



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MIRIA DE OLIVEIRA BARBOSA

**PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DA
ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE 1,3-TIAZÓIS E SEUS ANÁLOGOS
ESTRUTURAIS 4-TIAZOLINONAS**



RECIFE, PE
2014

MIRIA DE OLIVEIRA BARBOSA

**PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DA
ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE 1,3-TIAZÓIS E SEUS ANÁLOGOS
ESTRUTURAIS 4-TIAZOLINONAS**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cristina Lima Leite

Co-orientador: Dr. Marcos Veríssimo de O. Cardoso

RECIFE, PE
2014

MÍRIA DE OLIVEIRA BARBOSA

**PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DA ATIVIDADE
TRIPANOCIDA DE 1,3-TIAZÓIS E SEUS ANÁLOGOS ESTRUTURAIIS 4-TIAZOLINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 25/07/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira (Examinador Externo)
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

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

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus por ter me concedido a vida e aos meus familiares: Maria da Glória Nascimento Barbosa, Osias de Oliveira Barbosa e Michelle de Oliveira Barbosa.

AGRADECIMENTOS

. Em primeiro lugar agradeço a Deus, pois sem Ele eu não poderia existir, afinal sou obra de Suas mãos.

. A minha gratidão à minha orientadora Ana Cristina Lima Leite pela oportunidade de crescimento na minha vida profissional, pelo empenho e disponibilidade dedicadas a mim.

. Agradeço aos meus pais (Osias e Glória) por demonstrar o mais belo amor entre os homens e por todas as outras coisas que eu jamais poderia retribuir. Sou grata a Deus pela maravilhosa família que me deu e pela minha irmã (Michelle). Não pode caber em mim o amor por vocês. São vocês quem me conhecem por completo e me suportam mesmo assim.

. Meus familiares por parte de mãe e pai são grandes propulsores da minha carreira, pois sempre me incentivam a continuar. Infinitamente grata por acreditarem em mim, e me darem amor. Amo vocês.

. Minha gratidão aos meus amigos pela ajuda em todas as horas que necessitei. Eu não deixarei explícito nomes e locais de onde eles são, mas certamente sabem aqueles que realmente me ajudaram, pois já os agradei imensamente antes.

. Aos Integrantes do LpQM por todos os momentos de companheirismo que me ofereceram e pela maravilhosa recepção desde minha graduação. Para sempre guardarei vocês comigo.

. Aos maravilhosos companheiros do PG'S e discipulado, bem sabem minha eterna gratidão a vocês por nossas orações, consolos e risadas durante todo o tempo. Deus me preparou uma grande surpresa ao separar vocês para mim.

. Aos professores e mestres que me ensinaram e me fizeram chegar até aqui na carreira acadêmica.

. Aos funcionários do departamento de farmácia da UFPE por todo o apoio e momentos de risadas que juntos demos.

.A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFPE).

. Ao CNPq e FACEPE pelo suporte financeiro ao LpQM (DCFAR, UFPE).

. Aos funcionários da Central Analítica do DQF (UFPE) e a todos os professores colaboradores da área biológica que me ajudaram com os testes, minha gratidão.

. Meu português é fraco e minha gramática muito pequena para expressar a gratidão e o amor que sinto por vocês. Eu jamais poderei retribuir a todos, mas desejo o melhor para vida de cada um. Deus os abençoe !!!

**PORQUE DELE E POR ELE, E PARA ELE,
SÃO TODAS AS COISAS; GLÓRIA, POIS,
A ELE ETERNAMENTE. AMÉM.**

Bíblia Sagrada- Romanos 11:36

RESUMO

A doença de Chagas é considerada pela Organização Mundial da Saúde uma das doenças mais negligenciadas do mundo, cerca de 6 a 8 milhões de pessoas estão infectadas e 25 milhões sob risco de adquirir a doença. A quimioterapia para a enfermidade é composta por apenas um medicamento disponível no mercado, o benznidazol. O tratamento com o fármaco necessita de um longo período e apresenta graves efeitos colaterais. Haja vista a grande parcela da população afetada e com uma quimioterapia restrita, a busca de novos protótipos a fármacos antichagásicos se torna necessária e emergencial. Para o planejamento da série química utilizaram-se dois heterociclos, os 1,3-tiazóis e as 4-tiazolinonas. Estes constituem classes de compostos bastante exploradas no âmbito da Química Medicinal, devido a sua versatilidade química e ampla gama de atividades biológicas, com destaque para sua potencial atividade tripanocida. Para o planejamento da síntese utilizou-se técnicas de bioisosterismos e hibridação molecular. Com base nisso, este trabalho apresenta o planejamento, a síntese e avaliação farmacológica de 31 compostos, dos quais 21 se classificam como 1,3-tiazóis e 10 como 4-tiazolinonas. Todos os compostos tiveram sua estrutura química determinada por técnicas espectroscópicas como infravermelho, ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas. A atividade tripanocida foi determinada em epimastigotas (DM28c) e tripomastigota (cepa Y), além da citotoxicidade que foi estimada em esplenócitos de camundongos BALB/c. Os compostos cíclicos produzidos não demonstraram atividade tripanocida relevante sobre a forma tripomastigota, no entanto, os tiazóis apresentaram em sua maioria uma boa citotoxicidade, que pode ser até quatro vezes inferior ao benznidazol. A atividade frente à forma epimastigota foi até 10 vezes superior ao benznidazol,

Palavras-chaves: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Tiazóis.

STRUCTURAL PLANNING,SYNTHESIS AND EVALUATION BIOLOGICAL ACTIVITY OF 1,3-THIAZOLES TRYPANOCIDAL AND ITS STRUCTURAL ANALOGUES 4-TIAZOLINONES

ABSTRACT

Chagas disease is considered by the World Health Organization one of the most neglected diseases in the world, about 6 to 8 million people are infected and 25 million at risk of acquiring the disease. Chemotherapy for this sickness is composed by only one drug available in the market, benznidazole. The drug treatment requires a long period and has severe side effects. Given the large proportion of the population affected and restricted chemotherapy, the search for new prototypes antichagasic drugs becomes necessary and emergency. For planning chemical series, it was used two chemical classes, 1,3-thiazoles and 4-thiazolinones. These classes of compounds are fully explored in the context of Medicinal Chemistry due to their chemical versatility and wide range of biological activities, highlight their potential trypanocidal activity. Based on this, this paper presents the design, synthesis and pharmacological evaluation of 31 compounds, of which 21 are classified as 1,3-thiazoles and 10 as 4-thiazolinones. All compounds had the chemical structure determined by spectroscopic techniques such as IR, ^1H and ^{13}C NMR, LCMS. The trypanocidal activity was determined in epimastigotes (DM28c) and trypomastigotes (Y strain), and the cytotoxicity was estimated in splenocytes from BALB/c mice. The thiazoles compounds showed mostly a good cytotoxicity, which may be up to four times lower than benznidazole. The activity against the epimastigote form was up to 10 times higher than benznidazole, however such cyclic compounds showed no significant trypanocidal activity on trypomastigotes.

Keywords: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. Thiazoles.

Lista de Esquemas

Esquema 1: Desenvolvimento da doença de Chagas no paciente.....	28
Esquema 2: Esquema do método sorológico para determinação da doença de Chagas.....	32
Esquema 3: Obtenção das tiosemicarbazonas.....	42
Esquema 4: Obtenção dos tiazóis.....	43
Esquema 5: Obtenção das tiazolinonas.....	43

Lista de Figuras

Figura1: Representação do mercado farmacêutico mundial	16
Figura2: Estrutura química dos fármacos Benznidazol e Nifurtimox.....	17
Figura3: Localização da cruzaina no <i>T. Cruzi</i>	18
Figura4: Carlos Chagas.....	22
Figura5: Distribuição mundial da doença de Chagas 2005-2009.....	24
Figura6: Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	24
Figura7: <i>Triatoma infestans</i>	26
Figura8: Exame para confirmação da parasitemia (tripomastigota).....	29
Figura9: Localização dos segmentos mais afetados pela doença de Chagas.....	30
Figura10: Manifestações comuns na fase crônica da doença.....	31
Figura11: Mecanismo de ação dos fármacos nifurtimox e benznidazol.....	33
Figura12: Classes de inibidores da cruzaina.....	36
Figura13: Estrutura química do composto líder.....	37
Figura14: Estrutura química do 3,5-di-trifluormetil-tiossemicarbazona.....	37
Figura 15: Núcleo Tiazol.....	38
Figura 16: Protótipos estruturais.....	39

Lista de Tabelas

Tabela 1: Atividade anti- <i>T. cruzi</i> epimastigotados tiazóis.....	45
Tabela 2: Atividade anti- <i>T. cruzi</i> tripomastigotados tiazóis.....	47

Lista de Abreviaturas

¹H-RMN- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

¹³C-RMN- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

BDZ-Benznidazol

CC₅₀- Concentração Citotóxica para 50% da População

CCD- Cromatografia de Camada Delgada

d- Dubleto

dd- Duplo dubleto

DNA- “Deoxyribonucleic acid”

DNDI- “Drugs for Neglected Diseases Initiative”

ELISA-“Enzyme-linked immunosorbent assay”

ESI- Eletro Spray

GPI- Enzima glicosilfosfatidilinositol

HAI- Hemaglutinação

HIV- “Human Immunodeficiency Vírus”

IC₅₀ - concentração inibitória para 50% da população

IFI- Imunofluorescência indireta

IV- Infravermelho

LAFEPE- Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

m- multiplete

NFX- Nifurtimox

OMS- Organização Mundial da Saúde

OPAS- Fundo Estratégico da Organização Pan-Americana de Saúde

PCR- Polymerase chain reaction;

q- quarteto;

ROS- “Reactive Oxygen Species”

s- singleto

SAR- “Structure-Activity Relationships”

t- tripleto;

TOF- “Time-Of-Flight”

WB- Western blot

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1 Histórico	22
3.2. Epidemiologia	23
3.3 Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
3.4. Transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
3.4.1. Transmissão pelo vetor	26
3.4.2. Outras formas de transmissão.....	27
3.5 Manifestações clínicas e diagnóstico	27
3.5.1 Fase Aguda.....	27
3.5.2. Fase Crônica	29
3.6.Tratamento clínico	32
3.7.Desenvolvimento de novas drogas.....	34
3.8. Alvos terapêuticos.....	34
3.9. Cruzaína.....	35
3.10. 1,3-Tiazóis.....	38
3.10. 4-Tiazolinonas.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1.Planejamento estrutural	41
4.2. Seção química.....	42
4.2.1.Síntese das tiossemicarbazonas (MB01, MB02, MB03)	42
4.2.2.Síntese dos aril-1,3-tiazóis	42
4.2.3.Síntese das aril-4-tiazolinonas.....	43
4.2.4.Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	44
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	50
5.1. Generalidades	50
5.2. Metodologia da síntese e análise espectroscópica.....	51
6. PERSPECTIVAS.....	79
7. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	82

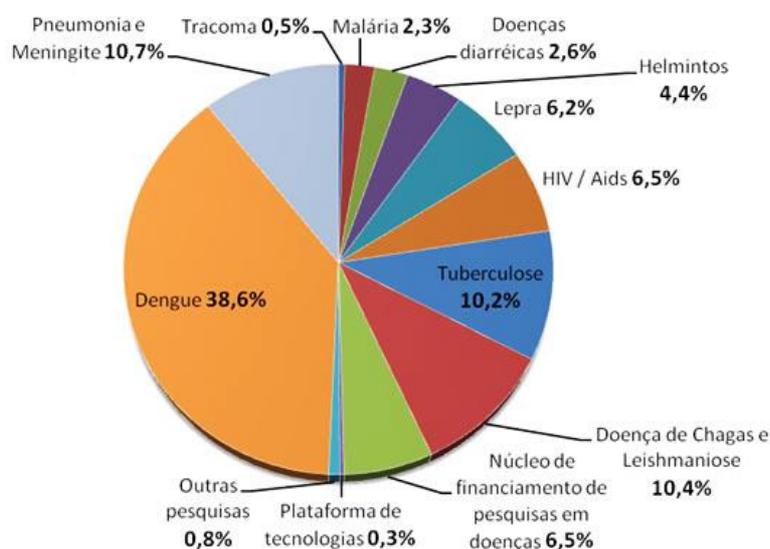
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas está inserida em um grupo de patologias negligenciadas e mais precisamente no sub grupo de doenças extremamente negligenciadas. São assim chamadas porque tem sido progressivamente marginalizadas pelos grandes produtores de fármacos, estando na base do problema o alto custo de investimentos e a falta de um mercado consumidor ativo em países desenvolvidos.¹

Diariamente, mais de 35 mil pessoas morrem de doenças infecciosas e negligenciadas, como leishmaniose, esquistossomose, doença de Chagas, filariose e doença do sono. Tais patologias gerem um impacto de proporções extensas sobre a humanidade, no entanto, elas ainda dispõem de escassos recursos de pesquisas.² (Figura 1).

Figura 1: Distribuição dos recursos de pesquisa em doenças tropicais e outras realizadas pelo Ministério da Saúde e Parceiros



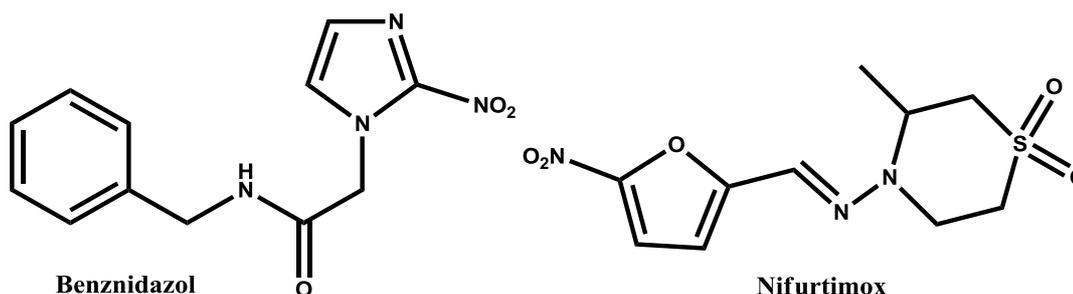
Estaduais

Fonte: G-Finder, 2010³

A doença de Chagas, também chamada tripanossomíase americana, é uma doença causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É transmitida aos seres humanos, principalmente por insetos triatomíneos conhecidos como barbeiros. Em nível mundial, cerca de dez milhões de pessoas estão infectadas, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas é endêmica.⁴

Entre 1975 e 2004, dos 1.556 novos medicamentos registrados, apenas 21 (1,3%) foram desenvolvidos especificamente para doenças negligenciadas. Atualmente, os únicos fármacos com ação tripanocida no mercado são o nifurtimox (NFX) e benznidazol (BZN), (**Figura 2**) sendo que o primeiro foi retirado da terapêutica na década de 1980 devido a seus efeitos colaterais, primeiro no Brasil e depois em outros países da América do Sul.

Figura 2: Estrutura química dos fármacos Benznidazol e Nifurtimox



Fonte: Do autor.

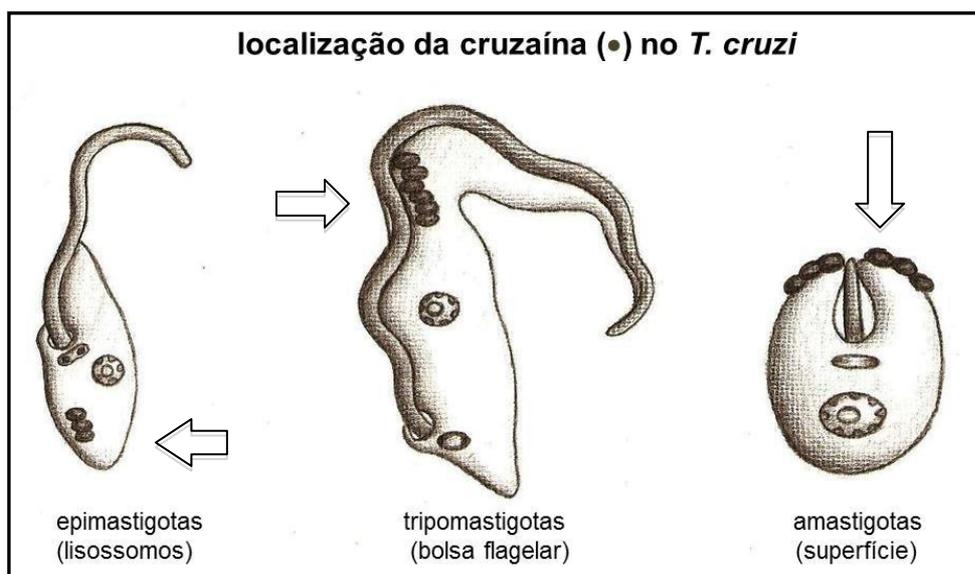
O benznidazol tem seu uso associado a um resultado positivo apenas na fase inicial da doença obtendo cura de até 80% dos pacientes tratados. A sua eficácia diminui significativamente na segunda fase ou fase crônica da doença onde a parasitemia é diminuída e os efeitos colaterais são mais agravados.⁵

A partir da década de 1990, diante das limitações do nifurtimox e do benznidazol após o crescente conhecimento da biologia básica do *T. cruzi*, permitiu-se o desenvolvimento de novas abordagens racionalmente desenvolvidas para uma quimioterapia específica.⁶

Um alvo escolhido para o combate à infecção por *Trypanosoma cruzi* é a cruzaina ou catepsina L-cisteína protease, que está expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasita, (**Figura 3**) além de desempenhar um papel fundamental durante a infecção de células hospedeiras, replicação e de metabolismo.⁷

A classe de enzimas cisteinil proteases são comuns na natureza e regulam vários processos vitais de inúmeros parasitas, o que as torna alvos altamente atrativos para o planejamento de novas drogas.

Figura 3: Localização da cruzaina no *T. Cruzi*



Fonte: MOREIRA, 2012⁸

A partir desse contexto, o planejamento e síntese de novos compostos para o tratamento da Doença de Chagas foi baseado em pesquisas anteriormente realizadas pelo nosso grupo de pesquisa (LpQM).^{9,10,11} Tomando como base o conhecimentos do nosso laboratório e da literatura escolheu-se grupamentos farmacofóricos tiossemicarbazonas e seus bioisómeros cíclicos (tiazóis e tiazolinonas) foram selecionados com o intuito de obter compostos menos tóxicos e com efeito tripanocida elevado.¹²

Este trabalho descreve a síntese de tiazóis e tiazolinonas candidatas a fármacos antichagásicos, concebidas por estratégias de bioisosterismo e hibridação molecular. Os compostos sintetizados exibiram uma baixa citotoxicidade, quando comparada ao benznidazol. Quanto a atividade na forma epimastigota, 13 moléculas demonstraram-se mais potente que o benznidazol, sendo o mais promissor o **MB 1.5**. Para a forma tripomastigota o **MB 1.5** permaneceu como o composto mais promissor da série.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Para maior detalhamento da atividade desenvolvida, classificou-se os objetivos como geral e objetivo.

2.1 Objetivo Geral

Os objetivos desse trabalho visa à obtenção de novos agentes com ação tripanocida partindo-se do planejamento e síntese de novos 1,3 tiazóis e 4-tiazolinonas, bem como a avaliação biológicas desses compostos.

2.2 Objetivos Específicos

- Planejamento estrutural e síntese de 12 inéditos 1,3-tiazóis (**MB01.1 a MB 1.12**)
- Planejamento e síntese de 10 inéditas 4-tiazolinonas (**MG 1.1 a 1.5 e MG2.1 a 2.5**)
- Caracterizar quimicamente e elucidar estruturalmente todos os compostos através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (¹H-RMN) e Carbono (¹³C-RMN), Infravermelho (IV) e LCMS;
- Analisar a citotoxicidade celular frente a esplenócitos de camundongos BALB/c.
- Avaliar atividade anti-proliferativa “in vitro” frente as formas epimastigotas, e tripomastigotas do *T. cruzi*, com determinação da concentração inibitória para 50% (IC50);

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

A fim de conceder uma maior

3.1 Histórico

Em 1909, Carlos Chagas(**Figura 4**), pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, descobriu uma doença infecciosa que acometia operários do interior de Minas Gerais. Esta, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é conhecida como doença de Chagas, em homenagem a quem a descreveu pela primeira vez.¹³

O trabalho de Chagas é único na história da medicina, porque ele foi o único pesquisador até agora a descrever completamente uma nova doença infecciosa: seu patógeno, o vetor, o hospedeiro, as manifestações clínicas e epidemiologia.¹⁴

A Doença de Chagas originou-se há milhões de anos atrás, como uma infecção enzoótica nos animais selvagens, e começou a ser transmitida aos seres humanos como uma antropozoonose, quando o homem invadiu o habitat silvestre. Há relatos na literatura que já foram encontradas evidências da infecção humana em múmias até 9.000 anos de idade.¹⁵

A endemia da doença de Chagas estabeleceu-se como uma zoonose apenas nos últimos 200-300 anos, com triatomíneos adaptados para ambientes domésticos dentre outros fatores, em decorrência da busca por uma nova fonte de sangue para alimentação.¹³ Os insetos hematófagos da subfamília Triatominae (família Reduviidae), espécies mais comuns pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*¹⁴, são vetores da doença para a contaminação do ser humano. A doença também pode ser transmitida através da transfusão de sangue ou transplante de órgãos, de uma mãe para o seu feto, além da ingestão de alimentos contaminados por parasitas.¹

Figura 4: Carlos Chagas



Fonte: FIOCRUZ, 2012⁵

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 6 a milhões milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. Mais de 25 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença.¹⁷ No Brasil, a notificação de casos agudos da doença de Chagas é compulsória imediata segundo a Portaria 2.4725, de 31 de agosto de 2010 do Ministério da Saúde.

Os sintomas da tripanossomíase americana variam durante a infecção e vão do estágio inicial, que se mostra comumente assintomática até a fase crônica onde o indivíduo pode apresentar hipertrofia cardíaca, megacólon ou megaesôfago. Para o tratamento o único fármaco disponível é o benznidazol, o qual é eficaz apenas no estágio inicial.¹⁷ Devido ao longo período necessário, o tratamento pode causar graves efeitos colaterais como anorexia, vômitos e dermatite alérgica, proveniente do dano oxidativo de alguns tecidos.

3.2. Epidemiologia

Mais de um século depois de sua descoberta, a doença de Chagas permanece como uma doença negligenciada na América Latina⁶. Essa enfermidade é um dos maiores problemas de saúde pública em países do cone sul das Américas, pela sua vasta distribuição, altos índices de prevalência e gravidade de evolução¹⁸.

A doença de Chagas foi originalmente limitada a áreas pobres e rurais da América Central e do Sul, em que a transmissão para o homem ocorre através de insetos vetores. Nos últimos 40 anos, o aumento dos programas de controle do vetor e a triagem obrigatória nos bancos de sangue reduziram substancialmente novos casos de infecção diminuindo o número da doença de Chagas na América Latina¹⁹.

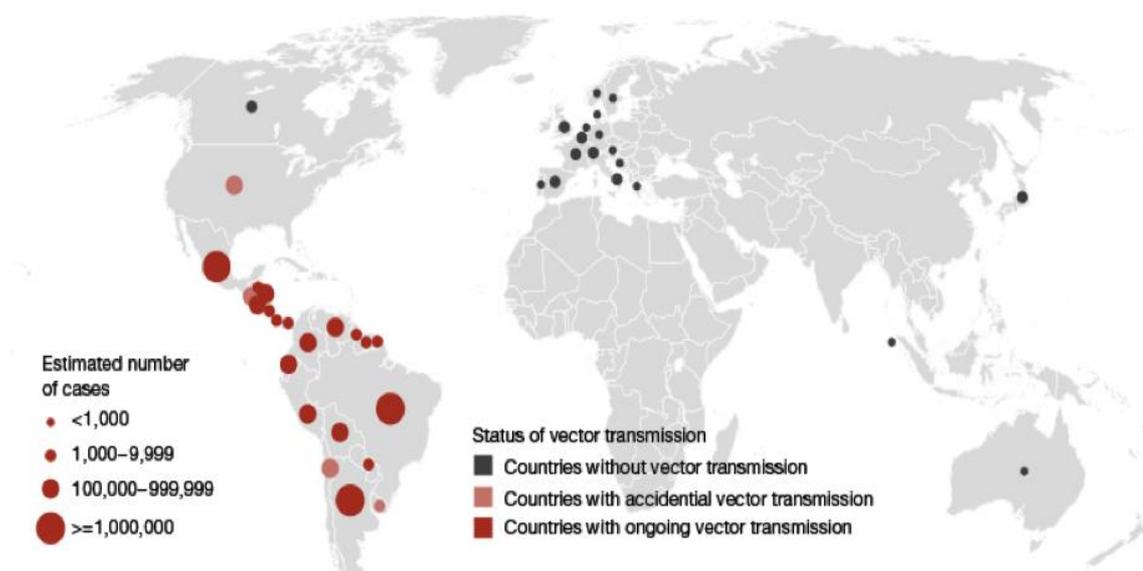
Em pesquisas feitas em vários países na década de oitenta, 100 milhões de pessoas (25% de todos os habitantes da América Latina) foram classificados em risco de infecção, e 17,4 milhões foram diagnosticados como infectados em 18 países endêmicos no período 1980-1985. De acordo com estimativas da Organização Pan Americana de Saúde, 20% da população da América Latina estava em risco (109 milhões de indivíduos) e cerca de 7,7 milhões pessoas foram infectadas em 2005.²⁰

Os dados mais recentes no Brasil apontam que a doença de Chagas segue como um problema de saúde pública, sendo observados casos e surtos em diferentes estados (Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina e São Paulo), sendo maior sua frequência na região da Amazônia

Legal, que engloba os estados do Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará e Tocantins.²¹

Os dados supracitados apontam uma grande abrangência da doença na América do Sul, mas devido ao grande fluxo de imigrantes de países endêmicos, algumas regiões como a Europa e pacífico ocidental, além do EUA e Canadá, já demonstra um crescente aumento de pessoas infectadas (**Figura 5**). O número de pessoas infectada no EUA chega a mais de 300.000 sendo este valor aproximadamente seis vezes maior que os casos relatados na Espanha no ano de 2007.²²

Figura 5: Distribuição mundial da doença de Chagas



Fonte: WORLD DISTRIBUTION OF CHAGAS DISEASE, 2014²³

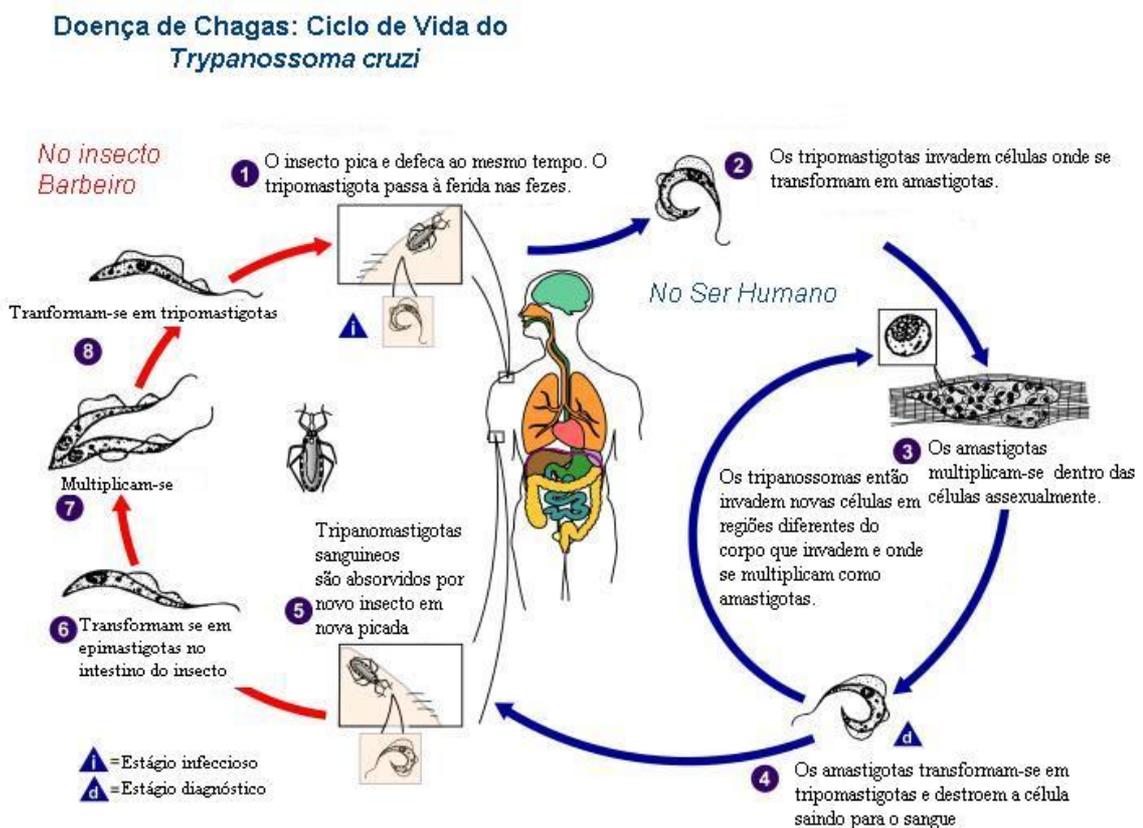
3.3 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* tem um ciclo de vida que se alterna entre hospedeiros vertebrados (que incluem uma vasta gama de mamíferos, incluindo os seres humanos) e hospedeiros invertebrados. O parasita apresenta quatro estágios evolutivos morfologicamente e bioquimicamente distintos durante o seu ciclo de vida: as formas replicativas (epimastigotas e amastigotas) e as formas não-replicativas (tripomastigotas metacíclicas e sanguíneas) do parasita. Este é transmitido aos seres humanos através da urina e das fezes excretadas pelos insetos vetores durante o repasto sanguíneo.¹⁴

Os tripomastigotas presentes nas excretas penetram na corrente sanguínea, através do ferimento causado pelo inseto. Depois de ciclos de divisão as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas na corrente sanguínea que são liberados após a ruptura da membrana da célula hospedeira. Os tripomastigotas sanguíneos liberados infectam as células vizinhas, ou são disseminadas através do sangue, infectando células em outros locais do corpo.

No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas sanguíneas transformam-se em epimastigotas, o estágio de desenvolvimento replicador do hospedeiro invertebrado. Na parte distal do intestino, os parasitas transformam-se em Tripomastigotas metacíclica, as formas infecciosas que são libertados juntamente com as fezes de insetos durante o repasto de sangue, completando assim o ciclo de vida de *T. cruzi*.²⁶ (Figura 6).

Figura 6: Ciclo biológico do *T. cruzi*



Fonte: UMESH S. PAL, 2011²⁵

3.4. Transmissão do *Trypanosoma cruzi*

3.4.1. Transmissão pelo vetor

A doença de Chagas é transmitida aos seres humanos e mais de 150 espécies de animais domésticos (por exemplo, cães e gatos) e mamíferos selvagens (por exemplo, roedores, marsupiais e tatus), principalmente por insetos da subfamília Triatominae, dentro de três ciclos que se sobrepõem: doméstico, peridomiciliar e silvestre. Apesar de terem sido identificadas mais de 130 espécies de triatomíneos, apenas alguns são vetores competentes para *T. cruzi*.²⁴

Triatoma infestans, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as três espécies de vetores mais importantes para a transmissão de *T. cruzi* ao homem. *R. prolixus* é o principal vetor na Colômbia, Venezuela, Guatemala, Honduras e algumas partes da Nicarágua e El Salvador, e *T. dimidiata* ocupa uma área semelhante, mas estende-se também mais ao norte, no México. Em áreas onde a doença de Chagas é endêmica, *T. infestans* (**Figura 7**) tem sido, de longe, o vetor mais importante.¹⁴

Figura 7: *Triatoma infestans*



Fonte: FIOCRUZ, 2012⁵

Apenas os triatomíneos adultos de ambos os sexos, podem abrigar e transmitir o *T. cruzi*. A probabilidade de um triatomíneo estar infectado com *T. cruzi* aumenta de acordo com o número de repastos sanguíneos realizados pelo mesmo, sendo assim os insetos mais velhos e adultos tendem a ter maiores taxas de infecção¹⁸.

Lugares de vegetação densa (florestas tropicais) e habitats urbanos não são ideais para o estabelecimento do ciclo de transmissão humana. No entanto, em regiões onde o habitat

silvestre e sua fauna são diluídos pela exploração, há um aumento do número de transmissão direta entre humanos.²⁶

3.4.2. Outras formas de transmissão

A doença de Chagas pode ser transmitida ao homem por mecanismos que não incluem o inseto vetor, tais como transfusão de sangue, congenitamente da mãe para o bebê durante a gestação, ou através do leite materno.³⁰ O risco de contrair a doença após transfusão de sangue proveniente de um doador infectado é inferior a 10-20%, e depende de vários fatores, incluindo a concentração de parasitas no sangue do doador, o componente do sangue transfundido, e, talvez, a estirpe do parasita. O risco de transmissão parece ser maior 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 cerca de 1 a 2% ou menos na maioria dos outros países endêmicos.²⁶ Essas diferenças podem ser atribuídas à cepa do parasita, ao estado imunológico das mães infectadas, a fatores placentários, e as diferentes metodologias utilizadas para a detecção de casos congênitos.

Esporadicamente, pode-se contrair a doença de Chagas por ingestão de alimentos ou líquidos contaminados com *T. cruzi*, e também por acidentes nos laboratórios que lidam com os parasitas vivos. A transmissão oral da doença de Chagas é normalmente responsável por surtos de infecção aguda em regiões desprovidas de insetos vetores. A ingestão de alimentos contaminados, como o caldo de cana-de-açúcar, açaí, ou carne crua, é geralmente associada a uma infestação parasitária maciça, resultando em uma manifestação clínica aguda mais severa e de alta mortalidade.²⁶

3.5 Manifestações clínicas e diagnóstico

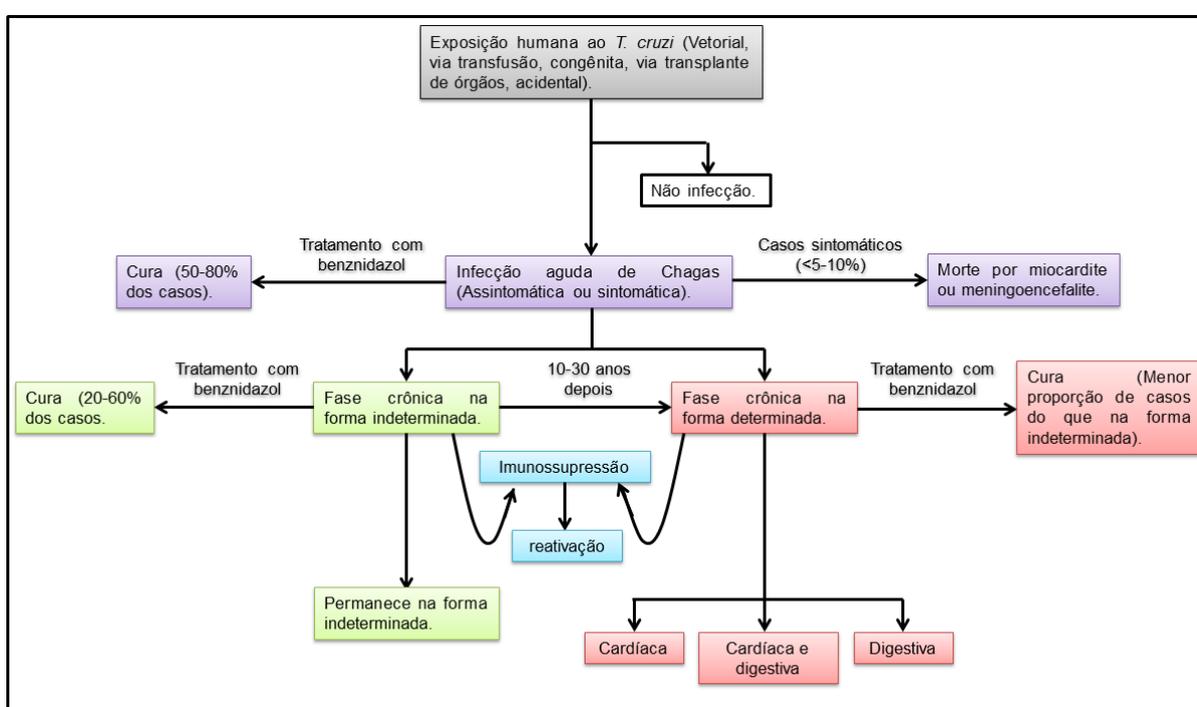
A doença pode ser observada em duas fases: fase aguda, ocorre logo após a infecção e fase crônica, que permanece ao longo da vida.

3.5.1 Fase Aguda

A fase inicial ou aguda é transitória e caracterizada pelo indivíduo que apresente febre persistente, associada a um ou mais das seguintes manifestações clínicas: artralgia, cefaleia, edema de face ou membros, epigastralgia, exantema, mialgia, sinal de Romaña, adenomegalia, cardiopatia aguda, esplenomegalia, hepatomegalia, icterícia ou manifestações hemorrágicas.³⁰

As manifestações da fase aguda da doença decrescem espontaneamente em cerca de 90% dos indivíduos infectados, mesmo se a infecção não for tratada com drogas tripanocidas. Cerca de 60 a 70% desses pacientes nunca irão desenvolver a doença clínica evidente. Esses pacientes têm a forma indeterminada da doença crônica, que se caracteriza pela positividade para anticorpos contra o *T. cruzi* no soro, um eletrocardiograma (ECG) normal, e exame radiológico normal do tórax, esôfago e cólon. A fase aguda é sensível aos tratamentos com antiparasitários e possui taxa de cura de 60% a 90% de cura (**Esquema 1**).³²

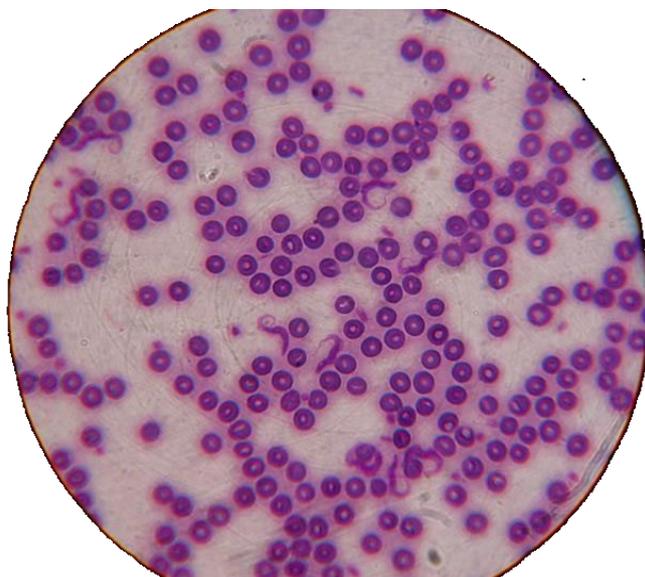
Esquema 1: Desenvolvimento da doença de Chagas no paciente



Fonte: RASSI, 2010²⁹

Para o diagnóstico da fase aguda da doença, são utilizados testes parasitológicos direto, baseado na observação do parasito presente no sangue dos indivíduos infectados, como o exame de sangue a fresco, esfregaço e gota espessa (**Figura 8**). 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 e na negatividade do teste direto a fresco. Esses testes são indicados na fase aguda da doença, quando a parasitemia é elevada.³⁰

Figura 8: Exame para confirmação da parasitemia (tripomastigota)



Fonte: ACERVO DE LÂMINAS DA USJT, 2014²⁸

3.5.2. Fase Crônica

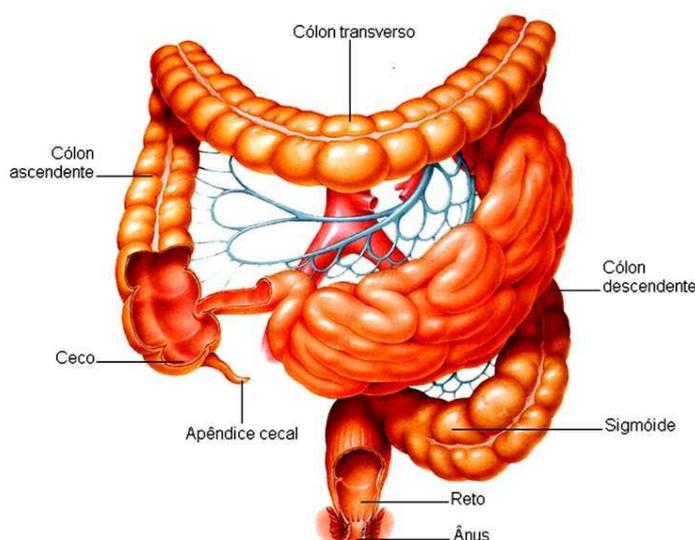
Após a fase inicial da doença, no período de 10 a 30 anos a doença pode alcançar a fase crônica. O desenvolvimento clínico vai desde a ausência de sinais e sintomas (na forma indeterminada) até os quadros onde a doença é grave e há risco de morte súbita. As manifestações clínicas típicas desta fase estão relacionadas com a alteração patológica do coração, esôfago, cólon, ou de uma combinação destes; e são agrupadas em três formas principais: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva.²⁷

Na forma cardíaca, o coração mostra-se macroscopicamente aumentada de volume e mais pesado do que o normal, com peso de 550g em média e hipertrofia das paredes. Dentre os principais sintomas estão: arritmias, insuficiência cardíaca, tromboembolismo, insônia e edema dos membros inferiores.³³

A morte súbita é a principal causa de morte em pacientes com cardiopatia chagásica, o que representa cerca de dois terços de todas as mortes, seguido de insuficiência cardíaca refratária (25 a 30%) e tromboembolismo (10 a 15%). 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 nódulo sinusal.^{34,35}

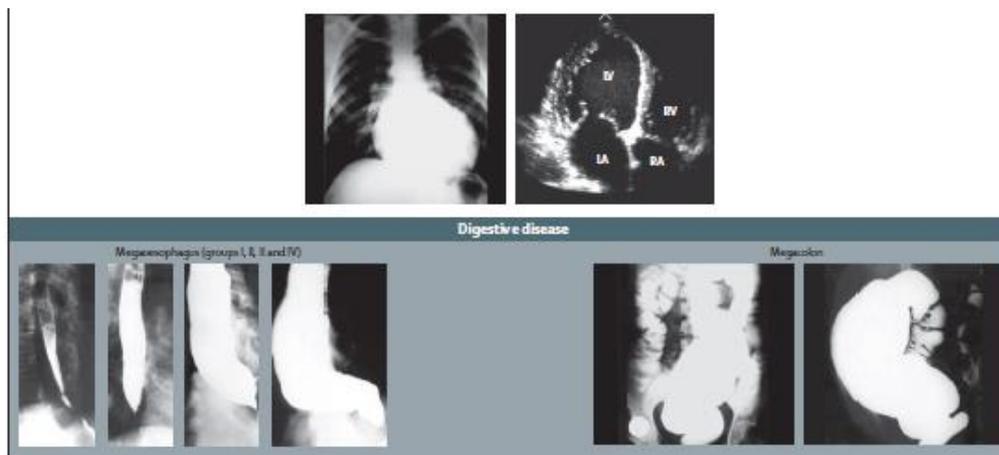
A forma digestiva é encontrada quase que exclusivamente ao sul da bacia amazônica (principalmente na Argentina, Brasil, Chile e Bolívia). Esta distribuição geográfica é devida provavelmente a diferenças nas estirpes dos parasitas³³. Disfunção gastrintestinal (principalmente megaesôfago, megacólon, ou ambos)³⁶, desenvolve-se em cerca de 10 a 15% dos pacientes cronicamente infectados.²⁶ No megaesôfago, observa-se o aumento do diâmetro do órgão e alterações na motilidade, além de sintomas como dores, regurgitação, hipertrofia das glândulas salivares (provocando sialose), soluço e tosse. No caso do megacólon apresenta-se como principal característica a constipação intestinal, causado pelo comprometimento do segmento sigmoide, reto ou cólon descendente (**Figura 9**), podendo durar semanas, e à perfuração levando por vezes à peritonite.³⁷

Figura 9: Localização dos segmentos do intesino mais afetados pela doença de Chagas



Fonte: INFOESCOLA, 2014³¹

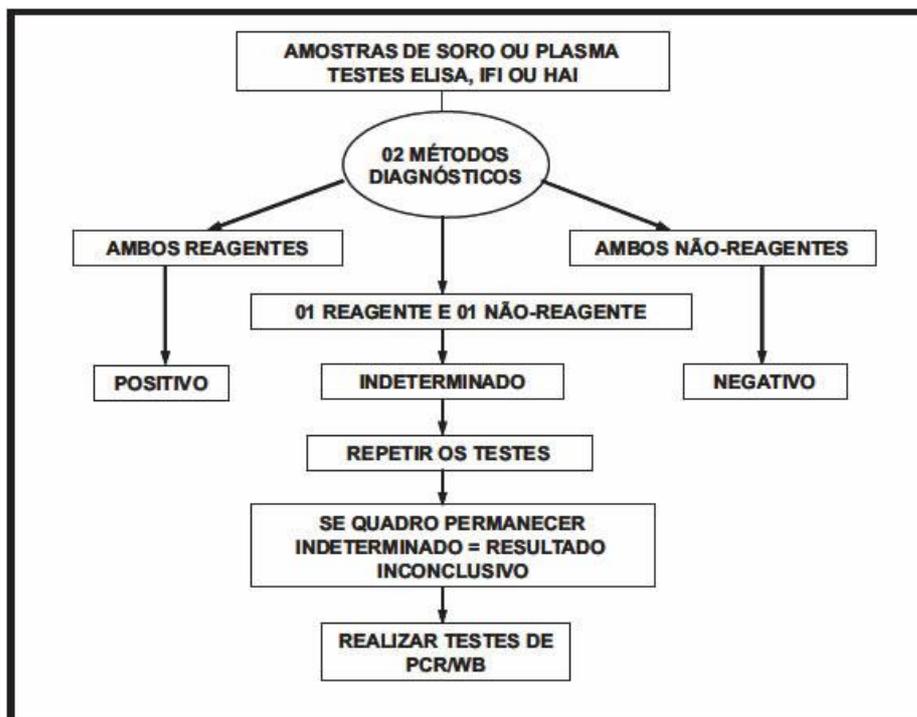
A associação da doença cardíaca com megaesôfago ou megacólon, ou ambos, define a forma cardiodigestiva da doença de Chagas.²⁸ Na maioria dos países, o desenvolvimento de megaesôfago geralmente precede o acometimento do coração e do cólon, mas a prevalência exata da forma cardiodigestiva não é conhecida por causa da escassez de estudos adequados³³. A **Figura 10** resume as manifestações clínicas mais comuns associadas com a fase crônica da doença.

Figura 10: Manifestações comuns na fase crônica da doença

Fonte: PAHO, 2012²⁰ (adaptado do autor)

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 Imunofluorescência indireta (IFI) e outro de alta especificidade (ELISA, utilizando antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi*).³⁸ Devido a necessidade de instalações laboratoriais específicas, o PCR não é útil no diagnóstico de rotina, no entanto devido sua alta sensibilidade pode ser utilizado em casos de sorologia inconclusiva. O **Esquema 2** demonstra o passo a passo que deve ser assumido.

Esquema 2: Esquema do método sorológico para determinação da doença de Chagas.



Fonte: FIOCRUZ, 2012³⁷

ELISA= Ensaio enzima imunoenzimático IFI= Inunofluorescência indireta HAI= Hemaglutinação PCR= Reação em Cadeia de Polimerase WB= Western blot

3.6. Tratamento clínico

Mesmo após mais de 100 anos da descoberta da doença de Chagas, o tratamento permanece inapropriado e irresoluto, causando efeitos colaterais severos e causando apenas uma diminuição da parasitemia, não garantindo, portanto, a cura definitiva.

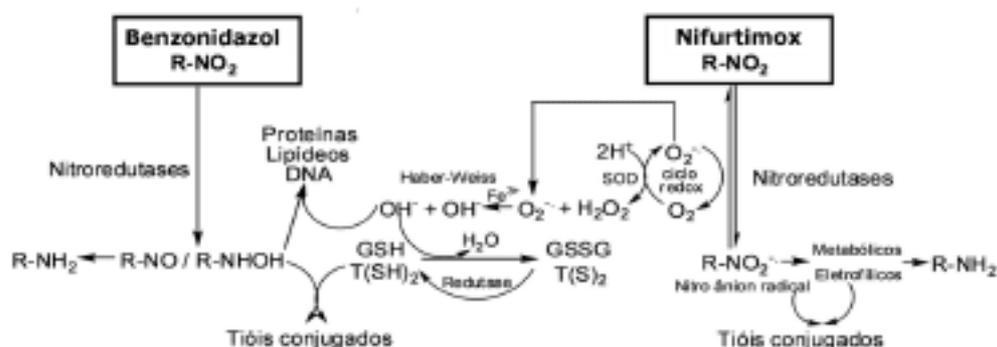
Na Alemanha, a Bayer e outros laboratórios desenvolveram as primeira drogas com atividade antichagásica, como a fenatridina carbídiuim, aminoquinolinas, arsênicos trivalentes e compostos nitrofurânicos. Como consequência dos anos de pesquisa, na década de 1960 obtiveram-se as drogas clássicas nifurtimox (Lampit) e benznidazol (Rochagam).³⁹

Até pouco tempo não existiam formulações pediátricas, apesar do fato de que crianças até 12 anos possuem 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 na terapêutica. O novo medicamento será utilizado em crianças a partir de dois anos de idade³⁶.

O nifurtimox é tripanossomicida contra a forma amastigota do *T. cruzi*. Seu mecanismo de ação envolve a redução do oxigênio molecular (O_2) formando o íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e regenerando o grupo NO_2 num processo conhecido como ciclo redox. O íon superóxido formado é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe^{III} , forma o radical hidroxila ($\bullet OH$). A esta espécie tem sido atribuído o efeito tripanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi*.⁴¹

Por outro lado, o fármaco benznidazol não atua através do ciclo redox e não depende diretamente de espécies reativas de oxigênio (ROS – espécies reativas de oxigênios). O radical nitro formado estaria envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi*. É descrito ainda que o fármaco aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama (IFN- γ - interferon-gamma) e inibe o crescimento do *T. cruzi* através da enzima NADH-fumarato redutase³⁶(Figura 11).

Figura 11: Mecanismo de ação dos fármacos nifurtimox e benznidazol



Fonte: MAYA, 2006³⁴

Os metabólitos formados através do mecanismo de ação acima podem atuar também em outros sistemas, especialmente no hospedeiro (humano), devido a sua alta reatividade. Esta baixa especificidade de ação em vias bioquímicas definidas do parasita contribui para os efeitos citotóxicos observados no tratamento dos pacientes.⁴¹

Segundo requerimentos de 1997 da Organização Mundial de Saúde, uma droga para ser considerada ideal no tratamento da doença de Chagas deve possuir algumas características:

1-Cura parasitológica na fase aguda e crônica da doença;

- 2-Ser efetiva em uma ou poucas doses;
- 3-Ser acessível aos pacientes, ou seja, baixo custo;
- 4-Não possuir efeitos colaterais nem teratogênicos;
- 5-Não requerer internação para o tratamento;
- 6-Não induzir resistência.

Por não cumprir vários desses pré-requisitos, o nifurtimox e benznidazol, não podem ser enquadrados como fármacos ideais.

Tendo em vista esse quadro supracitado sobre a doença de Chagas, tem-se cada vez mais intensificada a necessidade da descoberta de novas alternativas terapêuticas para a obtenção de fármacos mais seguros, ativos e alvos biológicos mais específicos.

3.7.Desenvolvimento de novas drogas

Dentre os desafios para a pesquisa de agentes quimioterápicos para a doença de Chagas, podemos destacar ainda o alto custo dos investimentos e a falta de um mercado potencial e seguro nos países em desenvolvimento. Devido a isso observa-se que o desenvolvimento de drogas para doenças negligenciadas não é muito viável para a indústria farmacêutica. Entre 1975 e 2004, dos 1.556 novos medicamentos registrados, apenas 21 (1,3%) foram desenvolvidos especificamente para doenças negligenciadas.⁴²

As pesquisas por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas tem evoluído sensivelmente nas últimas décadas, com destaque para o sequenciamento do genoma do *T. cruzi*³⁸ que permitiu a identificação de vários genes, muitos deles existentes apenas no parasita e não no homem. Esses estudos recentes têm permitido a identificação de alvos potenciais no *T. cruzi* e que incluem o metabolismo de esteróis, o DNA e diferentes enzimas.⁴²

3.8. Alvos terapêuticos

Vários critérios devem ser considerados na seleção de inibidores potenciais. O alvo a ser explorado deve ser encontrado unicamente no parasita e, portanto, ausente na célula do hospedeiro; deve ser também essencial para o desenvolvimento do parasita em um dos estágios de seu ciclo replicativo. O uso de enzimas e metabólitos como alvos terapêuticos permite melhor investigação em termos mecanísticos e estruturais, além de contribuir significativamente para o planejamento racional de fármacos.⁴³

Os alvos identificados que têm sido explorados para o planejamento racional de fármacos antichagásicos envolvem a inibição seletiva de enzimas fundamentais no desenvolvimento do parasita, entre elas vale menciona.⁴⁶

- **Tripanotiona redutase**, relacionada ao estresse oxidativo.
- **Trans-sialidase**, envolvida na glicosilação de mucinas de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para reconhecimento e adesão do parasita na célula do hospedeiro.
- **C₁₄D_{24,25}-esterol metiltransferase**, essencial na biossíntese de ergosterol.
- **Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase**, presente na via glicolítica.
- **Cisteína protease (Cruzipaína)**, relacionadas à atividade proteolítica e penetração do parasita na célula do hospedeiro.
- **Diidrofolato redutase**, responsável pela geração de cofator na síntese —de novo de timidina.
- **Prolil endopeptidase**, envolvida na clivagem de pequenos peptídeos biologicamente ativos.
- **Hipoxantina-fosforibosiltransferase**, essencial na síntese de nucleotídeos purínicos.
- **DNA topoisomerases I e II**, enzimas essenciais que catalisam alterações topológicas na molécula de DNA. Elas desempenham um papel fundamental no metabolismo do DNA, incluindo replicação, transcrição, recombinação e condensação.
- **Farnesilpirofosfato sintase**, envolvida na biossíntese de uma variedade de esteróides e poliisoprenoides e partirdo farnesilpirofosfato.

3.9. Cruzaína

Cruzaína (cruzipaína) é a principal cisteína protease do *T. cruzi*. A protease é expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasita, mas presente em diferentes locais variando com cada fase. No estágio epimastigota, que ocorre no inseto vetor, a protease está localizada em um compartimento lisossomal, onde funciona para degradar proteínas englobadas do intestino do inseto.⁴⁷

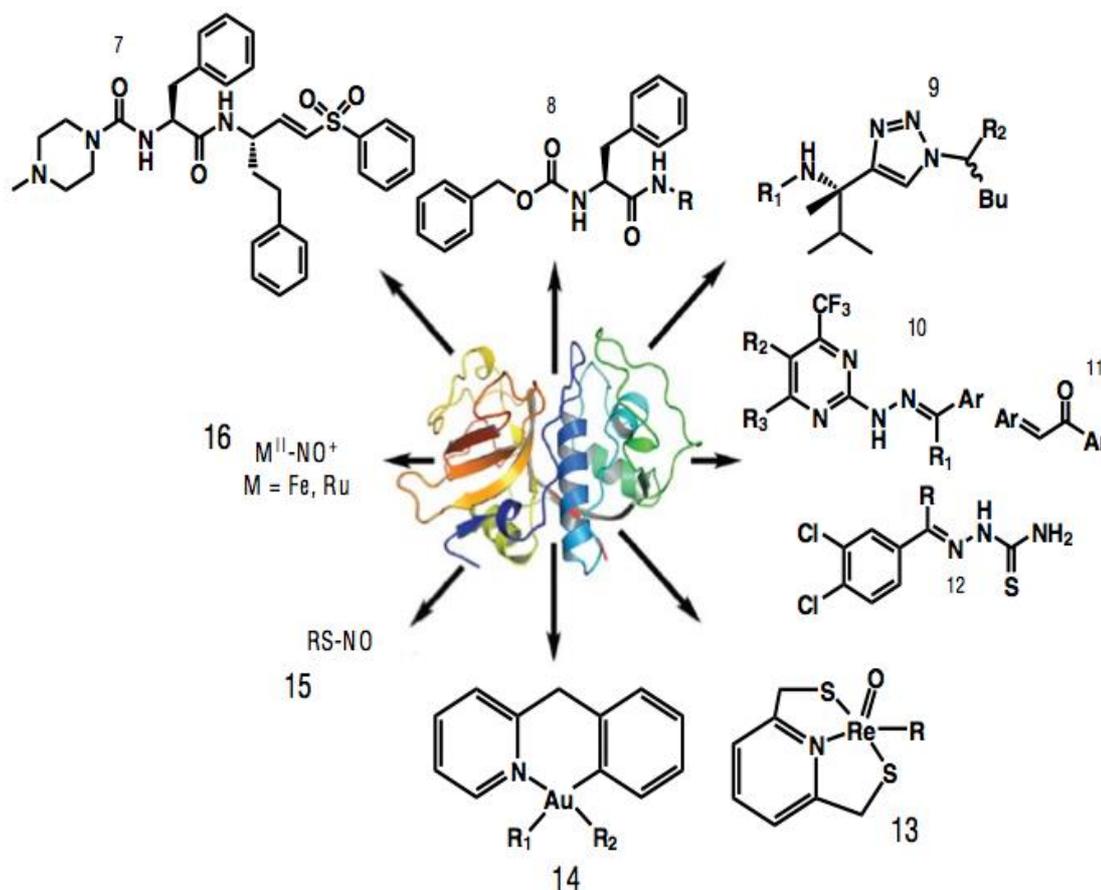
No estágio tripomastigota infecciosa, a protease é exibida no bolso flagelar, o local de endocitose e secreção. No estágio de amastigota, dentro da célula hospedeira de mamífero, a protease está presente tanto no compartimento lisossomal como na superfície do parasita,

onde pode funcionar na alimentação, na remodelação da célula de mamífero, ou evasão de mecanismos de defesa do hospedeiro.⁴⁸

Portanto, a cruzaina torna-se um alvo de interesse para a síntese de novas moléculas tripanomicidas. As principais classes de inibidores desta enzima incluem (**Figura 12**):

- Derivados peptídicos (7 e 8)⁴⁹;
- Derivados não-peptídicos (triazóis (9), pirimidinas (10), tiossemicarbazonas (12) e chalconas (11))⁵⁰;
- Complexos de rênio e ouro (oxorênios (13) e ciclometalados de ouro (14))⁵¹
- Doadores de óxido nítrico (nitrosotióis (15) e nitrosilo, complexos de ferro e rutênio (16))⁵².

Figura 12: Classes de inibidores da cruzaina



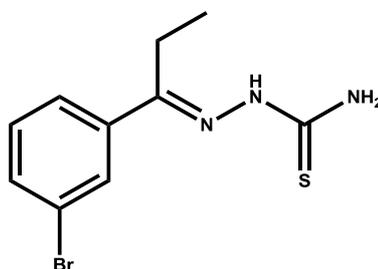
Fonte: LUIZ, 2009⁴⁶

Em 2002, Du e colaboradores⁴⁸ descreveram uma nova série de aril-tiossemicarbazonas, essas moléculas demonstraram serem potentes inibidores da cisteína protease do *Trypanosoma cruzi* (cruzaina). Alguns desses compostos também demonstraram ter atividade tripanocida *in vitro*. Estes autores inicialmente descobriram que a 3'-

bromopropilfenona-tiossemicarbazona⁴⁸ (**Figura 13**) inibia a cruzáina e poderia curar culturas de células de mamíferos infectadas com o *T. cruzi*. A 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona não mostrou nenhuma toxicidade para as células de mamíferos nas concentrações em que era tripanocida.

Após a descoberta deste composto líder, mais de 100 compostos foram projetados e sintetizados. Uma relação estrutura-atividade (SAR) foi estabelecida e muitos análogos potentes, com baixos valores de CI_{50} na faixa de nanomolar, foram identificados. A partir desses, foram identificados mais oito análogos com boa atividade tripanocida que as aril-tiossemicarbazonas eram protótipos a fármacos tripanocidas.⁴⁸

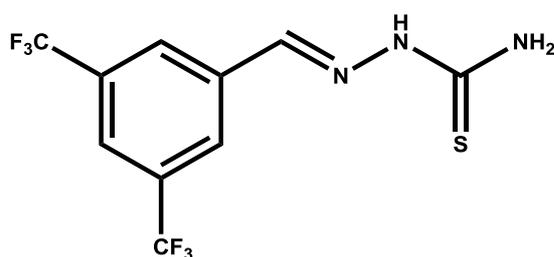
Figura 13: Estrutura química do composto líder



Fonte: Do autor

Dentre os vários análogos sintetizados por Du *et al*⁴⁸, destaca-se o composto 3',5'-di-trifluormetil-tiossemicarbazona (**Figura 14**), com atividade de CI_{50} de 20 nM frente a cruzáina, mostrando-se superior cerca de cinco vezes em comparação ao composto líder⁴⁸.

Figura 14: Estrutura química do 3,5-di-trifluormetil-fenil-tiossemicarbazona



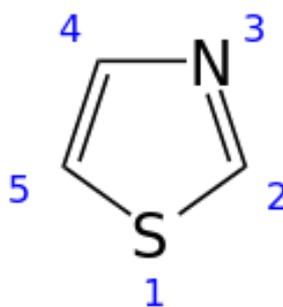
Fonte: Do autor

3.10. 1,3-Tiazóis

Os tiazóis são compostos heterocíclicos contendo em sua estrutura química um anel de cinco membros com os símbolos de Enxofre e Nitrogênio como heteroátomos, formam uma importante classe de compostos cíclicos na química orgânica com amplo espectro de atividades biológicas, o que desperta o interesse dos químicos medicinais por causa das suas atividades biológicas já citadas na literatura, tais como: Antibacteriana,^{54,55,56} Antifúngica⁵⁶ e Anti-inflamatória.⁵⁵

Para a indústria farmacêutica, o núcleo tiazol (**Figura 15**) tem aplicação no tratamento de alergias, hipertensão, inflamação, esquizofrenia, infecções bacterianas, por HIV, como hipnóticos, para o tratamento da dor, como antagonistas dos receptores de fibrinogênio com atividade antitrombótica, e inibidores da DNA girase bacteriana B.⁵⁴

Figura 15: Núcleo Tiazol



Fonte: Do autor

A construção estrutural da série de 1,3-tiazóis também levou em conta a possível relação bioisostérica entre os heterociclos tiazolinonas e tiazóis. Ambos os heterociclos são capazes de interagir por ligações de hidrogênio com os receptores envolvidos na atividade tripanocida. Porém, com propriedades físico-químicas distintas.

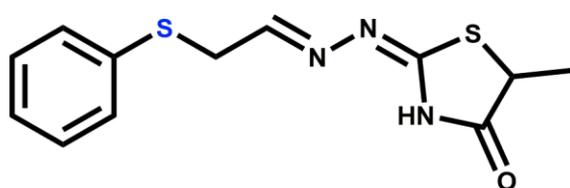
3.10. 4-Tiazolinonas

Além do heterociclo tiazol, as tiazolinonas (Anel de cinco membros, heterociclos substituídos com enxofre e nitrogênio com a presença de uma carbonila no carbono cinco) agem como inibidores covalentes e reversíveis da cruzaina. Nesse contexto, trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa identificaram uma série de inibidores não-peptídicos da cruzaina, pertencentes a classe das 4-tiazolinonas, isso indicou que a classe desses últimos compostos eram promissores para atividade tripanocida.¹⁰

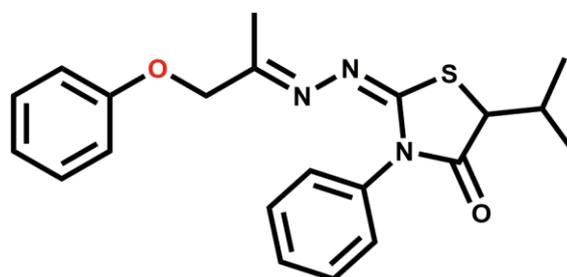
Em relatos mais recentes, Moreira e colaboradores⁵⁷ comprovaram a atividade anti-*T. cruzi* das 4-tiazolinonas, esses novos compostos foram hábeis em inibir a atividade da cruzaina e a proliferação das epimastigotas do *T. cruzi*, e foram fatais para as tripomastigotas nos ensaios in vitro em concentrações não tóxicas para esplenócitos de ratos.

Nos ensaios in vivo destacou-se os compostos abaixo, que conseguiu reduzir a parasitemia sanguínea em camundongos infectados.⁵⁷ A **Figura 16** apresenta a estrutura de alguns dos principais protótipos estruturais baseados em 4-tiazolinonas.

Figura 16: Protótipos estruturais



Aril-4-tiazolinona
 $IC_{50} = 0.4 \mu M$ (cruzaina)
 $IC_{50} = 10 \mu M$ (*T. cruzi*)



Aril-4-tiazolinona
 $IC_{50} = 6.6 \mu M$ (cruzaina)
 $IC_{50} = 6.1 \mu M$ (*T. cruzi*)

Fonte: Do autor

O planejamento da série possibilitou o estudo do efeito eletrônico de substituintes localizados na posição C4 do anel tiazólico. Partindo da fenila como anel aromático de referência, diversos substituintes foram inseridos (posição *orto*, *meta* e *para*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Planejamento estrutural

Com base nos relatos de Du⁴⁸, que descreveu o anel 3',5'-di-trifluormetil com detentor de uma potente atividade tripanocida e frente a cruzaina⁴⁸ e em virtude das propriedades tripanocidas de compostos tiazólicos já estudados pelo nosso grupo de pesquisa. Planejou-se uma série inédita de 1-3-tiazóis.

Além disso, escolheu-se realizar modificações estruturais e inserir substituintes na posição N3, pois em trabalhos recentes, observou-se que a inserção de substituintes nessa posição foi benéfica para a atividade farmacológica.

Por fim, almejou-se substituir o heterociclo tiazol por outro heterociclo estruturalmente equivalente (bioisostérico). Em razão de trabalhos de CAPUTTO *et al.*,⁵⁸ nós elegemos o anel heterociclo, culminando assim com a construção estrutural dos aril-4-tiazolinonas. Essa classe de moléculas se apresentou eficaz ao reduzir a parasitemia de camundongos infectados⁵⁰ e por isso a importância de classifica-lo como protótipo estrutural a fármaco antichagásico.

Tendo em mãos as excelentes atividades do nosso grupo de pesquisa com os grupos farmacofóricos escolhidos e em conjunto com o estudo realizado por Du e colaboradores⁴⁸, nós decidimos construir uma nova série de compostos tiossemicarbazônicos e seus bioisómeros cíclicos.

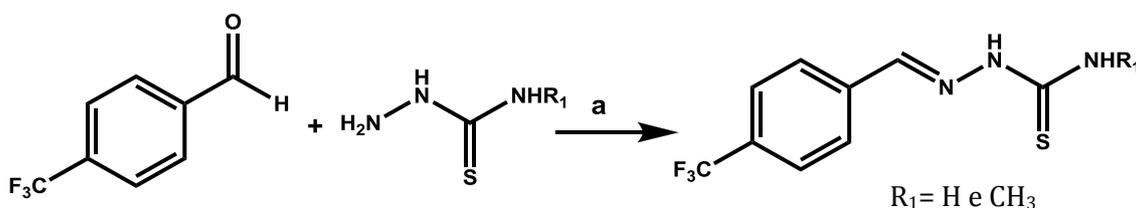
A substituição do 3',5'-di-trifluormetil por apenas um trifluormetil em *para* foi escolhida por nós com o propósito de avaliar os efeitos na atividade tripanocida dos novos compostos. A diminuição de um CF₃ na estrutura, diminui também sua massa molar o que o deixa mais próximo às regras de Lipinski.

4.2. Seção química

4.2.1. Síntese das tiossemicarbazonas (MB01, MB02, MB03)

A série que é composta por 31 moléculas, se inicia com a síntese de três tiossemicarbazidas. (**Esquema 3**). As tiossemicarbazonas (**MB01**, **MB 02** e **MB 03**) foram preparadas a partir da condensação do 4'-trifluormetil benzaldeído com a tiossemicarbazida, metil-tiossemicarbazida e fenil-tiossemicarbazida respectivamente em temperatura ambiente em refluxo por até três horas. Os produtos obtidos (**MB01**, **MB02** e **MB03**) foram recristalizados em tolueno, a quente.

Esquema 3: Obtenção das tiossemicarbazonas

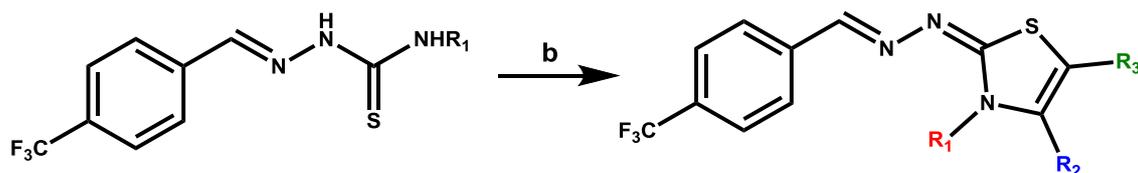


[a] 4'-trifluormetil benzaldeído, tiossemicarbazida equivalente, etanol, ácido correspondente, refluxo e temperatura 100° C, por até 48 horas.

4.2.2. Síntese dos aril-1,3-tiazóis

Os compostos do tipo aril-1,3-tiazóis são geralmente preparados através do protocolo de Hantzsch usando tioamida e uma acetona alfa-halogenada (**Esquema 4**). Esta rota fornece rendimentos satisfatórios, é de fácil execução, além de ser compatível com inúmeros compostos⁵¹. Os aril-1,3-tiazóis propostos foram preparados segundo a metodologia descrita por Hantzsch, em agitação magnética, sob refluxo, com isopropanol como solvente, em até 24 horas. Os compostos foram obtidos como sólidos cristalinos após evaporação a baixa pressão e posterior filtração, com rendimentos satisfatórios.

Esquema 4: Obtenção dos tiazóis



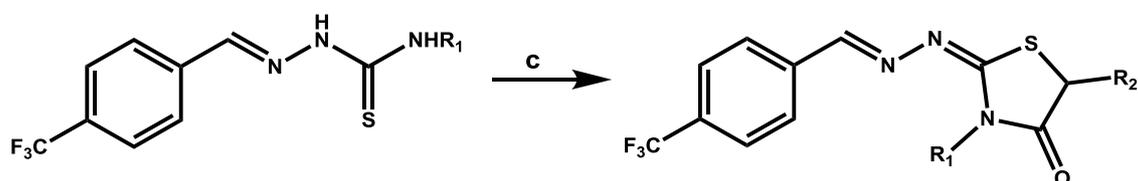
Composto	R ₁	R ₂	R ₃	Composto	R ₁	R ₂	R ₃
MB 1.1	H	Ph	H	MB 1.8	H	3,4-diCl	H
MB 1.2	H	4-NO ₂	H	MB 1.9	H	Ph	CH ₃
MB 1.3	H	3-NO ₂	H	MB 1.10	H	2-naftil	H
MB 1.4	H	2,4-diCl	H	MB 1.11	H	4-CH ₃	H
MB 1.5	H	4-MeO	H	MB 1.12	H	4-F	H
MB 1.6	H	4-Cl	H	MB 2.1	CH ₃	4-MeO	H
MB 1.7	H	4-Br	H	MB 2.2	CH ₃	4-NO ₂	H

[b]Isopropanol, agitação magnética, temperatura ambiente e α -halocetonas

4.2.3. Síntese das aril-4-tiazolinonas

As aril-4-tiazolinonas (**MG1.1** a **MG1.5** e **MG2.1** a **MG 2.5**) foram sintetizadas através da reação entre a tiossemicarbazona correspondente e os respectivos ácidos/ésteres α -halogenados (**Esquema 5**) estas reações foram realizadas em etanol absoluto, com excesso de acetato de sódio anidro, a temperatura de aproximadamente 100 °C e agitação magnética vigorosa. As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (CCD) que mostraram o consumo dos materiais de partida (tiossemicarbazonas) após longos tempos de reação.

Esquema 5: Obtenção das tiazolinonas



[c]Tiossemicarbazona de origem, acetato de sódio, ácido/ ésteres halogenados, Etanol, 100°C, agitação magnética por até 48 horas.

Composto	R ₁	R ₂	Composto	R ₁	R ₂
MG 1.1	H	Ph	MG 2.1	CH ₃	Ph
MG 1.2	H	Metil	MG 2.2	CH ₃	Metil
MG 1.3	H	H	MG 2.3	CH ₃	H
MG 1.4	H	Etil	MG 2.4	CH ₃	Etil
MG 1.5	H	Isopropil	MG 2.5	CH ₃	Isopropil

4.2.4. Avaliação da atividade anti- *T. cruzi*

Os aril-1,3-tiazóis e as aril-4-tiazolinonas foram inicialmente avaliados, *in vitro*, quanto as propriedades tripanocidas em modelos experimentais frente às formas evolutivas epimastigotas da cepa DM28c e tripomastigotas das cepas Y do *T. cruzi*. Nestes ensaios, os valores de CI_{50} (μM , concentração inibitória a 50%) foram determinados. Em princípio a viabilidade dos esplenócitos da linhagem de camundongos BALB/c foi analisada e expressa na concentração mais elevada não tóxica em μM . Para os ensaios biológicos almejando a determinação da atividade tripanocida para as formas evolutivas epimastigota e tripomastigota, os resultados foram expressados em valores de CI_{50} para epimastigotas e CC_{50} (Concentração citotóxica a 50 %) para tripomastigotas. Todos os compostos da tabela abaixo, exceto **MB1.2**, **MB02** e **MB 2.1**, se mostraram mais eficazes que o benznidazol na forma epimastigota. Abaixo a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* da série dos 1,3- tiazóis para a forma evolutiva epimastigota. A metodologia para a realização dos testes biológicos estão no **anexo 1**.

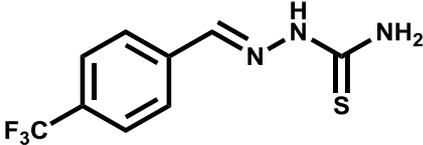
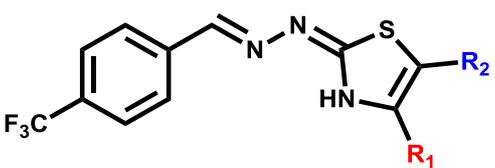
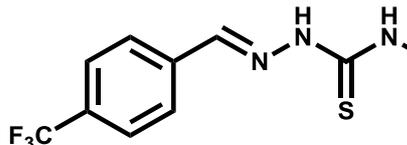
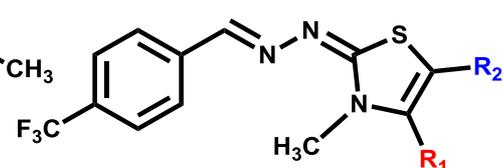
Código	R ₁	R ₂	Citotoxicidade μMol ^a	CI ₅₀ epimastigota μMol (DM28c) ^b
				
MB 01	-	-	20,2	4
				
MB 1.1-1.12				
MB 1.1	Ph	H	287,9	24.3
MB 1.2	4-NO ₂	H	25,5	79.1
MB 1.3	3-NO ₂	H	254,9	32.7
MB 1.4	2,4-diCl	H	24,0	10.6
MB 1.5	4-MeO	H	265,2	6.9
MB 1.6	4-Cl	H	131,0	29.6
MB 1.7	4-Br	H	234,6	8.5
MB 1.8	3,4-diCl	H	12,0	25
MB 1.9	Ph	CH ₃	69,1	10.9
MB 1.10	2-naftil	H	251,6	24.4
MB 1.11	4-CH ₃	H	ND	27.5
MB 1.12	4-F	H	13,7	10.6
				
MB 02	-	-	191,4	55.3
				
MB 2.1-2.12				
MB2.1	4-MeO	H	256,1	83.7
MB2.2	4-NO ₂	H	ND	18.6
BDZ	-	-	96,1	48.8

Tabela 1: Atividade anti-*T. cruzi*(epimastigota) dos 1,3-tiazóis

[a]Maior concentração não tóxica para esplenócitos de camundongos após 24h de incubação na presença dos compostos. [b] Determinado 5 dias após a incubação das formas epimastigotas com os compostos. CI₅₀ foi calculada a partir de cinco concentrações, o ensaio foi realizado em triplicata (DP+/- 10%). [c] Não definida. BDZ:benznidazol

Dentre os 16 compostos que tiveram suas atividades testadas frente a forma evolutiva epimastigota do *T. cruzi*, apenas 6 compostos apresentaram uma citotoxicidade, superior ao benznidazol. Comparando-se as tiossemicarbazonas **MB01** e **MB 02**, a simples adição de um grupamento metila na estrutura diminui a citotoxicidade em quase 10 vezes.

Contrastando a citotoxicidade de compostos tiossemicarbazônicos e seus derivados cíclicos, pode-se observar uma significativa diminuição da citotoxicidade, com exceção dos

compostos **MB 1.2**, **MB 1.4**, **MB1.8** e **MB1.12**, que mantiveram a citotoxicidade próxima a sua tiossemicarbazona de origem. Portanto, quanto a avaliação citotóxica, a ciclização foi benéfica em praticamente todos os casos.

Sobre a eficácia frente a forma epimastigota (cepas DM28c) de *Trypanosoma cruzi*, as tiossemicarbazonas (**MB01** e **MB02**) obtiveram resultados divergentes, sendo a sem substituinte (**MB 01**) mais promissora que a **MB02**. De todos os compostos analisados, o que apresentou melhor resultado foi a tiossemicarbazona **MB 01** para forma epimastigota.

Para a correlação entre os substituintes na posição *para*, podemos afirmar que os halogênios F, Cl e Br não possuem correlação quanto a atividade biológica e raio atômico. Dentre eles, o composto de que apresentou melhor atividade foi o **MB 1.7** (bromo substituído), seguido do **MB 1.12** (flúor substituído) e **MB1.6** (cloro substituído).

Quanto aos compostos que comportam em sua estrutura um grupo fortemente retirador de elétrons na posição *para*, como é o caso do **MB1.2**, a atividade demonstra uma diminuição importante. Em contrapartida, a adição desse mesmo grupo em *meta* sofre um aumento superior a duas vezes na atividade biológica. O composto **MB 1.2** é bem semelhante ao **MB 2.2**, sendo o segundo portador de uma metila em C5 do grupo tiazol e devido a esta alteração a atividade aumenta cerca de quatro vezes.

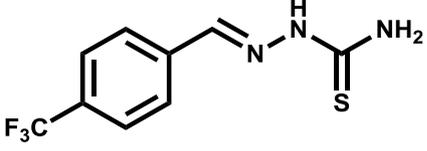
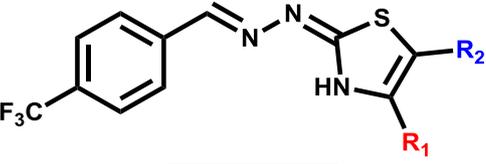
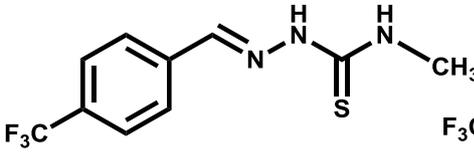
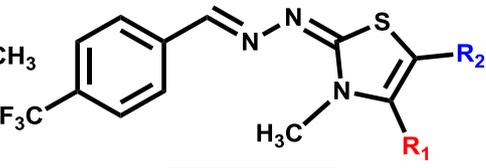
Quanto aos grupos ativadores (doam elétrons ao anel aromático) como o fenil, naftaleno e metil, o **MB1.1**, **MB 1.10** e **MB 1.11**, respectivamente a atividade permaneceu inalterada. Todavia, os efeitos desses grupos na estrutura incrementaram a atividade quando comparados ao grupo nitro de resultados expostos acima.

Outro efeito estudado foi a adição de um metil em C5, como é o caso das moléculas **MB1.1** e **MB 1.9**, sendo a segunda portadora de um grupo CH₃ a mais que a primeira. Nas suas atividades biológica houve um aumento de duas vezes quando o acréscimo da metila. Sendo a **MB1.9** uma das moléculas que obteve uma das melhores respostas no teste.

Os compostos dissubstituídos obtiveram respostas divergentes em sua atividade, dando foco a observação que em 2,4-diCl (**MB1.4**) obtivemos uma resposta duas vezes superior quando comparado a substituição em 3,4-diCl (**MB1.8**).

Tendo verificado a atividade para todos os compostos na forma evolutiva epimastigota, demos sequência ao estudo com a análise da atividade na forma tripomastigota.

Tabela 2: Atividade anti-*T. cruzi* tripomastigotados tiazóis

Código	R ₁	R ₂	Citotoxicidade μMol ^a	CI ₅₀ tripomastigota μMol (cepa Y) ^b
				
MB 01	-	-	20,2	13.8
				
MB 1.1-1.12				
MB 1.1	Ph	H	287,9	83.1
MB 1.2	4-NO	H	25,5	71.7
MB 1.3	3-NO	H	254,9	80.7
MB 1.4	2,4-diCl	H	24,0	53.8
MB 1.5	4-MeO	H	265,2	9.6
MB 1.6	4-Cl	H	131,0	40.7
MB 1.7	4-Br	H	234,6	80.3
MB 1.8	3,4-diCl	H	12,0	42.8
MB 1.9	Ph	CH ₃	69,1	79.4
MB 1.10	2-naftil	H	251,6	88.7
MB 1.11	4-CH ₃	H	ND	78.5
MB 1.12	4-F	H	13,7	33
				
MB 02	-	-	191,4	24.4
				
MB 2.1-2.12				
MB2.1	4-MeO	H	256,1	169.7
MB2.2	4-NO ₂	H	ND	57.5
BDZ	-	-	96,1	6.3

[a]Maior concentração não tóxica para esplenócitos de ratos após 24h de incubação na presença dos compostos. [b]Determinado 24 horas após a incubação das formas tripomastigotas com os compostos. CI₅₀ foi calculada a partir de cinco concentrações, os valores das CI₅₀ foram calculados usando ao menos sete concentrações (data-points) usando regressão não-linear. [c] Não definida. BDZ: benznidazol

Quanto à eficácia frente a forma tripomastigota (cepas Y de *Trypanosoma cruzi*, as tiossemicarbazonas (**MB01** e **MB02**) obtiveram resultados divergentes. O composto **MB 01**, sem substituinte apresentou um potencial inibitório duas vezes superior ao do composto, **MB02**. A adição de uma metila em N3 diminuiu drasticamente a atividade tripanocida.

O composto **MB1.1** dotado de um fenil sem substituintes na posição C4 do anel tiazólico, apresentou uma baixa atividade inibitória para a forma evolutiva tripomastigota. Excetuando-se os compostos **MB1.10** e **MB 2.1**, todos os outros compostos que substituíram o fenil demonstrou uma melhor atividade que o **MB 1.1**, independente se sua substituição foi feita em *orto*, *meta* ou *para*.

Outro efeito estudado foi a adição de um metil em C5, **MB1.9**, que diminuiu sensivelmente a atividade biológica quando comparado ao composto **MB1.1**, padrão da série, sem substituintes em C5.

Para compostos que comportam em sua estrutura um grupo fortemente retirador de elétrons na posição *para*, pode-se verificar uma leve diminuição da atividade quando a substituição é feita em *meta*. Comparando-se os compostos nitro substituídos MB 1.2 e MB2.2, observa-se que o segundo apresenta melhor atividade, isso ocorre devido a adição de uma metila no N3 do anel tiazólico.

Os compostos dissustituídos, **MB1.4** (2,4- diCl) e **MB1.8** (3,4-diCl), obtiveram respostas diferentes em sua atividade. A melhor resposta foi obtida para o composto MB 1.8, onde as dissustituições foram realizadas em *meta* e *para*. Para todas as substituições realizadas apenas em *meta*, ou apenas em *para*, houve um decréscimo da atividade tripanocida, excetuando o compostos **MB1.12** que apresenta um flúor na posição *para*.

Quando da adição de substituintes volumosos como o naftaleno, **MB 1.10**, a atividade frente as cepas Y do *Trypanosoma cruzi* foi não benéfica por se tratar da segunda mais baixa atividade de toda a série.

Para o composto **MB1.5**, o melhor da série, tanto para a forma epimastigota como para a tripomastigota, o grupo metóxi na posição *para* do anel aromático incrementou a atividade quando comparado a todos os outros compostos da série de 16 compostos testados. Sendo assim, esse composto pode ser eleito como o mais promissor da série.

PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

Essa sessão se destina a descrição dos métodos e equipamentos usados para as análises necessárias para confirmação das estruturas moleculares obtidas.

5.1. Generalidades

Para a preparação da série de compostos foram utilizados os reagentes comercialmente disponíveis nas empresas Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma- Aldrich. Os solventes utilizados foram provenientes da Vetec ou Dinâmica e quanto aos solventes deuterados para a análise são da marca CIL (Tédia Brazil). O acetato de sódio foi fundido em bico de Bunsen antes do uso.

Para o acompanhamento das reações utilizou-se cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F254 adquirida comercialmente. As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm).

Para a verificação dos pontos de fusão fez-se uso de capilares usando um aparelho fusiômetro e os valores indicam que os produtos se fundiram sem aparente decomposição da amostra.

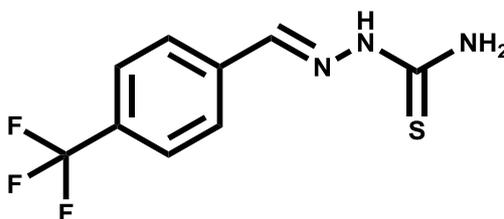
Para todos os compostos foram feitas as análises de RMN de ^1H e ^{13}C e quando necessário análise bidimensional (DEPT). Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram adquiridos, com a colaboração do Departamento de Química Fundamental, nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para ^1H ; 100 MHz 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 / doubleto; t / triplete; dd / duplodoubleto; q / quarteto; m / multiplete.

Para os espectros no infravermelho, utilizou-se o instrumento Bruker (Modelo IFS 66) usando pastilhas de KBr. As micro-análises para C, N, H, S foram feitas em um analisador elementar Carlo Erba (modelo EA 1110). Para os espectros de massas de alta-resolução (EMAR), usou-se a técnica de ionização por eletrospray (ESI) nos modos positivos (ESI+) ou negativo (ESI-) com detecção no modo "time-of-flight" (TOF), medidos nos aparelhos LC-IT-TOF da Shimadzu.

5.2. Metodologia da síntese e análise espectroscópica

MB01

(E)-2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinacarbotoamida



Em balão de fundo redondo, adicionou-se 5,166 mmols (0,157g) de tiossemicarbazida em 25 mL de etanol e 7 gotas de ácido clorídrico como catalizador sob agitação magnética e temperatura ambiente até completa dissolução do sólido. Os 5,166 mmols (0,9g) 4-(trifluorometil) benzaldeído foi adicionado em seguida e a reação foi aquecida até 100°C em refluxo por 3(três) horas.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, adicionou-se água ao balão de fundo redondo e houve um precipitação de coloração branca. Para a recristalização foi utilizado tolueno em volume 25 mL para a dissolução a quente, após a dissolução deixou-se esfriar lentamente a solução e o precipitado resultante foi de coloração branca, brilhosa e em agulhas.

PF: 166° C-170°C Rendimento: 85% Rf:0,41 (7:3 hexano/acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 11.6 (s largo, 1H, NH), 8.3 (s largo, 1H, HC=N), 7.8 (d, 2H, CH Ar) e 7.67 (d, 2H, CH Ar);

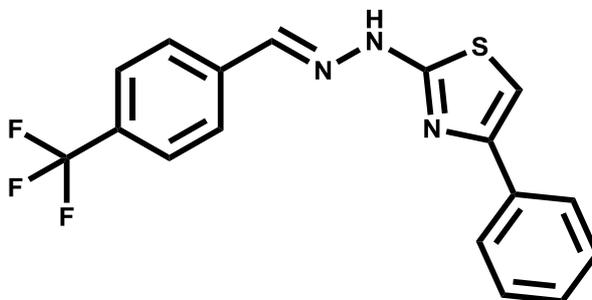
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (75.5 MHz, ppm): 178.3 (C=S), 140.2 (C=N), 138.1 (CH Ar), 134.5 (CH Ar), 129.9 (CH Ar), 127.6 (CH Ar) e 125.3 (CF₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3439.63(NH₂), 3154.62(NH), 1698.36 (HC=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₄H₁₆Cl₂N₂OS [M-H]⁺: 344,04; encontrado: 343,9749

MB01.1**((E)-4-fenil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil)tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 1,913 mmols do intermediário **MB01**, 1,913mmols de 2-bromo-acetofenona e 15mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meia hora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o término da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarelo claro. Para recristalização utilizou-se o álcool isopropílico 50 mL para completa dissolução a quente e deixou-se esfriar lentamente a temperatura ambiente.

PF: 212° C-215°C Rendimento: 47% Rf: 0,72 (7:3 hexano/acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 12.5 (s largo, 1H, NH), 8.1 (s, 1H, HC=N), 7.95 (d, 3H, CH Ar), 7.77 (d, 2H, CH Ar), 7.42 (d, 2H, CH Ar), 7.38 (CH tiazol), 7.30 (t, 1H, CH Ar);

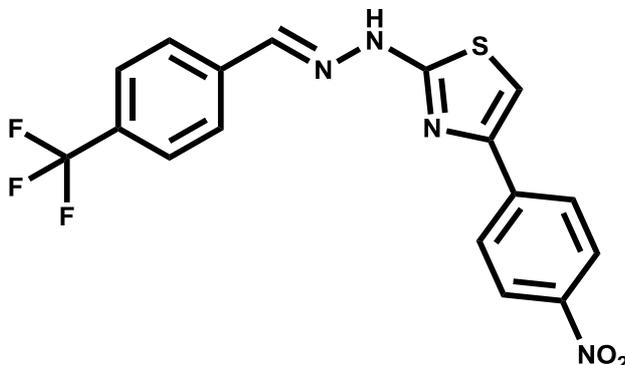
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (75.5 MHz, ppm): 167.9 (S-CH), 150.3 (C4 Tiazol), 139.6 (HC=N), 138.4 (CH Ar), 134.4 (C Ar), 129.1 (CH Ar), 128.7 (CH Ar), 127.7 (CH Ar), 126.8 (CH Ar), 125.8 (CH Ar), 125.8 (CH Ar), 125.6 (CF₃) e 104.2 (CH tiazol).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 1630.19 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₇H₁₂F₃N₃S [M-H]⁺: 347,07; encontrado: 348,0710

MB01.2**(E)-4-(4-nitrofenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 1,913 mmols do intermediário **MB01**, utilizou-se 1,913mmols de 2-bromo-acetofenona e 15mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meia hora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o término da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarelo alaranjado. Para recristalização utilizou-se o álcool isopropílico 50 mL para completa dissolução a quente e deixou-se esfriar lentamente a temperatura ambiente.

PF: 226° C-230°C Rendimento: 34% Rf: 0,66 (7:3 hexano/acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 8.3 e 8.2 (d, 2H, CH Ar), 8.11 (d, 2H, CH Ar), 8.1 (s, 1H, HC=N), 7.85 (d, 2H, CH Ar), 7.78 (d, 2H, CH Ar) e 4.3 (s largo, 1H, NH);

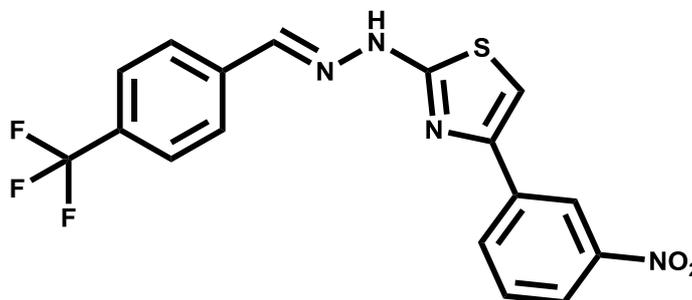
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (75.5 MHz, ppm): 168.4 (N=C-S), 148.6 (C4 Tiazol), 146.2 (CH Ar), 140.5 (HC=N), 139.9 (CH Ar), 138.2 (CH Ar), 130.2 (CH Ar), 129.2 (CH Ar), 126.8 (CH Ar), 126.4 (CH Ar), 125.8 (CF₃), 124.2 (CH Ar), 123.9 (CH Ar), 109.1 (CH tiazol).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3298.22(NH), 1594.12 (C=N), 1515.28 (NO₂);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₇H₁₁F₃N₄O₂S [M-H]⁺: 392,06; encontrado: 393,0565

MB01.3**(E)-4-(3-nitrofenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 0,809 mmols do intermediário **MB01**, utilizou-se 0,809mmols de 2,2',4'- tricloro-acetofenona e 15mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meia hora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarelo bege. Para recristalização utilizou-se o álcool isopropílico 50 mL para completa dissolução a quente e deixou-se esfriar lentamente a temperatura ambiente.

PF: 229° C-231°C Rendimento: 63% Rf:0,61 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 8.6 (s, 1H, CH Ar), 8.29 (d, 2H, CH Ar), 8.153 e 8.126 (d, 1H, CH Ar), 8.097 (s, 1H, HC=N), 7.85 (d, 2H, CH Ar), 7.76 (d, 2H, CH Ar), 7.725 (s, 1H, S-CH), 7.701 (s, 1H, CH Ar), 4.295 (s largo, 1H, NH);

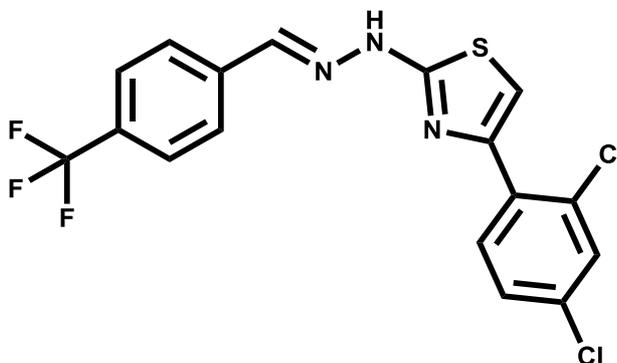
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (75.5 MHz, ppm): 168.7 (S-C=N), 167.3 (HC-NO₂), 148.7 (C=N), 140.2 (C4 Tiazol), 138.7 (CH Ar), 136.5 (CH Ar), 132.0 (CH Ar), 130.7 (CH Ar), 127.3 (C Ar), 126.2 (CH Ar), 122.6 (CH Ar), 120.4 (CF₃) e 107.4 (CH Tiazol)

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3049.09(NH), 1618.99 (C=N), 1530.97 (NO₂);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₇H₁₁F₃N₄O₂S [M-H]⁺: 392,016; encontrado: 393,0565

MB01.4**((E)-4-(2,4-diclorofenil)-2-(2-(4(trifluorometil)benzilideno) hidrazinil)tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 0,809 mmols do intermediário **MB01**, utilizou-se 0,809 mmols de 2-bromo-acetofenona e 15 mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meia hora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o término da reação, filtrou-se o precipitado de coloração branco amarelado.

PF: 165° C-168° C Rendimento: 50% Rf: 0,80 Rf 7:3-Hexano:Acetato de etila):

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 12.5 (s largo, 1H, NH), 8.1 (s, 1H, HC=N), 7.9 (s, 1H, CH Ar), 7.8 (dd, 4H, CH Ar), 7.7 (s, 1H, CH Ar), 7.50 (d, 1H, CH Ar) e 7.4 (s, 1H, CH tiazol);

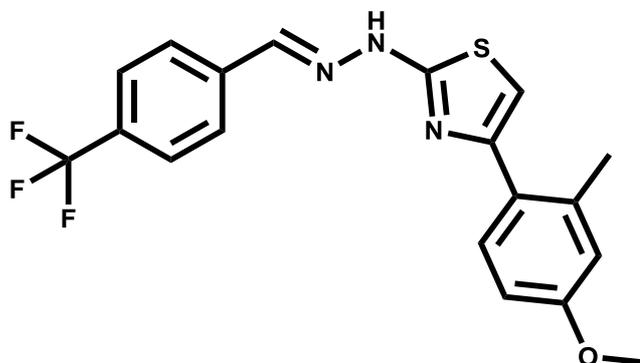
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 167.2 (S-C=N), 145.8 (C4 Tiazol), 139.7 (C=N), 138.3 (CH Ar), 132.6 (C-Cl), 132.2 (C-Cl), 131.9 (CH Ar), 131.6 (CH Ar), 129.8 (CH Ar), 129.0 (CH Ar), 128.7 (CH Ar), 127.5 (CH Ar), 126.8 (CH Ar), 125.7 (CF₃), 109.7 (CH Tiazol).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 1623.63 (C=N); 1173.84

EMAR (ESI): Calculado para C₁₇H₁₀Cl₂F₃N₃S [M-H]⁺: 416,25; encontrado: 415,9950

MB01.5**(E)-4-(4-metoxifenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazi-nil)tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 0,809 mmols do intermediário **MB01**, utilizou-se 0,809mmols de 2-bromo-4'-metoxi-acetofenona e 15mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meiahora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarelo. Para recristalização utilizou-se o álcool isopropílico q.s.q para completa dissolução a quente e deixou-se esfriar lentamente a temperatura ambiente. Observou-se uma mudança de cor, de roxo para amarelo queimado.

PF: 210° C-213°C Rendimento: 88% Rf: 0,64 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 8.1 (s, 1H, HC=N), 7.85 (d, 2H, CH Ar), 7.78 (d, 4H, CH Ar), 7.2 (s, 1H, CH tiazol), 6.97 (d, 2H, CH Ar) e 3.7 (s, 3H, CH₃);

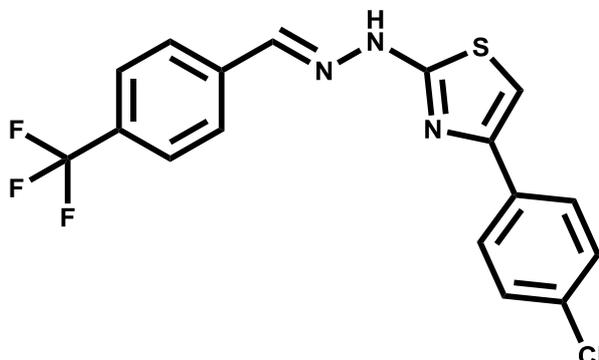
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 167.9 (S-C=N), 158.8 (C4 Tiazol), 139.4 (C=N), 138.4 (CH Ar), 127.2 (CH Ar), 126.9 (CH Ar), 126.7 (CH Ar), 125.7 (CF₃), 113.9 (CH Ar), 102.0 (CH Tiazol) e 55.1 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3421.75 (NH); 1611.53 (C=N), 1164.63 e

EMAR (ESI): Calculado para C₁₈H₁₄F₃N₃OS [M-H]⁺: 377,08; encontrado: 378,0814

MB01.6**(E)-4-(4-clorofenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil)tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 0,809 mmols do intermediário **MB01**, utilizou-se 0,809 mmols de 2-bromo-4'-cloro-acetofenona e 15 mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meia hora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o término da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarelo claro. Para recristalização utilizou-se o álcool isopropílico 50 mL para completa dissolução a quente e deixou-se esfriar lentamente a temperatura ambiente.

PF: 240° C-243° C Rendimento: 90% Rf: 0,74 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 12.5 (s largo, 1H, NH), 8.3 (s largo, 1H, HC=N), 8.1 (s, 1H, CH Ar), 7.8 (s, 1H, CH tiazol), 7.85 (s, 2H, CH Ar), 7.77 (d, 2H, CH Ar) e 7.46 (d, 2H, CH Ar);

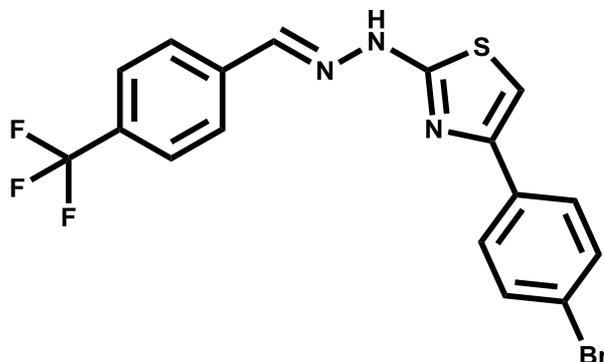
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 168.1 (S-C=N), 149.2 (C4 Tiazol), 139.7 (C=N), 138.3 (CH Ar), 133.3 (CH Ar), 132.0 (C-Cl), 129.5 (CH Ar), 128.6 (CH Ar), 127.3 (CH Ar), 126.8 (CH Ar), 125.7 (CF₃) e 105 (CH tiazol).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3451.89 (NH); 1623.25 (C=N); 1167.29 e

EMAR (ESI): Calculado para C₁₇H₁₁ClF₃N₃S [M-H]⁺: 381,03; encontrado: 382,0342

MB01.7**(E)-4-(4-bromofenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 0,728 mmols do intermediário **MB01**, utilizou-se 0,728mmols de 2,4'-dibromo-acetofenona e 15mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meia hora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o término da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarelo forte. Para recristalização utilizou-se o álcool isopropílico 50mL para completa dissolução a quente e deixou-se esfriar lentamente a temperatura ambiente.

PF: 235° C-238°C Rendimento: 68% Rf 7:3-Hexano:Acetato de etila): 0,71

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 12.4 (s largo, 1H, NH), 8.8 (s largo, 1H, HC=N), 8.09 (d, 2H, CH Ar), 7.78 (m, 5H, CH Ar) e 7.6 (s largo, 1H, CH tiazol);

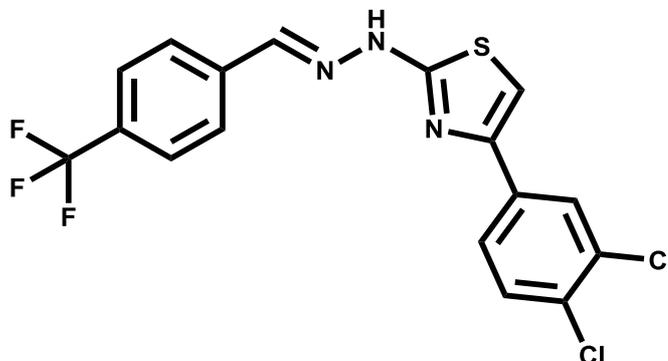
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 168.1 (S-C=N), 147.9 (C4 Tiazol), 139.8 (C=N), 138.2 (CH Ar), 135.0 (C-Cl), 131.4 (C-Cl), 130.9 (CH Ar), 129.8 (CH Ar), 127.7 (CH Ar), 127.160 (CH Ar), 126.7 (CH Ar), 125.6 (CH Ar), 122.8 (CH Ar) e 106.4 (CH tiazol).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 2928 (NH), 2958.92 (CH Ar), 1613.71 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₇H₁₁BrF₃N₃S; [M-H]⁺: 414,99; encontrado: 415,9948

MB01.8**(E)-4-(3,4-diclorofenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazi-nil)tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 1,011 mmols do intermediário **MB01**, utilizou-se 1,011 mmols de 2-bromo-3',4'-dicloro-acetofenona e 15 mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meia hora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o término da reação, filtrou-se o precipitado de coloração creme. Para recristalização utilizou-se o álcool isopropílico 50 mL para completa dissolução a quente e deixou-se esfriar lentamente a temperatura ambiente. Para essa reação houve uma difícil manipulação pela sua alta irritabilidade das mucosas e dificuldade na precipitação.

PF: 236° C-238° C Rendimento: 47% Rf: 0,76; (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 12.5 (s largo, 1H, NH), 8.1 (s largo, 1H, HC=N), 7.7 (m, 4H, CH Ar), 7.60 (d, 2H, CH Ar) e 7.4 (s, 1H, CH tiazol);

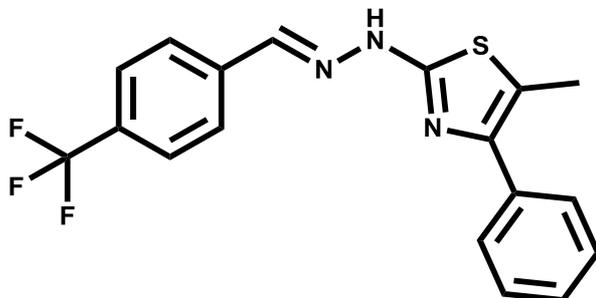
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 168.1 (S-C=N), 149.3 (C4 Tiazol), 139.6 (C=N), 138.3 (CH Ar), 133.7 (CH Ar), 131.6 (CH Ar), 127.5 (CH Ar), 126.7 (CH Ar), 125.7 (CF₃), 120.6 (C-Br) e 105.1 (CH tiazol).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3411.24 (NH), 3017.99 (CH Ar), 1610.73 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₈H₁₄F₃N₃OS [M-H]⁺: 426,25; encontrado: 427,9754

MB01.9**(E)-5-metil-4-fenil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidra-zinil)tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 1,011 mmols do intermediário **MB01**, utilizou-se 1,011 mmols de 2-bromo-propiofenona e 15 mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de 24 (vinte e quatro) horas.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o término da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarelo queimado. A reação apresentou ser bem complicada devido a irritabilidade das mucosas provocada pelo reagente de partida.

PF: 226° C-229° C Rendimento: 84% Rf: 0,60 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 8.1 (s largo, 1H, HC=N), 7.87(d, 2H, CH Ar), 7.78 (d, 2H, CH Ar), 7.60 (d, 2H, CH Ar), 7.46 (t, 2H, CH Ar) e 7.37 (m, 1H, CH Ar);

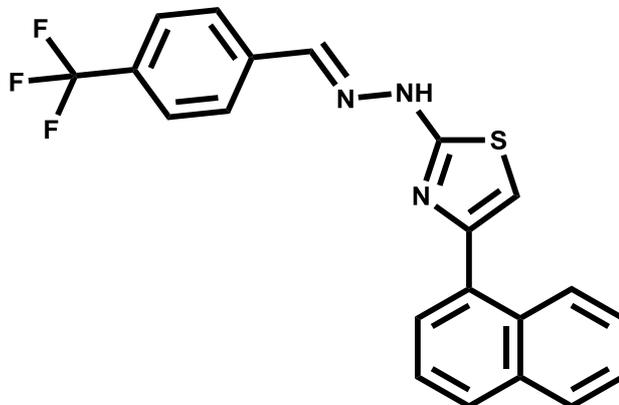
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 164.4 (S-C=N), 138.2 (CH Ar), 133.5 (CH Ar), 128.4 (CH Ar), 128.1 (CH Ar), 127.7 (CH Ar), 126.9 (CH Ar), 125.7 (CH Ar), 125.5 (CF₃), 117.4 (CH Tiazol), 12.1 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3366.11 (NH), 3061.97 (CH Ar), 1616.63 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₈H₁₄F₃N₃S [M-H]⁺: 361,09; encontrado: 362,0856

MB01.10**((E)-4-(naftaleno-1-il)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidra-zinil)tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 0,728 mmols do intermediário **MB01**, 0,728 mmols de 2-bromo-2'-acetonafona e 15 mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meia hora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o término da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarelo cítrico. A precipitação foi expressiva e começou-se observar desde o momento da mistura dos reagentes.

PF: 217° C-220° C Rendimento: 76% Rf: 0,71 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, PPM): 11.6 (s, 1H, NH), 8.4 (s, 1H, CH Ar), 8.1 (s, 1H, C=N), 8.02 (d, 2H, CH Ar), 7.92 (m, 6H, CH Ar), 7.80 (d, 2H, CH Ar), 7.5 (s, 1H, CH Tiazol) e 7.6 (s, 1H, CH Ar);

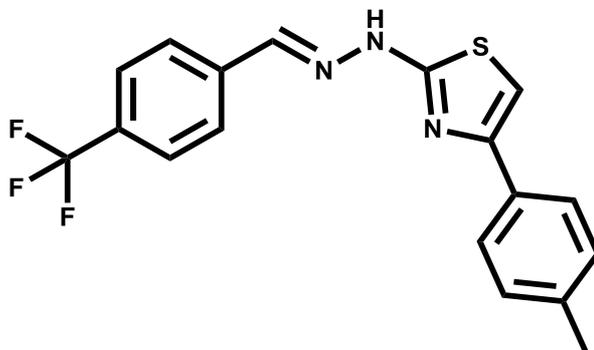
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 168.0 (S-C=N), 150.3 (C4 Tiazol), 139.6 (C=N), 138.3 (CH Ar), 133.1 (CH Ar), 132.5 (CH Ar), 131.9 (CH Ar), 128.7 (CF₃), 128.1 (CH Ar), 127.8 (CH Ar), 126.7 (CH Ar), 126.4 (CH Ar), 126.1 (CH Ar), 125.7 (CH Ar), 125.5 (CH Ar), 124.1 (CH Ar), 123.9 (CH Ar) e 105.0 (CH Tiazol).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3421.17 (NH), 3053.02 (CH Ar), 1613.46 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₈H₁₄F₃N₃S [M-H]⁺: 397,09; encontrado: 398,0866

MB01.11**(E)-4-p-toluil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 0,809mmols do intermediário **MB01**, 0,809mmols de 2-bromo-4'-metil-acetofenona e 15 mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meiahora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarelo. Para recristalização utilizou-se o álcool isopropílico 50 mL para completa dissolução a quente e deixou-se esfriar lentamente a temperatura ambiente.

PF: 214° C-217°C Rendimento: 47,60% Rf: 0,69 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, PPM): 11.612(s, 1H, NH), 8.109 (s, 1H, C=N), 7.866 e 7.847 (d, 2H, C Ar), 7.783 e 7.765 (d, 2H, C Ar), 7.747 e 7.729(d, 2H, C Ar), 7.291 (s, 1H, CH Tiazol), 7.222 e 7.203 (d, 2H, C Ar) e 2.496(s, 3H, CH₃);

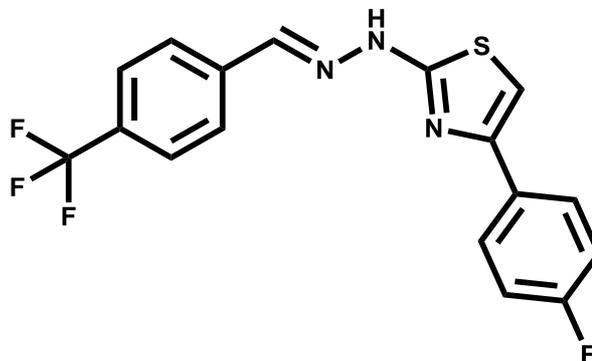
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 167.8 (S-C=N), 150.3 (C4 Tiazol), 143.3 (C=N), 139.6 (CH Ar), 138.3 (CH Ar), 136.9 (CH Ar), 131.7 (CH Ar), 129.2 (CH Ar), 128.9 (CH Ar), 126.7 (CH Ar), 125.6 (CF₃), 103.3 (CH Tiazol) e 20.8 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3350.54 (NH), 1625.33 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₈H₁₄F₃N₃S; [M-H]⁺: 361,09; encontrado: 362,0864

MB01.12**(E)-4-(4-fluorofenil)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidra-zinil)tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 0,809mmols do intermediário **MB01**, 0,809mmols de 2-Cl-4'-fluor-acetofenona e 15mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de 12(doze)horas.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarelo.

PF: 212° C-215°C Rendimento: 22% Rf:0,71 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, PPM): 11.6 (s, 1H, NH), 8.3 (s, 1H, C=N), 8.1 (s largo, 1H, CH Ar), 8.03 (d, 2H, CH Ar), 7.87 (m, 2H, CH Ar), 7.76 (m, 4H, C Ar), 7.3 (s, 1H, CH Tiazol), 7.25 (d, 2H, CH Ar) e 2.3 (s, 3H, CH₃);

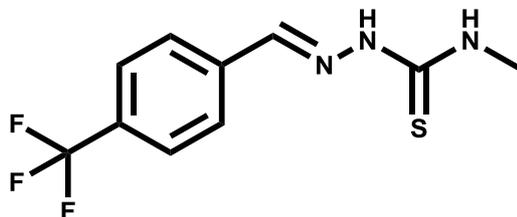
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 178.3 (S-C=N), 168.0 (C-F), 150.3 (C4 Tiazol), 140.3 (C=N), 139.5 (CH Ar), 138.3 (CH Ar), 127.8 (CH Ar), 127.6 (CH Ar), 127.5 (CH Ar), 126.5 (CH Ar), 126.7 (CH Ar), 125.6 (CF₃), 115.5 (CH Ar) e 108.9 (CH Tiazol).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3326.72 (NH), 1611.91 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₇H₁₁F₄N₃S [M-H]⁺: 365,06; encontrado: 366.0610

MB02**(E)-N-metil-2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinacarbotio-amida**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 5,166 mmols (0,157g) de 4-metil-tiossemicarbazida em 25 mL de etanol e 7 gotas de ácido clorídrico como catalizador sob agitação magnética e temperatura ambiente até completa dissolução do sólido. Os 5,166 mmols (0,9g) 4-(trifluorometil)benzaldeído foi adicionado em seguida e a reação foi aquecida até 100°C em refluxo por 3(três) horas.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, adicionou-se água ao balão e houve uma precipitação de coloração branca. Para a recristalização foi utilizado tolueno para a dissolução a quente, após a dissolução deixou-se esfriar lentamente a solução e o precipitado resultante foi de coloração branca, brilhosa e em agulhas.

PF: 234° C-236°C Rendimento: 94% Rf: 0,75 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (300 MHz, ppm): 11.7 (s, 1H, NH); 8.7 (s, 1H, HC=N), 8.02 (d, 2H, C Ar), 7.75 (d, 2H, C Ar), 3.3 (s largo, 1H, NHCH₃), 3.02 (d, 3H, CH₃);

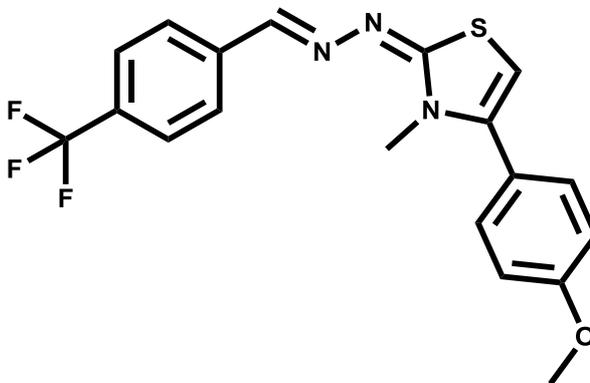
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (75.5 MHz, ppm): 177.9 (C=S), 139.8 (HC=N), 138.4 (CH Ar), 131.2 (CH Ar), 128.9 (CH Ar), 127.7 (CH Ar), 125.5 (CF₃) e 30.9 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3386,86(NH-CH₃); 3158,76 (NH); 1539,93(C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₀H₁₀F₃N₃S [M-H]⁺: 261,05; encontrado: 262,05

MB2.1**((E)-4-(4-metoxifenil)-5-metil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno) hidrazinil)tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 0,574 mmols do intermediário **MB02**, 0,574mmols de 2-bromo-4'-metoxi-acetofenona e 15mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meia hora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, filtrou-se o precipitado de coloração amarela.

PF: 166° C-168°C Rendimento: 72,05% Rf: 0,71 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (300 MHz, ppm): 8.5 (s, 1H, C=N), 7.96 (d, 2H, CH Ar), 7.83 (d, 2H, CH Ar), 7.46 (d, 2H, CH Ar), 7.09 (d, 2H, CH Ar), 6.8 (s largo, 1H, NH), 3.8 (s, 3H, O-CH₃), 3.5 (s, 3H, CH₃);

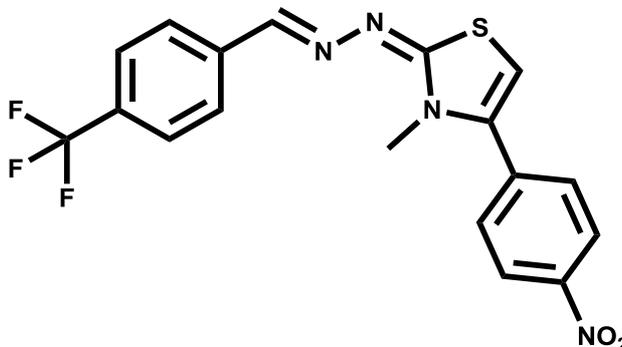
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (75 MHz, ppm): 169.5 (S-C=N), 160.3 (CH Ar), 148.7 (C4 Tiazol), 141.7 (C=N), 137.8 (CH Ar), 130.8 (CH Ar), 127.7 (CH Ar), 125.9 (CF₃), 121.2 (CH Ar), 114.4 (CH Ar), 103.8 (CH Tiazol), 55.4 (O-CH₃) e 34.9 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 1590.69 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₉H₁₆F₃N₃OS [M-H]⁺: 391,10; encontrado: 392,10

MB2.2**((E)-4-(4-metoxifenil)-5-metil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno) hidrazinil) tiazol**

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 0,766 mmols do intermediário **MB02**, 0,766mmols de 2-bromo-4'-nitro-acetofenona e 15mL de álcool isopropílico sob agitação magnética e temperatura ambiente por cerca de meia hora.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, filtrou-se o precipitado de coloração branca.

PF: 235° C-237°C Rendimento:83% Rf:0,66 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 8.5 (s, 1H, C=N), 8.35 (d, 2H, C Ar), 7.95 (d, 2H, C Ar), 7.83 (m, 4H, C Ar), 7.1 (s largo, 1H, CH Tiazol), 5.8 (s largo, 1H, NH), 2.7 (s, 3H, N-CH₃);

RMN ¹³C

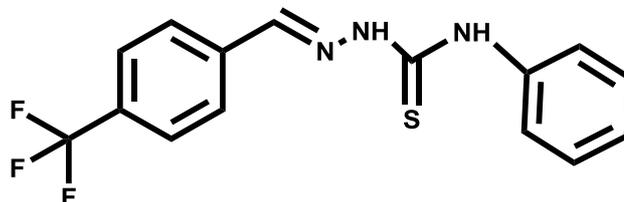
RMN- ¹³C (75 MHz, ppm): 170.7 (S-C=N), 149.6 (HC=N), 148.2 (C-NO₂), 139.9 (C4 Tiazol), 138.7 (CH Ar), 136.2 (CH Ar), 130.7 (CH Ar), 128.1 (CH Ar), 126.3 (CH Ar), 124.4 (CF₃), 123.3 (CH Ar), 106.3 (CH Tiazol) e 35.2 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 1608.64 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₈H₁₃F₃N₄O₂S [M-H]⁺: 406,07; encontrado: 407,0711

MB03

(E)-N-fenil-2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazina carbotio-amida

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 5,740 mmols de 4-fenil-tiossemicarbazida em 25 mL de etanol e 7 gotas de ácido clorídrico como catalizador sob agitação magnética e temperatura ambiente até completa dissolução do sólido. Os 5,740 mmols de 4-(trifluorometil)benzaldeído foi adicionado em seguida e a reação foi aquecida até 100°C em refluxo por 3(três) horas.

A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). Após o termino da reação, adicionou-se água ao balão de fundo redondo e houve um precipitação de coloração branca e com aspecto de plumas. O produto demonstrou-se puro e os espectros confirmaram a suposição.

PF: 190° C-193°C Rendimento:93% Rf:0,65 (7:3-Hexano:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 11.9 (s, 1H, NH), 10.2 (s, 1H, NH), 8.2 (s, 1H, HC=N), 8.13 (d, 2H, C Ar), 7.76 (d, 2H, C Ar), 7.54 (d, 2H, C Ar), 7.38 (t,2H, C Ar) e 7.23 (t, 1H, C Ar);

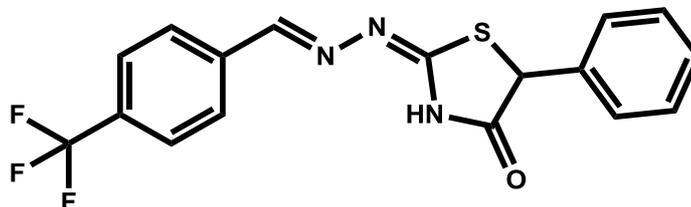
RMN ¹³C

RMN- ¹³C(100.515 MHz, ppm): 176.9 (C=S), 141.4 (C=N), 139.4 (CH Ar), 138,6 (CH Ar), 130.1 (CH Ar), 129.8 (CH Ar), 128.6 (CH Ar), 128.6 (CH Ar), 128.5 (CH Ar), 126.6 (C Ar), 126.0 (C Ar), 125.9 (C Ar), 123.2 (CF₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3336.09(NH); 1541.11 (HC=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₅H₁₂F₃N₃S [M-H]⁺: 323,0704; encontrado: 324,070

MG1.1**(E)-3-metil-5-fenil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazolidin-4-ona**

Em balão de fundo redondo com 15mL de etanol, adicionou-se 0,503 mmol da tiossemicarbazida **MB01** e em seguida a base acetato de sódio numa proporção de 4:1. Levou-se a agitação magnética até a completa dissolução sob temperatura ambiente. Posteriormente se adicionou 0,503 mmol de éster 2-cloro-2-fenil acetato e deixou-se sob agitação magnética e temperatura de 100° C por 24 horas. Observou-se um precipitado de coloração branca e fez-se placa. Com presença de sal no precipitado necessitou-se a recristalização com o solvente tolueno.

PF: 212° C-215°C Rendimento: 36% Rf: 0,61 (7:3-Tolueno:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 11.9 (s, 1H, NH), 8.2 (s, 1H, HC=N), 7.96 (d, 2H, CH Ar), 7.81 (d, 2H, CH Ar), 7.35 (m, 5H, CH Ar) e 5.4 (s, 1H, CH-S);

RMN ¹³C

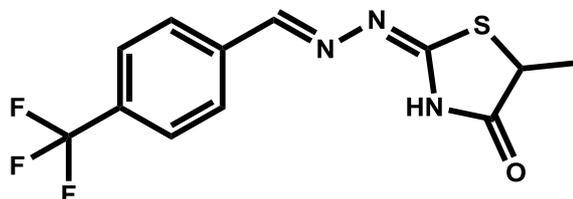
RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 155.3(C=O), 138.6 (C=N), 137.3 (CH Ar), 129.4 (CH Ar), 128.9 (CH Ar), 128.6 (CH Ar), 126.2 (CH Ar), 126.2 (CF₃) e 51.9 (C-S).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3045.09(NH); 1723.06 (C=O); 1637.62 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₈H₁₆F₃N₃OS [M-H]⁺: 379,40g; encontrado: 380,50

MG1.2

((E)-5-metil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazolidin-4-ona

Em balão de fundo redondo com 15mL de etanol, adicionou-se 0,809 mmol da tiossemicarbazida **MB01** e em seguida a base acetato de sódio numa proporção de 4:1. Levou-se a agitação magnética até a completa dissolução sob temperatura ambiente. Posteriormente se adicionou 0,809 mmol de ácido 2 cloro propiônico e deixou-se sob agitação magnética e temperatura de 100° C por 24 horas. Observou-se um precipitado de coloração branca e fez-se placa. Com presença de sal no precipitado necessitou-se a recristalização com o solvente tolueno.

PF: 239° C-241°C Rendimento: 40% Rf: 0,71 (7:3-Tolueno:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 12.1 (s largo, 1H, NH), 8.5 (s, 1H, HC=N), 7.96 (d, 2H, CH Ar), 7.82 (d, 2H, CH Ar), 4.3 (dd, 1H, C-SH), 1.51 (d, 1H, CH₃);

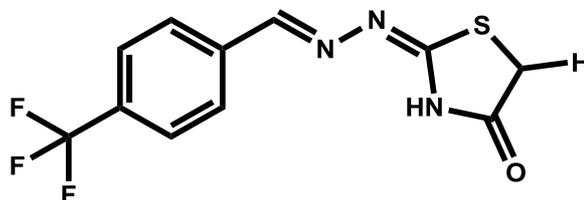
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 154.9 (C=O), 138.1 (C=N), 130.3 (CH Ar), 130 (CH Ar), 128.2 (CH Ar), 125.7 (C=N), 125.4 (CH Ar), 122.7 (CF₃), 42.3 (HC-S) e 18.7 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3045.09(NH); 1727.77 (C=O); 1641.83 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₃H₁₄F₃N₃OS [M-H]⁺: 317,33g; encontrado: 318,33

MG1.3**(E)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiiazolidin-4-ona**

Em balão de fundo redondo com 15mL de etanol, adicionou-se 0,809 mmol da tiossemicarbazida **MB01** e em seguida a base acetato de sódio numa proporção de 4:1. Levou-se a agitação magnética até a completa dissolução sob temperatura ambiente. Posteriormente se adicionou 0,809 mmol de éster bromo acetato de etila e deixou-se sob agitação magnética e temperatura de 100° C por 24 horas. Observou-se um precipitado de coloração branca e fez-se placa. Com presença de sal no precipitado necessitou-se a recristalização com o solvente tolueno.

PF: 251° C-254°C Rendimento: 35% Rf: 0,45 (7:3-Tolueno:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 12.0 (s largo, 1H, NH), 8.5 (s, 1H, HC=N), 7.96 (d, 2H, CH Ar), 7.82 (d, 2H, CH Ar) e 3.9 (s, 2H, H₂C-S);

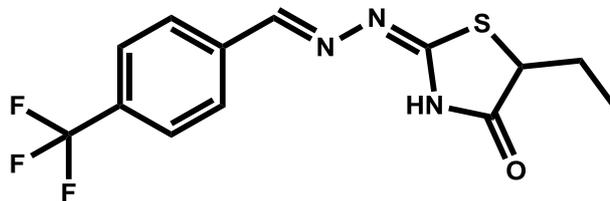
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 154.9 (C=O), 138.1 (C=N), 130.3 (CH Ar), 129.9 (CH Ar), 128.2 (CH Ar), 125.7 (CH Ar), 125.4 (CH Ar), 122.7 (CF₃) e 33.1 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3045.09(NH); 1710.55 (C=O); 1644.05 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₂H₁₂F₃N₃OS [M-H]⁺: 303,30; encontrado: 304,30;

MG1.4**(E)-5-etil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazolidin-4-ona**

Em balão de fundo redondo com 15mL de etanol, adicionou-se 0,809 mmol da tiossemicarbazida **MB01** e em seguida a base acetato de sódio numa proporção de 4:1. Levou-se a agitação magnética até a completa dissolução sob temperatura ambiente. Posteriormente se adicionou 0,809 mmol de ácido 2-br butírico e deixou-se sob agitação magnética e temperatura de 100° C por 24 horas. Observou-se um precipitado de coloração branca e fez-se placa. Com presença de sal no precipitado necessitou-se a recristalização com o solvente tolueno.

PF: 235° C-237° C Rendimento: 65% Rf: 0,79 (7:3-Tolueno:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 12.0 (s largo, 1H, NH), 8.5 (s, 1H, HC=N), 7.97 (d, 2H, CH Ar), 7.82 (d, 2H, CH Ar), 4.26 (dd, 1H, HC-S), 1.88 (m, 2H, CH₂) e 0.950 (t, 3H, CH₃);

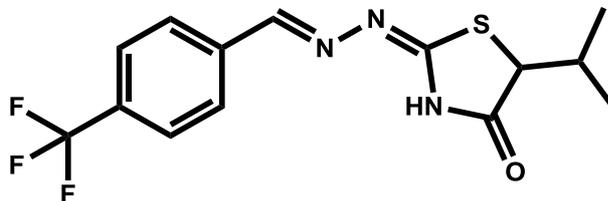
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 155 (C=O), 138 (C=N), 130.3 (CH Ar), 129.9 (CH Ar), 128.2 (CH Ar), 125.7 (C=N), 125.4 (CH Ar), 122.7 (CF₃), 49.3 (HC-S), 25.4 (CH₂) e 10.3 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3045.93 (NH); 1714.07 (C=O); 1641.98 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₄H₁₆F₃N₃OS [M-H]⁺: 331,36; encontrado: 332,36

MG1.5**(E)-5-isopropil-3-metil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno) hidrazinil)tiiazolidin-4-ona**

Em balão de fundo redondo com 15mL de etanol, adicionou-se 0,809 mmol da tiossemicarbazida **MB01** e em seguida a base acetato de sódio numa proporção de 4:1. Levou-se a agitação magnética até a completa dissolução sob temperatura ambiente. Posteriormente se adicionou 0,809 mmol de ácido 2-Br-3-metil butírico e deixou-se sob agitação magnética e temperatura de 100° C por 24 horas. Observou-se um precipitado de coloração branca e fez-se placa. Com presença de sal no precipitado necessitou-se a recristalização com o solvente tolueno.

PF: 203° C-205°C Rendimento: 65% Rf: 0,70 (7:3-Tolueno:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 12.0 (s largo, 1H, NH), 8.5 (s, 1H, HC=N), 7.97 (d, 2H, CH Ar), 7.82 (d, 2H, CH Ar), 4.3 (d, 1H, HC-S), 1.0 (d, 3H, CH₃) e 0.88 (d, 3H, CH₃);

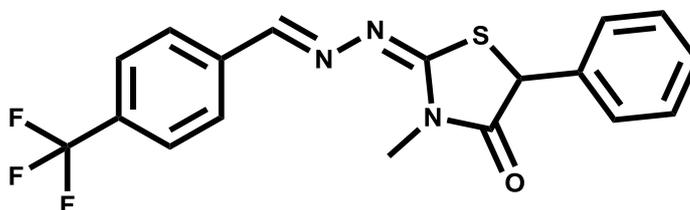
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 154.7 (C=O), 138.2 (C=N), 132.3 (CH Ar), 129.2 (CH Ar), 128.2 (CH Ar), 125.7 (C=N), 122.4 (CF₃), 55.2 (HC-S), 29.9 (CH), 20.4 (CH₃) e 16.3 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3045.62 (NH); 1722.03 (C=O); 1637.52 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₅H₁₈F₃N₃OS [M-H]⁺: 345,38; encontrado: 346,38

MG2.1**(E)3-metil-5-fenil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazolidin-4-ona**

Em balão de fundo redondo com 15mL de etanol, adicionou-se 0,809 mmol da tiossemicarbazida **MB02** e em seguida a base acetato de sódio numa proporção de 4:1. Levou-se a agitação magnética até a completa dissolução sob temperatura ambiente. Posteriormente se adicionou 0,809 mmol de éster 2-cl-2-fenil acetato e deixou-se sob agitação magnética e temperatura de 100° C por 48 horas. Observou-se um precipitado de coloração branca e fez-se placa. Com presença de sal no precipitado necessitou-se a recristalização com o solvente tolueno.

PF: 245° C-248° C Rendimento: 30% Rf: 0,62 (7:3-Tolueno:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 8.5 (s, 1H, C=N), 7.97 (d, 2H, CH Ar), 7.81 (d, 2H, CH Ar), 7.37 (m, 5H, CH Ar), 5.5 (s, 1H, CH-S) e 3.3 (CH₃);

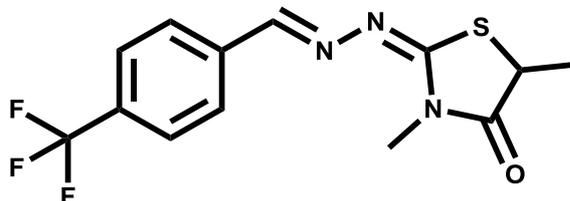
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 155.3 (C=O), 138.6 (C=N), 137.3 (CH Ar), 129.3 (CH Ar), 128.9 (CH Ar), 128.6 (CH Ar), 126.2 (CH Ar), 126.2 (CF₃) e 51.9 (C-S) e 35.2 (CH₃)

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3045.09(NH); 1723.06 (C=O); 1637.62 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₈H₁₄F₃N₃OS [M-H]⁺: 377,08; encontrado: 378,08

MG2.2**(E)-3,5-dimetil-2-((E)-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazona)tiazolidin-4-ona**

Em balão de fundo redondo com 15mL de etanol, adicionou-se 0,766 mmol da tiossemicarbazida **MB02** e em seguida a base acetato de sódio numa proporção de 4:1. Levou-se a agitação magnética até a completa dissolução sob temperatura ambiente. Posteriormente se adicionou 0,766 mmol de ácido 2 cloro propiônico e deixou-se sob agitação magnética e temperatura de 100° C por 48 horas. Observou-se um precipitado de coloração branca e fez-se placa. Com presença de sal no precipitado necessitou-se a recristalização com o solvente tolueno.

PF: 114° C-118°C Rendimento: 32% Rf: 0,75 (7:3-Tolueno:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 8.5 (s, 1H, HC=N), 7.96 (d, 2H, CH Ar), 7.82 (d, 2H, CH Ar), 4.23 (dd, 1H, C-SH), 1.51 (d, 1H, CH₃) e 3.4 (s, 3H, CH₃);

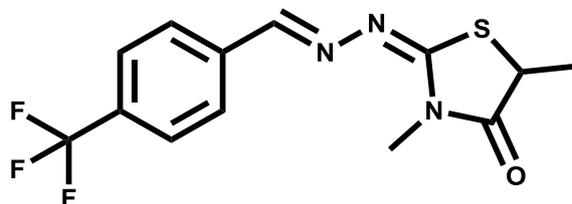
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 154.9 (C=O), 138.1 (C=N), 130.3 (CH Ar), 130 (CH Ar), 128.2 (CH Ar), 125.7 (C=N), 125.4 (CH Ar), 122.7 (CF₃), 42.3 (HC-S), 35.1 (CH₃) e 18.665 (CH₃);

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3045.09(NH); 1723.06 (C=O); 1637.62 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₃H₁₂F₃N₃OS [M-H]⁺: 315,07; encontrado: 316,07

MG2.3**(E)-3,5-dimetil-2-((E)-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazona)tiazolidin-4-ona**

Em balão de fundo redondo com 15mL de etanol, adicionou-se 0,766 mmol da tiossemicarbazida **MB02** e em seguida a base acetato de sódio numa proporção de 4:1. Levou-se a agitação magnética até a completa dissolução sob temperatura ambiente. Posteriormente se adicionou 0,766 mmol de éster bromo acetato de etila e deixou-se sob agitação magnética e temperatura de 100° C por 24 horas. Observou-se um precipitado de coloração branca e fez-se placa. Com presença de sal no precipitado necessitou-se a recristalização com o solvente tolueno.

PF: 156° C-158°C Rendimento: 35% Rf: 0,70 (7:3-Tolueno:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 8.6 (s, 1H, C=N), 7.8 (d, 2H, CH Ar), 7.75 (d, 2H, CH Ar), 3.9 (s, 1H, CH-SH), 3.1(s, 1H, CH₃);

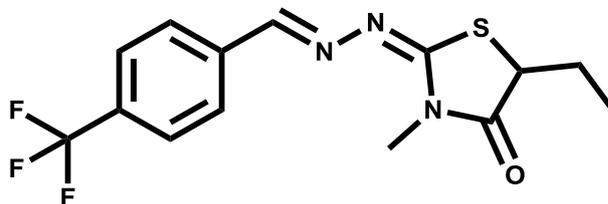
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 154.9 (C=O), 138.1 (C=N), 130.3 (CH Ar), 130 (CH Ar), 128.2 (CH Ar), 125.7(C=N), 125.4 (CH Ar), 122.7 (CF₃), 42.3 (HC-S), 33.9 (CH₃) e 18.6 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3045.09(NH); 1723.06 (C=O); 1637.62 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₂H₁₀F₃N₃OS [M-H]⁺: 301,05; encontrado: 302,05

MG2.4**((E)-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil) tiazolidin-4-ona**

Em balão de fundo redondo com 15mL de etanol, adicionou-se 0,766 mmol da tiossemicarbazida **MB02** e em seguida a base acetato de sódio numa proporção de 4:1. Levou-se a agitação magnética até a completa dissolução sob temperatura ambiente. Posteriormente se adicionou 0,766 mmol de ácido 2-br butírico e deixou-se sob agitação magnética e temperatura de 100° C por 24 horas. Observou-se um precipitado de coloração branca e fez-se placa. Com presença de sal no precipitado necessitou-se a recristalização com o solvente tolueno.

PF: 95,6° C-98,9°C Rendimento: 70% Rf: 0,62 (7:3-Tolueno:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 8.6 (s, 1H, C=N), 7.83 (d, 2H, CH Ar), 7.75 (d, 2H, CH Ar), 4.31 (m, 1H, CH-SH), 3.0 (s, 1H, CH₃) e 2.0 (m, 2H, CH₂) e 1.62 (m, 3H, CH₃)

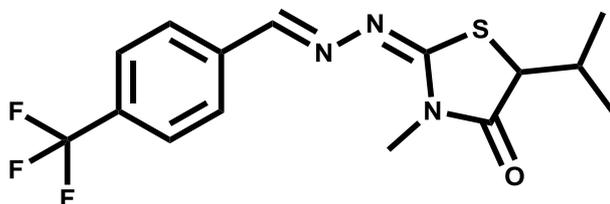
RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 155.1 (C=O), 138 (C=N), 130.3 (CH Ar), 129.9 (CH Ar), 128.2 (CH Ar), 125.7 (C=N), 125.4 (CH Ar), 122.7 (CF₃), 49.3 (HC-S), 34.9 (CH Ar), 35.90 (CH Ar), 35.7 (CH Ar), 35.6 (CH Ar), 25.4 (CH₂) e 10.3 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3045.09(NH); 1723.06 (C=O); 1637.62 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₄H₁₄F₃N₃OS [M-H]⁺: 329,08; encontrado: 330,08

MG2.5**(E)-3-metil-5-isopropil-3-metil-2-(2-(4-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil)thiazolidin-4-ona**

Em balão de fundo redondo com 15mL de etanol, adicionou-se 0,766 mmol da tiossemicarbazida **MB02** e em seguida a base acetato de sódio numa proporção de 4:1. Levou-se a agitação magnética até a completa dissolução sob temperatura ambiente. Posteriormente se adicionou 0,766 mmol de ácido 2-Br-3-metil butírico e deixou-se sob agitação magnética e temperatura de 100° C por 24 horas. Observou-se um precipitado de coloração branca e fez-se placa. Com presença de sal no precipitado necessitou-se a recristalização com o solvente tolueno.

PF: 97,8° C-101°C Rendimento: 50% Rf: 0,72 (7:3-Tolueno:Acetato de etila)

RMN ¹H

RMN- ¹H (400 MHz, ppm): 8.7 (s, 1H, C=N), 7.89 (d, 2H, CH Ar), 7.80 (d, 2H, CH Ar), 4.46 (d, 1H, CH-SH), 3.3(s largo, 1H, CH₃) e 0.98 (m, 3H, CH₃)

RMN ¹³C

RMN- ¹³C (100.5 MHz, ppm): 154.7 (C=O), 138.2 (C=N), 132.3 (CH Ar), 129.2 (CH Ar), 128.2 (CH Ar), 125.7 (C=N), 122.4 (CF₃), 55.2(HC-S), 33.9 (CH₃), 29.9 (CH), 20.4 (CH₃) e 16.4 (CH₃).

I.V.(Principais bandas)

(KBr, cm⁻¹): 3045.09(NH); 1723.06 (C=O); 1637.62 (C=N);

EMAR (ESI): Calculado para C₁₅H₁₆F₃N₃OS [M-H]⁺: 343,10; encontrado: 344,10

PERSPECTIVAS

6. PERSPECTIVAS

Com base nas informações obtidas nos resultados biológicos, pode-se planejar novos compostos, variando o substituinte em N3, para avaliar a relação estrutura-atividade e o possível incremento da atividade. Após a obtenção destes dados, dar-se-á sequência aos estudos analisando-os na forma epimastigota e tipomastigota. E posterior a análises desses resultados a forma evolutiva amastigota será testada com a finalidade de verificar a atividade dos compostos que obtiveram uma melhor resposta frente a forma evolutiva tripomastigota.

As análises biológicas dos compostos 4-tiazolinona estão em andamento com o grupo de pesquisas do Prof. Dr. Policarpo Ademar. De acordo com os resultados que serão obtidos, serão avaliadas as melhores moléculas para a realização dos testes frente à enzima cruzaina. A colaboração para o estudo já está estabelecida e os compostos serão enviados logo após o recebimento e análise da última série de compostos.

Modificações estruturais da molécula mais promissora, **MB 1.5**. Substituições em *orto* e *meta*, além de dissubstituições pelos vários carbonos do anel aromático ligado ao tiazol proporcionarão um melhor estudo de relação estrutura atividade.

A comparação entre tizóis e tiazolinonas é fundamental para enriquecer o trabalho e dar uma maior sustentação quanto a influencia desses grupos farmacofóricos nas moléculas antiparasitárias.

Também pretende-se analisar as alterações morfológicas induzidas pela ação dos compostos mais promissores, nas diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, através da microscopia eletrônica.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Foram sintetizadas e analisadas estruturalmente através de técnicas espectroscópicas duas séries derivadas do composto intermediário 4'-trifluormetil-fenil-tiossemicarbazida. À primeira série sintetizada pertencem 14 tiazóis e suas 2 tiossemicarbazonas de origem, **MB01** para os tiazóis denominados **MB01.X**, onde x é o número de identificação de substituinte e o mesmo para a série **MB02**.

A segunda série é composta de 10 tiazolinonas inéditas, caracterizadas estruturalmente por técnicas de RMN¹H e ¹³C, infravermelho e espectro de massas. Estas moléculas foram enviadas para testes biológicos como: citotoxicidade em esplenócitos, atividade tripanocida frente as formas epimastigota e tripomastigota. As atividades das tiazolinonas ainda não foram determinadas por nossos colaboradores até o presente momento, mas estamos esperando para tempo breve.

Para ambas as séries foram utilizadas metodologias simples, fundamentadas na literatura e bem utilizadas no nosso laboratório. Os rendimentos foram satisfatórios para os tiazóis, que variaram, em sua maioria, de 70% a 90% e, para as tiazolinonas, os rendimentos variaram de 35% a 70%.

Os tiazóis foram analisados quanto a sua atividade biológica e observou-se que a modificação estrutural proposta para o trabalho não foi benéfica para a atividade tripanocida. No entanto, a citotoxicidade diminuiu com a ciclização das tiossemicarbazonas, na maioria dos casos. A presença de uma metila na posição C5 do anel tiazólico (**MB 02**) proporcionou uma diminuição na citotoxicidade de quase dez vezes, quando comparado ao **MB 01**.

Face ao supracitado, obteve-se uma menor toxicidade para esplenócitos em todos os compostos analisados biologicamente, exceto para **MB01**, **MB1.8** e **MB1.12**. Em contrapartida, esses compostos demonstraram uma potente atividade frente a forma epimastigota, sendo até 12 vezes mais potente que o fármaco de escolha, o benznidazol.

Como protótipo mais promissor da série, obteve-se o **MB 1.5** que possui em sua estrutura um anel tiazólico substituído no carbono 4 com um *para*-metoxi-fenil. Essa molécula se mostrou mais potente na forma epimastigota e semelhante ao benznidazol na forma evolutiva tripomastigota. Quanto à citotoxicidade o **MB 1.5** se mostrou atóxico.

REFERÊNCIAS

- 1- Drugs for Neglected Diseases initiative (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.
- 2- LOSET, J. R.; CHANG, S. Drugs for Neglected Diseases initiative model of drug development for neglected diseases: current status and future challenges. **Future Medicinal Chemistry**, V.3, n.11, Pg. 1361-1371, 2011.
- 3- G. FINDER, 2010; Neglected Disease Research and Development: Is the Global Financial Crisis Changing R&D; Disponível em: <http://www.mmv.org/newsroom/publications/g-finder-2010>. Acessado em: 25 de junho de 2014
- 4- 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**. V.1, Pg.114, 2007.
- 5- FIOCRUZ – Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>, acessado em 12 de abril de 2012.
- 6- 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**. V.104, n. 1, Pg. 17–30, 2009.
- 7- 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 Trypanosomacruzi. **FEMS Microbiol Lett**. V.124, Pg.81–86, 1994.
- 8- MOREIRA, D. R. M. M. Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades tripanocidas de 2-iminotiazolidina-4-onas e seus análogos estruturais do tipo 2-imino-1,3-tiazóis. Tese de doutorado. Recife-PE, 2012.

9-LEITE, A. C. L.; MOREIRA, D. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; HERNANDES, M. Z.; PEREIRA, V. R. A.; SILVA, R. O.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, M. S.; SOARES, M. B. P. Synthesis, Cruzain Docking, and *in vitro* Studies of Aryl-4-Oxothiazolyhydrazones Against Trypanosomacruzi. **ChemMedChem**, V.2, n. 9, Pg. 1339-1345, 2007.

10-MOREIRA, D. R. M. M. *et al* Structural Investigation of Anti-Trypanosomacruzi 2-Iminothiazolidin-4-ones Allows the Identification of Agents with Efficacy in Infected Mice. **Journal of Medical Chemistry**, V.55, n. 24, Pg.10918-10936, 2012.

11-A. J. ALVES, A. C. L. LEITE, D. P. SANTANA, M. T. BELTRÃO, M. R. COELHO, P. GAYRAL, Synthesis of some 4-oxo- Δ^2 -thiazolin-2-ylhydrazones as potential antiprotozoal agents, **IL Farmaco**. V. 48, Pg. 1167–1171, 1993.

12- 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**. V.104, Pg. 263–269, 2009.

13- INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2012- Disponível em:http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1413&query=simple&search_by_authname=all&search_by_field=tax&search_by_keywords=any&search_by_priority=all&search_by_section=all&search_by_state=all&search_text_options=all&sid=32&site=fio&text=Chagas, acessado em: 09 de maio de 2014.

14- DPDx – Trypanosomiasis, American. Fact Sheet. Centers for Disease Control (CDC). Acessado em: 27 de Março de 2014.

15-COURA, J.R e DIAS, J.C.P,. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its Discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 104, Pg. 31-40, 2009.

- 16- ANVISA- Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos – Informe Técnico - nº 35 de 19 de junho de 2008. Acessado em: 27 de Março de 2014.
- 17-WHO (World Health Organization). Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Technical report series nº 905. Geneva: **World health Organization**, 2002
- 18- REY, L. Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Pg. 151-171, 2001.
- 19-MONCAYO A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V.98, Pg. 577–591, 2003.
- 20- Organización Panamericana de la Salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo, Uruguay: Organización Panamericana de la Salud, 2006 (in Spanish). Disponível em: www.paho.org Acessado em: 25 de novembro de 2012
- 21- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica, 77ª ed, Brasília, 2009. Disponível em :http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf. Acessado em 09 de junho de 2013.
- 22-BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis*. V.49, Pg. 52-54, 2009.
- 23- WORLD DISTRIBUTION OF CHAGAS DISEASE, 2014; Disponível em: <http://www.bayerpharma.com/en/corporate-responsibility/neglected-diseases/chagas/index.php>. Acessado em: 16 de junho de 2014
- 24- RASSI A, RASSI A JR, RASSI SG, ET AL. Doença de Chagas. In: Lopes AC, ed. Tratado de clínica médica, 2ed. São Paulo: Editora Roca, Pg. 4123–34, 2009.

25- UMESH S. PAL, MRUNAL K. SHIRSAT, INDRAJEET J. SINGHVI., MANOJ VERMA., NIKHIL SHAH; Review: Chagas Disease; **American Journal of Pharmtech Research**; Volume 1, Issue 3, 2011.

26- Nota técnica disponível no site:http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Nov/18/Informe_Diagnostico_DC_NUCOM_2_.pdf e publicada com autorização da Gerencia Técnica de Raiva e Chagas, Ministério da Saúde, 2013.

27- RASSI A, DIAS JC, MARIN-NETO JA, RASSI A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas disease; **Heart and Education in Heart**, 95 (7), 524–34, 2009.

28- ACERVO DE LÂMINAS DA USJT, disponível em: <http://www.usjt.br/acervolaminas/index.php/parasitologia/95-protozoarios> .Acessado em: 14 de junho de 2014

29- RASSI, A. Jr, RASSI, A., MARIN-NETO, J. A. **Chagas disease**.*Lancet*; 375: 1388–402; 2010.

30- BRAZ, L. M.; AMATONETO, V.; OKAY, T. S. Reactivation of *Trypanosomacruzi* infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization. V.50, Pg. 65– 66, 2008.

31-INFOESCOLA, 2014; Disponível em: <http://www.infoescola.com/sistema-digestivo/intestino-grosso>. Acessado em: 20 de junho de 2014

32- DIAS, J.C.P. Natural history of Chagas disease.*Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. V. 65, Pg. 359–66, 1995.

33 -CAMPBELL, D.A.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Current molecular medicine*. V.4, Pg. 549–62, 2004.

- 34- MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. J. R.; MACIEL, B. C.; SIMOES, M. V.; SCHMIDT, A. Chagas heart disease. In: Yusuf S, Cairns JA, Camm AJ, Fallen EL, Gersh BJ, eds. Evidence-based cardiology, 3ed. London: **(BMJ) Books**, Pg. 823–41, 2010.
- 35- NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARD, P.M; VITOR, R.W.A. Parasitologia Humana. 11ª edição, ED. São Paulo; *Atheneu*, **2005**.
- 36- DE REZENDE, J. M.; LUQUETTI, A. O. Chagasic megavisceras. In: Chagas' disease and the nervous system. Scientific publication. N. 547. Washington, DC: Pan American Health Organization, Pg.149–71, 1994.
- 37- 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*. V.104, Pg. 17-30, 2009.
- 38- MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. J. R.; MACIEL, B.C.; SIMOES, M.V.; SCHMIDT, A. Chagas heart disease. In: Yusuf S, Cairns JA, Camm AJ, Fallen EL, Gersh BJ, eds. Evidence-based cardiology, 3 ed. London: **(BMJ) Books**, Pg. 823–41, 2010.
- 39- DEANE, L. M. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. V.16, n.27–48, 1964.
- 40- DIAS DE TORANZO, E. G. D.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZUOLO, B. M.; CAZULO, J. J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experimentia*. V.44, Pg. 880-881, 1988.
- 41- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host (Review.) *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146: 601-620, 2006
- 42- FIOCRUZ – Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>, acessado em 12 de abril de 2012.

43- GARCIA S, RAMOS CO, SENRA JF. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas disease decreases cardiac alterations, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; 49 (4): 1521–8, 2005.

44- 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.

45- EL-SAYED, N. M. The genome sequence of *Trypanosomacruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, 2005.

46- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R.; Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in parasitology**, v. 19, p. 495-501, 2003.

47- 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.; CRAIK, C. S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 263-269, 2009

48- 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 Thiosemicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medical Chemistry**, 45 (13), 2695-2707, 2002

49- MCKERROW, J. H.; ROSENTHAL, P. J.; SWENERTON, R.; DOYLE, P.; **Current Opinion in infectious disease**, 21, 668, 2008.

50- FRICKER, S. P.; MOSI, R. M.; CAMERON, B. R.; BAIRD, I.; ZHU, Y.; ANASTASSOV, V.; COX, J.; DOYLE, P. S.; HANSELL, E.; LAU, G.; LANGILLE, J.; OLSEN, O.; QIN, L.; SKERLJ, R.; WONG, R. S. Y.; SANTUCCI, Z.; MCKERROW, J. H.; **Journal of Inorganic Biochemistry**, 102, 1839, 2008.

51- FRICKER, S. P.; MOSI, R. M.; CAMERON, B. R.; BAIRD, I.; ZHU, Y.; ANAS-

TASSOV, V.; COX, J.; DOYLE, P. S.; HANSELL, E.; LAU, G.; LANGILLE, J.; OLSEN, O.; QIN, L.; SKERLJ, R.; WONG, R. S. Y.; SANTUCCI, Z.; MCKERROW, J. H.; *Journal of Inorganic Biochemistry.*, 102, 1839, 2008.

52- SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W.; *In vitro* and *in vivo* antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors, **British Journal of Pharmacology**, 152,112,2007

53-LUIZ C. DIAS E MARCO A. DESSOY; Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no Desenvolvimento de NovosFármacos; **Química Nova**, Vol. 32, No. 9, 2444-2457, 2009.

54-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 (7), 948-954, 2007.

55- HOLLA, B. S.; MALINI, K. V.; RAO, B. S.; SAROJINI, B. K.; KUMARI, N. S. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 38(3), 313-318, 2003.

56- G. TURAN-ZITOUNI, A. ÖZDEMIR, Z.A. KAPLANCIKLI, K. BENKLI, P. CHEVALLET, G. AKALIN, Synthesis and antituberculosis activity of new thiazolylylhydrazone derivatives, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 43, 981-985, 2008.

57- MOREIRA, D. R. M. M.; COSTA, S. P. M.; HERNANDES; M. Z.; RABELLO, M. M.; OLIVEIRA FILHO, G. B. ; C. M. L.;L. F., C. A.;MELO, ROCHA,; SIMONE FERREIRA,FRADICO,R.; J. R. B.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SRIVASTAVA, R. M.; PEREIRA, V. M. B. P. S. A. C. L. L. ; SOARES, ; LEITE, Structural Investigation of Anti-*Trypanosomacruzi*2-Iminothiazolidin-4-ones Allows the Identification of Agents with Efficacy in Infected Mice. **Journal of Medical Chemistry**, 55 (24), 10918-10936, 2012.

58-CAPUTTO, M. E.; FABIAN, L. E.; BENÍTEZ, D.; MERLINO, A.; RÍOS, N.; CERECETTO, H. MOLTRASIO, G. Y.; MOGLIONI, A. G.; GONZÁLEZ, M.;

FINKIELSZTEIN, L. M. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosomacruzi*agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 19 (22), 6818- 6826, 2011.

ANEXOS

ANEXO I - PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

ANIMAIS

Para a determinação da citotoxicidade em esplenócitos, camundongos albinos da linhagem BALB/c (fêmeas entre 6-8 semanas) foram fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM, Recife, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas esterilizadas, e receberam alimentação e água à vontade. Os experimentos foram aprovados pelos comitês de ética da FIOCRUZ.

PARASITAS

Epimastigotas foram coletadas e mantidas em meio axênico usando o meio de cultura "liver infusion triptose" contendo 10% de SBF, 1% de hemina, 1% de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina e mantidas sob 26° C. Tripomastigotas circulantes da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas. Os parasitas foram então mantidos em ambiente axênico usando o meio RPMI-1640 contendo 10% de SBF, 1 % de hemina, 1 % de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina em estufa sob 37 °C e 5 % de CO₂.

7TOXICIDADE EM ESPLÊNOCITOS

Células esplênicas (6×10^5 células/poço) obtidas anteriormente foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura RPMI com 10% de soro bovino fetal. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em sete diferentes concentrações (faixa de 200 a 0,1 µg/mL) e com 1 µM de timidina tritiada/poço durante 24 h em estufa de CO₂ a 37°C. Em paralelo, foram feitos controles com células tratadas com saponina (0,05%), com células tratadas com DMSO (0,05%), substâncias com reconhecida atividade tóxica e um controle sem tratamento. Após 24 h de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada foi determinada através do contador beta de cintilação. O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados.

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA PARA EPIMASTIGOTAS

Epimastigotas (Dm28c) foram contadas em um hemocitômetro e depois vertidas em placas de 96 poços, a um número de células de 10^6 células/poço. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio LIT em cinco concentrações diferentes (1.23, 3.70, 11.11, 33.33 e 100 µg / mL) e adicionado às respectivas cavidades, em triplicata. A placa foi incubada durante 5 dias a 26°C, foram recolhidas alíquotas de cada poço, e o número de parasitas viáveis foram contadas numa câmara de Neubauer e comparados com cultura parasitária não tratada. CI50 foram calculados por meio de regressão não-linear no software GraphPad Prism 4.0. Benznidazol e nifurtimox foram utilizados como fármacos de referência.

TOXICIDADE PARA TRIPOMASTIGOTA CEPA Y

Tripomastigotas metacíclicas foram recolhidas a partir do sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas e, em seguida, distribuídas em placas de 96 poços a uma série de células de 4.105 células/poço em meio RPMI-1640. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio RPMI-1640 em cinco concentrações diferentes (1.23, 3.70, 11.11, 33.33 e 100µg/mL) e adicionado às respectivas cavidades, em triplicata. A placa foi incubada durante 24h a 37°C e 5% de CO₂. Alíquotas de cada poço foram recolhidas, e o número de

parasitas viáveis foi contado numa câmara de Neubauer. A percentagem de inibição foi calculada em relação às culturas não tratadas. O cálculo das CC50 também foi realizada por meio de regressão não-linear com o software GraphPad Prism 4.0. Benznidazol e Nifurtimox foram utilizados como os fármacos de referência.