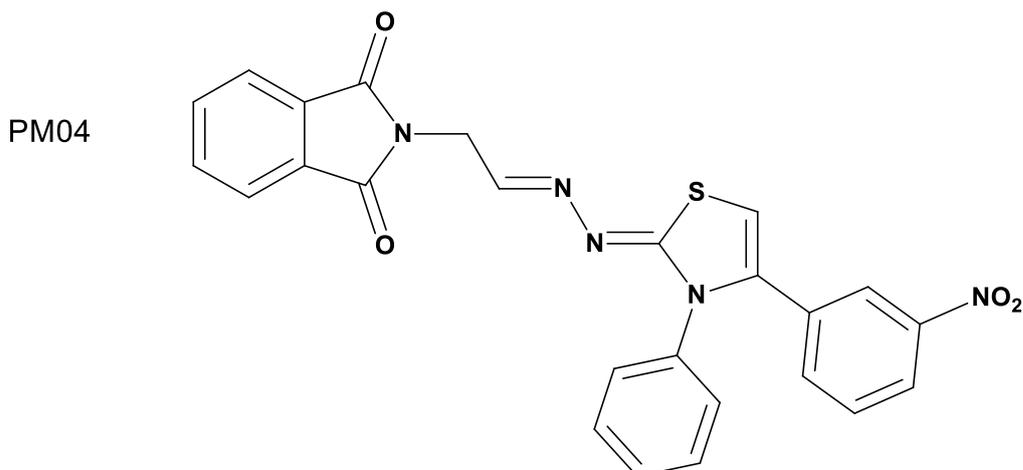
**PM02: 2-(2-((3-fenil-4-(p-tolil)thiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-diona:**

$C_{26}H_{20}N_4O_2S$ ; 452,13g/mol; Rend. 52%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,7; PF: 154-158°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1712.39 (C=O); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 2.190 (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.418 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.409 (s, 1H, CH tiazol), 6.945-6.986 (m, 4H, CH Ar), 7.167-7.445 (m, 6H, CH Ar), 7.881-7.948 (m, 4H, CH Ar ftalimida); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 20.660 ( $CH_3$ ), 38.867 ( $CH_2$ ), 100.669 (CH, tiazol), 123.096-139.456 (CH, Ar), 148.208 (C=N).



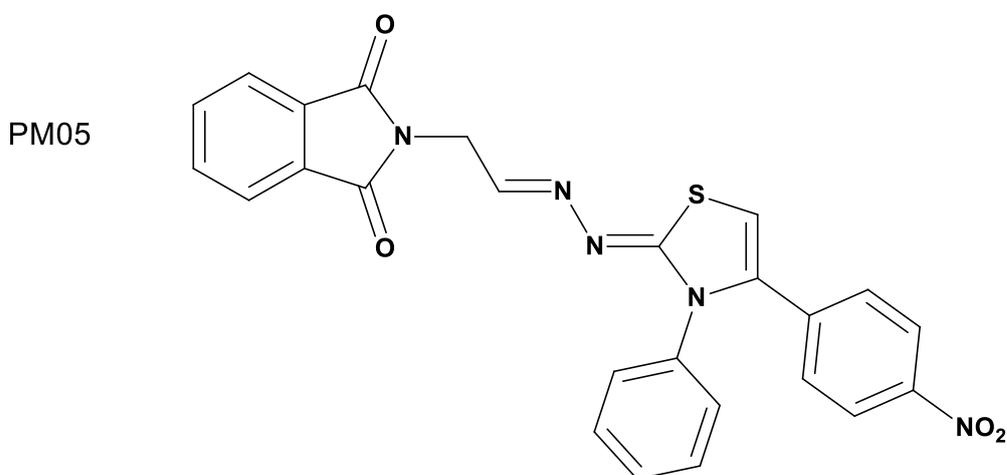
**PM03: 2-(2-((4-(4-metoxifenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-diona:**

$C_{26}H_{20}N_4O_3S$ ; 468,53g/mol; Rend. 54%; PF: 173-175°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1713.83 (C=O). RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 4.177 (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.436-4.446 (d, 2H,  $CH_2$ ), 6.826-8.104 (m, 14H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 40.057 ( $CH_2$ ), 123.073-137.536 (Ar), 146.782 (Tiazol), 167.492 (C=N), 169.643 (C=O).



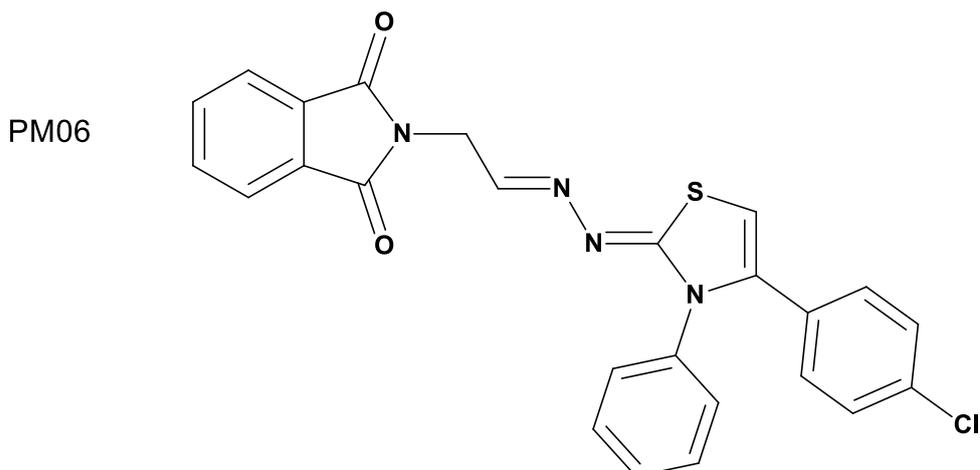
**PM04: 2-(2-((4-(3-nitrofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-diona:**

$C_{25}H_{17}N_5O_4S$ ; 483,50g/mol; Rend. 49%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,64; PF: 154-154°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1712.80 (C=O); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 4.427-4.436 (d, 2H,  $CH_2$ ), 6.758 (s, 1H, CH tiazol), 7.250-7.377 (m, 5H, CH Ar), 7.477-7.511 (m, 3H, CH Ar), 7.859-7.947 (m, 5H, CH Ar), 8.069 (t, 1H, HC=N).



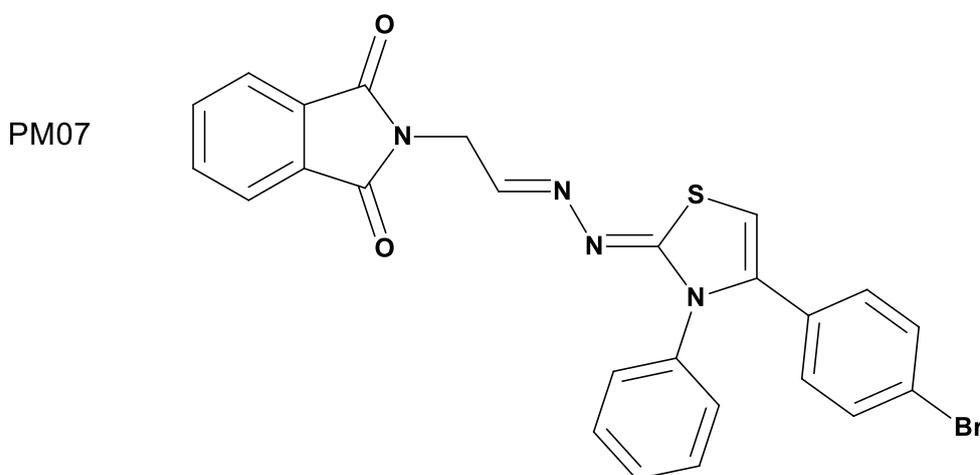
**PM05: 2-(2-((4-(4-nitrofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-diona:**

$C_{25}H_{17}N_5O_4S$ ; 483,50g/mol; Rend. 46%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,75; PF: 186-189°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1713.38 (C=O). RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 4.438 e 4.471 (d, 2H,  $CH_2$ ), 6.778-8.102 (m, 15H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 40.057 ( $CH_2$ ), 123.027-146.689 ( $CH_2$ , Ar), 167.484 C=N, Tiazol), 169.605 (C=N), 175.748 (C=O).



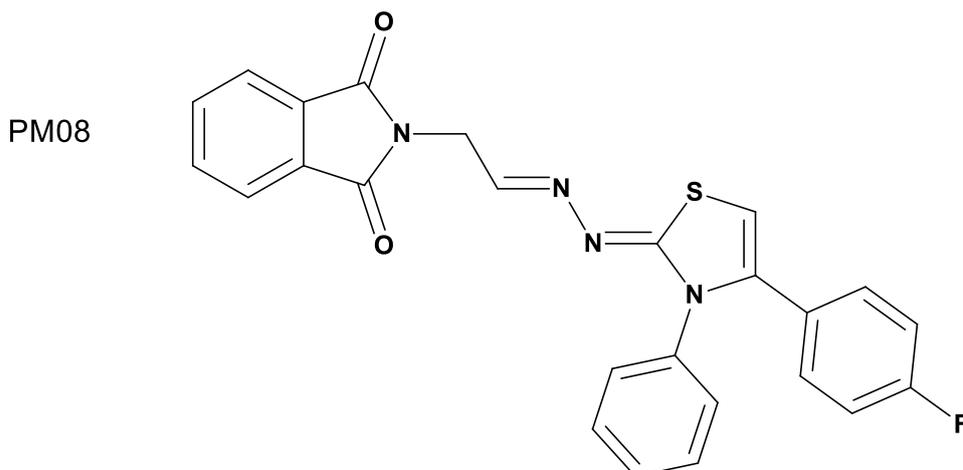
**PM06: 2-(2-((4-(4-chlorofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindoli-na-1,3-diona:**

$C_{25}H_{17}ClN_4O_2S$ ; 472,95g/mol; Rend. 58%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,844; PF: 176-179°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1717.30 (C=O). RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 4.412 e 4.422 (d, 2H,  $CH_2$ ), 6.503-7.940 (m, 15H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 56.021 ( $CH_2$ ), 101.844 (Tiazol), 123.088-138.682 (Ar). 167.575 (C=N), 169.888 (C=O).



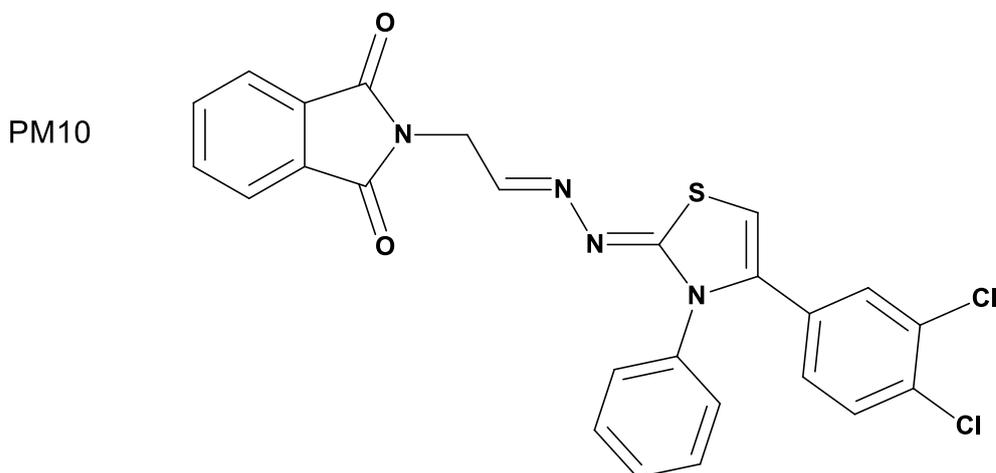
**PM07: 2-(2-((4-(4-bromofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindoli-na-1,3-diona:**

$C_{25}H_{17}BrN_4O_2S$ ; 517,40g/mol; Rend. 55%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,73; PF: 189-193°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1717.05 (C=O).



**PM08: 2-(2-(((4-(4-fluorofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindoli-na-1,3-diona:**

$C_{25}H_{17}FN_4O_2S$ ; 456,49g/mol; Rend. 50%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,63; PF: 176-179°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1714.47 (C=O); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 4.430 e 4.420 (d, 2H,  $CH_2$ ), 6.465 (s, 1H, CH tiazol), 7.022-7.359 (m, 9H, CH Ar), 7.446 (t, 1H, CH), 7.860-7.947 (m, 4H, CH Ar ftalimida); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 38.875 ( $CH_2$ ), 101.279 (CH tiazol), 115.060-138.304 (CH Ar), 148.323 (C=N), 160.151 e 163.417 (C-F), 167.583 (C=O), 169.933 (S-C=N).



**PM10: 2-(2-(((3,4-diclorofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ylideno)hidrazona)etil)isoindoli-na-1,3-diona:**

$C_{25}H_{16}Cl_2N_4O_2S$ ; 507,39g/mol; Rend. 48%; Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,89; PF: 154-157°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1714.45 (C=O). RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 4.448 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.807-7.918 (m, 14H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 40.127 ( $CH_2$ ), 104.590 (Tiazol), 123.109-137.337 (CH, Ar), 149.249 (Tiazol), 167.489 (C=N), 169.619 (C=O).

### **2.3.2 Parte Biológica**

**2.3.2.1 Toxicidade para esplenócitos:** Esplenócitos de camundongos BALB/c foram distribuídos em placa de 96 poços com uma densidade de  $5 \times 10^6$  células por poço em meio RPMI-1640. Cada inibidor químico foi solubilizado em DMSO na concentração de 10 mg/mL e em seguida a amostra foi diluída serialmente em meio RPMI-1640 nas concentrações de 1.0, 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , em triplicata. Como controle positivo, usou-se a saponina na concentração de 0.1  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que como controle negativo, os poços receberam somente meio RPMI-1640 e DMSO. A placa foi então cultivada por 24 horas na temperatura de 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. Então adicionou-se 1.0  $\mu\text{Ci}$  de <sup>3</sup>H-timidina em cada poço e a placa foi incubada por 6 horas. A placa foi então lida no contador de irradiação beta (Multilabel Reader, Finland) e a porcentagem de incorporação de timidina tritiada foi determinada. Para as células que não foram tratadas com as drogas (controle negativo), calculou-se como 100% de incorporação de timidina tritiada (100% de viabilidade celular). Para as células tratadas com saponina, a viabilidade celular foi de 5%. Quando o percentual de incorporação foi maior que 90%, a concentração da droga foi considerada como atóxica para os esplenócitos.

**2.3.2.2 Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota:** Epimastigotas das cepas Y ou Dm28c foram distribuídas em uma placa de 96 poços em uma densidade final de  $10^6$  células por poço. Cada inibidor químico foi adicionado nos respectivos poços em triplicatas. Benznidazol e Nifurtimox foram usados como controles positivos neste ensaio. A placa foi então cultivada durante 11 (cepa Y) ou 5 dias (cepa Dm28c) sob 26° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas foi calculado em uma câmara de Neubauer. Para as epimastigotas não tratadas com os inibidores químicos (controle negativo), assumiu-se como 100% do número de parasitas. As curvas dose-respostas foram determinadas e os valores das CI<sub>50</sub> foram calculados usando ao menos cinco concentrações ("data-points") usando uma equação não-linear (Prism, versão 4.0).

**2.3.2.3 Atividade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*:** Para determinar o efeito anti-proliferativo para *Leishmania sp.*, formas promastigotas ( $10^6/\text{ml}$ ) crescidos em culturas axênicas, na fase log de crescimento, foram colocadas em placas de 96 poços no volume de 100  $\mu\text{l}$ , sob condições de cultura adequadas (26°C). Os testes foram conduzidos tendo como controle culturas de parasitos sem tratamento. As substâncias foram

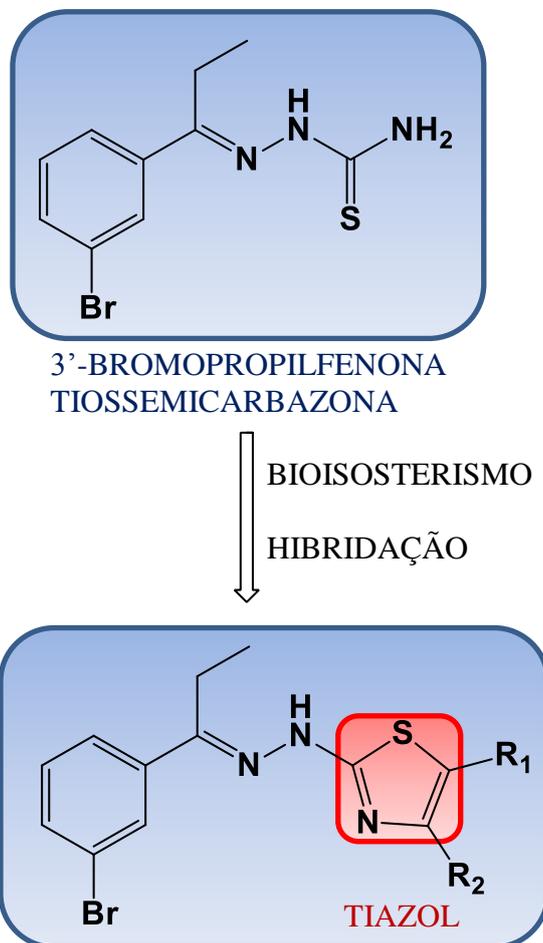
avaliadas quanto à concentração inibidora de 50% do crescimento dos parasitas ( $IC_{50\%}$ ) onde formas promastigotas de diferentes cepas de *Leishmania* foram cultivadas em diferentes períodos, na presença de diferentes concentrações dos compostos, procedendo-se em seguida a contagem de parasitos viáveis. O cálculo da  $IC_{50\%}$  foi determinado por meio de uma regressão linear simples utilizando o software Prisma 4 Graphpad.

# **Capítulo 3**

## **3-Bromo-Fenil-propil-Hidrazona-Tiazóis**

### 3.1 PLANEJAMENTO DA SÉRIE QUÍMICA

Esquema 8 - Planejamento da série química PT01.2-14



Tendo como base a potente atividade tripanossomicida apresentada pelo composto **1i** (3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona) [14] e tendo em vista que tiazolil-hidrazonas são potentes inibidoras da cruzafina e do crescimento do *T. cruzi* [13], utilizou-se as técnicas de hibridação molecular e bioisosterismo, obtendo-se bioisósteros da 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona, contendo o anel tiazol. Dessa forma, tais bioisósteros apresentam dois conhecidos grupamentos farmacofóricos importantes na atividade antichagásica (**Esquema 8**).

Foram utilizados variados substituintes químicos como grupo metil, metóxi, nitro, halogênios (F, Cl, Br), para as moléculas da série aqui proposta. Esta técnica permite posterior análise da relação estrutura-atividade (SAR) e assim apurar a especificidade das moléculas. A utilização dos substituintes halogenados foram selecionados devido à possibilidade de melhoria da absorção oral, da permeabilidade, da estabilidade metabólica e química, formação de ligação halogênio no alvo farmacológico contribuindo para a estabilidade da ligação

fármaco-receptor, além das contribuições estéricas dessa classe na interação com alvos farmacológicos [105].

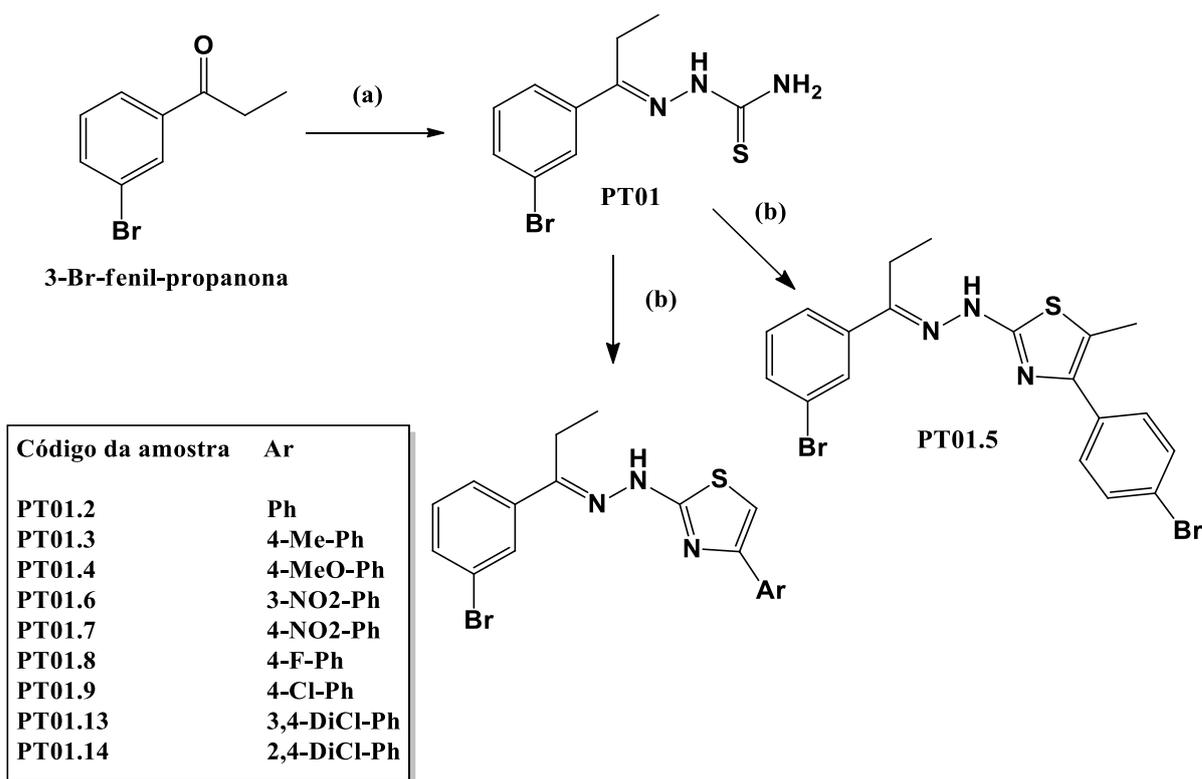
As metodologias de síntese propostas foram eficazes na obtenção dos produtos desejados em bons rendimentos, com tempo reacional variando em torno de três horas. Além de serem utilizados reagentes economicamente viáveis.

## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.2.1 Parte Química

#### 3.2.1.1 Obtenção da Série Química

Esquema 9 - Sínteses dos compostos PT01.2-14



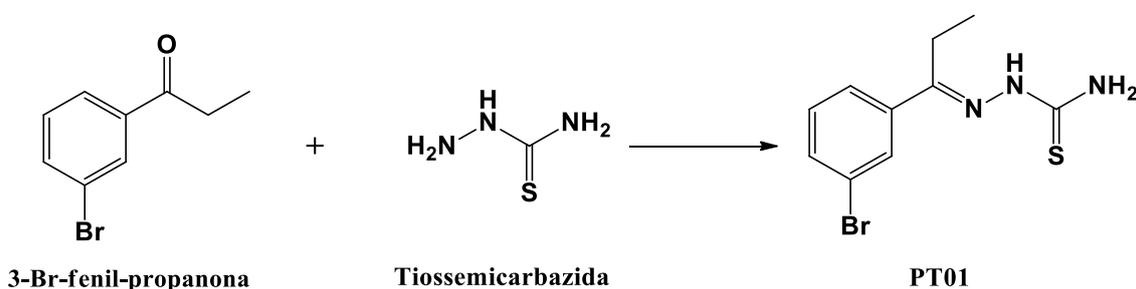
Reagentes e condições: (a) tiossemicarbazida, etanol, HCl, refluxo, 4hs; (b) respectiva acetofenona, isopropanol, t.a, 1h.

### 3.2.1.1.1 Síntese do PT01

Partindo-se do 1-(3-bromofenil)propan-1-ona, a tiossemicarbazona **PT01** foi obtida através de uma reação de aminação em meio ácido com etanol como solvente, onde o nitrogênio 4 da tiossemicarbazida ataca o carbono da carbonila do 1-(3-bromofenil)propan-1-ona e como resultado da desidratação subsequente obtém-se a 2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinacarbotoamida (**PT01**), como demonstrado no **esquema 10**.

O produto apresentou tempo reacional de até 6 horas e rendimento superior a 90%.

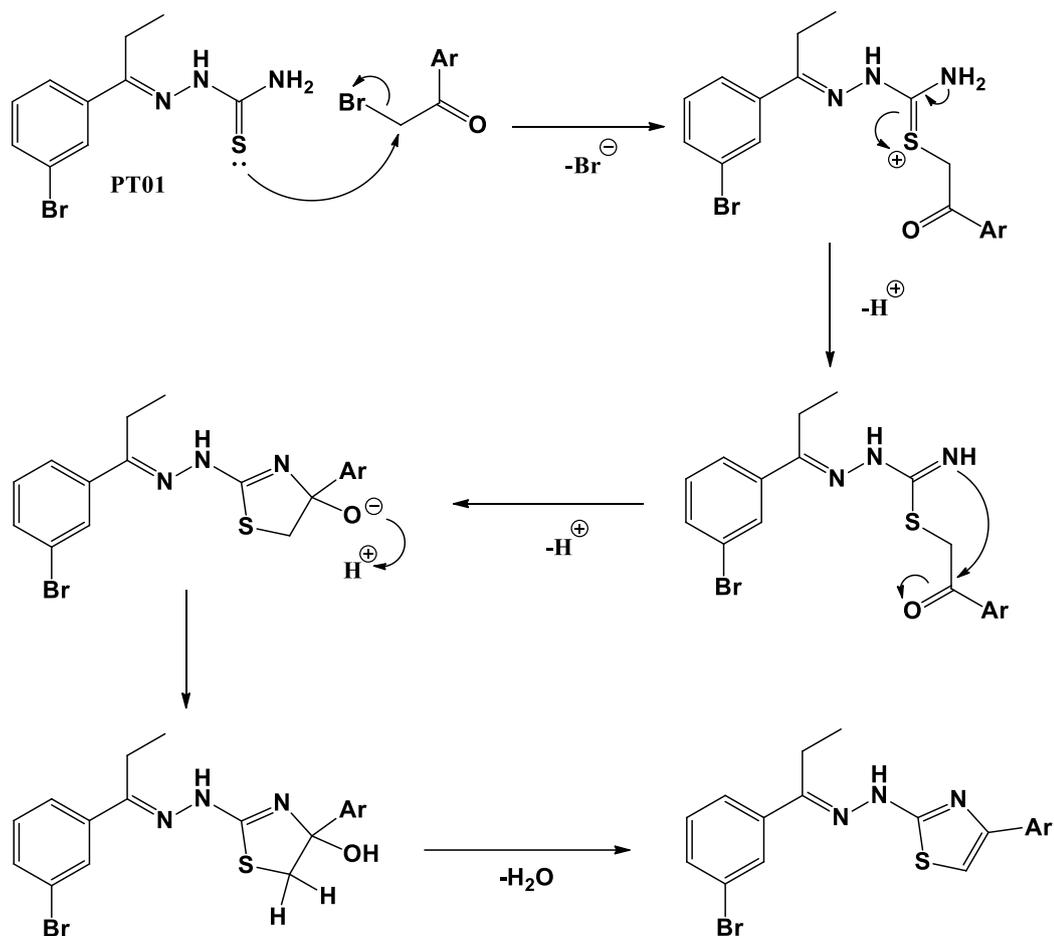
**Esquema 10:** Reação do PT01.



### 3.2.1.1.2 Série PT01.2-14

A síntese da série **PT01.2-14** (Fig. 25) apresenta mecanismo semelhante ao das moléculas do primeiro capítulo (**esquema 11**).

Esquema 11 - Reação da série PT01.2-14



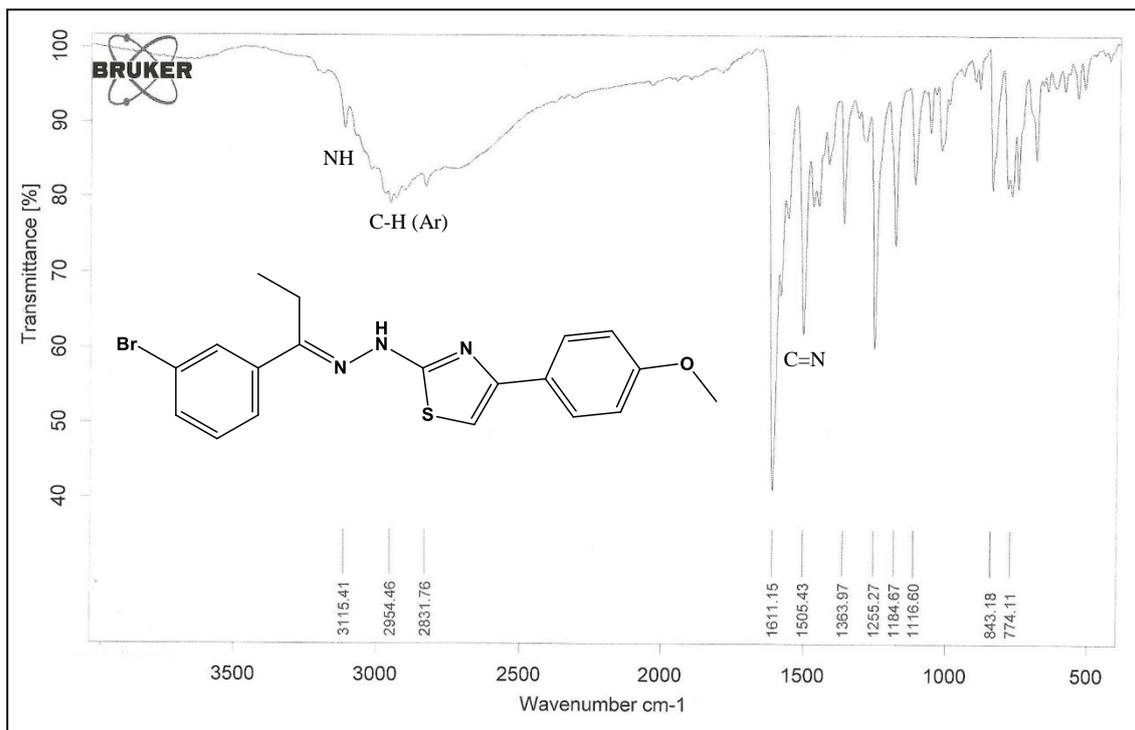
### 3.2.1.2 Caracterização Estrutural

#### 3.2.1.2.1 Série PT01.2-14

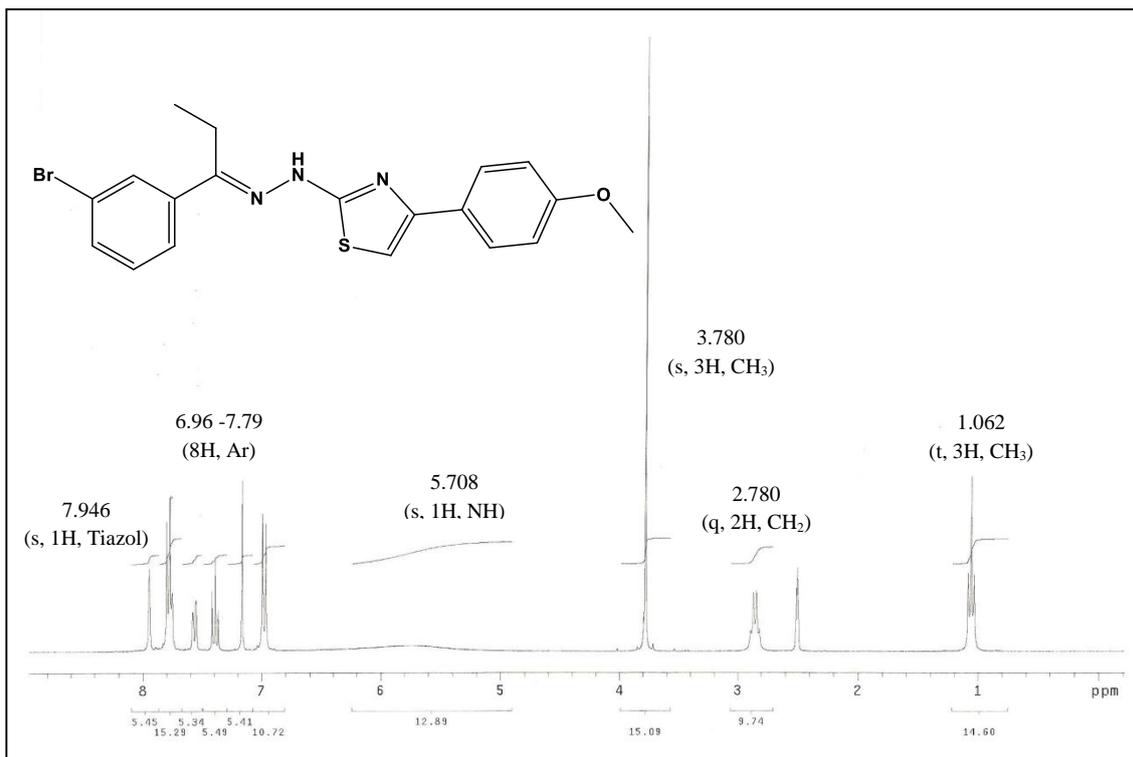
##### 3.2.1.2.1.1 PT01.4

A caracterização da série **PT01.2-14** será exemplificada pela caracterização do composto PT01.4. Através da análise espectroscópica na região do infravermelho foi possível constatar as principais bandas de absorção (**Fig. 26**). A frequência de 3115.41 cm<sup>-1</sup> sugere a deformação axial N-H de tioamida secundária. 1505.43 cm<sup>-1</sup> para o estiramento C=N.

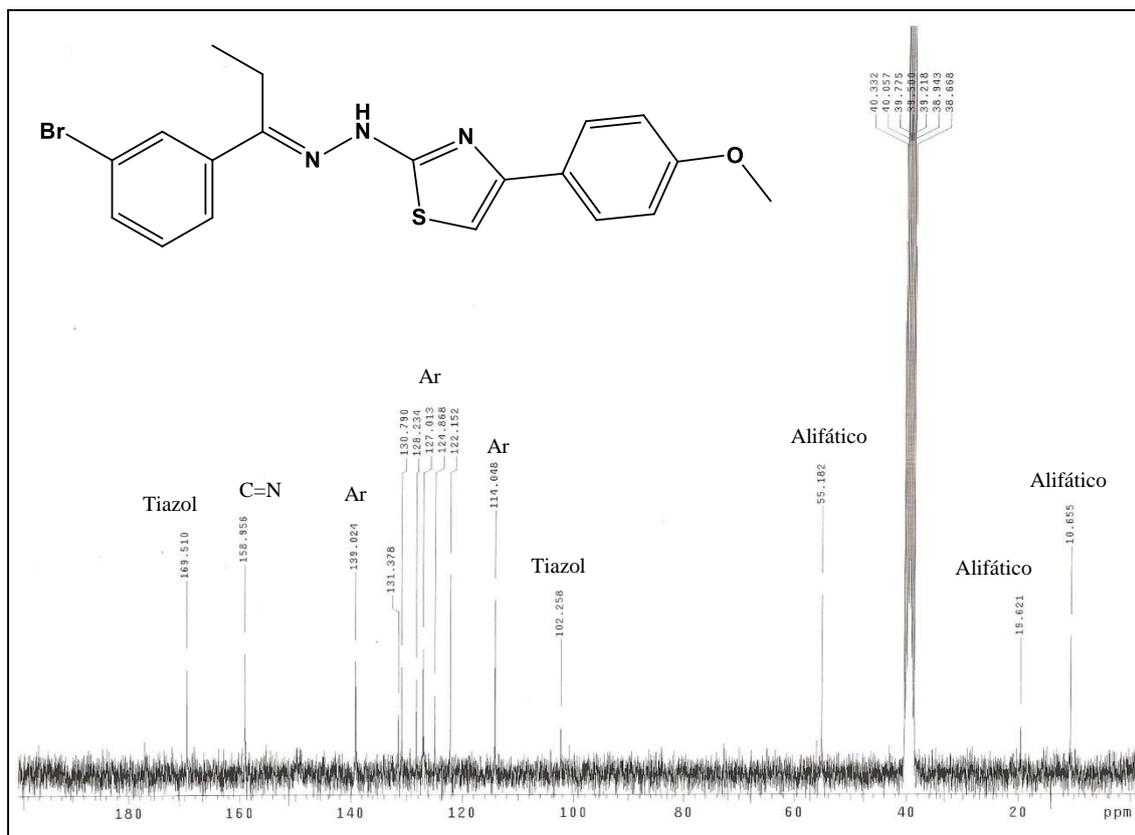
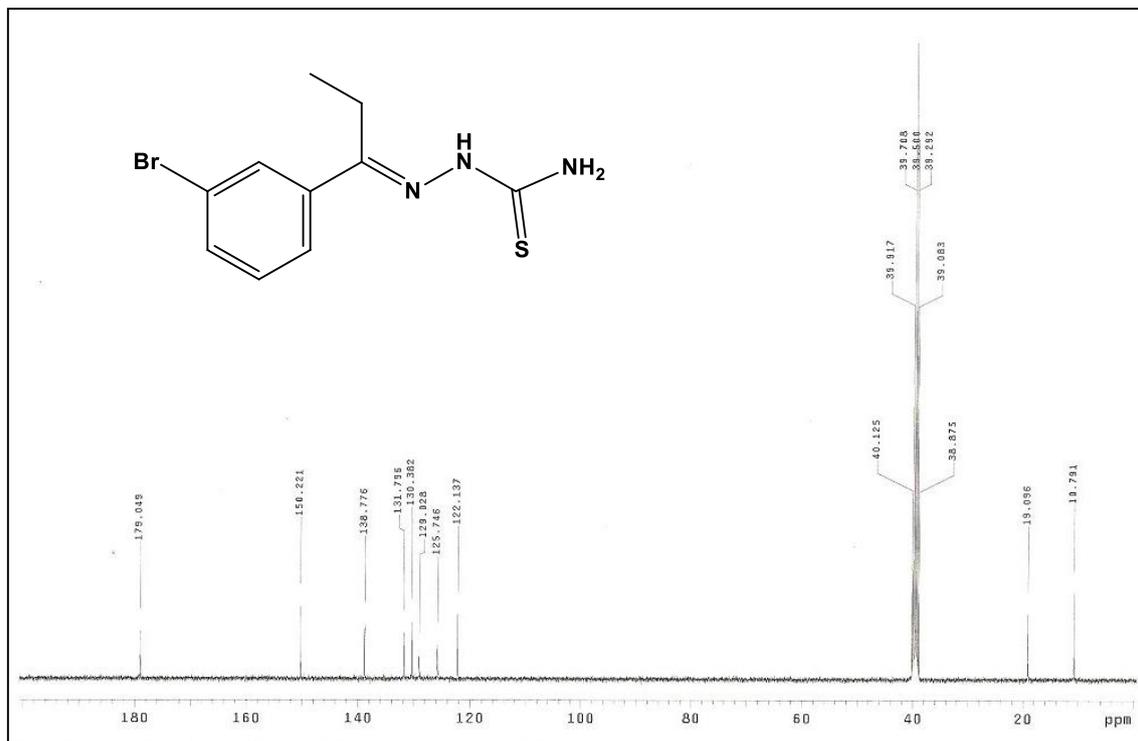
Figura 28 - Espectro de infravermelho da molécula PT01.4



A **Figura 27** apresenta os valores do espectro de RMN<sup>1</sup>H do composto **PT01.4**, onde foi constatada a presença de um tripleto em torno de 1.062, integrando para três hidrogênios, referente a um grupo metila ligado ao metileno (esse sinal é encontrado em todos os outros compostos dessa série). O grupamento metileno foi confirmado por um quarteto em 2.780 ppm integrando para dois hidrogênios (também presente nos demais compostos). Um singlete em 3.780 ppm integrando para três hidrogênios caracteriza a metila do grupo metoxi presente no **PT01.4**. O sinal largo em 5.708 ppm caracteriza a presença do NH hidrazínico. Os sinais entre 6.96 e 7.79 pertencem aos hidrogênios dos anéis aromáticos. O singlete em 7.946 ppm corresponde ao hidrogênio do anel tiazol.

Figura 29 - Espectro do RMN<sup>1</sup>H para a molécula PT01.4.

Para confirmação dos carbonos presentes na molécula **PT01.4**, foi utilizada a ressonância magnética nuclear de carbono 13 (**Fig. 28**). Os picos em 10.655, 19.621 e 55.182 correspondem aos carbonos alifáticos presentes nas moléculas dessa série. O pico em 102.258 é característico C-H do anél tiazol. Esse mesmo pico está presente em todos os compostos dessa série. Fazendo-se uma comparação com a hidrazona de partida (**PT01**) pode-se observar que esse pico característico, que aparece em torno de 103 ppm, não aparece no espectro de carbono 13 do **PT01** (**Fig. 29**). Os picos entre 114.048 e 139.024 correspondem aos carbonos aromáticos. O pico em 158.956 indica o carbono da função azometílica (C=N). Em 169.494 temos o pico característico do carbono do anel tiazol que está diretamente ligado a dois nitrogênios e um enxofre.

Figura 30 - Espectro do RMN<sup>13</sup>C para a molécula PT01.4Figura 31 - Espectro do RMN<sup>13</sup>C para a molécula PT01

### 3.2.2 Parte Biológica

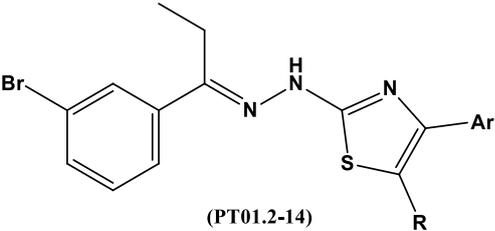
Todos os compostos da série (**PT01.2-14**) foram avaliados, *in vitro*, quanto as propriedades tripanocidas em modelos experimentais frente às formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas das cepas Y ou Dm28c do *T. cruzi*. Nestes ensaios, os valores de CI<sub>50</sub> (μM) foram calculados.

Nos ensaios com epimastigotas, o valor da CI<sub>50</sub> reflete a capacidade do composto em inibir a proliferação celular do parasita quando comparado com a cultura celular não tratada (controle negativo). Os compostos (**PT01.2-14**) foram incubados na presença de epimastigotas por cinco (cepa Dm28c) ou onze dias (cepa Y). Já nos ensaios com tripomastigotas, a forma evolutiva infectante em mamíferos, o valor da CI<sub>50</sub> reflete o efeito do composto em reduzir a viabilidade celular do parasita quando comparado com o controle negativo. Neste ensaio, os compostos (**PT01.2-14**) foram incubados na presença de tripomastigotas da cepa Y por vinte e quatro horas.

Para determinar a seletividade, os compostos (**PT01.2-14**) foram testados em ensaios com células de mamíferos. O efeito na viabilidade celular (toxicidade) destes compostos em esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c foi avaliado. Como este ensaio é de viabilidade celular, os esplenócitos foram incubados na presença dos compostos (**PT01.2-14**) por vinte e quatro horas. A toxicidade em esplenócitos foi quantificada como a maior concentração não-tóxica para as células, e quando necessário, os valores de CI<sub>50</sub> (em μM) foram determinados.

Todos os valores encontrados para os compostos foram comparados com o Nifurtimox (NFX), o Benznidazol (BZD) e com a tiossemicarbazona (**PT01**). Os resultados das atividades antichagásicas e de citotoxicidade em esplenócitos estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Citotoxicidade e atividade tripanocida frente às formas epimastigota e tripomastigota da série PT01.2-14.

Código	R	Ar	Citotox		CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	IS
			µg/ml <sup>a</sup>	µM	Epimastigotas µM (cepa DM28)	Tripomastigota µM (Cepa Y)	(Citotox./ IC50 tripom.)
 <p>(PT01.2-14)</p>							
PT01.2	H	Ph	25	64.71	73.80	5.51	11.74
PT01.3	H	4-Me-Ph	50	125.30	3.41	16.64	7.53
PT01.4	H	4-Me-O-Ph	50	120.10	ND	3.84	31.27
PT01.5	CH <sub>3</sub>	4-Br-Ph	10	20.87	69.30	5.80	3.60
PT01.6	H	3-NO <sub>2</sub> -Ph	10	23.18	28.98	15.05	1.54
PT01.7	H	4-NO <sub>2</sub> -Ph	>100	231.85	ND	60.00	3.86
PT01.8	H	4-F-Ph	50	123.67	ND	146.05	0.85
PT01.9	H	4-Cl-Ph	50	118.83	ND	140.34	0.85
PT01.13	H	3,4-diCl-Ph	25	54.92	ND	129.72	0.42
PT01.14	H	2,4-diCl-Ph	25	54.92	46.31	59.20	0.93
PT01			10	34.94	94.73	2.41	14.50
BZD			25	96.07	48.80	6.26	15.35
NFX			1	3.48	5.71	2.75	1.27

<sup>a</sup> = maior concentração atóxica em células esplênicas de camundongos BALB/c; BZD = Benznidazol; NFX = Nifurtimox; ND = Não Determinado; \* Os valores ND ("Não Determinado") significam medidas que foram feitas, mas não foi possível fazer a regressão para determinar o CI<sub>50</sub>. Isto significa que, apesar dos valores de CI<sub>50</sub> não terem sido determinados, os dados de atividade para a curva dose-resposta foram adquiridos.

### 3.2.2.1 Citotoxicidade e atividade antichagásica

De modo geral, os tiazóis (PT01.2-14) apresentaram menores valores de toxicidade em esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c quando comparados com a tiossemicarbazona (PT01) e com o NFX.

O composto **PT01.2** apresentou concentração atóxica para esplenócitos (25µg/ml) semelhante ao BZD (25µg/ml), cerca de duas vezes maior que o PT01 (10µg/ml) e cerca 20 vezes maior que o NFX (1µg/ml). O **PT01.2** também apresentou valor de  $CI_{50}$  para a forma tripomastigota do *T. cruzi* (5.51µM) semelhante ao BZD (6.26µM).

Com relação ao índice de seletividade (IS) o **PT01.2** é 11.74 vezes mais seletivo para o parasito que para células de mamíferos. A seletividade do **PT01.2** pelo parasito é próxima do IS do PT01 (14.50) e do BZD (15.35) e cerca de dez vezes mais seletivo que o NFX (1.27). Comparando-se os valores do **PT01.2** com o PT01, pode-se observar que a conversão da tiossemicarbazona para tiazolil-hidrazona reduziu a citotoxicidade em células de mamíferos e, apesar de uma pequena diminuição na atividade tripanocida, o valor de  $CI_{50}$  ainda foi semelhante ao fármaco de referência (BZD).

O composto **PT01.3** apresentou valor de citotoxicidade (50µg/ml) cerca de 5 vezes menor que o PT01 (10µg/ml), 2 vezes menor que o BZD (25µg/ml) e cerca de 50 vezes melhor que o NFX (1µg/ml). O **PT01.3** não apresentou uma significativa atividade frente à forma tripomastigota do *T. cruzi* (16.64µM), tendo um IS de 7.53. Entretanto, o **PT01.3** apresentou uma atividade tripanocida para a forma epimastigota (3.41µM) cerca de trinta vezes maior que o PT01 (94.73µM), quatorze vezes maior que o BZD (48.80µM) e semelhante ao NFX (5.71µM). Comparando-se com o **PT01.2** observa-se que a inserção de uma metila no anel aromático adjacente ao anel tiazol, diminuiu a atividade frente a forma tripomastigota (16.64µM) e aumentou consideravelmente a atividade frente à forma epimastigota (3.41µM).

O composto **PT01.4** também apresentou citotoxicidade (50µg/ml) cerca de 5 vezes melhor que o PT01 (10µg/ml), 2 vezes melhor que o BZD (25µg/ml) e cerca de 50 vezes melhor que o NFX (1µg/ml). O **PT01.4** apresentou, dentre os compostos dessa série, melhor atividade tripanocida frente à forma tripomastigota (3.84µM), com valor semelhante à tiossemicarbazona PT01 (2.41µM) e ao NFX (2.75µM) e quase duas vezes melhor que o BZD (6.26µM).

O **PT01.4** foi 31.27 vezes mais seletivo para o parasito que para células de mamíferos, sendo esse valor cerca de duas vezes melhor que o PT01 e que o BZD, e 25 vezes melhor que o NFX. Aparentemente a inserção de uma metoxila no anel aromático adjacente ao tiazol melhora a atividade tripanocida sem aumentar sua citotoxicidade para células de mamíferos.

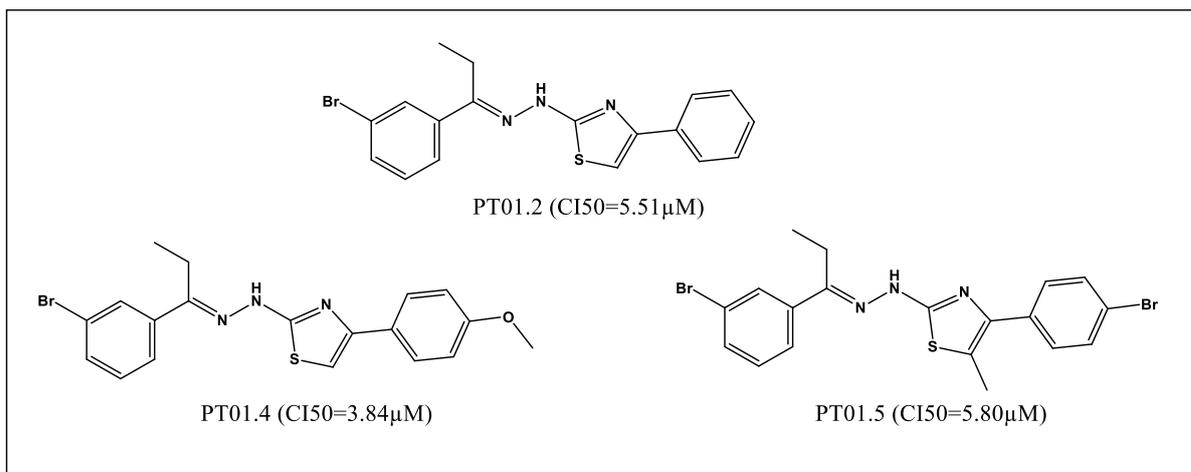
A inserção de halogênios (Cl, Br, F) no anel aromático adjacente ao tiazol (**PT01.5**, **PT01.8**, **PT01.9**, **PT01.13** e **PT01.14**) mostrou-se prejudicial para a atividade tripanocida.

Apesar de tais compostos apresentarem baixa toxicidade, não apresentaram significativa atividade tripanocida.

A inserção do grupo nitro no anel aromático adjacente ao tiazol (**PT01.6** e **PT01.7**) também mostrou-se prejudicial para a atividade tripanocida. Ainda com relação ao grupo nitro, observou-se que uma mudança do grupo nitro da posição *meta* (**PT01.6**) para a posição *para* (**PT01.7**) reduziu em dez vezes a toxicidade. No entanto, tal mudança também reduziu a atividade tripanocida (15.05 $\mu$ M para **PT01.6** e 60.00 $\mu$ M para **PT01.7**)

Portanto, entre os tiazóis da série **PT01.2-14**, foi possível identificar os tiazóis **PT01.2**, **PT01.4** e **PT01.5** como os mais potentes da série, que apresentam propriedades tripanocidas similares ao BDZ. O **PT01.4** foi o mais ativo para a forma tripomastigota, apresentando seletividade pelo parasito duas vezes melhor que o BZD e que o protótipo estrutural (PT01), e cerca de 30 vezes mais seletivo que o NFX (**Fig. 30**).

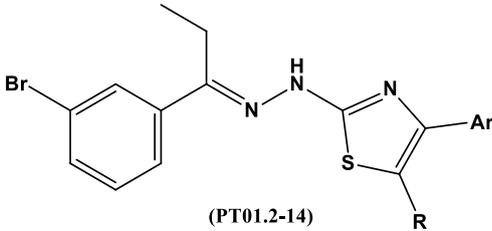
**Figura 32** - Compostos da série **PT01.2-14** com melhor atividade tripanocida frente a forma tripomastigota (Arquivo pessoal)



### 3.2.2.2 Atividade leishmanicida

Uma vez alcançado o objetivo de avaliar a atividade antichagásica de tais compostos (**PT01.2-14**), teve-se também a oportunidade de se calcular a atividade desses compostos frente a outro parasito, *Leishmania sp.* Os resultados estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Atividade leishmanicida frente à forma promastigota da série PT01.2-14.

CÓDIGO	R	Ar	IC50 promastigotas - μM ( <i>L.</i> <i>amazonensis</i> )	IS (Citotoxicidade/I C50 promastigotas)
 (PT01.2-14)				
PT01.2	H	Ph	6.29	<b>10.29</b>
PT01.3	H	4-Me-Ph	14.13	<b>8.87</b>
PT01.4	H	4-Me-O-Ph	8.07	<b>14.88</b>
PT01.5	CH3	4-Br-Ph	4.44	<b>4.70</b>
PT01.6	H	3-NO2-Ph	3.45	<b>6.72</b>
PT01.7	H	4-NO2-Ph	7.58	<b>30.59</b>
PT01.8	H	4-F-Ph	12.79	<b>9.67</b>
PT01.9	H	4-Cl-Ph	2.68	<b>44.34</b>
PT01.13	H	3,4-diCl-Ph	10.06	<b>5.46</b>
PT01.14	H	2,4-diCl-Ph	12.39	<b>4.43</b>
ND	=	PT01	3.18	<b>10.99</b>

Não

Determinado; \*Os valores ND ("Não Determinado") significam medidas que foram feitas, mas não foi possível fazer a regressão para determinar o CI<sub>50</sub>. Isto significa que, apesar dos valores de IC<sub>50</sub> não terem sido determinados, os dados de atividade para a curva dose-resposta foram adquiridos.

De modo geral, todos os compostos da série (PT01.2-14) foram ativos para a forma promastigota do *L. amazonensis*. O composto PT01.2 apresentou IS para a forma promastigota do *L. amazonensis* (10.29μM) semelhante à tiossemicarbazona PT01 (10.99μM), observando-se que a mudança de tiossemicarbazona para tiazolil-hidrazona não diminui a atividade leishmanicida.

A introdução de uma metila no anel aromático adjacente ao anel tiazol (PT01.3) reduziu a atividade leishmanicida (14.13μM) quando comparado ao PT01.2 (6.29μM). Já a introdução de uma metoxila no anel adjacente ao tiazol (PT01.4) manteve a atividade leishmanicida (8.07μM), semelhante ao PT01.2 (6.29μM).

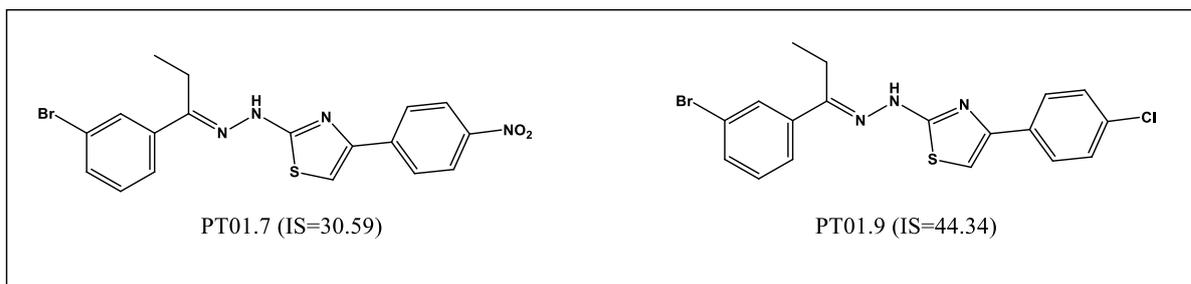
Aparentemente, a introdução de um halogênio no anel aromático adjacente ao tiazol melhora a atividade leishmanicida, com exceção do Flúor (PT01.8, 12.69μM). Por outro lado, a introdução de dois halogênios no anel aromático adjacente ao tiazol (PT01.13 e PT01.14) diminuiu a atividade leishmanicida (10.06 e 12.39μM, respectivamente).

A introdução de grupo nitro no anel aromático adjacente ao tiazol (**PT01.6** e **PT01.7**) também aumentou a atividade leishmanicida. A mudança do grupo nitro da posição *meta* (**PT01.6**) para a posição *para* (**PT01.7**) aumentou em cinco vezes a seletividade do parasito.

Dos compostos avaliados dessa série, o composto halogenado **PT01.9** foi o que apresentou melhor atividade leishmanicida ( $2.68\mu\text{M}$ ), sendo quase 45 vezes mais seletivo para o parasito que para células de mamíferos. Desse modo, a introdução de um Cloro na posição *para* do anel aromático diretamente ligado ao tiazol, mostrou-se ser a melhor estratégia para otimizar a atividade leishmanicida dessa série de tiazolil-hidrazonas.

Portanto, entre os tiazóis da série **PT01.2-14**, foi possível identificar os tiazóis **PT01.7** e **PT01.9** como os mais seletivos da série, sendo o **PT01.7** três vezes mais seletivo e o **PT01.9** quatro vezes mais seletivo, quando comparado com a tiossemicarbazona PT01 (**Fig. 31**).

**Figura 33** - Compostos da série **PT01.2-14** com maior seletividade para a forma promastigota do *Leishmania amazonensis* (Arquivo pessoal)



### 3.3 SEÇÃO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 Parte Química

Os reagentes foram adquiridos da Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma-Aldrich, enquanto que os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica. Os solventes deuterados (DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O) são da marca CIL (Tédia Brazil).

As reações foram acompanhadas em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F<sub>254</sub>. As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm).

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

Para todos os compostos inéditos, foram feitas as análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e quando necessário, análises bidimensionais (DEPT) bem como a adição de D<sub>2</sub>O para a localização dos sinais de NH. Todos os compostos foram solubilizados em DMSO-*d*<sub>6</sub>. Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram adquiridos nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para <sup>1</sup>H; 100 MHz para <sup>13</sup>C) ou Bruker AMX (300 MHz para <sup>1</sup>H e 75.5 MHz para o <sup>13</sup>C), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN <sup>1</sup>H foram designadas da seguinte forma: s / singleto; d / dubleto; t / tripleto; dd / duplo dubleto; q / quarteto; m / multipleto. Para os espectros no infravermelho, utilizou-se o instrumento Bruker (Modelo IFS 66) usando pastilhas de KBr.

##### 3.3.1.1 Metodologia de Síntese

**3.3.1.1.1 Síntese do composto intermediário PT01, 2-(1-(3-bromofenil)propilideno) hidrazinacarbotoamida:** Em balão de fundo redondo, adicionou-se a 1-(3-bromofenil)propan-1-ona, a tiossemicabazida (na proporção 1:1), etanol (q.s.p.s.) e HCl (cat.). A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 2-3 horas. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com etanol, obtendo-se o produto puro.

- **PT01** = 5,486mmols 1-(3-bromofenil)propan-1-ona, 5,486mmols tiossemicarbazida, 7 gotas HCl;

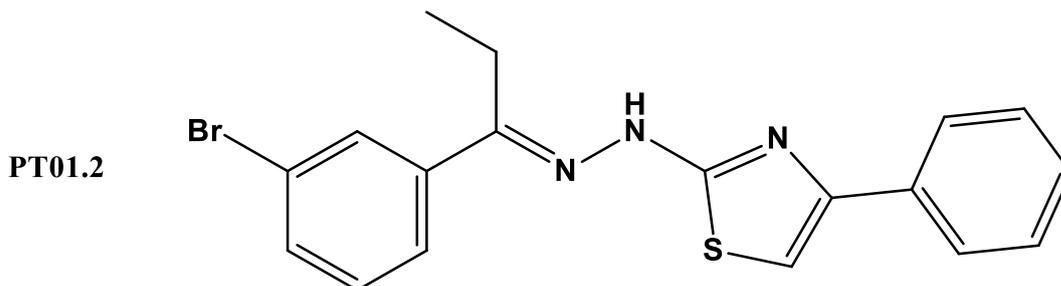
**3.3.1.1.2. Síntese da série 3-Br-fenil-propil-hidrazona-tiazóis (PT01.2-14):** Em balão de fundo redondo, adicionou-se o 2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinacarbotoio-amida (**PT01**), a respectiva cetona halogenada e isopropanol (q.s.p.s.). A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente por 1 hora. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com água destilada, obtendo-se o produto puro.

- **PT01.2** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-acetofenona;
- **PT01.3** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-4'-metil-acetofenona;
- **PT01.4** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-4'-metoxi-acetofenona;
- **PT01.5** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2,4'-dibromo-propilfenona;
- **PT01.6** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-3'-nitro-acetofenona;
- **PT01.7** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-4'-nitro-acetofenona;
- **PT01.8** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-4'-fluor-acetofenona;
- **PT01.9** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-4'-cloro-acetofenona;
- **PT01.13** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2-bromo-3',4'-dicloro-acetofenona;
- **PT01.14** = 1,398 mmol de **PT01**, 1,398 mmol de 2,2',4'-tricloro-acetofenona.

### 3.3.1.2 Dados Físico-Químicos e Elucidação Estrutural

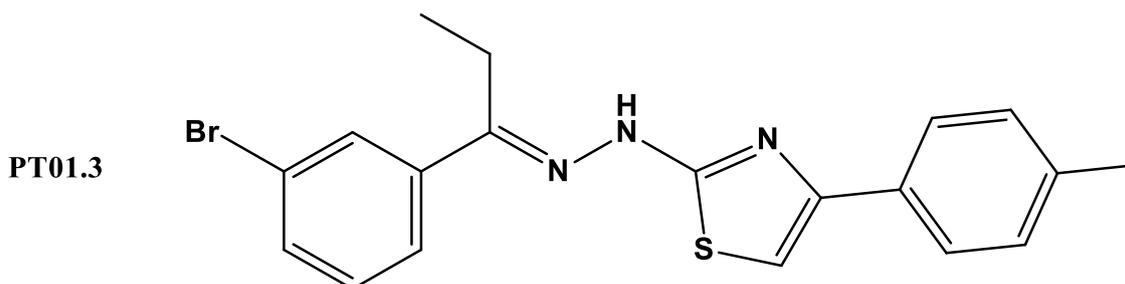
**PT01: 2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinacarbotoioamida:**

$C_{10}H_{12}BrN_3S$ ; 286,19g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.4; PF: 142°-146°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3415.33 (NH), 3200.90 e 3146.40 (CH Ar), 1507.11 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 0.992 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.860 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.341 (t, 1H, Ar), 7.560 (d, 1H, Ar), 7.860 (d, 1H, Ar), 8.083 e 8.151 (2s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.310 (s, 1H, Ar), 10.353 (s, 1H, NH); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.791 (Alif), 19.096 (Alif), 122.137 (Ar), 125.746 (Ar), 129.028 (Ar), 130.382 (Ar), 131.796 (Ar), 138.776 (Ar), 150.221 (C=N), 179.045 (S=C-NH<sub>2</sub>).



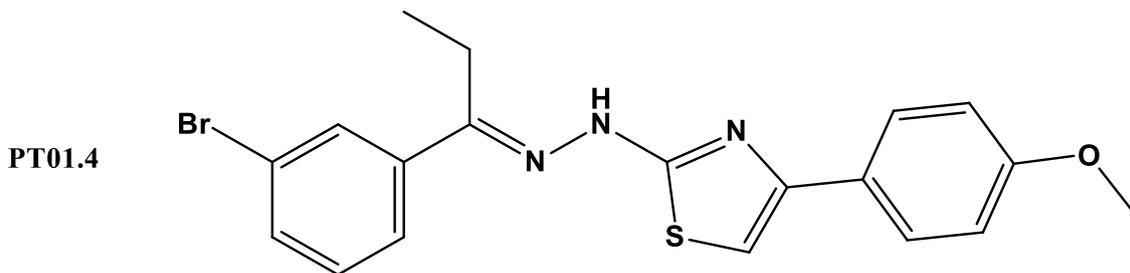
**PT01.2: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol:**

$C_{18}H_{16}BrN_3S$ ; 386,31g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.63; PF: 196°-199°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1516.36 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.029 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.820 (d, 2H,  $CH_2$ ), 7.276-7.396 (m, 5H, Ar), 7.518-7.536 (d, 1H, Ar), 7.721-7.739 (d, 1H, Ar), 7.810-7.828 (d, 2H, Ar), 7.911 (s, 1H, Tiazol), 10.638 (s, 1H, NH); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.065 (Alif), 19.639 (Alif), 104.404 (Tiazol), 122.100-138.962 (Ar), 149.819 (C=N), 169.576 (Tiazol).



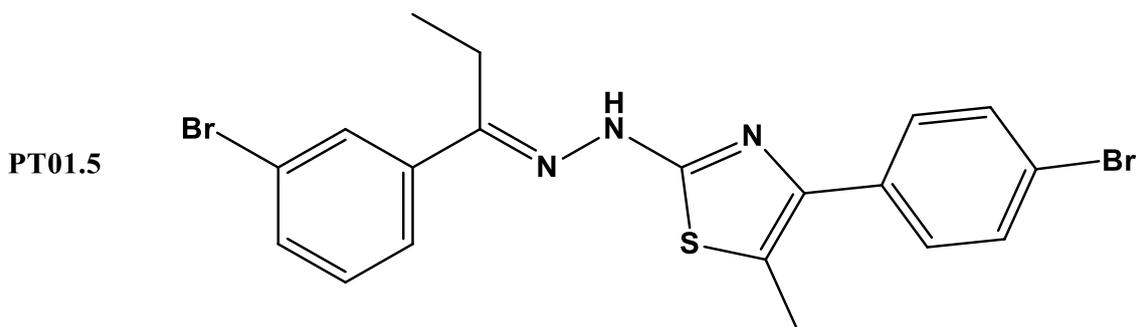
**PT01.3: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(p-tolil)tiazol:**

$C_{19}H_{18}BrN_3S$ ; 399,04g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.63; PF: 192°-196°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1505.60 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.064 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.314 (s, 3H,  $CH_3$ ) 2.847 e 2.864 (d, 2H,  $CH_2$ ), 6.322 (s, 1H, NH), 7.211-7.752 (m, 8H, Ar), 7.943 (s, 1H, Tiazol); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.583 (Alif), 19.587 (Alif), 20.792 (Alif), 103.422 (Tiazol), 122.085-137.042 (Ar), 138.992 (C=N), 169.494 (Tiazol).



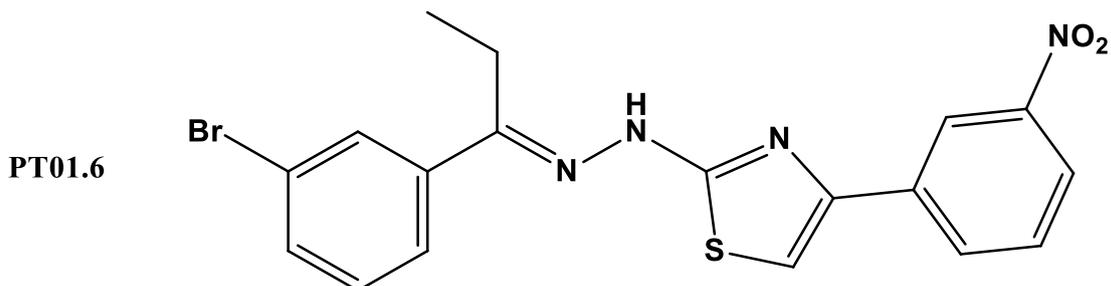
**PT01.4: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(4-metoxifenil)thiazol:**

$C_{19}H_{18}BrN_3OS$ ; 416,33g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.55; PF: 197°-200°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3115.41 (NH), 2954.46 e 2831.76 (CH Ar), 1509.43 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.062 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.780 (q, 2H,  $CH_2$ ), 3.780 (s, 3H,  $CH_3$ ), 5.708 (s, 1H, NH), 6.964 e 6.993 (d, 2H, Ar), 7.164 (s, 1H, Ar), 7.391 (t, 1H, Ar), 7.57 (dd, 1H, Ar), 7.776 (d, 1H, Ar), 7.79 (d, 2H, Ar), 7.946 (s, 1H, Tiazol); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.655 (Alif), 19.621 (Alif), 55.182 (Alif), 102.258 (Tiazol), 114.048-139.024 (Ar), 158.956 (C=N), 169.494 (Tiazol).



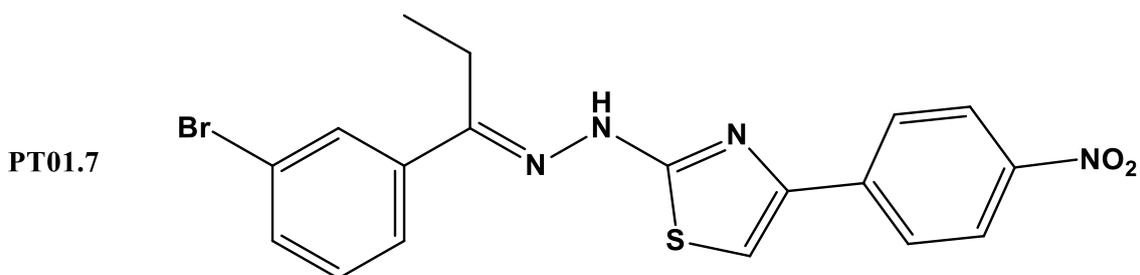
**PT01.5: 4-(4-bromofenil)-2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-5-metil-tiazol:**

$C_{19}H_{17}Br_2N_3S$ ; 479,23g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.65; PF: 192°-197°C; RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.051 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.396 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.822 e 2.840 (d, 2H,  $CH_2$ ), 4.637 (s, 1H, NH), 7.385 (t, 1H, Ar), 7.567 e 7.584 (d, 3H, Ar), 7.630 e 7.650 (d, 2H, Ar), 7.753 e 7.771 (d, 1H, Ar), 7.941 (s, 1H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.598 (Alif), 12.130 (Alif), 19.587 (Alif), 118.156-131.290 (Ar), 138.955 (C=N), 165.796 (Tiazol).



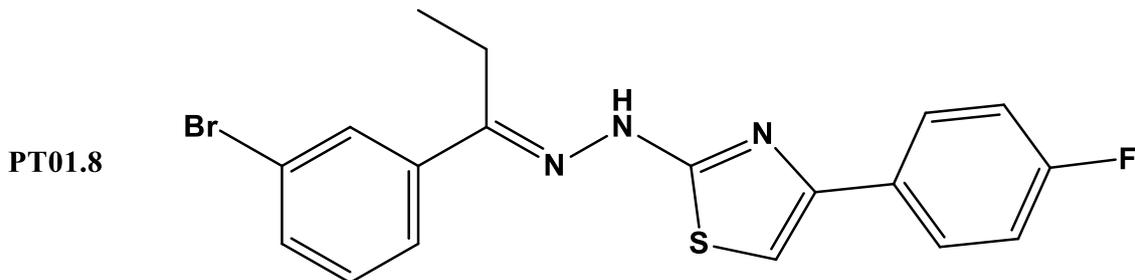
**PT01.6: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(3-nitrofenil)tiazol:**

$C_{18}H_{15}BrN_4O_2S$ ; 431,31g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.63; PF: 220°-223°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1530.66 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.071 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.862 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.83 e 11.6 (s, 1H, NH), 7.393-8.717 (m, 9H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.545 (Alif), 19.527 (Alif), 107.098 (Tiazol), 122.070-148.271 (Ar), 149.261 (C=N), 169.903 (Tiazol).



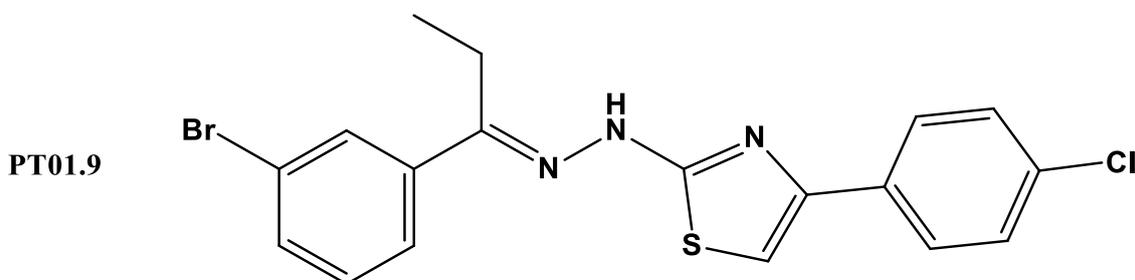
**PT01.7: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(4-nitrofenil)tiazol:**

$C_{18}H_{15}BrN_4O_2S$ ; 431,31g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.52; PF: 193°-196°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3332.81 (NH), 1508.37 (C=O); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.071 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.850 e 2.864 (d, 2H,  $CH_2$ ), 7.397-8.291 (m, 9H, Ar), 11.663 (s, 1H, NH); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.545 (Alif), 19.557 (Alif), 109.181 (Tiazol), 122.085-140.733 (Ar), 146.173 (C=N), 170.015 (Tiazol).



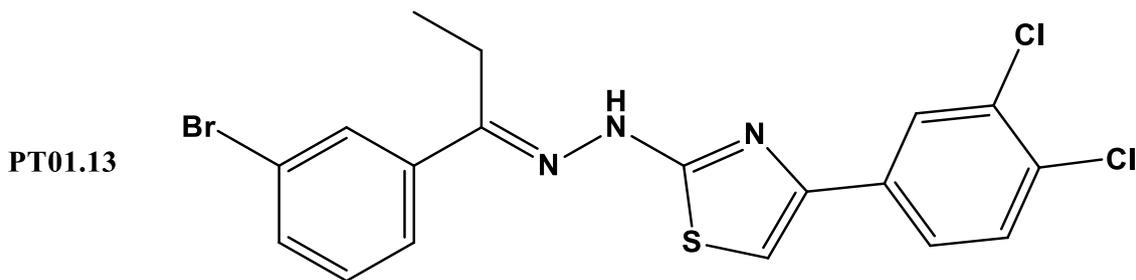
**PT01.8: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(4-fluorofenil)tiazol:**

$C_{18}H_{15}BrFN_3S$ ; 404,30g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.65; PF: 207°-210°C; RMN- $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.066 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.85 (q, 2H,  $CH_2$ ), 4.275 (s, 1H, NH), 7.218-7.929 (m, 9H, Ar); RMN- $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.568 (Alif), 19.505 (Alif), 104.047 (Tiazol), 115.335-139.074 (Ar), 149.164 (C=N), 169.688 (Tiazol).



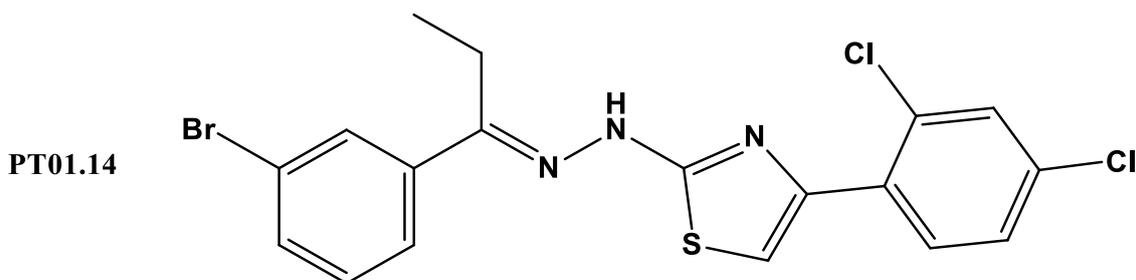
**PT01.9: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(4-clorofenil)tiazol:**

$C_{18}H_{15}BrClN_3S$ ; 420,75g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.65; PF: 204°-209°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3922.26 (NH); RMN- $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.096 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.834 (q, 2H,  $CH_2$ ), 6,006 (s, 1H, NH), 7.361-7.926 (m, 9H, Ar); RMN- $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.624 (Alif), 19.552 (Alif), 105.180 (Tiazol), 122.144-139.055 (Ar), 149.181 (C=N), 169.754 (Tiazol).



**PT01.13: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(3,4-diclorofenil)tiazol:**

$C_{18}H_{14}BrCl_2N_3S$ ; 455,20g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.85; PF: 228°-231°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3642.77 e 2971.43 (CH Ar), 1475.20 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.033 e 1.049 (d, 3H,  $CH_3$ ), 2.822 e 2.845 (d, 2H,  $CH_2$ ), 5.288 (s, 1H, NH), 7.348-8.101 (m, 8H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.632 (Alif), 19.583 (Alif), 106.623 (Tiazol), 122.152-147.868 (Ar), 149.265 (C=N), 169.808 (Tiazol).



**PT01.14: 2-(2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinil)-4-(2,4-diclorofenil)tiazol:**

$C_{18}H_{14}BrCl_2N_3S$ ; 455,20g/mol; Rf (8:2-Hexano:Acetato de etila): 0.75; PF: 174°-179°C; IV (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1518.07 (C=N); RMN-  $^1H$  (300 MHz, ppm): 1.061 (t, 3H,  $CH_3$ ), 2.84 (q, 2H,  $CH_2$ ), 4.041 (s, 1H, NH), 7.378-7.939 (m, 8H, Ar); RMN-  $^{13}C$  (75.5 MHz, ppm): 10.560 (Alif), 19.572 (Alif), 109.836 (Tiazol), 122.077-132.570 (Ar), 139.014 (C=N), 168.772 (Tiazol).

### 3.3.2 Parte Biológica

**3.3.2.1 Toxicidade para esplenócitos:** Esplenócitos de camundongos BALB/c foram distribuídos em placa de 96 poços com uma densidade de  $5 \times 10^6$  células por poço em meio RPMI-1640. Cada inibidor químico foi solubilizado em DMSO na concentração de 10 mg/mL e em seguida a amostra foi diluída serialmente em meio RPMI-1640 nas concentrações de 1.0, 10 e 100  $\mu g/mL$ , em triplicata. Como controle positivo, usou-se a saponina na concentração de 0.1  $\mu g/mL$ , enquanto que como controle negativo, os poços receberam somente meio RPMI-1640 e DMSO. A placa foi então cultivada por 24 horas na

temperatura de 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. Então adicionou-se 1.0 µCi de <sup>3</sup>H-timidina em cada poço e a placa foi incubada por 6 horas. A placa foi então lida no contador de irradiação beta (Multilabel Reader, Finland) e a porcentagem de incorporação de timidina tritiada foi determinada. Para as células que não foram tratadas com as drogas (controle negativo), calculou-se como 100% de incorporação de timidina tritiada (100% de viabilidade celular). Para as células tratadas com saponina, a viabilidade celular foi de 5%. Quando o percentual de incorporação foi maior que 90%, a concentração da droga foi considerada como atóxica para os esplenócitos.

**3.3.2.2 Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota:** Epimastigotas das cepas Y ou Dm28c foram distribuídas em uma placa de 96 poços em uma densidade final de 10<sup>6</sup> células por poço. Cada inibidor químico foram adicionados nos respectivos poços em triplicatas. Benznidazol e Nifurtimox foram usados como controles positivos neste ensaio. A placa foi então cultivada durante 11 (cepa Y) ou 5 dias (cepa Dm28c) sob 26° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas foi calculado em uma câmara de Neubauer. Para as epimastigotas não tratadas com os inibidores químicos (controle negativo), assumiu-se como 100% do número de parasitas. As curvas dose-respostas foram determinadas e os valores das CI<sub>50</sub> foram calculados usando ao menos cinco concentrações ("data-points") usando uma equação não-linear (Prism, versão 4.0).

**3.3.2.3 Toxicidade para a forma tripomastigota:** Tripomastigotas da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK<sub>2</sub> e distribuídas em uma placa de 96 poços para uma densidade final de 4x10<sup>5</sup> células por poço. Cada inibidor químico foi adicionado nos respectivos poços, em triplicata. Benznidazol e Nifurtimox foram usados como controles positivos neste ensaio. A placa foi então cultivada por 24 horas em 37° C contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas viáveis (ou seja, com motilidade aparente) foi contado em uma câmara de Neubauer. Para os poços que não receberam os inibidores químicos, assumiu-se como 100% do número de parasitas viáveis. As curvas dose-respostas foram determinadas e os valores das CI<sub>50</sub> foram calculados usando ao menos sete concentrações (data-points) usando regressão não-linear (Prism, versão 4.0).

**3.3.2.4 Atividade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*:** Para determinar o efeito anti-proliferativo para *Leishmania sp.*, formas promastigotas (10<sup>6</sup>/ml)

crescidos em culturas axênicas, na fase log de crescimento, foram colocadas em placas de 96 poços no volume de 100 µl, sob condições de cultura adequadas (26°C). Os testes foram conduzidos tendo como controle culturas de parasitos sem tratamento. As substâncias foram avaliadas quanto a concentração inibidora de 50% do crescimento dos parasitos (IC<sub>50%</sub>) onde formas promastigotas de diferentes cepas de *Leishmania* foram cultivadas em diferentes períodos, na presença de diferentes concentrações dos compostos, procedendo-se em seguida a contagem de parasitos viáveis. O cálculo da IC<sub>50%</sub> foi determinado por meio de uma regressão linear simples utilizando o software Prisma 4 Graphpad.

#### 4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Dez inéditos derivados da ftalimida (**PM01-10** e **PA01**) e dez inéditos derivados da 3'-bromopropifenona-tiossemicarbazona (**PT01.2-14**) do tipo tiazolil-hidrazona foram obtidos e caracterizados estruturalmente. Os compostos derivados da ftalimida (**PM01-10** e **PA01**) foram avaliados quanto as suas atividades tripanocidas “in vitro” frente à forma evolutiva epimastigota e quanto a citotoxicidade frente a células de mamíferos. Os compostos da série (**PT01.2-14**) foram avaliados quanto a atividade tripanocida frente à forma tripomastigota e epimastigota e quanto a citotoxicidade em células de mamíferos.

Entre os tiazóis da série **PM01-10**, foi possível identificar os tiazóis **PM04**, **PM05** e **PM06** como os mais potentes da série, que apresentam propriedades tripanocidas, para a forma epimastigota, melhores que o BDZ. O **PM04** apresentou atividade tripanocida similar ao NFX, porém com a vantagem de ser menos citotóxico. E o **PM06** foi composto mais seletivo para o parasito.

Entre os tiazóis da série **PT01.2-14**, foi possível identificar os tiazóis **PT01.2**, **PT01.4** e **PT01.5** como os mais potentes da série, que apresentam propriedades tripanocidas similares ao BDZ. O **PT01.4** foi o mais ativo para a forma tripomastigota, apresentando seletividade pelo parasito duas vezes melhor que o BZD e que o protótipo estrutural (PT01), e cerca de 30 vezes mais seletivo que o NFX.

As duas séries de compostos também foram avaliadas quanto as propriedade leishmanicidas. Entre os tiazóis da série **PM01-10**, foi possível identificar os tiazóis **PM02** e **PM10** como os mais potentes da série, que apresentaram melhores propriedades leishmanicidas. Já entre os tiazóis da série **PT01.2-14**, foi possível identificar os tiazóis **PT01.7** e **PT01.9** como os mais seletivos da série, sendo o **PT01.7** três vezes mais seletivo e o **PT01.9** quatro vezes mais seletivo, quando comparado com a tiossemicarbazona **PT01**.

Os compostos da série (**PM01-10**) ainda deverão ser avaliados quanto a atividade tripanocida frente a forma tripomastigota, uma vez que essa é a forma infectante e que se encontra presente na corrente sanguínea do hospedeiro. Os compostos mais ativos (de ambas as séries) serão avaliados quanto a atividade tripanocida frente a forma amastigota e os mais potentes poderão ser testados *in vivo*.

As duas séries de compostos foram bastante ativas para o *L. amazonenses*, indicando uma nova linha de pesquisa para tiazolil-hidrazonas. Principalmente para as tiazolil-hidrazonas derivadas da ftalimida, que apresentaram alta seletividade para o parasito.

## REFERÊNCIAS

1. WHO – Chagas. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, acessado em 12 de abril de 2012.
2. FIOCRUZ – Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=91>, acessado em 12 de abril de 2012.
3. 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; 104 (suppl 1): 17–30; 2009.
4. FIOCRUZ – Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>, acessado em 12 de abril de 2012.
5. CAZZULO, J.; STOKA, V.; TURK, V. **The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease.** Curr Pharm Design; 7:1143-1156; 2001.
6. FRANKE de CAZZULO, B. M.; MARTINEZ J.; NORTH, M. J.; COOMBS, G. H.; CAZZULO J. J. **Effect of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*.** FEMS Microbiol Lett; 124:81–86; 1994.
7. MCKERROW J. H.; DOYLE P. S.; ENGEL J. C.; PODUST L. M.; ROBERTSON S. A.; FERREIRA R.; SAXTON T.; ARKIN M.; KERR I. D.; BRINEN L. S.; CRACK C. S. **Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 104:263–269; 2009.
8. HASHIMOTO, Y. **Thalidomide as a Multi-Template for Development of Biologically Active Compounds.** Arch. Pharm. 341, 536–547; 2008.
9. NETO, J. F. G. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” da atividade biológica dos derivados da N-aminometilftalimida sobre *Trypanosoma Cruzi*.** Dissertação de mestrado. UNICAMP. 2002.
10. LEITE, A. C. L. *et al.* **Synthesis of aminoacyl thiazolidones as potential antitumour agents.** Biomedicine & Pharmacotherapy. v. 60, p. 121–126, 2006.
11. LEITE, A. C. L. *et al.* **Synthesis, Cruzain Docking, and *in vitro* Studies of Aryl-4-Oxothiazolylylhydrazones Against *Trypanosoma cruzi*.** Chem Med Chem. v. 2, p. 1339 – 1345, 2007.
12. LEITE, A. C. L. *et al.* **Synthesis, docking, and *in vitro* activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*.** Bioorganic & Medicinal Chemistry. v. 14, p. 3749–3757, 2006.
13. HERNANDES, M.Z. *et al.* **Studies toward the structural optimization of novel thiazolylylhydrazone-based potent antitrypanosomal agentes.** Bioorganic & Medicinal Chemistry; 18; 7826–7835; 2010.

14. 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.** Journal of Medicinal Chemistry; Vol. 45; No. 13; 2002.
15. HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A. *et al.* **Control of neglected tropical diseases.** N Engl J Med; 357: 1018–27; 2007.
16. MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. **Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework.** PLoS Negl Trop Dis; 1: e114; 2007.
17. CHAGAS, C. **Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 1: 159–218 (in Portuguese) ; 1909.
18. AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M. *et al.* **A 9,000-year record of Chagas disease.** Proc Natl Acad Sci USA; 101: 2034–39; 2004.
19. BERNSTEIN, R. E. **Darwin’s illness: Chagas disease resurgens.** J R Soc Med; 77: 608–09; 1984.
20. MONCAYO, A. **Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 98: 577–91; 2003.
21. WHO. **Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee.** Technical report series no 905. Geneva: World Health Organization, 2002.
22. Organización Panamericana de la Salud. **Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas.** Montevideo, Uruguay: Organización Panamericana de la Salud (in Spanish), 2006.
23. GUERRI-GUTTENBERG, R. A.; GRANA, D. R.; AMBROSIO, G.; MILEI, J. **Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared!** Eur Heart J; 29: 2587–91; 2008.
24. BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. **An estimate of the burden of Chagas disease in the United States.** Clin Infect Dis; 49: e52–54; 2009.
25. 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.
26. SCHMUNIS, G. A. **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 102 (suppl 1): 75–85; 2007.
27. GALVAO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D. S.; JURBERG, J. **A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes.** Zootaxa; 202: 1–36; 2003.

28. SCHMUNIS, G. A. **Prevention of transfusional Trypanosoma cruzi infection in Latin America.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 94 (suppl 1): 93–101; 1999.
29. BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; KATZ, L.; CAGLIOTI, S.; STRAMER, S. L. **Chagas disease and the US blood supply.** Curr Opin Infect Dis; 21: 476–82; 2008.
30. TORRICO, F.; ALONSO-VEJA, C.; SUAREZ, E. *et al.* **Maternal Trypanosoma cruzi infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia.** Am J Trop Med Hyg; 70: 201–09; 2004.
31. US Centers for Disease Control and Prevention. **Chagas disease after organ transplantation—Los Angeles, California, 2006.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep; 55: 798–800; 2006.
32. PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; GUARALDO, A. M.; FRANCO, R. M.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. **Chagas disease as a foodborne illness.** J Food Prot; 72: 441–46; 2009.
33. RASSI, A.; RASSI, A. Jr; RASSI, S. G. *et al.* **Doença de Chagas.** In: Lopes AC, ed. Tratado de clinica médica, 2nd edn. Sao Paulo: Editora Roca: 4123–34; 2009.
34. RASSI, A. Jr; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. **Chagas disease.** Lancet; 375: 1388–402; 2010.
35. MANOEL-CAETANO, F. S.; SILVA, A. E. **Implications of genetic variability of Trypanosoma cruzi for the pathogenesis of Chagas disease.** Cad Saude Publica; 23: 2263–74; 2007.
36. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. **Recommendations from a satellite meeting.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 94 (suppl 1): 429–32; 1999.
37. FREITAS, J. M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. **Real time PCR strategy for the identification of major lineages of Trypanosoma cruzi directly in chronically infected human tissues.** Int J Parasitol; 35: 411–17; 2005.
38. BRISSE S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. **Identification of six Trypanosoma cruzi lineages by sequence-characterised amplified region markers.** Mol Biochem Parasitol; 111: 95–105; 2000.
39. FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L; PIMENTA, J. R. *et al.* **Ancestral genomes, sex, and the population structure of Trypanosoma cruzi.** PLoS Pathog; 2: e24; 2006.
40. EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* **The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease.** Science; 309: 409–15; 2005.
41. 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; 25: 77-83; 2009.

42. DIAS, J. C. P. **Natural history of Chagas' disease.** Arq Bras Cardiol; 65: 359–66 (in Portuguese); 1995.
43. 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; 50: 65–66; 2008.
44. ANDRADE, Z. A. **Immunopathology of Chagas disease.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 94 (suppl 1): 71–80; 1999.
45. MARTINS, G. A.; VIEIRA, L. Q.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. **Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection: a possible role in immune response control.** Infect Immun; 67: 3864–71; 1999.
46. REED, S. G.; BROWNELL, C. E.; RUSSO, D. M.; SILVA, J. S.; GRABSTEIN, K. H.; MORRISSEY, P. J. **IL-10 mediates susceptibility to Trypanosoma cruzi infection.** J Immunol; 153: 3135–40; 1994.
47. GUTIERREZ, F. R.; MINEO, T. W.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M.; SILVA, J. S. **The effects of nitric oxide on the immune system during Trypanosoma cruzi infection.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 104 (suppl 1): 236–45; 2009.
48. TARLETON, R. L. **Trypanosoma cruzi and Chagas disease: cause and effect.** In: TYLER, K. M.; MILES, M. A. eds. World class parasites: American trypanosomiasis, vol 7. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers: 107–16; 2003.
49. BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. **Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?** Curr Mol Med; 8: 510–18; 2008.
50. MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMOES, M. V. **Pathogenesis of chronic Chagas heart disease.** Circulation; 115: 1109–23; 2007.
51. MINOPRIO, P. **Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches?** Int J Parasitol; 31: 588–91; 2001.
52. CUNHA-NETO, E.; BILATE, A. M.; HYLAND, K. V.; FONSECA, S. G.; KALIL, J.; ENGMAN, D. M. **Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry.** Autoimmunity; 39: 41–54; 2006.
53. GIRONES, N.; RODRIGUEZ, C. I.; CARRASCO-MARIN, E.; HERNAEZ, R. F.; de REGO, J. L.; FRESNO, M. **Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease.** J Clin Invest; 107: 985–93; 2001.
54. REIS, G. A. dos; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NUNES, M. P.; LOPES, M. F. **The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease.** Trends Parasitol; 21: 237–43; 2005.
55. ACQUATELLA, H. **Echocardiography in Chagas heart disease.** Circulation; 115: 1124–31; 2007.

56. ANDRADE, Z. A. **Mechanisms of myocardial damage in Trypanosoma cruzi infection.** Ciba Found Symp; 99: 214–33; 1983.
57. RASSI, A. Jr; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. **Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 104 (suppl 1): 152–58; 2009.
58. MARIN-NETO, J. A.; MARZULLO, P.; MARCASSA, C. *et al.* **Myocardial perfusion defects in chronic Chagas' disease as detected by thallium-201 scintigraphy.** Am J Cardiol; 69: 780–84; 1992.
59. KOBERLE, F. **Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis.** Adv Parasitol; 6: 63–116; 1968.
60. RASSI, A.; RASSI, A. Jr; RASSI, G. G. **Fase aguda da doença de Chagas.** In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. A., BARRAL-NETTO, M., eds. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas, 2nd edn. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 231–45 (in Portuguese); 2000.
61. FREILIJ, H.; ALTICHEH, J. **Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects.** Clin Infect Dis; 21: 551–55; 1995.
62. MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Jr; MACIEL, B. C.; SIMOES, M. V.; SCHMIDT, A. **Chagas heart disease.** In: YUSUF, S., CAIRNS, J. A., CAMM, A. J., FALLEN, E. L., GERSH, B. J., eds. Evidence-based cardiology, 3rd edn. London: BMJ Books: 823–41; 2010.
63. CAMPBELL, D. A.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. **The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics.** Curr Mol Med; 4: 549–62; 2004.
64. REZENDE, J. M.; LUQUETTI, A. O. **Chagasic megavisceras.** In: Chagas' disease and the nervous system. Scientific publication, no 547. Washington, DC: Pan American Health Organization: 149–71; 1994.
65. BRANDALISE, N. A.; ANDREOLLO, N. A.; LEONARDI, L. S.; CALLEJAS NETO, F. **Carcinoma associated with Chagas's megaesophagus.** Rev Col Bras Cir; 12: 196–99 (in Portuguese); 1985.
66. GARCIA, S. B.; ARANHA, A. L.; GARCIA, F. R. *et al.* **A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer?** Rev Inst Med Trop Sao Paulo; 45: 91–93; 2003.
67. FREITAS, H. F.; CHIZZOLA, P. R.; PAES, A. T. *et al.* **Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas heart disease.** Int J Cardiol; 102: 239–47; 2005.

68. OLIVEIRA, J. S. M.; ARAUJO, R. R. C.; NAVARRO, M. A. *et al.* **Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease.** *Am J Cardiol*; 52: 147–51; 1983.
69. CAROD-ARTAL, F. J.; VARGAS, A. P.; HORAN, T. A. *et al.* **Chagasic cardiomyopathy is independently associated with ischemic stroke in Chagas disease.** *Stroke*; 36: 965–70; 2005.
70. RASSI, A. Jr; RASSI, S. G.; RASSI, A. G. *et al.* **Sudden death in Chagas disease.** *Arq Bras Cardiol*; 76: 75–96; 2001.
71. FIORELLI, A. I.; STOLF, N. A.; HONORATO, R. *et al.* **Later evolution after cardiac transplantation in Chagas' disease.** *Transplant Proc*; 37: 2793–98; 2005.
72. ALTCLAS, J.; SINAGRA, A.; DICTAR, M. *et al.* **Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy.** *Bone Marrow Transplant*; 36: 123–29; 2005.
73. SARTORI, A. M.; IBRAHIM, K. Y.; NUNES WESTPHALEN, E. V. *et al.* **Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS.** *Ann Trop Med Parasitol*; 10: 31–50; 2007.
74. FIOCRUZ – Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=102>, acessado em 12 de abril de 2012.
75. MURCIA, L; CARRILERO, B; VIÑAS, P. A.; SEGOVIA, M. **Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients.** *Rev Esp Quimioter* 2012; 25 (1):74-75.
76. DNDi. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/centro-de-documentacao/comunicados-de-imprensa/331-30-05-2012-lote-comercial-bzn-pediatico.html>, acessado em 01 de junho de 2012.
77. 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.* 284, 25697-703. 2009.
78. DU, X.; HANSELL, E.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R.; COHEN, F. E.; MCKERROW, J. H. *Chem. Biol.* 7, 733–742; 2000.
79. BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A. A. **Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde;** *European Journal of Medicinal Chemistry*; 42; 948e954; 2007.
80. DONDONI, A. **Heterocycles in organic synthesis: thiazoles and triazoles as exemplar cases of synthetic auxiliaries.** *Org. Biomol. Chem*, 8, 3366–3385; 2010.

81. WILLIAMS, D. R.; BROOKS, D. A.; MOORE, J. L.; STEWART, A. O. **The Preparation C-4 Thiazole and Wittig Condensations of Phosphonium Methylides**; Tetrahedron Letters, Vol. 37, No. 7, pp. 983-986, 1996.
82. SAYDAM, S.; YILMAZ, E. **Synthesis, characterization and thermal behavior of 4-chloromethyl-2-(2-hydroxybenzilidenehydrazino) thiazole and its complexes with Cr(III), Co(II), Ni(II) and Cu(II)**. Spectrochimica Acta Part A; 63; 506-510; 2006.
83. HASHIMOTO, Y. **Structural development of biological response modifiers based on thalidomide**. Bioorg. Med. Chem; v. 10, p. 461-479, 2002.
84. TEO, S. K.; STIRLING, D. I.; ZELDIS, J. B. **Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product**. Drug Discov. Today, v. 10, p. 107-113, 2005.
85. LENZ, W. **Thalidomide and congenital abnormalities**. Lancet, v. 1, p. 45, 1962.
86. MELCHERT, M.; LIST, A. **The thalidomide saga**. Int. J. Biochem. Cell Biol., v. 39, p. 1489-1499, 2007.
87. SAMPAIO, E. P.; CARVALHO, D. S.; NERY, J. A. C.; LOPES, U. G.; SARNO, E. N. **Thalidomide: An overview of its pharmacological mechanisms of action**. Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents Med. Chem., v. 5, p. 71-77, 2006.
88. LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; KOATZ, V. L. G.; BARREIRO, E. J. **Thalidomide and analogs as anti-inflammatory and immunomodulator drug candidates**. Anti-Inflamm. Anti-allergy Agents Med. Chem., v. 5, p. 79-95, 2006.
89. MATTHEWS, S. J.; MCCOY, C. **Thalidomide: A review of approved and investigational uses**. Clin. Ther. v. 23, p. 342-395, 2003.
90. WNENDT, S.; ZWINGENBERGER, K. **Thalidomide's chirality**. Nature, v. 385, p. 303-304, 1997.
91. KNOBLOCH, J.; RÜTHER, U. **Shedding light on an old mystery: thalidomide suppresses survival pathways to induce limb defects**. Cell Cycle, v. 7, p. 1121-1127, 2008.
92. SCHUMACHER, H.; SMITH, R. L.; WILLIAMS, R. T. **The metabolism of thalidomide: the spontaneous hydrolysis of thalidomide in solution**. Br. J. Pharmacol. Chemother. v. 25, p. 324-337, 1965.
93. LIMA, L. M. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antiinflamatórios e antiasmáticos**. 2001. 306f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
94. CORRAL, L. G.; HASLETT, P. A. J.; MULLER, G. W.; CHEN, R.; WONG, L. -M.; OCAMPO, C. J.; PATTERSON, R. T.; STIRLING, D. A.; KAPLAN, G. J. Immunol, 163, 380. 1999.

95. SHIBATA, Y.; SHICHITA, M.; SASAKI, K.; NISHIMURA, K.; HASHIMOTO, Y.; IWASAKI, S. *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 177. 1995.
96. SHIBATA, Y.; SASAKI, K.; HASHIMOTO, Y.; IWASAKI, S. *Chem. Pharm. Bull.*, 44, 156. 1996.
97. MIYACHI, H.; AZUMA, A.; OGASAWARA, A.; UCHIMURA, E.; WATANABLE, N.; KOBAYASHI, Y.; KATO, F.; KATO, M.; HASHIMOTO, Y. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 2858.
98. MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. **Nitric Oxide; physiology, pathophysiology and pharmacology of Nitric Oxide.** *Pharmac. Ver.* (43): 109-242, 1991.
99. EVANS, T. G.; REED, S. S.; HIBBIS, J. R. **Nitric Oxide production in murine *Leishmaniasis*: correlation of progressive infection with increase in systemic synthesis of Nitric Oxide.** *Am. J. Med. Hyg.* 54; 486-9, 1996.
100. ADAMS, L. B.; HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; KRAHENBUHL, J. L. **Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen from L-arginine.** *J. Imm.* 144: 2725-9, 1990.
101. JAMES, S. L. **Role of Nitric Oxide in parasitic infections.** *Microb. Rev.* (59): 533-47, 1995.
102. NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E.; FLYNN, J. L.; MORRIS JÚNIOR, S. M. **Enhancement of macrophage microbicidal activity; supplemental Arginine and Citrulline augment Nitric Oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*.** *Infe. Imm.* 2793-6, 1995.
103. VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. **Nitric Oxide involved in control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitaemia and directly kills the parasite in vitro.** *Infec. Imm.* 62: 5177-82, 1994.
104. CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A. FREEMAN, G.L. **Differential regulation of Nitric Oxide synthase isoforms in experimental acute Chagas cardiomyopathy.** *Clin. Exp. Imm.* 121: 112-9, 2000.
105. HERNANDES, M. Z.; CAVALCANTI, S. M. T.; MOREIRA, D. R. M.; AZEVEDO JUNIOR, W. F. de; LEITE, A. C. L. **Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design.** *Current Drug Targets.* 11, 00-00. Bentham Science Publishers Ltd. 2010.