



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA

MICHELE FRANCE PAULA DA CRUZ

SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA DE
NOVOS DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS 3,5-DISSUBSTITUÍDOS

RECIFE

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA

SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA DE
NOVOS DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS 3,5-DISSUBSTITUÍDOS

MICHELE FRANCE PAULA DA CRUZ

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Coorientadora: Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

RECIFE

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Cruz, Michele France Paula da

Síntese, elucidação estrutural e avaliação tripanocida de novos derivados Imidazolidínicos 3,5-Dissubstituídos / Michele France Paula da Cruz. – Recife: O Autor, 2013.

82 f.: il.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação terapêutica, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Chagas, doença de 2. Imidazolina I. Lima, Mario do Carmo Alves de II. Pereira, Valéria Rêgo Alves III. Título.**

616.9363

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-265

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

REITOR:

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR:

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda Larrazábal da Silva

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA:**

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
INOVAÇÃO TERAPÊUTICA:**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

MICHELE FRANCE PAULA DA CRUZ

SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA DE
NOVOS DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS 3,5-DISSUBSTITUÍDOS

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte de requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor.

Data da defesa: 20 de Fevereiro de 2013

Data de aprovação: 20 de Fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (Orientadora) – Departamento de Antibióticos / Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

Profa. Dra. Janaína de Albuquerque Couto – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE

Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino – Departamento de Química / Universidade Federal de Alagoas, UFAL

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo – PNPd-CAPES / Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

Prof. Dr. Cleiton Diniz Barros – Departamento de Farmácia / Universidade Maurício de Nassau, UNINASSAU

RECIFE
2013

À minha querida mãe, Maria José Paula da Cruz, pelo amor, pelo apoio, pela compreensão e por tantos incentivos, a grande motivação para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha existência e por se fazer presente em todos os momentos do meu viver.

À minha mãe, Maria José Paula da Cruz, por suas orações, por seu carinho, por seu amor, por seu colo e por ter me dado força nos momentos das dificuldades e fraquezas.

Às Profas. Doutoras Maria do Carmo Alves de Lima e Valéria Rêgo Alves Pereira, por terem aceitado, sem hesitar, orientar este trabalho de doutorado, pelos ensinamentos e ajuda que sempre estiveram dispostas a prestar. Também, pela confiança que depositaram em mim, incentivando-me e ajudando-me a alcançar a finalização desta tese.

À minha irmã, Misterlane Keille, e meu sobrinho, Ítalo Alves, por estar sempre comigo em suas orações.

A Josenildo Paixão por nunca deixar de acreditar em mim, por palavras de otimismo e fazer parte da minha vida.

Às minhas amigas de sempre e para sempre, Jakelaine Gomes e Elissandra Barbosa.

À dupla Andreza Tavares e Antônio Sérgio, pela amizade, pelos estudos, conversas, dicas e força durante todo o período do doutorado.

Ao casal, Zeres Arruda e Rinaldo Alves e a amiga Maeli Francisca, pelas amizades conquistadas e jamais esquecidas.

À Ana Rosa e ao professor Manoel Farias, por constantes estímulos no meu crescimento profissional. E, pela amizade oferecida.

Aos colegas, Cássia Michelle, Marilene Felipe Santiago, Cleidiana Bezerra e Nedilson Gomes, por orações, ajuda e força na etapa final desta jornada.

Aos colegas de turma do curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação PPGIT, em especial a Jéssica Miranda, Débora Máximo e Gilcéia Lino.

À Profa. Dra. Suely Lins Galdino (*In memoriam*), que esteve sempre disponível em ajudar-me, apoiar-me e pela orientação durante o desenvolvimento da pesquisa. Que juntamente, com o Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta deu-me a oportunidade em poder participar do Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (GPIT-UFPE)

À Paulo Germano (Secretário do PPGIT-UFPE), pela colaboração prestada no decorrer, não só deste trabalho, mas desde a minha entrada no Programa de Pós-Graduação e pela paciência, disponibilidade e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF-UFPE), pela amizade, cooperação e presteza no desenvolvimento deste trabalho, e sem nenhuma ordem de prioridade: Andreza Tavares, Anekécia Lauro, Antônio Sérgio, César Amorim, Cleiton Diniz, Diogo Aires, Elizabeth Lafayette, Felipe Alcântara, Jamerson Oliveira, Luiz Carlos, Natália Colaço, Paula Roberta, Renata Santos, Sanderssonilo Albuquerque, Sandra Alcântara, Sandra Sarinho, Sinara Mônica, Sybele Lacerda, Tiago Bento, Tibério César e Willams Leal.

Ao grupo da Central Analítica, por ordem alfabética, Abene Ribeiro, Conceição Pereira, Elaine Patrícia, Érida Alves, Eliete Barros, Lúcio Costa, Ricardo Oliveira, pelas análises realizadas, dicas e momentos de descontrações.

A Universidade Federal de Pernambuco, em especial o Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT-UFPE), na pessoa de seus coordenadores Prof. Dr. Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade e Prof. Dr. Luiz Alberto de Lira.

A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), pela concessão da bolsa de estudo de nível doutorado.

Ao Centro de Ciências Biológicas (CCB), na pessoa de seus chefes Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda Larrazábal da Silva e Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães, por propiciar o suporte estrutural e técnico deste trabalho, permitindo uso irrestrito de todas as suas dependências.

Aos Laboratórios de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF-UFPE) do Departamento de Antibióticos e de Imunogenética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ pela realização das sínteses orgânicas e testes biológicos, respectivamente, que permitiram a realização desta tese.

Enfim, simplesmente, a todos vocês e tantos outros só tenho a dizer muito obrigada.

Michele France Paula da Cruz

Posso não ter feito melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito. Posso não ser o que deveria ser, mas não sou o que era antes de entrar no Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, onde eu aprendi, aprendi muito para minha vida pessoal e profissional (Martin Luther King modificado por Mim).

*Bem aventurado o homem que suporta com perseverança a provação;
porque, depois de ter sido aprovado, receberá a coroa da vida, a qual
o Senhor prometeu aos que o amam.*

Tiago 1:12

RESUMO

Passados mais de 100 anos da descoberta da doença de Chagas pelo médico sanitarista Carlos Chagas, cujo agente etiológico é *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), essa doença ainda vêm afetando milhões de pessoas em todo o Mundo, principalmente no continente americano. Apesar da disponibilidade de dois fármacos no mercado para o tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox e o benzonidazol, eles apresentam uma limitada eficácia na fase crônica e efeitos tóxicos indesejáveis ao ser humano. Com isso, outras substâncias vêm sendo estudadas, dentre elas temos os derivados imidazolidínicos por possuírem diferentes atividades farmacológicas dentre elas esquistossomicida, antimicrobiana, anticonvulsivante, antitumoral e tripanocida. Por isto, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar novos derivados imidazolidínicos a partir de novas moléculas 3-benzil-5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT) visando contribuir na introdução de novos agentes com potencial tripanocida. Os novos derivados foram obtidos em duas etapas. Primeiramente, a imidazolidina-2,4-diona reagiu com os haletos de benzila e hidróxido de sódio como catalisador, formando o 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT), por meio de uma reação de N-alquilação. Em seguida, os derivados imidazolidínicos 3,5-disubstituídos (LPSF/PT) foram obtidos através de uma reação de condensação da 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona com benzaldeídos substituídos em presença de morfolina. As estruturas químicas dos compostos sintetizados foram caracterizadas através de técnicas espectroscópicas: ressonância magnética de hidrogênio e carbono (RMN ^1H e ^{13}C) e espectroscopias na região do infravermelho (IV). A atividade tripanocida dos novos derivados imidazolidínicos (LPSF/PT-139, LPSF/PT-145, LPSF/PT-151, LPSF/PT-152, LPSF/PT-167, LPSF/PT-214) foram avaliadas sobre as formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) em diferentes concentrações e assim foi calculado o valor da IC₅₀. Dentre os compostos testados, o composto LPSF/PT-152 apresentou melhor resultado para a forma tripomastigota, por apresentar IC₅₀ de 1,26 µg/mL. Enquanto os compostos LPSF/PT-145 e LPSF/PT-214 para a forma epimastigota, por apresentarem, respectivamente, IC₅₀ de 2,11 µg/mL e 2,89 µg/mL. De acordo com os resultados obtidos, podemos sugerir a eficácia destes novos compostos imidazolidínicos e o potencial fármaco tripanocida.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Imidazolidinas. Tripanocida .

ABSTRACT

After more than 100 years of the discovery of Chagas disease whose etiologic agent is *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), by public health physician Carlos Chagas, this disease still affecting millions of people worldwide, mainly in the Americas. Despite the availability of both drugs on the market for the treatment of Chagas' disease, nifurtimox and benznidazol, they have a limited efficacy in chronic phase and undesirable toxic effects to humans. Thus, other substances have been studied, among them we have the derived imidazolidinics, which have different pharmacological activities and including schistosomicidal, antimicrobial, anticonvulsant, antitumor and trypanocidal. Therefore, this study aims to synthesize new imidazolidinic derivatives from new molecules such as 3-benzyl-5-benzylidene-imidazolidine-2,4-dione (LPSF / PT) to contribute in the introduction of new agents with a trypanocidal potential. The novel derivatives were obtained in two stages. Firstly, imidazolidine-2,4-dione reacted with benzyl halides and sodium hydroxide as catalyst to form 3-benzyl-imidazolidine-2,4-dione (LPSF / PT) by a reaction of N-alkylation. Then the 3,5-disubstituted imidazolidinic derivatives (LPSF / PT) were obtained by a condensation reaction of 3-benzyl-imidazolidine-2,4-dione with substituted benzaldehydes in the presence of morpholine. The chemical structures of the synthesized compounds were characterized by spectroscopic techniques: magnetic resonance of hydrogen and carbon (^1H and ^{13}C) and in the infrared spectroscopy (IR). The trypanocidal activity of the novel imidazolidinic derivatives (LPSF/PT-139, LPSF/PT-145, LPSF/PT-151, LPSF/PT-152, LPSF/PT-167, LPSF/PT-214) were evaluated under trypomastigotes and epimastigotes forms of *T. cruzi* (Y strain) at different concentrations and thus was also calculated the IC_{50} value. Among the compounds tested, the LPSF/PT-152 compound showed better results for the trypomastigotes form, by presenting IC_{50} of 1.26 $\mu\text{g} / \text{mL}$. While compounds LPSF/PT-145 and LPSF/PT-214 for epimastigote form, presented respectively IC_{50} of 2.11 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 2.89 $\mu\text{g} / \text{mL}$. According to the obtained results, we suggest the efficacy of these novel imidazolidinic compounds and potential trypanocidal drug.

Keywords: Chagas disease. Imidazolidines. trypanocidal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - a) <i>Trypanosoma cruzi</i> ; b) Inseto vetor	22
Figura 2 - Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> : a) amastigota; b) epimastigota; c) tripomastigota	23
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Figura 4 - Sinal de Romanã na fase aguda	26
Figura 5 - Primeiros compostos desenvolvidos para o tratamento da doença de Chagas: a) Tintura de fucsina e b) Atoxyl	28
Figura 6 - Nitrofurazona	28
Figura 7 - Nifurtimox	28
Figura 8 - Mecanismo de ação de nifurtimox e benzonidazol e via de detoxificação do <i>Trypanosoma cruzi</i> . GSH, glutatona; T(SH) ₂ , tripanotona; GSSG, dissulfeto de glutatona; T(S) ₂ , dissulfeto de tripanotona	29
Figura 9 - Benzonidazol	30
Figura 10 - Principais classes de inibidores da cruzaína	32
Figura 11 - nitrofurano (a); naftoquinona (b); fenotiazida (c)	33
Figura 12 - Composto 2,5-bis-(4-acetilaminofenil) furano	34
Figura 13 – Miltefosina	34
Figura 14 – Ergosterol	35
Figura 15 – Medicamentos disponíveis no mercado: a) cetoconazol; b) terbinafina; c) fluconazol	35
Figura 16 – a) norfloxacino; b) berenil; c) merbarona	36
Figura 17 - Imidazolidina-2,4-diona	37
Figura 18 - Anel imidazolidínico e seus sítios ativos	39
Figura 19 - 1,3-di-(4-clorobenzil)-2-(3-hidroxifenil)imidazolidina (a); 3-(2,4-dicloro-benzil)-5-(3,4,5-trimetóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-221)	43
Figura 20 - 3- (4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)	44
Figura 21 - 5,5-bis[(fenilmetil)tio]imidazolidina-2,4-diona	44
Figura 22 - Composto que apresentou melhor resultado nos testes, onde:	

Z=2-MOM-4-tiazol; A=2-(S)bu; B=2-propil; R ₁ =OCH ₃ ; R ₂ =H	45
Figura 23 - Fenitoína: 5-difenil-imidazolidina-2,4-diona	45
Figura 24 - 1-Benzil-5,5-difenil-3-imidazolidin-2,4-diona	46
Figura 25 - 5-ciclopropanospiro-4-flúorfenil-imidazolidina-2,4-diona	46
Figura 26 – Derivados imidazolidínicos com melhor atividade frente às células cancerígenas de mama e pulmão	47
Figura 27 - 3-(4-clorofenacil)-5-(4-metoxibenzilideno)-2-tioxi-imidazolidin-4- diona	48
Figura 28 - 3-(4-Bromobenzil)-5-(1- <i>H</i> -indol-3-il-metileno)-2-tioxi- imidazolidina-4-ona (LPSF/NN-52) (a); 5-(1- <i>H</i> -indol-3-il-metileno)-3-(4- nitrobenzil)-2-tioxi-imidazolidina-4-ona (LPSF/NN-100) (b)	49
Figura 29 – Espectro de RMN ¹ H do LPSF/PT-152	64
Figura 30 – Espectro de RMN ¹³ C do LPSF/PT-152	65
Figura 31 – Espectro de Infravermelho do LPSF/PT-152	66
Figura 32 - 3-(3-cloro-benzil)-5-(3-cloro-benzilideno)-imidazolidina-2,4- diona (LPSF/PT-152)(a); 1,3-Di-(4-clorobenzil)-2-fenilimidazolidina (b)	68
Figura 33 - 3-(3-bromo-benzil)-5-(2,4,6-trimetóxi-benzilideno)-imidazolidina- 2,4-diona (LPSF/PT-214) (a); -(4-nitro-benzil)-5-(3,4,5-metóxi- benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-17) (b); 3-(2,4-dicloro- benzil)-5-(3,4,5-trimetóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT- 221) (c)	69

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Obtenção da imidazolidina-2,4-diona a partir da bromoacetiluréia (a) com a amônia (b) em meio etanólico	37
Esquema 2 - Reação de obtenção da imidazolidina-2,4-diona a partir do (a) éster etílico da glicina e (b) cianato de potássio em presença de (c) ácido clorídrico (HCl)	38
Esquema 3 – Obtenção da imidazolidina-2,4-diona a partir da (a) glicina e da (b) uréia, na presença de (c) ácido sulfúrico	38
Esquema 4 – Obtenção da imidazolidina-2,4-diona substituída na posição N-3 (d) a partir da 5-fenil imidazolidina-2,4-diona (a) na presença de iodeto de metila (b) em solução de hidróxido/metanol (c)	40
Esquema 5 - Obtenção da imidazolidina na posição N-3: imidazolidina-2,4-diona (a); cloreto de benzila (b); solução de hidróxido de potássio/metanol (KOH) (c); 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (d)	40
Esquema 6 – Obtenção da imidazolidina-2,4-diona substituída a partir da sarcosina (a) com cianato de potássio (b) na presença de ácido clorídrico (HCl)(c)	41
Esquema 7 – Obtenção da 5-benzilideno imidazolidina-2,4-diona (d): fenilpropionato de propila (a); uréia (b); etóxido de sódio/metanol (C ₂ H ₅ ONa/MeOH) (c)	41
Esquema 8 – Obtenção da 5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona (f): imidazoldina-2,4-diona (a); benzaldeído substituído (b); ácido acético (c); acetato de sódio (d); anidrido acético (e)	42
Esquema 9 – Síntese de obtenção dos derivados imidazolidínicos 3,5-dissubstituídos	52
Esquema 10 – Síntese dos derivados 3-benzil-imidazolidina-2,4-dionas (LPSF-PT)	53
Esquema 11 – Obtenção dos derivados 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF-PT).....	54
Esquema 12 - Mecanismo reacional de N-alquilação	62
Esquema 13 - Mecanismo reacional da condensação de Knoevenagel aos derivados imidazolidínicos 3,5-dissubstituídos	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
3.1.1 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
3.2 A DOENÇA DE CHAGAS	25
3.2.1 Patologia da doença de Chagas	25
3.2.2 Quimioterapia	27
3.2.3 Alvos terapêuticos	31
3.3 AS IMIDAZOLIDINA-2,4-DIONAS.....	37
3.3.1 Imidazolidinas substituídas	38
3.3.2 Atividades biológicas das Imidazolidinas	42
3.3.3 Contribuições Científicas do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF/UFPE)	47
4 METODOLOGIA	51
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1.1 Reagentes e solventes utilizados	51
4.1.2 Equipamentos utilizados	51
4.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS – PARTE QUÍMICA	52
4.2.1 Síntese dos derivados 3-benzil-imidazolidina-2,4-dionas (LPSF-PT)	53
4.2.2 Síntese das 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4-dionas (LPSF- PT)	53
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS – PARTE BIOLÓGICA	54
4.3.1 Obtenção de células esplênicas	54
4.3.2 Avaliação da Citotoxicidade dos Compostos em Células de Camundongos Isogênicos	55
4.3.3 Avaliação da Atividade dos Compostos contra <i>Trypanosoma cruzi</i> ..	56

5 RESULTADOS E DISCUSSO	58
5.1 Mecanismo reacional dos derivados 3-benzil-imidazolidina-2,4-dionas (LPSF-PT)	62
5.1.2 Mecanismo reacional das 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4- dionas (LPSF-PT)	63
5.1.3 Caracterizao estrutural dos compostos imidazolidínicos	63
5.2 AVALIAO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS	66
6 CONCLUSO	71
7 PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS	75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Tripanossomíase americana (doença de Chagas) é uma importante causa de patologia cardíaca, digestiva e/ou associada (cardiodigestiva) no ser humano, principalmente no continente Americano. A doença de Chagas humana é uma zoonose que possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um protozoário flagelado, pertencente à ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, que necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo evolutivo, um vertebrado - homem ou mamíferos de outras espécies - e um invertebrado - hemípteros hematófagos da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*, conhecidos por "barbeiros" (REY, 2001; CASTRO et al., 2009; BERN et al., 2011).

Os insetos infectados podem ser encontrados em ambientes silvestres, onde os seres humanos são expostos apenas ocasionalmente, porém os insetos triatomíneos adaptaram-se em habitações humanas, particularmente em *habitats* precários (DIAS et al., 1989).

A doença de Chagas tem sido reconhecida como uma das doenças tropicais negligenciadas, acarretando um grande *problema de saúde pública*, sendo a *quarta maior de impacto social entre todas as doenças infecciosas e parasitárias da América Latina*, e uma das patologias de mais ampla distribuição no continente americano (VINHAES; DIAS, 2000; DOCAMPO et al., 2001; WHO, 2002; HOTEZ et al., 2008).

O tratamento para a doença de Chagas, no Brasil, baseia-se em apenas um medicamento no mercado, cujo nome é N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida (benzonidazol). Seu mecanismo de ação está na inibição da síntese de proteínas e de RNA, tanto nos tripomastigotas metacíclicos quanto nos amastigotas (CANÇADO, 2005).

Diante do presente contexto, novos fármacos na terapêutica contra a doença de Chagas vem sendo desenvolvidos, com o objetivo de aumentar a potência e segurança, garantindo, assim, um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico. Neste sentido, diversas moléculas sintéticas podem ser obtidas a partir de derivações de anéis heterocíclicos, dentre as quais, destacam-se as

imidazolidina-2,4-dionas (hidantoínas), devido à sua potencialidade como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

A modificação molecular nas imidazolidinas por substituição de radicais produz respostas biológicas diferenciadas, alterando as propriedades físicas e reatividade dos compostos químicos, dando origem a alterações na distribuição das células e tecidos e no acesso aos centros de enzimas ativas e receptores (PITTA et al., 2006).

Neste trabalho, foi realizada a síntese de novas moléculas imidazolidínicas 3,5-dissubstituídas através do planejamento racional de novos fármacos. Seguindo da análise das características físico-químicas e estruturais para a comprovação destes novos derivados. E por fim, a avaliação da atividade tripanocida destas novas moléculas através do método *in vitro*.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter novas moléculas 3-benzil-5-benzilideno-imidazolidina-2,4-dionas substituídas por halogênios (cloro, bromo e flúor) e grupos alquila (dimetil e metil) e alcóxido (metóxi) (LPSF/PT) visando contribuir na introdução de novos agentes com potencial atividade tripanocida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar novas moléculas 3-benzil-5-benzilidino-imidazolidina-2,4-dionas substituídas (LPSF/PT);
- ✓ Caracterizar estruturalmente os compostos sintetizados utilizando métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN¹H e RMN¹³C respectivamente) e infravermelho (IV);
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica em cultura de células esplênicas de camundongos isogênicos dos compostos obtidos;
- ✓ Investigar se há a atividade antiparasitária *in vitro* das substâncias avaliadas sobre formas epimastigotas e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Figura 1a) é um protozoário hemoflagelado cuja característica principal é a presença do cinetoplasto, localizado na mitocôndria que retém o material genético. Causa uma infecção sistêmica denominada doença de Chagas, cujos vetores são os insetos, comumente conhecidos como barbeiros (Figura 1b), sendo estes hospedeiros intermediários, da família *Reduviidae* e da subfamília *Triatominae* (RASSI JR., RASSI; MARIN-NETO, 2010). Até 2009 foram catalogados cerca de 140 espécies reconhecidas de vetores da doença, porém apenas algumas espécies transmitem a doença (FORERO; WEIRAUCH; BAENA, 2004; COSTA; ARGOLO; FÉLIX, 2006; GALVÃO, 2006; BÉRENGER; BLANCHET, 2007; PARTTERSON et al., 2009).

Esse parasita é encontrado em todas as regiões do Brasil, onde cerca de 70 espécies foram identificadas, sendo cinco espécies de maior importância devido a grande incidência de transmissão entre os animais domésticos e o homem: *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* e *T. infestans* (erradicada no país) (COURA 2007; DIAS et al., 2009; RASSI JR., RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Figura 1 - a) *Trypanosoma cruzi* (Portal Chagas); b) Inseto vetor.



Foto: Marcelo Pereira,
ICB/USP.

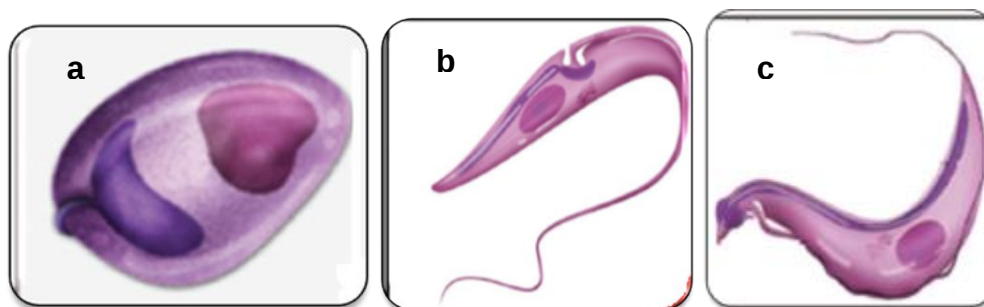
Fonte: <http://www.icb.usp.br/~marcelcp>

3.1.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Segundo Teixeira (2006), De Souza et al. (2010), Fernandes e Andrews (2012) o *T. cruzi* desenvolve seu ciclo de vida em hospedeiros invertebrados (triatomíneos) e vertebrados (mamíferos), onde assume três formas evolutivas que se diferenciam em aspectos morfológicos e bioquímicos que são:

- i. amastigota, encontrada no interior das células dos mamíferos (Figura 2a);
- ii. epimastigota, que se encontra presente no tubo digestivo do inseto vetor (Figura 2b); e, por último,
- iii. a tripomastigota, que é infectante, encontrada nas fezes e urina do inseto vetor (metacíclico) e circulantes no sangue dos mamíferos (sanguíneo) (Figura 2c).

Figura 2 - Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*: a) amastigota; b) epimastigota; c) tripomastigota

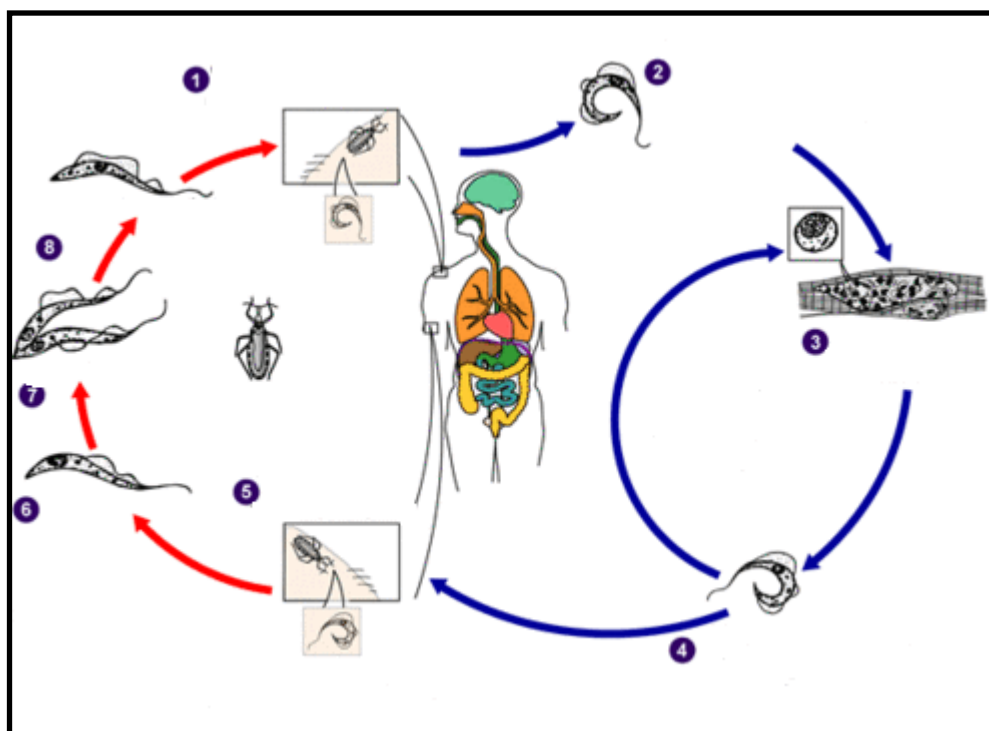


Fonte: JUNQUEIRA et al. (2011).

A Figura 3 se refere ao ciclo de vida do *T. cruzi* inicia-se quando o inseto vetor ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado **(1)** elimina por meio das fezes as formas tripomastigotas metacíclica **(2)**, que penetra na célula do hospedeiro e se transforma em amastigotas (CASTRO et al., 2007; ALVES et al., 2007, DE SOUZA et al., 2010). Em seguida, após ciclos de multiplicação intracelular, as formas amastigotas ganham a corrente circulatória e são levadas

para outros tecidos no corpo **(3)**, preenchem o citoplasma da célula hospedeira e se transformam em tripomastigotas sanguíneas, antes de serem liberadas para corrente sanguínea podendo infectar células vizinhas, se disseminar para outros órgãos ou serem ingeridos por outro inseto vetor reiniciando o ciclo **(4)** (LIMA et al., 2010; MUÑOZ-SARAIVA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011).

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



Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>.

O ciclo no inseto tem início quando ao se alimentar no sangue do vertebrado infectado ingere os tripomastigotas sanguíneos **(5)** e no intestino do vetor serão transformados na forma epimastigota **(6)** (exclusiva do hospedeiro invertebrado) onde se prolifera **(7)** e, novamente, transforma-se na forma tripomastigota metacíclica **(8)** que será eliminado com as fezes durante o repasto sanguíneo, podendo penetrar no organismo do hospedeiro vertebrado por meio da picada ou mucosas, renovando assim o ciclo de transmissão (DUTRA et al., 2006).

3.2 A DOENÇA DE CHAGAS

Descoberta em 1909, pelo médico sanitário Carlos Chagas, a doença de Chagas, também conhecida por tripanossomíase americana estava limitada apenas no Continente Americano devido à presença do vetor restrito a ele, porém há registros de casos em países não endêmicos por outros mecanismos de transmissão (BRASIL, 2009).

A transmissão da doença de Chagas ocorre por vários mecanismos, embora a principal seja a vetorial (SALOMON, 2011), onde os insetos ao picarem os vertebrados defecam após o repasto, eliminando formas infectantes de tripomastigotas que penetra pelo orifício da picada. As transmissões também podem ocorrer por transfusão sanguínea, porém o risco de infecção após uma transfusão é menor que 10-20% (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A infecção vetorial (congenita) ocorre pela passagem de parasitas de mulheres infectadas para seus bebês durante o segundo trimestre de gestação ou na hora do parto.

A ingestão de alimentos infectados pelo parasita também é outra forma de transmissão, é responsável por surtos em áreas urbanas e regiões onde não há circulação de insetos vetores domiciliados (BRASIL, 2009; NÓBREGA et al., 2009; ALARCÓN DE NOYA et al., 2010). Essa transmissão é caracterizada pelo ciclo enzoótico do parasita, no homem, e pode ocorrer através da ingestão de carne crua ou mal cozida, ou de alimentos contaminados por urina ou secreção anal de marsupiais infectados (DIAS, 2006).

3.2.1 Patologia da doença de Chagas

A doença de Chagas se manifesta em duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. A fase aguda é a forma logo após a infecção, na maioria dos casos é assintomático, o que dificulta o tratamento, e dura cerca de 12 semanas (RASSI et al., 2009).

Em casos sintomáticos apresentam um quadro febril, miocardites, adenopatia generalizada, sinais de inoculação (chagoma de inoculação ou sinal de Romana) (Figura 4), hepatoesplenomegalia e meningoencefalites nos casos mais severos. Na maioria dos casos, os pacientes podem se recuperar e entrar na fase indeterminada da doença, caracterizada pela ausência de sintomas e danos em órgãos (no coração, esôfago e intestino) que não são detectados por exames de rotina. Nesta fase, podem levar a morte infantil devido às complicações de insuficiência cardíaca e processos inflamatórios (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Figura 4 - Sinal de Romana na fase aguda.



Fonte: WHO (2007)

Os pacientes infectados com *T. cruzi* que não receberam tratamento adequado desenvolvem a fase crônica da doença e esses sintomas podem aparecer até 30 anos após a infecção (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010). A infecção aguda é seguida por uma fase crônica, que pode ser: indeterminada, cardíaca e digestiva. (BRASIL, 2009; RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2009). A seguir, essas formas serão descritas:

- **Indeterminada** – Nessa fase, alguns pacientes apresentam um quadro assintomático e sem sinais de comprometimento do aparelho circulatório e digestivo. Esse quadro poderá perdurar por toda a vida da pessoa infectada ou pode evoluir tardiamente para a forma cardíaca, digestiva ou associada (cardiodigestiva).

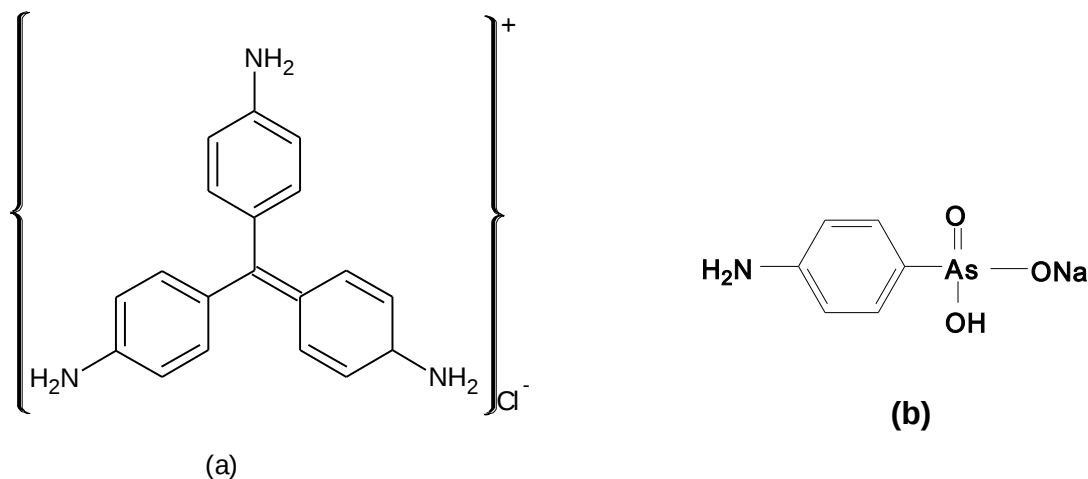
- **Cardíaca** – É caracterizada por uma cardiopatia chagásica sendo a maior responsável pela mortalidade na doença de Chagas, acomete cerca de 30% dos casos crônicos. Frequentemente, evolui para quadros de miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (DEVELOUX et al., 2009).
- **Digestiva** – Ocorre em menor frequência quando relacionado a outros casos e afeta o aparelho digestivo que, frequentemente, evolui para megacólon (espessamento da parede do cólon, causando sintomas de constipação e dor, e sérias complicações como impactação fecal) ou megaesôfago (sintomas: disfagia, dor e regurgitação).
- **Associada (cardiodigestiva)** – Ocorrência concomitante de lesões compatíveis com as formas cardíacas e digestivas.

3.2.2 Quimioterapia

Os primeiros compostos desenvolvidos para o tratamento da doença de Chagas (tripanossomíase americana) foram tintura de fucsina (Figura 5a), o atoxyl (arsênico) (Figura 5b) o tártaro emético (antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio. Todos estes compostos se mostraram ineficazes no tratamento proposto (CROFT, 1999; COURA; CASTRO, 2002).

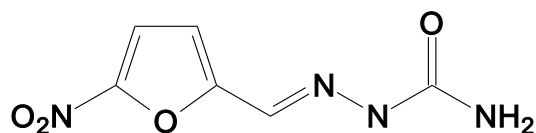
No início da década de 60, já haviam sido experimentados mais de 50 agentes químicos terapêuticos contra o *T. cruzi*. Se destacando com ação sobre a parasitemia os compostos com os nitrofuranos e, posteriormente, com as nitrofurazonas. Em experimentos realizados com camundongos utilizando a nitrofurazona (Figura 6) 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (Furacin), administrada oralmente por 50 dias, em média, promoveram cura em 62 dos 65 animais tratados (95,4%). Porém, quando a administração desse fármaco foi feita em pacientes chagásicos observou-se severos efeitos adversos, que obrigaram a interrupção do seu uso na terapia clínica (COURA; CANÇADO, 2009; DIAS et al., 2009).

Figura 5 - Primeiros compostos desenvolvidos para o tratamento da doença de Chagas: a) Tintura de fucsina; e b) Atoxyl.



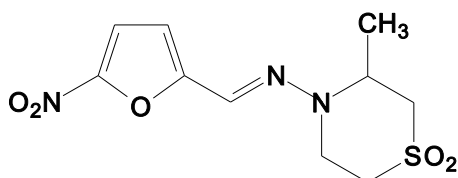
Fonte: CROFT (1999); COURA; CASTRO (2002).

Figura 6 – Nitrofurazona.



O Nifurtimox, (3-metil-4(5'-nitro-furfurilideneamino)-tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (Figura 7), é um composto nitroheterocíclico, com actividades antiprotozoária e antibacteriana. Foi producido e lanzado en 1967 (Laboratório Bayer) (Lampit®), sendo o primeiro medicamento utilizado para o tratamento da forma aguda da doença de Chagas (COURA et al., 2002; MAYA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008 a; WILKINSON; KELLY, 2009).

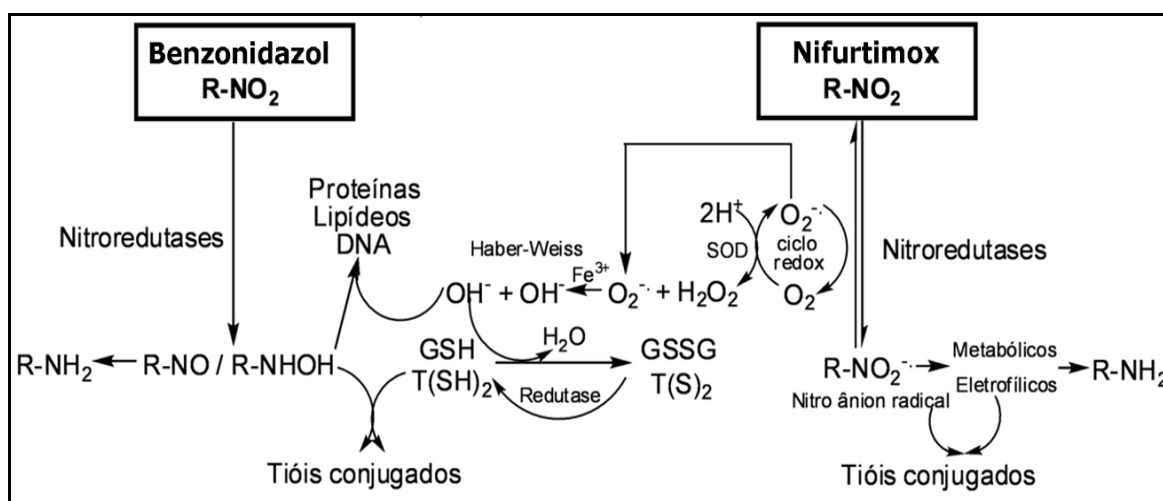
Figura 7 - Nifurtimox.



Estudos comprovam que o principal mecanismo de ação do nifurtimox é a produção de radicais livres através da redução do grupo nitro (NO_2), levando a intoxicação do parasita. Sob a ação de várias nitroreductases, enzimas que atuam em sistemas moleculares R-NO_2 , o grupo nitro é reduzido a grupo amino (NH_2). Este processo, iniciado pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase, leva à formação de um intermediário nitro (R-NO_2^-) com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH). O radical reduz o oxigênio molecular e forma o íon superóxido O_2^- . Esse íon é captado pela superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) formada na presença de íons Fe^{3+} é o principal radical livre que promove o efeito tripanocida por ligação aos lipídeos, proteínas e ao DNA (MAYA, 2003; URBINA; DOCAMPO, 2003; RAETHER; HÄNEL, 2003; DIAS et al., 2009).

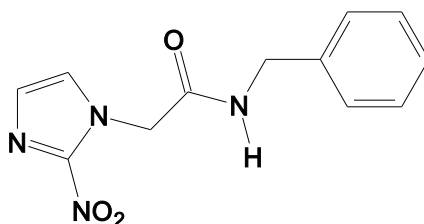
O benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) (Figura 9) é um derivado imidazólico, foi sintetizado por Wineholt e Liebman (OLIVEIRA et al., 2008 b). Ao contrário do nifurtimox, o benzonidazol não estimula a produção de O_2 e H_2O_2 nas mesmas condições experimentais, mas ainda assim, inibe o crescimento do *T. cruzi in vitro*, através da enzima NADH-fumarato redutase o que indica que o efeito tripanocida do benzonidazol não depende da produção de espécies reativas de oxigênio (Figura 8) (RASSI et al., 2002; TAVARES, 2006).

Figura 8 - Mecanismo de ação de nifurtimox e benzonidazol e via de detoxificação do *Trypanosoma cruzi*. GSH, glutationa; T(SH)_2 , tripanotiona; GSSG, dissulfeto de glutationa; T(S)_2 , dissulfeto de tripanotiona.



Fonte: MAYA (2007).

Figura 9 - Benzonidazol.



Estudos comprovam que o benzonidazol aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama (IFN- γ). Possivelmente, ocorre a geração *in situ* de metabólitos ativos nitrorreduzidos do benzonidazol. O grupo nitro (NO₂) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino (NH₂) pela ação de enzimas nitroredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares R-NO₂. Este processo, iniciado pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase, leva à formação de um intermediário nitro(R-NO₂⁻) com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH), aldeído-oxidase e outras enzimas do sistema citocromo P450, os quais são capazes de se ligar covalentemente a proteínas e lipídios, tanto do parasito quanto do hospedeiro (DIAS et al., 2009).

A ação de ambos os fármacos varia de acordo com algumas condições tais como: a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica do paciente, a fase da doença, entre outros. Ambos os nitroderivados apresentam eficácia na fase aguda e crônica recente da doença, alcançando níveis de até 80 % de cura nas doses de 8-10mg/kg/dia com nifurtimox e de 5-7,5 mg/kg/dia com benzonidazol, durante sessenta a noventa dias de terapia. No entanto, na fase crônica, ambas as drogas alcançam somente de 10 a 20 %, de acordo com as áreas geográficas (CANÇADO, 2002; COURA; CASTRO, 2002; COURA, 2007), o que, somando a resistência natural observada em vários isolados do parasito, reforça a necessidade de identificar novos compostos que possam vir a substituí-los (SOEIRO; DE CASTRO, 2009).

Embora o tratamento com nifurtimox e benzonidazol seja de grande relevância, os mesmos possuem limitações, dentre as quais: efeitos colaterais indesejáveis, indução de resistência ao parasito e longo período de tratamento. (WHO, 2007). Na década de 80, o nifurtimox deixou de ser utilizado no tratamento

da doença de Chagas no Brasil devido a severos efeitos colaterais, sendo produzido e utilizado apenas na América Central. No início de 2003, o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) conseguiu o direito de produzir e distribuir o medicamento Rochagan®, a base do fármaco benzonidazol (COURA; CASTRO, 2002; SCHOFIELD et al., 2006; WHO, 2007).

De acordo com o que foi relatado anteriormente, a pesquisa por novas terapias se faz necessária visto que nenhum desses fármacos atende aos preceitos de um bom quimioterápico com base nos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) que estabelece as seguintes exigências: (i) cura parasitológica dos casos agudos e crônicos da infecção; (ii) eficiência em dose única ou em poucas doses; (iii) acessibilidade ao paciente, (iv) baixo custo e fácil obtenção; (v) sem efeitos colaterais ou efeitos teratogênicos; (vi) não ter a necessidade de internação para o tratamento e (vii) nenhuma resistência do agente etiológico (COURA; CASTRO, 2002).

O Ministério da Saúde Brasileiro elaborou um manual destinado aos médicos que atendem os pacientes na rede do Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento etiológico, recomendando tratamento para infecção aguda, infecção congênita, infecção crônica recente (incluindo todas as crianças e adolescentes soropositivos), infecção crônica na forma indeterminada e formas clínicas iniciais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996a, 1996b). Alguns cientistas rebatem as indicações do Ministério da Saúde, afirmando que os pacientes chagásicos crônicos deveriam ser tratados independentemente do estágio da patologia.

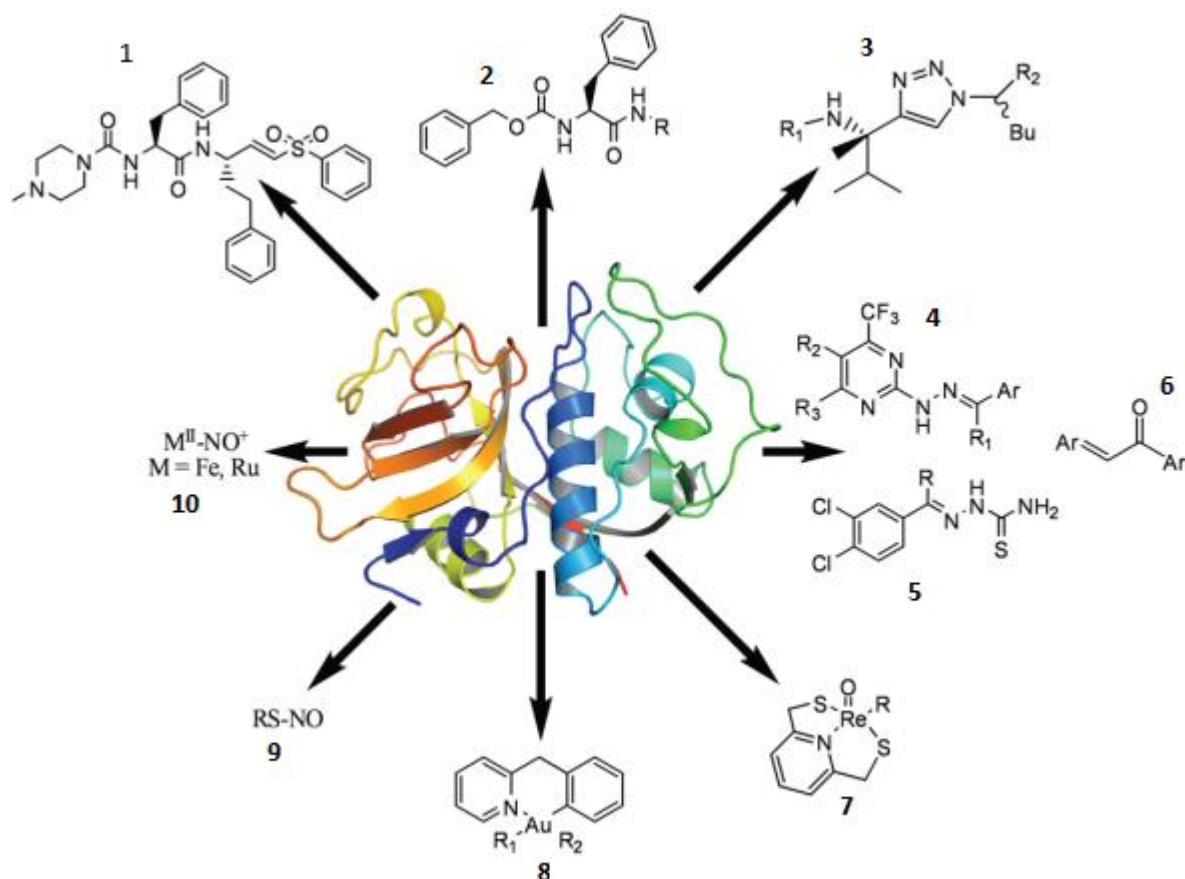
3.2.3 Alvos terapêuticos

A cruzipaina também conhecida como cruzaina ou GP57/51, é a proteína mais abundante do *T. cruzi* sendo essencial na replicação intracelular do parasito, além de sua importância na interação parasito/hospedeiro e na sinalização de íons de cálcio (Ca^{2+}) durante a invasão da célula do hospedeiro vertebrado (CAZZULO et al., 2002; SOEIRO; CASTRO, 2009). A inibição da cruzaina dificulta

a invasión das células e bloqueia a replicación da amastigota, além da diferenciación de tripomastigosta-amastigota, levando assim a inibição do desenvolvemento intracelular (CAZZULO et al, 2002).

As principais clases de inibidores da cruzaina inclúen (Figura 10): (i) derivados peptídicos (**1** e **2**); (ii) derivados não-peptídicos (triazóis **3**, pirimidinas **4**, tiossemicarbazonas **5** e chalconas **6**); (iii) complexos de rênio e ouro (oxorênios **7** e ciclometalados de ouro **8**); e (iv) doadores de óxido nítrico (nitrosotióis **9** e nitrosilo complexos de ferro e rutênio **10**). O derivado dipeptidil vinil sulfônico *N*-metil-Pip-F-hF-VSf (K777) exhibiu alta seletividade e uma potente actividade *in vitro* e *in vivo* en modelos inmunosuprimidos de infección experimental aguda de doenza de Chagas e já se encontra na fase I de teste clínico (McKERROW et al., 2009; BRAK et al., 2010).

Figura 10 – Principais clases de inibidores da cruzaina

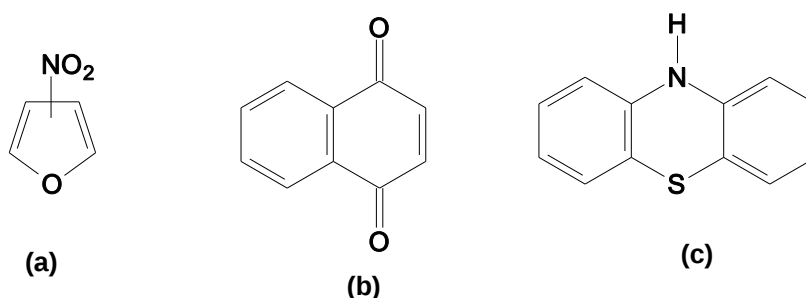


Fonte: McKERROW et al., 2009

A enzima tripanotona redutase (TR) foi descoberta em 1985, encontrada exclusivamente em *T. cruzi* é considerado por muitos um alvo molecular para planejamento de fármacos antiparasitários. Esta enzima catalisa a redução da tripanotona dissulfeto $[T(S)_2]$ em tripanotona ditiol $[T(SH)_2]$, desencadeando uma cascata de eventos responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio. Com isso, a TR protege contra o estresse oxidativo o ambiente no interior do parasita. Uma outra característica que faz com que esta enzima seja um alvo interessante é a sua diferença estrutural com relação a glutathione redutase (enzima que desempenha a mesma função no homem). As diferenças relacionadas ao tamanho, carga e distribuição dos bolsões hidrofílicos/hidrofóbicos, fazem com que o sítio ativo da TR com relação ao da glutathione redutase, seja capaz de acomodar com maior facilidade substratos com grupos mais volumosos (OLIVEIRA et al., 2008a).

Os compostos derivados de nitrofurano, naftoquinonas e fenotiazida (Figura 11) são capazes de inibir estas enzimas (MAYA et al., 2007; PINEIRO, 2009). Esses compostos apresentaram atividade tripanocida, todavia, têm sido muito difícil determinar qual, entre as várias enzimas envolvidas nesse sistema, é o seu alvo (VON et al., 2007; URBINA, 2010).

Figura 11 - nitrofurano (a); naftoquinona (b); fenotiazida (c).

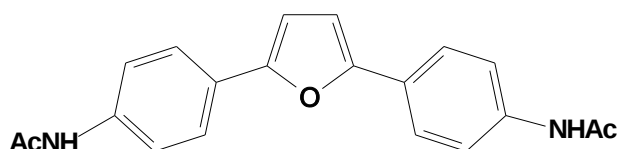


Fonte: URBINA (2010).

O composto 2,5-bis-(4-acetilaminofenil) furano (Figura 12) apresentou inibição na concentração de $48 \mu M$, 50% da atividade da enzima TR. Embora apresentando uma atividade considerável como inibidor da enzima, esse composto não foi ativo nos ensaios *in vitro* utilizando as formas tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*. O que pode ser explicado por sua baixa solubilidade,

dificultando sua penetração no parasita e, conseqüentemente, impedindo de alcançar concentrações suficientes para a inibição persistente da tripanotona redutase (OLIVEIRA et al., 2008a).

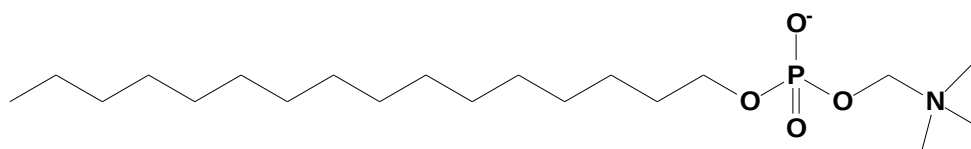
Figura 12 - Composto 2,5-bis-(4-acetilaminofenil) furano.



Fonte: OLIVEIRA et al. (2008 a)

Inibidores de fosfolípidos foram desenvolvidos visando o tratamento de câncer, uma vez que estes são capazes de inibir o crescimento do tumor (MAYA et al., 2007). A Miltefosina (Figura 13), utilizada atualmente para o tratamento da leishmaniose visceral, possui o mecanismo de ação através da inibição da biossíntese de fosfatidilcolina e esfingomielina, o que pode causar o processo de morte celular por apoptose (MAYA et al., 2007; APT, 2010). Há estudos em que mostram que este composto apresenta atividade em 11 cepas do *T. cruzi* (*in vitro*), todavia, é importante ressaltar que a Miltefosina é teratogênica e a transmissão congênita do *T. cruzi* é uma via de transmissão (APT; BUCKNER; NAVABI, 2010).

Figura 13 - Miltefosina

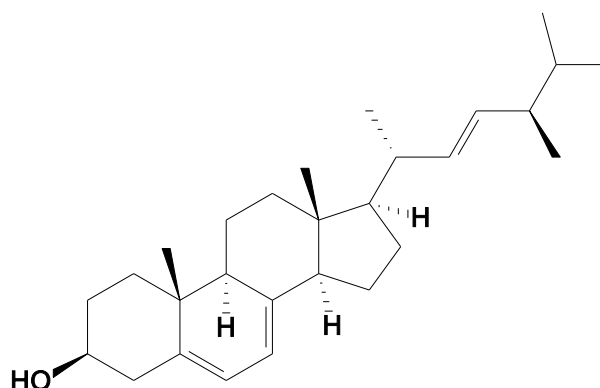


Fonte : MAYA et al., 2007; APT, 2010.

Compostos azólicos junto com heterociclos nitrogenados pertencem a classe de moléculas que atuam como inibidores da síntese de ergosterol (Figura 14)

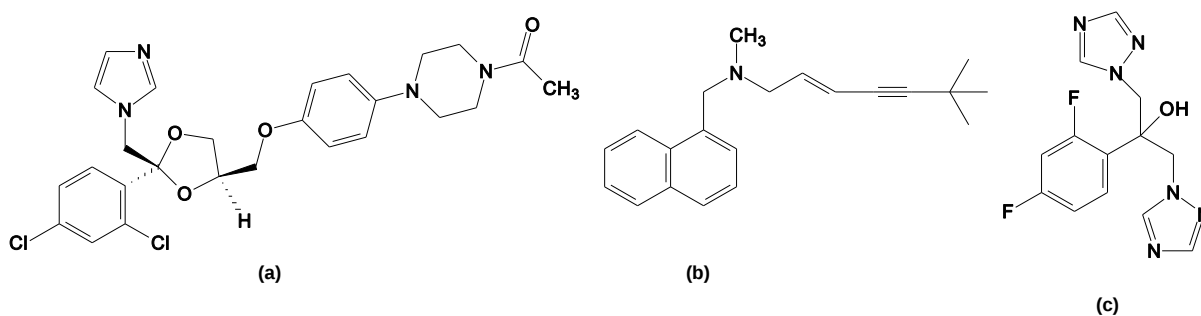
(principal esteroide para o crescimento do *T. cruzi*) (DUSCHAK; COUTO, 2007; APT, 2010). A via biossintética desse lipídeo e a principal enzima envolvida neste processo, C14-esterol demetilase (CYP51), têm sido estudadas como possíveis alvos para quimioterápicos.

Figura 14 - Ergosterol



Alguns medicamentos, (i) cetoconazol, (ii) terbinafina e (iii) fluconazol (Figura 15), disponíveis no mercado para tratamento de doenças causadas por fungos têm sido estudados contra o *T. cruzi*, pois ambos, fungos e *T. cruzi*, possuem em comum a via biossintética do ergosterol. Apesar de apresentarem efeito supressor contra o parasito, não foram capazes de impedir a progressão da doença (DO CAMPO, 2003; DIAS et al., 2009; URBINA, 2010).

Figura 15 – Medicamentos disponíveis no mercado: a) cetoconazol; b) terbinafina; c) fluconazol.



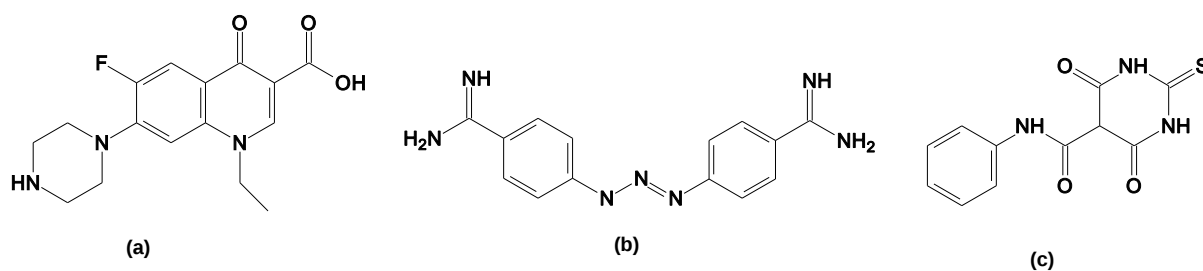
Fonte : DO CAMPO, 2003; DIAS et al., 2009; URBINA, 2010.

No *T. cruzi*, a DNA Topoisomerase II enzima importante na replicação do DNA, está presente no processo de replicação da cadeia de minicírculos e maxicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA), mitocôndria com genoma condensado, cuja manutenção e integridade são essenciais ao parasito durante o ciclo de vida intracelular (LIU et al., 2007; DIAS et al., 2009). A DNA Topoisomerase II está localizada exclusivamente no núcleo do parasita, onde é codificada pelo mRNA, essa enzima é expressa apenas na forma epimastigota e não na forma tripomastigota (FRAGOSO et al., 1998). Diversos inibidores da DNA Topoisomerase II bacteriana apresentaram atividade contra *T. cruzi*, inibindo a proliferação e os processos de diferenciação, além de causar danos ao cinetoplasto e/ou o núcleo de epimastigotas (KERSCHMANN et al., 1989; GONZALES-PERDOMO et al., 1990).

Dos fármacos antineoplásicos disponíveis no mercado comercial, alguns deles apresentam como alvo as DNA topoisomerasas, tais como os inibidores da topoisomerase I: (i) irinotecano (Camptosar®, da Pfizer) e (ii) topotecana (Hycamtin®, da GlaxoSmithKline); e os inibidores da topoisomerase II: (iii) etoposida e (iv) teniposida (Vepesid® e Vumon®, respectivamente, da Bristol-Myers Squibb). Apresentaram bons resultados contra formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* as classes de inibidores antraciclínicos, camptotecinas, acridínicos e fluoroquinolonas (DIAS et al., 2009).

Em 2011, Zuma et al, avaliaram a inibição das topoisomerasas com norfloxacin, berenil e merbarona (Figura 16), onde foi observada pouca influência sobre a proliferação celular, entretanto, o berenil causa alteração no cinetoplasto induzida por interação com topoisomerase II (ZUMA et al., 2011).

Figura 16 – a) norfloxacin; b) berenil; c) merbarona



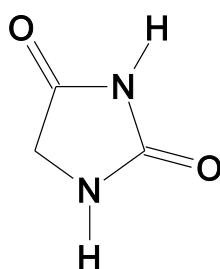
Fonte: ZUMA et al. (2011).

3.3 AS IMIDAZOLIDINA-2,4-DIONAS

As imidazolidina-2,4-dionas ou hindatoínas (Figura 17) são heterociclos pentagonais que possuem dois átomos de nitrogênio no anel e foi descoberta por Bayer em 1861 (WARE, 1950).

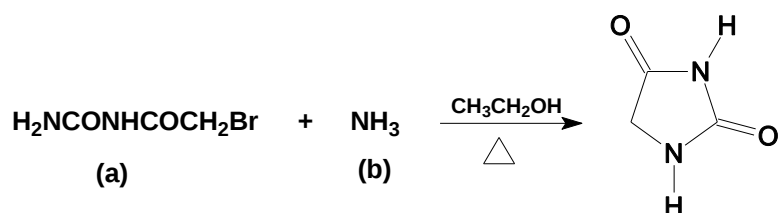
O sistema deste anel desperta grande interesse devido ao seu amplo espectro em diversas atividades biológicas, tais como: antimicrobiana (CATERINA et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 1999), anticâncer (BASAPPA et al., 2009; KAMINSKY, 2009), Anti HIV (COMBER et al., 1992).

Figura 17 - Imidazolidina-2,4-diona.



Bayer, em 1861, sintetizou a primeira imidazolidina-2,4-diona através do aquecimento da bromoacetiluréia (a) com amônia (b) em presença de etanol (Esquema 1) (WARE, 1950).

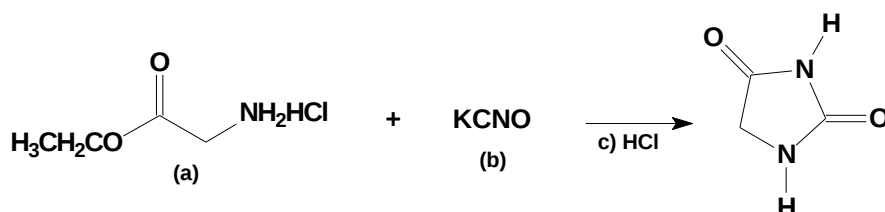
Esquema 1 - Obtenção da imidazolidina-2,4-diona a partir da bromoacetiluréia (a) com a amônia (b) em meio etanólico.



Fonte: WARE (1950).

Harries e Weiss (1900) obtiveram a imidazolidina-2,4-diona através da reação do éster etílico da glicina (a) e cianato de potássio (b), na presença de ácido clorídrico (d) (Esquema 2) (*apud* ELDERFIELD, 1957).

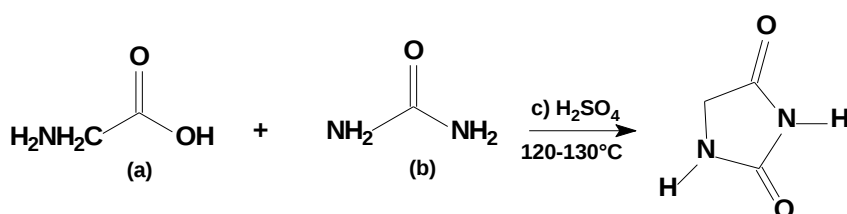
Esquema 2 - Reação de obtenção da imidazolidina-2,4-diona a partir do (a) éster etílico da glicina e (b) cianato de potássio em presença de (c) ácido clorídrico (HCl)



Fonte: WARE (1950).

Em 1978, Kochkanyan e colaboradores sintetizaram a imidazolidina-2,4-diona através do aquecimento da glicina (a) e a uréia (b) na presença de ácido sulfúrico (c), com a temperatura variando entre 120-130° C. (Esquema 3) (KOCHKANYAN et al., 1978).

Esquema 3 - Obtenção da imidazolidina-2,4-diona a partir da (a) glicina e da (b) uréia, na presença de (c) ácido sulfúrico.



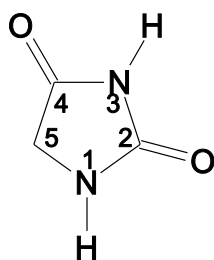
Fonte: KOCHKANYAN et al. (1978).

3.3.1 Imidazolidinas substituídas

As imidazolidina-2,4-dionas são consideradas ácidos fracos onde a principal contribuição à acidez é devido ao grupamento NH na posição 3 do anel

(Figura 18), que é influenciada pelos dois grupamentos carboxílicos (eletro-atrator) adjacentes. Nesta posição, elas podem ser alquiladas com haletos de alquila em solventes próticos ou apróticos, além de outros agentes alquilantes como o dimetil sulfato e diazometano (OLIVEIRA, 2008b).

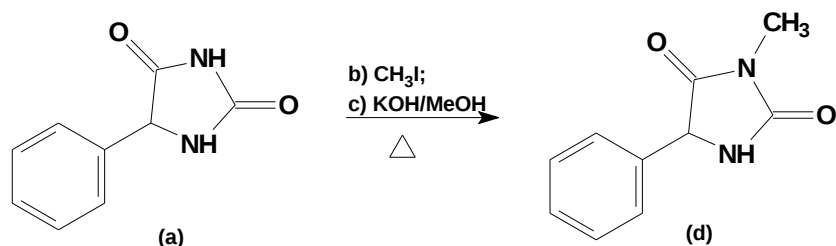
Figura 18 - Anel imidazolidínico e seus sítios ativos.



O grupo metileno da posição 5 do anel imidazolidínico é bastante reativo e foi relatado pela primeira vez por Wheeler e Hoffman em 1911 (*apud* OLIVEIRA, 2008 a). Posteriormente, em 1952, Phillips e Murphy (*apud* OLIVEIRA, 2008 b) explicaram quais os fatores que poderiam influenciar essa reatividade do metileno: (i) a facilidade da carbonila na posição 2 a ataques nucleofílicos por conta do efeito eletrônico e de ressonância; (ii) a força da base; (iii) as condições reacionais e (iv) os fatores estéricos. Essa reatividade é diminuída na presença de grupos doadores de elétrons, enquanto que grupos retiradores de elétrons causam um aumento na reatividade devido à ampliação do caráter positivo da carbonila.

Nas posições N-1 e N-3 são possíveis obter imidazolidinas substituídas, porém com certas limitações. Entretanto, Pinner obteve derivados de imidazolidina-2,4-dionas alquiladas na posição N-3 pelo tratamento com haletos de alquila em solução alcalina, onde com o aquecimento da 5-Fenil-imidazolidina-2,4-diona (a) com um equivalente de iodeto de metila (b) em solução de hidróxido de potássio/metanol (c) o produto formado foi o 3-metil-5-fenil-imidazolidina-2,4-diona (d) (Esquema 4) (WARE, 1950).

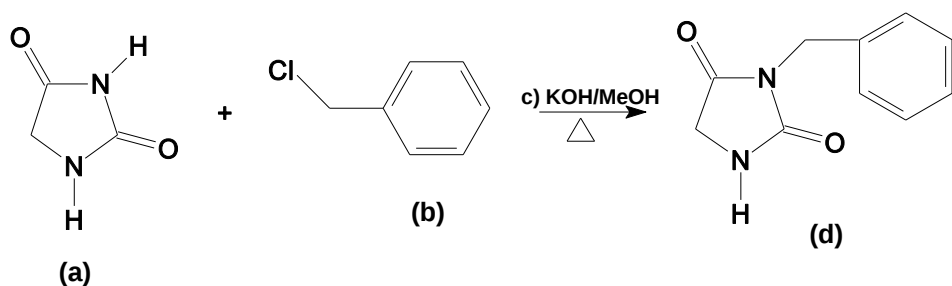
Esquema 4 - Obtenção da imidazolidina-2,4-diona substituída na posición N-3 (d) a partir da 5-fenil-imidazolidina-2,4-diona (a) na presença de iodeto de metila (b) em solução de hidróxido/metanol (c).



Fonte: WARE (1950).

Em 1991, Góes et al. sintetizaram a 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (d), a partir do cloreto de benzila (b) com a imidazoldina-2,4-diona (a) na presença de hidróxido de potássio/metanol (c) a quente (Esquema 5).

Esquema 5 - Obtenção da imidazolidina na posición N-3: imidazolidina-2,4-diona (a); cloreto de benzila (b); solução de hidróxido de potássio/metanol (KOH) (c); 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (d).

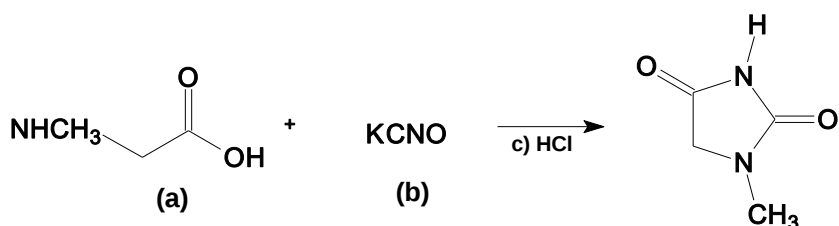


Fonte: GÓES et al. (1991).

Como átomo de hidrogênio na posición N-1 não é ácido o suficiente para permitir reações diretas de N-alkilação, as imidazolidinas N-alkiladas na posición N-1 foram obtidas a partir da ciclização de reagentes já substituídos nesta posición. Baumann e Hoppe-Sevler, em 1874, sintetizaram 1-metil-imidazolidina-

2,4-diona pela reacción da sarcosina com cianato de potássio na presenza de ácido clorídrico (Esquema 6) (WARE, 1950).

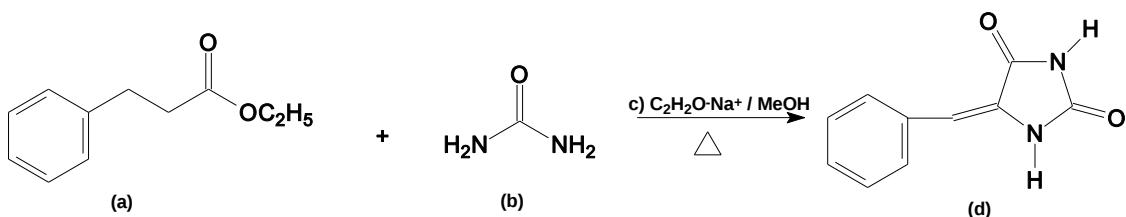
Esquema 6 - Obtenção da imidazolidina-2,4-diona substituída a partir da sarcosina (a) com cianato de potássio (b) na presença de ácido clorídrico (HCl) (c).



Fonte: WARE (1950).

Em 1900, Ruhemann e Stapleton (*apud* JOHNSON e BATES, 1915), obtiveram a primeira imidazolidina substituída na posição 5, através da reação do fenilpropionato de etila com uréia em solução alcoólica, na presença de etóxido de sódio sob aquecimento e obtiveram a 5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona (Esquema 7).

Esquema 7 - Obtenção da 5-benzilideno imidazolidina-2,4-diona (d): fenilpropionato de propila (a); uréia (b); etóxido de sódio/metanol ($C_2H_5ONa/MeOH$) (c).

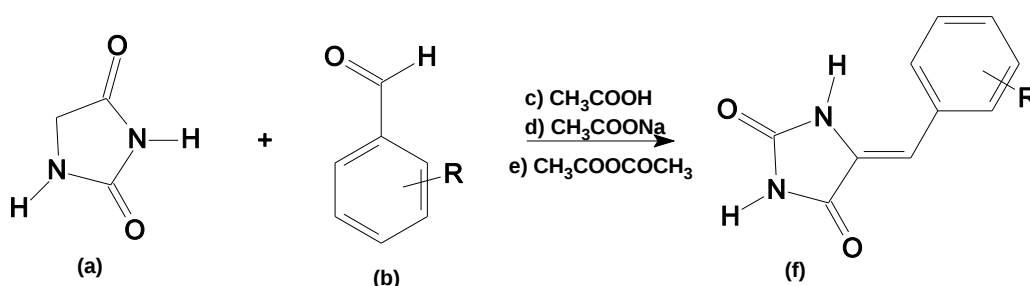


Fonte: RUHERMANN E STAPLETON (1900).

Em 1911, foi proposto por Wheeler e Hoffman, novo método para a obtenção de produtos condensados na posição 5 do anel, a partir da imidazolidina-2,4-diona com aldeídos aromáticos na presença de ácido acético

glacial, acetato de sódio e anidrido acético, abrindo assim perspectivas para a síntese de inúmeros derivados (Esquema 8) (WARE, 1950).

Esquema 8 – Obtenção da 5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona (f): imidazolidina-2,4-diona (a); benzaldeído substituído (b); ácido acético (c); acetato de sódio (d); anidrido acético (e).



Fonte: WARE (1950).

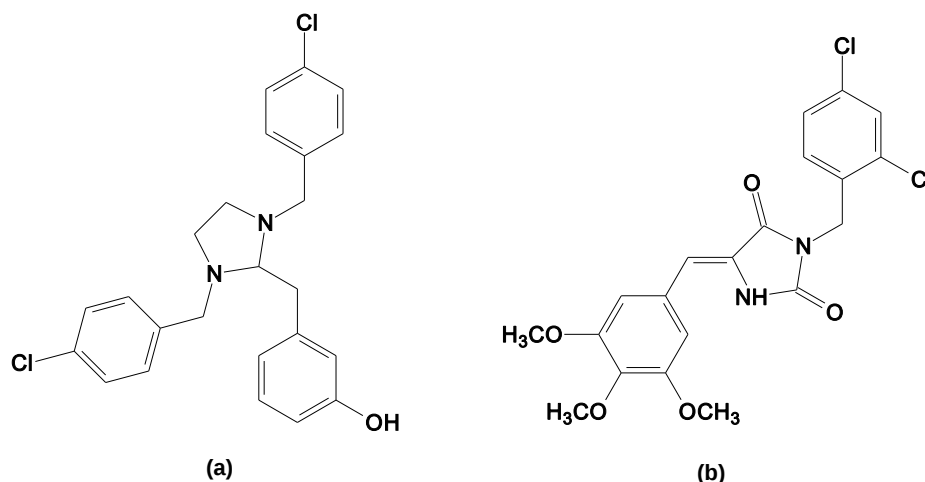
3.3.2 Atividades biológicas das Imidazolidinas

As atividades biológicas dos núcleos imidazolidínicos são diversificadas, tendo sido testadas para avaliar diferentes potenciais terapêuticos, descritos a seguir:

➤ **Atividade tripanocida**

Caterina et al, em 2008, testaram a atividade *in vitro* de alguns compostos imidazolidínicos frente à forma epimastigota do *T. cruzi*, o 1,3-di-(4-clorobenzil)-2-fenil-imidazolidina (Figura 19a), o qual apresentou um resultado de IC_{50} no valor de 5,5 μM menor que o do nifurtimox que foi de 7,7 μM . Posteriormente, Oliveira et al, testaram o derivado 3-(2,4-dicloro-benzil)-5-(3,4,5-trimetóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-221) (Figura 19b), e este apresentou o IC_{50} 5,0 μM (CATERINA et al., 2008; OLIVEIRA, 2011).

Figura 19 - 1,3-di-(4-clorobenzil)-2-(3-hidroxifenil)imidazolidina (a); 3-(2,4-dicloro-benzil)-5-(3,4,5-trimetóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-221)



Fonte: CATERINA et al.; OLIVEIRA (2008; 2011).

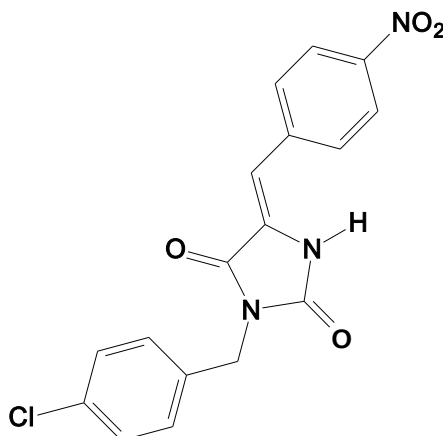
➤ Atividade Esquistossomocida

Em 2004, Oliveira et al avaliaram a atividade esquistossomocida do (Z)-3-benzil-5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona com diferentes substituintes na posição *para*, onde o derivado 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitrobenzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (Figura 20) apresentou melhor atividade *in vitro*, com mortalidade de 100 % dos vermes após 15 dias (OLIVEIRA, 2008 b).

➤ Atividade Antimicrobiana

O composto 3-benzil-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona, sintetizado e avaliado por Góes et al (1991) (Figura 20), apresentou atividade antifúngica, com a melhor ação observada frente à *Candida albicans* e *Neurospora crassa*; e antibacteriana, frente à *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (GÓES, 1991; LIMA et al., 1992), devido à presença do grupo nitro considerado parasitofrico.

Figura 20 - 3- (4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno).

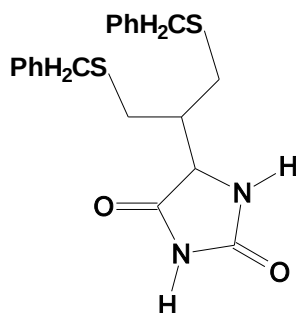


Fonte: OLIVEIRA, GÓES, LIMA et al., (2008b; 1991; 1992).

➤ Atividade AntiHIV

Comber et al, em 1992, sintetizaram e testaram novos compostos derivados das imidazolidina-2,4-dionas para inibir o HIV, tendo como controle positivo o AZT. O derivado foi o 5,5-bis[(fenilmetil)tio]imidazolidina-2,4-diona (Figura 21) que serviu como ponto de partida para posterior modificação de estrutura. As modificações foram feitas na posição 5 do anel imidazolidínico, quase todas essas manipulações resultaram em perda de atividade e nenhum composto era muito potente em uma dose não tóxica. Além do 5,5-bis[(fenilmetil)tio]imidazolidina-2,4-diona, outros três derivados apresentaram atividade quando avaliados em outra linha de células (COMBER et al., 1992).

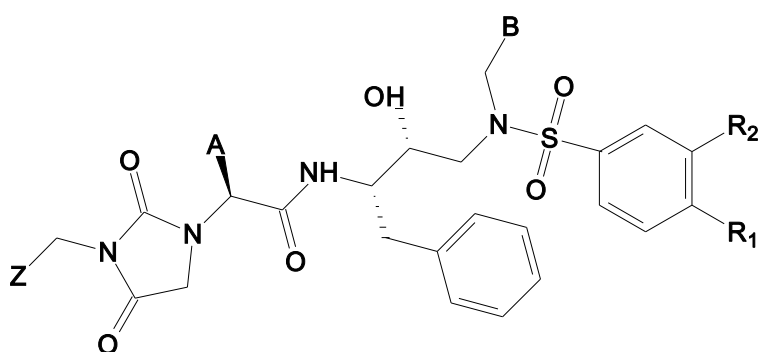
Figura 21 - 5,5-bis[(fenilmetil)tio]imidazolidina-2,4-diona.



Fonte: COMBER et al. (1992).

Em 2006 foram sintetizados novos derivados da série que contém 5-membros imidazolidina-2,4-diona (Figura 22) para inibidores da protease do HIV, onde algumas apresentaram excelente potência contra os dois tipos de vírus e uma estirpe mutante (A17) que é altamente resistente ao lopinavir (FLOSI et al., 2006).

Figura 22 - Composto que apresentou melhor resultado nos testes, onde: Z=2-MOM-4-tiazol; A=2-(S)bu; B=2-propil; R₁=OCH₃; R₂=H.

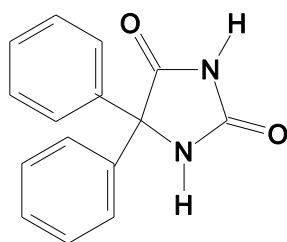


Fonte: FLOSI et al. (2006)

➤ Atividade Anticonvulsivante

Sintetizada em 1908 por Biltz, a 5,5-difenil-imidazolidina-2,4-diona (Figura 23) teve sua atividade anticonvulsivante determinada em 1937 por Merrit e Putnam. Ela atua na limitação da deflagração repetida de potenciais de ação provocada pela despolarização mantida dos neurônios, através do retardo da velocidade de recuperação dos canais de Na⁺ ativados por voltagem depois da inativação destes (GUERREIRO, 2006; HARDMAN et al., 2006).

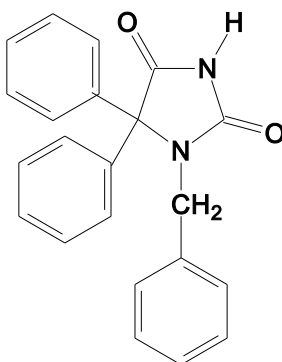
Figura 23 - Fenitoína: 5,5-difenil-imidazolidina-2,4-diona.



Fonte: HARDMAN et al. (2006).

Em 1989, Zejc et al sintetizaram novos compostos derivados da 5-difenil-imidazolidina-2,4-diona, onde o 1-benzil-5,5-difenil-3-imidazolidin-2,4-diona (Figura 24) apresentou-se como o melhor resultado para efeitos anticonvulsivantes e antidepressivos (ZEJC et al., 1989).

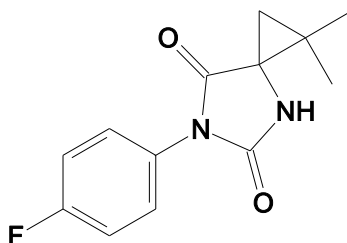
Figura 24 - 1-Benzil-5,5-difenil-3-imidazolidin-2,4-diona.



Fonte: ZEJC et al. (1989).

Zhu et al, em 2008, também comprovaram que alguns compostos imidazolidínicos apresentam resultados satisfatórios frente a mesma atividade, dentre os quais se destacou o 5-ciclopropanospiro-4-flúorfenil-imidazolidina-2,4-diona (Figura 25) (ZHU et al., 2008).

Figura 25 - 5-ciclopropanospiro-4-flúorfenil-imidazolidina-2,4-diona.

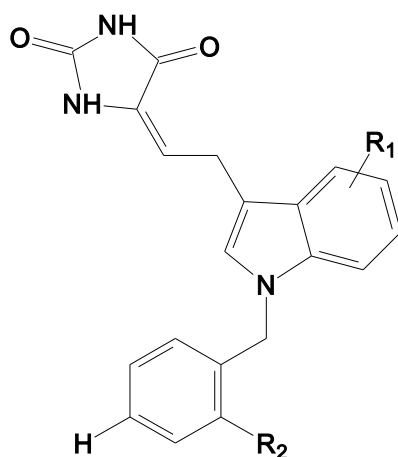


Fonte: ZHU et al. (2008)

➤ **Atividade Antitumoral**

Novos derivados da série imidazolidina-2,4-diona foram sintetizados e avaliados quanto à sua anti-proliferativa contra o câncer de mama e de pulmão de células em cultura. Vários análogos dos compostos que contêm um núcleo N-benzilindol ligado ao anel imidazolidínico na posição 5 apresentaram potencial atividade anticancerígena (Figura 26) (REDDY et al., 2010).

Figura 26 – Derivados imidazolidínicos com melhor atividade frente às células cancerígenas de mama e pulmão.



R₁: -CH₃; Br

R₂: Br; H

Fonte: REDDY et al. (2010).

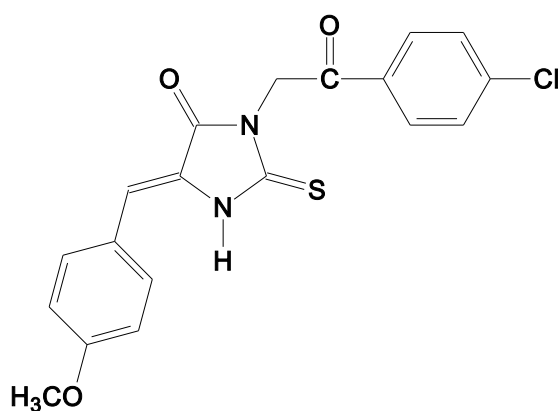
3.3.3 Contribuições Científicas do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF/UFPE)

No Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF/UFPE) são desenvolvidas novas moléculas com o objetivo de se tornarem, em sua maioria, candidatas a fármacos através da pesquisa no campo da Química Medicinal. Assim, há alguns trabalhos publicados na literatura das imidazolidinas frente ao T.

cruzi, além de uma patente, intensificando ainda mais a importância desse grupo farmacológico de grande aplicabilidade biológica e da seriedade do LPSF.

Em 2010, Gomes avaliou a atividade *in vitro* de alguns derivados imidazolidínicos, dentre os quais o 3-(4-clorofenil)-5-(4-metoxibenzilideno)-2-tioxi-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-25) (Figura 27) apresentou uma maior citotoxicidade, no valor de 50µg/mL, quando comparado com o fármaco benzonidazol.

Figura 27 - 3-(4-clorofenil)-5-(4-metoxibenzilideno)-2-tioxi-imidazolidin-4-diona.



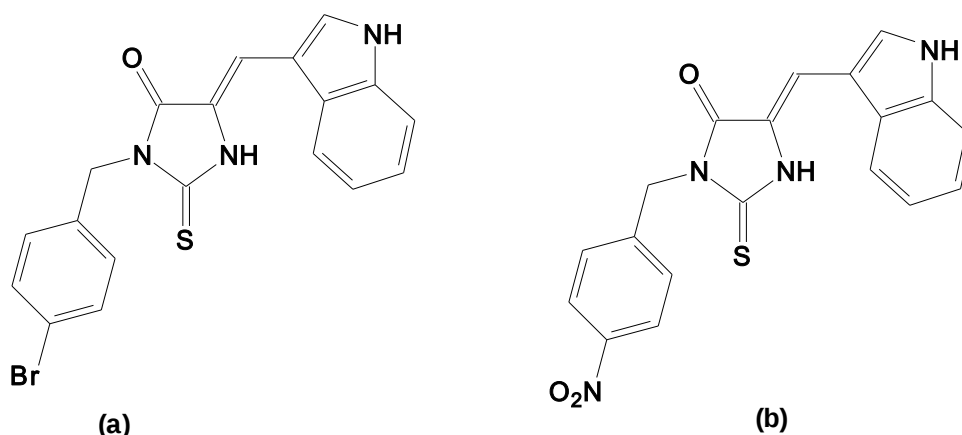
Fonte: GOMES (2010).

Posteriormente, Gomes et al (2012) avaliaram dois novos compostos frente a atividade tripanocida, 3-(4-Bromo-benzil)-5-(1-*H*-Indol-3-il-metileno)-2-tioxi-imidazolidina-4-ona (LPSF/NN-52) (Figura 28a) e 5-(1-*H*-Indol-3-il-metileno)-3-(4-nitro-benzil)-2-tioxi-imidazolidina-4-ona (LPSF/NN-100) (Figura 28b), no presente estudo, investigou-se as alterações morfológicas induzidas dos derivados imidazolidínicos sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* através de análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica. Os resultados indicam que o efeito da o tratamento com derivados de imidazolidina está associado disfunção mitocondrial, levando à morte do parasita.

O mecanismo de ação do derivado LPSF/NN-100 em *T. cruzi* pode ser semelhante ao nifurtimox, envolvendo a geração de radicais nitro e a produção de anion superóxido e de peróxido de hidrogênio (MAYA et al. 2007). No entanto, os derivados apresentaram uma bioatividade relevante contra as formas

tripomastigotas sem causar grandes danos a esplenócitos de camundongos. Assim, é possível que estes novos derivados imidazolidínicos sejam futuros candidatos como fármaco anti *T. cruzi* (GOMES et al, 2012).

Figura 28 - 3-(4-Bromobenzil)-5-(1-*H*-indol-3-il-metileno)-2-tioxi-imidazolidina-4-ona (LPSF/NN-52) (a); 5-(1-*H*-indol-3-il-metileno)-3-(4-nitrobenzil)-2-tioxi-imidazolidina-4-ona (LPSF/NN-100) (b).



Fonte: GOMES et al. (2012).

O composto o 3-(4-Nitro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-2-tioxi-imidazolidina-4-ona (LPSF/NN-97) (Figura 29a) na concentrao maior que 1 µg/mL apresentou inibio no valor de 29%, muito maior que o LPSF/NN-100 na mesma concentrao que foi de 0.49%. J o composto 3-(4-Bromo-benzil)-5-(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-2-tioxi-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-79) (Figura 29b) no apresentou inibio numa concentrao maior que 100 µg/mL.

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Reagentes e solventes utilizados

Os seguintes reagentes e solventes foram utilizados para obtenção dos compostos: cloreto de 3-cloro-benzil, cloreto de 2-bromo-benzil, cloreto de 3-bromo-benzil, 2-bromo-benzaldeído, 2-flúor-benzaldeído, 4-bromo-benzaldeído, 3-cloro-benzaldeído, 2,4-dicloro-benzaldeído, 2,4,6-Trimetóxi-benzaldeído, morfolina, metóxido de sódio, etanol absoluto, acetato de etila, *n*-hexano, dimetilformamida (DMF). Para todas as sínteses não foi realizado nenhum procedimento prévio de purificação dos reagentes, todos são de procedência da Sigma-Aldrich, Vetec ou Acros, obedecendo às especificações para PA ou PS.

4.1.2 Equipamentos utilizados

Para elucidação estrutural dos compostos sintetizados utilizamos, na espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo IFS66, em pastilhas de KBr de 1 % e 2 %, com bandas de absorção expressas em cm^{-1} . Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN^1H) foram realizados em espectrofotômetro Varian, modelo Unity plus-300 e Varian (Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE).

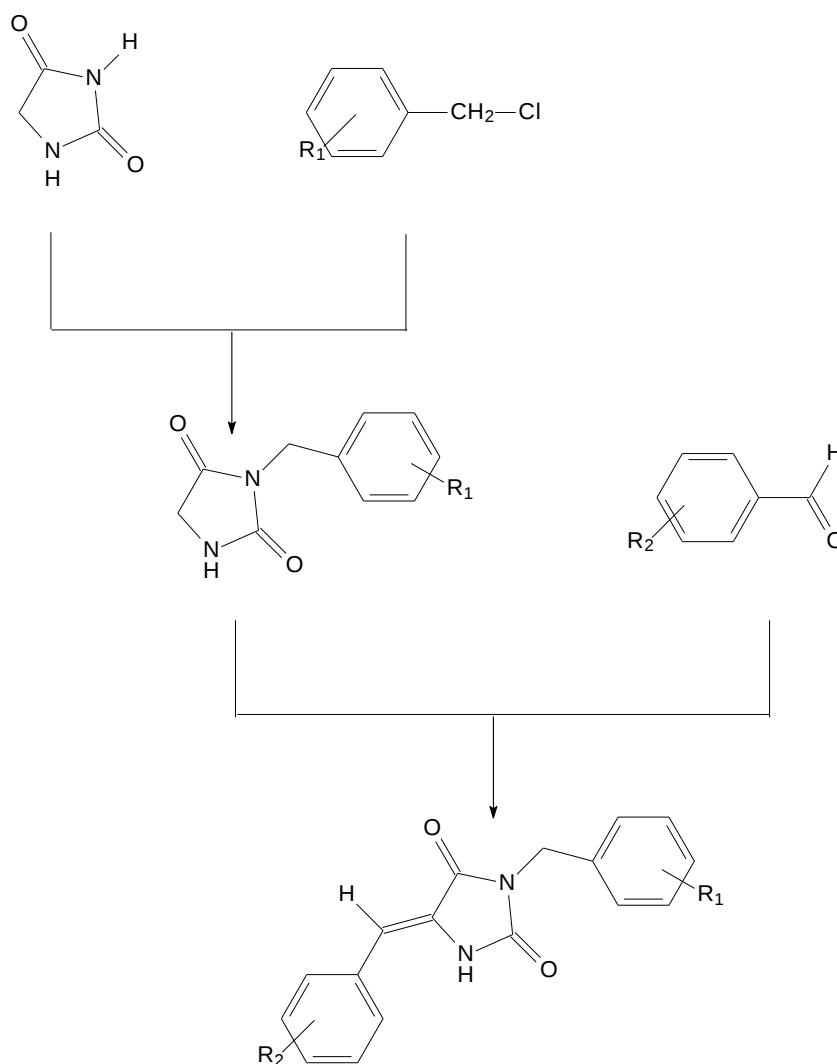
A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica gel 60 F_{254} Merck, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm) ou através de vapores de iodo. Na cromatografia em coluna sob pressão,

a sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh) foi utilizada como adsorvente. Os pontos de fusão (PF) foram determinados em aparelho Quimis, modelo Q.340.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS – PARTE QUÍMICA

As sínteses dos derivados imidazolidínicos foram realizadas de acordo com a via linear, onde o intermediário obtido reagiu posteriormente com benzaldeído, permitindo assim a síntese dos novos derivados imidazolidínicos substituídos nas posições 3 e 5 (Esquema 9).

Esquema 9 – Síntese de obtenção dos derivados imidazolidínicos 3,5-dissubstituídos



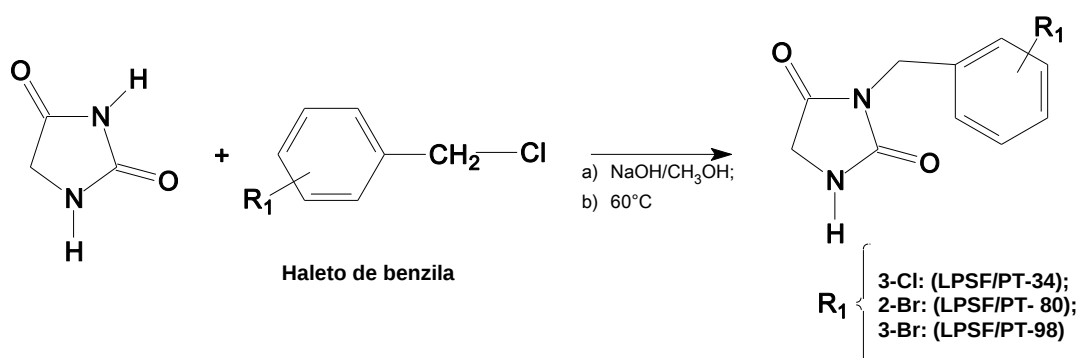
R₁ = 3-Cl; 2-Br; 3-Br

R₂ = 2-Br, 2-F, 4-Br, 3-Cl, 2,4-Cl, 2,4,6-OCH₃

4.2.1 Síntese dos derivados 3-benzil-imidazolidina-2,4-dionas (LPSF-PT)

Em um balão de fundo redondo foram adicionadas quantidades equimolares de imidazolidina-2,4-diona, haletos de benzila e hidróxido de sódio, NaOH, em presença de metanol, CH₃OH. O sistema foi aquecido a 60°C, durante 3 dias levando a formação da 3-(3-cloro-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-34), 3-(2-bromo-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-80), 3-(3-bromo-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-98) (Esquema 10).

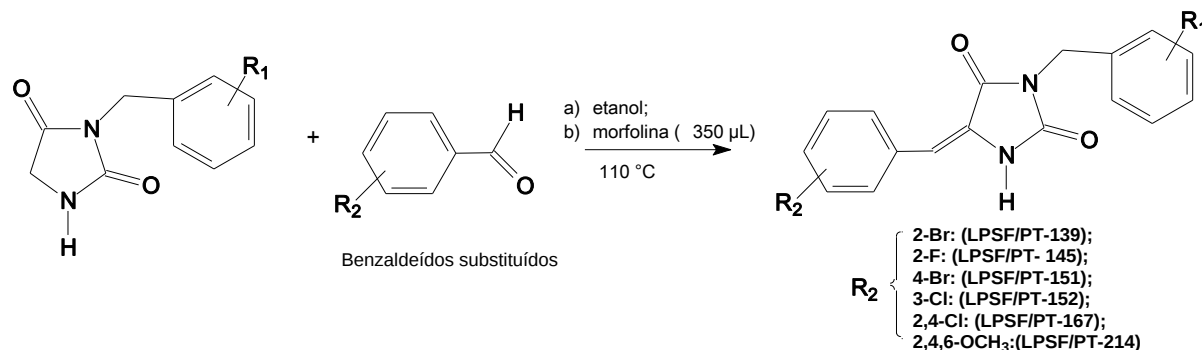
Esquema 10 - Obtenção dos derivados 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF-PT).



4.2.2 Síntese das 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4-dionas (LPSF-PT)

Quantidades equimolares da 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT) e benzaldeídos substituídos dissolvidos em etanol, em presença de 350 µL morfolina como catalisador, foi aquecida durante 4 horas, sob refluxo (Esquema 11). O produto obtido foi filtrado ainda quente e lavado com água destilada.

Esquema 11 - Obtenção dos derivados 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF-PT)



4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS – PARTE BIOLÓGICA

Com o intuito de avaliar a ação dos derivados imidazolidínicos contra as formas tripomastigotas e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, foram realizados os ensaios de citotoxicidade e atividade antiparasitária. Para a realização desses testes utilizou-se pool de pelo menos 5 camundongos isogênicos, machos BALB/c (6 a 8 semanas de idade) que foram criados no biotério da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) e mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, em Recife, Brasil. Todos os camundongos foram eutanasiados e tratados com a Comissão de Experiências com Animais de Laboratório (Ministério da Saúde, Brasil, 0266/05) da Fundação Oswaldo Cruz.

4.3.1 Obtenção de células esplênicas

A obtenção das células esplênicas se deu de acordo com Pereira e colaboradores (2004). Após a eutanásia do animal em câmara de CO₂, o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e colocado em tubo Falcon contendo meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 sem soro

fetal bovino (SBF) (incompleto). No fluxo vertical, cada baço foi transferido para placa de Petri onde foi macerado. As suspensões celulares obtidas foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 mL de meio RPMI 1640 incompleto por baço, centrifugadas a 4°C, 200 x g durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, adiciona-se solução para lise de hemácias. O sobrenadante, sem conter os debris celulares, foi coletado e centrifugado a 4°C, 200 x g durante 5 minutos. O sedimento (contendo as células) foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 completo. Uma alíquota de cada suspensão celular foi separada. Em seguida, diluída em azul de trypan para ser quantificada em câmara de Neubauer, assim como verificar a viabilidade celular.

4.3.2 Avaliação da Citotoxicidade dos Compostos em Células de Camundongos Isogênicos

Células esplênicas (6×10^5 células/poço), obtidas de acordo com o item anterior, foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura RPMI 1640 completo. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em seis concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg/ml) e de timidina tritiada (1 µCi/poço) durante 24 h em estufa de CO₂ (5 %) a 37°C. Para o controle foram utilizadas células tratadas com saponina (0,05 %), células tratadas com DMSO (1 %) e sem tratamento, sendo adicionada a todos os controles timidina tritiada (1 µCi/poço). Cada composto foi testado em duplicata. 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 (β-matrix 9600, Packard). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada ([³H]TdR) nos poços com as moléculas em relação aos poços não tratados. As concentrações atóxicas foram definidas como aquelas que causaram uma redução de 3H-timidina abaixo de 30% em relação aos controles.

4.3.3 Avaliação da Atividade Tripanocida

Para determinar o efeito anti-proliferativo ou a IC_{50} , para formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), foram cultivados a 26°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10 % de SBF (Soro fetal bovino), 1 % hemina. Os parasitos (10^6 /ml) cresceram em culturas axênicas, na fase log de crescimento. Para determinar o IC_{50} , culturas de epimastigotas, na presença de diferentes concentrações dos compostos foram avaliadas após 11 dias. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y) foram obtidas de sobrenadantes de cultura de linhagem de células Vero a 37 °C e colocadas em placas de 96 poços (4×10^5) em meio RPMI 1640 completo. Após 24 h e 11 dias, parasitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer. A porcentagem de inibição foi calculada em relação às culturas não tratadas. O cálculo da IC_{50} foi determinado através de regressão linear simples utilizando o software Prisma 4 Graphpad.

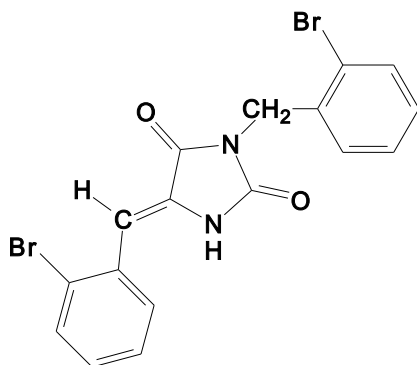
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção dos produtos LPSF/PT foi realizada através de duas etapas reacionais, a primeira ocorreu a obtenção dos compostos intermediários derivados da imidazolina-2,4-diona por meio de uma *N*-alquilação; a segunda, é seguida de uma condensação na posição 5 do anel imidazolidinico.

Foram obtidos seis compostos: 3-(2-bromo-benzil)-5-(2-bromo-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-139); 3-(2-bromo-benzil)-5-(2-fluor-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-145); 3-(3-cloro-benzil)-5-(4-bromo-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-151); 3-(3-cloro-benzil)-5-(3-cloro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-152); 3-(3-cloro-benzil)-5-(2,4-dicloro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-167); 3-(3-bromo-benzil)-5-(2,4,6-trimetóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-214). A seguir, os dados físicos-químicos e espectroscópicos dos compostos:

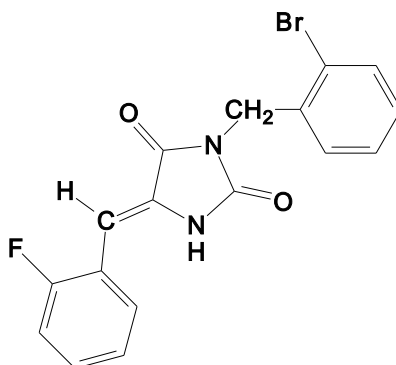
3-(2-bromo-benzil)-5-(2-bromo-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-139)



$C_{17}H_{12}N_3O_2Br_2$, M.M. 435,8 g/mol, sólido branco, P.F.: 220 °C; Rf. 0,58 *n*-hex/AcOEt 7:3, Rd: 74,39 %. IV (KBr 1 %, $\square\square\square cm^{-1}$) NH: 3212, C=O: 1766 e 1726, C=C: 1663, RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.08 (s, 1H, NH), 7.73 (t, 1H, ArH, J = 8.2 Hz), 7.66 (d, 1H, ArH, J = 8 Hz), 7.45 (t, 1H, ArH, J = 7.6 Hz), 7.37 (t, 1H, ArH, J = 7.6 Hz), 7.29 (t, 1H, ArH, J = 8.4 Hz), 7.26 (d, 1H, ArH, J = 7.99 Hz), 7.24 (d, 1H, ArH, J = 8 Hz), 7.21 (d, 1H, ArH, J = 7.99 Hz), 6.67 (s, 1H, -CH=), 4.71 (s, 2H, NCH $_2$ -). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ = 163.6; 154.7; 134.6; 132.8;

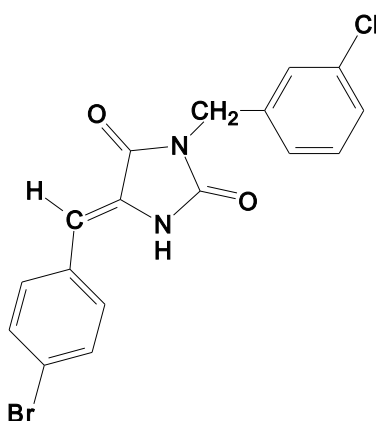
132.6; 132.3; 130.38; 130.30; 129.4; 128.7; 128.1; 128.00; 128.00; 124.1; 121.6;
107.3; 41.8.

**3-(2-bromo-benzil)-5-(2-fluor-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona
(LPSF/PT-145)**



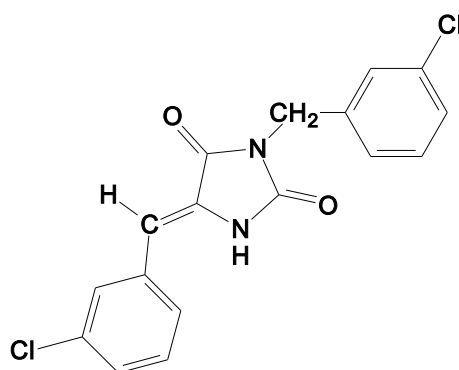
C₁₇H₁₂N₃O₂FBr, M.M. 374,9 g/mol, sólido branco, P.F.: 203 °C; Rf: 0,58 *n*-hex/AcOEt 7:3, Rd. 75,82 %. IV (KBr 1 %, $\square\square\square\text{cm}^{-1}$): NH: 3213, C=O: 1770 e 1720, C=C: 1665. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 10,94 (s, 1H, NH), 7.74 (t, 1H, ArH, J = 7.6 Hz), 7.53 (d, 1H, ArH, J = 8.39 Hz), 7.54 (d, 1H, ArH, J = 7.53 Hz), 7.40 (t, 1H, ArH, J = 7.40 Hz), 7.28-7.23 (m, 4H, ArH), 6,57 (s, 1H, =CH), 4,64 (s, 2H, NCH₂) RMN ¹³C (75 MHz, DMSO): δ = 163,7, 161.1, 158.6, 154.6, 135.7, 115.4, 124.9, 100.8, 40.8.

**3-(3-cloro-benzil)-5-(4-bromo-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona
(LPSF/PT-151)**



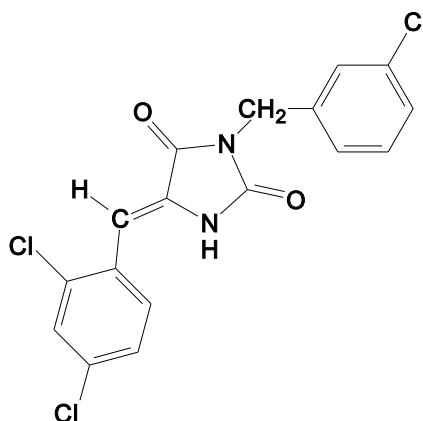
$C_{17}H_{12}N_2O_2ClBr$, M.M. 391 g/mol, sólido branco, P.F.: 207 °C, R.f.: 0,6 *n*-hex/
AcOEt 7:3, Rd. 47,45 %. IV (KBr 1 %, $\square\square\square cm^{-1}$): NH: 3312, C=O: 1768 e 1711 ,
C=C: 1658. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 11.02 (s, 1H, NH), 7.56 (d, 2H, ArH, J
= 8.39 Hz), 7.42 (d, 2H, ArH, J = 8,3 Hz), 7.25-7.3 (m, 3H, ArH), 7.30 (s, 1H, ArH),
6,67 (s, 1H, =CH), 4,74 (s, 2H, NCH_2). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ = 163.8,
154.8, 138.8, 133.1, 132.0, 131.6, 131.4, 130.5, 127.5, 127.3, 127.1, 126.0, 121.9,
108.7, 41,8.

3-(3-cloro-benzil)-5-(3-cloro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona
(LPSF/PT-152)



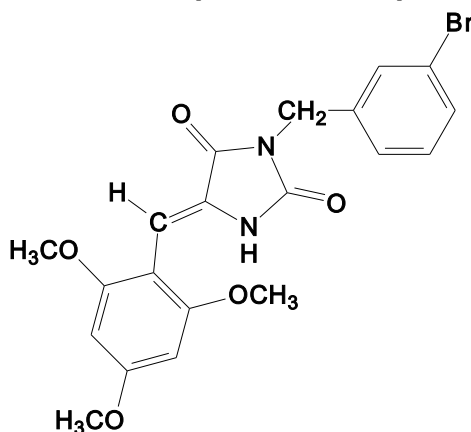
$C_{17}H_{12}N_2O_2Cl_2$, M.M. 346 g/mol; sólido branco, P.F.: 218 °C; R.f.: 0,62 *n*-hex/
AcOEt 7:3, Rd. 51,85 %. IV (KBr 1 %, $\square\square\square cm^{-1}$): NH: 3240, C=O: 1769 e 1712,
C=C: 1660. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.09 (s, 1H, NH), 6.68 (s, 1H, =CH),
4.75 (s, 2H, NCH_2), 7.41 (s, 1H, ArH), 7.22-7.38 (m, 6H, ArH), 7.35 (d, 1H, ArH, J
= 7.59 Hz), 7.25 (s, 1H, ArH). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ = 166.8, 163.8,
154.7, 138.8, 134.8, 133.6, 133.1, 130.5, 130.4, 128.7, 128.3, 128.2, 127.5, 127.3,
126.1, 108.3, 41,7.

**3-(3-cloro-benzil)-5-(2,4-dicloro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona
(LPSF/PT-167)**



$C_{17}H_{11}N_2O_2Cl_3$, M.M. 380,5 g/mol, sólido branco; P.F.: 147 °C, R.f.: 0,76 *n*-hex/
AcOEt 7:3, Rd: 64,87%. IV (ν cm^{-1} KBr): NH: 3213, C=O: 1765 e 1729, C=C 1673.
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.5 (s, 1H, NH), 7.494 (s, 1H, ArH), 7.49 (s, 1H,
ArH), 7.41-7.39 (m, 3H, ArH), 7,26 (d, 1H, ArH, J = 6.79 Hz), 6.93 (s, 1H, =CH),
4.72 (s, 2H, NCH_2). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ = 162.7, 154.9, 137.3, 135.5,
135.4, 134.7, 130.3, 130.0, 129.96, 129.7, 128.6, 128.4, 127.9, 127.6, 126.7,
107.5, 41.9.

**3-(3-bromo-benzil)-5-(2,4,6-trimetóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona
(LPSF/PT-214)**



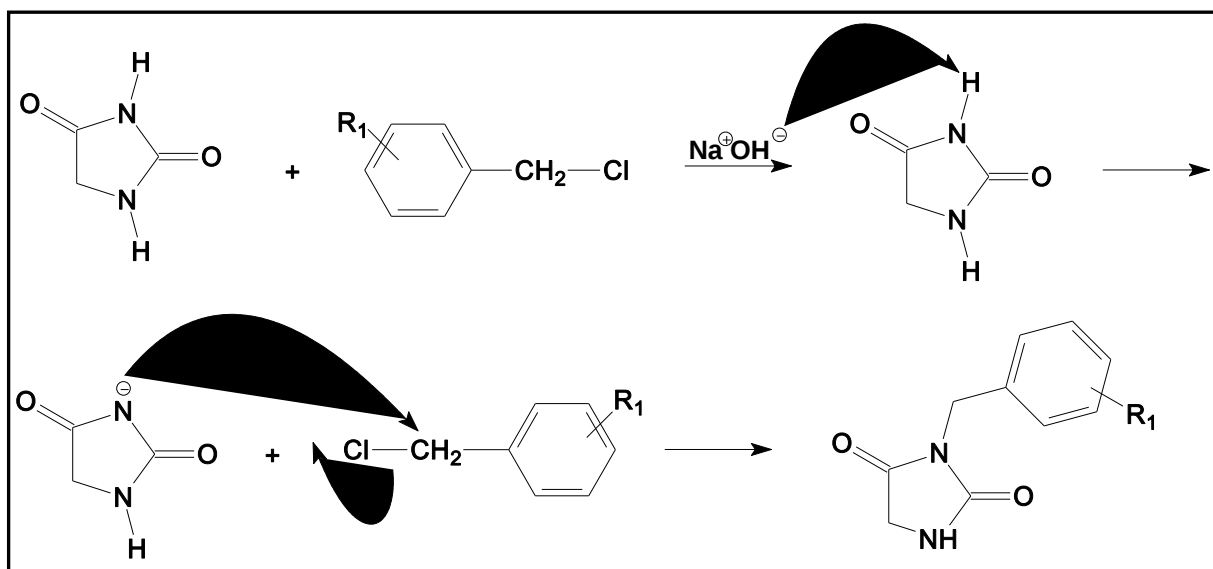
$C_{20}H_{19}N_2O_5Br$; MM= 447 g/mol; P.F.: 120 °C; R.f.: 0,54 *n*-hex/AcOEt 7:3. Rd.: 98 %.

IV (v cm^{-1} KBr): NH: 3224, C=O: 1757, C=O: 1714, C=C 1669. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): 6.16 (s, 1H, =CH), 4.71 (s, 2H, NCH_2), 7.58 (s, 2H, ArH), 7.00 (s, 1H, ArH), 7.18 (t, 1H, ArH, $J=7,79$ Hz), 7.35-7.42 (dd, 2H, ArH, $J=8,0$ Hz), 3.85 (s, 3H, $-CH_3$), 3.88 (s, 6H, $-CH_3$). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ = 162.8, 159.2, 153.1, 138.3, 131.5, 130.9, 130.1, 127.2, 124.3, 122.5, 104.6, 104.4, 91.2, 56.2, 55.4, 41.4.

5.1 Mecanismo reacional dos derivados 3-benzil-imidazolidina-2,4-dionas (LPSF-PT)

A obtenção dos derivados 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona inicia-se com a remoção do átomo de hidrogênio da imidazolidina, na posição 3, em solução metanólica. Este hidrogênio apresenta um caráter ácido que favorece a sua retirada pela ação da base, NaOH, formando um composto intermediário (sal), que por sua vez é tratado com o cloreto de benzila substituído, havendo, assim, a formação do composto LPSF-PT (Esquema 12).

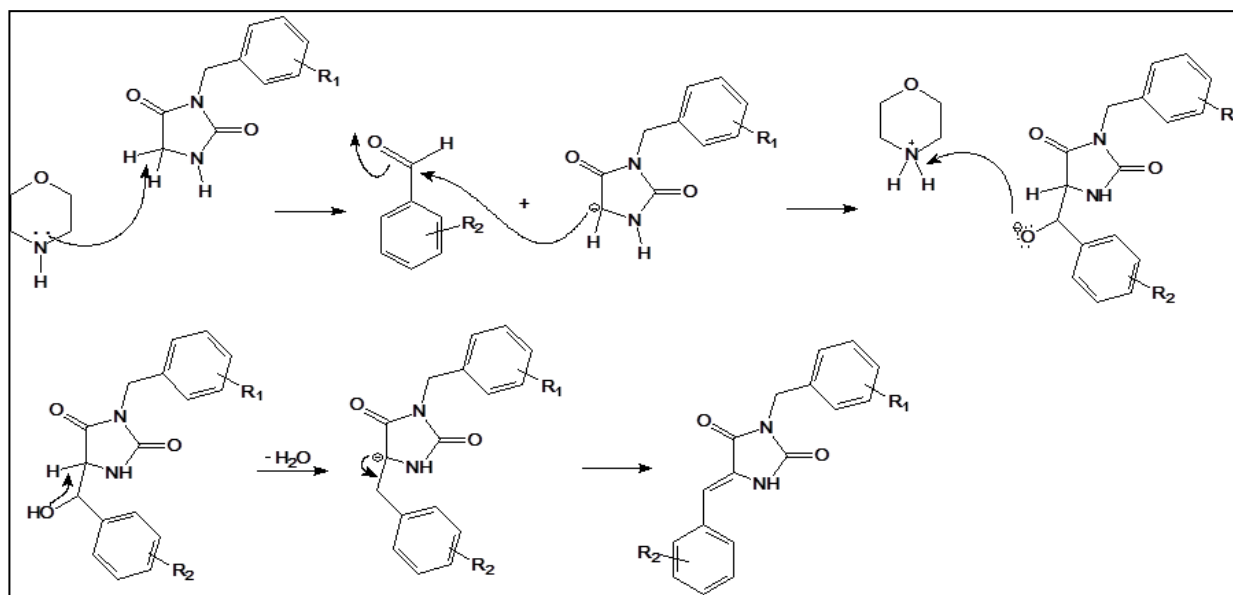
Esquema 12 - Mecanismo reacional de *N*-alquilação.



5.1.2 Mecanismo reacional das 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4-dionas (LPSF-PT)

O mecanismo reacional para a obtenção dos compostos finais baseia-se em uma reação de condensação de Knoevenagel. A formação dos produtos finais inicia-se com a remoção do próton (H) ácido do carbono 5 da imidazolidina pela morfolina que atua como base. Em seguida, o carbânion formado ataca o carbono do aldeído, que possui carga parcial positiva, conduzindo, através de uma reação intramolecular, à formação do derivado imidazolidínicos 3,5-dissubstituídos (Esquema 13).

Esquema 13 - Mecanismo reacional da condensação de Knoevenagel aos derivados imidazolidínicos 3,5-dissubstituídos.



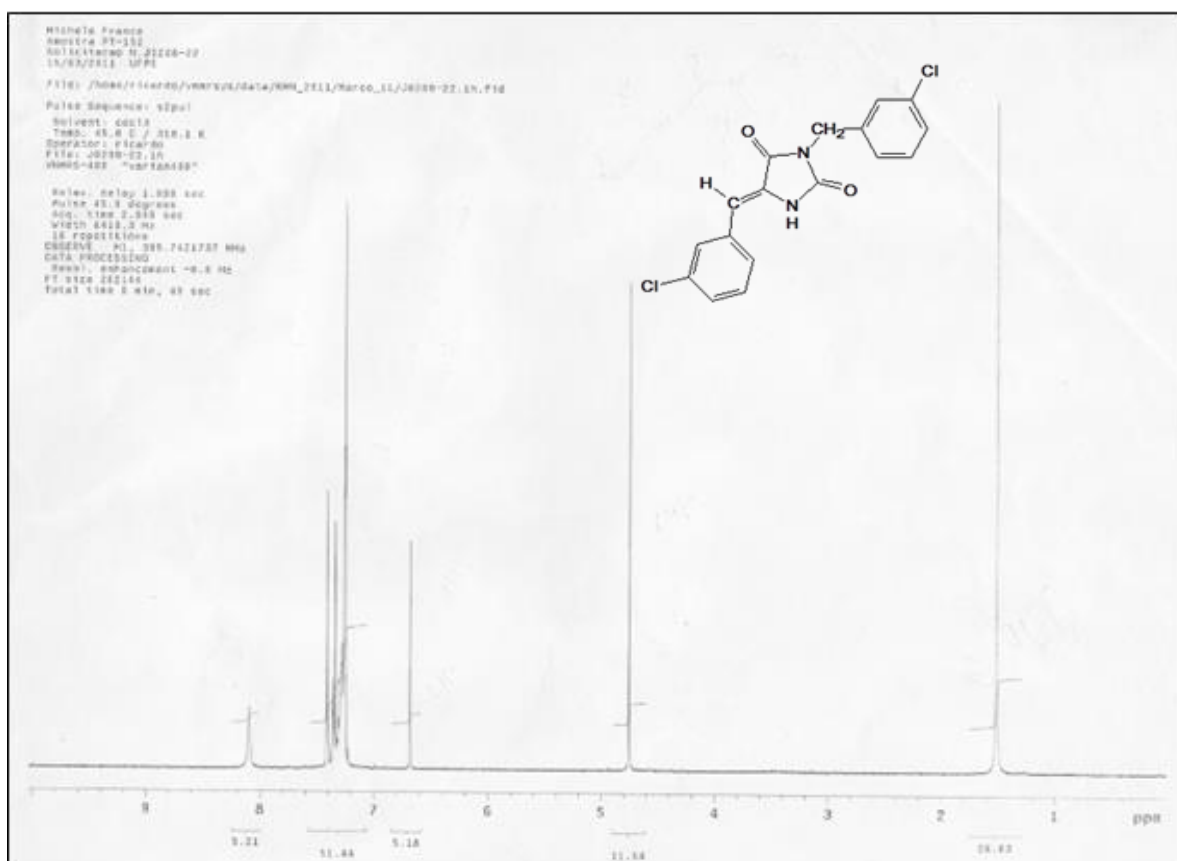
5.1.3 Caracterização estrutural dos compostos imidazolidínicos

Os espectros de RMN ^1H dos derivados imidazolidínicos 3,5-dissubstituídos apresentam sinais característicos do próton presente no núcleo

imidazolidínico (NH), evidenciado como um singlete na região de 8 a 11 ppm. Os singletos encontrados nas faixas de deslocamento entre 6,16 – 6,93 e 4,71 – 4,75 ppm, são característicos do =CH e CH₂, respectivamente. Em todos os espectros analisados observaram-se sinais de singlete (s), duplete (d), tripleto (t), duplo duplete (dd) e multiplete (m) na região característica de grupamentos aromáticos (7,1-7,7 ppm).

A figura 29 mostra o espectro do composto LPSF-PT 152, onde observa um singlete na região de δ 4,75 ppm referente aos hidrogênios do metileno (-CH₂-); na região de δ 6,68 ppm corresponde ao singlete do metino (-CH=); na região de δ 8,09 ppm observa-se um singlete referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio (NH), em torno de na região que varia de δ 7,22 a 7,38 ppm os sinais são referentes aos hidrogênios aromáticos. Os resultados estão em concordância com a estrutura proposta para o composto.

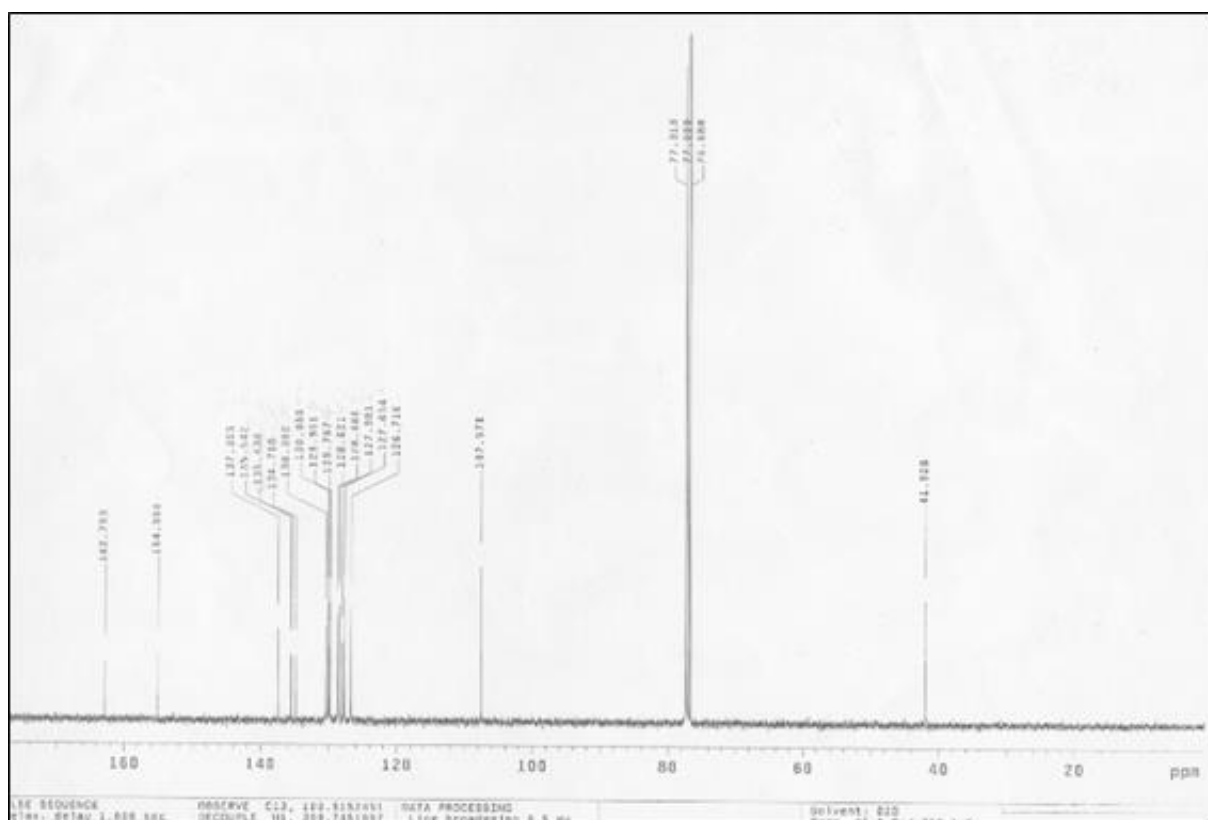
Figura 29 – Espectro de RMN ¹H do LPSF/PT-152



Os deslocamentos dos carbonos parcialmente positivos das carbonilas do anel imidazolidínico são evidenciados nos sinais entre 153 e 154 ppm e entre 163 a 164 ppm. Os deslocamentos dos carbonos aromáticos variam entre 115 e 130 ppm, devido à natureza dos substituintes aos quais estes encontram-se ligados.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 30) apresenta sinais na região próxima a δ 41.8 ppm referente ao carbonos do metileno, em δ 108.3 ppm o sinal corresponde ao carbono do metino, os sinais referente às carbonilas do carbono 2 e 4, respectivamente, encontram-se nas regiões δ 163.8 e 166.8 ppm, os demais sinais são representados nas regiões de 138.8 a 126.1 ppm.

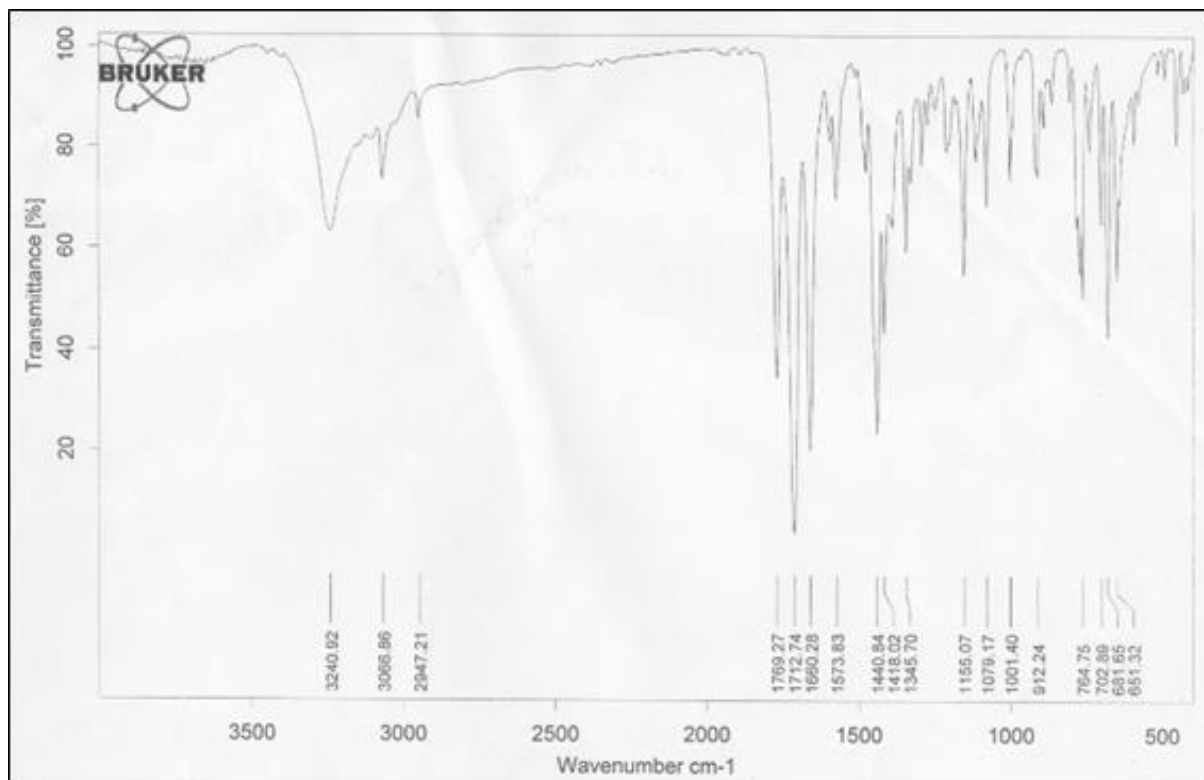
Figura 30 – Espectro de RMN ^{13}C do LPSF/PT-152



A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada como ferramenta adjunta na caracterização dos compostos sintetizados, por meio de grupos funcionais. Esses grupos originam bandas que ocorrem sempre na mesma região do espectro, independente da molécula em questão. Os derivados

imidazolidínicos apresentam bandas vibracionais características dos grupos funcionais N-H (3240 cm^{-1}) e C=O (1769 e 1712 cm^{-1}) além do sinal característico a funcionalidade C=C (1660 cm^{-1}) (Figura 31).

Figura 31 – Espectro de Infravermelho do LPSF/PT-152



5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS

Os seis compostos sintetizados foram avaliados contra as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* (cepas y) e os resultados foram expressos através dos valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$). A citotoxicidade foi expressa como a maior concentração atóxica testada em esplenócitos de camundongos BALB/c. Os fármacos utilizados como padrão foram o benzonidazol e nifurtimox.

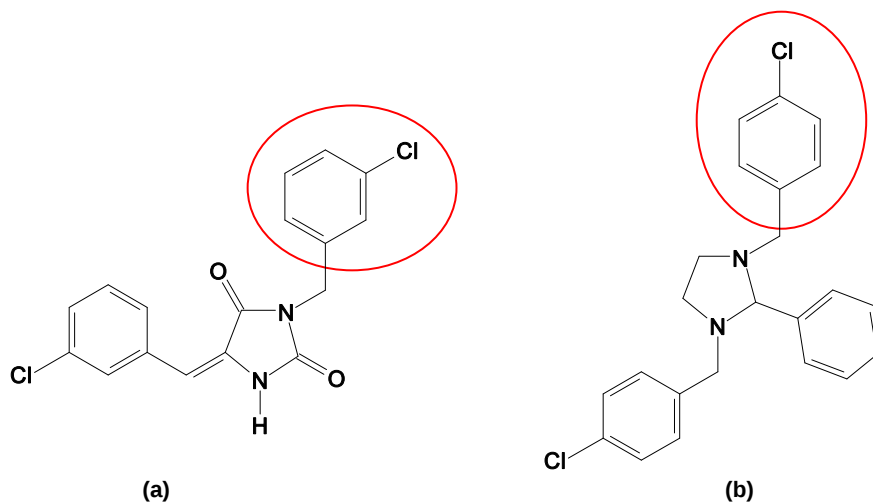
Os resultados da tabela 1 demonstram que entre os seis compostos testados *in vitro*, cinco apresentaram o mesmo valor para a citotoxicidade >100µg/ml, com exceção do derivado LPSF/PT-214, com maior concentração atóxica de 10µg/mL.

Tabela 1: Efeitos *in vitro* dos derivados imidazolidínicos (LPSF/PT) *Trypanosoma cruzi* cepa Y e Dm28c

Código	Tripomastigota (24h) IC ₅₀ (µg/mL)	Epimastigota (11 dias) IC ₅₀ (µg/mL)	Citotoxicidade
LPSF/PT-139	10.11	25.36	>100
LPSF/PT-145	21.71	2.11	>100
LPSF/PT-151	20.05	32.59	>100
LPSF/PT-152	1.26	27.24	>100
LPSF/PT-167	7.0	21.15	>100
LPSF/PT-214	7.3	2.89	10
Benzonidazol	1,63	12,7	25
Nifurtimox	0,79	1,64	1

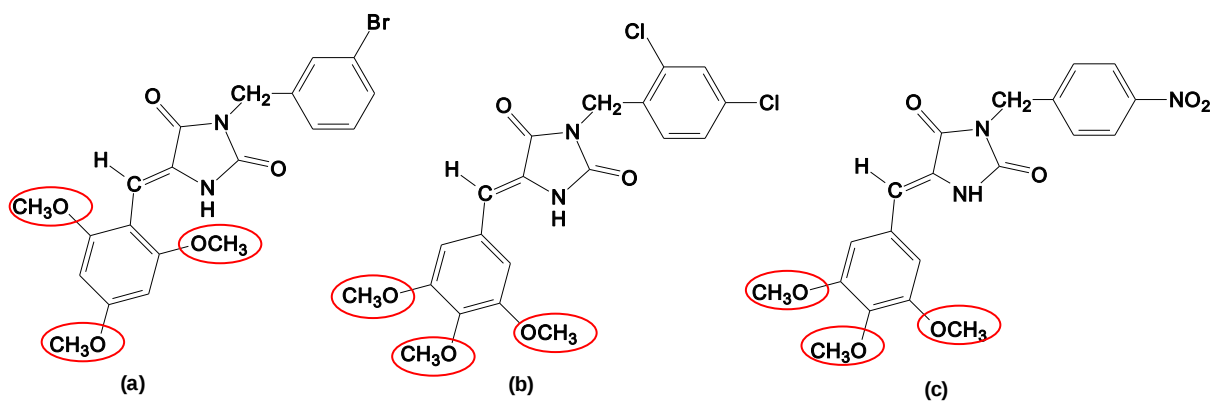
O derivado LPSF/PT-152 foi o que apresentou melhor atividade anti-*T. cruzi* nas suas concentrações atóxicas, com a IC₅₀ de 1.26 µg/mL para a forma tripomastigota quando comparada com o benzonidazol 1,63 µg/mL. Este possui em sua estrutura o radical 3-cloro no anel benzílico semelhante ao substituinte (4-cloro) utilizado por Caterina et al. (2008) (Figura 32), logo, sugere-se que a presença e posição desse grupo é um dos fatores que favorece o aumento na atividade tripanocida.

Figura 32 - 3-(3-cloro-benzil)-5-(3-cloro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-152)(a); 1,3-Di-(4-clorobenzil)-2-fenilimidazolidina (b).



Para as formas epimastigotas, os compostos LPSF/PT-145 e LPSF/PT-214, apresentaram um percentual de inibição nos valores de 2.11 µg/mL e 2.89 µg/mL respectivamente, menor que o benzonidazol 12,7 µg/mL. O derivado LPSF/PT 214 (Figura 33 a) apresenta o anel benzilidênico trissubstituído pelo radical metóxi semelhante aos 3-(4-nitro-benzil)-5-(3,4,5-metóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-17) (BARBOSA, 2010) e 3-(2,4-dicloro-benzil)-5-(3,4,5-trimetóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-221) (OLIVEIRA, 2011) (Figura 33 b) onde também foram observados um percentual de inibição considerável, diante desses resultados sugere que esses compostos sofrem uma influência na atividade tripanocida, devido ao grupamento metóxi. Porém, o derivado LPSF-214 apresentou o maior valor de citotoxicidade, 10 µg/mL, enquanto os outros derivados apresentaram valores superiores a 100 µg/mL.

Figura 33 - 3-(3-bromo-benzil)-5-(2,4,6-trimetóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-214) (a); -4-nitro-benzil)-5-(3,4,5-metóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-17) (b); 3-(2,4-dicloro-benzil)-5-(3,4,5-trimetóxi-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-221) (c)



CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Foram sintetizados seis novos derivados imidazolidínicos da série 3-benzil-5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT), os quais foram caracterizados por suas propriedades físico-químicas, métodos espectroscópicos (IV e RMN H^1 , C^{13});

Diante dos dados obtidos tais compostos foram analisados frente à atividade anti-*T. cruzi* (cepa Y), onde, o derivado LPSF/PT-152 obteve o melhor resultado frente às tripomastigotas, IC_{50} de 1.26 $\mu\text{g/mL}$ quando comparado com o benzonidazol 1.63 $\mu\text{g/mL}$;

Os derivados LPSF/PT-145 e LPSF/PT-214 apresentaram os melhores resultados frente às epimastigotas, IC_{50} de 2.11 $\mu\text{g/mL}$ e 2.89 $\mu\text{g/mL}$;

Entre os compostos testados *in vitro*, cinco apresentaram o mesmo valor para a citotoxicidade $>100\mu\text{g/mL}$, com exceção do derivado LPSF/PT-214, com maior concentração atóxica de 10 $\mu\text{g/mL}$;

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Sintetizar novos derivados imidazolidínicos;
- ✓ Estudar *in vitro* em sobrenadantes de cultura o potencial efeito imunomodulador do composto LPSF/PT-152 através da quantificação da produção de IFN- γ , IL-10 e Óxido Nítrico;
- ✓ Avaliar por citometria de fluxo a possível participação dos compostos LPSF/PT-145, LPSF/PT-152 e LPSF/PT-214 na indução de apoptose, apoptose tardia e necrose em esplenócitos de camundongos BALB/

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALARCÓN DE NOYA, B.; DIAZ-BELLO, B.; COLMENARES, C.; RUIZ-GUEVARA, R.; MAURIELLO, L.; ZAVALA-JASPE, R.; SUAREZ, J.A.; ABATE, T.; NARANJO, L.; PAIVA, M.; RIVAS, L.; CASTRO, J.; MÁRQUES, J.; MENDOZA, I.; ACQUATELLA, H.; TORRES, J.; NOYA, O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **Journal of Infectious Disease**, v. 201, n. 9, p. 1308-1315, 2010.

ALBUQUERQUE, J.F.C.; ROCHA FILHO, J.A.; BRANDÃO, S.S.F.; LIMA, M.C.A.; XIMENES, E.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; CHANTEGREL, J. PERRISSIN, M.; LUU-DUC, C. Synthesis and antimicrobial activity of substituted imidazolidinediones and thioxoimidazolidinones. **Il Farmaco**, v. 54, p. 77–82, 1999.

ALVES, C.R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; NOGUEIRA, N.F.; BOURGUINGNON, S.C.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P.; GONZALEZ, M.S. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 44-52, 2007.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug design, Development and Therapy**, v. 24, n. 4, p. 243-253, 2010.

ARAÚJO-JORGE, T. Opinião – doença e pobreza, desafios para o próximo governo. Correio Braziliense, 2011. **Resenha Eletrônica**. Disponível em: <http://www.fazenda.gov.br/resenhaeletronica/MostraMateria.asp?page=&cod=695501>

BARBOSA, A. F. P. **Descoberta de novos quimioterápicos para tratamento da Doença de Chagas**. Recife, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) -- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2010.

BASAPPA, C. S.; ANANDA KUMAR, S.; SWAMY, N.; SUGAHARA, K.; RANGAPPA, K. S. Anti-tumor and anti-angiogenic activity of novel hydantoin derivatives: Inhibition of VEGF secretion in liver metastatic osteosarcoma cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4928–4934, 2009.

BÉRENGER, J. M.; BLANCHET, D. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 733-736, 2007.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 655-81, 2011.

BRACK, K.; KERR, I.D.; BARRETT, K.T.; FUCHI, N.; DEBNATH, M.; ANG, K.; ENGEL, J.C.; MCKERROW, J.H.; DOYLE, P.S.; BRINEN, L.S.; ELLMAN, J.A. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1763-1773, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em saúde: zoonoses – **Série B. Textos Básicos de Saúde (Cadernos de Atenção Básica; n. 22)**. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil, 2009.

BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease, drug development: 2009-2010. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 609-16, 2010.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas diseases with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 29-37, 2002.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico da doença de Chagas nas fases aguda e crônica. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.667-676.

CAROD-ARTAL, F. J.; GASCON, J. Chagas disease and stroke. **The Lancet Neurology**, Londres, v. 9, n. 5, p. 533-542, 2010.

CASTRO, D. P.; SEABRA, S. H.; GARCIA, E. S.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. **Experimental Parasitology**, v. 117, n. 2, p. 201-207, 2007.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (american trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.

CATERINA, M. C.; PERILLO, I. A.; BOIANI, L.; PEZAROGLO, H.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; SALERNO, A. Imidazolidines as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents: biological evaluation and structure–activity relationships, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2226–2234, 2008.

CAZZULO, J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: Potential Targets for the Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 1261-1271, 2002.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypaum cruzi*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.

COMBER, R. N.; REYNOLDS, R. C.; FRIEDRICH, J. D.; MANGUIKIAN, R. A.; BUCKHEIT Jr., R. W.; TRUSS, J. W.; SHANNON, W. M.; SECRIST, J. A. 5,5-

Disubstituted Hydantoins: Syntheses and Anti-HIV Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 356-3572, 1992.

COSTA, J. M.; ARGOLLO, A. M.; FÉLIX, M. Redescription of *Triatoma melânica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v. 1.385, p. 47-52, 2006.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-22, 2007.

COURA, J. R., CANÇADO, J. R. A história da terapêutica da doença de Chagas. **Ministério da Saúde - Fiocruz**. Disponível em:
<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126>.

COURA, J. R., CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, Basel, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.

CROFT, S. L. Pharmacological Approaches to Antitrypanosomal Chemotherapy. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, 94, 215-220, 1999.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, p. 1-18, 2019. Disponível em :< <http://www.hindawi.com/journals/ijcb/2010/295394/> >. Acesso em: 09 de fev. 2012.

DIAS, E.; DIAS, J. C. P.; GARCIA, A. L. R.; DIAS, R. B.; MACHADO, E. N. M.; GOUVEIA, S. C.; BRONFEN, E. LESSA, Z. L. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Doença de Chagas: **Textos de apoio**, v. 52, 1989.

DIAS, J. C. P. Vigilância epidemiológica em doença de Chagas. **Caderno Saúde Pública**, v. 16, sup. 2, p. 43-59, 2000.

Dias, JCP. **Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas,**

como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Rev. Soc.

Bras. Med. Trop. vol.39 no.4 Uberaba July/Aug. 2006.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N., THIEMANN, O. H., OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2.444-2.457, 2009.

DUSCHAK, V.G.; COUTO, A.S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 2, p. 19-51, 2007.

DUTRA, P. M. L.; COUTO, L. C.; LOPES, A. H. C. S.; MEYER-FERNANDES, J. R.; Characterization of ecto-phosphatase activities of *Trypanosoma cruzi*: A comparative study between Colombiana and Y strains. **Acta Tropica**, v. 100, p. 88-95, 2006.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 3, p. 734-47, 2012.

FLOSI, W. J.; DeGOEY, D. A.; GRAMPOVNIK, D. J.; CHEN, H.; KLEIN, L. L.; DEKHTYAR, T. MASSE, S.; MARSH, K. C.; HONG MEI MO; KEMPF, D. Discovery of imidazolidine-2,4-dione-linked HIV protease inhibitors with activity against lopinavir-resistant mutant HIV. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 6695–6712, 2006.

FORERO, D.; WEIRAUCH, C.; BAENA, M. Synonymy of the reduviid (hemiptera: heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). **Zootaxa**, v. 670, p. 1-12, 2004.

GALVÃO, C. & ÂNGULO, V. M. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemíptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colômbia. **Zootaxa**, v. 1.241, p. 61-68, 2006.

GÓES, A. J. S.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; LUU-DUC, C. Synthèse et activité antifongique des chlorobenzyl benzylidène thiazolidinediones et imidazolidinediones substituées. **Ann. Pharmaceutiques Françaises**, v. 49, n. 2, p. 92-98, 1991.

GOMES, F. O. S. **Avaliação *in vitro* de derivados 2-tioxo imidazolidínicos para quimioterapia da doença de Chagas**. Recife, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) -- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

GOMES, F. O. S.; MELO, C. M. L.; PEIXOTO, A. A.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PEREIRA, V. R. A.; PITTA, I. R. New imidazolidine derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents: structure–activity relationships. **Parasitol Res**, v. 111, n. 6, p. 2361–2366, 2012.

GUERREIRO, C. A. M.; História do Surgimento e Desenvolvimento das Drogas Antiepilépticas. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 12, p. 18-21, 2006.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 757.

HARRIES & WEISS, Ber., v. 33, p. 3418, 1900. *In*: ELDERFIELD, R.C. Heterocyclic Compound, London: John Wiley & Sons. v. 5, p. 711-716, 1957.

HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S.K.; PERIAGO, M.R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. 1-11, 2008.

Disponível em: <

<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000300>>

Acesso em: 24 jan. 2013.

JUNQUEIRA, A. C. V., GONÇALVES, T. C. M., MOREIRA, C. J. C. Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopia de malária e laboratoristas da rede pública. 2. ed. Rio de Janeiro: SCV/ICT, 2011.

KAMINSKY, D.; ZIMENKOVSKY, B.; LESYK, R. Synthesis and in vitro anticancer activity of 2,4-azolidinedione-acetic acids Derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3627–3636, 2009.

KAWANISHI, M., KOTOKU, N., ITAGAKI, S., HORII, T. AND KOBAYASHI, M. Structure–activity relationship of anti-malarial spongy peroxides having a 3-methoxy-1, 2-dioxane structure. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 5297–5307, 2004.

KOCHKANYAN, R. O.; ISRAELIAN, Y. U.; ZARITOVSKII, A. N. New method for the synthesis of azolidones. **Chem. Heterocyclic Compounds**, v. 1, p. 70-72, 1978.

KOSTAKIS, I. K., et al., Design, synthesis and cell growth inhibitory activity of a series of novel aminosubstituted xantheno[1, 2-dimidazoles in breast cancer cells. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 3445–3455, 2008.

LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 837-843, 2010.

LIMA, M. C. A.; COSTA, L. B.; GÓES, A. J. S.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; LUU-DUC, C. Synthèse et activité antimicrobienne des chlorobenzyl benzylidène imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées. **Pharmazie**, v. 47, n. 3, p. 182-184, 1992.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUNEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PERIE, J.; CHAUVIERE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 999-1006, 2003.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, 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. Comparative biochemistry and physiology. Part a, **Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601-20, 2007.

McKERRROW, 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, sup. 1, p. 263-269, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Epidemiologia da doença de Chagas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Reunião sobre tratamento etiológico da doença de Chagas**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996.

MUÑOZ-SARAIVA, S. G. et al. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Failure Review**, Norwell, v. 17, n. 1, p. 45-64, 2010.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. N. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 15, p. 653-655, 2009.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O. SOUZA Jr., A. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento Etiológico da Doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008a.

OLIVEIRA, S. M.; SILVA, J. B. P.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R., Estrutura, Reatividade e Propriedades Biológicas das Hidantoínas. **Química Nova**, v. 31, p. 614-622, 2008b.

PATTERSON, J. S.; BARBOSA, S. E.; FELICIANGELI, M.D. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. **Acta Tropicall**, v. 110, p. 187-199, 2009.

PEREIRA, M. C. The **parasitology images gallery. Arthropoda: Insecta and Acari**. São Paulo. Disponível em: < <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/triatoma.htm> >. Acesso em: 9 fev. 2012.

PORTAL CHAGAS. **História da doença de chagas: ciência, saúde e sociedade**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=171>> Acesso em: 10 Jan. 2012.

RAETHER, J. M.; HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol res**, v. 90, sup. 1, p. 9-39, 2003.

RASSI, A. Jr. et al. Chagas disease. **The Lancet**, v. 735, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, sup. I, p. 152-158, 2009.

RASSI, A.; NETO, V. A. SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLLI FILHO, F. AMATO, V. S.; ROSSI, G. G.; RASSI JR., A. Tratamento da fase crônica da doença de Chagas com nifurtimox associado ao corticóide. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p.547-550, 2002.

REDDY, Y. T.; REDDY, P. N.; KODURU, S.; DAMODARAN, C.; CROOKS, P.A. Aplysinopsin analogs: Synthesis and anti-proliferative activity of substituted (Z)-5-(N-benzylindol-3-ylmethylene)imidazolidine-2,4-diones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3570–3574, 2010.

RUHERMAN & STAPLETON. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 246 (1900). In: JOHNSON, T. B.; BATES, J. S. **Journal of the American Chemical Society**, v. 37, p. 383-385, 1915.

SCHOFIELD, C. J. JANNIN, J. SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 583-588, 2006.

SILVEIRA, A. C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Caderno Saúde Pública**, v. 16, sup. 2, p. 35-42, 2000.

SOEIRO, M. N. C.; DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opin Ther Targets**, v. 13, p. 105-121, 2009.

TAVARES, W. Antibióticos e quimioterápicos para o Clínico. São paulo: Atheneu; 2006.

TEIXEIRA, A. R.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592-630, 2011.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-91, 2006.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, 2010.

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

VON, A.; ZARAGOZA, E.; JONES, D.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; FRANCO-PAREDES, C. New insights into Chagas disease: a neglected disease in Latin America. **J Infect Developing Countries**, v. 1, n. 2, p. 99-111, 2007.

WARE, E. The chemistry of hydantoins. **Chemical. Review**, 46, 403-470, 1950.

WHEELER, L.; HOFFMAN, C.; Hydantoins (I) of phenylalanine and of tyrosine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 45, p. 368, 1911.

WHO. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Argentina: **World Health Organization**, 2007. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas>>. Acesso em: 02 dez. 2012.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: Mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, n. 11, p. 1-24, 2009.

ZEJC, A.; KIEC-KONONOWICZ, K.; CHLON, G.; KLEINROK, Z.; KOLASA, K.; PIETRASIEWICZ, T.; CZECHOWSKA, G. Synthesis and pharmacological properties of diphenylimidazolidine acetic and propionic acids derivatives. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.**, v. 41, n. 5, p. 483-93, 1989.

ZHU, Q.; PAN, Y.; XU, Z.; LI, R.; QIU, G.; XU, W.; KE, X.; WU, L.; HU, X.; Synthesis and potential anticonvulsant activity of new N-3-substituted 5,5-cyclopropanespirohydantoins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 296-302, 2009.