



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

**Planejamento Estrutural, Síntese e Avaliação da Atividade
Tripanocida de Inéditas Aril-4-tiazolinonas.**

Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira.

Recife, PE

2015

Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira

**Planejamento Estrutural, Síntese e Avaliação da Atividade Tripanocida de Inéditas
Aril-4-tiazolinonas.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

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

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

Recife, PE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Siqueira, Lucianna Rabelo Pessoa de
Planejamento estrutural, síntese e avaliação da atividade tripanocida
de inéditas Aril-4-tiazolinonas/ Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira–
Recife: O Autor, 2015.

102 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite

Coorientador: Marcos Veríssimo de O. Cardoso

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação
Terapêutica, 2015.

Inclui referência

- 1. Materia médica 2. Chagas, doença de 3. Tiazóis I. Leite, Ana**
Cristina Lima (orientadora) II. Cardoso, Marcos Veríssimo de
O. (coorientador) III. Título

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-069

Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira

**Planejamento Estrutural, Síntese e Avaliação da Atividade Tripanocida de
Inéditas Aril-4-tiazolinonas.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre
em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 26/02/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr. Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

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

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior (Examinador Interno)
Universidade Estadual da Paraíba

Recife, PE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof.^a Dr.^a Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

**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

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Lúcia de Fátima Rabelo Pessoa de Siqueira, pelo total apoio, por seu amor incondicional e, embora clichê, mas não menos verdade, por ser a melhor mãe do mundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, pela vida e por tudo que ele permite que nela aconteça. Sem ele, nada seria possível;

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Cristina Lima Leite, pelas ótimas oportunidades, pela confiança, pelo crescimento proporcionado, ensinamentos e experiências concedidas, desde a minha iniciação científica até hoje;

Ao meu Co-orientador, Dr. Marcos Veríssimo de O. Cardoso, pelas ajudas que começaram desde a bancada na minha iniciação científica, pelos caminhos, pela enorme ajuda e disponibilidade, boa vontade e todas as contribuições para realização deste trabalho;

A minha banca de qualificação composta pelos professores: Dr. Danilo Cesar Galindo Bedor, Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo e Dra. Ana Cristina Lima Leite pelas ótimas colocações, pela melhor construção desta dissertação e pelo conhecimento agregado;

A toda a minha família, em especial a minha mãe, pelo seu investimento em minha educação e a minha vida como um todo. Amor incondicional é pouco. Ao meu pai e meu irmão, pelo apoio, carinho, ajuda e o colo de família que é sem igual. Sem vocês, eu nada seria.

Agradeço também a todos os meus tios (as), especialmente as minhas tias Ana, Sineide, Ivone e Socorro, meus tios Ubaldo e Cal, às primas Marília, Ana Luiza. Todos eles também foram fundamentais até aqui, sou extremamente grata por tudo que fizeram por mim;

Ao meu Helton, por se fazer um companheiro de verdade nesse período, por todo carinho, paciência, por ser tão lindo comigo e por deixar tudo mais leve;

A minha amiga de graduação, ex-parceira de laboratório, amiga de vida e prestativa sem igual: Míria Barbosa.

Aos meus amigos do LpQM (DCFAR, UFPE): Arsênio, Wan, Gevanio, Paulo André, Míria, Elany, Dayane, Thays, Stefane, pelo ombro amigo, por todas as ajudas, por vocês existirem;

Aos meus amigos da graduação: Jessica, Maria Clara, Tibério, Danilo, Risoleta, Renata, Hellen, Hyalyne, Marina, Larissa e Cecília pelos ótimos momentos compartilhados;

Aos meus amigos do colégio: Thalita, Alinne, Renata Laíse, Dayseanne, Bárbara, Arthur e as Jéssicas: os ombros amigos mais antigos são sempre aconchegantes, mesmo distantes.

Aos demais amigos de Recife e também de Caruaru: Janaína e Fernando César (incluindo toda a sua família e Cici *in memoriam*), Derick, Ivanna, “Tia Fernanda” , Daura, Marcinha, Marcelo, Felipe;

Aos funcionários da Central Analítica do DQF (UFPE), em especial a Eliete Barros e Abene Ribeiro, pelas análises espectroscópicas;

Ao Dr. Policarpo Ademar Sales Júnior da (Fiocruz, MG) pelo compromisso e a realização da avaliação das propriedades farmacológicas dos compostos no *T. cruzi*;

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (UFPE);

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

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma infecção parasitária sistêmica, que afeta cerca de 10 milhões de pessoas e causa, em média, cerca de 14.000 mortes por ano, além da estimativa de que 25 milhões de pessoas estão em risco de adquirir a doença. No Brasil, o Benznidazol (BZD) é o único fármaco utilizado para o tratamento durante a fase aguda, enquanto que, durante a fase crônica da doença, o mesmo mostra-se com atividade limitada. Dessa forma, o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença de Chagas se faz necessário. Sabendo-se que o *T. cruzi* é susceptível às tiossemicarbazonas e seus bioisósteros, essas classes de compostos têm se mostrado promissoras para o desenvolvimento de drogas tripanocidas. Baseado em relatos na literatura de potentes tiossemicarbazonas tripanocidas, elegeu-se o composto protótipo (**Composto 1i** - página 21) deste trabalho, onde planejou-se por meio da estratégia de bioisosterismo, a síntese de inéditas aril-4-tiazolinonas, no intuito de obter compostos mais potentes e menos tóxicos. Além disso, de estabelecer a relação estrutura-atividade anti-*T. cruzi*, através da inserção de substituintes diversos nas posições N3 e C5 do anel heterociclo. Os compostos foram obtidos em duas etapas, sendo a primeira a obtenção das tiossemicarbazonas (**Int 1-3**), com rendimentos que variaram de 68% a 81%, e a segunda etapa, a reação destas (**Int 1-3**) com ésteres e ácidos halogenados para obtenção dos compostos cíclicos (**LR 01-18**) os quais apresentaram rendimentos de 23% a 97%. Todas as moléculas foram caracterizadas quimicamente por Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (¹H-RMN) e Carbono (¹³C-RMN) e Infravermelho (IV). A atividade tripanocida foi determinada em amastigostas e tripomastigotas da cepa Tulahuen e a toxicidade foi estimada em fibroblastos L929. Após realização dos ensaios biológicos, foi possível identificar os compostos **LR-05**, **LR-07** e **LR-08** como agentes tripanocidas com potência superior ao BZD (21.90 µM), com valores de 13.27 µM, 12.20 µM e 2.46 µM, respectivamente. O composto **LR-08** foi cerca de nove vezes mais potente que o BZD e possui como característica estrutural uma metila em N3 e outra metila em C5. Constatou-se que a funcionalização da tiossemicarbazona em tiazolinona foi benéfica, resultando em três compostos mais ativos (**LR-07**, **LR-08** e **LR-16**) que os seus intermediários (**Int 2-3**). De maneira geral, foi possível identificar tiazolinonas mais ativas, para às formas evolutivas tripomastigota e amastigota, quando comparado ao BZD.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, tiossemicarbazonas, tiazolinona.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* protozoan, is a systemic parasitic infection that affects about 10 million people and causes on average about 14,000 deaths for year in addition to the estimated 25 million people are at risk acquiring the disease. In Brazil, Benznidazole (BZD) is the only drug used for the treatment during the acute phase, whereas during the chronic phase of the disease, shows the same with limited activity. Thus, the development of drugs for the treatment of Chagas disease is required. Knowing that the *Trypanosoma cruzi* is susceptible to thiosemicarbazone and its bioisosters, these classes of compounds have shown promise for the development of trypanocidal drugs. Based on reports in the powerful thiosemicarbazones trypanocides literature, was elected the prototype compound (Compound 1i - page 21) of this work, which was planned by bioisosterism strategy, the synthesis of aryl-4-thiazolinones unpublished, in order to more potent and less toxic compounds. Furthermore, to establish the relation structure-anti-T activity. *cruzi*, by inserting in the various substituents N3 and C5 positions of the heterocycle ring. The compounds were obtained in two steps, the first being the obtaining of thiosemicarbazone (Int 1-3), with yields ranging from 68% to 81% and the second step, the reaction of these (Int 1-3) with esters and halogenated acids to obtain the cyclic compound (LR 01-18) showed that yields of 23% to 97%. All molecules were chemically characterized by Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H -NMR) and carbon (^{13}C -NMR) and Infrared (IR). The trypanocidal activity was determined in amastigostas and trypomastigotes of the Tulahuen strain and toxicity was estimated in L929 fibroblasts. After performing biological assays it was possible to identify compounds LR-05, LR-07 and LR-08 as trypanocidal agents with superior power to BZD (21.90 mM), with values of 13.27 μM , 12.20 μM and 2.46 μM , respectively. The LR-08 compound was about nine times more potent than the BZD and has as structural feature in one methyl and one methyl N3 C5. It was found that functionalization of thiosemicarbazone was beneficial in thiazolinone, resulting in three more active compounds (LR-07, LR-08 and LR-16) their intermediaries (Int 2-3). In general, it was possible to identify more active thiazolinones to the amastigote and trypomastigote forms evolutionary compared to the BZD

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, thiosemicarbazones, thiazolinone.

Lista de Esquemas

Esquema 1: Rota sintética para obtenção das aril-4-tiazolinonas.....	50
Esquema 2: Obtenção das tiosemicarbazonas.....	51
Esquema 3: Reação da série LR 01-18	52

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química do Nifurtimox (1) e Benznidazol (2).....	20
Figura 2: Aril-4-tiazolinonas.....	21
Figura 3: Estrutura do composto 1i.....	21
Figura 4: Carlos Chagas.....	25
Figura 5: Distribuição geográfica da doença de Chagas nas Américas de acordo com a situação do principal vetor de transmissão de cada área. Ano de 2011 (39).....	28
Figura 6: Distribuição espacial da prevalência observada de doença de Chagas na população brasileira (42).....	29
Figura 7: Sinal de Romaña (1).....	31
Figura 8: História natural da doença de Chagas no homem.....	31
Figura 9: Transmissão pelo vetor e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
Figura 10: Estrutura do VNI e K11777.....	42
Figura 11: Representação cristalográfica da Cruzaína.....	44
Figura 12: Estrutura de inibidores da cruzaína.....	45
Figura 13: Composto PT01.4.....	47
Figura 14: Tiossemicarbazona ao centro (21), seu bioisómero clássico pirazolina (20) e seu bioisómero não clássico tiazolinona (22).....	48
Figura 15: Estrutura de alguns dos principais protótipos a fármacos antichagásicos do nosso laboratório, baseados em 4- tiazolinonas (27).....	48
Figura 16: Emprego do bioisosterismo para o planejamento das aril-4-tiazolinonas.....	50
Figura 17: Estrutura da 3-Bromofenilpropanona(1) e das tiossemicarbazidas utilizadas (2 e 3).....	52
Figura 18: Exemplo de espectro de IV referente ao composto LR-05.....	55
Figura 19: Espectro de RMN ¹ H da molécula LR-05.....	56
Figura 20: Espectro do RMN ¹³ C da molécula LR-05.....	57

Lista de símbolos e abreviaturas

))) - irradiação no ultrassom

AIDS - síndrome da imunodeficiência humana.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ar - aromático

AVC - acidente vascular cerebral

BZD - benznidazol

CCD - cromatografia de camada delgada

d, s, t, q, m – dubleto, singleto, tripleto, quadrupletto, multipletto

DALY - disability-adjusted life year

ADN - ácido desoxirribonucleico.

DNDi - Drugs for Neglected Diseases Initiative

DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas

ECG - eletrocardiograma

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

EMAR - espectro de massas de alta resolução

ESI - técnica de ionização por electrospray

FDA - Food and Drug Administration

FIOCRUZ - Fundação Osvaldo Cruz

GPI - glicosilfosfatidilinositol

HAI - Hemaglutinação

HIV - vírus da imunodeficiência humana.

Hz - Hertz

CI₅₀ - concentração inibitória para 50% da população

IgG - imunoglobulina G

IgM - imunoglobulina M

IS - índice de seletividade

IV - Infravermelho

LAFEPE - Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

P&D - Pesquisa & Desenvolvimento

PCR - reação em cadeia da polimerase

PF - ponto de fusão

Ph - fenil

ppm - partes por milhão

SAR - relações estruturas-atividades

Rend. - rendimento reacional

Rf - fator de retenção

RIFI - Imunofluorescência indireta

RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN ¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SNC - sistema nervoso central

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

WB - Western blot

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estimativas sobre o número de imigrantes latino-americanos na Espanha.....	27
Tabela 2: Descrição dos substituintes, rendimento (%) e Ponto de fusão (PF) das aril-4-tiazolinonas (LR 01-18) e tiossemicarbazonas (Int 1-3).....	53
Tabela 3: Citotoxicidade e atividade tripanocida frente à forma amastigota da série LR .01-18 e seus intermediários.....	58
Tabela 4: Regra de Lipinski aplicada para os compostos LR 01-18.....	60

SUMÁRIO

Conteúdo

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral.....	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3.	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	Doença de Chagas.....	25
3.1.1	Histórico e Características.....	25
3.1.2	Epidemiologia	26
3.1.3	Sinais e Sintomas	30
3.1.4	Transmissão do <i>T. cruzi</i>	34
3.1.5	Ciclo de Vida do <i>T. cruzi</i>	36
3.1.6	Diagnóstico.....	38
3.1.7	Tratamento Clínico.....	40
3.1.8	Desenvolvimento de Novas Drogas	41
3.1.9	Alvos Terapêuticos.....	42
3.1.10	Cisteínas Proteases	44
3.1.11	3'-Bromopropiofenona-tiossemicarbazona.....	46
3.1.12	Tiossemicarbazonas e 4-Tiazolinonas.....	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Planejamento da Série Química	50
4.2	Obtenção das moléculas LR 01-18	51
4.2.1	Síntese dos compostos.....	51
4.3	Atividade Farmacológica.....	57
4.3.1	Avaliação <i>in vitro</i> das atividades tripanocidas	58
5.	PARTE EXPERIMENTAL	64
5.1	Parte Química	64
5.1.1	Generalidades	64
5.2	Metodologia de Síntese e Dados Espectroscópicos	65
5.2.1	Síntese do composto intermediário Int 1 (E)-2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinacarbotoamida:	65

5.2.2 Síntese do composto intermediário Int-2, (E)-2-(1-(3-bromofenil)propilideno)-N-metil hidrazinacarbotioamida	66
5.2.3 Síntese do composto intermediário Int-3, (E)-2-(1-(3-bromofenil)propilideno)-N-fenil hidrazinacarbotioamida	67
5.2.4 Síntese do composto LR-01, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)tiiazolidin-4-ona:	68
5.2.4 Síntese do LR-02, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-metiltiazolidin-4-ona	69
5.2.5 Síntese do LR-03, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-etil tiiazolidin-4-ona:	70
5.2.6 Síntese do LR-04, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-isopropiltiazolidin-4-ona:	71
5.2.7 Síntese do LR-05, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5,5-dimetiltiazolidin-4-ona:	72
5.2.8 Síntese do LR-06, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-feniltiazolidin-4-ona:	73
5.2.9 Síntese do LR-07, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3-metiltiazolidin-4-ona:	74
5.2.10 Síntese do LR-08, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3,5-dimetiltiazolidin-4-ona:	75
5.2.11 Síntese do LR-09, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-etil-3-metiltiazolidin-4-ona:	76
5.2.12 Síntese do LR-10, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-isopropil-3-metiltiazolidin-4-ona:	77
5.2.13 Síntese do LR-11, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3,5,5-trimetiltiazolidin-4-ona:	78
5.2.14 Síntese do LR-12, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3-metil-5-feniltiazolidin-4-ona:	79
5.2.15 Síntese do LR-13, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3-feniltiazolidin-4-ona:	80
5.2.16 Síntese do LR-14, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-metil-3-feniltiazolidin-4-ona:	81
5.2.17 Síntese do LR-15, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-etil-3-feniltiazolidin-4-ona:	82
5.2.18 Síntese do LR-16, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-isopropil-3-feniltiazolidin-4-ona:	83
5.2.20 Síntese do LR-18, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3,5-difeniltiazolidin-4-ona:	85

5.3	Protocolo da Avaliação Farmacológica	86
5.3.1	Ensaio <i>in vitro</i> sobre as formas evolutivas tripomastigota e amastigota do <i>T. cruzi</i> ...	86
5.3.3	Toxicidade para fibroblastos L929	86
6	Conclusões e Perspectivas	88
6.1	Conclusões.....	90
6.2	Perspectivas.....	90
	REFERÊNCIAS	92

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, também chamada tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente fatal, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É transmitida aos seres humanos, principalmente através das fezes de insetos triatomíneos conhecidos como barbeiros (1).

O início da história da doença de Chagas datou de abril do ano de 1909, no estado de Minas Gerais, Brasil, através do pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, Carlos Chagas (1878 – 1934). Tanto o vetor, quanto o protozoário foram descobertos e identificados por ele (1).

A nível mundial, cerca de dez milhões de pessoas estão infectadas, principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica. Cerca de 25 milhões de pessoas estão em risco de adquirir a tripanossomíase (2) e estima-se que 14 mil pessoas morrem a cada ano em todo o mundo (3).

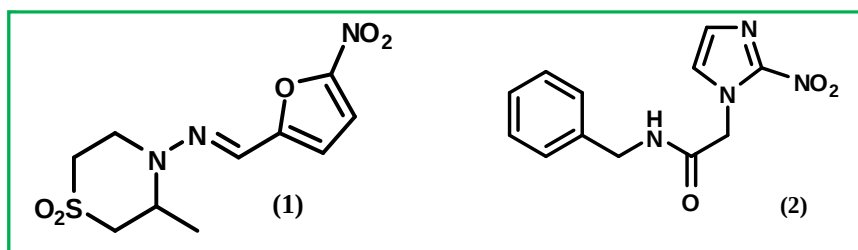
A tripanossomíase é considerada como uma das doenças “negligenciadas”, a qual recebe essa denominação pela atenção insuficiente por parte dos poderes públicos e por serem enfermidades ligadas às más condições de vida e moradia (4). As doenças negligenciadas afetam um bilhão de pessoas ao redor do mundo, muitas vezes as populações mais vulneráveis que vivem em áreas rurais pobres. Uma fonte de estigma social e da pobreza, as doenças negligenciadas podem resultar em vários problemas de saúde ao longo da vida e até mesmo a morte (5).

As recomendações para o tratamento de quimioterapia da doença de Chagas no Brasil são baseadas em decisões tomadas por especialistas que foram reunidos pelo Ministério da Saúde em 1997, com a revalidação feita, posteriormente, por especialistas coordenados pela Organização Pan-Americana da Saúde, em 1998. Estas recomendações sugerem que os casos agudos de doença de Chagas adquiridos através do vetor, por transmissão oral ou congênita, através de acidentes de laboratório ou qualquer outra via de transmissão deve ser imediatamente tratado com uma das drogas que estão atualmente disponíveis: nifurtimox e benznidazol (**Figura 1**) (6). O nifurtimox teve sua comercialização interrompida em alguns países: primeiro no Brasil, depois na Argentina, no Chile e Uruguai (7), devido a sua alta toxicidade. Assim, a única droga utilizada no país é o nitro-heterociclo benznidazol (BZD) (LAFEPE, Brasil), que é eficaz para a cura da doença na fase aguda, mas é menos eficaz em doentes na fase crônica (8, 9, 10). Além disso, o benznidazol não é considerado adequado,

uma vez que exhibe efeitos secundários graves, tais como hipersensibilidade, erupção cutânea, desordem gastrointestinal, conduzindo um grande número de pacientes a interromper o tratamento (11).

Dessa forma, a doença de Chagas é considerada como uma das doenças tropicais mais preocupantes em toda a América Latina (12), existindo, portanto, uma necessidade urgente do desenvolvimento de novas drogas mais seguras e efetivas para o tratamento da mesma (13).

Figura 1: Estrutura química do Nifurtimox (1) e Benznidazol (2).

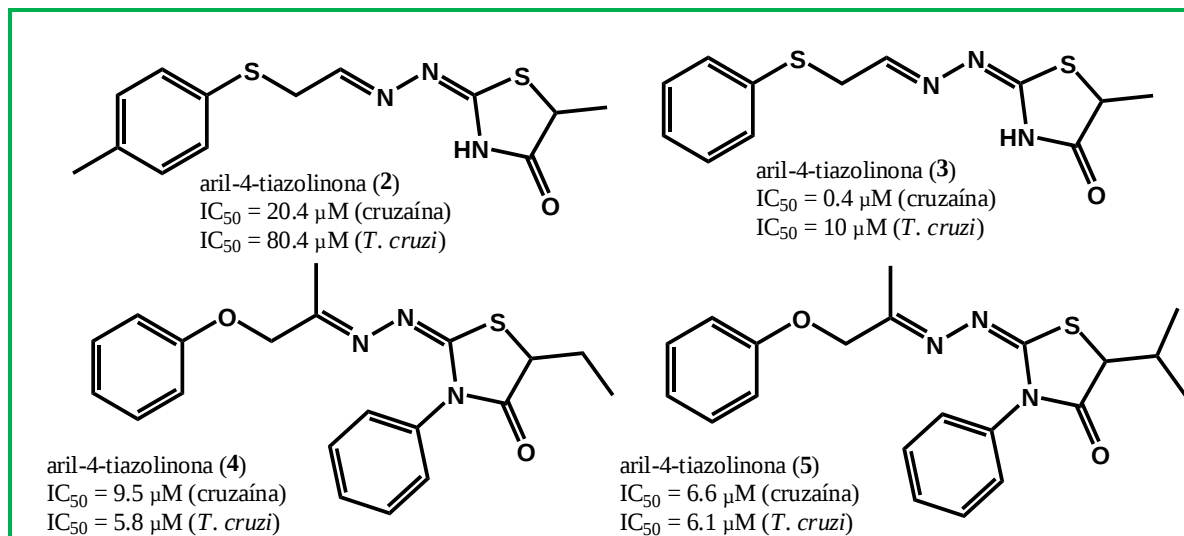


Fonte: Do autor.

O atual conhecimento da anatomia, bioquímica, fisiologia e ainda, de quase todas as etapas do ciclo de vida dos parasitos no homem, tem possibilitado o processo de planejamento de fármacos de forma mais racional, com ênfase no mecanismo de ação, visando atingir os alvos específicos e essenciais dos parasitos e assim poupar seu hospedeiro humano (14). Como exemplo, tem-se a cruzaina, que é a principal cisteinil protease do parasita *Trypanosoma cruzi*. Ela é expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasita e desempenha um papel fundamental durante a infecção de células hospedeiras, replicação e de metabolismo. Por esse motivo é considerada um alvo importante para o desenvolvimento de novos agentes anti-*trypanosoma cruzi* (14).

Tiossemicarbazonas e seus bioisómeros cíclicos, como as aril-4-tiazolinonas, tem apresentado atividade contra *T. cruzi* e via cruzaina (13, 15-20), que exerce um papel importante durante a infecção de células hospedeiras. Muitas tentativas têm sido feitas para explorar as relações estrutura-atividade (SAR), com objetivo de sintetizar compostos menos tóxicos e com efeito tripanocida melhorado (20-26). Ainda sobre o núcleo tiazolinona, ao longo dos anos, o nosso grupo descreveu a síntese e atividade anti-*T. cruzi* delas (13, 21, 22, 27), onde nas primeiras tentativas, as aril-4-tiazolinonas mostraram apenas baixa atividade contra as formas epimastigota e tripomastigota do parasita (21). Entretanto, trabalhos posteriores despertaram grande interesse no núcleo 4-tiazolinona (**Figura 2**), pois comprovaram boa atividade apresentada frente ao *T. cruzi* e à cruzaina (13, 22, 27).

Figura 2: Aril-4-tiazolinonas

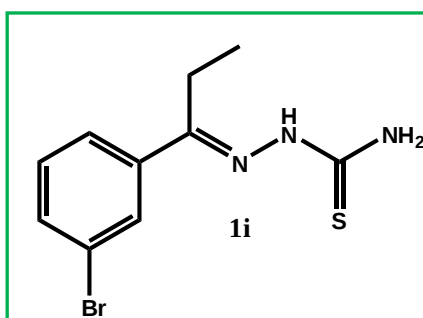


Fonte: Do autor

Em 2002, Du e colaboradores descreveram inicialmente alguns derivados tiossemicarbazônicos com potente atividade antichagásica *in vitro*, destacando-se o composto **1i** (3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona) (Figura 3).

Diante do exposto, este trabalho apresenta a síntese de uma série de inéditas aril-4-tiazolinonas, tendo como protótipo estrutural, o composto **1i**, (3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona) (Figura 3), candidatas a fármacos antichagásicos, planejadas por estratégia de bioisosterismo.

Figura 3: Estrutura do composto 1i.



Fonte: Do autor

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar novos agentes tripanocidas e potenciais inibidores da cruzáina. O trabalho engloba o planejamento e a síntese de novas 4-tiazolinonas, onde posteriormente será realizada a avaliação das suas atividades antichagásicas.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ O planejamento estrutural e síntese de uma série de compostos (**LR-01 a LR-18**) constituída por inéditas tiazolinonas;
- ❖ Caracterização química e elucidação estrutural de todos os compostos através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H -RMN) e Carbono (^{13}C -RMN), Infravermelho (IV);
- ❖ Avaliação da atividade anti-proliferativa *in vitro* frente às formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*, com determinação da concentração inibitória para 50% (CI_{50});
- ❖ Análise da citotoxicidade celular frente à células de mamíferos, para determinar o índice de seletividade (SI) (em comparação com o Benznidazol);
- ❖ Análise comparativa das atividades tripanocidas e das relações estrutura-atividade das moléculas estudadas.

3. Revisão da Literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença de Chagas

3.1.1 Histórico e Características

A Tripanossomíase americana é uma grave doença parasitária resultante da infecção pelo protozoário parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, tendo insetos triatomíneos como vetores. É conhecida como doença de Chagas, tendo sido nomeada desta maneira por causa do médico brasileiro Carlos Chagas (**Figura 4**), que foi quem primeiro a descreveu em 1909. O trabalho de Chagas é único na história da medicina, porque ele foi o único pesquisador até agora a descrever completamente uma nova doença infecciosa: seu patógeno, o vetor, o hospedeiro, as manifestações clínicas e epidemiologia (28).

Figura 4: Carlos Chagas



Fonte: Fiocruz 2012.

A doença de Chagas é transmitida aos seres humanos e mais de 150 espécies de mamíferos domésticos e silvestres, principalmente por grandes insetos, sanguessugas do filo *Arthropoda*, subfilo *Hexapoda*, ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*. Apesar de existirem cerca de 140 espécies de triatomíneos, foram identificados, somente alguns que são vetores competentes para *T. cruzi*. Os principais vetores são: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* nos países do Cone Sul, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* nos Países Andinos e partes da América Central, e *T. dimidiata* e *Triatoma barberi* no México (29).

Embora a doença de Chagas só tenha sido descoberta em 1909, ela começou há milhões de anos como uma doença enzootica entre os animais selvagens. Sua transmissão ao homem começou acidentalmente como uma antropozoonose quando a humanidade invadiu ecótopos silvestres. A doença de Chagas endêmica se estabeleceu como uma zoonose durante os últimos 200-300 anos, através do desmatamento para o surgimento da agricultura e a criação de gado, sendo feita a adaptação de triatomíneos para moradias, tendo os seres humanos e animais domésticos como fontes de alimento (29).

As formas mais importantes de transmissão da doença de Chagas ainda são as vetoriais (seja por lesão resultante da picada, pela mucosa ocular ou pela mucosa oral), entretanto, a transmissão transfusional e congênita também tem importância epidemiológica (30).

A tripanossomíase americana apresenta-se classicamente em uma fase aguda ou inicial, a qual é seguida por uma fase crônica, que pode ser classificada em: forma indeterminada, cardíaca, digestiva ou com diferentes manifestações clínicas (31). A fase aguda é sensível aos tratamentos com antiparasitários, com as taxas de cura de 60 a 90%. Depois de 4 a 8 semanas, os indivíduos com infecções ativas entram na fase crônica da doença de Chagas, que é assintomática para 60 a 80% dos indivíduos durante quase toda vida (31).

Durante os últimos anos, a doença tem recebido cada vez mais atenção como um problema emergente na América do Norte e Europa, devido a migrações internacionais de áreas endêmicas para áreas não-endêmicas (30). Há cerca de 8-10 milhões de pessoas infectadas na América Latina (32).

A terapia antiparasitária é indicada para pacientes com infecção aguda, em crianças e pessoas recém-infectadas, e no caso de reativação devido à imunossupressão (3). Estudos anteriores sugeriram que o tratamento anti-tripanosoma pode retardar a progressão da doença crônica, mas ainda é uma questão de debate (33, 34, 35). As drogas atualmente disponíveis (Benzonidazol e Nifurtimox (**Figura 1**)) exigem um uso prolongado, realiza um risco de eventos adversos e precisam de acompanhamento cuidadoso (36).

3.1.2 Epidemiologia

A tripanossomíase americana ocorre principalmente na América Latina. No entanto, nas últimas décadas, tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos da América,

Canadá, muitos países da Europa Ocidental e alguns do Pacífico e isto é principalmente devido à mobilidade da população entre a América Latina e o resto do mundo (**Tabela 1**). Menos frequentemente, é devido a uma infecção através de transfusão de sangue, a transmissão vertical (da mãe infectada para o filho) ou a doação de órgãos (37).

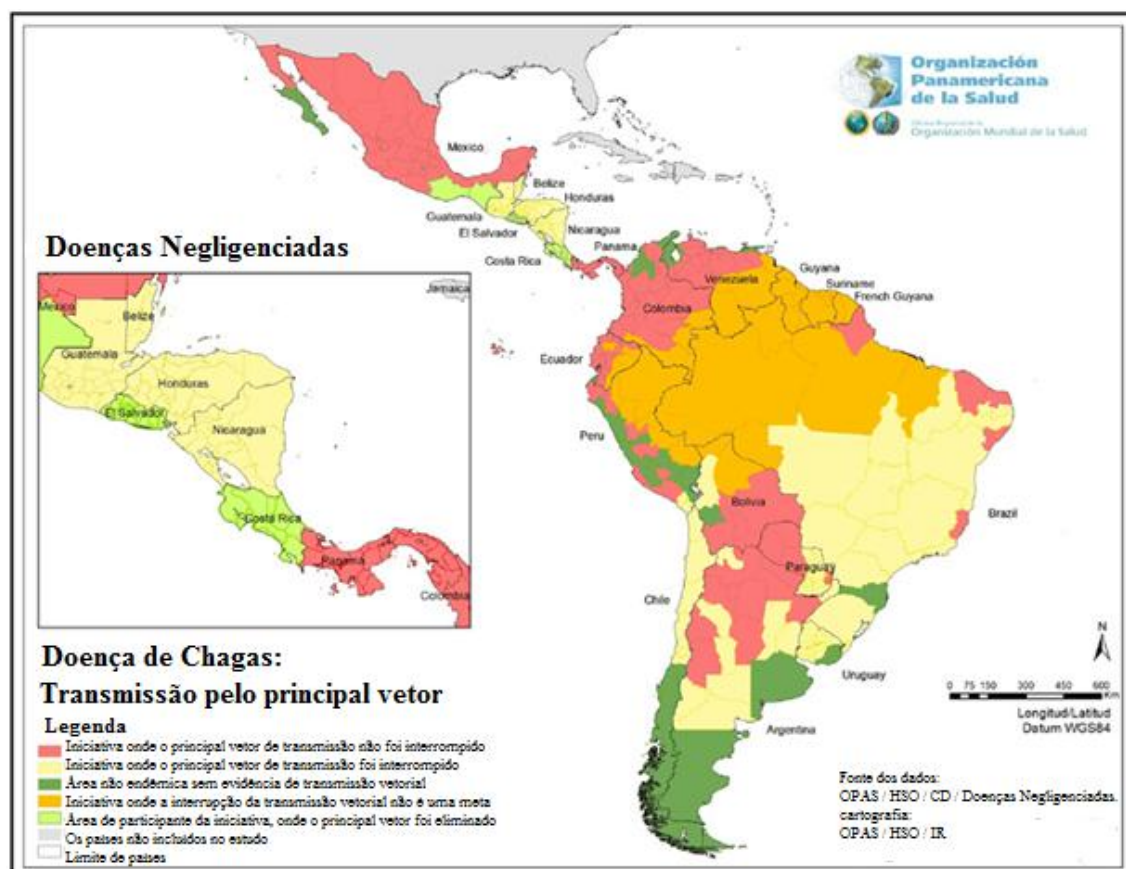
Tabela 1: As estimativas sobre o número de imigrantes latino-americanos na Espanha, por país de origem, número esperado de imigrantes com infecção *T. cruzi*, e destes, o número esperado com necessidade de atenção médica. (3)

Países	Número de imigrantes	Nº estimado de imigrantes infectados com <i>T. cruzi</i>	Nº estimado de imigrantes que poderão precisar de atenção médica
Argentina	196.447	16.109	3.222
Bolívia	236.023	36.348	7.270
Brasil	119.209	1.550	310
Chile	48.939	1.370	274
Colômbia	284.043	11.078	2.216
Costa Rica	1.651	71	14
Equador	415.535	4.986	997
El Salvador	5.029	307	61
Guatemala	3.424	270	54
Honduras	21.520	1.248	250
México	23.673	166	33
Nicarágua	8.391	143	29
Panamá	2.228	201	40
Paraguai	66.950	6.226	1.245
Peru	123.173	3.695	739
Uruguai	61.407	737	147
Venezuela	61.069	2.443	489
Total	1.678.711	86.948 (5.2%)	17.390

Fonte: Schmunis G. A., Yadon Z.E., 2010 (3). Adaptado pelo autor.

Cerca de dez milhões de pessoas estão infectadas à nível mundial e cerca de 25 milhões de pessoas estão em risco de adquirir a tripanossomíase (2). Estima-se que 14 mil pessoas morrem a cada ano em todo o mundo (3) e que 100 milhões de pessoas nas Américas vivem em áreas de exposição e estão em risco de contrair esta doença (38).

Figura 5: Distribuição geográfica da doença de Chagas nas Américas de acordo com a situação do principal vetor de transmissão de cada área. Ano de 2011 (39).



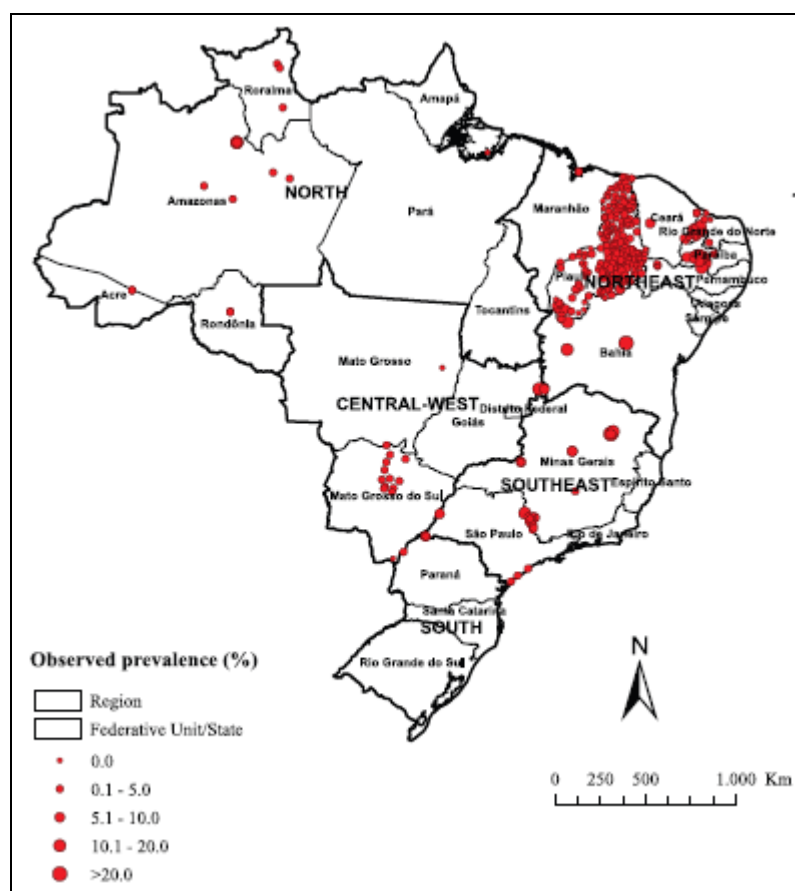
Fonte: Pan American Health Organization, 2011. Adaptado pelo autor.

Desde o início de 1990, os países afetados pela doença de Chagas, especialmente aqueles onde a doença é endêmica, tem se organizado para proporcionar uma resposta relacionada à saúde pública. Junto com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), um esquema bem sucedido foi gerado pelas iniciativas sub-regionais de Prevenção e Controle da Doença de Chagas. Estas iniciativas têm sido desenvolvidas no México (2004), Cone Sul (1992), América Central (1997), países andinos (1998) e os países amazônicos (2003). Eles têm contribuído para a melhoria substancial da situação por meio da interrupção da transmissão vetorial no todo ou parte do território dos países em questão, da remoção de espécies não-nativas de vetores, da implementação do rastreio universal de doadores de sangue, triagem de casos congênitos, reduzindo a prevalência em crianças, diminuição da morbidade, cobertura ampliada para o diagnóstico e o acesso ao tratamento, melhorando a qualidade do diagnóstico, tratamento clínico e tratamento das pessoas infectadas (39).

Após a redução significativa do vetor e da transmissão transfusional do *Trypanosoma cruzi* no Brasil, o número de casos com a forma aguda da doença de Chagas foi reduzido

drasticamente (40). A redução de mortalidade específica e aumento da sobrevivência dos indivíduos infectados é uma consequência de um melhor conhecimento sobre a história natural da doença e melhoria dos cuidados clínicos e cirúrgicos (41, 42, 43). Estimativas apontam que 2-3 milhões de pessoas estão infectadas no Brasil (43, 44), com cerca de 6000 mortes por ano (45, 46, 47).

Figura 6: Distribuição espacial da prevalência observada de doença de Chagas na população brasileira (42).



Fonte: Martins-Melo, F.R.; Heukelbach, J., 2013.

A fase crônica da doença de Chagas é o período mais longo durante a sua evolução após a fase aguda ou inicial da doença. Os dois a três meses da fase aguda são seguidos por um período de tempo no qual é dito crônico, inicialmente assintomático, sem alterações eletrocardiográficas e/ou radiológicas no coração, esôfago ou cólon, o que foi descrito por Carlos Chagas (1916) como a “forma crônica indeterminada”. Este conceito foi validado por um grupo de especialistas durante a Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, realizado em Araxá, Minas Gerais (MG), Brasil e é conhecido que a cada ano, de 2-5% dos casos desta forma clínica iria evoluir para formas sintomáticas cardíacas ou digestivas (47).

Na Argentina, a transmissão vetorial foi interrompida em 13 das 19 províncias endêmicas (2). Grandes progressos nesse sentido também foram feitos tanto no Paraguai como na Bolívia. Em todos os países endêmicos é obrigatória a análise para *T. cruzi* dos órgãos, sangue, células e tecidos doados (32). No entanto, o influxo de imigrantes de países endêmicos está fazendo com que a doença de Chagas se torne um importante problema de saúde nos EUA, no Canadá, em muitas partes da Europa e no Pacífico ocidental, onde um crescente número de pessoas infectadas foi identificado (32). O destino mais comum para os imigrantes da América Latina são os EUA, onde cerca de 300.167 pessoas (principalmente do México) estão infectadas com o *T. cruzi* (32).

Como os movimentos da população, aumentou-se a possibilidade de transmissão por transfusão sanguínea, tornando-se a causa mais importante de infecção nos Estados Unidos. Em razão disso, a transfusão de sangue e os enxertos de tecidos estão agora ativamente monitorados nos EUA, buscando desta forma minimizar esse risco (32).

3.1.3 Sinais e Sintomas

3.1.3.1 Fases, Formas e Evolução Clínica

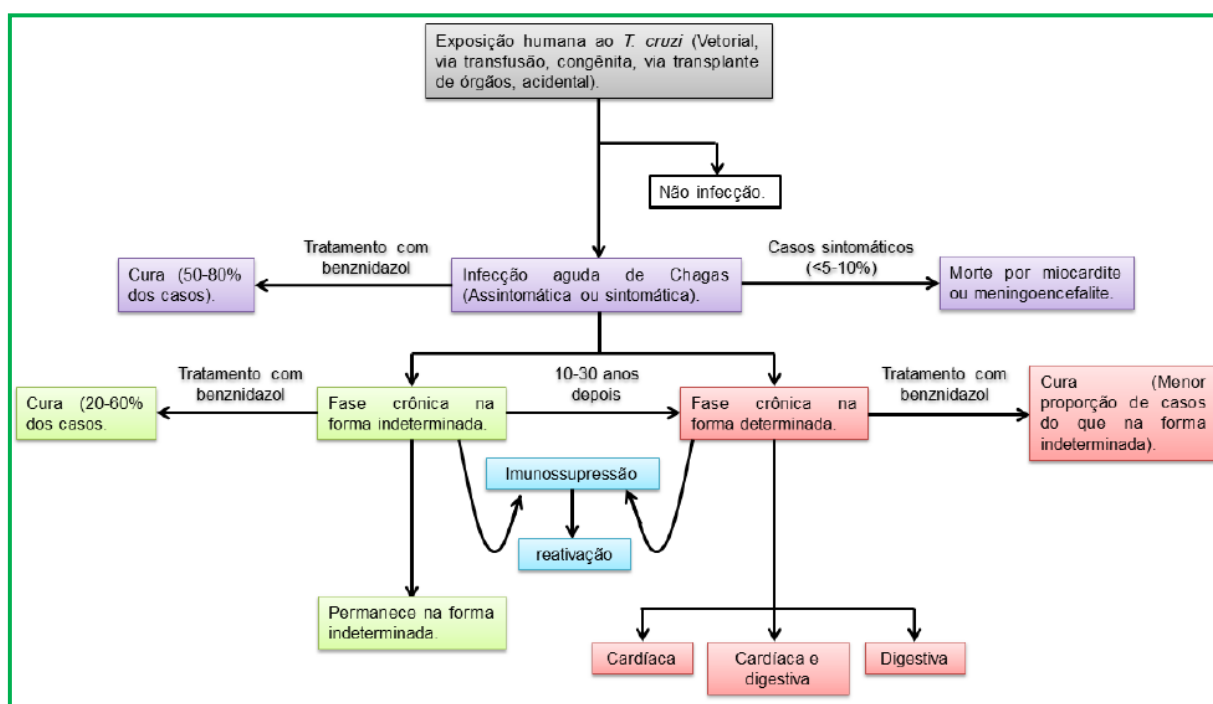
Os determinantes da doença de Chagas vêm da quantidade de parasitas na infecção inicial, as formas infectantes na inoculação (número de tripomastigotas), a linhagem dos *T. cruzi* inoculados (I, II, Z3 ou I/Z3 híbrido, reclassificado hoje como TCI-TcVI), as reinfecções, a qualidade das estirpes e clones (biodemas); os receptores clonal-histotrópicos específicos do hospedeiro e resposta imunitária inicial do paciente (48, 49, 50, 51, 52).

A forma aguda tem características clínicas de uma infecção generalizada, de gravidade variável, sendo o diagnóstico sugerido pela presença dos sinais de porta de entrada (sinal de Romaña, chagoma cutâneo) (**Figura 7**) e comprovado pelo encontro dos parasitos no sangue periférico (exame a fresco ou gota espessa) (1).

Figura 7: Sinal de Romaña (1).

Fonte: Fundação Oswaldo Cruz.

As manifestações clínicas da fase aguda da doença resolvem-se espontaneamente em cerca de 90% dos indivíduos infectados, mesmo se a infecção não for tratada com drogas tripanocidas. Cerca de 60 a 70% desses pacientes nunca irão desenvolver a doença clínica evidente. Esses pacientes têm a forma indeterminada da doença crônica, que se caracteriza pela positividade para anticorpos contra o *T. cruzi* no soro, um eletrocardiograma (ECG) normal e exame radiológico normal do tórax, esôfago e cólon. O restante, 30 a 40% das pessoas infectadas irão desenvolver subsequentemente a doença crônica na sua forma determinada – ou seja, cardíaca, digestiva (megaesôfago e megacólon), ou cardiodigestiva – isso ocorre geralmente de 10 a 30 anos após a infecção inicial (**Figura 8**) (53).

Figura 8: Possíveis manifestações clínicas da doença de Chagas no homem.

Fonte: RASSI, A. Jr; RASSI, A. , 2010.

Estudos clínicos têm mostrado que os fármacos (Nifurtimox e Benznidazol (**Figura 1**)) têm atividade significativa na fase aguda (até 80% de cura parasitológica, que é definida como negatização de testes sorológico e parasitológico (54)), mas a sua eficácia varia de acordo com a área geográfica, provavelmente devido a diferenças na sensibilidade às drogas entre as diferentes cepas de *T. cruzi* (54, 55).

3.1.3.2 Fase Aguda

A doença de Chagas apresenta uma fase inicial ou aguda com alta parasitemia, visto em exames de sangue diretos. Na maioria dos casos, é assintomática. Os casos sintomáticos podem mostrar o ponto de entrada, que tem como sinais o chagoma de inoculação ou sinal de Romaña (**Figura 7**), febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite, em casos graves (29). Durante a fase aguda, a intensidade e localização das lesões dependem da idade do paciente. Em geral, a fase aguda é muito grave entre crianças menores de 2 anos de idade, e é quase sempre fatal entre aqueles com miocardite, insuficiência cardíaca e meningoencefalite (56). O prognóstico também pode ser muito ruim em casos da forma congênita, levando assim não só ao aborto e prematuridade, mas também a lesões no fígado, baço, coração e sistema nervoso central, com sequelas neurológicas e deficiência mental. A fase aguda também pode ser severa em pessoas com o sistema imunológico debilitado (28).

Em casos que os sintomas se desenvolvem durante a fase aguda, eles normalmente desaparecem espontaneamente dentro de 3 a 8 semanas, em cerca de 90% dos indivíduos (31). Apesar de os sintomas desaparecerem, a infecção persiste e entra numa fase crônica. Em relação aos indivíduos com doença de Chagas crônica, 60 a 80% nunca irão desenvolver sintomas (chamado doença de Chagas crônica indeterminada), enquanto o restante 20 a 40% irão desenvolver risco cardíaco e/ou distúrbios digestivos durante a sua vida (chamada de doença de Chagas crônica determinada). Em 10% dos indivíduos a doença progride diretamente da fase aguda para fase crônica sintomática (31).

3.1.3.3 Fase Crônica

O desenvolvimento clínico da fase crônica da doença de Chagas vai desde a ausência de sinais e sintomas (na forma indeterminada) até os quadros onde a doença é grave e há risco de morte prematura. As manifestações clínicas da fase crônica estão relacionadas com o envolvimento patológico de órgãos específicos, nomeadamente o coração, esôfago e cólon, que são agrupados em três grandes formas da doença: cardíacos, digestivos, ou cardio-digestiva (29, 31). A doença cardíaca é o aspecto clínico mais importante da doença de Chagas, devido a sua frequência e gravidade. A fase crônica dura por toda a vida e resulta em uma taxa de sobrevivência encurtada (37, 56, 57).

Na condição crônica ao longo da vida, a resposta imune celular limita a proliferação do parasita, mas não é capaz de erradicar a infecção, o que leva a uma sustentada resposta inflamatória que é a base do desenvolvimento de um ou mais das formas crônicas sintomáticas da doença (58).

Cerca de dois terços das pessoas com sintomas crônicos têm problemas cardíacos, com destaque para miocardiopatia dilatada, que é caracterizada por disfunção ventricular com insuficiência cardíaca, arritmias, bloqueios cardíacos, morte súbita e eventos tromboembólicos (29, 37). Estima-se que um terço dos pacientes desenvolvem danos ao sistema digestivo, resultando em dilatação do trato digestivo (megaesôfago e megacólon), acompanhado de perda de peso severa. Dificuldades de deglutição (acalasia secundária) pode ser o primeiro sintoma de distúrbios digestivos e pode levar à desnutrição (59). O megaesôfago provoca disfagia com odinofagia, combinado com dor epigástrica, regurgitação, sialorréia e desnutrição em casos graves. O megacólon, muitas vezes, afeta o segmento sigmoide, reto ou cólon descendente ou uma combinação desses; e produz obstipação prolongada, distensão abdominal e, ocasionalmente, grande obstrução intestinal devido ao fecaloma ou ao volvo sigmoide.

A forma digestiva é encontrada quase que exclusivamente ao sul da bacia amazônica (principalmente na Argentina, Brasil, Chile e Bolívia), e é rara no norte da América do Sul, América Central e México. Esta distribuição geográfica é devida provavelmente a diferenças nas estirpes dos parasitas (61, 62, 63).

A forma cardíaca desenvolve-se em 20 a 30% dos indivíduos e, normalmente, leva a alterações do sistema de condução sanguíneo, bradiarritmias e taquiarritmias, aneurismas apicais, insuficiência cardíaca, tromboembolismo e morte súbita (58). As anomalias mais comuns do ECG são o bloqueio do ramo direito, o bloqueio fascicular anterior esquerdo,

batimentos ventriculares prematuros, entre outros. A combinação de bloqueio do ramo direito e bloqueio fascicular anterior esquerdo é muito comum na doença de Chagas (29). A insuficiência cardíaca é frequentemente uma manifestação tardia da doença de Chagas e está associada com maior mortalidade do que a insuficiência cardíaca de outras causas (64, 65). Geralmente é biventricular, com predomínio de falência no lado direito (edema periférico, hepatomegalia e ascite, mais proeminentes do que congestão pulmonar) em estágios avançados (29).

A associação de doença cardíaca com megaesôfago ou megacólon, ou ambos, define a forma cardiodigestiva da doença de Chagas. Na maioria dos países, o desenvolvimento de megaesôfago geralmente precede o acometimento do coração e do cólon, mas a prevalência exata da forma cardiodigestiva não é conhecida por causa da escassez de estudos adequados (29).

3.1.4 Transmissão do *T. cruzi*

3.1.4.1 Transmissão pelo Vetor

A doença de Chagas é transmitida aos seres humanos e a várias espécies de animais domésticos (por exemplo, cães, gatos) e mamíferos selvagens (por exemplo, roedores, marsupiais e tatus), principalmente pelos insetos hematófagos triatomíneos da subfamília *Triatominae*. Considera-se três ciclos que se sobrepõem: doméstico, peridoméstico e silvestre (66).

A maioria das espécies de triatomíneos é silvestre e a transmissão de *T. cruzi* para hospedeiros mamíferos estão associados com esse habitat. No entanto, pelo menos 10 espécies de triatomíneos aparentam ter populações estritamente domésticas em específicas regiões da América Latina, enquanto que mais de 20 espécies estão descritas como vetores secundários porque muitas vezes eles invadem as casas, caracterizando o ciclo peridoméstico. Para considerar a interação entre subpopulações de *T. cruzi* e seus diferentes vetores, tem-se a divisão em quatro regiões atualmente tema das iniciativas de controle multinacionais (67):

- ❖ **México e a América Central:** Nesta região de oito países (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Panamá), os principais vetores domésticos são *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*;

- ❖ **Países andinos:** Nos quatro países, Venezuela, Colômbia, Equador e Peru, os vetores domésticos são *R. prolixus* , *R. ecuadoriensis* , *T. dimidiata* , *T. maculata* e *T. infestans*;
- ❖ **Países amazônicos:** Esta região envolve partes de nove países, Brasil, Peru, Colômbia, Bolívia, Venezuela, Equador, Guiana, Suriname e Guiana Francesa. Embora a região amazônica tenha sido muito afetada por mudanças na agricultura nas últimas décadas, não há nenhuma evidência de uma colonização permanente em domicílios humanos por uma espécie de triatomíneos associados com padrões de transmissão de *T. cruzi*.
- ❖ **Países do Cone Sul** - Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai - *T. infestans* é o principal vetor (67).

Os lugares de vegetação densa (como florestas tropicais) e habitats urbanos não são ideais para o estabelecimento do ciclo de transmissão humana. No entanto, em regiões onde o habitat silvestre e sua fauna são diluídos pela exploração econômica e ocupação humana, como em áreas recém-desmatadas, áreas de cultura de palmeiras piaçava, e em algumas partes da região amazônica, um ciclo de transmissão humana pode desenvolver-se quando os insetos forem em busca de novas fontes de alimento (51).

Triatomíneos adultos de ambos os sexos, podem abrigar e transmitir o *T. cruzi*. A probabilidade de um triatomíneo estar infectado com *T. cruzi* aumenta de acordo com o número de repastos sanguíneos realizados pelo mesmo, de modo que insetos mais velhos e adultos tendem a ter maiores taxas de infecção (29).

3.1.4.2 Outras Formas de Transmissão

A doença de Chagas pode ser transmitida ao homem por mecanismos que não incluem o inseto vetor, tais como transfusão de sangue, congenitamente da mãe para o bebê durante a gestação, ou através do leite materno (68). A transmissão materno-fetal do *Trypanosoma cruzi* tem sido relatada em vários países da América Latina, como a Argentina (69, 70, 71), Bolívia (72, 73, 74, 75), Brasil (76, 77), Chile (78) e Paraguai (79), a taxas de até 12% de mães infectadas (80, 81).

Nos casos em que houver suspeita de transmissão congênita, é necessária a realização do teste sorológico materno e, posteriormente, o teste parasitológico no recém-nascido. Sendo o resultado positivo, o tratamento etiológico deve ser iniciado imediatamente (82).

O risco de contrair a doença após transfusão de sangue proveniente de um doador infectado é inferior a 10-20%, e depende de vários fatores, incluindo a concentração de parasitas no sangue do doador, o componente do sangue transfundido, e, talvez, a estirpe do parasita (83). Em regiões não endêmicas, como os EUA e Canadá, e em muitas partes da Europa, alguns casos de infecções mediadas por transfusão sanguínea e transplante de órgãos foram relatadas (84), mas o número real de casos pode ser substancialmente maior por causa do grande número de imigrantes de áreas endêmicas da América Latina. No México, estudos mostraram resultados onde a prevalência da infecção em gestantes foi de 7,32 % (106/1448) em geral (82).

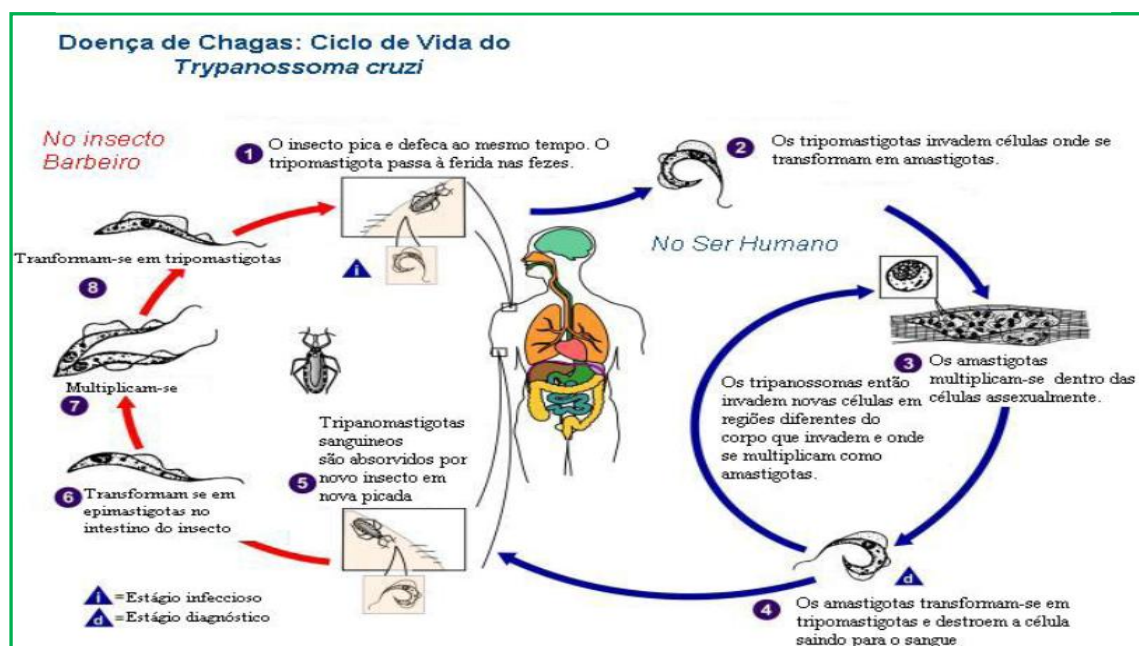
A doença de Chagas pode também ser contraída por ingestão de alimentos ou líquidos contaminados com *T. cruzi*, e também por acidentes nos laboratórios que lidam com os parasitas vivos. A transmissão oral da doença de Chagas é normalmente responsável por surtos de infecção aguda em regiões desprovidas de insetos vetores. A ingestão de alimentos contaminados, como caldo de cana-de-açúcar, açaí, ou carne crua, é geralmente associada a uma infestação parasitária maciça, resultando em uma manifestação clínica aguda mais severa e de alta mortalidade. Em 2007, foi relatado um surto na Venezuela, onde 103 crianças teriam ingerido suco de goiaba contaminado (85, 86).

Apesar da doença de Chagas ser considerada controlada devido às estratégias de controle vetorial e transfusional, casos agudos são notificados, sobretudo por transmissão oral e congênita, levando à preocupação do ressurgimento da doença (87, 88).

3.1.5 Ciclo de Vida do *T. cruzi*

O ciclo de vida de *T. cruzi* é complexo, com vários estágios de desenvolvimento em insetos vetores e mamíferos hospedeiros. Tripomastigotas não replicativos, na corrente sanguínea, e amastigotas intracelulares replicativos, são as formas típicas do organismo, que são identificadas em hospedeiros mamíferos, enquanto epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos replicativos infecciosos infectam o vetor triatomíneo (**Figura 9**) (39).

Figura 9: Transmissão pelo vetor e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: UMESH S. PAL, 2011

A transmissão pelo vetor se dá inicialmente pela penetração da membrana mucosa intacta do olho por tripomastigotas infecciosos e leva a uma reação indolor da conjuntiva, com edema unilateral de ambas as pálpebras e linfadenite do gânglio da pré-auricular (sinal de Romana); uma picada em qualquer outra parte da pele pode conduzir a uma reação no tecido subcutâneo com edema local e endurecimento, congestão vascular e infiltração celular (chagoma). As tripomastigotas na célula hospedeira escapam a partir do vacúolo parasitóforo e são libertados para o citoplasma por um mecanismo não usual: tripomastigotas transformam-se em amastigotas esféricas que começam a replicação, e quando a célula local fica inchada com amastigotas, transformam-se de volta para tripomastigotas com crescimento de flagelos. As tripomastigotas lisam as células infectadas, invadem os tecidos adjacentes e se espalham através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para locais distantes, principalmente células musculares (cardíaca, lisa e esquelética) e as células ganglionares, onde se submetem a novos ciclos de multiplicação intracelular (39).

Durante a fase aguda, todos os tipos de células nucleadas no hospedeiro humano são alvos potenciais para a infecção. Com o desenvolvimento da resposta imunológica, o número de parasitos nos tecidos diminui substancialmente, indicando o fim da fase aguda. No entanto, uma vez que o parasito não é completamente eliminado, a infecção de tecidos específicos, tais como o músculo ou gânglio entérico, persiste indefinidamente na vida do hospedeiro (89).

Quanto à diversidade genética do *T. cruzi*, em 1999, chegou-se a um consenso sobre as cepas de *T. cruzi* e duas linhagens principais foram descritas (90). *T. cruzi* I, que predomina no ciclo de transmissão silvestre, aparenta ser menos resistente a drogas tripanocidas, e está associado à doença humana em todos os países endêmicos ao norte da bacia amazônica. *T. cruzi* II, que predomina no ambiente doméstico em todos os países do Cone Sul, aparentemente aumentou a resistência aos medicamentos tripanocidas e, ao menos no Brasil e na Argentina, foi comprovadamente relacionado com o dano tecidual causado pela doença de Chagas (91). TcI é o mais abundante e largamente disperso de todas as cepas do *T. cruzi* nas Américas. Pode ser encontrado em toda a gama de triatomíneos, e podem estar associados com os ciclos silvigenético e domésticos. A infecção humana com TcI é concentrada no norte de América do Sul e Central, e está associada com cardiomiopatia da doença de Chagas (92).

3.1.6 Diagnóstico

Na fase aguda e nas formas crônicas da doença de Chagas, o diagnóstico etiológico poderá ser realizado pela detecção do parasito através de métodos parasitológicos (diretos ou indiretos) e pela presença de anticorpos no soro, através de testes sorológicos sendo os mais utilizados a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Hemaglutinação (HAI) e Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Testes de maiores complexidades como o teste molecular, utilizando Polymerase Chain Reaction (PCR) e o Western blot (WB) têm apresentado resultados promissores e poderão ser utilizados como teste confirmatório tanto na fase aguda como nas formas crônicas da doença (1).

A grande exigência hoje é para um teste rápido com alta sensibilidade, especificidade e estabilidade para o trabalho de campo e emergências do banco de sangue, em diferentes áreas geográficas onde as diferentes cepas e clones de *T. cruzi* circulam (6).

3.1.6.1 Diagnóstico na Fase Aguda

O diagnóstico da infecção aguda é baseado na detecção microscópica de tripomastigotas no sangue (2). O diagnóstico é realizado através dos exames parasitológicos diretos e indiretos. Os exames parasitológicos possuem uma grande especificidade e

sensibilidade devido à alta parasitemia presente na fase aguda da doença. Já os métodos parasitológicos de concentração tais como micro-hematócrito e teste de Strout são indicados quando os exames parasitológicos convencionais apresentam resultados negativos e o indivíduo apresenta grandes suspeitas de infecção aguda (87). Essas abordagens podem apresentar sensibilidade entre 80 a 90%. Apesar da elevada produção de anticorpos da classe IgM durante a fase aguda, o diagnóstico sorológico se torna difícil devido a indisponibilidade de kits comerciais registrados na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e à carência de controles positivos para IgM (93).

Atualmente, existe a necessidade de desenvolvimento de métodos de diagnósticos sorológicos para a fase aguda (identificação de IgM), principalmente testes rápidos que possam ser usados em locais de difícil acesso (93).

3.1.6.2 Diagnóstico na Fase Crônica

O diagnóstico da fase crônica tem como base os exames sorológicos devido à alta quantidade de anticorpos que existe nesta fase. Assim, os exames parasitológicos diretos ou indiretos não são recomendados, pois apresentam baixa sensibilidade (94). O Ministério da Saúde preconiza a realização de dois testes sorológicos de princípios metodológicos ou preparações antigênicas diferentes, onde os mais recomendados são o ELISA, o HAI (Hemaglutinação Indireta) e o RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta). Apesar da elevada sensibilidade e especificidade apresentada por estes testes, algumas desvantagens podem ser descritas, com relação principalmente a dois aspectos: 1) Resultados falso-positivos, em virtude de determinantes antigênicos comuns entre *T. cruzi* e outros parasitas; 2) Resultados inconclusivos, principalmente em bancos de sangue, levando ao descarte desnecessário de bolsas de sangue. Além disso, alguns empecilhos operacionais também podem estar envolvidos durante a realização da técnica levando à necessidade de ajuste técnico e/ou modificações nas preparações antigênicas ou à utilização de novas abordagens mais simples e mais eficazes (95).

3.1.7 Tratamento Clínico

Atualmente, o fármaco de escolha é o Benznidazol (**Figura 1**). Ele possui capacidade limitada quanto à cura parasitológica (eliminação completa do *T. cruzi*), sendo mais eficaz no início da infecção, mas não é limitado aos casos na fase aguda. Em pacientes crônicos, a resistência a esta droga tem sido relatada (96) e em vários estudos observacionais feitas nas últimas décadas (97-99), o tratamento com BZD retardou o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia em adultos com longa infecção crônica (99). Outros problemas relacionados à utilização do BZD são, por exemplo, o grande número de efeitos colaterais apresentados durante a terapia (anorexia, vômitos, alergias) e o fato do *T. cruzi* apresentar linhagens diferentes de acordo com a localização geográfica, mostrando, assim, eficácia diferente, além da grande dificuldade na prescrição de uma dose adequada (96). O Nifurtimox não é utilizado no país, em razão da sua ineficácia e dos seus efeitos adversos (96).

A fase aguda nem sempre é diagnosticada, seja pelas manifestações clínicas serem parecidas com outras patologias ou por desinformação das pessoas quanto à doença e sintomas chagásicos. Dessa forma, ocorre a passagem para a fase crônica da doença, cujo atual tratamento é bastante limitado, configurando então a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos eficazes para a doença em questão.

Até pouco tempo não existiam formulações pediátricas, apesar do fato de crianças até 12 anos possuírem maiores chances de se beneficiarem com o tratamento, por não apresentarem ainda a sintomatologia crônica da doença. Porém, uma concentração pediátrica do Benznidazol para a doença de Chagas – desenvolvida pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), em parceria com a DNDI (Drugs for Neglected Diseases Initiative - Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas) – já está disponível para compra via Fundo Estratégico da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) ou por contato direto com o laboratório. O novo medicamento será utilizado em crianças a partir de dois anos de idade (100).

Embora a taxa de cura diminua com tempo que um adulto foi infectado com Chagas, o tratamento com Benznidazol tem demonstrado adiar o aparecimento de doenças do coração em adultos com infecção crônica (65). O tratamento da infecção crônica em mulheres, antes ou durante a gravidez, não parece reduzir a probabilidade de a doença ser repassada para o bebê. Da mesma forma, não está claro se o tratamento profilático da infecção crônica é benéfico em pessoas que serão submetidas a imunossupressão (65).

3.1.8 Desenvolvimento de Novas Drogas

A indústria farmacêutica apresentou, ao longo de sua história, um ritmo acelerado de inovações tecnológicas que resultaram em um fluxo contínuo de novos produtos no mercado. Essas foram quase sempre implementadas por empresas a partir de elevados investimentos em pesquisa e desenvolvimento tecnológico (P&D), mas em estreita cooperação com outras instituições, em geral públicas ou sem fins lucrativos. Entretanto, no período entre 1975 e 2004, apenas 1% dos 1.535 novos fármacos registrados foram destinados às doenças tropicais. Esses dados sugerem que o investimento em P&D de fármacos para doenças negligenciadas é inadequado, sendo evidenciado pelo fato de o investimento em malária ser pelo menos 80 vezes menor que o para HIV/ AIDS (101). Como uma das ações tomadas no objetivo de intervir nessa situação, a Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas (DNDi) pesquisa e desenvolve novos tratamentos para as doenças negligenciadas e atualmente, ela tornou disponíveis dois novos tratamentos para malária, um para doença do sono (tripanossomíase africana), um para leishmaniose visceral, uma combinação de drogas contra leishmaniose visceral específica para a Ásia e um tratamento pediátrico com dose adaptada para doença de Chagas. Outros 12 compostos químicos estão em fase de desenvolvimento (102).

Em 2003, sete organizações do mundo se uniram para fundar a Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDI), que desde o mesmo ano configura-se como entidade jurídica, além de uma organização de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos que não visa lucro e que acima de tudo é conduzida pelas necessidades dos pacientes (104). Das sete organizações envolvidas na fundação, cinco são instituições do setor público, uma é organização humanitária e uma organização internacional de pesquisa, são elas: o Instituto Pasteur, Conselho Indiano de Pesquisa Médica, Instituto de Pesquisas Médicas (Quênia), Médicos Sem Fronteiras, Ministério da Saúde (Malásia), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz – Brasil) e o Programa Especial da OMS para a Pesquisa e Treinamento sobre Doenças Tropicais (TDR). A DNDI tem como principal objetivo fornecer até 2018, de 11 a 13 novos tratamentos para a leishmaniose, a doença do sono (THA), a doença de Chagas, a malária, HIV pediátrico e filarioses.

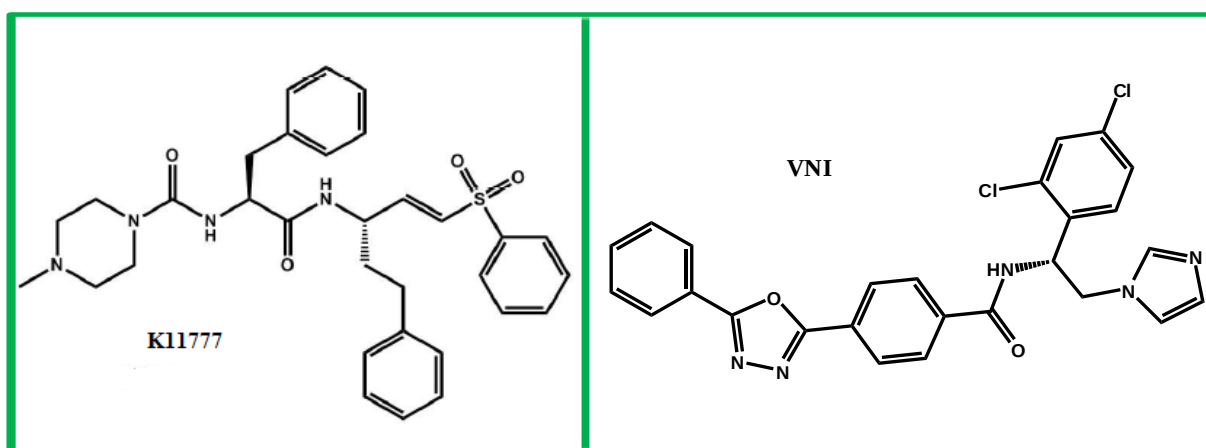
O mundo acadêmico no plano mundial registra, analogamente, baixo interesse pelas doenças negligenciadas, a julgar pelo número de publicações nos últimos 40 anos. Doenças negligenciadas e não-negligenciadas com o mesmo número de anos de vida adaptados à incapacidade (DALY, Disability-Adjusted Life Year), se trata de um indicador validado pela OMS, que avalia a prevenção e prioridades em saúde. Esse indicador apresenta o número de

publicações expressivamente diferentes, nos bancos de dados *Web of Science* e *PubMed*. Enquanto as publicações sobre doenças não-negligenciadas tiveram ascensão significativa, aquelas relativas a doenças negligenciadas registraram discretíssimo aumento no período pesquisado (105).

A doença de Chagas é considerada como extremamente negligenciada, o que ilustra uma realidade preocupante face às necessidades das populações mais pobres e vulneráveis do planeta (30). As pesquisas por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas têm evoluído sensivelmente nas últimas décadas, com destaque para o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* (104) que permitiu a identificação de vários genes, muitos deles existentes apenas no parasita e não no homem. Esses estudos recentes têm permitido a identificação de alvos potenciais no *T. cruzi* e que incluem o metabolismo de esteróis, o ADN e diferentes enzimas (30).

Através do planejamento de fármacos baseado na estrutura, duas moléculas foram recentemente desenvolvidas e agora são consideradas fortes candidatos a fármacos: K11777, um derivado peptidil que inibe cruzaina (106), e VNI, um derivado oxadiazol e inibidor de atividade da 14- α -desmetilase (106, 107), (**Figura 10**). Elas foram selecionadas para iniciar ensaios clínicos, no entanto, as chances de qualquer droga que está em estágio clínico ser aprovada, são baixas. Portanto, o número de potenciais candidatos a fármacos deve ser expandido.

Figura 10: Estruturas químicas do VNI e K11777.



Fonte: DOYLE, P.S., et al. , 2011; VILLALTA, F., et al. 2013.

3.1.9 Alvos Terapêuticos

Os fatores atuais mais importantes na descoberta de novos fármacos envolvem isolamento, identificação e caracterização de novos compostos, bem como de suas propriedades moleculares e cinéticas. A validação de um novo alvo por método químico ou genético tem conduzido, frequentemente, ao estudo da otimização das propriedades farmacológicas e toxicológicas de possíveis inibidores para o tratamento da doença de Chagas (108, 109).

A análise genômica e proteômica do protozoário causador da doença de Chagas, *T. cruzi*, datam do ano de 2005 (110). Nestes estudos, houve concomitante análise dos genes e das proteínas celulares presentes em outros tripanossomatídeos patogênicos (110). Estas determinações revelaram novos alvos terapêuticos hipotéticos para o tratamento da doença, como a trans-sialidase, a histidina amônio-liase e a urocano hidratase (enzimas capazes de converter histidina a glutamato no metabolismo do parasito) (110).

Os alvos moleculares da ação de candidatos tripanocidas dependem do conhecimento de vários processos do parasita como, por exemplo, os mecanismos de invasão no hospedeiro. Enzimas chave estão também entre os alvos preferidos para o desenvolvimento de novos fármacos (111).

Os alvos que têm sido explorados para o planejamento racional de fármacos antichagásicos envolvem a inibição seletiva de enzimas fundamentais no desenvolvimento do parasita, segue alguns deles:

- ❖ **Tripanotiona redutase**, relacionada ao estresse oxidativo.
- ❖ **Trans-sialidase**, envolvida na glicosilação de mucinas de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para reconhecimento e adesão do parasita na célula do hospedeiro.
- ❖ **C14D24,25-esterol metiltransferase**, essencial na biossíntese de ergosterol.
- ❖ **Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase**, presente na via glicolítica.
- ❖ **Cisteína protease (Cruzipaína ou Cruzaína)**, relacionadas à atividade proteolítica e penetração do parasita na célula do hospedeiro.

3.1.10 Cisteínas Proteases

Um alvo atraente para o desenvolvimento de drogas, a cruzaina (**Figura 10**) é a principal cisteína protease de *Trypanosoma cruzi* (112, 113), que desempenha um papel fundamental durante a infecção das células hospedeiras, de replicação e de metabolismo (114) e tem sido considerado um alvo importante para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas (113). Esta enzima faz parte da família das papaínas C1 das cisteíno-proteases com especificidade intermediária entre as catepsinas L e B, sendo expressa em diferentes níveis por diferentes estágios do parasita (115).

A cruzaina está envolvida durante a invasão do parasita, a diferenciação e proliferação em células hospedeiras (116). Especificamente, é responsável pela degradação de proteínas da célula hospedeira e, portanto, contribui para o resultado da infecção (117). No que se refere à identificação de inibidores da cruzaina, a maior parte dos esforços tem sido realizada por meio da investigação de compostos peptídicos, como ureias (118, 119), hidrazonas (120, 121, 122, 123) e tiossemicarbazonas (17, 19).

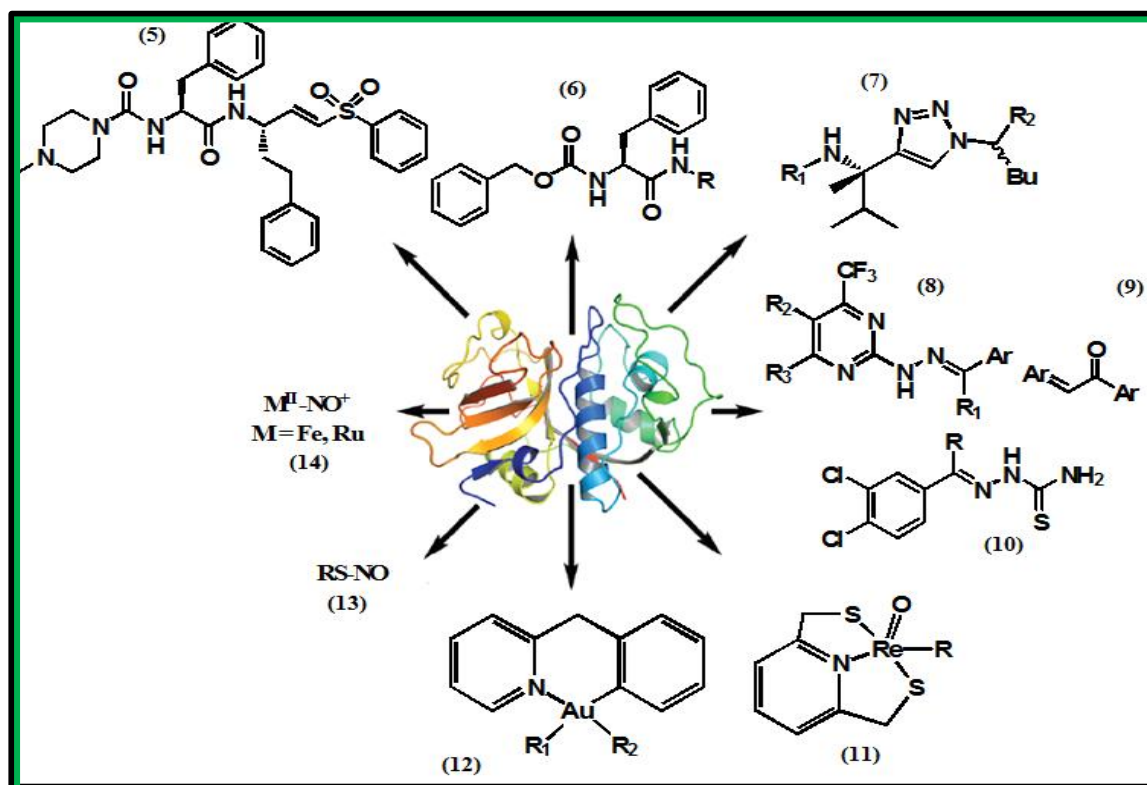
Figura 11: Representação cristalográfica da Cruzaina.



Fonte: KERR *et al.*, 2009.

Certo número de inibidores da cruzaina estruturalmente diversos tem sido relatado. Recentemente, uma ênfase especial tem sido aplicada para identificar inibidores não peptídicos. Com base na relação bioisostérica conhecida entre ligações peptídicas e ureias, os primeiros inibidores não peptídicos da cruzaina identificados foram aril-ureias e tioureias, que exibiram uma afinidade moderada contra cruzaina e atividade antiproliferativa contra culturas de células amastigotas (17). Após estas constatações, tiossemicarbazonas e seus bioisósteros pirazolina-1-tiocarboxiamida foram explorados como inibidores potenciais da cruzaina, uma vez que tioureias e tiossemicarbazonas são classicamente consideradas como bioisósteros. Esta abordagem rendeu agentes altamente eficazes contra a enzima e as culturas de células do parasito. Inspiradas pela potência de tiossemicarbazonas, outras classes de inibidores não peptídicos têm sido desenvolvidas, em cima da cruzaina, explorando amidas funcionalizadas, hidrazonas e triazóis/triazinas, N-acilhidrazonas, vinilsulfonas, e chalconas como protótipos estruturais (13) (**Figura 12**).

Figura 12: Estruturas de alguns inibidores da cruzaina.



Fonte: DIAS, L. C., et al, 2009.

3.1.11 3'-Bromopropiofenona-tiossemicarbazona

Du e colaboradores (2002) realizaram um trabalho que identificou uma nova série de pequenas moléculas fortemente inibidoras da infecção pelo *T. cruzi*, como promissores agentes para a terapia anti-tripanosoma (17).

Dentre as tiossemicarbazonas inicialmente obtidas por Du e colaboradores, o composto **1i** (3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona) (**Figura 3**) apresentou atividade tripanocida significativa, sem causar toxicidade para células hospedeiras ou problemas de solubilidade. As células infectadas e tratadas com o composto **1i** a 10 µM foram curadas da infecção chagásica. Para confirmar a atividade tripanocida, as células infectadas foram tratadas com o composto **1i** durante três semanas e, em seguida, **1i** foi removido da cultura de células. Nenhum parasito foi observado em qualquer um dos sobrenadantes da cultura ou nas células hospedeiras. As células estavam saudáveis e livres do parasito até o experimento ser encerrado em 5-6 semanas após infecção (17).

Seguindo esta linha, mais de 100 compostos foram desenhados e sintetizados. A relação estrutura-atividade (SAR) foi estabelecida e, muitos análogos potentes com valores de CI_{50} na escala nanomolar foram identificados. Oito análogos adicionais apresentaram atividade tripanocida em um ensaio de cultura de células, indicando que ariltiossemicarbazona é uma importante estrutura para a morte dos parasitos. Os estudos cinéticos mostram que estes são inibidores dependentes do tempo.

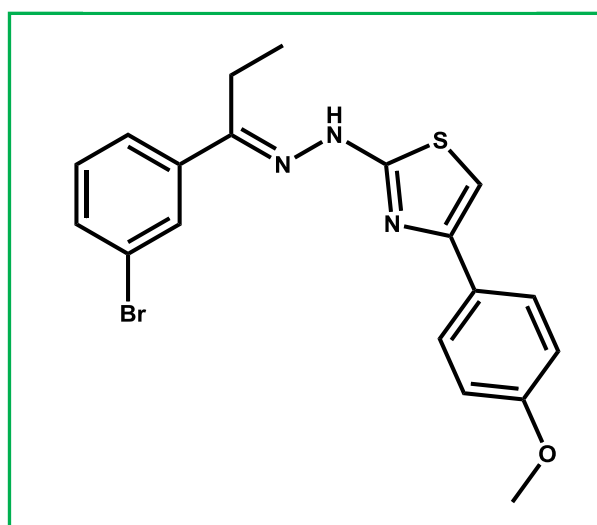
A natureza não peptídica desta série, a pequena dimensão e custo extremamente baixo de produção sugerem que esta é uma direção promissora para o desenvolvimento de nova quimioterapia antitripanosoma (17).

3.1.12 Tiossemicarbazonas e 4-Tiazolinonas

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos em cima do núcleo tiossemicarbazona frente à atividade anti-*T. cruzi* (13, 122, 124). Os mecanismos de ações vêm sendo investigados, como por exemplo, via inibição da cruzaina ou por processo apoptótico. De modo geral, a ligação entre aril tiossemicarbazonas com a cruzaina envolve a ligação covalente da tioamida com o aminoácido Cys25, bem como a localização do grupo aril em um bolso hidrofóbico profundo (124).

Em confirmação ao êxito da linha de síntese de Du e colaboradores, que descreveram a 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona como uns dos mais eficazes inibidores da cruzaina, com atividade tripanocida em níveis que não são tóxicos para células de mamíferos (17)., Gomes e colaboradores sintetizaram tiazóis derivados da 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona, tendo o composto PT01.4 (**Figura 13**), frente a forma tripomastigota, atividade superior ao Benznidazol (**Figura 1**), Nifurtimox (**Figura 1**) e seu composto protótipo (**Figura 3**) (125).

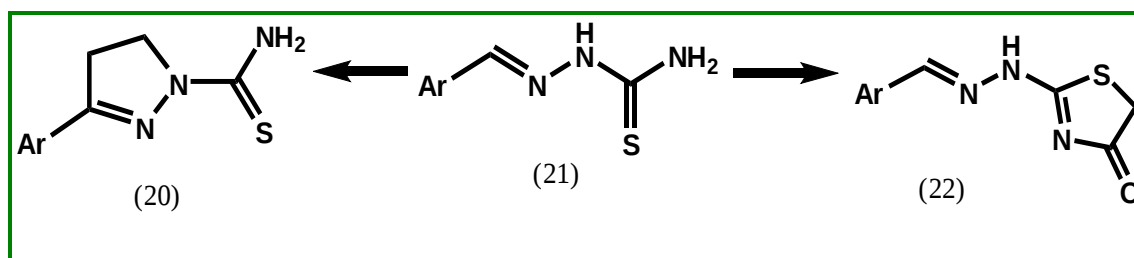
Figura 13: Composto PT01.4



Fonte: Do autor.

Tiossemicarbazonas podem ser vistas como bioisósteros acíclicos e não clássicos de 4-tiazolinonas (22), e como bioisósteros acíclicos para 2-pirazolina-1-tiocarboxamidas (20) (também descritas como potentes inibidores da cruzaina) (20), conforme ilustrado na (**Figura 14**) (126). Além disso, derivados de 4- tiazolinonas foram descritos como tendo atividade antitumoral (86), antibacteriana (87), antifúngica (88), e como agentes antiprotozoários (89)

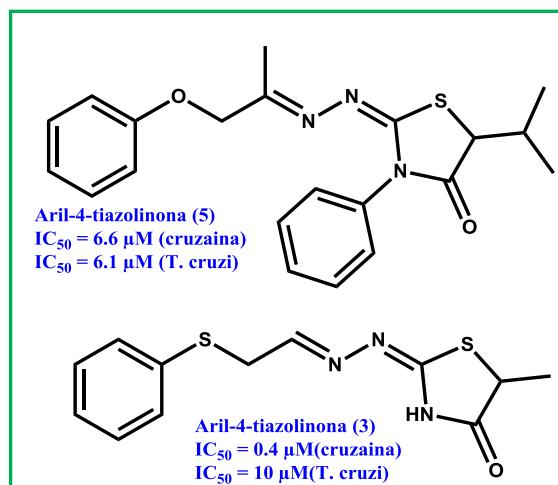
Figura 14: Tiossemicarbazona ao centro (21) e seus bioisósteros: pirazolina (20) e tiazolinona (22).



Fonte: Do autor.

Leite e colaboradores, em estudos prévios, concluíram que compostos da classe das 4-tiazolinonas são ativos contra *T. cruzi* nos ensaios *in vitro*, e em concentrações não tóxicas para células de mamíferos (esplenócitos de ratos), e que sua atividade foi comparável a droga de referência Benznidazol. Logo, essa classe de compostos são promissores candidatos a fármacos tripanocidas (13, 21, 22). Em pesquisas mais recentes, Moreira e colaboradores comprovaram a atividade *anti-T. cruzi* das 4-tiazolinonas, esses novos compostos promoveram a inibição da atividade da cruzaina e a proliferação das epimastigotas do *T. cruzi*, sendo fatais para a forma tripomastigota nos ensaios *in vitro* em concentrações não tóxicas para esplenócitos de ratos. Nos ensaios *in vivo*, destacou-se o composto (5), que conseguiu reduzir a parasitemia sanguínea nos camundongos infectados. Isso indica que as 4-tiazolinonas são novos protótipos estruturais a fármacos antichagásicos (27). A **Figura 15** apresenta a estrutura de alguns dos principais protótipos estruturais do nosso laboratório, baseados em 4-tiazolinonas.

Figura 15: Estrutura de alguns dos principais protótipos a fármacos antichagásicos do nosso laboratório, baseados em 4- tiazolinonas (27).



Fonte: Do autor

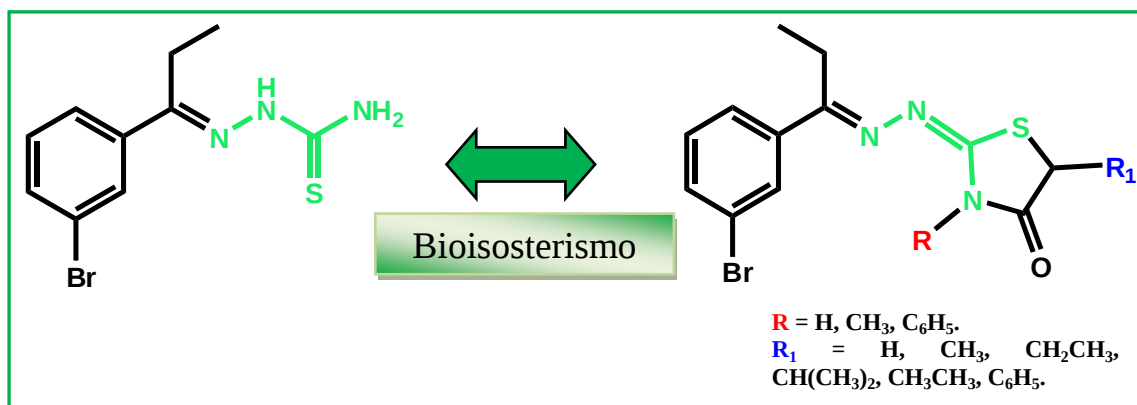
4. Resultados

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Planejamento da Série Química

O planejamento químico das 18 inéditas aril-4-tiazolinonas teve como base o composto **1i** (3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona) (**Figura 3**) (17), descrito por Du como potente para a atividade tripanocida e frente a enzima cruzaina. As modificações estruturais escolhidas foram as inserções de substituintes em posições estratégicas, como por exemplo, na posição N3 do anel tiazolinona e realizada de maneira racional, uma vez que obtivemos sucesso em trabalhos anteriores (27).

Figura 16: Emprego do bioisosterismo para o planejamento das aril-4-tiazolinonas.

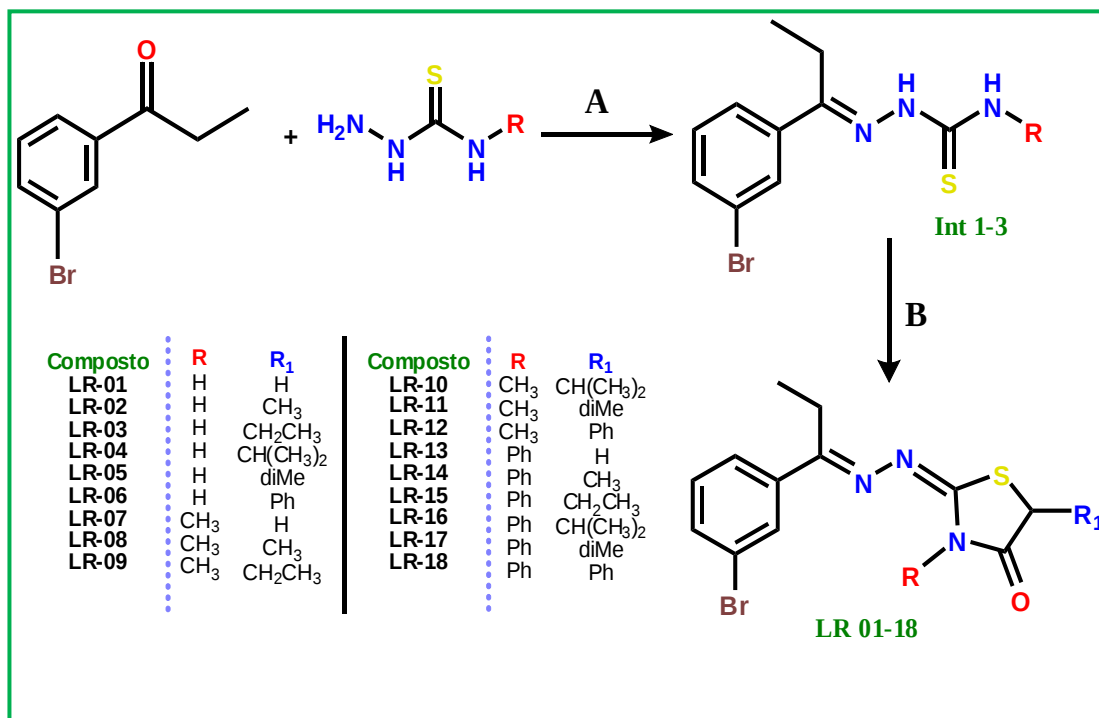


Fonte: Do autor

O **Esquema 1** apresenta a sequência das reações envolvidas na síntese das aril-4-tiazolinonas (**LR-01** a **LR-18**). Foram utilizados reagentes economicamente viáveis e os rendimentos foram considerados satisfatórios (23% a 97%).

Dessa forma, visou-se estabelecer uma análise da relação estrutura-atividade (REA), a confirmação da estrutura química por meio de RMN ^{13}C , RMN ^1H , Infravermelho, Análise elementar e realização dos ensaios biológicos para verificação da atividade antichagásica. Diante do planejamento estrutural realizado, seguimos em direção à síntese dos compostos almejados (**LR 01-18**).

Esquema 1: Rota sintética para obtenção das aril-4-tiazolinonas (**LR 01-18**).



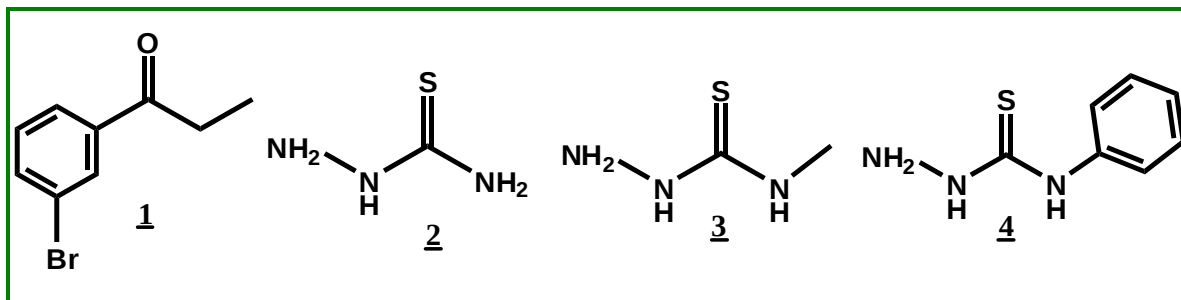
Síntese dos compostos **LR 01-18**. Reagentes e condições: a) Diferentes tiossemicarbazidas, em etanol, irradiação por ultrassom, ácido clorídrico (4 gotas), 2-5 horas; b) Ácidos e ésteres halogenados, etanol, refluxo, acetato de sódio, 20-22 horas.

4.2 Obtenção das moléculas LR 01-18

4.2.1 Síntese dos compostos

A série de tiazolinonas (**LR 01-18**) parte primeiramente da síntese das tiossemicarbazonas (**Int 1-3**) que, por sua vez, são obtidas através da reação de condensação da respectiva tiossemicarbazida com a 3-bromofenilpropanona, ambas adquiridas comercialmente (**Figura 17**).

Figura 17: Estrutura da 3-Bromofenilpropanona (**1**) e das tiossemicarbazidas utilizadas (**2**, **3** e **4**).

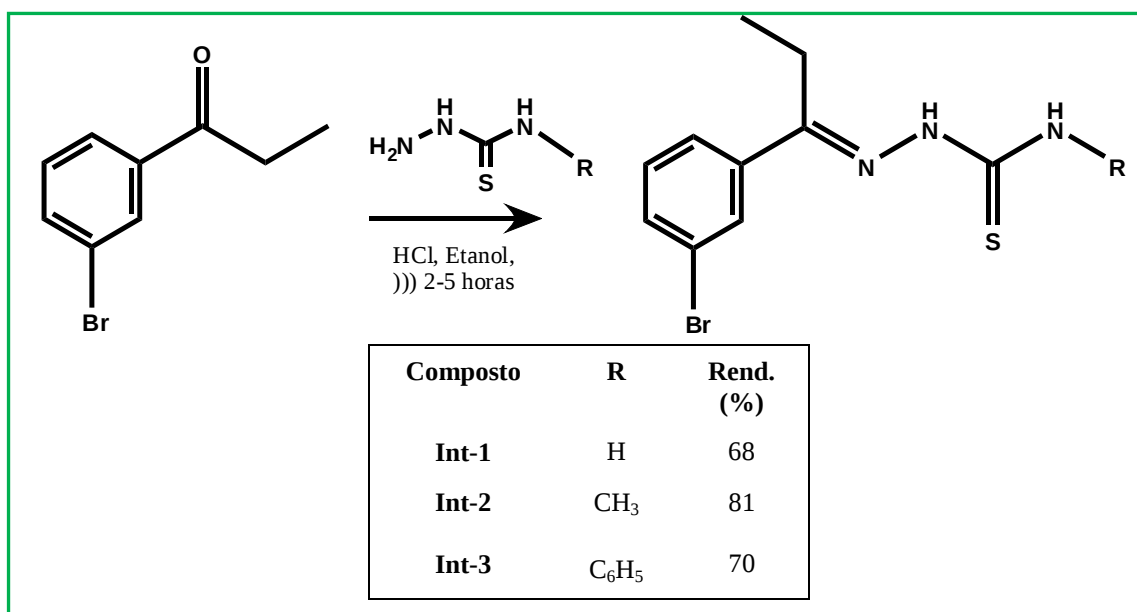


Fonte: Do autor.

De acordo com o **Esquema 2**, as reações para a síntese das tiossemicarbazonas (**Int 1-3**) foram realizadas na presença de ácido clorídrico (HCl), em etanol, com aquecimento, em banho de ultrassom. Nestas condições, foi possível sintetizar três tiossemicarbazonas (**Int-1**, **Int-2** e **Int-3**) com rendimentos satisfatórios, em torno de 75% e com tempo reacional médio de até 5h.

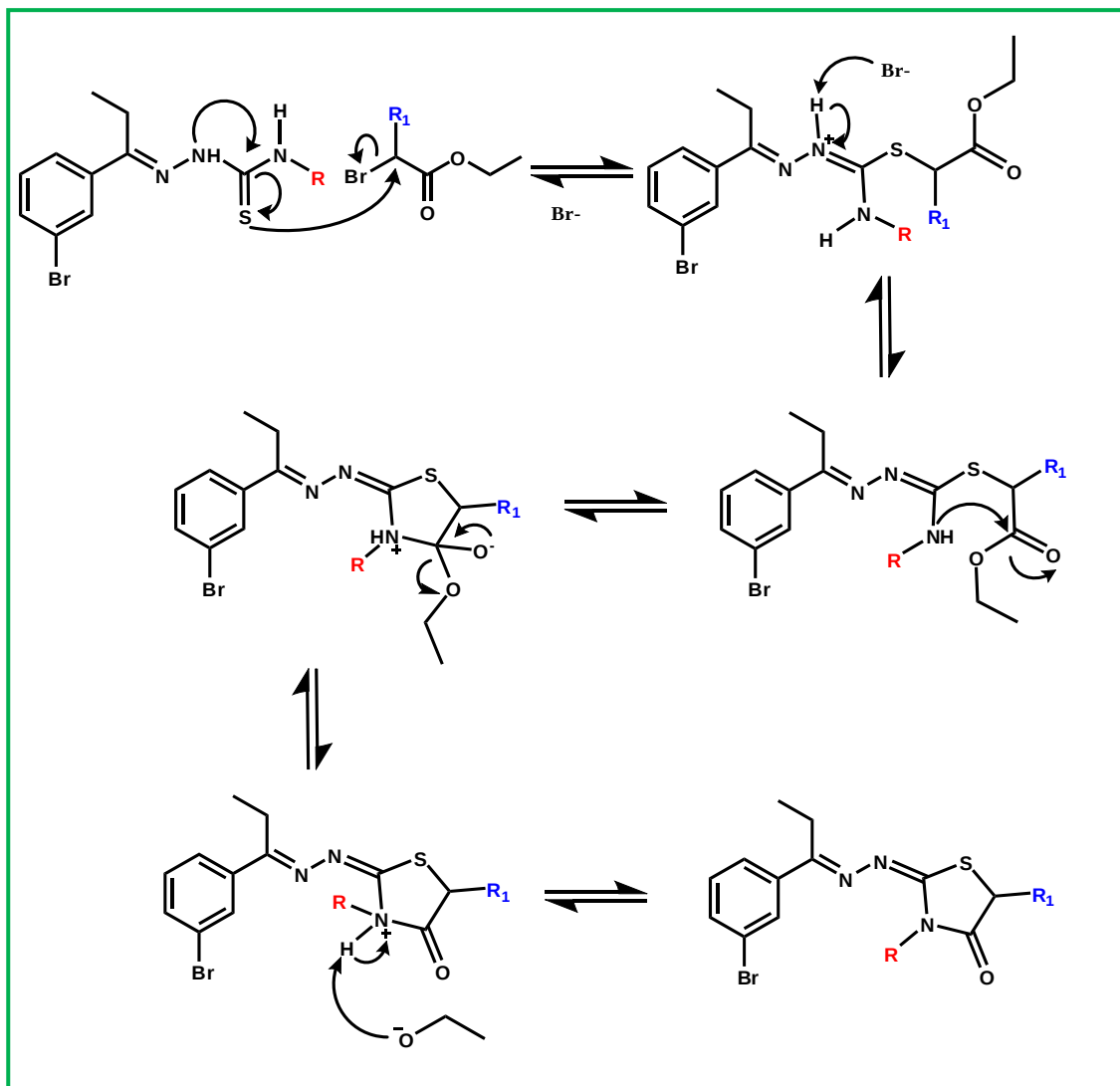
As tiossemicarbazonas sintetizadas (**Int 1-3**) foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e IV). Nos espectros de IV, a ausência de absorção na região de estiramento axial de carbonilas ($1790\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) confirma que a cetona foi consumida no meio reacional, indicando a formação da tiossemicarbazona.

Esquema 2: Obtenção das tiossemicarbazonas (**Int-1** e **Int-3**).



As aril-4-tiazolinonas (**LR 01-18**) foram sintetizadas através da reação entre a respectiva tiossemicarbazona (**Int 1-3**) com os respectivos acetatos α -halogenados. Estas reações foram realizadas em etanol absoluto, com excesso de acetato de sódio anidro, sob refluxo e agitação magnética. As reações foram acompanhadas por CCD, mostrando o consumo dos materiais de partida (as tiossemicarbazonas) após cerca de 20 horas de reação.

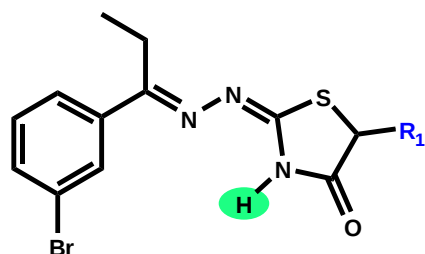
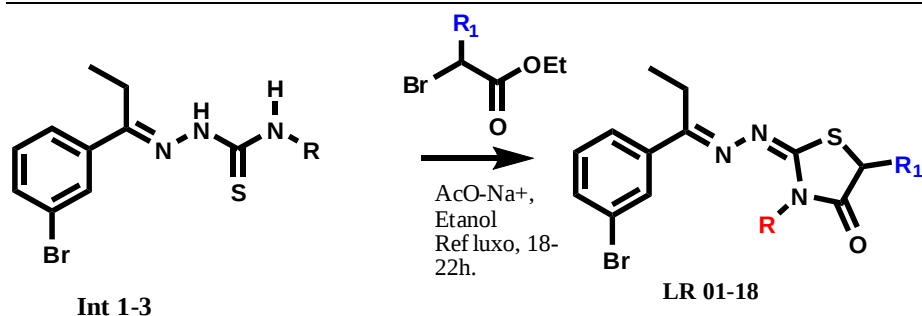
Esquema 3: Reação da série LR 01-18.



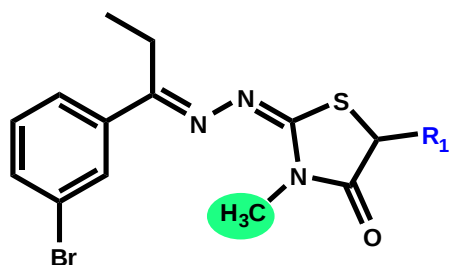
Reagentes e condições: ácidos e ésteres halogenados em etanol, refluxo, acetato de sódio, 20-22 horas

Os produtos obtidos tiveram rendimentos de 23% a 97%, após recristalização, quando necessária, em tolueno. Os sólidos obtidos variavam de cores amareladas à brancas. Os substituintes, rendimento e Ponto de fusão (PF) das aril-4-tiazolinonas (**LR 01-18**) estão listadas na **Tabela 2**.

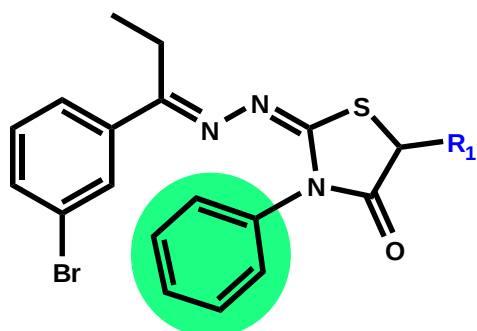
Tabela 2: Descrição dos substituintes, rendimento (%) e Ponto de fusão (PF) das aril-4-tiazolinonas (**LR 01-18**) e tiossemicarbazonas (**Int 1-3**).



R_1	Código	PF (°C)	Rend. (%)
H	LR-01	142°C	23
CH ₃	LR-02	119°C	52
CH (CH ₃) ₂	LR-03	116°C	60
CH ₂ CH ₃	LR-04	135°C	96
CH ₃ CH ₃	LR-05	162°C	94
C ₆ H ₅	LR-06	189°C	88



R_1	Código	PF (°C)	Rend. (%)
H	LR-07	129°C	76
CH ₃	LR-08	120°C	97
CH (CH ₃) ₂	LR-09	189°C	71
CH ₂ CH ₃	LR-10	136°C	94
CH ₃ CH ₃	LR-11	133°C	31
C ₆ H ₅	LR-12	130°C	92



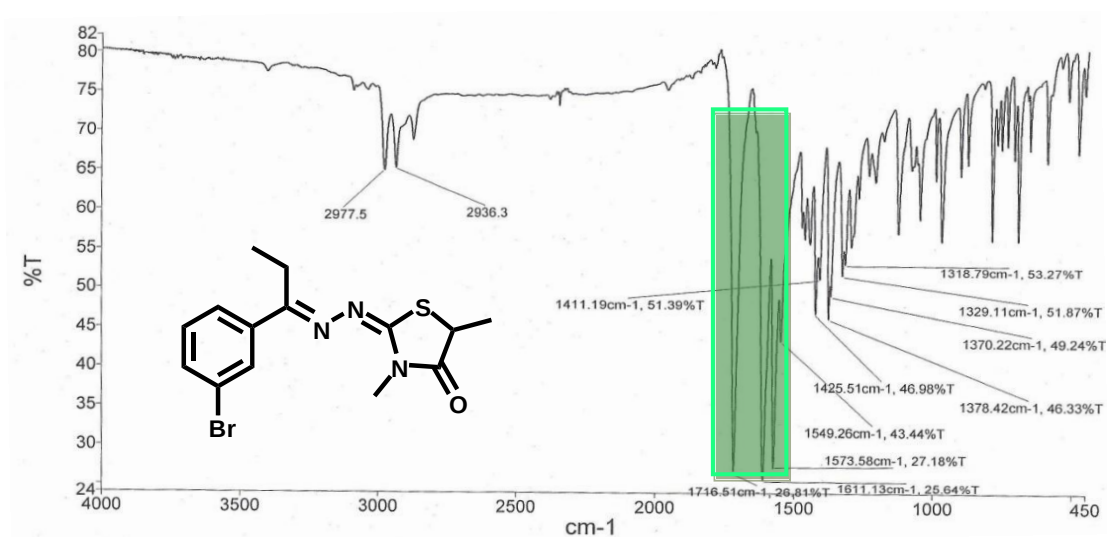
R_1	Código	PF (°C)	Rend. (%)
H	LR-13	170°C	61
CH ₃	LR-14	141°C	68
CH (CH ₃) ₂	LR-15	121°C	96
CH ₂ CH ₃	LR-16	159°C	67
CH ₃ CH ₃	LR-17	122°C	40
C ₆ H ₅	LR-18	185°C	61

Assim como as tiossemicarbazonas (**Int 1-3**), as aril-4-tiazolinonas (**LR 01-18**) foram caracterizadas por técnicas espectrométricas (RMN de ^1H e ^{13}C , IV).

Quanto a características espectroscópicas dos compostos (**LR 01-18**), é perceptível a presença de absorções na região de estiramento axial de carbonilas nos espectros de IV, confirmando a formação do anel tiazolinona. O sinal referente ao carbono da carbonila foi também localizado no RMN de ^{13}C .

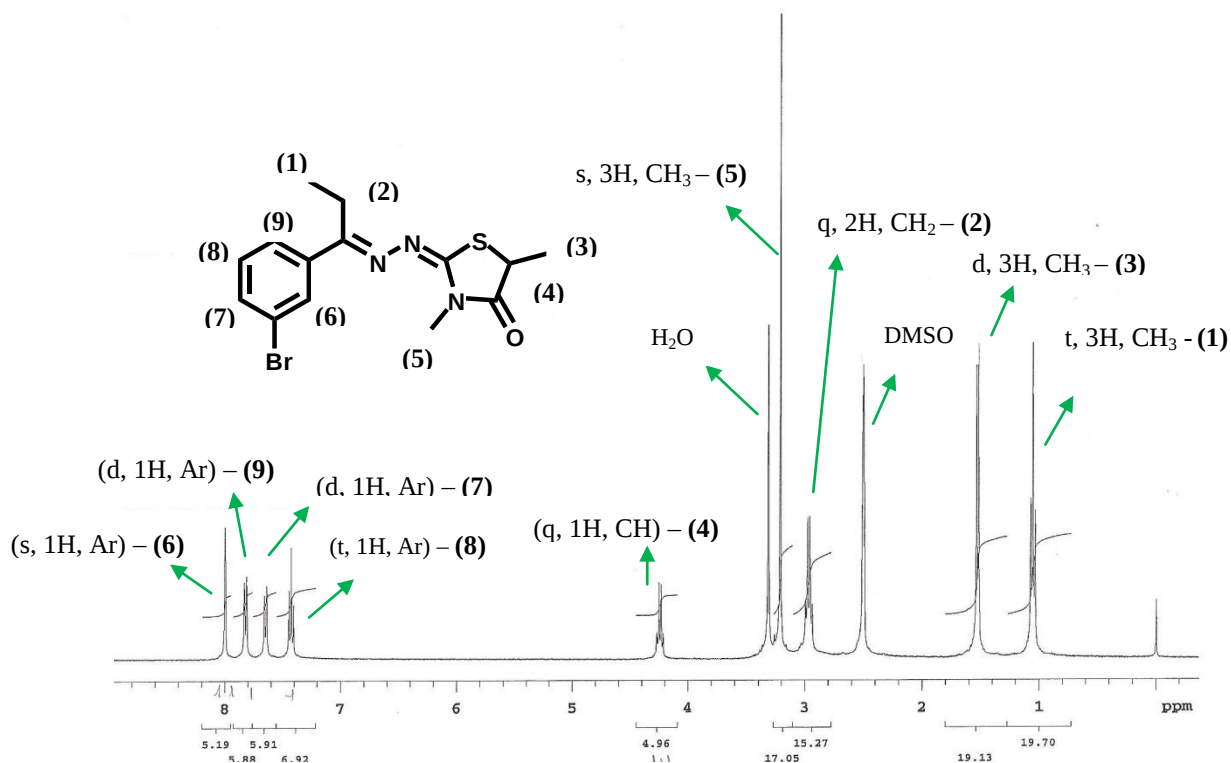
A análise do espectro de IV (**Figura 18**) permite-nos observar a presença do estiramento de $\text{C}=\text{O}$, em 1716.51 cm^{-1} , confirmando a formação do anel 4-tiazolinona. Além dos estiramentos na frequência de 1611 e 1573 cm^{-1} , característicos da ligação ($\text{C}=\text{N}$).

Figura 18: Exemplo de espectro de IV referente ao composto **LR-08**.



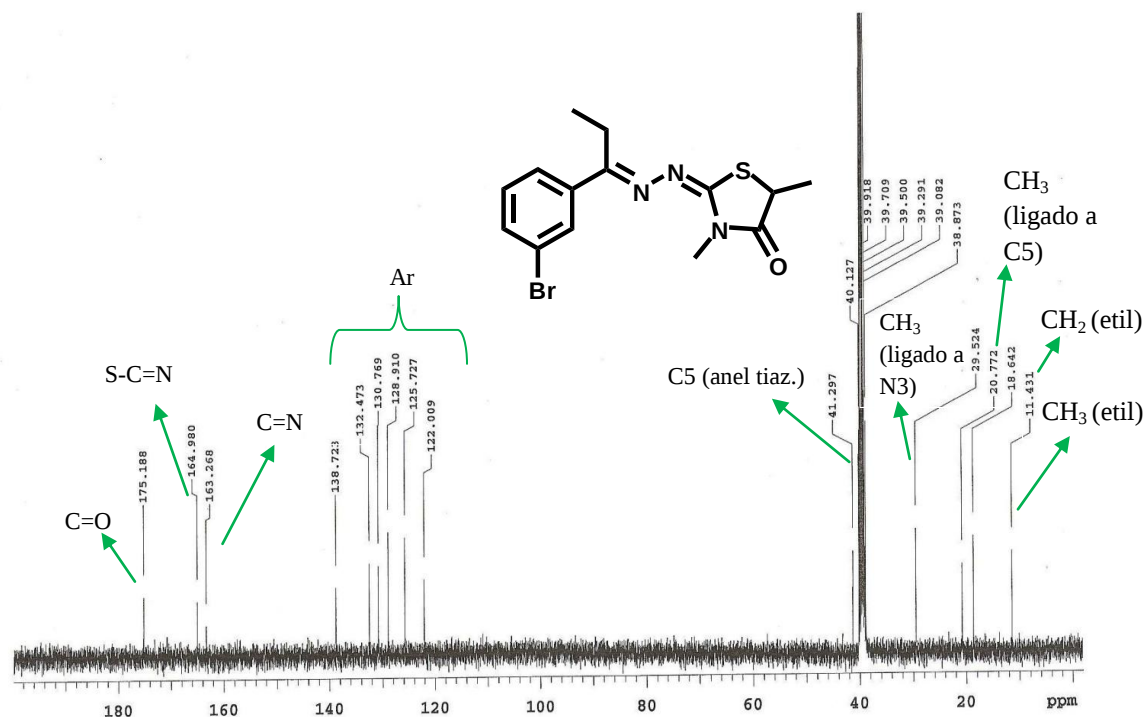
A **Figura 19** apresenta um exemplo de espectro de RMN ^1H para a série **LR** (composto **LR-08**), onde foi constatada a presença de um tripleto em 1.05 ppm, integrando para três hidrogênios, referente ao grupo metila ligado ao metileno. O grupamento metileno é confirmado pela localização de um quadrupletto em 3.1 ppm, integrando para dois hidrogênios. Em 1.5 ppm, tem-se um dubleto que caracteriza a metila ligada ao metino do anel tiazolinona, integrando para três hidrogênios, sendo este metino caracterizado em 4.2 ppm por um quadrupletto e integrando para um hidrogênio. Em 3.3 ppm, há um singletto característico da metila ligada ao nitrogênio presente no anel tiazolinona e os sinais entre 7.4 ppm e 7.9 ppm, são referentes aos hidrogênios do anel aromático.

Figura 19: Espectro de RMN ^1H da molécula **LR-08**.



A **Figura 20** exemplifica o RMN ^{13}C , do composto **LR-08**, utilizado como referência. O pico em 175.2 ppm corresponde ao carbono da carbonila ($\text{C}=\text{O}$). O pico em 165.0 ppm, corresponde ao carbono da ligação $\text{S}-\text{C}=\text{N}$ do anel tiazolinona, enquanto que 163.3 ppm corresponde ao carbono $\text{C}=\text{N}$ alifático. Os picos entre 138.7 ppm e 122.1 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. Em 41.2 ppm, há o C5 do anel tiazolinona, em 29.5 há o CH_3 ligado ao N3 do anel tiazolinona e, por fim, 18.6 ppm e 11.4 ppm ao CH_2 e CH_3 , respectivamente, do grupo etil da molécula (**LR-08**).

Figura 20: Espectro do RMN C^{13} da molécula **LR-08**.



4.3 Atividade Farmacológica

As aril-4-tiazolinonas (**LR 01-18**) sintetizadas, bem como as tiossemicarbazonas (**Int 1-3**) foram inicialmente avaliadas, *in vitro*, quanto às propriedades tripanocidas. As formas evolutivas testadas foram a tripomastigota e amastigota da cepa Tulahuen do *T. cruzi*, que expressam beta-galactosidase e, posteriormente, foram obtidos os valores de CI_{50} (μM).

Os compostos foram testados segundo o modelo descrito por Romanha A.J. et al (127), onde é estabelecido as linhagens de cultura de células de mamíferos, as linhagens e formas do parasita, a utilização de procedimentos automatizados, as determinações de CI_{50} , índice de seletividade (IS) e comparação com os dados *in vitro* do BZD.

Quanto à seletividade, os compostos (**Int 1-3** e **LR 01-18**) foram testados em ensaios com células murinas e o efeito na viabilidade celular (toxicidade) destes compostos em fibroblastos L929 foi avaliado. Sendo um ensaio de viabilidade celular, os fibroblastos foram incubados na presença dos compostos (**LR 01-18**) por noventa e seis horas. Os valores de CI_{50} (em μM) foram determinados.

Para fins de enriquecimento deste trabalho, também está sendo desenvolvida a atividade tripanocida frente à forma evolutiva epimastigota, de maneira a complementar com os resultados aqui expostos. Na dependência desses resultados, seguiremos ainda com o teste de inibição da atividade catalítica da enzima cruzaina pelos compostos (**LR 01-18**), com o intuito de identificar o mecanismo de ação dos mesmos.

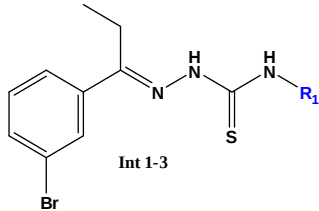
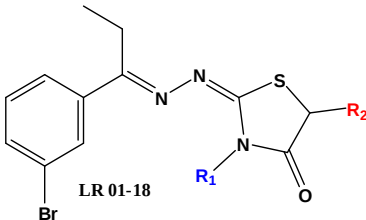
4.3.1 Avaliação *in vitro* das atividades tripanocidas

As tiazolinonas deste trabalho tiveram como protótipo estrutural o composto **1i**, (3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona (**Figura 3**), previamente descrito como potente agente antichagásico *in vitro* (17). Explorou-se a utilização de substituintes nas posições N3 e C5, obtendo os compostos **LR 01-18**. Após a caracterização estrutural de todos esses compostos, a toxicidade celular e atividade antiparasitária foram determinadas.

Estes compostos foram testados frente às formas evolutivas amastigotas e tripomastigotas da cepa Tulahuen do *T. cruzi*, com determinação dos valores de CI_{50} em μM . O BZD foi utilizado como fármaco de referência. Realizou-se também a determinação da toxicidade celular em fibroblastos L929, com determinação da IC_{50} expresso em μM .

Para efeito de comparação da atividade farmacológica, as aril-tiossemicarbazonas (**Int 1-3**) também foram testadas frente ao *T. cruzi* e à células de mamíferos. A **Tabela 3** apresenta os resultados da avaliação farmacológica *in vitro* das propriedades tripanocidas e da toxicidade em fibroblastos L929 para as aril-tiossemicarbazonas (**Int 1-3**) e aril-4-tiazolinonas (**LR 01-18**).

Tabela 3: Citotoxicidade e atividade tripanocida da série **LR 01-18** e seus intermediários (**Int 1-3**).

Código	R ₁	R ₂	Atividade tripanocida ¹ (μM)	CI ₅₀ Fibroblastos ² μM (Cepa L929)	IS ³ (Citotox./ IC ₅₀ amast.)
 Int 1-3  LR 01-18					
Int-1	H	-	5.73	69,88	12.20
Int-2	CH ₃	-	50.96	266,47	5.23
Int-3	Ph	-	88.88	110,41	1.24
LR-01	H	H	-	-	Inativo
LR-02	H	CH ₃	79.94	235.13	2.94
LR-03	H	CH ₂ CH ₃	-	-	Inativo
LR-04	H	CH(CH ₃) ₂	-	-	Inativo
LR-05	H	diMe	13.27	225.82	17.02
LR-06	H	Ph	89.23	198.85	2.23
LR-07	CH ₃	H	12.20	117.56	9.64
LR-08	CH ₃	CH ₃	2.46	56.45	22.99
LR-09	CH ₃	CH ₂ CH ₃	-	-	Inativo
LR-10	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	79.25	523.12	6.60
LR-11	CH ₃	diMe	175.13	217.22	1.24
LR-12	CH ₃	Ph	-	-	Inativo
LR-13	Ph	H	-	-	Inativo
LR-14	Ph	CH ₃	-	-	Inativo
LR-15	Ph	CH ₂ CH ₃	-	-	Inativo
LR-16	Ph	CH(CH ₃) ₂	48.38	112.51	2.33
LR-17	Ph	diMe	168.23	185.89	1.10
LR-18	Ph	Ph	-	-	Inativo
BZD	-	-	21.90	2401.72	109.65

¹ Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário das formas amastigotas e tripomastigotas ;

² Concentração do composto que induz 50% de morte celular (L929); ³ CI₅₀ do composto sobre as células dividido pelo CI₅₀ do composto sobre o parasita. Os valores de CI₅₀ foram calculados através de interpolação linear.

Dentre os 21 compostos submetidos ao ensaio biológico, quatro apresentaram atividade tripanocida superior ao BZD, sendo um composto intermediário (**Int 1**) e três compostos cíclicos (**LR-05**, **LR-07** e **LR-08**).

Primeiramente, acerca da atividade antiparasitária dos três compostos intermediários, foi possível identificar o composto **Int 1** com atividade superior ao BZD. Esse composto não apresenta substituintes na posição N4. Observou-se que a inserção de um grupo metila (**Int-2**)

em N4 foi prejudicial à atividade tripanocida e que a substituição por uma fenila (**Int-3**) foi ainda mais deletéria, nos indicando que o aumento do volume do substituinte na posição N4 não é benéfico. Quanto à citotoxicidade desses compostos intermediários, nota-se que o composto **Int 2** apresentou o melhor resultado dentre eles, indicando que a presença de um volume intermediário no substituinte em N4 é benéfico para a toxicidade.

Sobre a ciclização dessas moléculas frente à atividade tripanocida, pode-se comparar os casos em que os compostos cíclicos apresentaram melhores resultados que os seus compostos intermediários. Os compostos **LR-07** e **LR-08**, que possuem uma metila na posição N3, foram cerca de 3 e 17 vezes mais ativos, respectivamente, que o seu intermediário **Int 2** e o composto **LR-16**, que possui uma fenila em N3, também foi quase duas vezes mais ativo que o seu intermediário **Int 3**.

Uma análise para os compostos substituídos na posição N3 do anel tiazolinona, nos mostra que a subsérie com a presença de uma metila (**LR-07** a **LR-12**) foi a mais ativa. A subsérie com a presença de uma fenila (**LR-13** a **LR-18**) não mostrou incremento de atividade. Para os compostos não substituídos nesta posição, destaca-se o composto **LR-05**, que apresentou atividade ligeiramente melhor que o BZD, enquanto que os demais não apresentaram atividades significativas.

Quanto à substituição em C5 do anel tiazolinona, de modo geral, a inserção de grupos alquila pouco volumosos, como por exemplo, o substituinte dimetilado, foi benéfica para atividade tripanocida.

Ainda sobre a atividade tripanocida, os compostos **LR-05**, **LR-07** e **LR-08** apresentaram atividade superior que o BZD, com destaque para molécula **LR-08** que chegou a ser cerca de 9 vezes mais potente. Sua característica estrutural é a presença de uma metila em N3 e outra metila em C5, mais uma vez, sugerindo que a inserção de grupos alquila pouco volumosos foram benéficas.

Quanto à toxicidade, todos os compostos derivados do **Int-1** tiveram a toxicidade reduzida após a ciclização, corroborando com os dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (125). De uma forma geral, os compostos testados (**LR 01-18**) apresentaram toxicidade maior que o BZD para a linhagem celular em questão (fibroblastos L929).

A respeito do índice seletividade (IS), destacam-se os compostos **LR-08** que é 22.9 vezes mais seletivo para o parasito que para células de mamíferos e o **LR-05** é 17.0 vezes mais seletivo. Essas duas moléculas evidenciam que a ciclização também foi benéfica para seletividade.

Uma observação importante a ser feita, é quanto às propriedades estabelecidas segundo a Regra de Lipinski (128). Ela estabelece os seguintes parâmetros para obtenção de boas propriedades farmacocinéticas e desenvolvimento de medicamentos:

- ❖ Coeficiente de Log de P (C logP) < 5;
- ❖ Número de doadores de ligação de hidrogênio < 5;
- ❖ Número de receptores de ligação de hidrogênio ≤ 10
- ❖ Peso molecular < 500.

Um composto que satisfaz, ao menos, três dos quatro critérios adere à regra de Lipinski. Sendo assim, todos os compostos desta série (**LR 01-18**) obedecem à regra descrita acima (**Tabela 4**).

Tabela 4: Regra de Lipinski aplicada para os compostos LR 01-18.

Compostos	PM	C log P	Nº de doadores de ligação de hidrogênio	Nº de aceptores de ligação de hidrogênio	Nº de critérios atendidos
Regra	<500	<5	<5	≤ 10	No mínimo 3
LR-01	326.21	2.79	1	3	Todos
LR-02	340.24	3.36	1	3	Todos
LR-03	354.27	3.88	1	3	Todos
LR-04	368.29	4.25	1	3	Todos
LR-05	353.01	3.79	1	3	Todos
LR-06	401.01	4.73	1	3	Todos
LR-07	339.0	3.01	0	3	Todos
LR-08	353.01	3.58	0	3	Todos
LR-09	367.03	4.11	0	3	Todos
LR-10	381.05	4.47	0	3	Todos
LR-11	367.03	4.02	0	3	Todos
LR-12	415.03	4.95	0	3	Todos
LR-13	401.01	4.67	0	3	Todos
LR-14	415.03	5.24	0	3	3
LR-15	429.05	5.76	0	3	3
LR-16	443.06	6.13	0	3	3
LR-17	429.05	5.67	0	3	3
LR-18	477.05	6.61	0	3	3

Dados obtidos via www.chemicalize.org | Adaptado pelo autor.

Por fim, foi possível identificar as aril-4-tiazolinonas **LR-05**, **LR-07** e **LR-08** como as mais potentes da série, uma vez que apresentam propriedades tripanocidas superiores ao BDZ e que este trabalho demonstra mais uma vez o potencial anti-*T.cruzi* de compostos sintéticos

contendo a porção tiosemicarbazona e seus bioisosteros cíclicos em sua estrutura, estando assim em concordância com os relatos da literatura.

5. Parte Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Parte Química

5.1.1 Generalidades

Os reagentes químicos foram adquiridos da Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma-Aldrich, enquanto que os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica. Os solventes deuterados (DMSO- d_6) são da marca Sigma-Aldrich. As tiossemicarbazidas foram adquiridas também pela Sigma-Aldrich.

As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F₂₅₄. As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm).

As reações mediadas por irradiação no ultrassom foram realizadas em um ultrassom modelo Unique EM-804 TGR usando frequência de 40 KHz (180 W), com a utilização de seu aquecimento, em torno de 40°C.

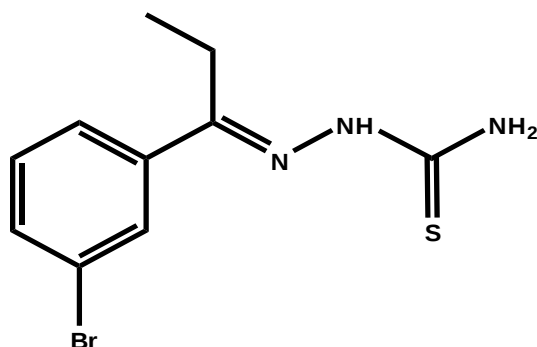
Os pontos de fusão foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover.

Para todos os compostos foram feitas as análises de RMN (^1H e ^{13}C) e DEPT. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram adquiridos nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para ^1H ; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para ^1H e 75.5 MHz para o ^{13}C), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN ^1H foram designadas da seguinte forma: s / singleto; d / dubleto; t / tripleto; q / quarteto.

Para os espectros no infravermelho, utilizou-se o instrumento Bruker (Modelo IFS 66) usando pastilhas de KBr.

5.2 Metodologia de Síntese e Dados Espectroscópicos

5.2.1 Síntese do composto intermediário Int 1 (E)-2-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazinacarbotioamida:



Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,45 g) da 3-bromopropilfenona, 2.12 mmol (0,23 g) de tiossemicarbazida, 5 mL de etanol e 6 gotas de ácido clorídrico. A mistura foi mantida sob irradiação no ultrassom, com aquecimento, por 3 horas. Posteriormente, adicionou-se água destilada e o precipitado formado foi guardado em geladeira, sendo filtrado em funil sinterizado, lavado com etanol e deixado no dessecador sob vácuo.

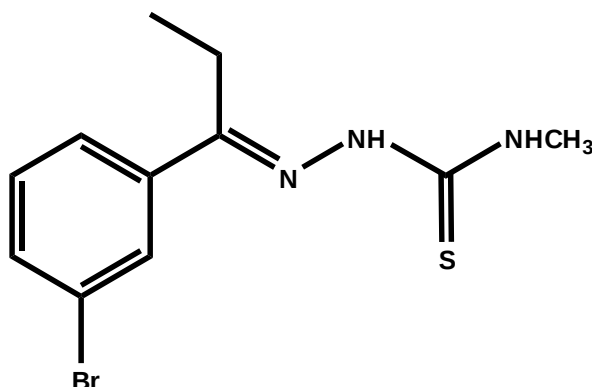
Cristais amarelos; P.F: 143°C; Rend.: 68% ; Rf = 0,71 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 3416 (NH), 3202 e 3147 (NH₂), 1598 (C=N) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.0 (t, 3H, CH₃), 2.8 (q, 2H, CH₂), 7.3 (t, 1H, Ar), 7.5 (d, 1H, Ar), 7.8 (d, 1H, Ar), 8.0 (s largo, 2H, NH₂), 8.1 (s, 1H, Ar), 8.3 (s, 2H, NH₂), 10.4 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.8 (CH₃), 19.1 (CH₂), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (CH, Ar), 129.0 (CH, Ar), 130.3 (CH, Ar), 133.0 (CH, Ar), 136.2 (CH, Ar), 150.2 (C=N), 179.1 (C=S).

5.2.2 Síntese do composto intermediário Int-2, (E)-2-(1-(3-bromofenil)propilideno)-N-metil hidrazinacarbotioamida



Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,45 g) da 3-bromofenilpropanona, 2.12 mmol (0,26 g) de 4-metil-3-tiossemicarbazida, 5 mL de etanol e 6 gotas de ácido clorídrico. A reação foi mantida sob irradiação no ultrassom, com aquecimento por 3 horas. Posteriormente, adicionou-se água destilada e o precipitado formado foi guardado em geladeira, sendo filtrado em funil sinterizado, lavado com água e deixado no dessecador sob vácuo. O produto foi recrystalizado em tolueno a quente.

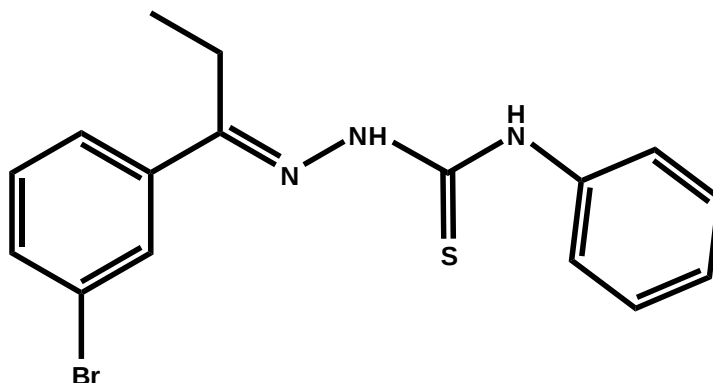
Cristais amarelos; PF: 146°C; Rend.: 81% ; Rf = 0,72 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 3290 e 3192 (NH), 1551 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1.0 (t, 3H, CH_3), 2.8 (q, 2H, CH_2), 3.4 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-NH}$), 7.5 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.9 (d, 1H, Ar), 8.1 (s, 1H, Ar), 8.5 (s largo, 1H, NH), 10.4 (s largo, 1H, NH).

RMN de ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 10.7 (CH_3), 19.1 (CH_2), 31.1 (N- CH_3), 122.1 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 127.2 (CH, Ar), 130.4 (CH, Ar), 131.7 (CH, Ar), 138.8 (C, Ar), 149.9 (C=N), 178.6 (C=S).

5.2.3 Síntese do composto intermediário Int-3, (E)-2-(1-(3-bromofenil)propilideno)-N-fenil hidrazinacarbotioamida



Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,45 g) da 3-bromofenilpropanona, 2.12 mmol (0,26 g) de 4-metil-3-tiossemicarbazida, 5 mL de etanol e 6 gotas de ácido clorídrico. A reação foi mantida sob irradiação no ultrassom, com aquecimento por 3 horas. Posteriormente, adicionou-se água destilada e o precipitado formado foi guardado em geladeira, sendo filtrado em funil sinterizado, lavado com água e deixado no dessecador sob vácuo. O produto foi recristalizado em tolueno a quente.

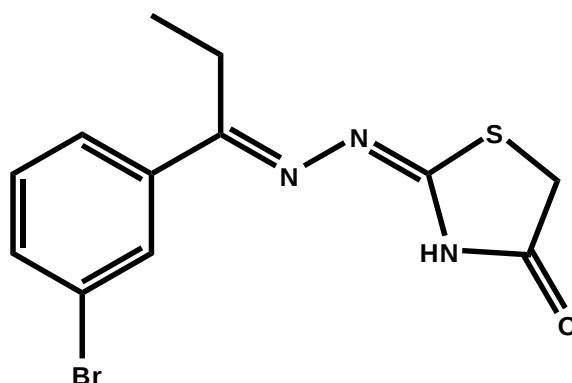
Cristais amarelados; PF: 151°C; Rend.: 70% ; Rf = 0,60 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 3307 e 2971 (NH), 1522 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1.1 (t, 3H, CH_3), 2.9 (q, 2H, CH_2), 7.2 (t, 1H, Ar), 7.4 (t, 3H, Ar), 7.6 (m, 3H, Ar), 7.9 (d, 1H, Ar), 8.2 (s, 1H, Ar), 10.1 (s, 1H, NH), 10.7 (s, 1H, ArNH).

RMN de ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 10.8 (CH_3), 19.4 (CH_2), 122.0 (CH, Ar), 125.4 (CH, Ar), 125.9 (BrC, Ar), 126.1 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 130.3 (CH, Ar), 131.9 (CH, Ar), 138.6 (C, Ar), 139.1 (C-N, Ar), 151.1 (C=N), 177.2 (C=S).

5.2.4 Síntese do composto LR-01, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)tiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,60 g) do composto (**Int 1**), 20 mL de etanol e 8.48 mmol (0,72 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 15 minutos, foram adicionados 4.24 mmol (0,61 g) de bromoacetato de etila e a reação foi então mantida sob refluxo (90 °C) durante 20 horas (monitorada por CCD). Após esse período, um precipitado de coloração branca foi obtido. Guardou-se na geladeira por três dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois transferido para o dessecador sob vácuo. Recristalizado em tolueno a quente. O produto apresentou aspecto amorfo.

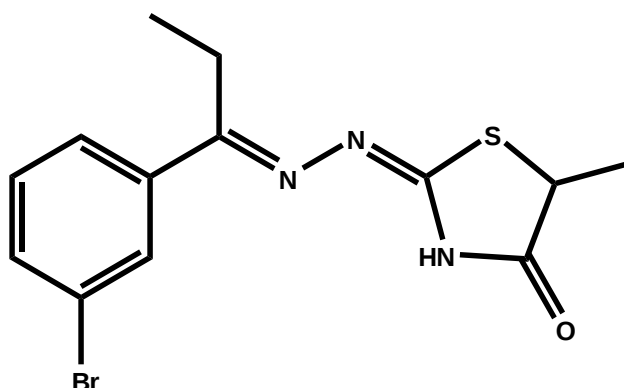
Composto de coloração branca; PF: 142 °C; Rend.: 23%; Rf: 0,66 (Tolueno / Acetato de etila 7:3).

IV, principais sinais: 3201 (NH), 1601 (C=O), 1507 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.0 (t, 3H, CH_3), 2.9 (q, 2H, CH_2), 3.9 (s, 2H, CH_2), 7.4 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar) e 11.7 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 20.7 (CH_2), 32.8 (CH_2 , heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.6 (BrC, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.3 (CH, Ar), 138.8 (C, Ar), 163.5 (C=N), 165.6 (S-C=N), 173.9 (C=O).

5.2.5 Síntese do LR-02, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-metiltiazolidin-4-ona



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,67 g) do composto (**Int 1**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,69 g) de acetato de sódio. Após aquecimento de aproximadamente 15 minutos, foram adicionados 4.24mmol (0,66 g) de 2-bromopropionato de metila e a reação foi então mantida sob refluxo (90 °C) durante cerca de 20 horas (monitorada por CCD). Após esse período, um precipitado de coloração amarelada foi obtido. Guardou-se na geladeira por dois dias e, posteriormente, o precipitado foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois transferido para o dessecador sob vácuo.

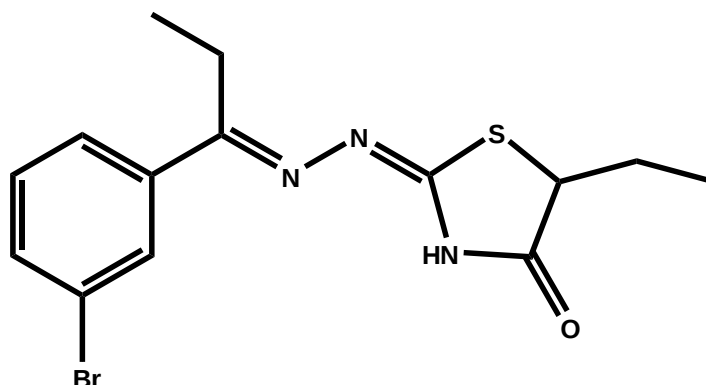
Composto amarelo escuro; PF: 119 °C; Rend.: 52% ; Rf: 0,68 (Tolueno / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 3409 (NH), 1722 (C=O), 1565 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 0.98 (t, 3H, CH_3), 1.5 (q, 2H, CH_2), 1.7 (d, 3H, CH_3 heterociclo), 3.1 (q, 1H, CH heterociclo), 7.3 (t, 1H, Ar), 7.48 (d, 1H, Ar), 7.7 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar), 11.5 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 19.7 (CH_2), 24.8 (CH_3 , heterociclo), 36.6 (CH, heterociclo), 122.4 (CH, Ar), 124.9 (BrC, Ar), 126.2 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 130.8 (CH, Ar), 133.2 (C, Ar), 150.6 (C=N), 154.9 (S-C=N), 179.9 (C=O).

5.2.6 Síntese do LR-03, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-etil tiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,61 g) do composto (**Int 1**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 15 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,71 g) de ácido 2-bromobutílico e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 20 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração amarela foi obtido. Guardou-se em geladeira por três dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente.

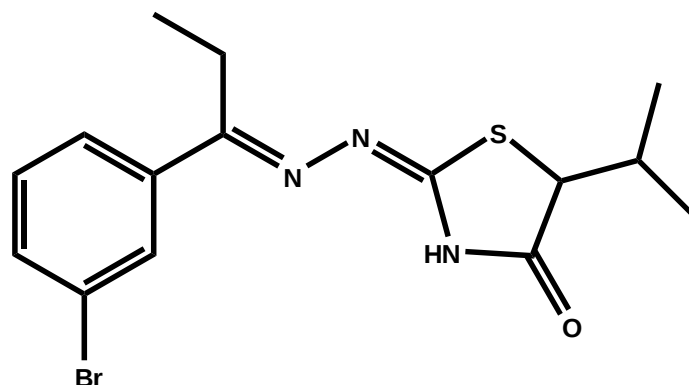
Pó amarelado; PF: 116 °C; Rend.: 60% ; Rf: 0,70 (Tolueno / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1714 (C=O), 1613 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 0.8 (t, 3H, CH_3), 0.9 (t, 3H, CH_3), 1.8 (m, 2H, CH_2), 2.9 (q, 2H, CH_2), 4.1 (t, 1H, CH heterociclo), 7.3 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.8 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar), 11.8 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 10.4 (CH_3), 11.6 (CH_3), 20.6 (CH_2), 25.4 (CH_2), 49.2 (CH heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.5 (BrC, Ar), 128.8 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.1 (CH, Ar), 138.9 (C, Ar), 163.0 (C=N), 165.2 (S-C=N), 176.8 (C=O).

5.2.7 Síntese do LR-04, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-isopropiltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,66 g) do composto (**Int 1**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,695 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 15 minutos, foram adicionados 4.24 mmol (0,77 g) de ácido 2-bromo-3-metilbutílico e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante cerca de 20 horas (monitorada por CCD). Após esse período, um precipitado de coloração amarela foi sintetizada. Guardou-se na geladeira por um dia e, posteriormente, filtrou-se em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois transferido para o dessecador sob vácuo.

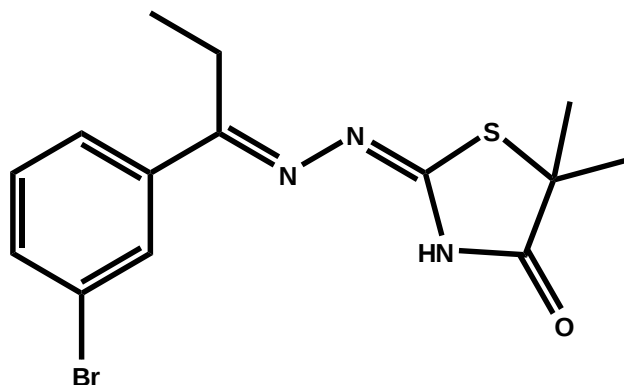
Pó levemente amarelado; PF: 135 °C; Rend.: 96% ; Rf: 0,74; (Tolueno / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 3421 (NH), 1708 (C=O), 1613 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 0.9 (t, 3H, CH_3), 1.0 (q, 2H, CH_2), 1.1 (d, 3H, CH_3), 1.3 (d, 3H, CH_3), 2.4 (d, 1H, CH), 4.1 (d, 1H, CH heterociclo), 7.3 (t, 1H, Ar), 7.5 (d, 1H, Ar), 7.7 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar), 11.7 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 11.6 (CH_3), 16.4 (CH_3), 17.8 (CH_3), 20.7 (CH_2), 22.8 (CH), 56.1 (CH heterociclo), 121.9 (CH, Ar), 125.3 (BrC, Ar), 128.5 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.6 (CH, Ar), 139.4 (C, Ar), 160.6 (C=N), 160.4 (S-C=N), 172.2 (C=O).

5.2.7 Síntese do LR-05, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5,5-dimetiltiazolidin-4-ona:



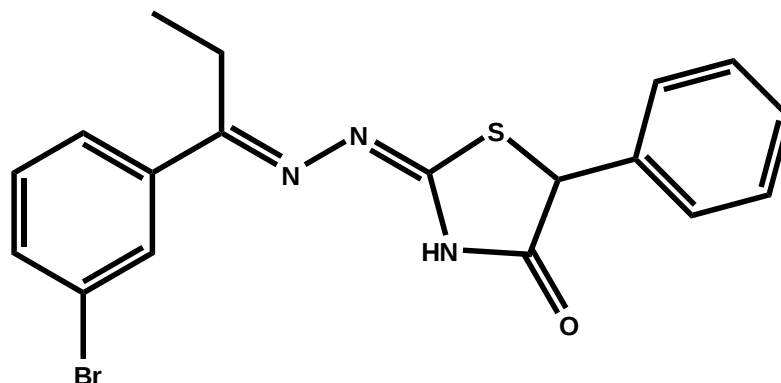
Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,60 g) do composto (**Int 1**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 20 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,70 g) de ácido α -bromo isobutílico e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 22 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração levemente amarelado foi obtido. Guardou-se em geladeira por cinco dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente. Pó amarelado; PF: 162 °C; Rend.: 94% ; Rf: 0,45 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1712 (C=O), 1615 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.1 (t, 3H, CH_3), 1.7 (s, 6H, CH_3), 2.9 (q, 2H, CH_2), 7.2 (t, 1H, Ar), 7.5 (d, 1H, Ar), 7.7 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar), 11.6 (s largo, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.8 (CH_3), 22.0 (CH_2), 28.0 (CH_3 , CH_3 , heterociclo), 49.6 (C, heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 122.8 (BrC, Ar), 123.3 (CH, Ar), 129.9 (CH, Ar), 130.0 (CH, Ar), 133.1 (C, Ar), 161.7 (C=N), 166.2 (S-C=N), 175.1 (C=O).

5.2.8 Síntese do LR-06, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-feniltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,60 g) do composto (**Int 1**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 15 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,84 g) de 2-cloro-2-fenilacetato de etila e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 22 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração amarelo foi obtido. Guardou-se em geladeira por dois dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

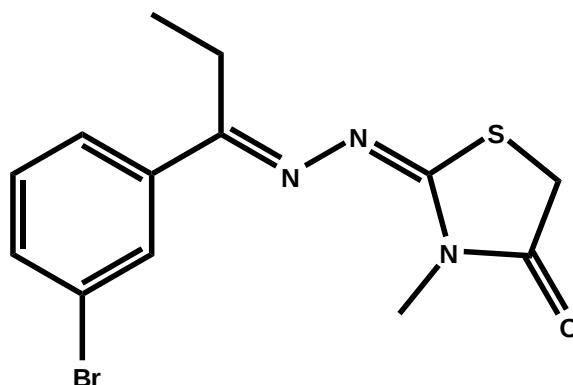
Pó amarelado; PF: 189°C; Rend.: 88% ; Rf: 0,67 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1709 (C=O), 1619 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1.0 (t, 3H, CH_3), 2.9 (q, 2H, CH_2), 5.4 (s, 1H, CH heterociclo), 7.1 (m, 5H, Ar), 7.5 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.7 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 20.7 (CH_2), 51.1 (CH heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.2 (BrC, Ar), 125.6 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.3 (C, Ar), 138.7 (C=N), 163.4 (S-C=N), 175.3 (C=O).

5.2.9 Síntese do LR-07, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3-metiltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,64 g) do composto (**Int 2**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio. Após aquecimento de aproximadamente 15 minutos, foram adicionados 4.24 mmol (0,61 g) de bromoacetato de etila e a reação foi então mantida sob refluxo (90 °C) durante 22 horas (monitorada por CCD). Após esse período, um precipitado de coloração alaranjada foi obtido. Guardou-se na geladeira por dois dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante por meio de filtração em funil de Büchner e sinterizado, lavado com etanol e depois transferido para o dessecador sob vácuo.

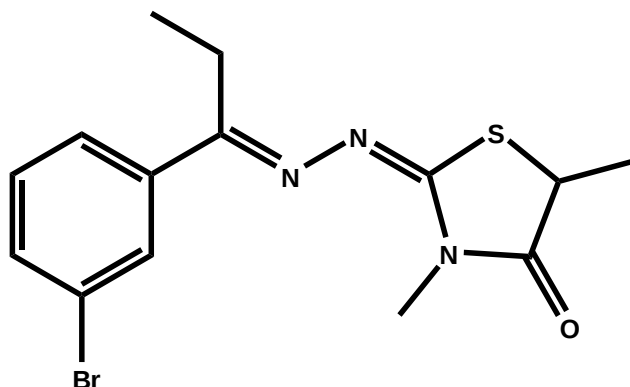
Composto alaranjado; PF: 129 °C; Rend.: 76% ; Rf: 0,76 (Tolueno / Acetato de etila 9:1).

IV, principais sinais: 2961 (C-H), 1707 (C=O), 1628 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1.0 (t, 3H, CH_3), 2.8 (q, 2H, CH_2), 3.3 (s, 3H, N- CH_3), 3.9 (s, CH_2 heterociclo), 7.3 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.8 (d, 1H, Ar), 8.1 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 11.9 (CH_3), 20.5 (CH_2), 25.6 (CH heterociclo), 29.4 (N- CH_3), 122.1 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.6 (CH, Ar), 132.5 (C, Ar), 138.6 (C=N), 162.8 (S-C=N), 169.8 (C=O).

5.2.10 Síntese do LR-08, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3,5-dimetiltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,61 g) do composto (**Int 2**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,71 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de cerca de 15 minutos, foram adicionados 4.24mmol (0,65 g) de 2-bromopropionato de metila e a reação foi mantida sob refluxo (90 °C) durante aproximadamente 20 horas (monitorada por CCD). Assim, um precipitado de coloração amarela foi obtido. Guardou-se na geladeira por dois dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois transferido para o dessecador sob vácuo.

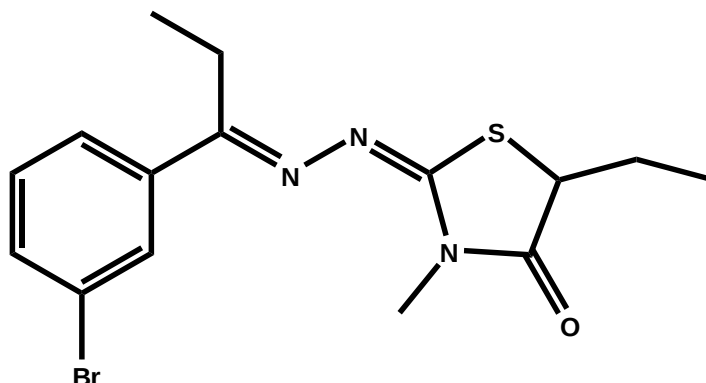
Pó amarelado; PF: 120 °C; Rend.: 97% ; Rf: 0,68 (Tolueno / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1716 (C=O), 1611 e 1573 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.03 (t, 3H, CH_3), 1.5 (d, 3H, CH_3), 2.9 (q, 2H, CH_2), 3.3 (s, 3H, N- CH_3), 4.2 (q, 1H, CH), 7.4 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.8 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.4 (CH_3), 18.6 (CH_2), 20.7 (CH_3 heterociclo), 29.5 (N- CH_3), 41.3 (CH heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.4 (CH, Ar), 138.7 (C, Ar), 163.2 (C=N), 164.9 (S-C=N), 175.1 (C=O).

5.2.11 Síntese do LR-09, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-etil-3-metiltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,63 g) do composto (**Int 2**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 15 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,70 g) de ácido 2-bromobutílico e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 20 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração amarela foi obtido. Guardou-se em geladeira por quatro dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

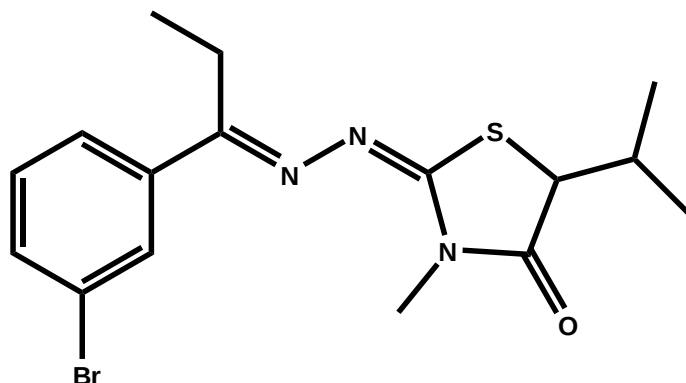
Pó levemente amarelado; PF: 189 °C; Rend.: 71% ; Rf: 0,62 (Tolueno / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1722 (C=O), 1605 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0.9 (t, 3H, CH_3), 1.0 (t, 3H, CH_3), 1.9 (m, 1H, CH_2), 2.1 (m, 1H, CH_2), 2.9 (q, 2H, CH_2), 3.2 (s, 3H, CH_3), 3.3 (s, 1H, CH), 4.2 (d, 1H, CH heterociclo), 7.4 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.8 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 10.3 (CH_3), 11.4 (CH_3), 20.8 (CH_2), 25.4 (CH_2), 29.4 (N- CH_3), 48.2 (CH heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 138.7 (C, Ar), 163.0 (C=N), 165.2 (S-C=N), 174.2 (C=O).

5.2.12 Síntese do LR-10, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-isopropil-3-metiltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,63 g) do composto (**Int 2**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 10 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,76 g) de ácido 2-bromo-3-metilbutílico e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 20 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração amarelo claro foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

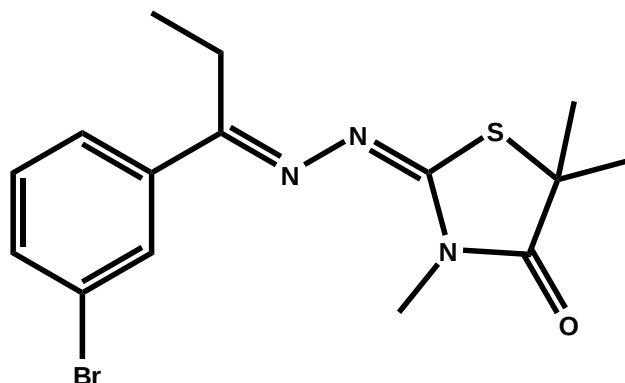
Pó amarelado; PF: 136 °C; Rend.: 94% ; Rf: 0,59 (Tolueno / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1719 (C=O), 1602 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0.9 (d, 3H, CH_3), 1.0 (d, 3H, CH_3), 1.1 (t, 3H, CH_3), 2.5 (m, 1H, CH), 2.9 (m, 2H, CH_2), 3.2 (s, 3H, N- CH_3), 4.3 (d, 1H, CH heterociclo), 7.4 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.8 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 10.1 (CH_3), 11.2 (CH_3), 11.6 (CH_3), 13.8 (CH), 20.6 (CH_2), 29.1 (N- CH_3), 46.3 (CH heterociclo), 121.1 (CH, Ar), 125.4 (BrC, Ar), 128.3 (CH, Ar), 131.0 (CH, Ar), 132.2 (CH, Ar), 136.9 (C, Ar), 162.3 (C=N), 166.1 (S-C=N), 173.7 (C=O).

5.2.13 Síntese do LR-11, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3,5,5-trimetiltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,63 g) do composto (**Int 2**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 20 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,70 g) de ácido α -bromo isobutílico e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 22 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração bege a branco foi obtido. Guardou-se em geladeira por dois dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

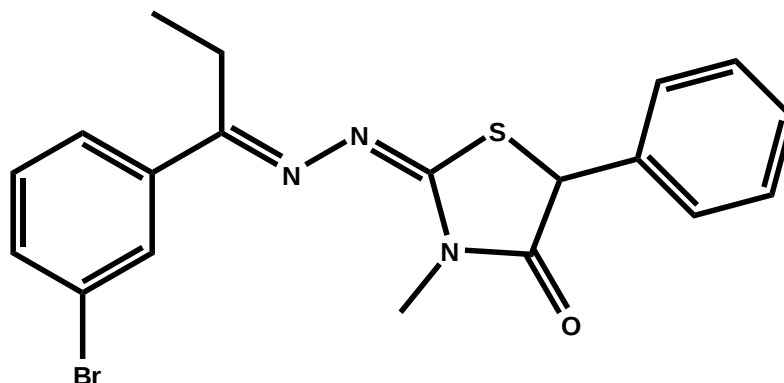
Pó amarelado; PF: 133 °C; Rend.: 31% ; Rf: 0,63 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1715 (C=O), 1608 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, Clorofórmio- d_6): 1.1 (t, 3H, CH_3), 1.5 (s, 6H, CH_3), 2.9 (q, 2H, CH_2), 3.2 (s, 3H, $\text{N}_3\text{-CH}_3$), 7.1 (t, 1H, Ar), 7.4 (d, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, Clorofórmio- d_6): 10.4 (CH_3), 11.6 (CH_2), 21.6 ($\text{CH}_3\text{-N}_3$), 28.3 (CH_3 , heterociclo), 29.8 (CH_3 , heterociclo), 51.2 (C, heterociclo), 122.7 (CH, Ar), 124.9 (BrC, Ar), 125.4 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 132.6 (C, Ar), 161.6 (C=N), 166.2 (S-C=N), 178.2 (C=O).

5.2.14 Síntese do LR-12, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3-metil-5-feniltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,63 g) do composto (**Int 2**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 15 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,84 g) de 2-cloro-2-fenilacetato de etila e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 22 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração bege foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

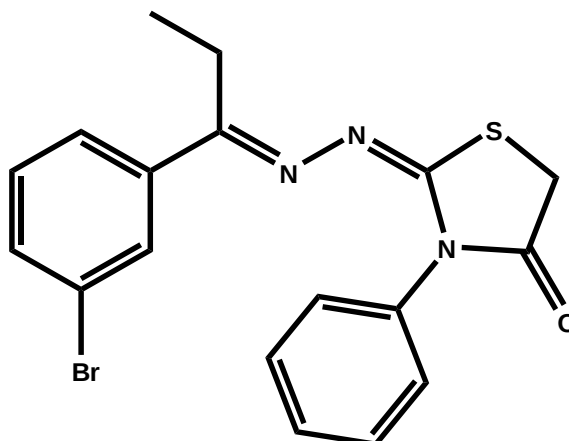
Pó amarelado; PF: 130 °C; Rend.: 92% ; Rf: 0,66 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1709 (C=O), 1619 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1.0 (t, 3H, CH_3), 2.2 (s, 3H, CH_3), 2.9 (q, 2H, CH_2), 5.4 (s, 1H, CH heterociclo), 7.3 (m, 5H, Ar), 7.5 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.8 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 13.8 (CH_2), 20.7 ($\text{CH}_3\text{-N}_3$), 26.3 (CH, heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.2 (BrC, Ar), 125.6 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.3 (C, Ar), 137.0 (C, Ar), 138.7 (C=N), 163.6 (S-C=N), 175.1 (C=O).

5.2.15 Síntese do LR-13, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3-feniltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,63 g) do composto (**Int 3**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 10 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,60 g) de bromoacetato de etila e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 22 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração amarelo foi obtido. Guardou-se em geladeira por três dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

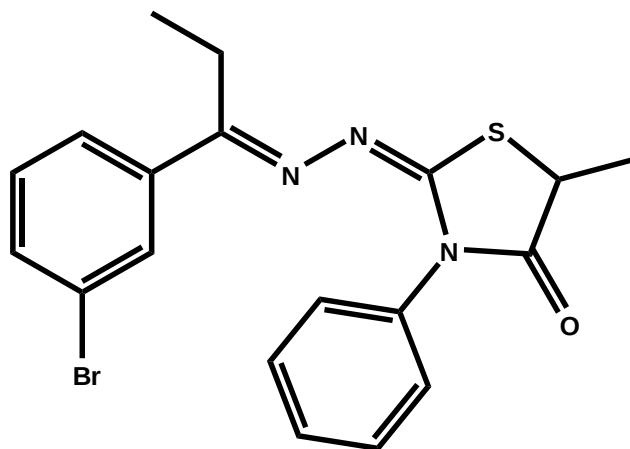
Pó amarelado; PF: 170 °C; Rend.: 61% ; Rf: 0,58 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1720 (C=O), 1602 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0.8 (t, 3H, CH_3), 2.6 (q, 2H, CH_2), 4.1 (s, 2H, CH_2 heterociclo), 7.2 (m, 5H, Ar), 7.5 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.7 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.3 (CH_3), 21.0 (CH_2), 32.3 (CH_2 heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 135.0 (C, Ar), 138.6 (N3-C, Ar), 164.2 (C=N), 165.3 (S-C=N), 171.8 (C=O).

5.2.16 Síntese do LR-14, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-metil-3-feniltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,63 g) do composto (**Int 3**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 20 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,70 g) de ácido 2-bromopropionato de metila e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 22 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração amarelo foi obtido. Guardou-se em geladeira por dois dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente.

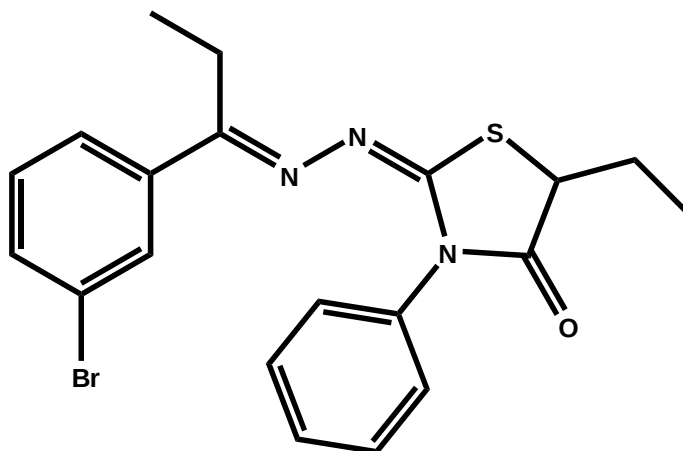
Pó levemente amarelado; PF: 141 °C; Rend.: 68% ; Rf: 0,69 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1724 (C=O), 1605 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0.8 (t, 3H, CH_3), 1.6 (d, 3H, CH_3), 2.6 (q, 2H, CH_2), 4.4 (q, 1H, CH heterociclo), 7.3 (m, 5H, Ar), 7.5 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.7 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.3 (CH_3), 18.7 (CH_2), 20.9 (CH_3), 41.3 (CH heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 135.0 (C, Ar), 138.6 ($\text{N}_3\text{-C}$, Ar), 162.9 (C=N), 165.3 (S-C=N), 174.8 (C=O).

5.2.17 Síntese do LR-15, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-etil-3-feniltiazolidin-4-ona:



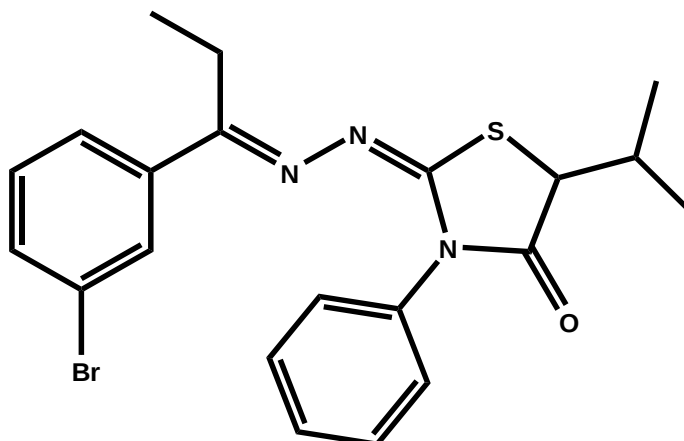
Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,63 g) do composto (**Int 3**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 15 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,70 g) de ácido 2-bromobutílico e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 22 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração amarelo foi obtido. Guardou-se em geladeira por cinco dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo. Pó levemente amarelado; PF: 121 °C; Rend.: 96% ; Rf: 0,68 (Tolueno / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1731 (C=O), 1603 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0.8 (t, 3H, CH_3), 1.0 (t, 3H, CH_3), 2.0 (m, 2H, CH_2), 2.6 (q, 2H, CH_2), 4.4 (t, 1H, CH heterociclo), 7.3 (m, 5H, Ar), 7.5 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.7 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 10.1 (CH_3), 11.3 (CH_3), 21.0 (CH_2), 25.6 (CH_2), 48.2 (CH heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 129.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 134.9 (CH, Ar), 138.6 ($\text{N}_3\text{-C}$, Ar), 162.7 (C=N), 165.5 (S-C=N), 173.9 (C=O).

5.2.18 Síntese do LR-16, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5-isopropil-3-feniltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,63 g) do composto (**Int 3**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 15 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,76 g) de ácido 2-bromo-3-metilbutílico e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 20 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração amarela foi obtido. Guardou-se em geladeira por três dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente.

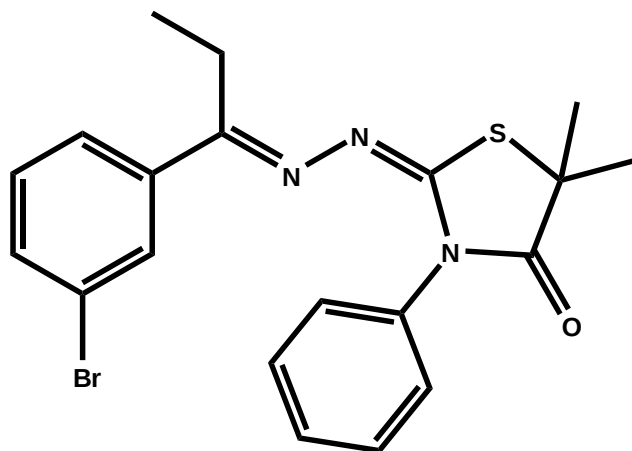
Pó levemente amarelado; PF: 159 °C; Rend.: 67% ; Rf: 0,55 (Tolueno / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1725 (C=O), 1566 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0.8 (m, 3H, CH_3), 0.9 (m, 2H, CH_2), 0.9 (m, 6H, CH_3), 2.0 (m, 1H, CH (diMe)), 3.3 (d, 1H, CH heterociclo), 7.4 (m, 6H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.8 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 10.9 (CH_3), 17.4 (CH_3), 20.8 (CH_2), 26.3 (CH, diMe), 53.9 (CH heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 127.9 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 130.1 (CH, Ar), 130.9 (CH, Ar), 132.9 (CH, Ar), 135.5 (CH, Ar), 138.7 (C, Ar), 139.2 (CH, Ar), 163.0 (C=N), 165.1 (S-C=N), 172.7 (C=O).

5.2.19 Síntese do LR-17, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-5,5-dimetil-3-feniltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,63 g) do composto (**Int 3**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 20 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,70 g) de ácido α -bromo isobutílico e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 20 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração amarelado foi obtido. Guardou-se em geladeira por dois dias e, posteriormente, o precipitado foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente.

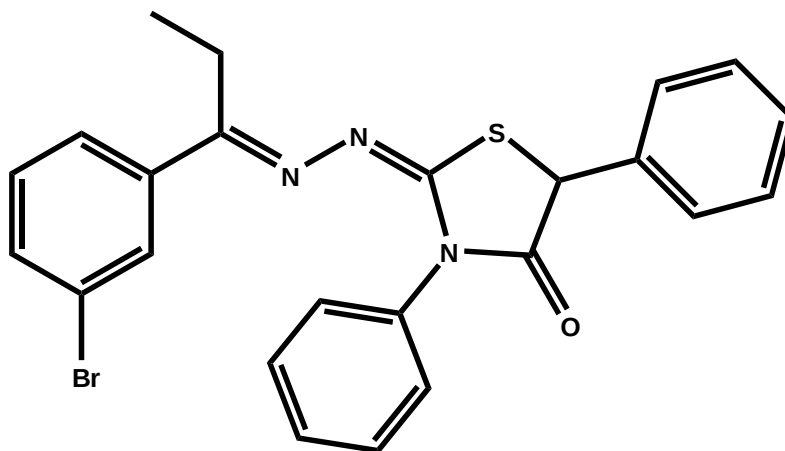
Pó levemente amarelado; PF: 122 °C; Rend.: 40% ; Rf: 0,56 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1732 (C=O), 1606 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 0.85 (t, 3H, CH_3), 1.6 (s, 6H, CH_3), 2.6 (q, 2H, CH_2), 7.4 (m, 6H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.7 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.2 (CH_3), 20.9 (CH_2), 27.8 (CH_3 , CH_3 , heterociclo), 50.8 (C, heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 135.0 (CH, Ar), 138.5 (C, Ar), 138.7 (C, N_3), 161.7 (C=N), 165.3 (S-C=N), 177.2 (C=O).

5.2.20 Síntese do LR-18, (E)-2-((E)-(1-(3-bromofenil)propilideno)hidrazona)-3,5-difeniltiazolidin-4-ona:



Sob agitação magnética: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2.12 mmol (0,63 g) do composto (**Int 3**), 20 mL de etanol, 8.48 mmol (0,70 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento de aproximadamente 20 minutos, adicionou-se 4.24 mmol (0,84 g) de 2-cloro-2-fenilacetato de etila e a reação prosseguiu sob refluxo (90 °C) durante 22 horas (monitorada por CCD). Um precipitado de coloração bege foi obtido. Guardou-se em geladeira por dois dias e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

Pó amarelado; PF: 185 °C; Rend.: 61% ; Rf: 0,67 (Hexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais: 1728 (C=O), 1602 (C=N) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 0.9 (t, 3H, CH_3), 2.6 (q, 2H, CH_2), 2.9 (q, 2H, CH_2), 5.6 (s, 1H, CH heterociclo), 7.3 (m, 10H, Ar), 7.5 (t, 1H, Ar), 7.6 (d, 1H, Ar), 7.8 (d, 1H, Ar), 7.9 (s, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.3 (CH_3), 21.0 (CH_2), 50.2 (CH, heterociclo), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.6 (C, Ar), 135.0 (CH, Ar), 136.7 (CH, Ar), 138.5 (CH, Ar), 139.0 (C, Ar), 162.4 (C=N), 165.8 (S-C=N), 172.7 (C=O).

5.3 Protocolo da Avaliação Farmacológica

5.3.1 Ensaio *in vitro* sobre as formas evolutivas tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*

Este ensaio realizado é descrito por Buckner et al. e atualizado por Romanha A. J. et al (127). Utilizou-se o *T. cruzi* (cepa Tulahuen) que expressa o gene β -galactosidase da *Escherichia coli*. As formas infecciosas tripomastigota são obtidas através da cultura em monocamadas de fibroblastos L929 de camundongos no meio RPMI-1640 (pH 7,2-7,4), sem vermelho de fenol (Gibco BRL), contendo 10% de soro fetal bovino e glutamina. Microplacas de cultura de tecido (96 poços) foram semeadas com fibroblastos L929 a 4.000 células por poço em meio de 80 μ L e incubado durante a noite a 37°C com 5% de CO₂. Os tripomastigotas expressando a β -galactosidase foram então adicionados a 40.000 por poço num volume de 20- μ L. Após 2 horas de contato, o meio contendo tripomastigotas que não tinham penetrado nas células foi descartado e substituído por 200 μ L de meio fresco. Após 48 horas, o meio foi descartado e substituído novamente com 180 μ L de meio fresco e 20 μ L de uma solução de um composto de teste diluído com o meio a partir de soluções estoque preparadas usando dimetil sulfoxido. Cada composto foi testado em triplicata, em concentrações que variam de cerca de 100-2 μ M. Os compostos ditos inativos foram testados na dose de 80 μ g/mL, exceto para os compostos **LR-03** e **LR-04** que foram inativos na dose de 20 μ g/mL. Após sete dias de cultura, o vermelho de clorofenol, β -D-galactopiranosídeo a 100 μ M e Nonidet P-40 a 0,1% foram adicionados às placas e incubados durante a noite a 37°C. A absorbância foi medida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas automático. O BZD na sua metade da concentração máxima inibitória (CI₅₀) foi utilizada como um controle positivo. Os resultados são expressos como uma percentagem de inibição do crescimento do parasita.

5.3.3 Toxicidade para fibroblastos L929

Para este bioensaio, 4.000 células de mamíferos em 200 mL de meio RPMI-1640 (pH 7,2-7,4) (Gibco BRL) mais 10% de soro fetal bovino e 2 mM de glutamina são adicionados a cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços, que é incubado durante três dias, a 37°C, em CO₂. O meio é então substituído com soluções dos compostos ativos (diluídos em

200 µL de meio sem vermelho de fenol suplementado) em concentrações 50X a CI_{50} encontrado no ensaio de toxicidade para a forma tripomastigota/amastigota. A placa é incubada durante quatro dias a 37°C. Após este período, 20 µL de AlamarBlue™ é adicionado a cada poço e a placa é incubada durante 4-6 horas, após esse período, a absorbância a 570 e 600 nm é medida. Os controles com células não tratadas e tratadas com BZD são executados em paralelo e triplicatas são executadas na mesma placa. Os resultados são expressos como a diferença percentual na redução entre tratado (T) e células não tratadas (NT), usando a seguinte equação:

$$\frac{(117,216) (Abs570 TC) - (80,586) (Abs600 TC)}{(117,216) (Abs570 UT) - (80,586) (Abs600 UT)} \times 100$$

6 . Conclusões e Perspectivas

6.1 Conclusões

As dezoito aril-4-tiazolinonas inéditas propostas (**LR-01 a LR-18**) foram sintetizadas a partir das tiossemicarbazonas (**Int 1-3**), através de metodologias sintéticas descritas e que já foram empregadas em nosso laboratório. As condições reacionais utilizadas resultaram em rendimentos satisfatórios (23-97%) e pureza comprovada. As estruturas foram confirmadas por I.V., RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Os compostos da série foram avaliados quanto à atividade tripanocida frente às formas tripomastigota e amastigota e quanto a citotoxicidade em células de mamíferos.

O planejamento estrutural das aril-4-tiazolinonas, através da estratégia de bioisosterismo, foi fundamentado na tentativa de identificar compostos que mantivessem a atividade tripanocida somado a uma menor toxicidade quando comparado aos seus bioisósteros acíclicos, as tiossemicarbazonas. Assim, foi possível identificar três compostos (**LR-05, LR-07 e LR-08**) com atividade tripanocida *in vitro* superior que o BZD, quanto à inibição da viabilidade celular frente a amastigota/tripomastigota da cepa Tulahuen. Destaque para o composto **LR-08** que foi cerca de 9 vezes mais potente que o BZD e que possui como característica estrutural a presença de uma metila em N3 e outra metila em C5.

6.2 Perspectivas

As aril-4-tiazolinonas (**LR 01-18**) e as tiossemicarbazonas (**Int 1-3**) sintetizadas apresentaram toxicidade menos satisfatória quando comparada ao BZD em fibroblastos L929, porém, pode-se realizar novas alterações estruturais nessa série com o intuito de manter ou aperfeiçoar a potência tripanocida e reduzir esta toxicidade. Além disso, como forma de enriquecimento deste trabalho para futuras publicações, têm-se o seguimento dos testes biológicos frente a enzima cruzaina para os compostos mais promissores (**LR-05, LR-07 e LR-08**) afim de estabelecer um possível mecanismo de ação para essas moléculas.

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

Referências

REFERÊNCIAS

- (1) Fundação Oswaldo Cruz; Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acessado em: 07 de Fevereiro de 2014.
- (2) Word Health Organization; Disponível em: <<http://www.who.int/tdr>>. Acessado em: 07 de Fevereiro de 2014.
- (3) SCHMUNIS GA; YADON ZE. Chagas' disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**. 2010; Vol. 115, Pág. 14–21.
- (4) KROPF, S. P. Carlos Chagas, a ciência para combater doenças tropicais. Rio de Janeiro: Museu da Vida / Casa de Oswaldo Cruz / FIOCRUZ. 2009.
- (5) Organização Mundial de Saúde; Disponível em <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/human-rights.pdf?ua=1>> . Acessado em 07 de Fevereiro de 2014.
- (6) COURA, J. R. ; PEREIRA, J. B. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol. 45 no. 3 Uberaba May/June 2012.
- (7) COURA J.R. ; CASTRO S. L. A critical review on Chagas disease Chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 2002; 97: 3-24.
- (8) URBINA, J. A. New Advances in the Management of a Long-Neglected Disease. **Clinical Infectious Diseases**. 2009, 49, 1685–1687.
- (9) MACHADO, F. S.; JELICKS, L. A.; KIRCHHOFF, L. V.; SHIRANI, J.; NAGAJYOTHI, F.; MUKHERJEE, S.; NELSON, R.; COYLE, C. M.; SPRAY, D. C.; DE CARVALHO, A. C.; GUAN, F.; PRADO, C. M.; LISANTI, M. P.; WEISS, L. M.; MONTGOMERY, S. P.; TANOWITZ, H. B. Chagas heart disease: report on recent developments. **Cardiology in Review**. 2012, 20, 53–65.
- (10) MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A., JR.; AVEZUM, A., JR.; MATTOS, A. C.; RASSI, A. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 2009, 104, 319–324.
- (11) PINAZO, M. J.; MUÑOZ, J.; POSADA, E.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; GÁLLEGO, M.; AYALA, E.; DEL CACHO, E.; SOY, D.; GASCON, J. Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2010, 54, 4896–4899.
- (12) TARLETON, R. L.; CURRAN, J. W. Is Chagas Disease Really the “New HIV/AIDS of the Americas” **PLoS Neglected Tropical Disease**. 2012, 6, e 1861.
- (13) HERNANDES, M. Z.; RABELLO, M. M.; LEITE, A. C.; CARDOSO, M. V.; MOREIRA, D. R.; BRONDANI, D. J.; SIMONE, C. A.; REIS, L. C.; SOUZA, M. A.; PEREIRA, V. R.; FERREIRA, R. S.; McKERROW, J. H. Studies toward the structural

optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 18 (22), 7826-7835, 2010.

(14) MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. Sistemas Enzimáticos de Tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. **Revista Virtual de Química**. Disponível em: < <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/view/577/400> >. Acesso em: 10 de fevereiro de 2014.

(15) CAPUTTO, M. E.; FABIAN, L. E.; BENÍTEZ, D.; MERLINO, A.; RÍOS, N.; CERECETTO, H. MOLTRASIO, G. Y.; MOGLIONI, A. G.; GONZÁLEZ, M.; FINKIELSZTEIN, L. M. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-Trypanosoma cruzi agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 19 (22), 6818-6826, 2011.

(16) CAPUTTO, M. E.; CICCARELLI, A.; FRANK, F.; MOGLIONI, A. G.; MOLTRASIO, G. Y.; VEGA, D.; LOMBARDO, E.; FINKIELSZTEIN, L. M. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolylhydrazone derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 55, 155-163, 2012.

(17) DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; McKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medical Chemistry**, 45 (13), 2695-2707, 2002.

(18) CHIYANZU, I.; HANSELL, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; McKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and Evaluation of Isatins and Thiosemicarbazone Derivatives Against Cruzain, Falcipain-2 and Rhodesain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 13 (2), 3527-3530, 2003.

(19) GREENBAUM, D. C.; MACKEY, Z.; HANSELL, E.; DOYLE, P.; GUT, J.; CAFFREY, C. R.; LEHRMAN, J.; ROSENTHAL, P. J.; McKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Parasitocidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors Against Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei, and Trypanosoma cruzi. **Journal of Medical Chemistry**, 47 (12), 3212-3219, 2004.

(20) FUJII, N.; MALLARI, J. P.; HANSELL, E. J.; MACKEY, Z.; DOYLE, P.; ZHOU, Y. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; McKERROW, J. H.; GUY, R. K. Discovery of Potent Thiosemicarbazone Inhibitors of Rhodesain and Cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 15 (1), 121-123, 2005.

(21) LEITE, A. C. L.; LIMA, R. S.; MOREIRA, D. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; BRITO, A. C. G.; SANTOS, L. M. F.; HERNANDES, M. Z.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, R. S.; SOARES, M. B. P. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against Trypanosoma cruzi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14 (11), 3749-3757, 2006.

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

- (23) GUIDO, R. V.; TROSSINI, G. H.; CASTILHO, M. S.; OLIVA, G.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-Activity Relationships for a Class of Selective Inhibitors of the Major Cysteine Protease from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 23 (6), 964-973, 2008.
- (24) TROSSINI, G. H. G.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. Quantitative structure–activity relationships for a series of inhibitors of cruzaina from *Trypanosoma cruzi*: Molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 28, 3-11, 2009.
- (25) PIZZO, C.; FARAL-TELLO, P.; SALINAS, G.; FLO, M.; ROBELLO, C.; WIPF, P.; MAHLER, S. G. Selenosemicarbazones as Potent Cruzipain Inhibitors and Their Antiparasitic Properties Against *Trypanosoma cruzi*. **Medicinal Chemistry Communications**, 3, 362-368, 2012.
- (26) MERLINO, A.; BENITEZ, M.; CAMPILLO, N. E.; PAEZ, J. A.; TINOCO, L. W.; GONZALEZ, M.; CERECETTO, H. Amidines Bearing Benzofuroxan or Benzimidazole 1,3-Dioxide Core Scaffolds as *Trypanosoma cruzi*-Inhibitors: Structural Basis for Their Interactions with Cruzipain. **Medicinal Chemistry Communications**, 3, 90-101, 2012.
- (27) MOREIRA, D. R. M. M.; COSTA, S. P. M.; HERNANDES, M. Z.; RABELLO, M. M.; OLIVEIRA FILHO, G. B.; MELO, C. M. L.; ROCHA, L. F.; SIMONE, C. A.; FERREIRA, R.; FRADICO, J. R. B.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SRIVASTAVA, R. M.; PEREIRA, V.; SOARES, M. B. P. S.; LEITE, A. C. L. L. Structural Investigation of Anti-*Trypanosoma cruzi* 2-Iminothiazolidin-4-ones Allows the Identification of Agents with Efficacy in Infected Mice. **Journal of Medical Chemistry**, 55 (24), 10918-10936, 2012.
- (28) DPDx – Trypanosomiasis, American. Fact Sheet. Centers for Disease Control (CDC). Retrieved 12/Março/2012.
- (29) COURA, J. R.; PEREIRA, J. B. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- (30) FIOCRUZ – Chagas. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=91>> . Acessado em 08 de fevereiro de 2014.
- (31) RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. *Lancet*, 375, 1388–402, 2010.
- (32) GASCON J, BERN C, PINAZO MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**; DOI:10.1016/j., 2009.
- (33) ANDRADE J. P. ; MARIN NETO, J. A. ; PAOLA A. A. ; VILAS-BOAS F. ; OLIVEIRA G.M. ; BACAL F. ; et al. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas’ heart disease: executive summary. **Arquivo Brasileiro Cardiologia** 2011;96:434–42.
- (34) RIBEIRO, A. L. ; NUNES M. P. ; TEIXEIRA M. M. ; ROCHA M. O. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol** 2012; 9:576–89.

- (35) CARYN BERN, M. D. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **The New England Journal of Medicine**. 2011; 364:2527–34.
- (36) ISSA V.S. ; BOCCHI E. A. Antitrypanosomal agents: treatment or threat? *Lancet* 2010; 376:768, author reply 768–9.
- (37) NUNES, M. C. P. Nunes, MD; DONES, W., MD; MORILLO, C. A. MD; ENCINA, J. J. MD, RIBEIRO, A. L. Chagas Disease An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. **Journal of the American College of Cardiology**. Vol. 62, 2013; 62(9): 767-776. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.046
- (38) World Health Organization – WHO - Factsheets 2013. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en> > . Acessado em 09 fevereiro de 2014.
- (39) Pan American Health Organization. Disponível em: < http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856&Itemid=4196&lang=en > . Acessado em: 09 fevereiro de 2014.
- (40) SILVEIRA, A.C. , 2011a. New challenges and the future of control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 44 (Suppl. 2), 122–124.
- (41) MARTINS-MELO, F.R. ; RAMOS JR. , A. N. ; ALENCAR, C.H. ; HEUKELBACH, J. ; 2012e. Multiple causes of death related to Chagas' disease in Brazil, 1999 to 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 45, 591–596.
- (42) MARTINS-MELO, F.R. ; HEUKELBACH, J., 2013. Epidemiology and spatial distribution of mortality related to Chagas disease in Brazil, 1999 to 2007. *Cadernos Saúde Coletiva*. 21, 105–106.
- (43) RAMOS JR., A. N. ; MARTINS-MELO, F.R. ; BARBOSA, J.C. ; HEUKELBACH, J. , 2010. The role of operational research and the challenges for integration of care and control of Chagas disease in the Brazilian Unified Health System. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 43 (Suppl. 2), 12–17.
- (44) AKHAVAN, D. , 2000. Cost-effectiveness Analysis of the Project for Controlling Chagas Disease in Brazil - Final Report. Pan American Health Organization, Brasília.
- (45) DIAS, J.C., 2007. Globalization, inequity and Chagas disease. *Caderno de Saúde Publica* 23 (Suppl. 1), S13–S22.
- (46) MARTINS-MELO, F.R.; ALENCAR, C. H. ; RAMOS JR. , A. N. ; HEUKELBACH, J. , 2012a. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999–2007. *PLoS Negl. Neglected Tropical Disease*. 6, e1508.
- (47) MARTINS-MELO, F. R. ; RAMOS JR., A. N. ; ALENCAR, C. H. ; HEUKELBACH, J. , 2012b. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. **The Journal of Infection in Developing Countries**. 6, 817–824.
- (48) COURA, J.R., 1988. Determinantes epidemiológicos da doença de Chagas no Brasil: a infecção, a doença e sua morbi-mortalidade. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 83, 392–402.

- (49) MACEDO, A. M. ; PENA, S. D. J. , 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitol. Today** 14, 119–124.
- (50) ANDRADE, S. G. ; CAMPOS, R. F. ; SOBRAL, S. C. ; MAGALHÃES, J. B. ; GUEDES, R. S. P. ; GUERREIRO, M. L. , 2006. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 39, 1–8.
- (51) TEIXEIRA, A. R. L., NASCIMENTO, R. J. ; STURM, N. R. , 2006a. Evolution and pathology in Chagas disease - a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 101, 463–491.
- (52) ZINGALES, B. ; ANDRADE, S. G. ; BRIONES, M. R. S. ; CAMPBELL, D. A. ; CHIARI, E. ; FERNANDES, O. ; et al. , 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 104, 1051–1054.
- (53) DIAS, J. C. P. Natural history of Chagas' disease. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**; 65: 359–66 (in Portuguese); 1995.
- (54) CANÇADO, J.R. Criteria of Chagas disease cure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94 (I), 331–336, 1999.
- (55) ANDRADE, S. G. et al. (1992) Specific chemotherapy of Chagas' disease: the comparison between the response in patients and experimental animals infected with the same strains. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 86, 624–626.
- (56) RASSI A. JR. ; RASSI A. ; LITTLE W. C. ; et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **N Engl J Med** 2006; 355:799–808.
- (57) NUNES M. C. ; REIS R.C. ; COLOSIMO E. A. ; et al. Risk estimation approach in Chagas disease is still needed. **International Journal of Cardiology**. 2011;147:294–6.
- (58) MARIN-NETO J.A. ; RASSI A. JR. ; MACIEL B.C. ; SIMOES M.V. ; SCHMIDT A. Chagas heart disease. In: YUSUF S.; CAIRNS J.A. ; CAMM A.J. ; FALLEN E. L. ; GERSH B. J. ; eds. Evidence-based cardiology, 3rd edn. **London: British Medical Journal (BMJ) Books**, 823–41, 2010. CAROD-ARTAL F. J. ; GASCON J. Chagas disease and stroke. **Lancet Neurol** 2010; 9:533–42.
- (59) LOUIS V KIRCHHOFF (17 December 2010). Chagas Disease (American Trypanosomiasis). eMedicine, Retrieved 8/February/2014.
- (61) CAMPBELL DA, WESTENBERGER SJ, STURM NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. **Current Molecular Medicine**; 4; 549–62, 2004.
- (62) DE REZENDE J. M. ; LUQUETTI A. O. Chagasic megavisceras. In: Chagas' disease and the nervous system. Scientific publication, nº 547. Washington, DC: Pan American Health Organization, 149–71, 1994.

- (63) BRANDALISE N. A. ; ANDREOLLO N. A. ; LEONARDI L. S. ; CALLEJAS NETO F. Carcinoma associated with Chaga's megaesophagus. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**; 12, 196–99, 1985.
- (64) GARCIA S. B. ; ARANHA A. L. ; GARCIA F. R. ; et al. A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; 45, 91–93, 2003.
- (65) FREITAS H. F. ; CHIZZOLA P. R. ; PAES A. T. , et al. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas heart disease. **International Journal of Cardiology**; 102: 239–47, 2005.
- (66) DEANE L. M. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**; 16: 27–48, 1964.
- (67) VALLEJOA, G.A. ; GUHLI F. ; SCHAUB G.A. Triatominae – *Trypanosoma cruzi*/ *T. rangeli*: Vector–parasite interactions. **Acta Tropica**. 2009 May-Jun;110(2-3):137-47
- (68) SANTOS FERREIRA C. ; AMATO NETO V. ; GAKIYA E. ; BEZERRA R. C. ; ALARCÓN R. S. Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; 45 (1): 41–2, 2003.
- (69) ZAIDENBERG, M., 1997. Congenital Chagas' disease in the province of Salta, Argentina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 32 (1999), 689–695.
- (70) ALTSCHEH, J. ; BIANCARDI, M. ; LAPEÑA, A. ; BALLERING, G. ; FREILIJ, H. , 2005. Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 38, 41–45.
- (71) GÜRTLER, R. E. ; SEGURA, E. L. ; COHEN, J. E. , 2003. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerg. Infect. Dis.** 9, 29–32.
- (72) AZOGUE, E. ; LA FUENTE, C. ; DARRAS, C. , 1985. Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 79, 176–180.
- (73) TORRICO, F. ; ALONSO-VEGA, C.; SUAREZ, E. ; RODRIGUEZ, P. ; TORRICO, M. C. ; DRAMAIX, M. ; TRUYENS, C. ; CARLIER, Y. , 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 70, 201–209.
- (74) BERN, C. ; VERASTEGUI, M. ; GILMAN, R. H. ; LAFUENTE, C. ; GALDOS-CARDENAS, G. ; CALDERON, M. ; PACORI, J. ; DEL CARMEN ABASTOFLO, M. ; APARICIO, H. ; BRADY, M. F. ; FERRUFINO, L. ; ANGULO, N. ; MARCUS, S. ; STERLING, C. ; MAGUIRE, J. H. , 2009. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. **Clin. Infect. Dis.** 49, 1667–1674.

- (75) BRUTUS, L. ; SCHNEIDER, D. ; POSTIGO, J. ; DELGADO, W. ; MOLLINEDO, S. ; CHIPPAUX, J. P. ; 2007. Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 101, 1159–1160.
- (76) NISIDA, I. V. ; AMATO-NETO, V. ; BRAZ, L. M.; DUARTE, M. I. ; UMEZAWA, E. S. , 1999. A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three health institutions in Sao Paulo City, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** 41, 305–311.
- (77) RASSI, A. ; AMATO-NETO, V. ; RASSI, G. G. ; AMATO, V. S. ; RASSI JR, A. ; LAQUETTI, A. O. ; RASSI, S. G. , 2004. A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 37, 485–489.
- (78) APT, W. ; ZULANTAY, I. ; SOLARI, A. ; ORTIZ, S. ; ODDO, D. ; CORRAL, G. ; TRUYENS, C. ; CARLIER, Y. , 2010. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in the province of Choapa, IV Region, Chile: preliminary report (2005–2008). **Biol. Res.** 43, 269–274
- (79) RUSSOMANDO, G. ; ALMIRÓN, M. ; CANDIA, N. ; FRANCO, L. ; SÁNCHEZ, Z. ; DE GUILLEN, I. , 2005. Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in endemic areas of Paraguay. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38, 49–54.
- (80) CARLIER, Y. ; TORRICO, F. , 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 36, 767–771.
- (81) CARLIER, Y. ; TRUYENS, C. , 2010. Maternal–fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. In: Telleria, J., Tibayrenc, M. (Eds.), *American Trypanosomiasis, Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Elsevier, pp. 539–581.
- (82) CARDOSO, E. J.; VALDÉZ, G. C. ; CAMPOS, A. C.; SANCHEZ R. L.; MENDOZA, C. R. ; HERNANDÉZ, A. P.; RAMÍREZ, M. H. ; HABANA, J. R.; et al. Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: A problem of public health little studied in Mexico. **Experimental Parasitology**. 2012; 131(4):425-32. doi: 10.1016/j.exppara.2012.05.013
- (83) BERN C, MONTGOMERY SP, KATZ L, CAGLIOTI S, STRAMER SL. Chagas disease and the US blood supply. **Current Opinion in Infectious Diseases**; 21: 476–82, 2008.
- (84) US Centers for Disease Control and Prevention. Chagas disease after organ transplantation - Los Angeles, California, 2006. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 2006; 55: 798–800.
- (85) ALARCÓN DE NOYA B. ; DÍAZ-BELLO Z. ; COLMENARES C. ; et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas,Venezuela. **Journal of Infectious Diseases**; 201 (9):1308–15, 2010.

- (86) PEREIRA K.S. ; SCHMIDT F.L. ; GUARALDO A.M. ; FRANCO R.M. ; DIAS V. L. ; PASSOS L. A. Chagas disease as a foodborne illness. **Journal of food protection**; 72: 441–46, 2009.
- (87) Valente S. A. S. Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas. Exposição na Mesa Redonda Situação atual da doença de Chagas na Amazônia. XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Florianópolis, março/ 2005.
- (88) FIGUEIRÓ-FILHO E. A. ; SENEFFONTE F. R. ; LOPES A. H. ; DE MORAIS, O. O. ; SOUZA JÚNIOR V. G. ; MAIA T. L. ; DUARTE G. Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes vírus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop.** 40(2): 181-7, 2007.
- (89) RASSI, A., RASSI, A. Jr, RASSI, S. G. *et al.* Doença de Chagas. In: Lopes AC, ed. Tratado de clinica médica, 2nd edn. Sao Paulo: Editora Roca: 4123–34; 2009.
- (90) Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz; 94 (suppl 1): 429–32; 1999.
- (91) FREITAS, J. M. ; LAGES-SILVA, E. ; CREMA, E. ; PENA, S. D. ; MACEDO, A. M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **Int J Parasitol**; 35: 411–17; 2005.
- (92) ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL D.; TIBAYRENC M.; MACEDO A. M.; TEIXEIRA M. G.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN M. S.; SILVA, E. L.; MACHADO, C. R. ; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012 Mar;12(2):240-53. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.
- (93) DIAS J. C. P. ; PRATA, A. ; CORREIA D. Problems and perspectives for Chagas disease control; in search of a realistic analysis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41. n. 2, p. 193-196, 2008.
- (94) MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE 2005. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 30 (Supl. III): 12-14.
- (95) CAVALCANTI M. P. ; LORENA V. M. B. ; GOMES, Y. M. Avanços Biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Rev. Patologia Tropical**, v. 37, p. 1-14, 2008.
- (96) GARCIA S. ; RAMOS C. O. ; SENRA J. F. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas disease decreases cardiac alterations, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; 49 (4): 1521–8, 2005.
- (97) VIOTTI, R. ; VIGLIANO, C. ; LOCOCO B. ; et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Ann Intern Med** 2006;144:724–34.

- (98) GALLERANO, R. H. ; SOUSA R. R. Resultados de um estudio a largo plazo com drogas antiparasitarias em infectados chagasicos cronicos. **Rev Fed Arg Cardiol** 2001; 30:289–96 (in Spanish).
- (99) FABBRO D. L. ; STREIGER M.L. ; ARIAS E. D ; et al. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40:1–10.
- (100) DNDi. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/centro-de-documentacao/comunicados-de-imprensa/331-30-05-2012-lote-comercial-bzn-pediatrico.html>, acessado em 02 de Maio de 2014.
- (101) NETO, P. J. R.; et al. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 2012.
- (102) Agência FAPESP. Disponível em: http://agencia.fapesp.br/cientistas_avaliam_parceria_para_desenvolver_drogas_contra_doencas_negligenciadas/20246/
- (103) BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Prioridades de pesquisa em saúde. 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/CadernoPrioridadePesquisa.pdf>. Acesso em: 14 de Maio de 2014.
- (104) Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/sobre-a-dndi/panorama/visao-a-missao.pdf> > . Acesso em: 14 de Maio de 2014.
- (105) FERREIRA, E. I.; Planejamento de Fármacos na Área de Doença de Chagas: Avanços e Desafios; **Revista Virtual de Química**, 4 (3), 225-246, 2012.
- (106) DOYLE, P. S.; ZHOU, Y. M.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2007.51, 3932–3939.
- (107) F. VILLALTA; M. C. DOBISH, P. N. ; NDE, Y. Y. KLESCHENKO, T. Y. HARGROVE, C. A. JOHNSON, M. R. WATERMAN, J. N. JOHNSTON, G. I. LEPESHEVA. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. **J. Infect. Dis.** 208 (2013) 504–511. DOI: 10.1093/infdis/jit042
- (108) A. A. RASCÓN JR, J. H. MCKERROW. Synthetic and natural protease inhibitors provide insights into parasite development, virulence and pathogenesis. **Curr. Med. Chem.** 20 (2013) 3078–3102. DOI:10.2174/0929867311320250005
- (109) GUHL, F.; LAZDINS-HELDS, J.K. (Eds.). Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. WHO & PAHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases Report, v.9, p. 1-2, 2007.
- (110) PITA, S. S. da R.; PASCUTTI, P. G. Alvos Terapêuticos na Doença de Chagas: a Tripanotiona Redutase como Foco. **Rev. Virtual Quim.**, 2011, 3 (4), 307-324.

- (111) ALVEZ, M. J. M. ; MORTARA, R. A. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 2009, 104 (Supl. I), 76.
- (112) MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in parasitic diseases. **Annual Review Pathology**, 1 (497), 497-536, 2006.),
- (113) MCKERROW, J. H.; DOYLE, P.S.; ENGEL, J.C.; PODUST, L.M.; ROBERTSON, S. A.; FERREIRA, R.; SAXTON, T.; ARKIN, M.; KERR, I. D.; BRINEN, L. S.; CRAIK, C. S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 263-269, 2009
- (114) V. G. DUSCHAK; M. CIACCIO; J. R. NASSERT; M. A. BASOMBRI. Enzymatic activity, protein expression and gene sequence of cruzipain in virulent and attenuated *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.** 87 (2001) 1016–1022.
- (115) P. S. DOYLE; Y. M. ZHOU; I. HSIEH; D. C. GREENBAUM ; J. H. MCKERROW, J. C. ENGEL. The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. **Plos Pathog.** 7 (2011) e1002139. DOI:10.1371/journal.ppat.1002139
- (116) DU, X.; HANSELL, E.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R.; COHEN, F. E.; MCKERROW, J. H. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents, **Chemistry & Biology**, 7, 733–742; 2000.
- (117) H. J. WIGGERS ; J. R. ROCHA; W. B. FERNANDES, R. SESTI-COSTA, Z. A. CARNEIRO, J. CHELESKI, A. B. DA SILVA, L. JULIANO, M. H. CEZARI, J. S. Silva, J. H. MCKERROW, C. A. MONTANARI. Non-peptidic cruzain inhibitors with trypanocidal activity discovered by virtual screening and in vitro assay. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 7 (2013) e 2370. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002370
- (118) J. M. DOS SANTOS FILHO; A. C. L. LEITE; B. G. DE OLIVEIRA, D. R. M. MOREIRA, M. S. LIMA, M. B. P. SOARES, L. F. C. LEITE. Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-*N* acylhydrazones as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Bioorg. Med. Chem.** 17 (2009) 6682–6691. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.07.068
- (119) N. C. ROMEIRO, G. AGUIRRE, P. HERNANDÉZ, M. GONZÁLEZ, H. CERECETTO, I. ALDANA, S. PÉREZ-SILANES, A. MONGE, E. J. BARREIRO, L. M. LIMA. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorg. Med. Chem.** 17 (2009) 641–652. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.11.065
- (120) J. M. DOS SANTOS FILHO; D. R. MOREIRA; C. A. DE SIMONE; R. S. FERREIRA; J. H. MCKERROW; C. S. MEIRA; E. T. GUIMARÃES; M. B. P. SOARES. **Bioorg. Med. Chem.** 20 (2012) 6423–6433. DOI:10.1016/j.bmc.2012.08.047
- (121) T. N. FRANKLIM; L. FREIRE-DE-LIMA, J. N. S. DINIZ; J. O. PREVIATO, R. N. CASTRO, L. MENDONÇA-PREVIATO, M. E. F. DE LIMA. Design, synthesis and trypanocidal evaluation of novel 1,2,4-triazoles-3-thiones derived from natural piperine. **Molecules** 18 (2013) 6366–6382. DOI: 10.3390/molecules18066366

- (122) MOREIRA, D. R. M.; OLIVEIRA, A. D. T.; GOMES, P. A. T. M. ; LEITE, A C. L. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. **Eur J Med Chem.** 2014 Mar 21;75:467-78. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.02.001
- (123) L. M. LIMA; E. J. BARREIRO. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design; **Current Medicinal Chemistry**, 12, 23–49, 2005.
- (124) VICINI, P.; GERONIKAKI, A.; ANASTASIA, K.; INCERTIA, M.; ZANI, F. Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14, 3859–3864, 2006.
- (125) GOMES, P. A. T. M. Síntese e Avaliação da Atividade Anti-*Trypanossoma Cruzi* de Inéditas Hidrazona-Tiazóis. **Tese de Mestrado**. Recife – PE, 2012.
- (126) PIZZO, C.; SAIZ, C.; TALEVI, A.; GAVERNET, L.; PALESTRO, P.; BELLERA, C.; BLANCH, L. B.; BENÍTEZ, D.; CAZZULO, J. J.; CHIDICHIMO, A.; WIPF, P.; MAHLER, S. G. Synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones based on multicomponent reactions and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. **Chemical Biology & Drug Design**, 77, 162–177, 2011.
- (127) ROMANHA, A.J.; et al. 2010. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 105: 233-238.
- (128) LIPINSKI, C. A.; et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**.