

HELENA BRAGA LEITES

**Síntese de derivados do megalzol: um potente
fármaco antiparasitário**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2018

HELENA BRAGA LEITES

**Síntese de derivados do megalzol: um potente
fármaco antiparasitário**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Ronaldo Zucatelli Mendonça

Versão original

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Braga Leites, Helena

Síntese de derivados do megalol: um potente
fármaco antiparasitário / Helena Braga Leites;
orientador Ronaldo Zucatelli Mendonça. -- São Paulo,
2018.

147 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. 5-nitroimidazóis. 2. megalol. 3. Trypanossoma
cruzi. 4. Schistosoma mansoni. 5. atividade
antiparasitaria. I. Zucatelli Mendonça, Ronaldo,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a):

Título da Dissertação:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:.....
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **808/2016** referente ao projeto intitulado: "*Síntese de Derivados do Megazol: um Potente Fármaco Anti-Parasitário*" sob a responsabilidade de **Helena Braga Leites** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Ronai Zucatelli Mendonça**, do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 14 de abril de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

Aos meus pais Aurea e Manoel,
que sempre me apoiaram em tudo e continuam apoiando.
Às minhas irmãs Clara e Laura e aos meus sobrinhos
Isadora e Bernardo, minhas alegrias diárias.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciências Biomédicas e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido.

À professora Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque, por toda a orientação, paciência, boa vontade, amizade e ensinamento na parte de síntese orgânica, por ter acreditado em mim e por ter disponibilizado seu laboratório para que eu pudesse realizar meu trabalho.

Ao meu orientador prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, por todo o auxílio, apoio e ensinamento na parte biológica.

À Rafa, Flávia, Paty e o Rodolfo, por toda a ajuda e ensinamento quanto aos testes biológicos, me mostrando todas as técnicas com paciência e bom humor.

Ao professor Dr. Ariel Mariano Silber, por todo o ensinamento referente aos parasitas, facilitando minha compreensão.

Aos professores Dra. Bianca Zingales, Dra. Margareth Capurro pela participação na banca de qualificação e pelas sugetões dadas.

Um agradecimento especial ao professor Dr. Roberto Parise Filho, por diversos conselhos e sugestões, além da participação na banca de qualificação.

Ao professor Dr. Pat Forgione, por ter me recebido em seu laboratório, além de todo o ensinamento. Agradeço também aos colegas do fORGione Group por toda a ajuda e amizade que construímos ao longo do período que pude viver lá.

Aos meus pais, Aurea e Manoel, que sempre me incentivaram a fazer o que gosto e que formaram a minha maravilhosa família. As minhas irmãs, Clara e Laura, minhas primeiras amigas. E aos meus sobrinhos, Isadora e Bernardo, que são uma das maiores alegrias da minha vida.

Ao meu namorado Renato por todo o seu companheirismo, paciência e amor.

A todo o resto da família Braga Leites, sempre muito unida e animada.

Aos meus melhores amigos Monique Andressa, Miss, Francisca Bia, Bruna, Carol e Denis, que tem estado comigo por toda a minha vida, dividindo tantos momentos importantes.

E a todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

LEITES, H.B. **Síntese de derivados do megalzol: um potente fármaco antiparasitário.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

As doenças negligenciadas são uma classe de doenças causadas, em sua maioria, por parasitas, e que abrangem aproximadamente 1 bilhão de pessoas ao redor do mundo. A esquistossomose e a Doença de Chagas fazem parte dessa classe, e ambas apresentam muitos problemas relacionados ao tratamento farmacológico, sobretudo em relação à resistência e toxicidade. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novos compostos esquistossomicidas e antichagásicos. Em vista disso, em 1968, Asato e Berkelhammer sintetizaram o megalzol, um composto do tipo 5-nitroimidazol que apresentou elevada atividade antiparasitária. Entretanto, este composto também apresentou atividade mutagênica, não podendo ser inserido na terapêutica. Contudo, por meio de modificações moleculares planejadas, podem ser obtidos derivados mais seguros e mais potentes. Compostos do tipo tiossemicarbazona, amídicos e contendo diferentes heterocíclicos foram sintetizados, para se avaliar a influência destes grupos frente à atividade esquistossomicida e antichagásica. Ao final, foi observado que a inserção da tiossemicarbazona no lugar no anel 1,3,4-tiadiazólico não contribuiu para a atividade antichagásica, entretanto, frente ao *Schistosoma mansoni*, o composto mostrou-se mais ativo. A troca do imidazol pelo heterocíclico furano também piorou a atividade frente ao *Trypanosoma cruzi*, mas melhorou a atividade frente ao *Schistosoma mansoni*. Já a inserção do tiofeno não contribuiu para a atividade frente a ambos os parasitas. Os compostos sem grupo nitro foram os piores da série, indicando que este substituinte possivelmente pertence ao grupo farmacofórico. A formação das amidas, planejadas para agirem como pró-fármacos, não promoveram melhora da atividade esquistossomida, uma vez que o composto ativo também não apresentou resultados expressivos. Porém, estes compostos obtiveram resultados antichagásicos promissores, com o 1-metil-2-(5-acetamida-1,3,4-tiadiazol)-5-nitroimidazol (3) apresentando IC_{50} no valor médio de 0,375 μ M, e o 1- metil- 2- (5-propionamida-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol (5) obtendo IC_{50} médio no valor de 2,085 μ M. Estudos adicionais de inibição frente as formas amastigotas do *Trypanosoma cruzi*, bem como estudos “*in vivo*”, se fazem necessários para validar os resultados de ambos os compostos.

Palavras-chave: 5-nitroimidazóis, megalzol, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, atividade antiparasitária.

ABSTRACT

LEITES, H.B. **Synthesis of megalzol derivatives: a potent antiparasitic drug.** 2018. Master's thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Neglected diseases are a class of diseases caused mostly by parasites, and they affect approximately 1 billion people around the world. Schistosomiasis and Chagas disease are part of this class, and both present many problems related to pharmacological treatment, especially in relation to resistance and toxicity. Therefore, it's necessary to develop new schistosomicidal and antichagasic compounds. In view of this, in 1968, Asato and Berkelhammer synthesized megalzol, which is a 5-nitroimidazole derivative that has a high antiparasitic activity. However, this compound also presented mutagenic activity and could not be used for therapy purposes. However, by means of planar molecular modifications, safer and more potent derivatives can be obtained. Amidic thiosemicarbazones containing different heterocyclic moieties were synthesized to evaluate the influence of these groups on the schistosomicidal and antichagasic activity. At the end, it was observed that substituting the 1,3,4-thiadiazolic ring with the thiosemicarbazone group didn't contribute to the antichagasic activity; but enhanced the drug effect against *Schistosoma mansoni*. Substituting the imidazole by the furan also worsened the antichagasic activity, but improved the schistosomicidal activity. However, the substitution of the imidazole by thiophene worsened the activity against both parasites. Compounds without the nitro group were the least effective of all the synthesized derivatives, indicating that this group possibly belongs to the pharmacophoric group. The formation of the amides, designed to act as prodrugs, produced promising antichagasic results, where 1-methyl-2-(5-acetamide-1,3,4-thiadiazole)-5-nitroimidazole (3) had an $IC_{50}=0,375 \mu M$, and 1-2-(5-propionamide-1,3,4-thiadiazolyl)-5-nitroimidazole (5) had an $IC_{50}=2,085 \mu M$. Further studies of inhibition against amastigote forms of *Trypanosoma cruzi* as well as *in vivo* studies are needed to validate the results obtained from both compounds.

Keywords: 5-nitroimidazoles, megalzol, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, antiparasitic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vermes adultos de <i>S.mansoni</i> . Foto tirada por microscopia eletrônica de varredura.	22
Figura 2: Distribuição da esquistossomose no Brasil.....	23
Figura 3: Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	25
Figura 4: estrutura química do Praziquantel	27
Figura 5: estrutura química do Niridazol	28
Figura 6: <i>Trypanosoma cruzi</i> em sua forma tripomastigota. Foto tirada por microscopia eletrônica de varredura.	29
Figura 7: Distribuição geográfica da Doença de Chagas	30
Figura 8: Ciclo biológico do T.cruzi	32
Figura 9: Estruturas químicas do benzonidazol e nifurtimox, respectivamente.	34
Figura 10: Esquema de biorredução enzimática de nitrocompostos, por ambas as vias	35
Figura 11: Estrutura química do megalzol.	36
Figura 12: Reação de alquilação do carbono 2 do imidazol utilizando dimetilsulfato.	37
Figura 13: Reação de alquilação do nitrogênio 1 do imidazol utilizando dimetilsulfato.	37
Figura 14: Intermediários de ressonância do 5-nitro-imidazol	37
Figura 15: intermediários de ressonância do 4-nitro-imidazol.....	37
Figura 16: Intermediários de ressonância do 2-nitro-imidazol.	38
Figura 17: esquema de conversão da TS_2 em $T(SH)_2$ pela tripanotiona redutase.	41

Figura 18: estrutura do anel 1,3,4- tiadiazólico e da tiossemicarbazona.	45
Figura 19: estruturas do furano e tiofeno, respectivamente.....	47
Figura 20: estrutura dos compostos contendo a propionamida e o anel oxadiazólico, respectivamente.	47
Figura 21: estrutura do derivado contendo o nitro-tiofeno.	48
Figura 22: resumo dos derivados obtidos.	52
Figura 23: esquema da síntese total do megazol.....	56
Figura 24: esquema geral da síntese dos derivados amídicos.....	58
Figura 25: esquema geral da síntese das tiossemicarbazonas	58
Figura 26: esquema geral da ciclização das tiossemicarbazonas.	59
Figura 27: estrutura do composto 1.	66
Figura 28: mecanismo da reação de condensação entre o 1- metil- 2- imidazol- carboxialdeído e a tiossemicarbazida.	67
Figura 29: esquema de formação dos dois isômeros na reação de condensação entre o 1- metil- 2- imidazol- carboxialdeído e a tiossemicarbazida.....	67
Figura 30: estrutura do composto 2.....	68
Figura 31: mecanismo da reação de ciclização por ácido clorídrico e ácido fórmico.....	69
Figura 32: mecanismo da reação de ciclização proposto por ácido clorídrico .	69
Figura 33: estrutura do composto 3..	70
Figura 34: estrutura do composto 4.....	71
Figura 35: estrutura do composto 5.	72
Figura 36: estrutura do composto 6.	72

Figura 37: estrutura do composto 7	72
Figura 38: estrutura do composto 8	73
Figura 39: estrutura do composto 9.	74
Figura 40: estrutura do composto 10.	74
Figura 41: estrutura do composto 11.....	75
Figura 42: estrutura do composto 12.	75
Figura 43: estrutura do composto 13.	76
Figura 44: espectro de RMN ¹ H do composto 9	78
Figura 45: espectro de RMN ¹³ C do composto 9.....	80
Figura 46: espectro de RMN ¹ H do composto 11	81
Figura 47: espectro de RMN ¹³ C do composto 11.	83
Figura 48: espectro de RMN ¹ H do composto 4.....	84
Figura 49: espectro de RMN ¹³ C do composto 4.	85
Figura 50: espectro de RMN ¹ H do composto 8.....	88
Figura 51: espectro de RMN ¹³ C do composto 8.	89
Figura 52: espectro de RMN ¹ H do composto 3.....	92
Figura 53: espectro de RMN ¹³ C do composto 3	93
Figura 54: estrutura do composto 14.....	95
Figura 55: curva de crescimento dos parasitas na presença dos compostos..	96
Figura 56: Curva de inibição dos parasitas do composto 3, em diferentes concentrações (réplica 2).	99

Figura 57: Curva de inibição dos parasitas do composto 4, em diferentes concentrações (réplica 2). 100

Figura 58: Curva de inibição dos parasitas do composto 5, em diferentes concentrações (réplica 2). 100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Valores de IC ₅₀ para cada nitrocomposto frente às cepas e o clone estudados	39
Quadro 2: compostos selecionados para os testes.	59
Quadro 3: valores dos deslocamentos químicos dos derivados com diferentes heterocíclicos	86
Quadro 4: valores dos deslocamentos químicos dos derivados contendo tiossemicarbazona.	90
Quadro 5: valores dos deslocamentos químicos dos derivados contendo amidas.	94
Quadro 6: valores de clogP dos compostos selecionados.....	95
Quadro 7: Valores da concentração do composto 3	99
Quadro 8: Valores da concentração do composto 5	100
Quadro 9: Valores da concentração do composto 4	100
Quadro 10: pontuação atribuída ao composto, de acordo com a motilidade e acasalamento.	102
Quadro 11: classificação dos compostos de acordo com os testes biológicos	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Asn- Asparagina

C_{máx}- Concentração máxima

CNBr- Brometo de cianogênio

Cys- Cisteína

DMAP- Dimetil-amino-piridina

DMSO- Dimetilsulfóxido

EPC- Equipamento de proteção coletiva

EPI- Equipamento de proteção individual

ERO's- Espécies reativas de oxigênio

Et₃N- Trietilamina

F%- Biodisponibilidade

FeCl₃- Cloreto férrico

Fe(OH)₃- Hidróxido de ferro III

GSH- Glutathiona tiólica

GSSG- Glutathiona dissulfeto

HCl- Ácido clorídrico

HNO₃- Ácido nítrico

IC₅₀- Concentração que inibe 50%

J- constante de acoplamento

LIT- Liver Infusion Tryptose

LogP- Coeficiente de partição

NH₄Fe(SO₄)₂- Sulfato de ferro e amônio

OMS- Organização Mundial da Saúde

REA- Relação Estrutura Atividade

RMN¹³C- Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN¹H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPMI- 1640- “Roswell Memorial Park Institute”

SFB- Soro fetal bovino

SmCB1- Catepsina B1

SNC- Sistema Nervoso Central

S.O.D- Superóxido Dismutase

T ½ - Tempo de meia vida

T(S)₂- Tripanotiona dissulfeto

T(SH)₂- Tripanotiona ditiol

THF- Tetrahidrofurano

TMS- Tetrametilsilano

TSC- Tiossemicarbazida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1- Parasitoses	21
1.2- Esquistossomose	21
1.2.1- Descrição	21
1.2.2- Transmissão	23
1.2.3- Sintomatologia e diagnóstico	24
1.2.4- Ciclo biológico do parasita	25
1.2.5- Prevenção e controle	26
1.2.6- Tratamento	27
1.3- Doença de Chagas	28
1.3.1- Descrição	28
1.3.2- Transmissão	30
1.3.3- Sintomas e diagnóstico	31
1.3.4- Ciclo biológico	32
1.3.5- Prevenção e controle	33
1.3.6- Tratamento	33
1.4- Megazol	36
1.4.1- Características químicas	36
1.4.3- Atividade biológica	38
1.4.4 – Mecanismo de ação	40
1.4.5- Toxicidade	41
1.5 – Desenvolvimento de fármacos e derivados do megazol	42
1.5.1- Tiossemicarbazona	43
1.5.2- Grupo amino e latenciação	45
1.5.2.1- Biodisponibilidade (F%)	45
1.5.3- Derivados heterocíclicos	46
2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	49
2.1- Geral	50

2.2- Específicos	51
------------------------	----

3 PARTE EXPERIMENTAL 53

3.1- Materiais.....	54
---------------------	----

3.1.1- Reagente e solventes para a síntese	54
--	----

3.1.2- Equipamentos e outros utensílios	54
---	----

3.1.3- Utensílios utilizados nos ensaios biológicos.....	54
--	----

3.2- Métodos analíticos	55
-------------------------------	----

3.2.1- Faixa de fusão	55
-----------------------------	----

3.2.2- Análise elementar	55
--------------------------------	----

3.2.3- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	55
--	----

3.2.4- Cálculo do cLogP	56
-------------------------------	----

3.3- Métodos de síntese	56
-------------------------------	----

3.3.1- Síntese do megalol.....	56
--------------------------------	----

3.3.1.1.- Substituição nucleofílica (formação da tiossemicarbazona) (1) ...	56
---	----

3.3.1.2- Ciclização (2)	57
-------------------------------	----

3.3.1.3- Nitração/proteção do grupo amino (3)	57
---	----

3.3.1.4- Desproteção do grupo amino (4)	57
---	----

3.3.2- Síntese das amidas	57
---------------------------------	----

3.3.3. - Síntese dos derivados heterocíclicos	58
---	----

3.3.3.1- Substituição nucleofílica (formação da tiossemicarbazona) (1)	58
---	----

3.3.3.2- Ciclização (2).....	59
------------------------------	----

3.4- Ensaios biológicos	59
-------------------------------	----

3.4.1- <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
---------------------------------------	----

3.4.1.1- Cultivo das formas epimastigotas.....	61
--	----

3.4.1.2- Avaliação da proliferação celular.....	61
---	----

3.4.1.3- Cálculo da concentração inibitória 50% (IC ₅₀).....	61
--	----

3.4.2- <i>Schistosoma mansoni</i>	61
---	----

3.4.2.1- Linhagem do parasita e animais hospedeiros	62
---	----

3.4.2.2- Manutenção do ciclo do <i>Schistosoma mansoni</i>	62
--	----

3.4.2.3- Compostos a serem testados e preparo das amostras	63
--	----

3.4.2.4- Recuperação dos vermes adultos e avaliação da atividade esquistossomicida	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1- Síntese do Megazol	66
4.2- Síntese das amidas	71
4.3- Síntese do 2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitrofurano	73
4.4- 2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-tiofeno	74
4.5- Síntese do 2-(5- amino- 1,3,4- tiadiazolil)-5-nitrotiofeno	75
4.6- Caracterização dos compostos	76
4.6.1- Identificação por RMN ¹ H e RMN ¹³ C dos derivados contendo anéis heterocíclicos	77
4.6.2- Identificação por RMN ¹ H e RMN ¹³ C dos derivados contendo tiossemicarbonas	87
4.6.3- Identificação por RMN ¹ H e RMN ¹³ C dos derivados contendo amidas	91
4.7- Ensaios biológicos	95
4.7.1- Ensaios frente ao <i>Trypanosoma cruzi</i>	96
4.7.1.1- Ensaio de proliferação celular	96
4.7.1.2- Ensaio de concentração inibitória 50% (IC ₅₀)	99
4.7.2- Ensaios frente ao <i>Schistosoma mansoni</i>	101
4.7.2.1- Análise da motilidade e taxa de mortalidade e acasalamento	101
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
APÊNDICE	130
ANEXOS	142

1 INTRODUÇÃO

1.1- Parasitoses

Os seres humanos vêm sofrendo consideravelmente devido a doenças causadas por parasitas, principalmente após o século dezessete, quando enfermidades como a malária, esquistossomose e a Doença do Sono contribuíram para devastar um terço da população europeia (ROBERTS, JANOBY, 2009).

Apesar dos avanços da civilização ao longo dos anos, as parasitoses ainda possuem muitos problemas relacionados ao diagnóstico e a terapêutica. Muitas vezes, as pessoas infectadas ficam sem opção de tratamento, não havendo também interesse da indústria farmacêutica em desenvolver novos fármacos. Devido a isso, as doenças dessa classe são consideradas doenças “negligenciadas” (TROUILLER *et al.*, 2002; TOGERSON *et al.*, 2014; ANDREWS *et al.*, 2014).

1.2- Esquistossomose

1.2.1- Descrição

A esquistossomose é uma parasitose causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Atualmente, cinco espécies são conhecidas, sendo elas o *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mekongi* e *S. intercalatum* (ROSS *et al.*, 2007).

Ao contrário da maioria das doenças causadas por parasitas, que tiveram seus casos diminuídos em função do desenvolvimento econômico e métodos de controle, esta helmintose ainda se encontra em expansão, responsável por mais de 200 mil mortes anualmente (WHO, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 240 milhões de pessoas estão infectadas ao redor do mundo e mais de 800 milhões vivem em áreas endêmicas, que abrangem 78 países. Essas áreas caracterizam-se por estarem na região dos trópicos, normalmente possuem uma população de baixa renda e há pouca quantidade de água potável (WHO, 2016).

Na América do Sul (sobretudo Brasil e Venezuela), a espécie transmissora da doença é o *S. mansoni* (Figura 1), portanto nesses locais a doença recebe o nome de esquistossomose mansônica. Essa distribuição geográfica está associada devido ao parasita necessitar de um hospedeiro intermediário que vive em águas doces: o molusco do gênero *Biomphalaria* (REY, 2011).

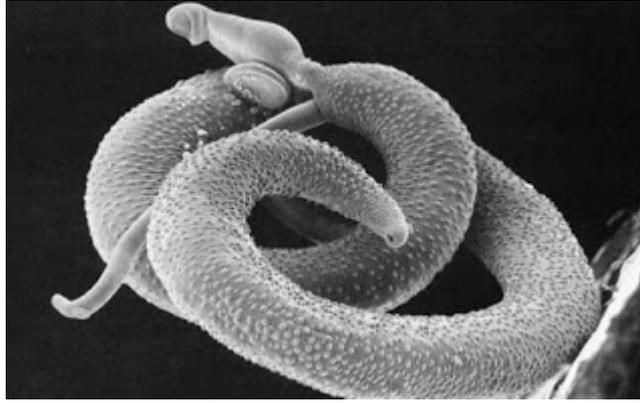


Figura 1: Vermes adultos de *S.mansoni*. Foto tirada por microscopia eletrônica de varredura.
Fonte: www.intechopen.com/books/show/title/schistosomiasis.

Os vermes possuem dimorfismo sexual, sendo o macho de cor esbranquiçada, medindo de 6 a 13 mm de comprimento por 1,1mm de largura. Já a fêmea é cilíndrica, mais fina e mais comprida que o macho, medindo de 10 a 20 mm de comprimento por 0,16 mm de largura. O macho também possui um canal ginecóforo, em que a fêmea permanece alojada e é facilmente fecundada (KATZ E ALMEIDA, 2003).

No Brasil, a esquistossomose foi detectada pela primeira vez em 1907, no estado da Bahia (AMARAL *et al.*, 2006). Então o parasita começou a migrar para outros locais do país, atingindo a costa litorânea da região Nordeste, desde o Rio Grande do Norte, até a Bahia, alcançando Minas Gerais. Os dois últimos são os estados mais endêmicos. A doença também abrange o estado do Pará, Goiás e Distrito Federal, além das regiões sudeste e sul (Figura 2) (ARAÚJO *et al.*, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Atualmente, estima-se haver 8 milhões de pessoas infectadas, e 25 a 30 milhões em área endêmicas (PIMENTA *et al.*, 2012).

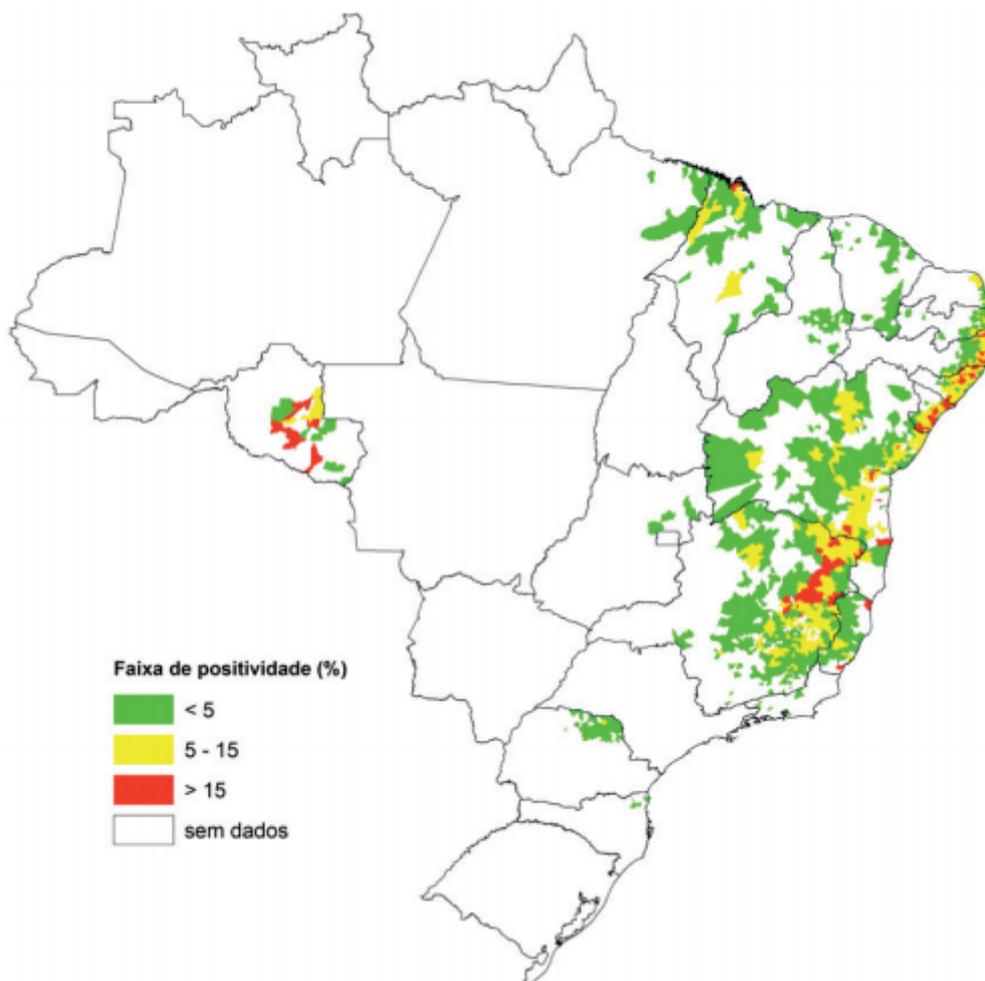


Figura 2: Distribuição da esquistossomose no Brasil.

Fonte: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose-BRASIL, 2012.

1.2.2- Transmissão

A infecção por esquistossomose se dá quando o hospedeiro vertebrado entra em contato com as cercárias eliminadas pelos caramujos do gênero *Biomphalaria*, que compreende vinte e quatro espécies na América Latina. Porém, até o presente momento, sabe-se que apenas quatro podem ser infectadas naturalmente pelo parasita: *B.glabrata*, *B.tenagophila*, *B.straminea* e *B.prona* (CALDEIRA, *et al.*, 2016).

Na maioria dos estados brasileiros, o molusco que atua como hospedeiro intermediário pertence à espécie *B.glabrata*, exceto no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, onde a espécie *B.tenagophila* é a mais comum (SIMÕES *et al.*, 2013).

O processo de transmissão acontece em locais com água doce contaminada, e ocorre casualmente, não havendo atração específica da cercária pelo hospedeiro. Em vista disso, o processo de infecção vai depender

do tempo que o mesmo fica dentro da água, e de sua superfície corpórea exposta. Porém, uma vez que a cercária adere à pele, inicia o processo de penetração (REY, 2011).

1.2.3- Sintomatologia e diagnóstico

A esquistossomose é uma doença que apresenta três fases, onde os sintomas podem variar e se tornar mais graves. A fase migratória é praticamente assintomática. Nos casos sintomáticos, o mais comum é a chamada “dermatite cercariana”, consequência da penetração da cercaria na pele do hospedeiro. Se o sistema imunológico estiver sensível devido a uma infecção anterior, essa dermatite tende a ser mais grave (ROBERTS E JANOVY, 2009). Geralmente dura de 2 a 3 dias, e às vezes pode vir acompanhada de febre e episódios transitórios de urticária (FERREIRA, 2012).

A fase aguda ocorre de 16 a 90 dias após a infecção, e normalmente os sintomas se manifestam em indivíduos que visitaram áreas endêmicas, mas que nunca haviam entrado em contato com o *Schistosoma mansoni* (LAMBERTUCCI, 2010). Dentre os mais comuns estão febre, cefaleia, anorexia, mal-estar, diarreia, dor abdominal e prostração, e ocorrem devido ao crescimento dos vermes, produção dos ovos e antígenos. Esse quadro é conhecido como síndrome de Katayama. O hemograma mostra leucocitose e intensa eosinofilia. Nessa fase, antes das 6 primeiras semanas de infecção, praticamente não há ovos nas fezes do hospedeiro, então o diagnóstico é feito com base em dados clínicos, epidemiológicos e em exames sorológicos. Após esse período, pode-se realizar o exame de fezes (*S.mansoni* e *S.japonicum*) ou urina (*S.haematobium*), com o objetivo de se isolar os ovos do *S. mansoni*, que se caracterizam, sobretudo, por apresentarem um espículo lateral, o que facilita sua identificação (JAURÉGUIBERRY *et al.*, 2010; COLLEY *et al.*, 2014).

A fase crônica avança gradualmente. Os ovos depositados pelo verme adulto acumulam-se no lúmen intestinal, o que vai desencadear a resposta inflamatória, resultando na formação de granulomas ricos em fibroblastos (MARKELL *et al.*, 2003; FERREIRA, 2012). A esquistossomose intestinal pode ser assintomática por anos, evoluindo para dores abdominais, diarreia sanguinolenta e letargia (ROBERTS E JANOVY, 2009). Porém, muitos ovos continuam no fluxo sanguíneo e ficam retidos nos capilares do espaço porta hepático, levando a um acúmulo de granulomas no mesmo, causando fibrose periportal (“pipe stem fibroses”). Esse processo reduz o fluxo sanguíneo drenado pela veia porta, resultando em hipertensão portal e hepatoesplenomegalia (principalmente do lado esquerdo), o que pode ocasionar a formação de ascites (acúmulo anormal de líquido), que originou o nome popular da doença no Brasil: barriga d’água (REY, 2011). Em casos mais raros, os ovos podem seguir para o tecido pulmonar e para o sistema nervoso central, ocasionando outras complicações (ROSS *et al.*, 2012). É importante

Os miracídios medem cerca de 160 µm de comprimento por 60 µm de largura, e após eclodirem dos ovos, nadam ativamente até encontrarem o hospedeiro intermediário. Quando conseguem localiza-lo, as larvas iniciam o processo de penetração, perdendo parte de suas estruturas e transformando-se em esporocistos primários, após 48 horas. Eles originarão os esporocistos secundários, que por fim, originarão as cercarias (KATZ E ALMEIDA, 2003; CARVALHO *et al.*, 2008).

Após 30 dias, devido a estímulos como luz e calor, as cercarias são liberadas na água, e vão procurar pelo hospedeiro vertebrado. Ocorrendo a penetração na pele do mesmo, ela perde a cauda e passa a se chamar esquistossômulo, que vai acessar os vasos e a circulação sistêmica. Muitos são vencidos pelo sistema imune, porém os que sobrevivem irão para os pulmões e depois para o fígado, onde se alimentam de sangue e tornam-se adultos. Por fim, após aproximadamente 5 semanas de infecção, os parasitas migram para os vasos mesentéricos, onde atingem a maturidade sexual e inicia-se a oviposição. Os primeiros ovos são encontrados nas fezes de 6 a 8 semanas após a infecção, e os vermes adultos vivem em média de 3 a 10 anos, embora alguns possam viver mais de 40 anos eliminando ovos (ROSS *et al.*, 2002; FERREIRA, 2012; COLLEY *et al.*, 2014).

1.2.5- Prevenção e controle

A esquistossomose é uma doença que ocorre principalmente em países menos desenvolvidos, e isso pode ser visto na falta de água limpa e educação sanitária. O controle da doença permanece um desafio nos países endêmicos, e as medidas utilizadas baseiam-se em duas estratégias: evitar o contato dos indivíduos com a água contaminada, e evitar a contaminação da água com os ovos de *Schistosoma mansoni*. Isso é feito por meio de programas públicos de saneamento básico, instalação de água e esgoto nas casas, mudanças no meio ambiente, educação sanitária, controle do caramujo *Biomphalaria* e tratamento de pessoas infectadas (BLANCHARD, 2004; MORAES, 2011; FERREIRA, 2012).

Obras de engenharia sanitária seriam as mais eficientes para o controle dessa parasitose, evitando a eliminação inadequada de dejetos e impedindo a propagação da doença por esgoto a céu aberto. Entretanto, nos países menos desenvolvidos essa tarefa não é fácil. No Brasil, apenas metade das cidades tem algum tipo de sistema adequado para a coleta de dejetos, sendo a maioria delas localizadas na zona urbana (KATZ E ALMEIDA, 2003).

Além disso, conscientizar a população a mudar seus hábitos é difícil, sobretudo mulheres e crianças, uma vez que dependem de coleções hídricas para atividades domésticas e pessoais, além de lazer (MORAES, 2011).

1.2.6- Tratamento

O fármaco de primeira escolha a ser utilizado no tratamento da esquistossomose é o praziquantel (Figura 4), que age contra todas as espécies de *Schistosoma*. Sua dose padrão é de 40 a 60 mg/kg de peso corporal, e seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido. Sabe-se apenas que ele aumenta a permeabilidade da membrana do helminto a cátions, principalmente o cálcio, que vai promover a contração e consequente paralisação do músculo do parasita. Com isso, ele se separa do tecido do hospedeiro e é rapidamente expelido (NOVAES *et al.*, 1999; BLANCHARD, 2004; DOENHOFF, 2008). Na esquistossomose aguda com intensos sintomas, recomendam-se adicionar ao tratamento, corticoides como a prednisona (1mg/kg de peso) (LAMBERTUCCI, 2010).

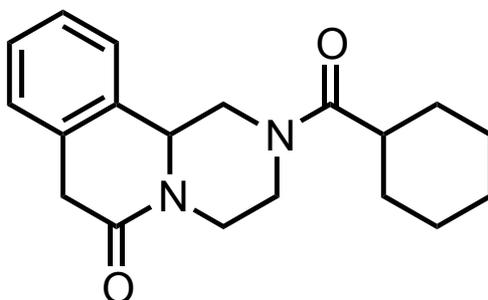


Figura 4: estrutura química do Praziquantel

Contudo, essa substância age apenas contra os vermes adultos, e apesar de reverter levemente os danos no fígado, as sequelas causadas pela fibrose são irreversíveis. Além disso, já se comprovou a existência de linhagens resistentes ao praziquantel, sobretudo em países endêmicos. Entre os principais efeitos adversos, destacam-se dor abdominal, dor de cabeça, diarreia sanguinolenta e vertigem (BLANCHARD, 2004; DOENHOFF, 2008; COLLEY *et al.*, 2014).

Outro fármaco que já foi utilizado no tratamento da esquistossomose foi o niridazol (Figura 5), um nitrocomposto derivado das imidazolidinas (LAMBERT, 1964). Seu mecanismo de ação não foi completamente elucidado. Alguns estudos mostram que esse fármaco age diminuindo a quantidade de glicogênio nos músculos do parasita, por meio da inibição da enzima fosforilase-fosfatase (dessa forma, a enzima glicogênio-fosforilase, responsável por degradar o glicogênio do parasita, mantém-se ativa constantemente) (BUEDING, FISHER, 1970; NELSON, COX, 2014).

Já outros trabalhos levam a crer que em condições anaeróbias, o grupo nitro do fármaco sofre biorredução enzimática, gerando intermediários que vão se ligar covalentemente a macromoléculas do helminto, impedindo que ele

realize importantes reações metabólicas, levando-o a morte (TRACY, 1983, CATTO, 1984; CIOLI, 1995).

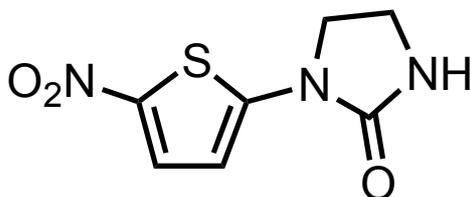


Figura 5: estrutura química do Niridazol

A substância era ministrada na dose de 25mg/kg de peso 2x ao dia, e apresentou um índice de cura muito amplo, de 12,2 a 90,2%. Apesar da toxicidade central (hepato, nefro e cardiotoxicidade), os danos neuropsiquiátricos (cefaleia, tonturas, tremores, psicose tóxica, convulsão, coma e consequente óbito) foram o que descontinuaram o uso desse fármaco (CARVALHO, 1982).

No Brasil, até pouco tempo atrás empregava-se a oxamniquina, eficaz apenas contra o *S. mansoni*. Apesar de ser um nitrocomposto, acredita-se que seu mecanismo de ação não esteja ligado à redução do grupo nitro, e sim na formação de um éster a partir de sulfotranferases, com consequente alquilação do DNA do parasita, causando inibição de sua síntese (PICA-MATTOCCIA *et al.*, 2006; DOENHOFF *et al.*, 2009). Esse fármaco foi muito bem tolerado e apresentou eficácia, já que a dose única de 15mg/kg em adultos curou 80-90% dos pacientes, e a dose única de 20-25mg/kg em crianças curou 65-90% (SILVA *et al.*, 1974; KATZ *et al.*, 1974; ZICKER E PEREIRA, 1977). Porém, o alto custo limitou seu uso, e hoje ela não é mais utilizada (KATZ, 2008).

1.3- Doença de Chagas

1.3.1- Descrição

A Tripanossomíase Americana, que posteriormente teve seu nome alterado para Doença de Chagas, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Figura 6). Essa alteração foi uma homenagem para o médico e pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, que além de descobrir a parasitose em 1909, também descreveu seu agente etiológico, hospedeiros e vetores, ciclo de transmissão e sintomas da fase aguda (KROPF, SÁ, 2009).

Baseado em fragmentos de DNA do parasita encontrados em tecidos de múmias colombianas, acredita-se que ele infecte populações humanas há cerca de 9000 anos (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004).



Figura 6: *Trypanosoma cruzi* em sua forma tripomastigota. Foto tirada por microscopia eletrônica de varredura.

Fonte: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2014/05/15/walter-colli-arte-de-ser-cientista-brasil/>

A Organização Mundial da Saúde classifica a Doença de Chagas como uma das treze doenças tropicais mais negligenciadas da América Latina, porém, ao contrário da esquistossomose, podem-se perceber avanços quanto às políticas de controle e prevenção. Há pouco mais de 10 anos, em 2005, estimava-se um total de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas com a doença. Após 5 anos, em 2010, esse número foi reduzido para 10 milhões, e atualmente, em 2018, estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas. Com isso, a taxa de mortalidade, que era de aproximadamente 50.000, caiu para 14.000 (SZAJNMAN *et al.*, 2005; SCHMUNIS, YADON, 2010; WHO; 2010; WHO, 2017).

Alguns casos da Doença de Chagas já foram notificados no sul dos Estados Unidos e em alguns países da Europa, principalmente devido à migração (CROVATO, REBORA, 1997; DORN, *et al.*, 2007), contudo as áreas endêmicas se encontram em 21 países da América Latina, por serem o habitat do vetor da doença. Estima-se que 90 milhões de pessoas vivam nessas áreas, estando, portanto, em risco (Figura 7) (COURA, DIAS, 2009).

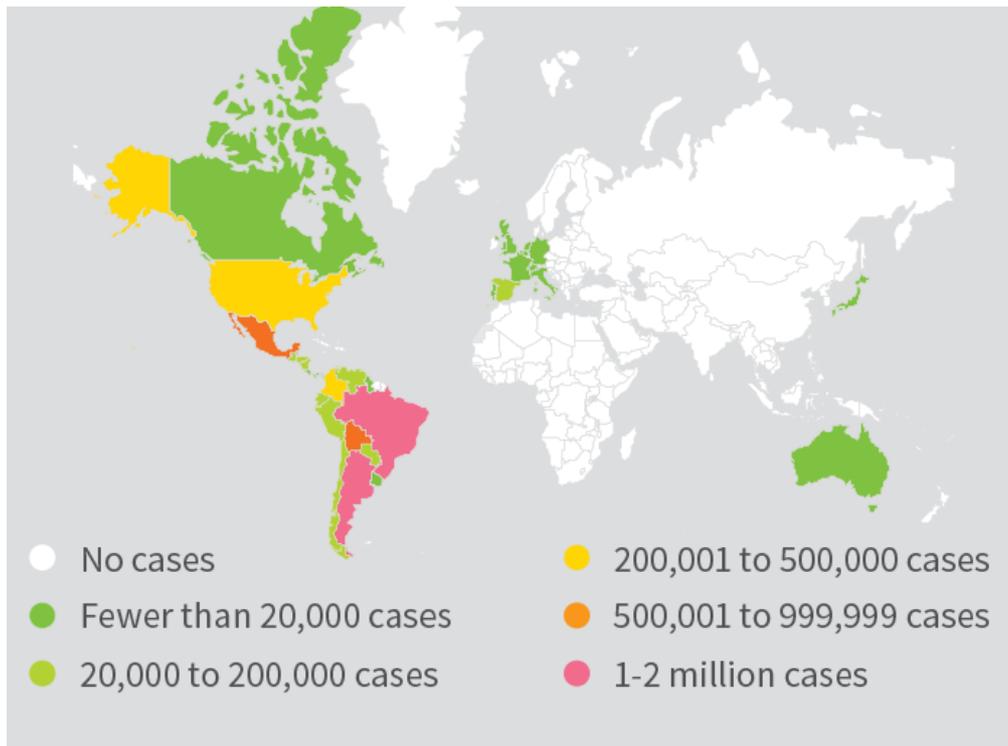


Figura 7: Distribuição geográfica da Doença de Chagas

Fonte: <http://unitingtocombatntds.org/reports/5th-report/chagas-disease-progress/>

1.3.2- Transmissão

O *Triatoma infestans* é o principal vetor da Doença de Chagas em grande parte da América do Sul, porém, no Norte desse mesmo continente e em diversos países da América Central, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são os principais. No Brasil, além do *T. infestans*, outros dois vetores estão presentes, tendo grande importância: *Triatoma brasiliensis*, encontrado frequentemente no sertão nordestino, e *Panstrongylus megistus*, encontrado especialmente na Bahia e Minas Gerais (REY, 2011; FERREIRA, 2012).

A transmissão da infecção chagásica ocorre tanto no homem quanto nos animais. A primeira forma e de maior relevância epidemiológica, correspondendo a 80% dos casos da doença, é pela picada do vetor contaminado com as formas tripomastigostas metacíclicas (ARAS *et al.*, 2003). Normalmente a picada ocorre no rosto devido à pele mais fina. Em seguida, o inseto defeca no local, permitindo a passagem dos parasitas contidos nas fezes para a corrente sanguínea do hospedeiro. O vetor possui hábitos noturnos e apresenta em sua saliva uma propriedade anestésica e anticoagulante, o que torna sua picada indolor. Devido à picada no rosto, no Brasil o *Triatoma* é chamado de “barbeiro”. Residências de pau-a-pique e madeira constituem abrigos ideais para o mesmo (TARTAROTTI *et al.*, 2004).

Os outros mecanismos de transmissão são por transfusão sanguínea e transmissão congênita (REY, 2011). Também, há relatos de casos da doença

cuja transmissão ocorreu por transplante de órgãos, alimentos contaminados por triatomíneos (particularmente caldo de cana e açaí), leite materno e até mesmo acidentes de laboratório. No entanto, esses casos são mais raros (DIAS, AMATO-NETO, LUNA, 2011).

1.3.3- Sintomas e diagnóstico

A fase aguda é iniciada de 1 a 2 semanas após a infecção pelas formas tripomastigostas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi*. No local da picada, os organismos proliferam, formando um nódulo conhecido como chagoma. Caso a picada ocorra próxima à região do olho, os parasitas podem provocar conjuntivite e edema unilateral nas pálpebras, que pode se espalhar para outros locais. Esse sintoma é conhecido como sinal de Romaña (ROBERT E JANOBY, 2009). Além desse sinal característico, mal estar, calafrios, febre alta e dores musculares também podem estar presentes (MARKELL, VOGUE, 2003). Esse estágio é mais comum em crianças menores de 5 anos, e em muitos casos pode ser assintomático (FERREIRA, 2012).

Após a fase aguda, inicia-se a fase crônica, que em grande parte dos casos também pode permanecer assintomática ou indeterminada (BARBOSA, 2009). Porém, após alguns anos a infecção pode evoluir e os sintomas podem aparecer. A forma cardíaca é a mais perigosa e frequente manifestação da doença, e o indivíduo pode apresentar taquicardia, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), tromboembolismo, cardiomegalia e morte súbita (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010). Há também a forma digestiva, que produz alterações funcionais e morfológicas no cólon e esôfago (condição de megacólon e megaesôfago) (SANCHEZ-LERMEN *et al.*, 2007).

O diagnóstico da fase aguda é feito principalmente por microscopia (detecção das formas tripomastigotas), devido à alta quantidade de parasitas no sangue (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010). Na fase crônica, utilizam-se imunodiagnósticos, já que há baixa parasitemia e elevada concentração de imunoglobulinas específicas, principalmente IgG. Os ensaios mais comuns são imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e testes imunoenzimáticos (ELISA) (ALMEIDA, SANTILIANO, 2012).

1.3.4- Ciclo biológico

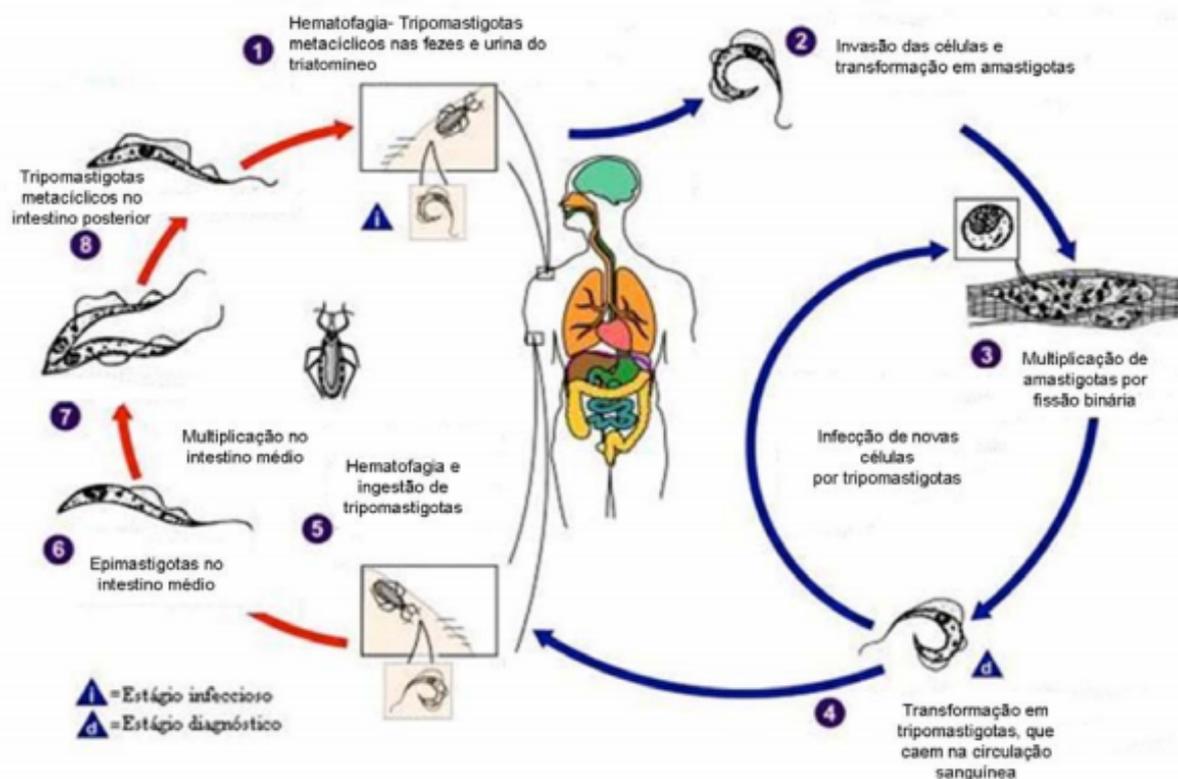


Figura 8: Ciclo biológico do *T.cruzi*

Fonte: CAMPOS, 2007

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Figura 8) é digenético, com um hospedeiro intermediário/vetor (inseto) e um hospedeiro definitivo (mamífero). Em ambos os hospedeiros, o parasita apresenta uma forma infectante que não se reproduz, e uma forma reprodutiva que não é infectante. Os mamíferos são parasitados pelas formas amastigota e tripomastigota, e os insetos pelas formas epimastigota e tripomastigota metacíclico (REY, 2011; FERREIRA, 2012).

O vetor infecta-se após ingerir sangue de um mamífero contaminado com as formas tripomastigotas do parasita. Depois de ingeridas, essas formas seguem para o intestino médio, onde perdem seu flagelo e vão se diferenciar em esferomastigotas e epimastigotas, respectivamente. Em seguida, as formas epimastigotas vão se reproduzir por fissão binária, colonizando a região. Já no intestino posterior, atingindo o reto, elas se diferenciam nas formas tripomastigotas metacíclicos, e posteriormente são eliminadas junto com as

fezes e urina do vetor. O desenvolvimento completo dos parasitas nos triatomíneos requer pelo menos 7 dias (SOUZA, 1999; BERN *et al.*, 2011).

A infecção no hospedeiro vertebrado se dá pelo contato com as formas tripomastigostas metacíclicas. Quando entram na corrente sanguínea do mamífero, os parasitas invadem uma variedade de células, perdendo seu flagelo e assumindo uma forma arredondada, tornando-se amastigotas. Essas formas irão se reproduzir dentro da célula por fissão binária, e após um número variável de divisões, que dura de 4 a 5 dias, irão se diferenciar em tripomastigotas. Por fim, estas irão romper a membrana plasmática da célula, sendo liberadas na corrente sanguínea e podendo invadir outras células, tecidos, bem como infectar outro vetor. Após essas etapas, o ciclo se reinicia (KROPF, SÁ, 2009; BRAZ, 2015).

1.3.5- Prevenção e controle

Atualmente, não há vacinas disponíveis contra a Doença de Chagas, então primeiramente sua prevenção está no controle do vetor, já que é o meio de transmissão mais comum. Isso pode ser feito investindo-se em melhorias nas moradias, uma vez que os triatomíneos se desenvolvem em habitações mais pobres. A aplicação de inseticidas também deve ser feita, a fim de eliminar os insetos. O inseticida organoclorado BHC já foi o mais utilizado, porém devido à sua elevada toxicidade, hoje se emprega os inseticidas piretróides (ARGOLO *et al.*, 2007; RASSI JR, RASSI, MARIN NETO, 2010).

Quanto à prevenção da transmissão congênita, não há uma medida específica, mas a detecção precoce da doença, bem como seu tratamento, é o mais recomendado (DIAS, AMATO-NETO, LUNA, 2011).

A realização de exames sanguíneos em indivíduos que forem realizar transfusões, a fim de se observar a presença ou ausência do parasita, e normas de biossegurança, para evitar contaminação caso haja eventuais acidentes em laboratórios de análises clínicas, também são medidas que devem ser utilizadas (SILVEIRA, 2000; DIAS, AMATO-NETO, LUNA, 2011).

Diversos programas para o controle da Doença de Chagas surgiram em vários países, principalmente com o foco na eliminação de vetores, e estão tendo resultados satisfatórios. No Brasil, o primeiro programa foi institucionalizado em 1950, pelo Serviço Nacional da Malária, mas só em 1975 ele se tornou de alcance nacional (VINHAES, DIAS, 2000).

1.3.6- Tratamento

Hoje em dia, há apenas dois medicamentos disponíveis no mercado para se tratar da Doença de Chagas: os nitrocompostos nifurtimox, lançado em 1967, e o benzonidazol, sintetizado em 1972 (Figura 9). No Brasil, apenas o benzonidazol está disponível (REY, 2011).

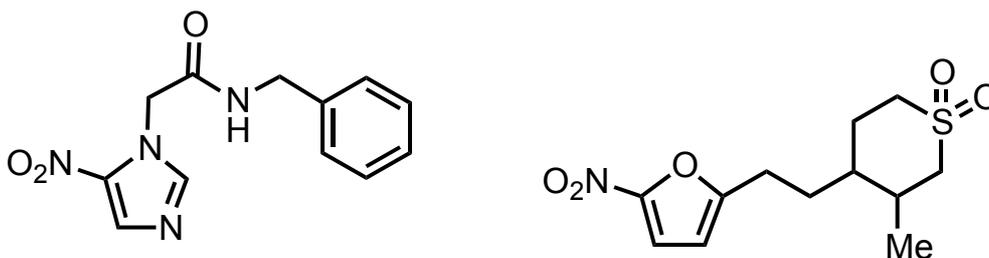


Figura 9: Estruturas químicas do benznidazol e nifurtimox, respectivamente.

Assim que se descobriu o benznidazol, estabeleceu-se que para pacientes maiores de 12 anos, na fase aguda, o tratamento seria feito de 30 a 60 dias, na dose de 5 a 10 mg/kg, via oral, todo dia. Porém, novos estudos em 1983, definiram a dose de 5 a 7 mg/kg, 2 vezes ao dia, o tratamento padrão. A dose diária não deve ultrapassar 300 mg (LAZZARI, FREILIJ, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2008; ANDREADE *et al.*, 2011; GRAYSON *et al.*, 2017).

Já o nifurtimox, para indivíduos maiores de 17 anos e que estejam na fase aguda da doença, deve ser administrado de 3 a 4 vezes ao dia, na dose de 8 a 10 mg/kg, por 90 a 120 dias (FORSYTH *et al.*, 2016).

Sabe-se que o mecanismo de ação de ambos é por meio de biorredução enzimática *in vivo* do grupo nitro ao grupo amina. A enzima responsável por essa redução é a nitrorredutase do tipo I, uma flavoenzima dependente de NADPH, e cada redução envolve a participação de 2 elétrons (Figura 10) (HALL *et al.*, 2011; HALL, WILKINSON, 2012).

O benznidazol, heterocíclico do tipo 2-nitroimidazol, segue via anaeróbia, não ocorrendo danos oxidativos. O processo se inicia com a redução do grupo nitro ao intermediário nitroso, que em seguida reduz à hidroxilamina, principal intermediário formado, dando origem então ao grupo amina. Esses intermediários formados podem interagir com macromoléculas do parasita por meio de ligações covalentes, impedindo que ele realize reações metabólicas, levando-o a morte (PATTERSON, WYLLIE, 2014). Há relatos que o benznidazol também age estimulando a fagocitose do *T. cruzi*, em um mecanismo dependente da citocina interferon-gama (IFN- γ). (MAYA *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2009).

Na via aeróbia, o grupo nitro é reduzido ao radical nitro aniônico, porém este é muito instável, então o oxigênio do meio promove sua reoxidação, regenerando o grupo nitro, mas formando também o íon superóxido (O_2^-). Este íon sofre ação da enzima superóxido dismutase (S.O.D), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este é altamente reativo e vai desestruturar as membranas biológicas do invasor. O peróxido de hidrogênio ainda pode sofrer ação de ferredoximas (reação de Haber-Weiss), liberando mais espécies reativas, como o radical hidroxil (OH^\cdot), que pode se ligar a lipídios, proteínas e DNA do parasita, lesando as células. Nesse caso, há dano oxidativo, havendo formação

de radicais livres. O nifurtimox, um 5-nitrofurano, segue essa via (MAYA *et al.*, 2007; BUSCHINI *et al.*, 2009).

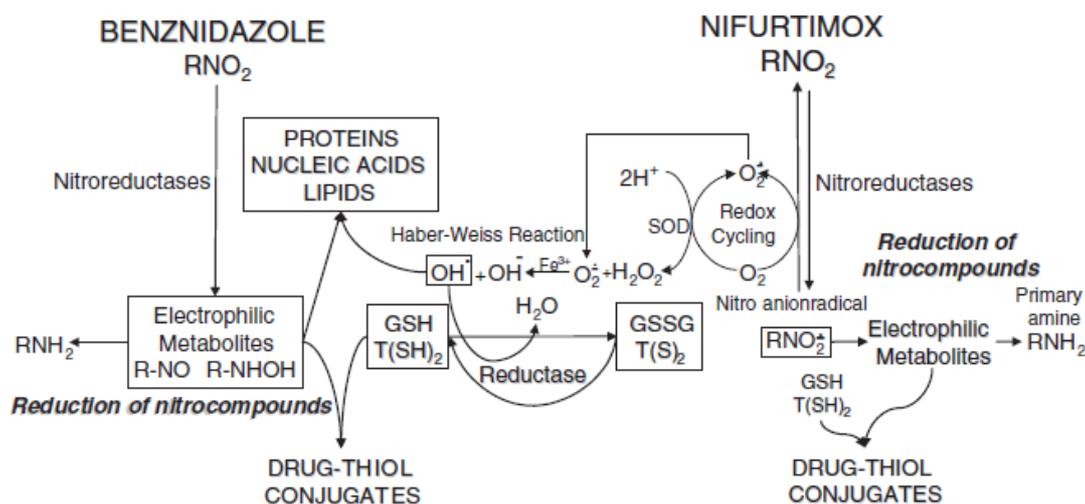


Figura 10: Esquema de biorredução enzimática de nitrocompostos, por ambas as vias

Fonte: MAYA *et al.*, 2007.

Porém, tanto o benzonidazol como o nifurtimox não são seletivos apenas para o *T.cruzi*. Seus intermediários podem atacar os tecidos do hospedeiro, com isso seus efeitos adversos são bem numerosos. Dentre os efeitos do benzonidazol, pode-se destacar dermatite com erupção cutânea, dores musculares e nas articulações, depressão da medula óssea, trombocitopenia (diminuição das plaquetas), dentre outros (RAETHER, HANEL, 2003; URBINA, DO CAMPO, 2003). Já os efeitos adversos mais comuns do nifurtimox são digestivos (anorexia, náusea, dor abdominal), neurológicos (dores de cabeça e alterações de humor), fadiga e insônia (JACKSON *et al.*, 2010)

Os fármacos são amplamente utilizados na fase aguda, com uma porcentagem de cura de aproximadamente 70% (PEDRA *et al.*, 2011).

Já na fase crônica, a utilização também é indicada, pois evita que o paciente se torne um reservatório da doença. Além disso, estudos demonstraram que os fármacos reduziram as formas tripomastigotas sanguíneas e as formas amastigotas nos tecidos do hospedeiro, contribuindo para a melhora dos sintomas cardíacos (COURA, BORGES-PEREIRA, 2014). Corroborando esses resultados, outro grupo de pesquisadores observou uma melhora nos resultados de testes sorológicos em pacientes que se encontravam nesse estágio da doença (MORILLO *et al.*, 2015)

Porém, a porcentagem de cura nessa fase é baixa (8-30%), o que faz com que o paciente deva ingerir uma dose maior do fármaco para obter o mesmo resultado, aumentando sua toxicidade (PEDRA *et al.*, 2011). Isso

reforça a necessidade de se encontrar novos compostos com maior atividade e potencialmente menos tóxicos.

1.4- Megazol

Como pôde ser visto, o arsenal terapêutico da esquistossomose e da Doença de Chagas é limitado. Os fármacos disponíveis atualmente possuem uma série de problemas em relação à resistência e, principalmente, à toxicidade.

Entretanto, em 1968, em um projeto da indústria química americana American Cyanamid, sintetizou-se uma série de produtos do tipo 5-nitroimidazol, entre ele o megazol, que surgiu como uma alternativa promissora (ASATO, BERKELHAMMER, 1968).

1.4.1- Características químicas

A designação química do megazol (Figura 11) é 1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazol)-5-nitroimidazol, e foi sintetizado pela primeira vez por Asato e Berkelhammer. É um composto sólido cristalino amarelo forte, sendo pouco solúvel em dimetilformamida (DMF) e acetona, e solúvel em tetrahidrofurano (THF) e dimetilsulfóxido (DMSO). Apresenta faixa de fusão no valor de 270-275°C, e potencial redox no valor de -438mV (ASATO, BERKELHAMMER, 1968; ALBUQUERQUE, 1995).

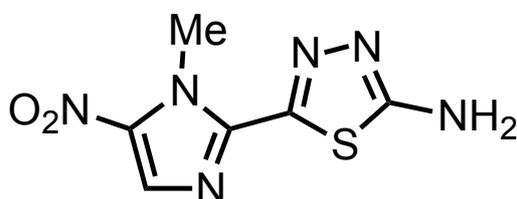


Figura 11: Estrutura química do megazol.

O megazol contém um imidazol, um heterocíclico que pode sofrer uma série de reações. A posição 2 do anel é muito favorável de sofrer reações de alquilação e acilação em meio básico. A base desprotona o próton pirrólico, desta forma, os pares de elétrons remanescentes são compartilhados apenas com o carbono 2, deixando-o parcialmente negativo, e muito reativo para uma reação de alquilação. Como toda a carga negativa é compartilhada apenas com o carbono 2, as posições 4 e 5 do imidazol não sofrem este tipo de reação. Os principais agentes alquilantes utilizados são haletos de alquila e o dimetilsulfato (Figura 12) (JOULE, MILLS, 2010; EICHER *et al.*, 2012).

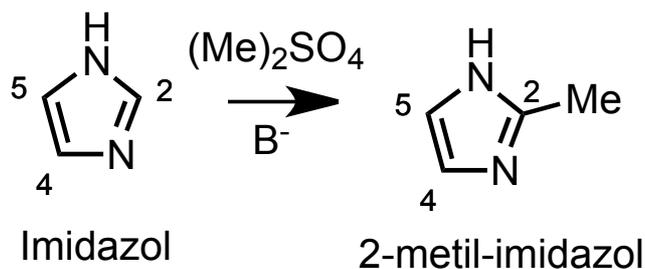


Figura 12: Reação de alquilação do carbono 2 do imidazol utilizando dimetilsulfato.

O nitrogênio em posição 1 do anel imidazólico também pode ser alquilado em meio básico, devido à remoção do próton ácido pela mesma (Figura 13) (KHABNADIDEH, 2003; JOULE, MILLS, 2010).

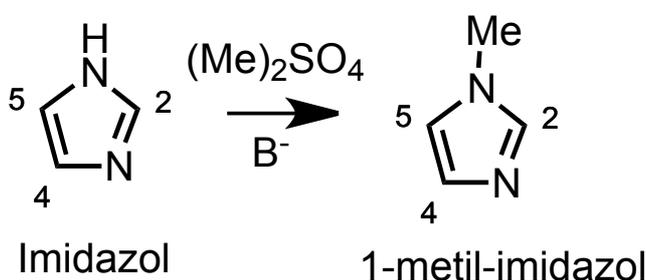


Figura 13: Reação de alquilação do nitrogênio 1 do imidazol utilizando dimetilsulfato.

O imidazol também pode ser facilmente nitrado em meio ácido. A posição 5 (Figura 14) é mais favorecida que a posição 4 (Figura 15), pois formam-se mais intermediários de ressonância, contribuindo para maior estabilidade do produto formado. O rendimento desse processo é em torno de 90% e o reagente mais usado é o ácido nítrico (JOULE, MILLS, 2010; TRUNZ *et al.*, 2011; BHATNAGAR *et al.*, 2011).

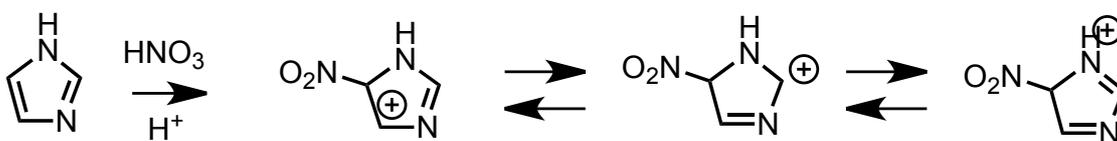


Figura 14: Intermediários de ressonância do 5-nitro-imidazol

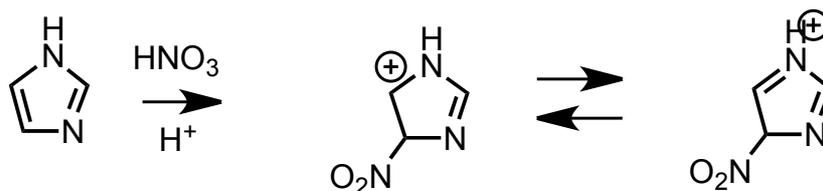


Figura 15: intermediários de ressonância do 4-nitro-imidazol

A posição 2 do imidazol (Figura 16) não sofre reação de nitração. Isso porque, em meio ácido, a densidade eletrônica do carbono 2 é baixa, devido a ele se localizar entre dois átomos eletronegativos. Além disso, há também a formação de um intermediário de ressonância que não contribui para a estabilidade do produto final, devido ao octeto incompleto do nitrogênio (BHATNAGAR *et al.*, 2011; BRUICE, 2014; EICHER *et al.*, 2014).

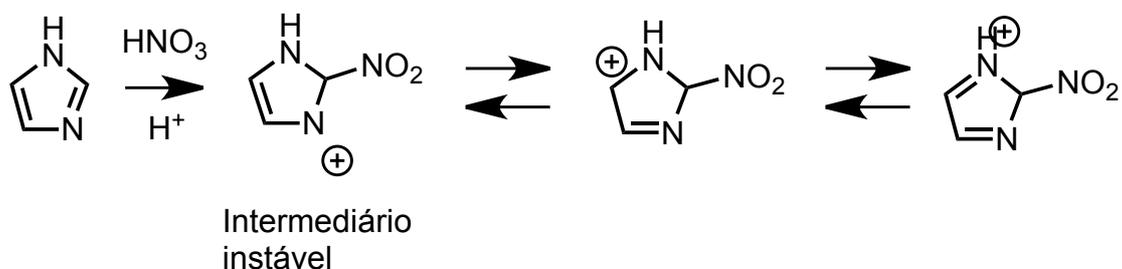


Figura 16: Intermediários de ressonância do 2-nitro-imidazol.

O megazol, assim como todos os 5-nitroimidazóis, precisa estar substituído por um grupo alquil no nitrogênio 1, e por um substituinte no carbono 2 para apresentar atividade biológica. Acredita-se que a proteção estérica causada pelos grupos substituintes ao redor do grupo nitro (principal grupo responsável pela atividade biológica) melhora a interação fármaco-receptor (TRIVEDI *et al.*, 2011).

1.4.3- Atividade biológica

Este composto, quando sintetizado, atraiu a atenção dos pesquisadores, demonstrando em testes biológicos *in vivo* e *in vitro* um amplo espectro de ação. Primeiramente, apresentou atividade frente bactérias gram positivas e gram negativas, e parasitas do gênero *Trichomonas*, causador da tricomoníase (BURDEN, RACETTE; 1968, ASATO, BERKELHAMMER, 1972; WILKELMANN *et al.*, 1977; NAIR, NAGARAJAN, 1983).

Em seguida, foi testado contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, obtendo resultados expressivos (ALBUQUERQUE, PERRIE, 1999). No início dos anos 90, pesquisadores da FIOCRUZ realizaram um experimento em que trataram camundongos infectados com a cepa Y utilizando 500 mg/kg em dose única, via oral, de nifurtimox, benzonidazol e megazol. O objetivo era comparar a capacidade de indução da fagocitose pelos macrófagos, além da atividade antichagásica. Ao final do teste, concluiu-se que o megazol foi o composto que induziu a maior fagocitose das formas sanguíneas, *in vitro*, pelos macrófagos, bem como promoveu a destruição das formas intracelulares do parasita (LAGES-SILVA; FILARDI; BRENNER, 1990).

Os dados obtidos neste experimento corroboraram com os resultados de um ensaio realizado alguns anos antes, em que o megazol curou uma alta

porcentagem de infecções causadas por linhagens resistentes ao nifurtimox e ao benzonidazol (FILARDI, BRENNER, 1982).

Posteriormente, outro estudo comparou novamente o megazol com os dois fármacos utilizados para tratar a doença, medindo a dose de cada um necessária para inibir 50% das cepas epimastigotas do *T. cruzi* (IC₅₀). Dois tipos de cepas e um clone foram utilizados (Quadro 1) (MAYA *et al.*, 2003).

Quadro 1: Valores de IC₅₀ para cada nitrocomposto frente às cepas e o clone estudados
Fonte: MAYA *et al.*, 2003.

Fármaco	Tulahuen (µM)	Clone CL-Brener (µM)	LQ (µM)
benzonidazol	11,44 +- 0,1	12,77 +- 1,1	16,95 +- 0,7
nifurtimox	9,91 +- 0,2	10,44 +- 0,3	12,28 +- 0,2
megazol	3,75 +- 0,1	2,91 +- 0,2	4,24 +- 0,6

Analisando-se os valores do quadro, percebe-se que o 5-nitroimidazol foi o que apresentou a melhor atividade antichagásica, o que poderia resultar em um tratamento mais curto (MAYA *et al.*, 2003).

Após os excelentes resultados frente ao *Trypanosoma cruzi*, foram feitos ensaios frente ao *Trypanosoma brucei*, causador da chamada “Doença do Sono” ou Tripanossomíase Africana. O fármaco também se mostrou eficiente, sendo capaz de reduzir a carga parasitária na fase aguda da doença. Sua ação é potencializada quando associado aos fármacos suramin ou melarsoprol, duas das principais substâncias utilizadas no tratamento da parasitose. Estudos realizados mostraram que a associação de megazol (100mg/kg) e suramin (20mg/kg) foi capaz de combater a infecção em ratos que já estavam no estágio mais grave da doença, havendo envolvimento do sistema nervoso central (SNC). Após uma semana de tratamento, a quantidade de parasitas foi reduzida e os animais apresentaram melhora (ENANGA *et al.*, 1998). Corroborando com esses dados, Darsaud e colaboradores (2004) realizaram outro experimento, em que associaram os mesmos fármacos, porém a dose de megazol foi diminuída (80mg/kg). Ao final do ensaio, a parasitemia foi completamente eliminada em 10 dos 12 animais tratados.

Em outro estudo, em que se associou megazol e melarsoprol, os animais também apresentaram significativa melhora, também quanto aos sintomas neurológicos (JENNINGS, 1996).

O megazol também demonstrou atividade frente a *Leishmania infantum*, reduzindo 95% do total de parasitas a 6,2 µM, e 99% a 12,5 µM. Ainda, moléculas derivadas desse composto contendo diferentes substituintes na posição 2 do anel tiadiazólico foram testadas contra cepas das formas amastigostas de *Leishmania donovani*, obtendo-se resultados promissores. (RIENTE, 2009).

1.4.4 – Mecanismo de ação

Os compostos do tipo 5-nitroimidazol quase não são reduzidos por via aeróbia. Normalmente seguem a via anaeróbia, formando os intermediários ativos que vão interagir com as macromoléculas e o DNA do parasita. Eles induzem a liberação do fosfato de timidina, que vai desestabilizar a estrutura e destruir a dupla hélice do DNA. Estruturas contendo maior quantidade de bases adenina e timina tendem a ser lesionadas mais rapidamente, devido a estarem ligadas por apenas duas ligações de hidrogênio (guanina e citosina estão ligadas por três), sendo mais fácil de serem rompidas (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009; NELSON, COX, 2014).

Entretanto, estudos foram realizados e demonstraram que o megalozol sofre biorredução enzimática aeróbia, sendo capaz de gerar radicais livres e levar o parasita ao stress oxidativo, através do rompimento de seu DNA, inativação de proteínas e enzimas, e destruição de suas membranas (CADENA, 1989; FERREIRA, MATSUBARA, 1997; VIODÉ *et al.*, 1999). O composto também tem a capacidade de provocar a inibição da síntese proteica e de DNA nas formas amastigotas do parasita (CASTRO, MEIRELLES, 1990; MELLO *et al.*, 2013).

Posteriormente, um grupo de pesquisadores descobriu que esse composto também pode estar relacionado à inibição da tripanotiona redutase, uma flavoenzima essencial para a sobrevivência do parasita. Ela é responsável por converter a tripanotiona dissulfeto ($T(S)_2$), forma oxidada e formada nas reações redox, em tripanotiona ditiol ($T(SH)_2$), forma reduzida. Com a enzima inibida, haverá falta da forma $T(SH)_2$, responsável por sintetizar desoxirribonucleotídeos, manter o equilíbrio tiólico nas células, e principalmente, proteger o parasita de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Dessa forma, as membranas, DNA e outras macromoléculas ficarão susceptíveis a essas ERO's, levando o parasita à morte (VIODÉ *et al.*, 1999; FAIRLAMB, 2001; MAYA *et al.*, 2003; MAYA *et al.*, 2007) (Figura 17).

A $T(SH)_2$ também é responsável por converter a glutathiona dissulfeto (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH), devido aos parasitas, ao contrário dos mamíferos, não possuem a enzima glutathiona redutase. A GSH também age combatendo as ERO's formadas nas reações redox (MAYA *et al.*, 2007; ULRICH *et al.*, 2017).

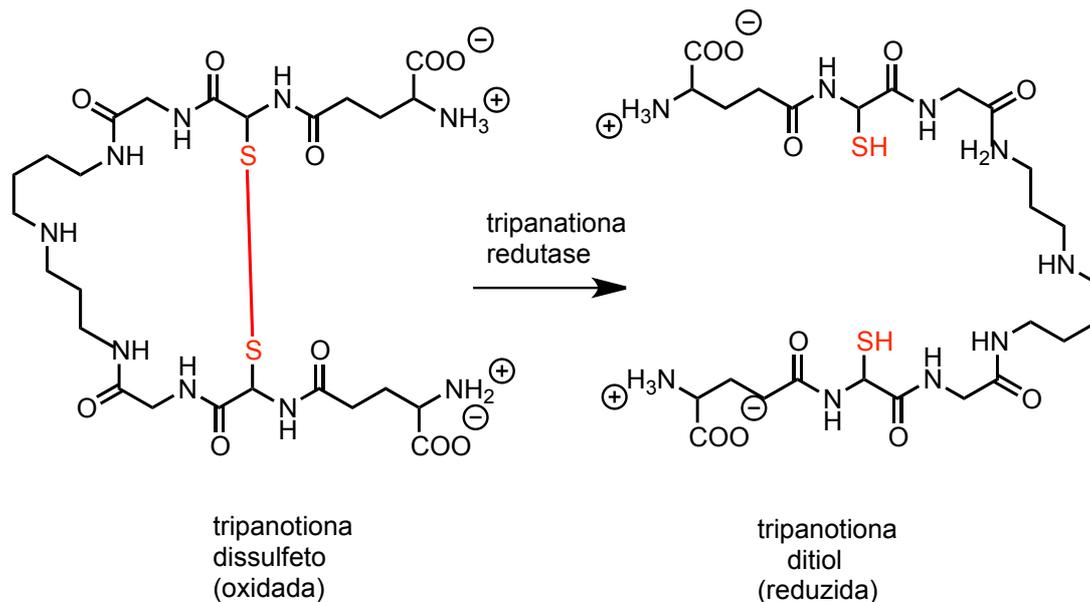


Figura 17: esquema de conversão da TS_2 em $T(SH)_2$ pela tripanotiona reductase.

1.4.5- Toxicidade

Efeitos tóxicos do megazol também foram determinados em estudos da American Cyanamid (BURDEN, 1968).

Após uma série de testes realizados em camundongos, ratos e cadelas, o fármaco pareceu estar ligado a alterações na medula óssea e cálculo renal. Portanto, foi contraindicado a indivíduos que apresentam discrasias sanguíneas e doenças renais (BURDEN, 1968).

Estudos de teratogenia também foram realizados, e mostrou que o megazol não deveria ser ingerido por mulheres grávidas ou em idade fértil (BURDEN, 1968)

Porém, o maior problema relacionado à toxicidade foram os danos causados ao DNA do hospedeiro. Em 1986, o teste de Ames determinou o megazol como um agente mutagênico, alterando os pares de bases, modificando, portanto, o quadro de leitura. Os estudos levaram a crer que as ERO's como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, formados a partir da redução do grupo nitro, foram os responsáveis pela mutagenicidade (FERREIRA, FERREIRA, 1986a).

Trabalhos mais recentes comprovaram os dados obtidos em relação às mutações "frameshift" (VIODÉ *et al.*, 1999; BUSCHINI *et al.*, 2007). Posteriormente, outro estudo foi feito utilizando-se cepas de *Salmonella entérica*, e o megazol foi capaz de alterar os pares de bases de seu DNA de três maneiras diferentes: foi capaz de adicionar, como também deletar pares de guanina-citosina (G:C), e também pôde substituí-los por pares de adenina-timina (A:T) (MELLO *et al.*, 2013). As bactérias são mais sensíveis a sofrerem

mutações, devido a maior presença de nitrorredutases. Os mamíferos também podem sofrer alterações em seu DNA, mas apresentam menor risco, devido a menor quantidade dessas enzimas (POLI *et al.*, 2002; BUSCHINI *et al.*, 2007; MELLO *et al.*, 2013).

Sendo assim, mesmo com a elevada atividade antichagásica, a alta toxicidade torna o uso do megalzol inviável. Desta forma, faz-se necessário investir em derivados.

1.5 – Desenvolvimento de fármacos e derivados do megalzol

A Química Medicinal é uma ciência que envolve a descoberta de compostos com atividade biológica, bem como a elucidação de suas estruturas por meio de técnicas específicas e a caracterização de suas propriedades físico-químicas (MASSI *et al.*, 2013).

A síntese orgânica é a técnica utilizada mais comum na obtenção de novos derivados (61% de novos compostos são obtidos por meio desse processo), pois permite a construção de moléculas em seus diversos níveis de complexidade. A rota sintética empregada vai influenciar na pureza dos intermediários, influenciando então, na pureza do produto final. Por conta disso ela deve ser bem avaliada (MENEGATTI *et al.*, 2001; BADE *et al.*, 2010). Muitas vezes, a reação entre duas substâncias pode gerar dois isômeros, sendo que apenas 1 terá atividade biológica, sendo o intermediário de interesse (MASSI *et al.*, 2013).

Após a obtenção da molécula, passa-se para os ensaios pré-clínicos, em que são realizados testes “*in vitro*”, e “*in vivo*”, em animais. Após essa etapa, inicia-se os ensaios clínicos em humanos, que são divididos em fases. Esses ensaios têm o objetivo de se analisar a segurança, eficácia terapêutica, farmacocinética, interações medicamentosas, dentre outros. Ao final, demora cerca de 10 anos para um único fármaco ser desenvolvido completamente (KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988; QUENTAL, SALLES FILHO, 2006).

O processo de síntese, bem como os ensaios pré-clínicos e clínicos têm um custo elevado. Estima-se que as principais indústrias farmacêuticas invistam de 8-9 bilhões de dólares anuais no setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), e isso não é garantia da produção de moléculas bioativas (SCHUHMACHER *et al.*, 2013). Além disso, há o impacto ambiental, devido aos resíduos gerados. Por isso, os processos estão sempre sendo estudados e otimizados, para que a busca por novos fármacos ocorra da melhor forma possível (FERREIRA *et al.*, 2008). Os países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, ainda estão na busca por fármacos antiparasitários, devido às doenças causadas por parasitas ainda permanecerem no país.

A busca por esta classe de compostos inicialmente é feita de forma aleatória, pois pouco se conhece sobre parasitas. Muitas vezes, quando não se tem um alvo específico, o objetivo é tentar melhorar a atividade biológica da substância (VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003).

A partir do estudo da relação entre a estrutura química do composto protótipo (megazol) e a atividade biológica (REA), podem-se distinguir quais partes da molécula são importantes para a ação. Essas informações são obtidas por meio de modificações moleculares introduzidas de forma planejada, obtendo-se derivados. Muitas vezes, pequenas modificações feitas na molécula promovem grande alteração na resposta farmacológica. Isso porque para promover a ação, o fármaco precisa realizar interações com o alvo biológico (SILVERMAN, 2004; BARREIRO, FRAGA, 2008)

Além disso, o outro principal objetivo da modificação é descobrir o grupo farmacofórico, que pode ser definido como um conjunto de características eletrônicas e estéricas que caracterizam um ou mais grupos pertencentes a uma molécula, que melhoram sua interação com o receptor, proporcionando assim, sua atividade biológica. Por outro lado, há grupos que podem desencadear uma resposta tóxica quando reconhecidos pelo receptor; esses grupos são chamados de grupos toxicofóricos (BARREIRO, FRAGA, 2008; LEMNKE *et al.*, 2012).

1.5.1- Tiossemicarbazona

As tiossemicarbazonas são estruturas de grande interesse na química medicinal, devido à ampla ação farmacológica. Este grupo já demonstrou atividade antimicrobiana, antitumoral, antiviral, anticonvulsivante, anti-inflamatória, dentre outras (TEITZ *et al.*, 1994; FEUN *et al.*, 2002; DUARTRE, FRAGA, FRAGA, 2007; CARDOSO, 2008).

Ademais, muitos trabalhos vêm demonstrando a atividade esquistosomicida e antichagásica das tiossemicarbazonas, por meio da inibição das enzimas catepsina B1 (SmCB1), presente no *Schistosoma mansoni*, e cruzaina, no *Trypanosoma cruzi* (GREENBAUM *et al.*, 2004; FUJII *et al.*, 2005; CARDOSO, 2008; DU *et al.*, 2012; FONSECA *et al.*, 2015).

A SmCB1 é a principal enzima do *Schistosoma mansoni*, pertencendo ao grupo das cisteíno-proteinases. Isso porque contém em sua tríade catalítica, um resíduo de cisteína (Cys-100), além de uma de histidina (His-270) e uma Asparagina (Asn-290). Está localizada no intestino do parasita, portanto está relacionada principalmente à degradação de macromoléculas do sangue do hospedeiro, sobretudo a hemoglobina. A partir dela, o helminto obtém nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, reprodução e crescimento. (BUATHONG *et al.*, 2014). A SmCB1 ainda é responsável pela degradação de outras proteínas importantes como a imunoglobulina igG e albumina sérica (DELCROIX *et al.*, 2007; KASNY *et al.*, 2009).

A inibição da SmCB1 frente à derivados contendo tiossemicarbazonas foi comprovada em um estudo recente. O melhor composto, contendo um radical dimetilamino-benzeno em sua estrutura, apresentou 100% de inibição e $IC_{50} = 1,5 \pm 0,4 \mu M$. O segundo melhor, contendo um pirrol, apresentou 86,1 \pm 4,4% de inibição, e $IC_{50} = 6,8 \pm 2,1 \mu M$. O estudo concluiu que um grupo aromático ligado a tiossemicarbazona é muito importante para a inibição da enzima, e a substituição da mesma por uma semicarbazona prejudica muito a atividade dos compostos sintetizados. Nesse trabalho, entretanto, não foram realizados estudos de modelagem molecular (FONSECA *et al.*, 2015).

Já a cruzaina é a principal enzima presente no *Trypanosoma cruzi*, também pertencente à classe das cisteíno proteinases, contendo em seu sítio catalítico os aminoácidos Cys-25, His-159 e Asn-175 (CHEN *et al.*, 2010). Esta enzima está presente em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, e se localiza nos lisossomos das formas amastigotas e epimastigotas. Nas formas tripomastigotas, além de se apresentar nesta organela, se localiza também na bolsa flagelar (JAGER, KOCH, FLOHÉ, 2013). A cruzaina também tem papel crucial na invasão do parasita nos tecidos humanos. Além disso, degrada a região Fc dos anticorpos (dessa forma, o sistema complemento não é ativado, sendo mais difícil combater o parasita), estimula a liberação de peptídeos pró-inflamatórios como a bradicinina, é responsável pelo processamento de nutrientes do protozoário, dentre outras ações (SAJID *et al.*, 2011; ROBINSON, DALTON, 2011).

Um trabalho realizado recentemente mostrou que compostos contendo tiossemicarbazonas foram capazes de inibir a cruzaina, e que assim como na catepsina B1, a presença de um grupo aromático é muito importante para essa inibição. Porém, um estudo mostrou que não necessariamente os compostos com maior capacidade de inibição foram os mais potentes da série: o derivado que apresentou 65% de inibição obteve $IC_{50} = 239,3 \mu M$, um valor ruim. Outro derivado apresentou 55%, e se mostrou inativo frente ao *T. cruzi*. Já os compostos mais potentes, que apresentaram IC_{50} nos valores de $6,3 \mu M$ e $12,0 \mu M$, inibiram a enzima em 20% e 50%, respectivamente (BLAU *et al.*, 2013).

Trabalhos de modelagem molecular mostraram que a inibição da cruzaina pela porção tiossemicarbazona ocorre através do ataque nucleofílico da Cys-25 ao carbono eletrofílico tiocarbonilado, e transferência de um próton da His-159 ao enxofre do mesmo, formando um intermediário tetraédrico. A ligação estabelecida é do tipo covalente (DU *et al.*, 2002; TROSSINI *et al.*, 2010).

Dessa forma, as cisteíno-proteases são um alvo biológico em comum nesses parasitas, podendo-se então, avaliar a contribuição do anel aberto e do anel fechado para a atividade, e estabelecer uma relação-estrutura-atividade (REA) (Figura 18).

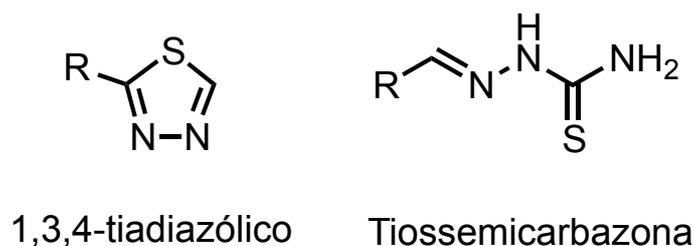


Figura 18: estrutura do anel 1,3,4- tiadiazólico e da tiossemicarbazona.

1.5.2- Grupo amino e latenciação

A amina presente no anel tiadiazólico do megalol também é outro grupo a partir do qual se podem obter derivados. A partir deste grupamento, podem-se sintetizar amidas, grupos mais lipofílicos devido ao aumento da cadeia lateral. Essa característica facilita a absorção pelas membranas celulares, aumentando a biodisponibilidade dos compostos. Uma vez absorvidos, enzimas dos parasitas denominadas peptidases promovem a hidrólise entre o nitrogênio e o carbono carbonílico, e os derivados voltam a ser novamente o megalol (CHUNG, 2005).

Esta técnica é chamada de latenciação, um processo de modificação molecular em que se insere um transportador no fármaco de interesse por uma ligação lábil, tornando-o inativo. Dessa forma, ele só será liberado mediante uma reação, química ou enzimática, no local de ação, ou próximo a ele, *in vivo* (CHUNG, FERREIRA, 1999; LIMA *et al.*, 2012).

O conceito de latenciação foi proposto por Harper, em 1959, e por meio dela, problemas farmacocinéticos, efeitos tóxicos, características organolépticas indesejáveis, tempo de atividade, formulações de difícil preparo e falta de seletividade podem ser resolvidos. A partir do momento em que a modificação é feita, através da inserção do transportador, obtém-se então um pró-fármaco (CHOI, JO, 2004; AVER, KREUTZ, SUYENAGA, 2015).

1.5.2.1- Biodisponibilidade (F%)

Para se conseguir aumento da biodisponibilidade por meio da latenciação, devem-se inserir transportadores lipofílicos na molécula ativa. Com o aumento da lipofilicidade dos compostos, há o aumento da permeabilidade destes pelas membranas celulares, uma vez que estas são estruturas lipoproteicas. Desta forma, obtém-se melhor absorção. (CHUNG, FERREIRA, 1999; CHUNG *et al.*, 2005; PEREIRA, 2007).

A lipofilicidade de um composto é comumente expressa pelo coeficiente de partição (logP) entre dois líquidos imiscíveis, sendo um a fase orgânica (n-octanol) e um a fase aquosa (água). Para um fármaco conseguir atingir boa

permeabilidade pela membrana de uma célula e conseqüentemente boa absorção, o ideal é o logP não ultrapassar 5 (KOKATE, LI, JASTE, 2008; LEESON, 2012). Caso o valor seja maior, significa que o composto é altamente lipofílico, o que faz com que ele não se dissolva nos fluidos biológicos. Há ainda o risco de o composto ficar preso entre as membranas biológicas, não conseguindo ser absorvido. Ao contrário, se o logP for muito baixo, ele não consegue ultrapassar essas membranas devido a falta de afinidade, e a absorção também não ocorre (SMITH *et al.*, 2012).

Atingindo-se uma maior absorção e, portanto, uma maior biodisponibilidade, uma menor dose do fármaco pode ser administrada, diminuindo os efeitos adversos do mesmo, tornando-o mais seguro (HETAL, BINDESH, SNEHA, 2010).

Além disso, o desenvolvimento de um pró-fármaco antiparasitário com maior biodisponibilidade, além de maior eficácia e segurança, tem impactos econômicos. Isso porque estima-se que a Doença de Chagas gere custos individuais no valor de US\$ 383,00 na América Latina para o Sistema de Saúde. No total, são US\$ 7,19 bilhões gastos no mundo todo com a doença entre medicação, internações, monitoramento dos pacientes, além da produtividade perdida e gastos com as mortes (LEE *et al.*, 2013).

Já para a esquistossomose, no Brasil, estima-se que em 2010 o Sistema Único de Saúde gastou cerca de R\$ 1.010.278,79, apenas com internações dos pacientes que estavam no estágio mais grave da doença. Ainda, estima-se um gasto de R\$ 82.897,08 com exames de diagnóstico, além dos gastos com medicação, que somou R\$ 885,60. Há ainda gastos com consultas médicas de acompanhamento, alimentação adequada aos pacientes, transporte, dentre outros (NASCIMENTO, 2013).

O desenvolvimento de compostos mais ativos e seguros tende a reduzir esses custos com menos internações, monitoramento, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (o que aumenta a produtividade dos mesmos), dentre outros.

1.5.3- Derivados heterocíclicos

O megalzol é constituído por dois anéis heterocíclicos: imidazol e o anel tiadiazólico, portanto, podem-se obter derivados a partir da substituição de ambos (ALBUQUERQUE, 1995).

O imidazol possui dois homólogos estruturais que podem ser utilizados para sintetizar derivados: furano e tiofeno (Figura 19) (JOULE, MILLS, 2014).



Furano Tiofeno

Figura 19: Estruturas do furano e tiofeno, respectivamente

Compostos do tipo 5-nitrofuranos foram os primeiros a serem usados na quimioterapia. Além de exibirem propriedades antimicrobianas e antifúngicas, seus derivados possuem também ação antiparasitárias (CAPOBIANCO-PEREZ, CORDERO DE TROCONIS, 2001). Dois fármacos muito conhecidos dessa classe são o nifurtimox, já mencionado, e a nitrofurazona, que também possui atividade antimicrobiana (BOSQUESI *et al.*, 2008). Essa classe também já foi amplamente utilizada como esquistossomicida. Em 1960, foi sintetizado um derivado contendo o grupo propionamida, que frente ao *S.japonicum*, provocou a eliminação de 100% dos parasitas, em ratos. Em coelhos, a eliminação foi de 97-100%, e em cães, 81-95%. Quando testado em esquistossomulos de *S.mansoni*, em 1966, a atividade foi confirmada (LEI *et al.*, 1944; HILL *et al.*, 1966). Em 1970 outro composto, contendo um anel oxadiazólico, foi sintetizado. Diferentemente da maioria dos fármacos dessa classe, este derivado apresentou atividade frente às formas jovens do *S.mansoni*, em dose única, por via intramuscular (Figura 20) (DUNSFORD *et al.*, 1984). Ainda, muitos outros nitrofuranos foram sintetizados depois, apresentando boa ação esquistossomicida, entretanto, nenhum nunca teve sucesso no uso terapêutico (PITTA *et al.*, 2013).

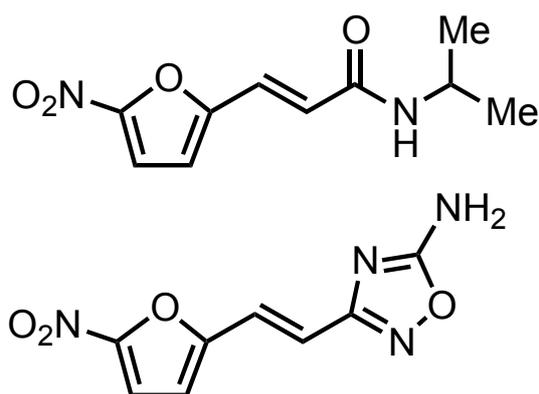


Figura 20: estrutura dos compostos contendo a propionamida e o anel oxadiazólico, respectivamente.

Já o 5-nitrotiofeno é um bioisómero do furano. Em 1974, este heterocíclico foi usado como substituinte no planejamento de derivados do

niridazol, e o composto obtido mostrou boa ação frente ao *Schistosoma mansoni* (Figura 21) (BENAZET, LEROY, 1974; PITTA *et al.*, 2013).

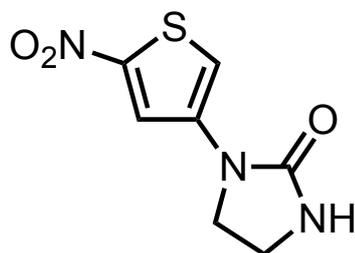


Figura 21: estrutura do derivado contendo o nitro-tiofeno.

Ambos sofrem reação de Substituição Eletrofílica Aromática (SEAr), entretanto, o furano é mais reativo. Isso ocorre devido ao tiofeno possuir maior energia de ressonância (diferença de energia da forma real da molécula e da forma com menor energia), estabilizando menos os carbocátions formados, diminuindo a reatividade do composto (STEFANI, 2009).

2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

As doenças negligenciadas constituem um grupo de 20 doenças que afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, estando presente atualmente em 149 países (MOLYNEUX, 2013; WHO, 2017).

A população de menor nível sócio-econômico, normalmente residentes na América Latina e África, sempre foi a mais afetada por essa classe de doenças, devido à falta de saneamento básico, água limpa e dificuldade de acesso aos serviços de saúde. Entretanto, com as mudanças climáticas, migrações populacionais e o aquecimento global, os vetores das doenças têm se espalhado, tornando as doenças negligenciadas um problema mundial (GITHEKO *et al.*, 2000; HOTEZ, 2016; MITRA, MAWSON, 2017).

A Doença de Chagas e a Esquistossomose pertencem a esse grupo de doenças, e ambas ainda possuem muitas dificuldades relacionadas ao diagnóstico, e principalmente, à terapêutica. Não há interesse da indústria farmacêutica em investir no desenvolvimento de fármacos antiparasitários, e devido a isso, os compostos existentes no mercado possuem muitos problemas (ANDREWS *et al.*, 2014). No caso da Doença de Chagas, a baixa atividade do benzonidazol na fase crônica faz com que o hospedeiro deva ingerir uma alta dose deste fármaco, contribuindo para o aumento de sua toxicidade (COURA, BORGES- PEREIRA, 2014). Já o praziquantel, utilizado no tratamento na esquistossomose, possui muitos casos de resistência, além de possuir atividade apenas frente ao verme adulto do *Schistosoma mansoni* (COLLEY *et al.*, 2014).

Em vista disso, torna-se necessário o desenvolvimento de novos compostos antichagásicos e esquistossomicidas.

Então, em 1968, foi sintetizado o megazol, um composto do tipo 5-nitroimidazol, que apresentou excelente atividade antiparasitária (ASATO, BERKLHAMMER, 1968). Entretanto, apresentou propriedades mutagênicas, não podendo ser introduzido na terapêutica (MELLO *et al.*, 2013). Contudo, a partir dele podem ser obtidos derivados, por meio de modificações moleculares planejadas.

1.1- Geral

Desta forma, os principais objetivos deste trabalho são:

- Sintetizar derivados do megazol, a partir dos grupos químicos interessantes presentes na molécula;
- Avaliar a atividade biológica frente aos parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni*, causadores da Doença de Chagas e Esquistossomose, duas importantes parasitoses, relacionando também os grupos químicos importantes para essa atividade.

1.2- Específicos

- Testar um derivado contendo o grupamento tiossemicarbazona;
- Sintetizar derivados obtidos a partir do grupo amino, obtendo-se a amida correspondente;
- Sintetizar análogos estruturais do megazol com os anéis heterocíclicos furano e tiofeno.

Os compostos sintetizados, após identificação estrutural, serão testados com relação à inibição do crescimento do *Trypanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni*, em cultura celular (Figura 22).

Os dados obtidos serão empregados tanto para ampliar o estudo de novos fármacos antichagásicos e esquistossomicidas, como também para uma melhor compreensão dos processos químicos envolvidos na síntese de intermediários do tipo 5-nitroheterocíclicos.

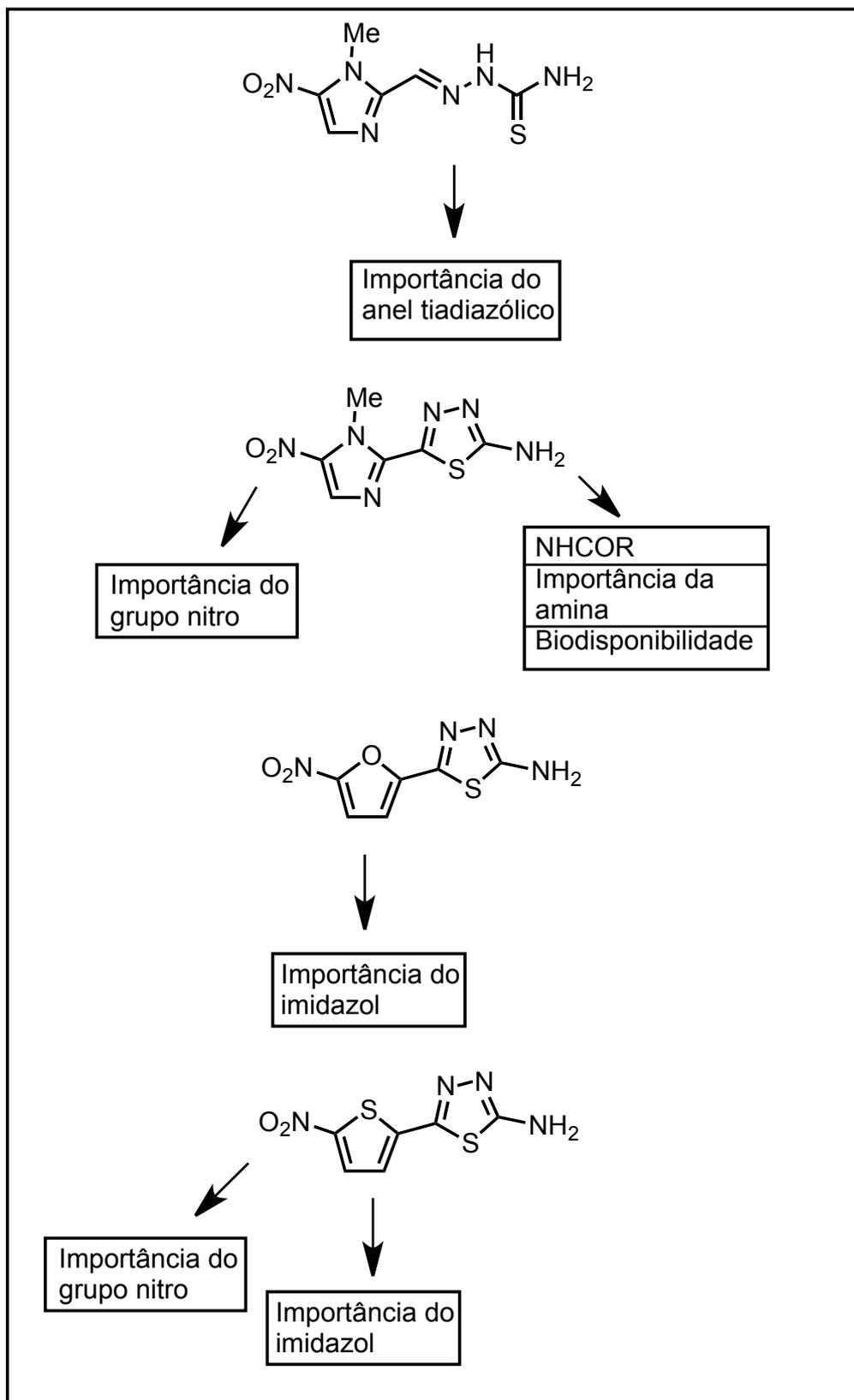


Figura 22: Resumo dos derivados obtidos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1- Materiais

3.1.1- Reagente e solventes para a síntese

- 1-metil-2-imidazol-carboxialdeído (Sigma- Aldrich)
- 2-tiofeno-carboxialdeído (Sigma- Aldrich)
- 5-nitro-2-furaldeído (Sigma- Aldrich)
- 5-nitro-2-tiofeno-carboxialdeído (Sigma- Aldrich)
- Acetato de etila (Synth)
- Acetona (Synth)
- Ácido acético (Sigma-Aldrich)
- Ácido clorídrico (Synth)
- Ácido nítrico (Synth)
- Anidrido acético (Synth)
- Cloreto de miristil (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de nonanoíla (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de propanoíla (Sigma-Aldrich)
- Dimetilsulfóxido deuterado (Sigma-Aldrich)
- Etanol (Synth)
- Hidróxido de amônio (Synth)
- Sulfato de sódio anidro (Synth)
- Tetrahidrofurano (Synth)
- Tiossemicarbazida (Sigma-Aldrich)
- Tricloroetileno (Synth)
- Trietilamina (Sigma-Aldrich)

3.1.2- Equipamentos e outros utensílios

- Agitadores magnéticos
- Analisador elementar Perkin Elmer 2400
- Aparelho para faixa de fusão (Buchi)
- Cromatofolhas de alumínio recobertas com sílica (Merck)
- Espectrômetro de RMN Bruker Avance-DPX 300/75 MHz com sonda de 5mm multinuclear
- Evaporador Rotatório (Marconi)
- Revelador UV

3.1.3- Utensílios utilizados nos ensaios biológicos

- Anfotericina B 2 µg/ml
- Antimicina 0,5 µM

- Dimetilsulfóxido (Merck)
- Eppendorfs
- Estereomicroscópio (SMZ 1000, Nikon)
- Estreptomicina 200 µg/ml
- Estufa com controle de temperatura, umidade e CO₂
- Leitor de ELISA
- Meio Liver Infusion Tryptose (LIT)
- Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Cultilab)
- Microscópio invertido (SMZ 1000, Nikon)
- Penicilina 200U/ml
- Placas de cultura
- Placas de petri
- Praziquantel 3 µg/ml
- Rotenona 60 µM
- Soro fetal bovino (Cultilab)

3.2- Métodos analíticos

3.2.1- Faixa de fusão

A faixa de fusão foi medida em aparelho Buchi, localizado no Laboratório de Síntese de Otimização de Fármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP, com o objetivo de se determinar a pureza dos compostos sintetizados, ajudando a caracterizá-los.

3.2.2- Análise elementar

A análise elementar, técnica na qual se determina as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio em uma amostra, foi realizada no Instituto de Química (IQ) da USP, também com o objetivo de se caracterizar e determinar a pureza dos compostos sintetizados.

3.2.3- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para maior caracterização das estruturas, foi feita a análise espectroscópica de ¹H e ¹³C, utilizando-se o Espectrômetro de RMN Bruker Avance-DPX 300 MHz, localizado no bloco 13 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

3.2.4- Cálculo do cLogP

O cLogP dos compostos foi calculado através do programa de computador Marvin Sketch.

3.3- Métodos de síntese

Os compostos foram sintetizados no laboratório de Síntese e Otimização de Fármacos da FCF. Posteriormente, foram identificados pelos métodos analíticos já mencionados.

Todos os resíduos que foram gerados durante as sínteses foram devidamente classificados, identificados e enviados ao tratamento adequado no Setor de Resíduos da FCF, para depois serem incinerados.

3.3.1- Síntese do megazol

O processo de síntese total do megazol foi realizado em quatro etapas, sendo elas a substituição nucleofílica (formação da tiossemicarbazona), ciclização, nitração/proteção do grupo amino e desproteção do grupo amino (Figura 23).

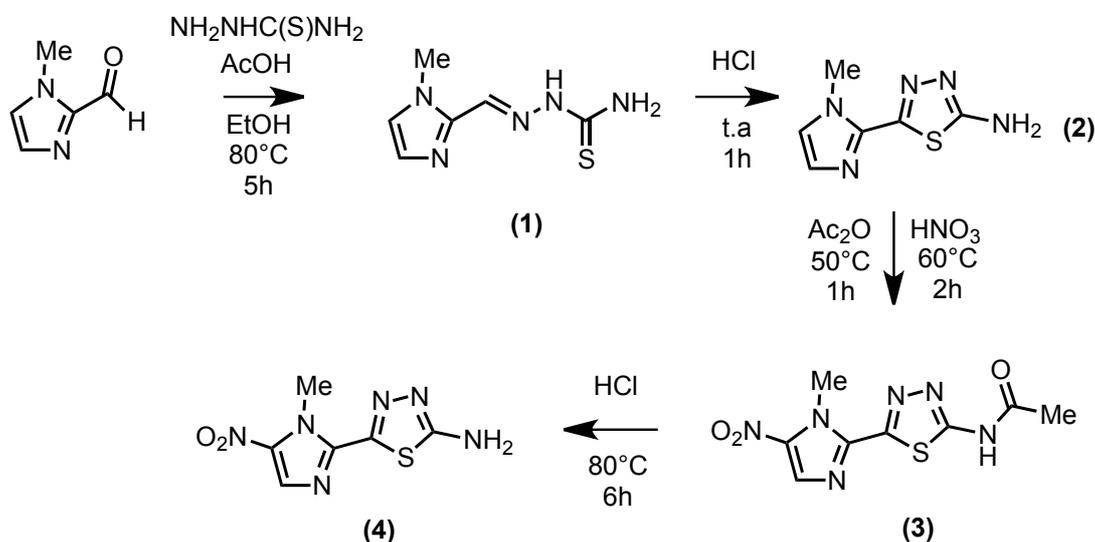


Figura 23: esquema da síntese total do megazol.

3.3.1.1.- Substituição nucleofílica (formação da tiossemicarbazona) (1)

Reagiu-se 10 mmol (1,1g) de 1-metil-2-imidazol-carboxaldeído com 10 mmol (0,91g) de TSC, em uma mistura de 30 ml de etanol com 2 ml de ácido

acético. A reação foi colocada em refluxo a uma temperatura de 80°C por 5 horas. Em seguida, foi resfriada a temperatura ambiente, formando-se um sólido que foi filtrado a vácuo e lavado com etanol. Recristalização: etanol.

3.3.1.2- Ciclização (2)

Adicionou-se 1,65 mmol (0,3 g) do composto 1 a 5 ml de ácido clorídrico (HCl), e deixou-se reagindo à temperatura ambiente por 1 hora. Passado esse tempo, a mistura foi resfriada em gelo picado e neutralizada com hidróxido de amônio. Em seguida, extraiu-se com a fase aquosa com tricloroetileno (3x20 ml). A fase orgânica obtida foi lavada 3 vezes com 20 ml de água e 1 vez com 20 ml de NaCl, e em seguida, seca com sulfato de sódio anidro. Após filtração, o solvente foi evaporado em rotaevaporador, obtendo-se o produto final. Recristalização: etanol.

3.3.1.3- Nitração/proteção do grupo amino (3)

A um balão de fundo redondo, adicionou-se 1,1 mmol (0,2 g) do composto 2 em 5 ml de anidrido acético, e aqueceu-se a 50°C sob refluxo por 1h. Passado o tempo, adicionou-se 2 ml de ácido nítrico 70%, e o refluxo foi retomado por mais 2 horas. Nesta etapa, a temperatura atingiu cerca de 60°C. Após isso, verteu-se o meio em gelo picado e neutralizou-se com solução de hidróxido de amônio. Durante a reação, foi feito acompanhamento com CCD. Ao final, obteve-se um sólido bege, que foi seco em estufa. Recristalização: acetona.

3.3.1.4- Desproteção do grupo amino (4)

A um balão de fundo redondo, adicionou-se 0,75 mmol (0,2 g) do composto 3, e 5 ml de ácido clorídrico concentrado. A mistura foi colocada em refluxo por 6 horas. Após esse tempo, resfriou-se o meio com gelo picado e neutralizou-se com hidróxido de amônio, ocorrendo a precipitação de um sólido amarelo intenso, que foi recristalizado em acetona.

3.3.2- Síntese das amidas

Os derivados amídicos foram obtidos por meio da reação do megazol com o respectivo cloreto de ácido. Primeiramente, dissolveu-se 5 mmol de megazol e 5,5 mmol de trietilamina (Et_3N) em 20 ml de THF anidro. Em seguida, a mistura foi colocada em agitação à temperatura ambiente e atmosfera inerte de nitrogênio, adicionando-se em seguida, com auxílio de seringa e gota a gota, 5,5 mmol do respectivo cloreto de ácido. Após

aproximadamente 30 minutos, foi possível observar a formação de um precipitado. A reação foi mantida por 1 hora para a obtenção da propanoílamida (**5**) e nonanoílamida (**6**), e 6 horas para a obtenção da miristamida (**7**). Ao final, filtrou-se e os compostos foram recristalizados em etanol (Figura 24).

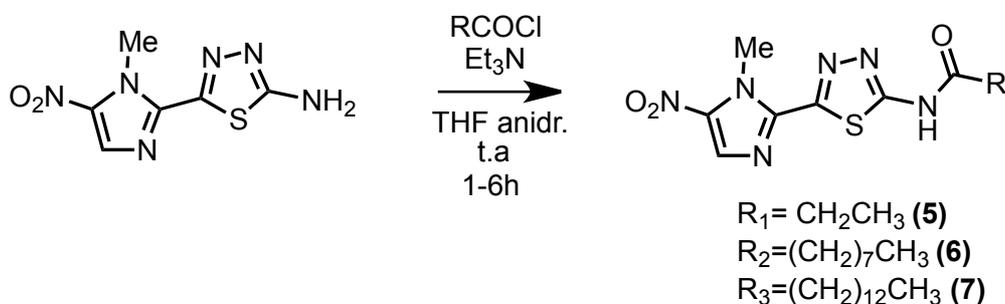


Figura 24: esquema geral da síntese dos derivados amídicos.

3.3.3-Síntese dos derivados heterocíclicos

Os derivados heterocíclicos contendo furano e tiofeno no lugar do anel imidazólico foram obtidos em duas etapas sintéticas. Primeiro, por meio de uma substituição nucleofílica, obteve-se a tiossemicarbazona correspondente, que em seguida foi ciclizada, obtendo-se o derivado.

3.3.3.1- Substituição nucleofílica (formação da tiossemicarbazona)

Reagiu-se 10 mmol do aldeído correspondente com 10 mmol de TSC em 30 ml de etanol. Ácido acético foi utilizado como catalisador, na quantidade de 2 ml. Após 5 horas em refluxo, foi observada a formação de um precipitado, que foi filtrado à vácuo e lavado com etanol (Figura 25).

Recristalização: etanol.

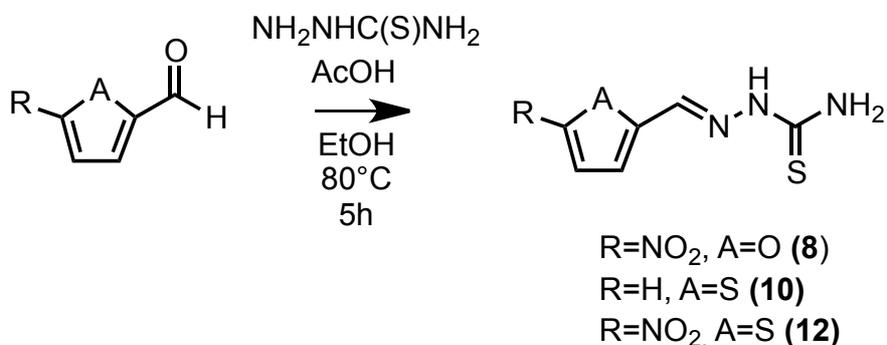


Figura 25: esquema geral da síntese das tiossemicarbazonas.

3.3.3.2- Ciclização

Em seguida, adicionou-se 0,1 g do produto correspondente obtido na primeira etapa, a 2 ml de HCl, deixando-se reagir a temperatura ambiente por 1 hora. Então, a mistura foi colocada em banho de gelo picado e neutralizada com hidróxido de amônio. Então, extraiu-se com tricloroetileno (3x20), e a fase orgânica obtida foi lavada 3 vezes com 20 ml de água e 1 vez com 20 ml de NaCl. Ao final, adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se, e o solvente foi evaporado a pressão reduzida, obtendo-se os respectivos produtos finais (Figura 26).

Recristalização: acetona (**9**); acetona:água (**11,13**).

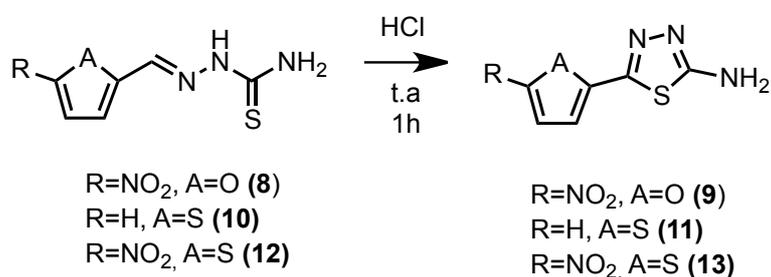


Figura 26: esquema geral da ciclização das tiossemicarbazonas.

3.4- Ensaio biológicos

Após as sínteses, alguns dos compostos foram selecionados para os testes (Quadro 2). Inicialmente, realizaram-se ensaios frente ao *Trypanosoma cruzi*. Em seguida, testou-se contra o *Schistosoma mansoni*.

Dentre as substâncias selecionadas, o composto 13 foi testado apenas frente ao *S.mansoni*.

Quadro 2: compostos selecionados para os testes.

Nº	Composto	Nome
2		1-metil- 2- (5-amino-1,3,4- tiadiazolil)- 5-imidazol
3		1-metil- 2 – (5-acetamida-1,3,4- tiadiazol)-5-nitroimidazol

4		megalol
5		1- metil-2-(5-propionamida-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol
6		1- metil-2- (5-nonanoilamida- 1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol
9		2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitrofurano
11		2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-tiofeno
13		2- (5- amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitrotiofeno
14		1-metil-2-imidazolil-5-nitro-tiossemicarbazona

3.4.1- *Trypanosoma cruzi*

Os ensaios frente às formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* foram feitos em uma parceria com o Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos (LaBTryps) (ICB-II/USP), que desenvolveu o protocolo. A cepa utilizada no ensaio foi a Cepa CL-clone 14 (BRENER, CHIARI, 1963), que foi gentilmente disponibilizada pelo prof.Dr.Ariel Mariano Silber.

3.4.1.1- Cultivo das formas epimastigotas

As formas epimastigotas extracelulares foram cultivadas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT), que contém infusão de fígado (5,0 g/l), Tryptose (5,0 g/l), NaCl (4,0 g/l), KCl (0,4 g/l), Na₂HPO₄ (8,0 g/l), glicose (2,0 g/l), hemina (10,0 g/l) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a pH=7,2. O meio foi mantido a 28°C (CAMARGO, 1964).

3.4.1.2- Avaliação da proliferação celular

Primeiramente, foi feito o ensaio de proliferação celular (análise da densidade celular). Os parasitas foram tratados com os compostos na concentração final de 5 µM. Como controle negativo, utilizou-se DMSO. Já para controle positivo (inibição), foi utilizada uma combinação de Rotenona (60 µM) e Antimicina (0,5 µM). Os parasitas ($2,5 \times 10^6$ células mL⁻¹) foram cultivados em placas de cultura de 96 poços (200 µl/poço) e mantidos a 28°C. A proliferação celular foi estimada por leitura da absorbância da densidade ótica (DO) em 620 nm durante 8 dias. A absorbância foi transformada em valores de densidade celular (células/ml), utilizando uma equação de regressão linear que foi obtida previamente sob as mesmas condições (DAMASCENO *et al.*, 2014). O programa GraphPadPrism5 foi utilizado para a construção dos gráficos.

O ensaio foi feito duas vezes, em réplica.

3.4.1.3- Cálculo da concentração inibitória 50% (IC₅₀)

Em seguida, os compostos que apresentaram boa atividade frente ao *Trypanosoma cruzi* passaram por um novo ensaio, cujo objetivo foi avaliar a concentração inibitória 50% (IC₅₀). Os protozoários ($2,5 \times 10^6$ mL⁻¹) também foram incubados em placas de 96 poços (200 µl/poço) a 28°C, por 8 dias. O IC₅₀ foi determinado no quinto dia, devido aos parasitas entrarem em fase exponencial de crescimento. Os compostos foram utilizados nas concentrações de 0,5 µM- 1,0 µM- 2,0 µM- 3,0 µM- 4,0 µM- 5,0 µM, obtendo-se uma curva dose-resposta. A concentração que inibe 50% foi determinada por meio do ajuste dos dados dessa curva, feita pelo programa OriginPro 8 (DAMASCENO *et al.*, 2014).

Este ensaio foi feito em réplica.

3.4.2- *Schistosoma mansoni*

Os testes frente ao *S. mansoni* foram feitos em uma parceria com o Laboratório de Parasitologia e Malacologia do Instituto Butantan.

3.4.2.1- Linhagem do parasita e animais hospedeiros

O ciclo do *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) utilizado nesse trabalho foi mantido em caramujos *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), utilizados como hospedeiro intermediário, e hamsters *Cricetus auratus*, utilizados como hospedeiro definitivo. A linhagem BH do parasita vem sendo mantida, há muitos anos, no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, São Paulo.

Os caramujos descendem de espécimes de Barreiro de Baixo, Belo Horizonte, Minas Gerais. Os moluscos são mantidos em aquários de polietileno (22 x 55 x 17 cm) com cerca de 20 litros de água filtrada e aeração em temperatura ambiente, e são alimentados com alface fresca. Os hamsters, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, são mantidos em caixas de polipropileno (40 x 34 x 16 cm) com tampa metálica, acomodados em maravalha, que é trocada duas vezes por semana, e alimentados com ração e água *ad libitum*. Os roedores usados nos experimentos são do sexo feminino, recém-desmamados, pesando aproximadamente 20 gramas e com 21 dias de idade (MORAES, 2011).

3.4.2.2- Manutenção do ciclo do *Schistosoma mansoni*

Para a manutenção do ciclo do *Schistosoma mansoni*, os hamsters foram infectados subcutaneamente com seringa de 1 ml, contendo aproximadamente 250 cercárias. Após cerca de 45 dias, esses hamsters foram sacrificados em câmara de CO₂, para a retirada do fígado e obtenção dos miracídios. Os fígados foram triturados com solução salina (0,85%), e a suspensão desses tecidos triturados foi deixada para sedimentar na geladeira, protegida da luz. Após lavagens com decantações sucessivas, o sedimento foi suspenso com água desclorada e exposta à luz, obtendo-se então, os miracídios. O número e a viabilidade dos miracídios e cercárias foram determinados com o auxílio de um estereomicroscópio (PELLEGRINO, KATZ, 1968).

Após esse procedimento, iniciou-se o processo de infecção do hospedeiro intermediário pelos miracídios. Os moluscos sexualmente maduros foram colocados, individualmente, em placas de células contendo 24 poços, juntamente com água filtrada e 10 miracídios. A exposição do molusco ao miracídio foi realizada sob luz artificial (incandescente de 60 W) durante 4 horas. Após 35-40 dias, os moluscos foram colocados novamente sob luz artificial para se avaliar a eliminação das cercárias. Os caramujos que estavam infectados foram protegidos da luz com a colocação de papel alumínio ao redor

do aquário, para evitar a eliminação das cercárias (PELLEGRINO, KATZ, 1968).

Para a infecção do hospedeiro definitivo, cerca de 30 caramujos infectados foram transferidos para um béquer contendo água desclorada, e expostos a luz para a eliminação das cercárias. Para concentração cercariana, os parasitas foram transferidos para tubos de ensaio de vidro parcialmente protegidos da luz com papel alumínio, de modo que a entrada de luz foi somente no ápice. As cercárias foram utilizadas para infectar os hamsters (PELLEGRINO, KATZ, 1968).

3.4.2.3- Compostos a serem testados e preparo das amostras

Os compostos sintetizados foram conservados a temperatura ambiente e em local livre de umidade, em frascos de vidro âmbar. Para preparar cada um dos compostos para o teste, transferiu-se 1 mg dos mesmos para “ependorfs” e dissolveu-os em 3% de DMSO (p/v). Então, adicionou-se o meio “Roswell Memorial Park Institute” (RPMI 1640) até se obter uma solução mãe para cada análogo, com cada substância na concentração de 1mg/ml. Em seguida, a partir de cada solução mãe, preparou-se as soluções para os testes, com o análogo na concentração final de 100 µM.

O meio RPMI contém L-glutamina e vermelho de fenol (pó para preparar 1 litro de solução), e foi esterilizado por filtração.

3.4.1.4- Recuperação dos vermes adultos e avaliação da atividade esquistossomicida

Os vermes adultos de *S. mansoni* apresentavam aproximadamente 45 dias de idade, e foram recuperados por perfusão do sistema porta hepático, conforme descrito por Smithers e Terry (1965). A perfusão foi realizada com a solução balanceada de RPMI 1640 e heparina sódica 5 UI/ml. Os hamsters foram sacrificados por inalação de CO₂ e, posteriormente, fez-se uma secção longitudinal na região ventral, expondo-se os órgãos internos. A veia porta foi cortada, e com o auxílio de uma agulha acoplada a uma bomba peristáltica, injetou-se a solução diretamente no coração do animal, coletando-se os vermes adultos (SMITHERS, TERRY, 1965).

Os ensaios “*in vitro*” com os vermes adultos foram realizados com machos e fêmeas acasalados. Os casais de vermes obtidos dos hamsters por perfusão foram lavados 3 vezes com o meio RPMI 1640 já diluído em tubos Falcon. O meio foi esterilizado por filtração (Corning), e enriquecido com penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/ml e anfotericina B 2 µg/ml. Posteriormente, os parasitas acasalados foram transferidos para placas de Petri estéreis e incubados a 37°C.

Em seguida, adicionou-se em cada poço das placas de cultura, um casal de vermes, e 2ml de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB, penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/ml e anfotericina B 2 µg/ml (DE MORAES *et al.*, 2011). Então, adicionou-se aos poços 500 µL da solução previamente preparada, na concentração de 100 µM, contendo os análogos. Cada análogo foi testado em 5 casais de vermes.

Praziquantel 3mg/ml foi utilizado como controle positivo, e poços contendo apenas DMSO 1,5% foram utilizados como controle negativo. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa a 5% de CO₂, e foram monitoradas diariamente por 96 horas, com auxílio de microscópio invertido e estereomicroscópio. O objetivo desse teste foi observar a motilidade, acasalamento e a taxa de mortalidade dos parasitas na presença dos análogos, durante esse período.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Síntese do Megazol

1-metil-2-imidazolil-tiossemicarbazona (1)

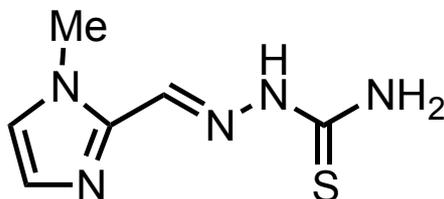


Figura 27: estrutura do composto 1.

Sólido branco. PF= 160-162,2°C. R= 81% (1,48g).

C=31,57; H=3,53; N=36,22 (% teórica).

C=31,28; H=3,47; N=37,08 (% obtida).

O composto 1 (Figura 27) foi obtido a partir da condensação do aldeído com a tiossemicarbazida, formando a tiossemicarbazona correspondente, caracterizada por conter uma imina. Essa reação caracteriza uma substituição nucleofílica em compostos carbonílicos. O processo começa com a protonação da carbonila do aldeído pelo ácido acético, formando o íon oxônio. Em seguida, há o ataque nucleofílico do N-1 da tiossemicarbazida (Figura 28). A importância do ácido, além de atuar como catalisador, está em manter o pH controlado, uma vez que esta reação é reversível e favorece a formação do material de partida (aldeídos), já que a ligação carbonílica é mais forte que a ligação C=N. O pH deve ser mantido entre 4 e 5 para que se atinjam bons rendimentos. Em pH's muito ácidos, o nitrogênio da tiossemicarbazida pode ser protonado em excesso, diminuindo sua nucleofilicidade e atrapalhando a reatividade. Por outro lado, em valores maiores que 5, a carbonila não será protonada o suficiente, diminuindo a velocidade da reação (SOLOMONS, FRYHLE, 2002; COSTA *et al.*, 2003; TENÓRIO *et al.*, 2005).

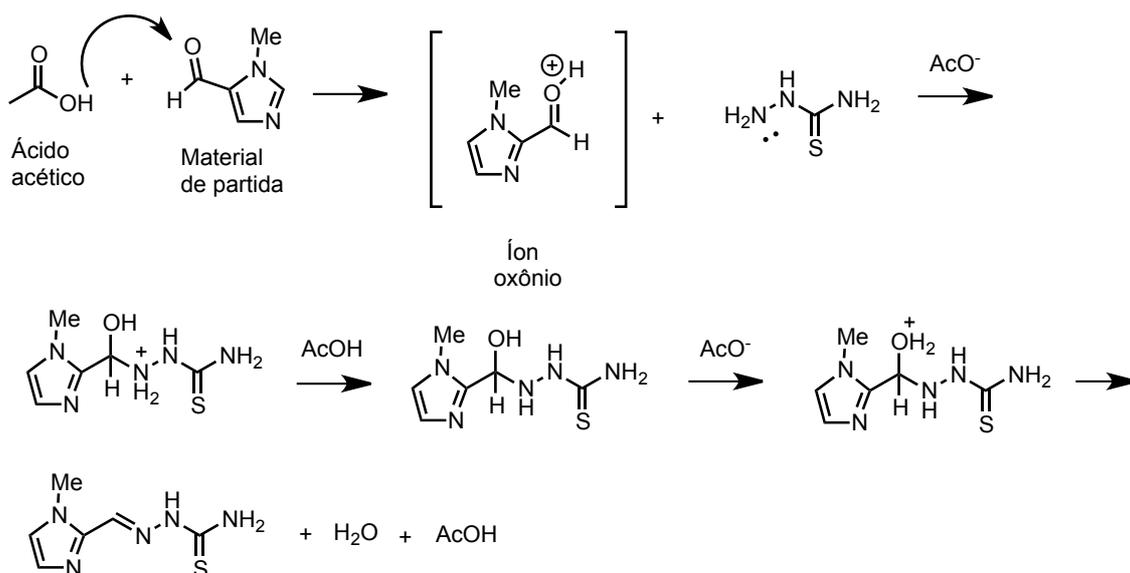


Figura 28: mecanismo da reação de condensação entre o 1-metil-2 imidazol-carboxialdeído e a tiossemicarbazida.

Entretanto, além do N-1, o N-3 da tiossemicarbazida também apresenta um par de elétrons disponível, podendo atacar o carbono carbonílico do aldeído e formar outro isômero. Porém, este isômero é formado em quantidade bem menor, devido ao N-3 ser um nucleófilo mais fraco, pois seus elétrons estão sendo compartilhados com o carbono tiocarbonilado, diminuindo sua nucleofilicidade. A molécula formada também não cicliza, pois formaria um anel instável.

Os isômeros possuem solubilidade muito parecida, sendo que o 2 pode ser considerado uma impureza. Esta teoria foi provada na tese de Albuquerque, em 1995 (Figura 29).

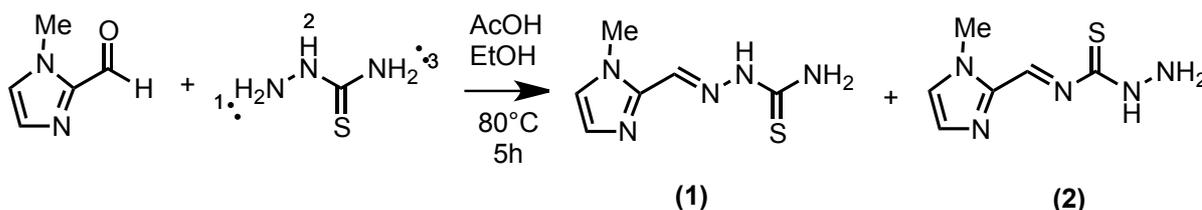


Figura 29: esquema de formação dos dois isômeros na reação de condensação entre o 1- metil- 2- imidazol- carboxialdeído e a tiossemicarbazida.

Devido às características parecidas, não foi possível separá-los nessa etapa (formou-se uma mistura). Eles só foram separados na próxima, quando o isômero 1 ciclizou, formando o produto de interesse.

O rendimento obtido (81%) está de acordo com a literatura, que descreve a formação das tiossemicarbazonas no valor entre 80-90%.

1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-imidazol (2)

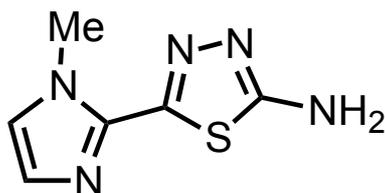


Figura 30: estrutura do composto 2.

Sólido branco. PF= 240,1-241°C. R= 71% (0,21g)

C=39,77; H=3,89; N=38,65 (% teórica).

C=39,46; H=3,79; N=37,96 (% obtida).

A formação do anel 1,3,4-tiadiazólico a partir da tiossemicarbazona foi feita pela ação do ácido clorídrico concentrado. Essa reação originou o composto 2 (Figura 30).

Esse mecanismo foi proposto de acordo com em um estudo em que o anel 1,3,4-tiadiazólico é formado a partir da tiossemicarbazida, ácido clorídrico e ácido fórmico. O ácido orgânico tem o papel de doar um carbono para a formação do anel tiadiazólico, e reage primeiro com a tiossemicarbazida através de uma condensação, caracterizando uma substituição nucleofílica acíclica, ocorrendo um processo semelhante à formação da tiossemicarbazona. Em seguida, o produto formado da condensação reage com o ácido clorídrico, que irá promover a ciclização. Ela se inicia pelo ataque do hidrogênio do ácido à ligação dupla do carbono carbonílico, dando origem ao carbocátion. Este é atacado pelo enxofre (nucleófilo), formando a estrutura cíclica hidroxilada. Então, os íons cloro provenientes da dissociação do ácido retiram o hidrogênio do anel, formando o heterocíclico 1,3,4-tiadiazólico. Água e HCl são os subprodutos formados dessa reação (HARISH *et al.*, 2013; MANSOORY, RAJPUT, 2015) (Figura 31).

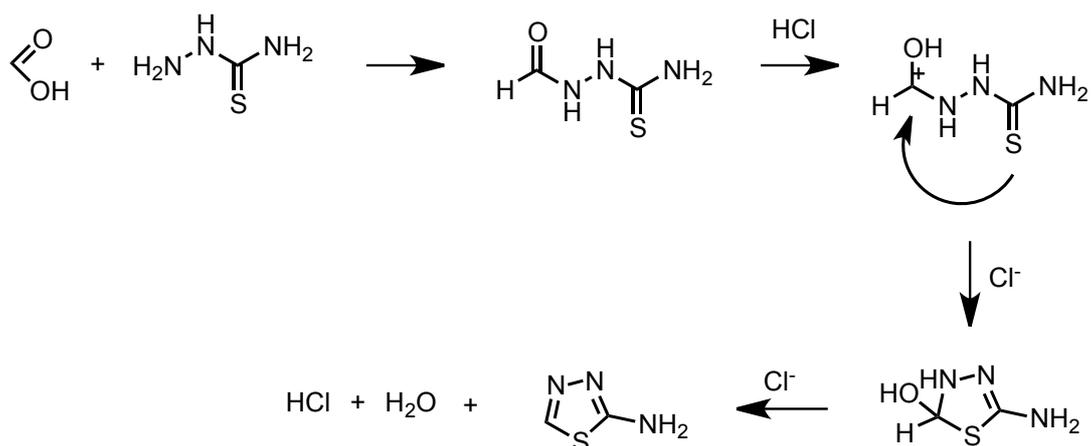


Figura 31: mecanismo da reação de ciclização por ácido clorídrico e ácido fórmico.

Na ciclização dos derivados, o ácido fórmico não foi necessário, pois os dois carbonos já haviam sido fornecidos pela tiossemicarbazona. Como consequência, não há formação de água como subproduto, apenas HCl (Figura 32).

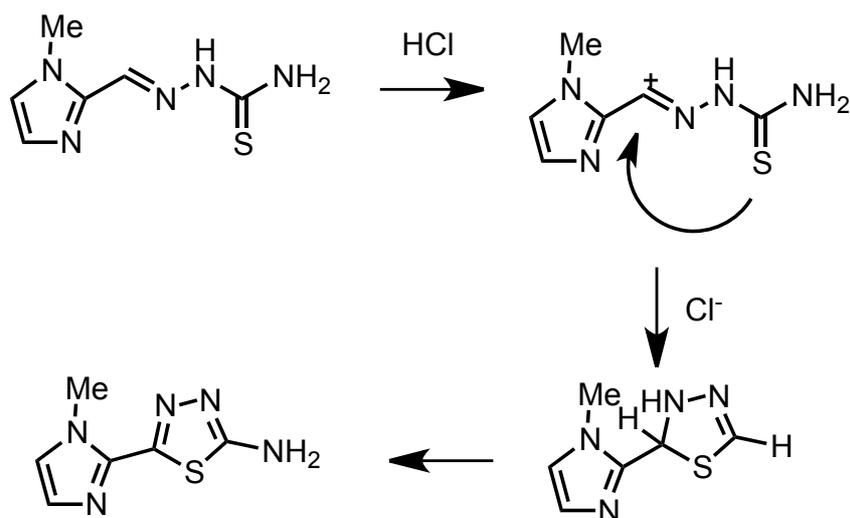


Figura 32: mecanismo da reação de ciclização proposto por ácido clorídrico.

Segundo a literatura, o rendimento do processo está em torno de 80-82% (HARISH *et al.*, 2013; RAJPUT, 2015), e o obtido na reação foi de 71%, o que pode ser explicado pela formação do isômero 2, que não reagiu, acarretando queda de rendimento.

Essa metodologia de ciclização apresenta-se muito mais vantajosa em relação à primeira metodologia desenvolvida para sintetizar o megazol, na qual utiliza-se sulfato de amônio e ferro III (NH₄Fe(SO₄)₃) ou clorreto férrico (FeCl₃). Isso porque os sais de ferro utilizados são sais de ácidos fortes e bases fracas,

então ao final da reação o meio está ácido, o que faz com que esses compostos formem como subproduto hidróxido de ferro III ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) (ASATO, BERKELHAMMER, 1968). Essa base está na forma de gel, o que dificulta muito sua separação do produto formado, podendo diminuir o rendimento do processo se ela não for feita corretamente.

Em relação ao último método desenvolvido, no qual utiliza-se brometo de cianogênio (CNBr), a ciclização por HCl apresentou-se mais vantajosa por se tratar de um reagente de toxicidade muito menor, já que o reagente cianado é um agente irritante para os olhos, além de provocar queimaduras na pele e ser venenoso se inalado ou ingerido, apresentando risco a saúde nível 4. Este reagente requer bastante cuidado no seu manuseio, bem como equipamentos de proteção individual (EPI's) e equipamentos de proteção coletiva (EPC's) específicos (PATNAIK, 2007).

1-metil-2-(5-acetamida-1,3,4-tiadiazol)-5-nitroimidazol (3)

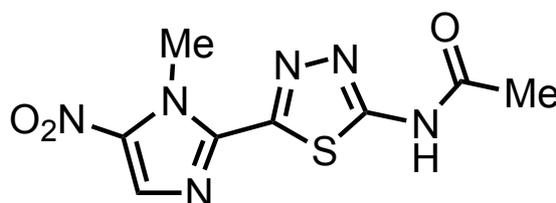


Figura 33: estrutura do composto 3.

Sólido bege. PF= 235,3-236,2 °C. R= 74,3% (0,22g).

C=35,82; H=2,98; N=31,34 (% teórica).

C=35,92; H=3,09; N=30,35 (% obtida).

Para a síntese do composto 3 (Figura 33), foi feita a reação de nitração optando-se por utilizar a mistura clássica de ácido nítrico 70% e anidrido acético. O emprego do anidrido faz-se necessário para a proteção do grupo amina presente no anel 1,3,4-tiadiazólico. Nesse processo, ocorre ainda a formação de ácido acético como subproduto, garantindo que o meio permaneça ácido, o que favorece o direcionamento do grupo nitro para a posição 5 do imidazol, já que o processo ocorre a temperatura favorável. O meio ácido também evita que o grupo protetor acetil seja removido.

Todas as condições favoráveis ao processo de nitração permitiram a utilização de ácido nítrico 70% ao invés de ácido nítrico fumegante (99,5%), diminuindo a toxicidade do procedimento. Obteve-se um rendimento de 74%, provando que a metodologia, além de menos tóxica, foi eficiente.

Megazol (4)

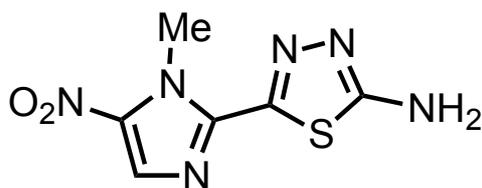


Figura 34: estrutura do composto 4.

Sólido amarelo. PF= 269,1-270,7°C. R= 79,7% (0,14 g).

C=31,83; H=2,67; N=37,15 (% teórica).

C=31,61; H=2,60; N=36,44 (% obtida).

Na última etapa, utilizou-se o ácido clorídrico para a remoção o grupo protetor. Ele promove a hidrólise do grupo amida à amina, obtendo-se então o megazol (Figura 34). O processo teve rendimento de 80%.

Ao final do processo de síntese do megazol, obteve-se um rendimento global de 34,2%, sendo mais vantajosa que as primeiras rotas desenvolvidas. Essa rota também apresenta menos etapas, minimizando a formação de resíduos. Com relação à toxicidade dos reagentes utilizados, pode-se destacar apenas o ácido nítrico e o ácido clorídrico, porém o uso de EPI's e EPC's apropriados minimizam os riscos.

4.2- Síntese das amidas

As 3 amidas (excluindo o composto 3) foram obtidas pela reação da amina localizada no anel 1,3,4-tiadiazólico do megazol, com o respectivo cloreto de ácido. Para a obtenção do 1-metil-2-(5-propionamida-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol (composto 5) (Figura 35), utilizou-se o cloreto de propanoíla; para a síntese do 1-metil-2-(5-nonanoilamida-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol (composto 6) (Figura 36), foi utilizado o cloreto de nonanoíla e para a obtenção do 1-metil-2-(5-miristamido-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol (composto 7) (Figura 37), utilizou-se o cloreto de miristil.

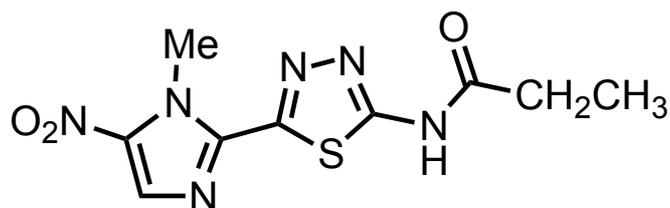


Figura 35: estrutura do composto 5.

Sólido amarelo claro. PF=235-237,2°C. R= 58% (0,081 g)

C=38,29; H=3,57; N=29,77 (% teórica).

C=38,00; H=3,14; N=29,32 (% obtida).

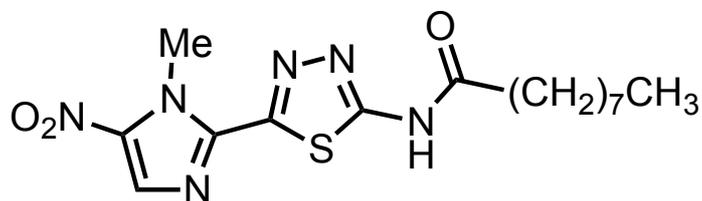


Figura 36: estrutura do composto 6.

Sólido esbranquiçado. PF= 246,2-247,1 °C. R= 60% (0,11 g).

C=49,17; H=6,05; N=22,93 (% teórica).

C=48,89; H=5,98; N=21,80 (% obtida).

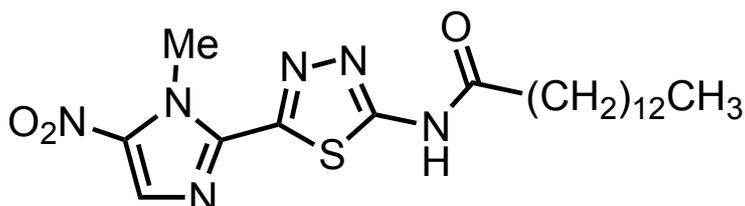


Figura 37: estrutura do composto 7.

Sólido esbranquiçado. PF= 255,9-257 °C. R= 55% (0,24 g).

C=55,00; H=7,39; N=19,26 (% teórica).

C=54,21; H=6,91; N=19,00 (% obtida).

A reação para a obtenção destes produtos segue o mecanismo de uma substituição nucleofílica acílica, na qual reagem compostos carbonílicos e

nucleófilos. Esse processo deve ser realizado em atmosfera inerte utilizando-se solvente anidro (BRUICE, 2014). O cloreto é um bom grupo de saída, já que sua base conjugada é fraca; por sua vez, o grupo amina do megazol é um bom nucleófilo, então desloca o íon cloreto e a reação ocorre facilmente. Como subproduto dessa reação, forma-se o HCl, que promove a protonação da amina do megazol que ainda não havia reagido, transformando-o em um sal não reativo, diminuindo o rendimento. Para isso não ocorrer, emprega-se então uma base não nucleofílica, como a trietilamina, que captura o ácido, impedindo que ele reaja com a amina do megazol. Essa metodologia foi desenvolvida por Schotten-Baumann, em 1884.

O tempo usado para a obtenção de cada amida variou, devido à diferença no número de carbonos do cloreto a partir de qual cada uma foi obtida. O composto 5 foi obtido a partir do cloreto de propanoila, contendo 3 carbonos, portanto, seu tempo de reação foi menor. Já o cloreto de miristil, que contém 14 carbonos, reage mais lentamente, necessitando de mais tempo.

Os rendimentos obtidos (58% para o composto 5, 60% para o composto 6 e 55% para o composto 7) foram abaixo do esperado, pois a literatura descreve a formação de amidas com rendimento entre 80-100% (BRUICE, 2014). Esse valor pode ser devido à falta de uso de catalisadores como o 1,4-dimetilaminopiridina (DMAP), um catalisador nucleofílico que aumenta a eletrofilicidade da carbonila do cloreto de ácido, aumentando a velocidade da reação (TAYLOR *et al.*, 2012). Essa técnica pode ser utilizada futuramente em novas sínteses de amidas.

4.3- Síntese do 2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitrofurano

2-formil-5-nitrofurano-tiossemicarbazona (8)

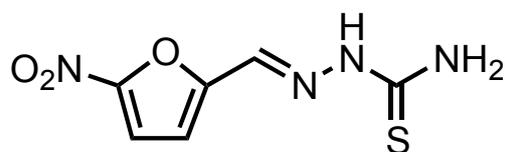


Figura 38: estrutura do composto 8.

Sólido amarelo. PF= 250,9-251,3 °C. R= 80% (1,84g)

C=33,64; H=2,82; N=26,16 (% teórica).

C=33,30; H=2,60; N=25,92 (% obtida).

Para a obtenção do composto 8 (Figura 38), partiu-se do reagente 5-nitro-2-formil-carboxialdeído e da tiossemicarbazida. A reação que ocorre entre

eles também foi uma condensação, às mesmas condições, obtendo-se a tiossemicarbazona. O rendimento do processo foi de 80%, e também obteve-se uma mistura, com um isômero de interesse e um isômero não ciclizante.

2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitrofurano (9)

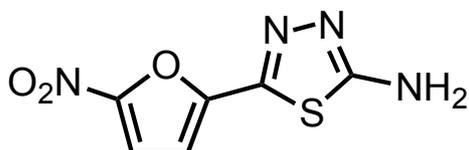


Figura 39: estrutura do composto 9.

Sólido amarelo escuro. PF= 280,3-281°C. R= 60% (0,059g)

C=33,96; H=1,90; N=26,40 (% teórica).

C=33,80; H=1,76; N=25,85 (% obtida).

A ciclização também foi feita com ácido clorídrico, obtendo-se o análogo (Figura 39) diretamente. O rendimento também diminuiu bastante em relação à reação de obtenção do composto 8 (60%), devido ao isômero não ciclizante (impureza).

O rendimento global da reação foi de 45,5%, um valor maior que a síntese do megazol. Isso pode ser explicado porque para obter esse produto, não foi necessário nitrá-lo, uma vez que partiu-se de um reagente já contendo o grupo nitro. Isso reduz duas etapas do processo (nitração/proteção do grupo amino e hidrólise do grupo acetil), contribuindo para um aumento do rendimento global, além de diminuir a quantidade de resíduos gerados.

4.4- 2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-tiofeno

2-tiofenil-tiossemicarbazona (10)

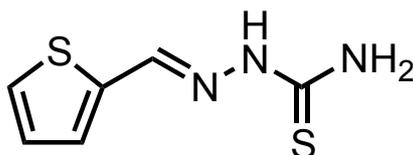


Figura 40: estrutura do composto 10.

Sólido amarelo escuro. PF= 184,1-185,3°C. R= 84% (1,55g)

C=38,91; H=3,78; N=22,70 (% teórica).

C=38,70; H=3,54; N=22,62 (% obtida).

Manteve-se a mesma metodologia, utilizando-se a reação de condensação, formando o composto 10 (Figura 40). O derivado heterocíclico empregado foi o aldeído ligado a um tiofeno. O rendimento do processo foi de 84%.

2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-tiofeno (11)

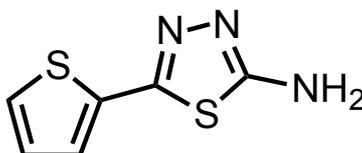


Figura 41: estrutura do composto 11.

Sólido amarelo escuro. PF= 205,1-206,4°C. R= 73% (0,072g).

C=39,34; H=2,73; N=22,95 (% teorica).

C=39,14; H=2,52; N=22,80 (% obtida).

A ciclização também foi feita com ácido clorídrico, e às mesmas condições. O composto 11 (Figura 41) foi obtido com rendimento de 73%.

O rendimento global desse processo foi de 61,6%, um valor acima da média. Isso se deve também ao processo ter apenas duas etapas, e a valores elevados nos rendimentos das reações individuais.

4.5- Síntese do 2-(5- amino- 1,3,4- tiadiazolil)-5-nitrotiofeno

2-tiofenil-5-nitro-tiossemicarbazona (12)

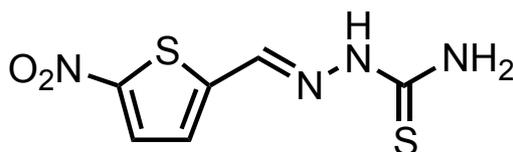


Figura 42: estrutura do composto 12.

Sólido amarelo escuro. PF= 204,3-205,6°C. R= 80% (1,84g).

C=31,30%; H=2,60%; N=24,31% (% teórica)

C=31,16%; H=2,51%; N=24,19% (% teórica)

Novamente, utilizou-se a reação de condensação para formar o composto 12 (Figura 42), às mesmas condições. Utilizou-se o 5-nitro-2-tiofeno-carboxaldeído como reagente de partida, e obteve-se 80% de rendimento.

2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitrotiofeno (13)

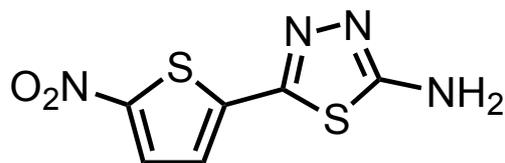


Figura 43: estrutura do composto 13.

Sólido amarelo escuro. PF= 245,8-246,1°C. R= 69% (0,068g).

C=31,57%; H=1,75%; N=24,56% (% teórica)

C=31,42%; H=1,52%; N=24,40% (% obtida)

A ciclização também foi feita com HCl, às mesmas condições, obtendo-se o composto 13 (Figura 43) com 69% de rendimento.

Obteve-se um rendimento global de 55,5%, um valor similar ao derivado tiofênico. O processo de síntese dessa molécula foi realizado em duas etapas, já partindo de um reagente nitrado, otimizando o tempo, visando aumentar o rendimento global e diminuir os resíduos gerados.

4.6- Caracterização dos compostos

Após a síntese e purificação, os compostos foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa. O procedimento é feito em placas de sílica, em que a própria sílica age como a fase estacionária. A fase móvel variou para cada composto. O processo é feito para se ter certeza de que apareceria apenas uma mancha, indicando que há apenas um produto no meio.

Calculou-se também a faixa de fusão dos compostos, para se avaliar o grau de pureza dos mesmos. Para a total caracterização das estruturas, foi feita a RMN¹H e RMN¹³C, complementada com a análise elementar.

4.6.1- Identificação por RMN¹H e RMN¹³C dos derivados contendo anéis heterocíclicos

O solvente escolhido na realização da RMN¹H e RMN¹³C foi dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆), por questões de solubilidade, e foi utilizado tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. A legenda adotada para a multiplicidade dos sinais dos hidrogênios foi: s-singlete; d-dubleto; dd-duplo duplete; sl-singlete largo, q-quarteto e m-multiplete, sendo J a constante de acoplamento. Os arquivos foram abertos no programa de RMN intitulado MestreReNova, em que também foram feitos os cálculos de parâmetros como o J.

A integral, parâmetro que mede a área de cada sinal, correspondendo ao número de hidrogênios presentes em cada átomo, também foi analisada.

O DMSO-d₆ é um solvente altamente higroscópico e polar, portanto tem a capacidade de realizar ligações de hidrogênio intermoleculares com a água. Quando a ligação é formada, o DMSO-d₆ doa um de seus deutérios para a água, formando-se HDO (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE; 2005). Como as duas substâncias são miscíveis, os sinais referentes a elas também aparecem nos espectros, sendo o do solvente em aproximadamente 2,5 ppm, e o da água em aproximadamente 3,2 ppm.

No Quadro 3, podem-se observar os deslocamentos químicos dos derivados contendo os diferentes anéis heterocíclicos. Os substituintes são o imidazol, furano e tiofeno, que diferem quanto ao deslocamento de seus hidrogênios e carbonos.

Em comum, os compostos apresentam o anel tiadiazólico ligado a uma amina primária, portanto, no espectro de RMN¹H devem-se observar apenas os hidrogênios ligados à mesma, uma vez que o anel não apresenta nenhum. Em relação às aminas primárias, é característico o aparecimento de um singlete largo, pois hidrogênios desse grupo têm a capacidade de realizar ligação de hidrogênio intermolecular com o DMSO-d₆, ocorrendo então, a troca pelo deutério. Essa ligação de hidrogênio contribui para desblindar os hidrogênios e os carbonos dos compostos. Hidrogênios de aminas primárias costumam apresentar deslocamentos químicos de 0,5 a 4,0 ppm (RIBEIRO, SOUZA, 2007), porém as aminas em questão sofrem o efeito de ressonância do anel tiadiazólico, então seus prótons são mais desblindados, apresentando sinais de 7,44 a 7,87 ppm.

Em relação ao número de carbonos, o anel apresenta dois, muito desblindados. Isso é devido à ligação com heteroátomos eletronegativos (enxofre e nitrogênio), que diminuem a densidade eletrônica dos carbonos, aumentando o deslocamento químico. Além disso, esses dois carbonos têm hibridização sp², o que desblinda mais.

Quanto aos heterocíclicos, cada um apresenta um padrão de deslocamento. A seguir, serão discutidos alguns espectros para se observar a diferença dos sinais e comprovar a estrutura dos compostos.

O espectro abaixo é o RMN¹H do composto 9, que apresenta um furano em sua estrutura (Figura 44)

- RMN¹H (DMSO-d₆/300MHz) δ (ppm) = 7,32 (d, 1H, H4, J= 4,03 Hz); 7,84 (d, 1H, H3, J= 3,96 Hz); 7,87 (sl, 2H, NH₂).

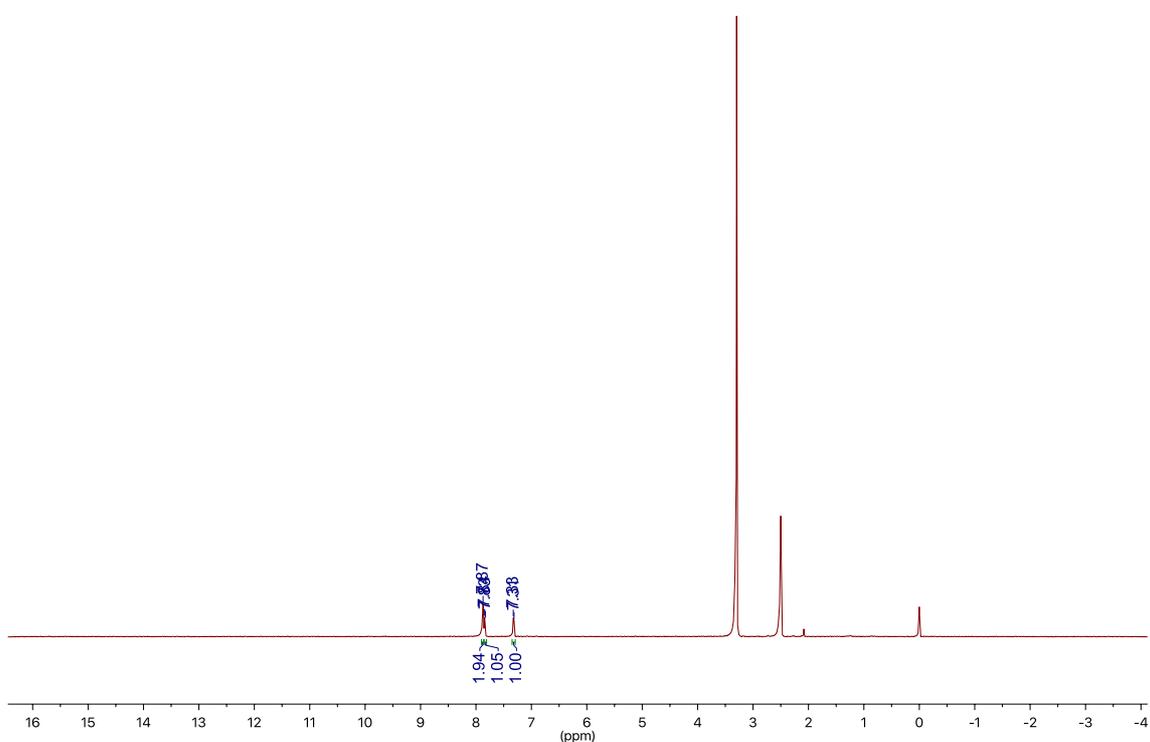
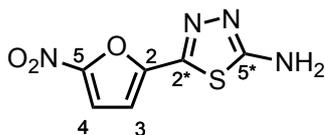


Figura 44: espectro de RMN¹H do composto 9

O furano apresenta dois hidrogênios que acoplam entre si: o H3 e o H4. Dessa forma, ambos devem apresentar sinal de dubleto. O H4 é mais blindado, pois está em posição meta ao anel tiadiazólico, então o anel doa elétrons para este próton, aumentando sua densidade eletrônica, contribuindo para a blindagem. O sinal dele pode ser visto em 7,32 ppm, como um pequeno dubleto. No espectro pode ser vista a integral no valor de 1,00, comprovando que há apenas 1 hidrogênio naquele local.

O H3 é um pouco mais desblindado, pois não sofre influência do anel tiadiazólico. Apesar de estar em posição meta ao grupo nitro, que também doa elétrons para este hidrogênio, a influência do anel é maior. O sinal apresentou um dubleto com deslocamento químico no valor de 7,84 ppm e integral no valor de 1,05, comprovando a presença de apenas 1 hidrogênio no local.

A constante de acoplamento (J) entre esses hidrogênios foi de 3,96 Hz e 4,03 Hz. Segundo Joule e Mills (2010), o valor médio de J entre o H3 e H4 de um furano é de 3,5 Hz, um valor próximo ao obtido. Essa constante é a maior dentre as existentes nesse heterocíclico, pois os átomos nessa posição estão mais próximos na molécula, o que faz com que acoplem mais fortemente.

Bem próximo ao dubleto do H3, ve-se o singlete largo do hidrogênio da amina, em 7,87 ppm. A integral apresentada foi no valor de 1,94, comprovando a presença de 2 hidrogênios.

Em 2,50 ppm observa-se o sinal do DMSO-d6, e em 3,30 ppm o sinal da água. Próximo ao sinal do solvente há-se um pequeno pico, que pode se tratar de uma pequena impureza.

A seguir, observa-se o espectro de carbono do composto 9 (Figura 45).

- RMN¹³C (DMSO-d6/75MHz) δ (ppm) = 112,12 (C4); 115,61 (C3); 143,74 (C5); 148,32 (C2); 158,97 (C*2); 170,54 (C*5).

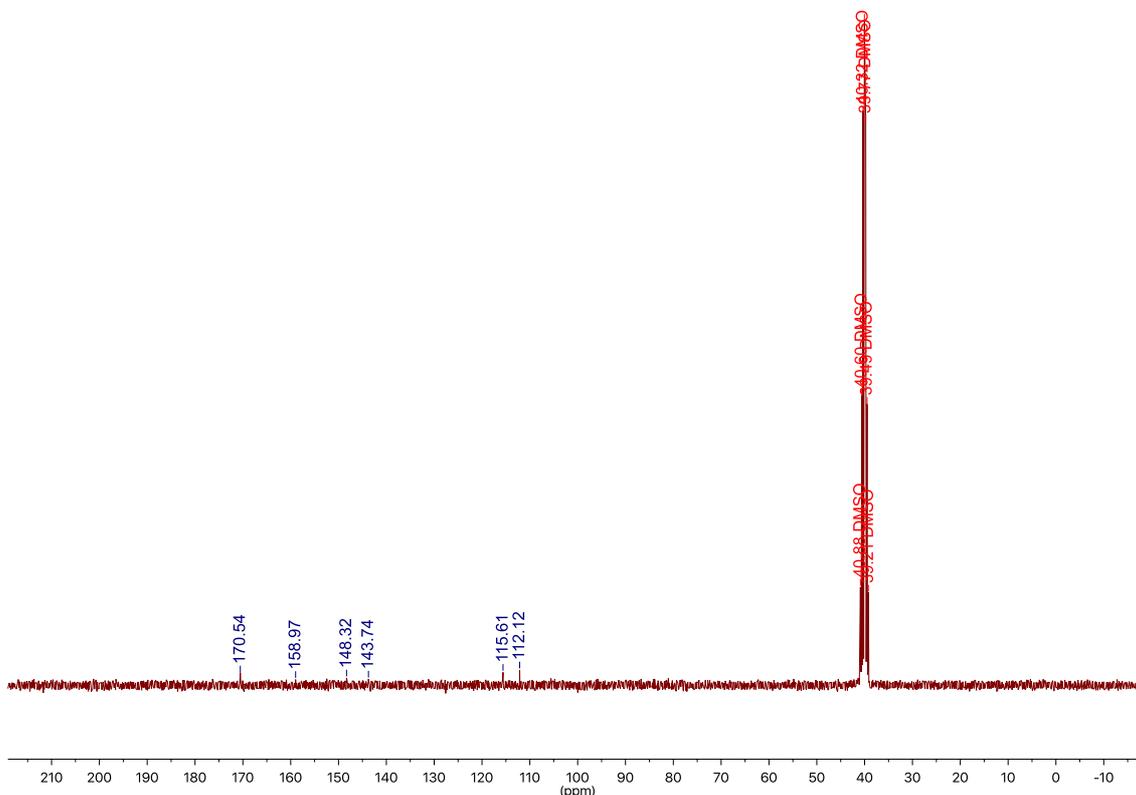
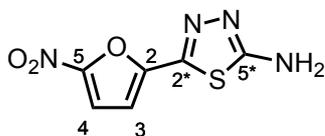


Figura 45: espectro de RMN¹³C do composto 9

Analisando-se o espectro, nota-se em 170,54 ppm, o pico referente ao C*5 do anel tiadiazólico. Como já explicado, esse carbono é muito desblindado, sofrendo influencia dos átomos eletronegativos. Já em 158,97 ppm, observa-se o sinal referente ao outro carbono do anel tiadiazólico (C*2). É menos desblindado que o C*5, pois está ligado apenas a um nitrogênio, e não dois. Em 148,32 ppm, há o sinal do C2 do furano, seguido do C5, em 143,74 ppm. O carbono mais blindado é o 4, pelo mesmo motivo de seu hidrogênio: está em posição meta ao anel tiadiazólico. Seu sinal aparece em 112,12 ppm. Por fim, em 115,61 ppm há o sinal do C3.

A seguir, tem-se o RMN¹H do composto 11, que contém um tiofeno em sua estrutura (Figura 46).

RMN¹H (DMSO-d₆/300MHz) δ (ppm) = 7,11 (dd, 1H, H4, J₁=5,1 Hz, J₂= 3,7 Hz); 7,39 (sl,1H, NH₂); 7,40 (d, 1H, H3, J= 3,7 Hz); 7,61 (d, 1H, H5, J= 5,07 Hz).

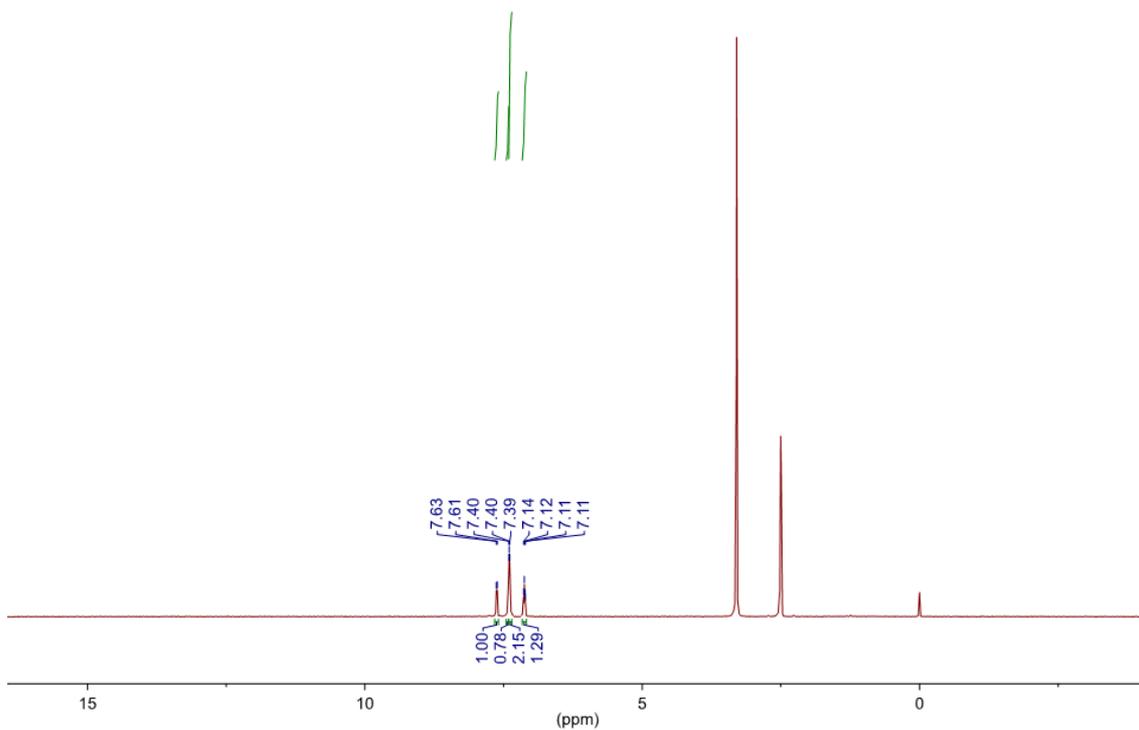
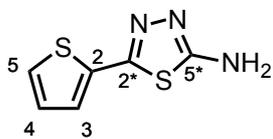


Figura 46: espectro de RMN¹H do composto 11.

O espectro do tiofeno é mais complicado de se analisar, pois não é muito bem definido devido a ser um espectro de segunda ordem. Sistemas desse tipo são caracterizados por uma pequena diferença no deslocamento químico dos hidrogênios, com isso os sinais podem se sobrepor, sendo mais difícil de identifica-los. Outro fator que interfere na intensidade dos sinais é a constante de acoplamento: se um hidrogênio apresenta um valor menor de J, há menos espaço entre os sinais, dificultando a identificação (ABRAHAM, BERSTEIN, 1959; SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005).

Em 7,11 ppm, nota-se o sinal do H4, o mais blindado (anel tiadiazólico doa elétrons). Este hidrogênio apresentou sinal de duplo dubleto, o que indica que ele acoplou com o H5 e H3. Como o H4 acoplou com dois hidrogênios não equivalentes, possui duas constantes de acoplamento: $J_1= 5,1$ Hz e $J_2=3,7$ Hz. A constante no valor de 3,7 Hz condiz com o acoplamento entre o H3 e H4. No tiofeno, ao contrário do furano, esses hidrogênios estão mais longe na molécula, com isso eles acoplam mais fracamente, o que faz com que o J seja menor. O acoplamento entre H4 e H5 tem J no valor de 5,1 Hz, pois neste heterocíclico, devido a influencia do tamanho do átomo de enxofre, os hidrogênios estão mais próximos, o que faz com que acoplem mais fortemente (JOULE, MILLS, 2010). O H4 apresentou integral no valor de 1,29, comprovando a presença de apenas 1 hidrogênio na área.

Em 7,39 ppm, há o singleto referente ao hidrogênio da amina, muito próximo ao dubleto do H3, em 7,40 ppm. Como já discutido, os sinais do espectro não são muito bem definidos, e um dos motivos para isso é a baixa diferença de deslocamento químico. Porém, observando-se os valores das integrais apresentadas, é possível diferenciar ambos os sinais e comprovar a presença dos grupos. O H3 apresentou integral no valor de 0,78, confirmando a presença de apenas 1 átomo, enquanto o grupo amino obteve 2,15, ratificando a presença de 2. Quanto a constante de acoplamento, H3 exibiu $J=3,7$ Hz, comprovando o acoplamento com H4.

Por fim, em 7,61 ppm observa-se o sinal do H5, que aparece como um dubleto, e é o mais desblindado devido a estar do lado do enxofre, que diminui sua densidade eletrônica. Possui $J=5,07$ Hz, o que reafirma o acoplamento com o H4, e integral no valor de 1,00, validando a presença de 1 hidrogênio.

Abaixo, há o RMN¹³C do composto 11 (Figura 47).

RMN¹³C (DMSO-d₆/75MHz) δ (ppm) = 127,46 (C4); 127,49 (C3); 127,89 (C5); 133,24 (C2); 154,82 (C*2); 168,03 (C*5).

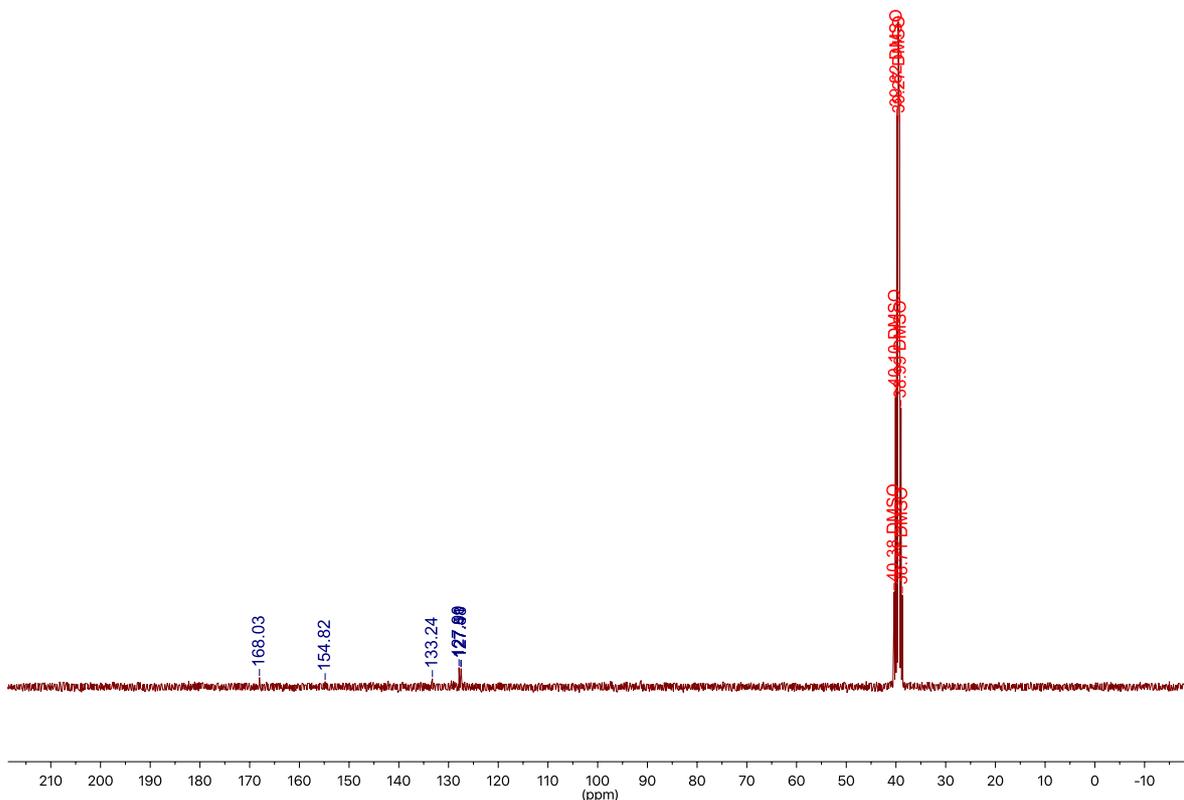
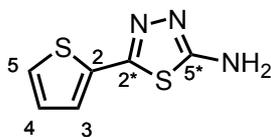


Figura 47: espectro de RMN¹³C do composto 11.

Em 168,03 ppm, há o sinal correspondente ao C*5, o mais desblindado, e em 154,82 ppm, tem-se o segundo mais desblindado, que equivale ao C*2. Em 133,24 ppm, aparece o sinal do C2, que é desblindado pelo anel tiadiazólico. O C3, C4 e C5 possuem deslocamentos bem próximos, sendo o 4 o mais blindado em 127,46 ppm. Os sinais em 127,89 ppm e 127,49 ppm correspondem ao C5 e C3, respectivamente.

Por fim, há o RMN¹H do megazol, composto 4, que contém um nitroimidazol como heterocíclico (Figura 48).

RMN¹H (DMSO-d₆/300MHz) δ (ppm) = 4,32 (s, 3H, CH₃); 7,80 (sl, 2H, NH₂); 8,18 (s, 1H, H4).

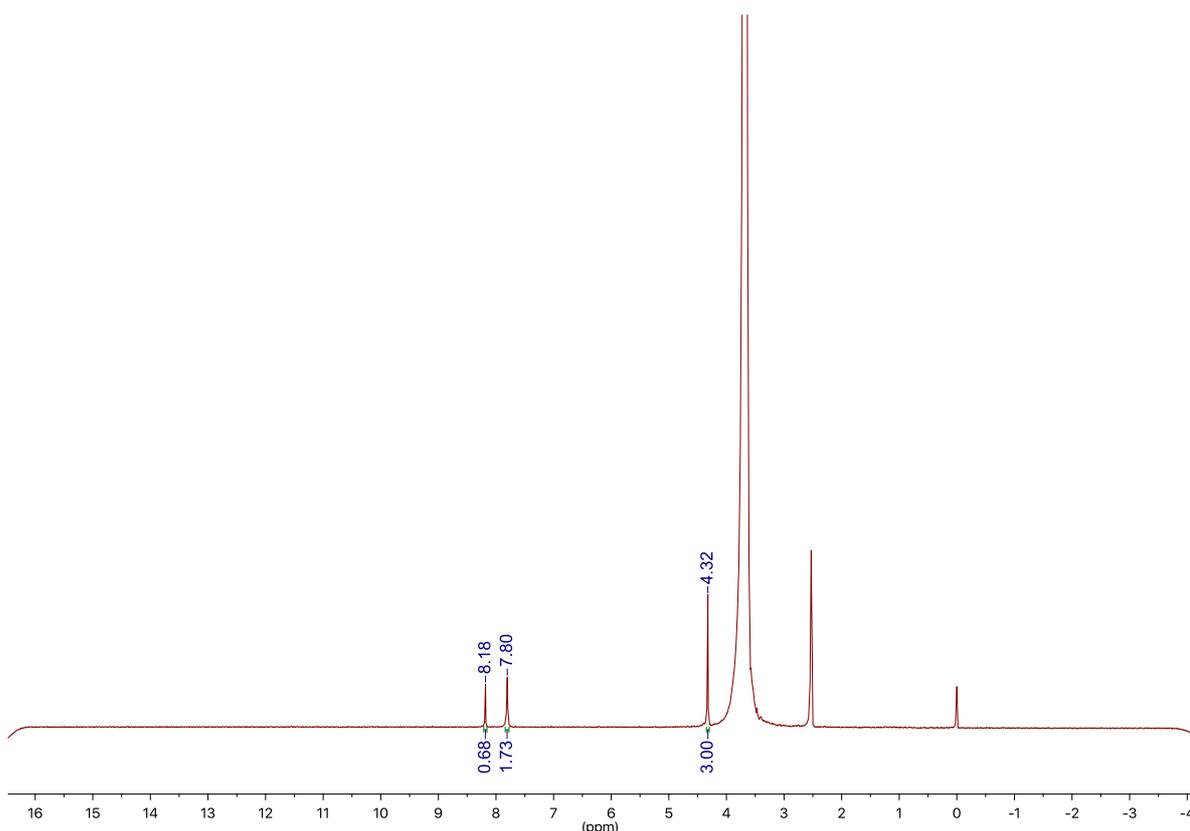
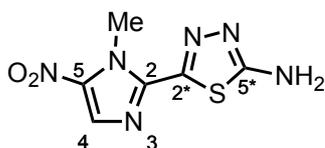


Figura 48: espectro de RMN¹H do composto 4.

O imidazol possui sistema de primeira ordem, portanto, a identificação de seus sinais é mais fácil. Este anel possui apenas um hidrogênio (H4), sendo ele o mais desblindado, com sinal em 8,18 ppm. A ressonância do imidazol e a ligação a um átomo eletronegativo contribuem para diminuir a densidade eletrônica deste hidrogênio, desblindando-o.

Em 7,80 ppm, tem-se o sinal do hidrogênio da amina. Ele aparece como um singlete largo.

Por fim, o hidrogênio mais blindado é o do grupo metil, com o sinal em 4,32 ppm. Este hidrogênio está ligado em um carbono sp³, e a diferença de eletronegatividade no sistema é baixa. Por conta disso, é o menos deslocado.

Abaixo, tem-se o espectro de RMN¹³C do composto 4 (Figura 49)

RMN¹³C (DMSO-d₆/75MHz) δ (ppm) = 35,02 (N-CH₃); 133,11 (C₄); 140,20 (C₅); 141,47 (C₂); 148,28 (C*₂); 170,01 (C*₅).

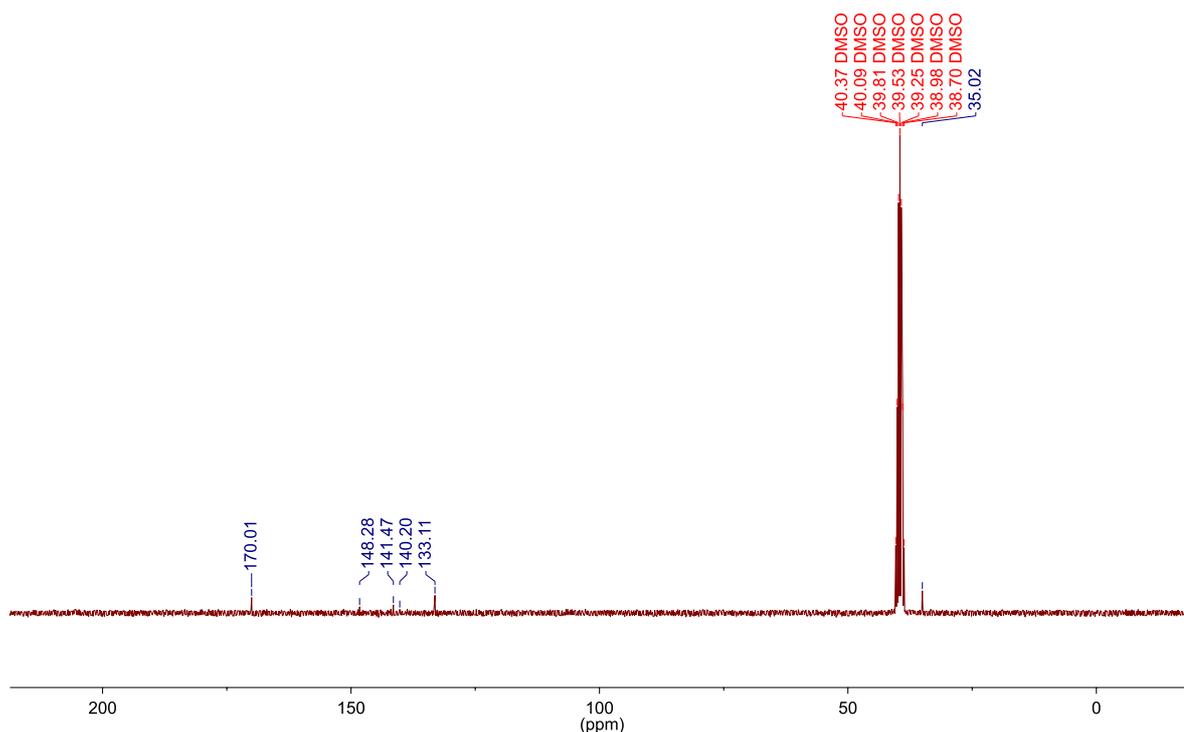
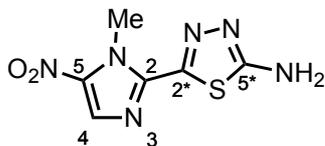
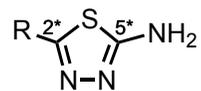


Figura 49: espectro de RMN¹³C do composto 4.

Em 170,01 ppm e 148,28 ppm, podem-se ver os sinais do C*₅ e C*₂, os mais desblindados da molécula, respectivamente. O sinal do C₂ aparece em 141,47 ppm, seguido do C₅ e C₄, que apresentaram deslocamentos em 140,20 ppm e 133,10 ppm. Por fim, o mais blindado é o carbono do grupo metil (CH₃), com sinal em 35,02 ppm, pois sofre poucas influências de grupos eletronegativos, além de ser um carbono sp³.

Quadro 3: valores dos deslocamentos químicos dos derivados com diferentes heterocíclicos



Composto (R)	Deslocamentos químicos (δ) do hidrogênio (ppm)					δ do carbono (ppm)						
	N-CH ₃	NH ₂	H3	H4	H5	C2	C3	C4	C5	N-CH ₃	C*2	C*5
2- 	3,96 (s)	7,72 (sl)	-	6,0 (s)	7,3 (s)	137,7	-	124,7	128,4	34,7	149,8	161
4- 	4,32 (s)	7,80 (sl)	-	8,18 (s)	-	141,47	-	133,11	140,2	35,02	148,2	170
9- 	-	7,87 (sl)	7,84 (d)	7,32 (d)	-	148,32	115,10	112,12	143,74	-	158,9	170
11- 	-	7,43 (sl)	7,41 (d)	7,13 (dd)	7,62 (d)	133,25	127,49	127,46	127,90	-	150,61	168
13- 	-	7,77 (sl)	7,63 (d)	7,24 (d)	-	147,17	130,66	129,50	145,88	-	153,2	170,

4.6.2- Identificação por RMN¹H e RMN¹³C dos derivados contendo tiossemicarbazonas

Os valores dos deslocamentos químicos dos derivados contendo tiossemicarbazonas podem ser vistos no Quadro 4. Analisando-se apenas essa estrutura, comum a todos esses compostos, deve-se observar no espectro os sinais referentes ao hidrogênio da amina primária (NH₂), da hidrazona (NH) e do carbono imínico (CH).

Os hidrogênios da hidrazona (NH) são os mais desblindados, apresentando sinais nas frequências de 10,39 á 11,88 ppm. Este hidrogênio é muito ácido, sendo assim, muito deslocado.

Já os hidrogênios imínicos aparecem de 8,04 a 8,56 ppm, e são desblindados pelo carbono sp² e pelo nitrogênio.

Por fim, tem-se os hidrogênios ligados a amina, com os sinais aparecendo de 7,75 a 8,07 ppm.

Em relação ao espectro de carbono, há o carbono imínico e o tiocarbonílico. O carbono tiocarbonílico é bastante desblindado devido a influencia da ligação dupla com o enxofre, fazendo com que os compostos apresentem deslocamentos de 178,1 ppm à 179,4 ppm.

Já o carbono imínico é menos desblindado, com os sinais aparecendo na frequência de 128,5 a 133,3 ppm.

Abaixo, observa-se o espectro de RMN¹H do composto 8, em que a tiossemicarbazona está ligada ao nitro-furano (2-formil-5-nitrofurano-tiossemicarbazona) (Figura 50).

RMN¹H (DMSO-d₆/300MHz) δ (ppm) = 7,43 (d, 1H, H3, J=4,0 Hz); 7,84 (d, 1H, H4, J= 4,0 Hz); 8,04 (s, 1H, NH₂); 8,07 (s, 1H, NH₂), 8,56 (s, 1H, C=N); 11,88 (s, 1H, NH).

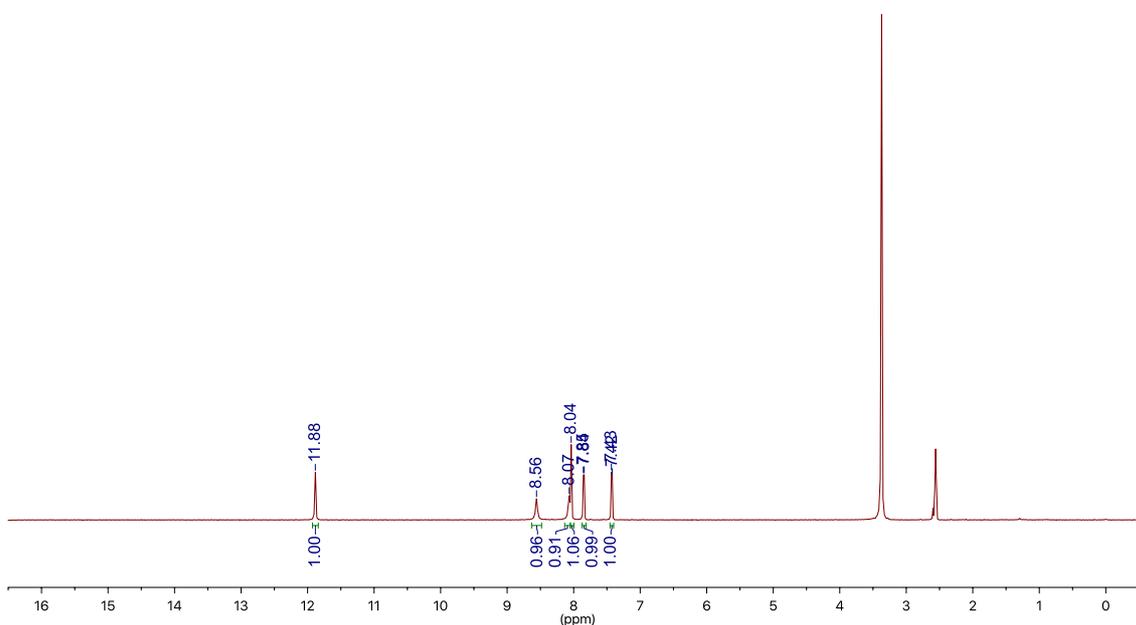
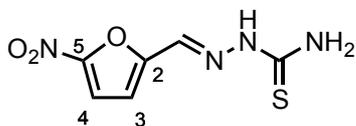


Figura 50: espectro de RMN¹H do composto 8.

Em 7,43 ppm, pode-se ver o duplete correspondente ao H3. Diferentemente do que ocorre com a primeira classe de compostos, esse hidrogênio é o mais blindado, pois o grupo nitro tem maior capacidade de doar elétrons para a posição meta do anel do que a tiossemicarbazona, visto que é o maior retirador de elétrons. Este hidrogênio apresentou J=4,0 Hz e integral no valor de 1,00, confirmando apenas um átomo na área. Em 7,84 ppm, é visível o duplete do H4, segundo mais blindado da molécula. Este hidrogênio também apresentou J=4,0 Hz, o que comprova o acoplamento com H3.

Em 8,56 ppm, observa-se o singlete correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono imínico. Esse carbono é sp², então contribui para a desblindagem deste proton. A integral apresentada foi no valor de 0,96, concluindo-se que há apenas um hidrogênio no local.

Os dois hidrogênios ligados ao grupo amina apresentam dois sinais, na

forma de singlete, em 8,04 ppm e 8,07 ppm. As integrais apresentadas foram no valor de 1,06 e 0,91, ratificando-se a presença destes prótons.

Por fim, em 11,88 ppm, tem-se o singlete correspondente a hidrazona. Este hidrogênio é o mais ácido, por conta disso, é muito desblindado. Obteve-se também integral no valor de 1,00. A presença deste sinal confirma que o produto foi, de fato, sintetizado.

Abaixo, tem-se o espectro de RMN¹³C do composto 8 (Figura 51).

RMN¹³C (DMSO-d₆/75MHz) δ (ppm) = 113,18 (C3); 115,07 (C4); 129,77 (CH=N); 151,52 (C2); 152,56 (C5); 178,42 (C=S).

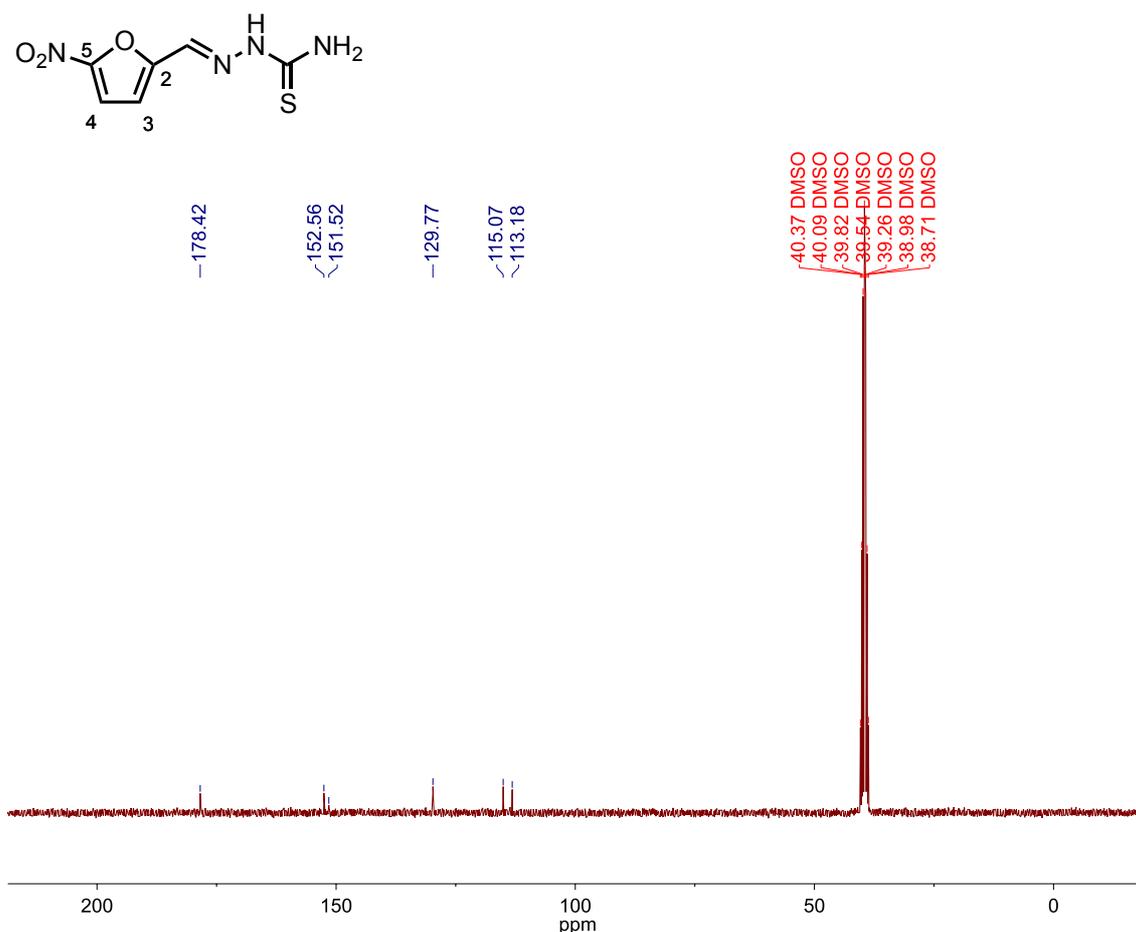
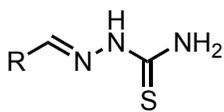
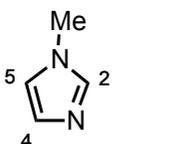
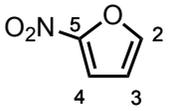
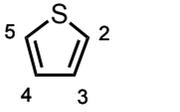
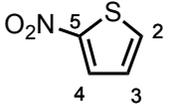


Figura 51: espectro de RMN¹³C do composto 8

Em 178,42 ppm, pode-se ver o sinal do carbono tiocarbonílico, o mais desblindado. Em seguida, tem-se o sinal do C5 e C2, em 152,56 ppm e 151,52 ppm, respectivamente. Ambos são desblindados pelo oxigênio e há o efeito de ressonância do anel furânico, que influencia na desblindagem. Em 129,77 ppm, há o sinal do carbono imínico, que é sp². Por fim, em 113,18 ppm e 115,05 ppm obtém-se o sinal do C3 e C4, os mais blindados da molécula. Assim como no espectro de hidrogênio, o C3 é mais blindado que o C4, já que o grupo nitro é maior retirador de elétrons que a tiossemicarbazona.

Quadro 4: valores dos deslocamentos químicos dos derivados contendo tiossemicarbazona.

														
Composto (R)	Deslocamentos químicos (δ) do hidrogênio (ppm)							δ do carbono (ppm)						
	N-CH ₃	HC=N	NH	NH ₂	H3	H4	H5	C2	C3	C4	C5	N-CH ₃	C=N	C=S
1- 	4,15 (s)	8,11 (s)	11,8 (s)	7,75 (s) 7,85 (s)	-	7,1 (d)	7,41 (d)	141,7	-	124,8	131,4	35,07	133,3	178,40
8- 	-	8,56 (s)	11,88 (s)	8,04 (s) 8,07 (s)	7,43 (d)	7,84 (d)	-	151,5	113,1	115,1	152,56	-	129,77	178,42
10- 	-	8,36 (s)	11,44 (s)	7,72 (s) 7,82 (s)	7,43 (d)	7,12 (dd)	7,53 (d)	139,1	129,6	127,8	137,6	-	130,5	179,40
12- 	-	8,04 (s)	11,40 (s)	8,04 (s) 8,16 (s)	7,5 (d)	8,00 (d)	-	146,6	129,0	130,2	150,6	-	133,2	178,10

4.6.3- Identificação por RMN¹H e RMN¹³C dos derivados contendo amidas

Foram sintetizados quatro derivados amídicos a partir da amina ligada ao anel tiadiazólico. Os valores de seus deslocamentos químicos podem ser observados no Quadro 5.

Em relação ao RMN¹H, devem-se observar os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia carbônica da amida. Esses hidrogênios são pouco desblindados, devido à baixa diferença de eletronegatividade entre eles e os carbonos.

Por fim, os hidrogênios de amidas, assim como os de aminas, também têm a capacidade de realizar ligações de hidrogênio intermolecular com o DMSO-d₆, porém sua taxa de troca é mais baixa. Mesmo assim, o sinal emitido pode ser um singleto largo, devido ao momento quadrupolo do nitrogênio (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005). Este pico, entretanto, às vezes pode desaparecer da linha de base.

Quanto ao RMN¹³C, devem-se observar os sinais referentes à cadeia carbônica, que são os mais blindados, e o sinal do carbono carbonílico, o mais desblindado.

Abaixo, pode-se observar o espectro de RMN¹H do composto 3 (Figura 52).

RMN¹H (DMSO-d₆/300MHz) δ (ppm) = 2,25 (s, 3H, H₄, CH₃); 4,40 (s, 3H, N-CH₃); 8,27 (s, 1H, H₄).

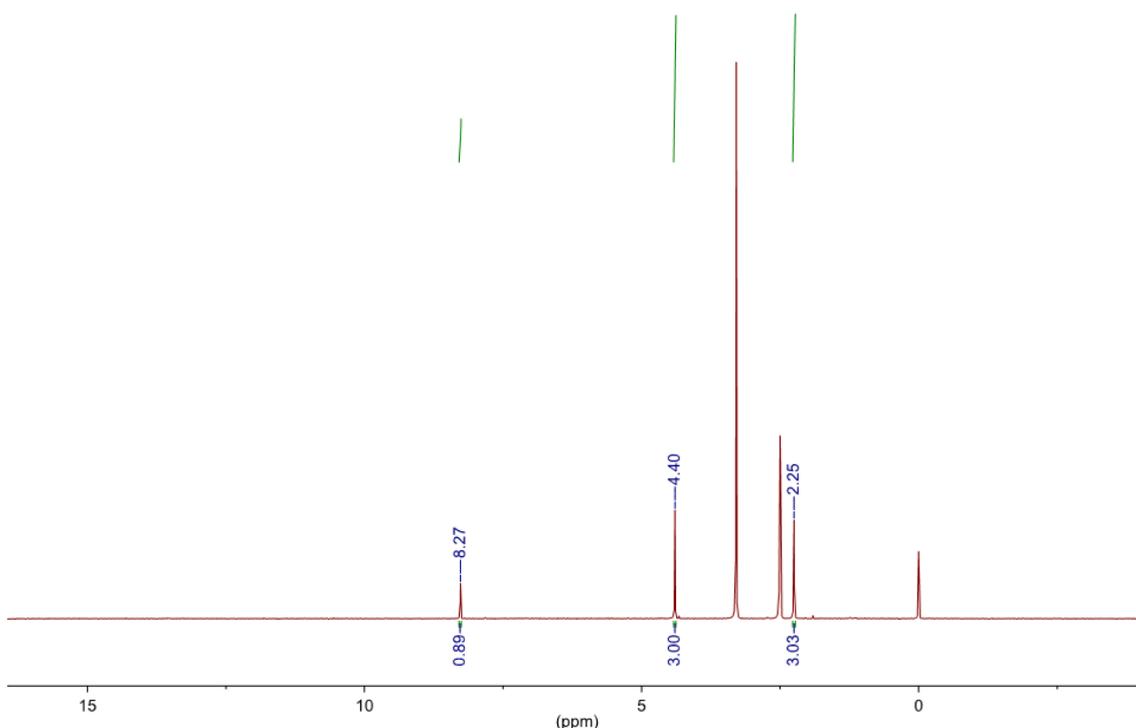
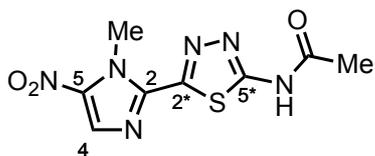


Figura 52: espectro de RMN¹H do composto 3.

Em 2,25 ppm, há o sinal correspondente ao hidrogênio do grupo metil da cadeia alquílica. Este apresentou integral no valor de 3,03, confirmando a presença de 3 hidrogênios na área, comprovando a síntese desta amida. Este átomo é o mais blindado devido à baixa diferença de eletronegatividade do sistema.

Já em 4,40 ppm, pode-se observar o sinal dos hidrogênios do grupo metil ligado ao nitrogênio do imidazol. Este grupo está ligado a um heteroátomo, estão é um pouco mais desblindado. Observa-se a integral no valor de 3, o que ratifica a presença de 3 átomos de hidrogênio.

Por fim, em 8,27 ppm, há o sinal pertencente ao H₄ do anel imidazólico, o mais desblindado.

Por fim, abaixo, há o espectro de RMN¹³C do composto 3 (Figura 53).

RMN¹³C (DMSO-d6/75MHz) δ (ppm) = 22,37 (C-CH₃); 35,24 (N-CH₃); 133,10 (C4); 140,67 (C5); 141,86 (C2); 159,77 (C*2), 170,40 (C*5); 176,90 (C=O).

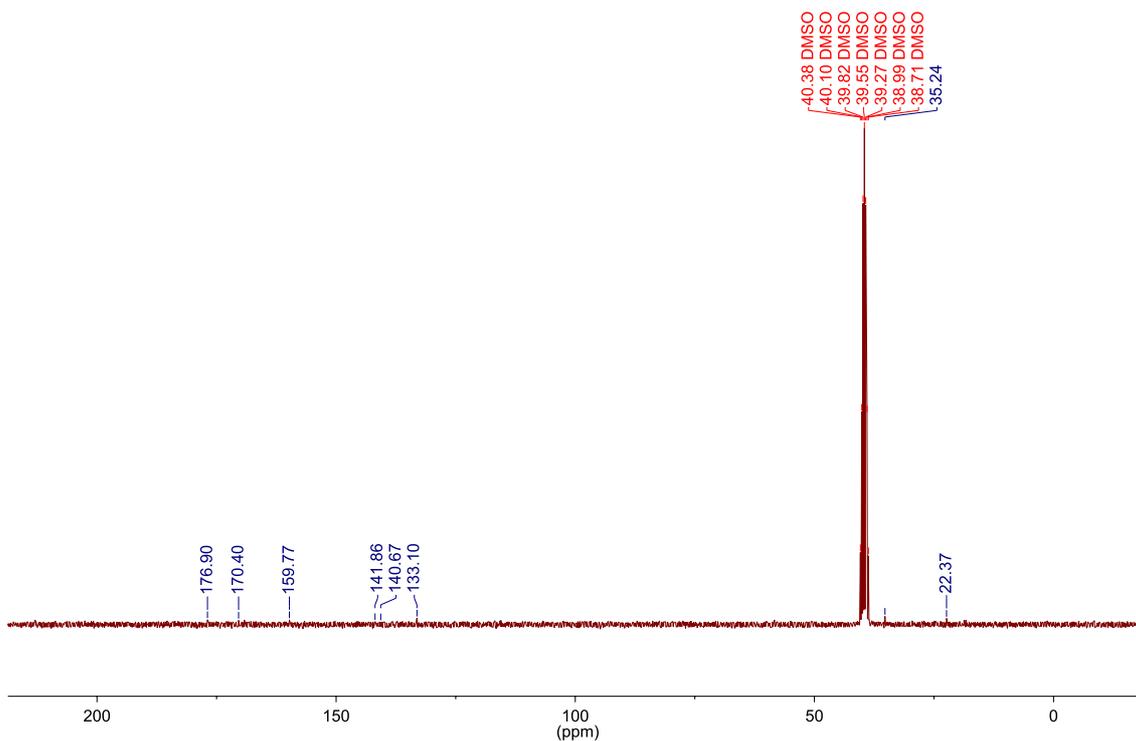
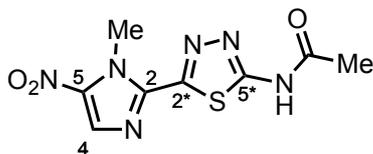
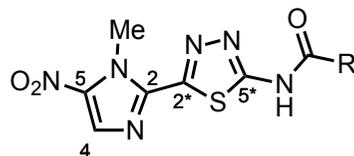


Figura 53: espectro de RMN¹³C do composto 3.

Em 22,37 ppm pode-se ver o sinal do grupo metil ligado ao carbono carbonílico. Este é o carbono mais blindado devido a não sofrer influencia de grupos eletronegativos, e a sua presença confirma a síntese desta amida. Em 35,24 ppm há o sinal correspondente ao grupo metil ligado ao nitrogênio imidazólico, o segundo mais blindado. O sinal do C5 aparece em 140,67 ppm, seguido do C2, em 141,86 ppm. Por fim, obtém-se os três carbonos mais desblindados, em 159,77 ppm, 170,40 ppm e 176,90, que equivalem ao C*2, C*5 e à carbonila, respectivamente.

Quadro 5: valores dos deslocamentos químicos dos derivados contendo amidas.



Composto (R)	Deslocamentos químicos (δ) do hidrogênio (ppm)					δ do carbono (ppm)								
	N-CH ₃	NH	(CH ₂) _n	CH ₃	H ₄	C ₂	C ₄	C ₅	N-CH ₃	C* ₂	C* ₅	C=O	(CH ₂) _n	C
3- CH ₃	4,40 (s)	-	-	2,25 (s)	8,27 (s)	141,86	133,1	140,6	35,24	159,7	170,4	176,9	-	22
5- CH ₂ CH ₃	4,32 (s)	-	2,50 (q)	1,11 (t)	8,27 (s)	153,8	133,1	141,2	35,02	158,3	170,1	177,1	27,35	19
6- (CH ₂) ₇ CH ₃	4,41 (s)	-	1,26 (m)	0,88 (s)	8,27 (s)	151,33	133,16	141,8	35,27	159,9	172,2	176,7	23,8-34,7	13
7- (CH ₂) ₁₂ CH ₃	4,38 (s)	-	1,25 (m)	0,84 (s)	8,24 (s)	151,2	132,96	140,6	35,11	154,0	172,9	178,0	21,9-34,8	13

4.7- Ensaios biológicos

Após a síntese dos compostos no Laboratório de Síntese e Otimização de Fármacos, os de maior interesse foram selecionados para os testes biológicos.

Outro composto que estava armazenado no Laboratório de Síntese foi selecionado para o teste. A substância foi o 1-metil-2-imidazolil-5-nitro-tiossemicarbazona (Figura 54). Optou-se por essa molécula para poder se estabelecer uma comparação direta com o megazol, devido a ela ser a tiossemicarbazona análoga a ele.

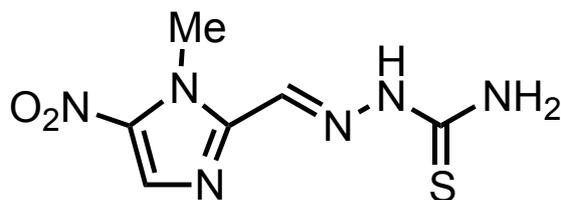


Figura 54: estrutura do composto 14.

Antes de testados frente aos parasitas, foi calculado o cLogP dos compostos, através do programa Marvin Sketch (Quadro 6).

Quadro 6: valores de clogP dos compostos selecionados.

Composto	cLogP
1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-imidazol - 2	0,11
1-metil-2-(5-acetamida-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol - 3	0,21
Megazol - 4	0,14
1-metil-2-(5-propionamida-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol - 5	0,91
1-metil-2-(5-nonilamida-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol - 6	3,57
1-metil-2-(5-miristamido-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol- 7	5,80
2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitrofurano - 9	0,72
2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-tiofeno - 11	1,41
2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitrotiofeno- 13	1,51

4.7.1- Ensaios frente ao *Trypanosoma cruzi*

Os ensaios frente ao *Trypanosoma cruzi* foram realizados com a colaboração do prof.Dr.Ariel Mariano Silba e da Dra.Flávia Damasceno.

Para os ensaios, utilizou-se a forma epimastigota do parasita, com o intuito de se obter dados para estudos de relação estrutura atividade (REA) neste tipo morfológico.

Inicialmente, realizou-se o ensaio de proliferação celular. Este ensaio é amplamente utilizado para avaliar a atividade antichagásica de compostos. As substâncias que apresentaram os melhores resultados passaram por novos testes, em que tiveram seu IC₅₀ avaliado.

4.7.1.1- Ensaio de proliferação celular

Os parasitas foram colocados em placas de cultura, adicionando-se também os compostos na concentração de 5 µM. Em seguida, mediu-se a absorbância dos poços durante 8 dias. Os valores obtidos foram convertidos em número de parasitas/ml (DAMASCENO *et al.*, 2014). Os compostos foram divididos, de forma aleatória, em dois grupos para os testes, sendo testados em dias diferentes, e em réplicas. Os resultados foram plotados em um só gráfico (Figura 55).

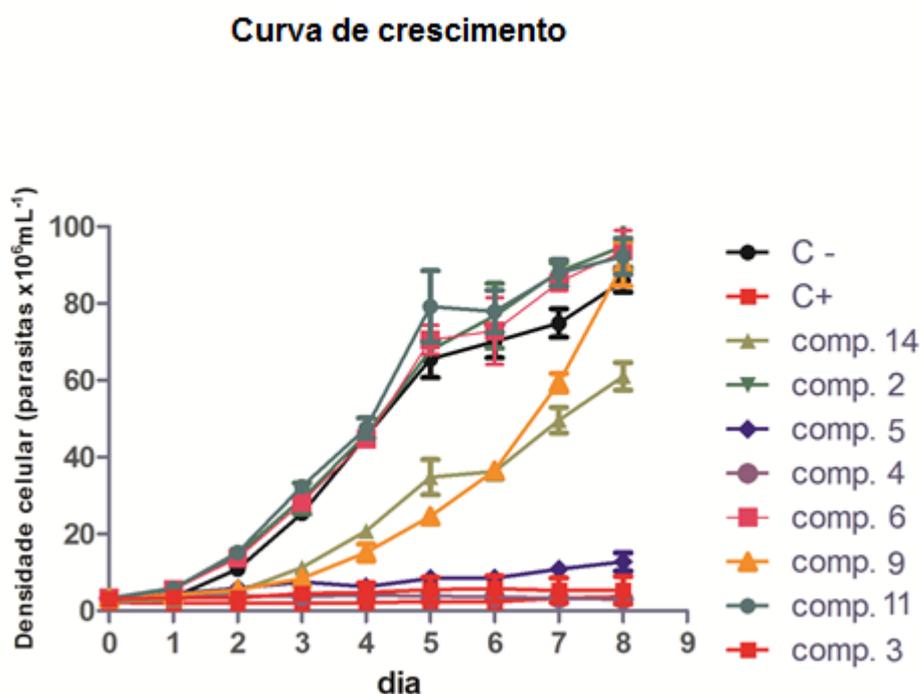


Figura 55: curva de crescimento dos parasitas na presença dos compostos.

A curva de crescimento do *Trypanosoma cruzi* é do tipo sigmoide. Os parasitas começam a multiplicação lentamente, e atingem a fase exponencial no quinto dia (DAMASCENO *et al.*, 2014).

Analisando-se a curva, pode-se observar que os compostos 2 e 11 não conseguiram conter a proliferação celular dos parasitas, nem na fase de crescimento estacionário, obtendo os mesmos resultados que o controle negativo. Isso confirma uma atividade muito ruim. Este resultado, de certa forma, já era esperado, pois nenhum dos dois compostos testados possui o grupo nitro em sua estrutura. Como já mencionado, este grupamento sofre redução, gerando intermediários e ERO's que irão atacar as macromoléculas do parasita, provocando sua morte (VIODÉ *et al.*, 1999). Em vista disso, juntamente com os dados obtidos, a retirada do grupo nitro da estrutura implica em total perda da atividade biológica, confirmando que ele pertence ao grupo farmacofórico.

Em relação ao composto 9, é sabido que os 5-nitrofuranos possuem ampla atividade antiparasitária, como pode ser visto no nifurtimox e na nitrofurazona, além de outros compostos que não são usados na terapêutica (CAPOBIANCO-PEREZ, CORDERO DE TROCONIS, 2001; PITTA *et al.*, 2013). Entretanto, avaliando-se a curva de crescimento, nota-se que esta atividade não foi vista neste derivado. Inicialmente, o composto 9 até apresentou atividade antichagásica interessante, devido ao *Trypanosoma cruzi* ainda estar na fase estacionária. Porém, após o quinto dia, quando o protozoário atingiu a fase exponencial, viu-se que houve grande aumento da proliferação celular dos parasitas. Este composto apresentou cLogP 0,72, sendo mais lipofílico que o megazol, portanto a falta de atividade não está relacionada a falta de absorção pela célula do parasita. Portanto, neste caso, a troca do imidazol pelo furano piorou a interação com o alvo, não contribuindo para a atividade antichagásica.

O composto 14 é o único que contém uma tiossemicarbazona em sua estrutura, portanto, atua como um possível inibidor da enzima cruzaina do parasita, causando grandes danos ao protozoário. O mecanismo de inibição, como já provado por estudos de modelagem molecular, ocorre por meio do ataque nucleofílico da Cys-25 presente na cruzaina, ao carbono tiocarbonílico da tiossemicarbazona. Em seguida, a His-159 da enzima, doa um próton ao enxofre ligado ao carbono, formando um intermediário tetraédrico. Há grupos orgânicos que podem ser inseridos como substituinte, podendo otimizar a atividade do composto sintetizado (TROSSINI, 2008).

Entretanto, ao testá-lo, viu-se que ele só apresentou atividade interessante até a fase estacionária do *Trypanosoma cruzi*. Após o quinto dia,

quando o protozoário atingiu a fase exponencial, o composto não conseguiu conter seu crescimento, não apresentando a atividade esperada.

Apesar do grupamento imidazol, presente no composto 14, ser um grupo aromático, estudos mostram que os melhores substituintes são o grupo aril (anéis benzênicos), pois realizam uma ligação covalente com o subsítio s2 da cruzaina, favorecendo mais a atividade antichagásica (GREENBAUM *et al.*, 2004; ESPÍNDOLA *et al.*, 2015). Como o composto 14 não possui este ponto de interação, não consegue se ligar ao subsítio s2, não favorecendo tanto a atividade. Além disso, o estudo mostrou que outro ponto de interação com a enzima são grupos alquílicos ligados ao carbono imínico (GREENBAUM *et al.*, 2004; BLAU *et al.*, 2013). O composto 14 não apresenta nenhum grupo ligado a tal carbono, o que pode reduzir mais ainda a ação frente ao *Trypanosoma cruzi*.

As amidas foram sintetizadas com o objetivo de se aumentar a biodisponibilidade, por meio da técnica da latenciação. Este processo é muito empregado no ramo da química medicinal, para a obtenção de pró-fármacos. Esses compostos são inativos, devendo sofrer biotransformação química ou enzimática, próximo ao local de ação para liberar o fármaco ativo (PARISE FILHO *et al.*, 2010). Aumentando-se a biodisponibilidade a partir de pró-fármacos de megazol, a dose a ser administrada aos pacientes é menor, devido a maior absorção, o que torna os compostos menos tóxicos.

Dentre as amidas sintetizadas, o composto 7 não foi testado. Isso porque o seu clogP obtido foi de 5,80. Como já visto, esse valor não é adequado dentro dos parâmetros químico-farmacêuticos, pois haveria grande chance de o composto não ser dissolvido nos fluidos biológicos do parasita, ou então ficar preso em suas membranas, não conseguindo então, ser absorvido. Dessa forma, só os compostos 3, 5 e 6 foram testados, por possuírem valores dentro dos parâmetros. Porém, do ponto de vista sintético, foi interessante sintetizá-lo para observar as diferenças que ocorreram na síntese de cada amida, principalmente com relação ao tempo, como já discutido anteriormente.

O composto 6 obteve cLogP no valor de 3,57, o que indica que foi absorvido. Entretanto, ao observar-se a curva de crescimento, nota-se que a atividade do composto não foi boa, pois o mesmo não conseguiu conter a proliferação dos parasitas. Este resultado pode indicar que as peptidades não conseguiram hidrolisar a ligação amídica (ligação labil), não conseguindo, portanto, liberar o megazol (composto ativo) no tempo analisado. O tamanho da cadeia carbônica (relativamente longa, contendo 9 carbonos) pode ter dificultado o processo de hidrólise por parte dessas enzimas. Porém, mais estudos devem ser realizados para se confirmar esta hipótese.

Os compostos 3 e 5, como pode-se observar, foram os que apresentaram as melhores atividades, portanto, passaram pelo ensaio de concentração inibitória 50% (IC₅₀).

4.7.1.2- Ensaio de concentração inibitória 50% (IC₅₀)

Os compostos 3 e 5 foram selecionados para o ensaio de IC₅₀, após apresentarem atividade antichagásica interessante (Figura 56 e Figura 57). O megalzol, como era de se esperar, também obteve ação excelente frente ao *Trypanosoma cruzi*, e também teve seu IC₅₀ calculado para comparação (Figura 58). O ensaio é feito utilizando-se seis concentrações conhecidas dos compostos, de modo que cada uma vai inibir uma determinada quantidade de protozoário. Então, o programa ajusta os dados, obtendo-se o valor de IC₅₀ (MAGDALENO *et al.*, 2009; DAMASCENO *et al.*, 2014). Este parâmetro é calculado no quinto dia, devido aos protozoários entrarem em fase exponencial.

Inicialmente, os testes seriam feitos na concentração mínima de 0,5 µM, e máxima de 5 µM. Porém, quando se testou o megalzol e o composto 3, o valor mínimo já mostrou inibição maior que 50%, tendo que ser reduzido. Para esses compostos então, utilizou-se a concentração mínima de 0,05 µM, e máxima de 1 µM.

A curva obtida é uma sigmoide com seis pontos, cada um referente às concentrações utilizadas no experimento (o valor está em log) e a porcentagem de inibição. Como já mencionado, o experimento foi feito em duplicata, mas apenas uma das réplicas será discutida.

Quadro 7: Valores da concentração do composto 3

Concentração	
(µm)	Log (µm)
0,05	-1,3
0,1	-1,0
0,2	-0,69
0,3	-0,52
0,5	-0,3
1,0	0,0

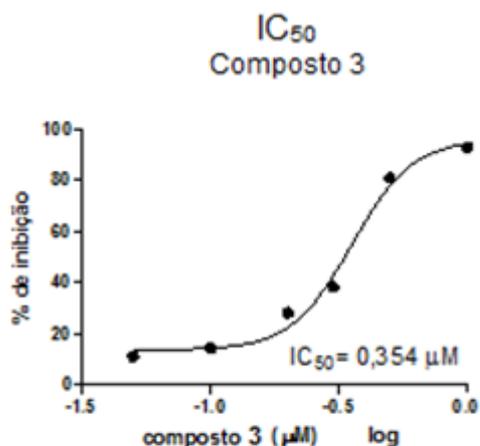


Figura 56: Curva de inibição dos parasitas do composto 3, em diferentes concentrações (réplica 2).

Quadro 8: Valores da concentração do composto 5

Concentração	
(μm)	Log (μm)
0,05	-1,3
0,1	-1,0
0,2	-0,69
0,3	-0,52
0,5	-0,3
1,0	0,0

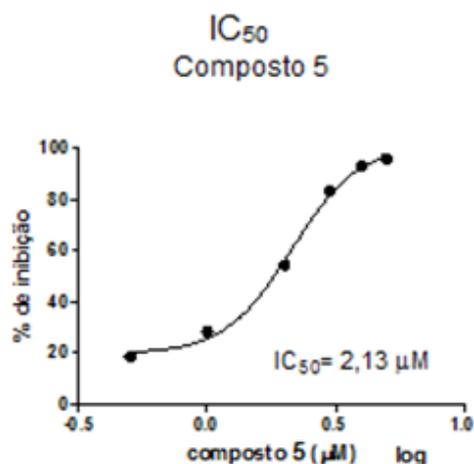


Figura 57: Curva de inibição dos parasitas do composto 5, em diferentes concentrações (réplica 2).

Quadro 9: Valores da concentração do composto 4

Concentração	
(μm)	Log (μm)
0,5	-0,3
1	-0,0
2	-0,3
3	-0,47
4	-0,6
5	0,69

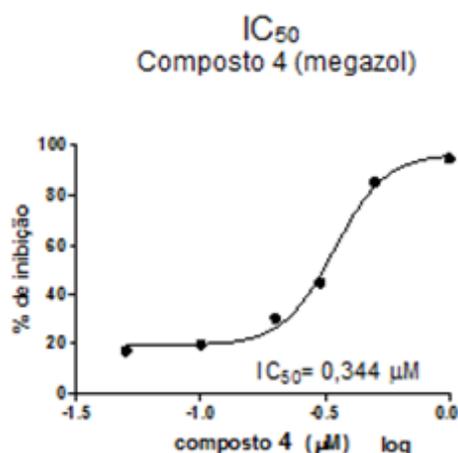


Figura 58: Curva de inibição dos parasitas do composto 4, em diferentes concentrações (réplica 2).

Analisando-se os resultados do composto 5, nota-se que as peptídeos conseguiram hidrolisar a ligação amida, liberando o megazol. Em seguida, ao avaliar juntamente seu cLogP e o IC₅₀, percebe-se que esta molécula apresentou coeficiente de partição no valor de 0,91, sendo, portanto, mais lipofílica que o a substancia ativa (cLogP=0,14). Desta forma, o derivado deveria ser melhor absorvido, ficando em maior concentração, possuindo então, melhor atividade biológica. Entretanto, ao observar o IC₅₀ de ambos os compostos, nota-se que o megazol apresentou um valor mais baixo (0,344 μM , enquanto que o composto 5 apresentou 2,13 μM), indicando uma melhor atividade antichagásica. Desta forma, a inserção do transportador propanoílico não contribuiu como o esperado para o aumento da biodisponibilidade do megazol, pois este apresentou melhor atividade que o derivado.

Sabe-se que a maior parte de megazol é internalizado para a célula por difusão passiva, portanto, o valor do cLogP tem grande influência. Porém outra parte se liga ao transportador p2-amino-purina, que também transporta melarsoprol, adeninas e adenosinas. O transportador se liga as quatro substâncias por meio da porção C=N-NH₂, portanto, o grupo amina deve estar livre (DE KONING E JARVIS, 1999; DIAS *et al.*, 2009). A inserção de transportadores por meio do processo de latenciação promove a conversão do grupo amina em amida, desta forma o transportador não consegue mais reconhecer os compostos. Isto pode ter atrapalhado a absorção por meio do transportador, embora este mecanismo não seja o principal.

Por fim, o composto 3 foi o que apresentou o melhor resultado da série, apresentando atividade levemente mais baixa que a do megazol (IC₅₀=0,354 µM, enquanto o composto ativo apresentou 0,344 µM). Este derivado apresentou o menor clogP dentre as amidas (0,21), com apenas dois carbonos na cadeia lateral, indicando que a inserção de um transportador muito lipofílico, como já mostrado, é irrelevante para se aumentar a absorção do megazol.

Apesar da inserção de transportadores lipofílicos não contribuírem fortemente para o aumento da biodisponibilidade, os compostos 3 e 5 mostraram-se derivados promissores, obtendo resultados expressivos frente ao *Trypanosoma cruzi*. Entretanto, estes testes devem ser complementados com ensaios frente às formas amastigotas do parasita, bem como ensaios “*in vivo*”.

4.7.2- Ensaios frente ao *Schistosoma mansoni*

Após os resultados obtidos frente ao *T.cruzi*, os compostos foram testados frente ao *Schistosoma mansoni*. Neste experimento, foram avaliados a motilidade dos parasitas, a taxa de mortalidade e o grau de acasalamento. Os ensaios foram realizados com a colaboração da M^a.Rafaela Freitas e da prof.Dra.Eliana Nakano.

4.7.2.1- Análise da motilidade e taxa de mortalidade e acasalamento

A motilidade dos parasitas foi monitorada em microscópio invertido e estereomicroscópio diariamente, por 96 horas. Os casais de parasitas foram adicionados em placas contendo 24 poços, que também continham meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/ml e anfotericina B 2 µg/ml. Praziquantel 3 µg/ml foi como controle positivo, e DMSO 1,5%, como controle negativo. Então, adicionou-se a solução teste contendo os compostos.

Ao final do teste, os parasitas poderiam permanecer acasalados ou separados, e ter sua motilidade avaliada como normal, “levemente reduzida”, “redução significativa” ou estarem mortos. Para facilitar a classificação final do composto, o Laboratório de Parasitologia e Malacologia adotou um sistema de

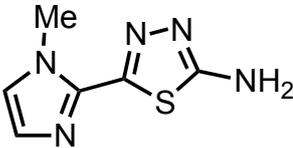
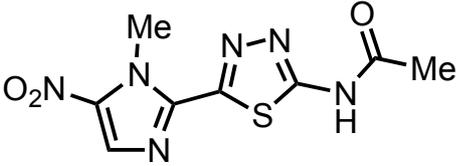
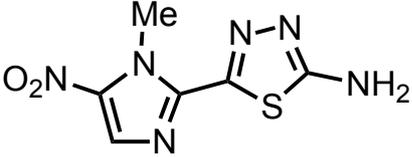
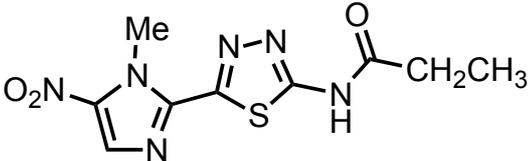
“Scores”, atribuindo uma pontuação ao composto de acordo com sua motilidade e acasalamento (Quadro 10).

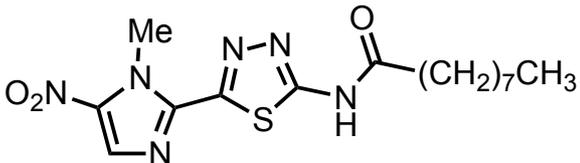
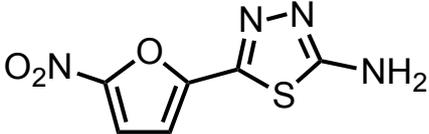
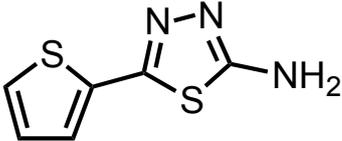
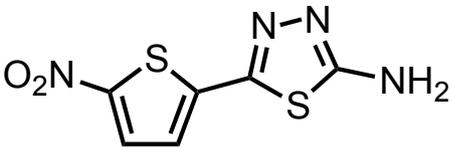
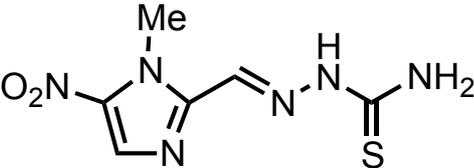
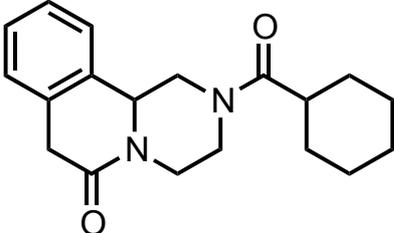
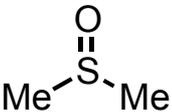
Quadro 10: pontuação atribuída ao composto, de acordo com a motilidade e acasalamento.

Pontos	Motilidade
0	Normal
1	Levemente
2	Redução sig.
3	Morto
Pontos	Acasalamento
0	Casal
1	Separado

Os compostos que obtiveram, na soma dos 5 casais, uma pontuação de 0-37, podem ser classificados como ruins; 38 à 80 classificam-se como regulares, e maior que 81, enquadram-se como bons. A classificação pode ser vista no Quadro 11.

Quadro 11: classificação dos compostos de acordo com os testes biológicos

Número	Composto	Pontos	Classificação
2		22	Ruim
3		28	Ruim
4		42	Regular
5		35	Ruim

6		36	Ruim
9		63	Regular
11		24	Ruim
13		30	Ruim
14		80	Regular
Praziquantel (Controle +)		120	Bom
DMSO (Controle -)		14	Ruim

A análise da motilidade do parasita foi realizada por meio da observação visual. Essa metodologia é eficiente, pois é rápida, de custo baixo, e direta. Os parasitas adultos, sobretudo os machos, realizam movimentos ondulatórios e rápidos, que vão de uma extremidade a outra, sendo muito fáceis de identificar. (DA SILVA, NOEL, 1995). Esse tipo de movimento permite o uso de um

método mais subjetivo, como é o caso, e que é normalmente empregado em testes “*in vitro*” (XIAO *et al.*, 2007).

Ao contrário do que ocorre com compostos antichagásicos, há menos relatos de nitro-compostos utilizados como esquistossomicidas. Porém, como já mencionado, algumas substâncias como o niridazol já foram introduzidas na terapêutica (LAMBERT, 1964). Para se avaliar a importância do grupo nitro frente ao *Schistosoma mansoni*, os compostos 2 e 11 foram testados. Ambos os compostos apresentaram os piores resultados, porém, sua retirada não implicou em uma grande queda de atividade, tendo em vista que nenhum dos compostos sintetizados foi classificado como bom. Portanto, diferentemente dos antichagásicos, o grupo nitro não é o principal responsável pela atividade esquistossomicida. Porém, ao mesmo tempo, ele não pode ser descartado do grupo farmacofórico.

O composto 14 foi o que obteve melhor resultado, sendo o único capaz de levar dois parasitas fêmeas a morte. Como já mencionado, esta molécula é a única dentre as sintetizadas que possui em sua estrutura uma tiossemicarbazona, e como já visto, este grupo é capaz de inibir a cisteíno-protease SmCB1, enzima responsável pela degradação de IgG, hemoglobina e outras proteínas do hospedeiro, sendo essencial para a sobrevivência do *Schistosoma mansoni* (FONSECA *et al.*, 2015). Seguindo essas informações, possivelmente o composto também causou a inibição da SmCB1, o que torna o parasita mais susceptível ao sistema imune do hospedeiro.

É sabido que a atividade da SmCB1 no *Schistosoma mansoni* macho é de 50 a 100% menor que nas fêmeas (DALTON *et al.*, 1996). Portanto, sua inibição vai afetar mais estas últimas, o que pode ser comprovado nos resultados, tendo em vista que o composto causou a morte apenas de fêmeas e nenhum macho. Além disso, a atividade esquistossomicida em geral foi mais expressiva frente aos helmintos deste gênero.

Substituintes aromáticos ligados à tiossemicarbazona mostraram-se importantes para a ação frente ao *Schistosoma mansoni*. Até o momento, não é sabido que anéis benzênicos sejam mais importantes para a atividade do que qualquer outro grupo aromático, diferentemente do que ocorre no *Trypanosoma cruzi* (FONSECA *et al.*, 2015). Isso indica que as enzimas cruzaina e catepsina B1 tem um modo de ação um pouco diferente, apesar de serem cisteíno-proteases. O composto apresentou atividade regular, atingindo 80 pontos, mostrando que o imidazol não é o melhor dos grupos aromáticos a ser utilizado como substituinte.

O modo com a SmCB1 é inibida não pode ser proposto. Para isso, são necessários estudos de modelagem molecular, em que se pode obter o comprimento e o ângulo de ligação entre o ligante (composto) e o receptor (enzima), além do tipo de ligação entre eles. Estes estudos são feitos por computadores (RODRIGUES, 2001). A partir dessas informações, pode-se

então realizar novas modificações no composto, para melhorar sua atividade biológica e diminuir sua toxicidade.

Em seguida, analisando-se os resultados do megazol, nota-se uma atividade modesta, visto que obteve apenas 42 pontos. Este composto sempre se destacou por seu amplo espectro de ação frente a diversos organismos, com destaque para o *Trypanosoma cruzi*, como já visto (ASATO, BERKELHAMMER, 1972; ALBUQUERQUE, PERRIE, 1999). Entretanto, agora que testado frente ao *Schistosoma mansoni*, este 5-nitroimidazol não apresentou resultados expressivos.

O composto 9 foi o único 5-nitrofurano da série. Esta classe já foi amplamente utilizada como esquistossomicida, apresentando atividade frente as formas jovens e adultas do parasita (HILL *et al.*, 1966; CIOLI; PICCA-MATOCCHIA; ARCHER, 1995; PITTA *et al.*, 2013). Avaliando os resultados, nota-se que este composto foi o que apresentou o segundo melhor desempenho dentre os derivados sintetizados, obtendo 63 pontos. Neste caso, a substituição do imidazol (presente no megazol) pelo furano favoreceu a atividade esquistossomicida.

Ao contrário, ao analisar o resultado do composto 13, que possui um 5-nitrotiofeno ligado ao anel 1,3,4-tiadiazol, nota-se que o mesmo obteve 30 pontos, um desempenho inferior ao megazol. Um composto dessa classe, derivado do niridazol, já foi sintetizado e se mostrou ativo frente ao *Schistosoma mansoni* (BENZET, LEROY, 1974). Porém, neste caso, a substituição do imidazol pelo tiofeno diminui a atividade esquistossomicida.

Por fim, há os compostos amídicos, que também não corresponderam ao teste, uma vez que o megazol, composto ativo, também não apresentou uma boa atividade. Há uma grande possibilidade dos compostos 3 e 5 terem sido hidrolisados pelas peptidases, pois inúmeras dessas enzimas já foram descritas em diferentes fases do desenvolvimento do parasita (SILVA *et al.*, 2011), porém, isso não tem como ser provado.

Analisando os resultados referentes ao acasalamento, nota-se que o composto 14 foi o único capaz de separar todos os casais de parasitas. Sabe-se que entre o tegumento e as células subtegumentares do parasita, está localizada a musculatura lisa, que é dividida em camadas circulares e longitudinais. A camada longitudinal está associada à motilidade, e a camada circular é responsável pela manutenção do canal ginecóforo do macho (NOEL *et al.*, 2008), sendo importante para manter os helmintos pareados. Então, é possível que esse composto também tenha a capacidade de agir nas camadas circulares, ocasionando a separação dos parasitas.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O trabalho em questão consta da síntese e avaliação da atividade antichagásica e esquistossomicida de derivados do megalzol, um composto sintetizado em 1968, que apresentou atividade antiparasitária promissora.

- A metodologia de síntese para formar a tiossemicarbazona por meio da condensação com aldeído utilizando DMSO como solvente mostrou-se adequada, obtendo-se rendimentos elevados, além de ser menos tóxica;

- o processo de formação do anel 1,3,4 tiadiazólico a partir da tiossemicarbazona utilizando-se HCl também mostrou-se adequado, com bons rendimentos;

- os rendimentos no processo de síntese das amidas foram satisfatórios, podendo-se otimizar a metodologia para melhor aproveitamento dos reagentes;

- o composto 14, único que possui uma tiossemicarbazona ligada ao imidazol, foi o único capaz de induzir a morte de dois parasitas *Schistosoma mansoni*, obtendo 80 pontos. O megalzol, composto análogo, obteve 42 pontos, indicando que em uma comparação direta, a inserção da tiossemicarbazona favorece a atividade esquistossomicida. A indução da morte foi dependente do tempo. Já quanto à atividade antichagásica, a inserção da tiossemicarbazona mostrou-se desfavorável;

- a troca do imidazol pelo heterocíclico furano contribuiu para a atividade esquistossomicida, de modo que o composto 9 obteve o segundo melhor resultado da série. Entretanto, para a atividade antichagásica, a troca foi desfavorável;

- a inserção do tiofeno no lugar do imidazol não contribuiu para a atividade esquistossomicida;

- a retirada do grupo nitro nos derivados contendo imidazol e tiofeno desfavoreceu a atividade esquistossomicida. Entretanto, a queda da mesma não foi muito expressiva, uma vez que os próprios compostos nitrados não apresentaram resultados promissores. Apesar disso, não se pode descartar o grupo nitro do grupo farmacofórico. Já para a atividade antichagásica, a retirada do grupo nitro inativou totalmente o megalzol, comprovando que o grupo nitro pertence ao grupo farmacofórico;

- as amidas foram obtidas pelo processo de latenciação, um processo de modificação molecular que foi realizado com sucesso em se tratando dos compostos 3 e 5, com o composto ativo sendo liberado. Já analisando-se o

composto 6, a cadeia carbônica longa impossibilitou a hidrólise da ligação lábil, não havendo a liberação do megazol. Os compostos 3 e 5 apresentaram boa atividade frente ao *Trypanosoma cruzi*, entretanto, a inserção do transportador lipofílico não foi capaz de aumentar sua biodisponibilidade, uma vez que o megazol obteve um desempenho superior a ambos. Já frente ao *Schistosoma mansoni*, nenhum dos três compostos demonstrou atividade, já que o composto ativo também não obteve ação expressiva;

Como perspectivas deste trabalho, podem-se citar alguns tópicos interessantes que podem ajudar em trabalhos futuros:

- Estudos de modelagem molecular de compostos contendo tiossemicarbazonas, sendo úteis no planejamento e síntese de novos inibidores da enzima SmCB1;

- estudos de liberação dos compostos 3 e 5 (HPLC), visando obter informações quanto ao tempo de ação dos mesmos no organismo do hospedeiro.

- avaliar a atividade biológica dos compostos frente as formas amastigotas do *Trypanosoma cruzi*, devido a esta forma do parasita estar muito presente na forma crônica da doença, na qual ainda não há medicamento disponível;

- novos estudos utilizando-se a técnica de latenciação, inserindo-se outros transportadores;

- estudos utilizando a técnica de síntese de biosisoterismo;

- com o uso da nanotecnologia, pode-se também desenvolver nanopartículas dos compostos, como alternativa de melhorar a biodisponibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRIGHT, J.D; SHEPHERD, R.G. Reactions of 1,2 dimethyl- 5- nitroimidazole, novel methods of conversion of 2- methyl group to nitrile. **J. Heterocyclic Chem.** v.10, p.899-907, 1973.

ALBUQUERQUE, C.N. **Synthèse et études physico-chimiques d'analogues du MEGAZOL, anti-parasitaire du type nitro-imidazole; étude de leur mode d'action.** Toulouse, 1995. 207p. Thèse de Doctorat. Université Paul Sabatier.

ALBUQUERQUE, C.N; PERRIE, J.J. Nova rota de síntese do Megazol (1-metil-2-[5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol], um antiparasitário ativo contra o *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** v.35, nº1, p.57-64, 1999.

ALMEIDA, B. R.; SANTILIANO, F. C. Levantamento dos métodos de diagnóstico para a doença de Chagas. **Enciclopédia biosfera.** Goiânia. v.8, nº 14, p.1588, 2012.

AMARAL, R; TAUIL, P. L; LIMA, D. D; ENGELS, D. An analysis of the impact of schistosomiasis control programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.101, p.79-85, 2006.

AMARO, C.R.S. **Proposição de nova rota de síntese do Megazol.** 2003. 57p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ANDRADE, J.P; MARIN NETO, J.A; DE PAOLA, A.A.V; VILAS-BOAS, F; OLIVEIRA, G.M.M; BACAL, F; BOCCHI, E.A; ALMEIDA, D.R; FRAGATA FILHO, A.A; MOREIRA, M.C.V; XAVIER, S.S; OLIVEIRA JÚNIOR, W.A; DIAS, J.C.P. I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. Resumo executivo. **Arq. Bras. Cardiol.** v.96, nº6, 2011.

ANDREWS, K.T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **Int. J. Parasitol. : Drugs Drug Resist.** v.4, p.95-111, 2014.

ARANTES, F.S. **Comparação das duas principais rotas de obtenção do Megazol.** 2007. 66p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ARAS, R.; GOMES, I.; VEIGA, M.; MELO, A. Transmissão vetorial da doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, nº3, p.359-363. 2003.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Editora Imperial Novo Milênio. Rio de Janeiro (RJ), 2008.

ASATO, G; BERKELHAMMER, G. Nitroheterocyclic antimicrobial agents: 1-methyl-2-nitro-5-imidazolyl derivatives. **J. Med. Chem.** v.15, nº 10, p.1086-1088, 1972.

AUFDERHEIDE, A.C; SALO, W; MADDEN, M; STREITZ, J; BUIKSTRA, J; GUHL, F; ARRIAZA, F; RENIER, C; WITTMERS, L.E; FORNACIARI, G; ALLISON, M. A 9000- year record of Chagas' Disease. **PNAS.** v.101, nº7, p.2034-2039, 2004.

AVER, G.M; KREUTZ, O.C; SUYENAGA, E.S. Métodos de obtenção de fármacos sob a ótica da química medicinal. **Revista Conhecimento Online.** v.2, 2015.

BARBOSA, L. G. N. Doença de Chagas. **Revista Logos.** nº1, p.20-36. 2009.

BARREIRO, E.J; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: as bases moleculares de ação dos fármacos**. Artmed. 2ª Edição. Porto Alegre (RS), 2008.

BARRY, C.E; BOSHOFF, H.I.M; C.S. DOWD. Prospects for clinical introduction of nitroimidazole antibiotics for the treatment of tuberculosis. **Curr. Pharm. Design.** v.10, p.3239- 3262, 2004.

BASCH, P. F. Why do Schistosomes have separate sexes? **Parasitol. Today.** v. 6, p.160-163, 1990.

BENAZET, F; LEROY, J. P. Action of the (nitro-5 thiazolyl-2)-1-imidazolidine-thione-2 (26354 R.P.) on experimental bilharziasis in laboratory animals. **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.** v.67, nº3, p.287-297, 1974.

BERN, C; KJOS, S; YABSLEY, M.J; MONTGOMERY, M.P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **Clin. Microbiol. Rev.** v.24, nº4, p.655-681, 2011.

BERSTEIN, H.J; ABRAHAM, R.J. The proton magnetic resonance spectrum of thiophene. **Can. J. Chem.** v. 37, nº5406, p.2095-2097, 1959.

BHATNAGAR, A; SHARMA, P. K; KUMAR, N. A Review on “Imidazoles”: Their Chemistry and Pharmacological Potentials. **Int. J. PharmTech Res.** v.3, nº1, 268- 282, 2011.

BLANCHARD, T.J. Schistosomiasis. **Trav. Med. Infect. Dis.** v.2, p.5-11, 2004.

BLAU, L; MENEGON, R.F; TROSSINI, G.H.G; MOLINO, J.V.D; VITAL, G,D; CICARELLI, R.M.B; PASSERINI, G.D; BOSQUESI, P.L; CHIN, C.M. Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. **Eur. J. Med. Chem.** v.67, p.142-151, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii** : diretrizes técnicas. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4ªed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 144p.

BRAZ, S.C.M. **Investigação do tratamento com o benzonidazol sobre a resposta imunológica de portadores crônicos da doença de Chagas.** Recife, 2015, 153p. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

BRENER, Z; CHIARI, E. Morphological variations observed in different strains in *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.19, p.220-224, 1963.

BRUICE, P.Y. **Organic Chemistry.** Pearson Education Limited. Edinburgh Gate, Harlow. 7ª Edição, 2014.

BUATHONG, S; LEELAYOOVA, S; MUNGTHIN, M; TAN-ARIYA, P. Role of Cathepsin B in *Schistosoma japonicum* Infection. **J. Trop. Med. Parasitol.** v.37, p.43-53, 2014.

BUEDING, E; FISHER, J. Biochemical effects of Niridazole on *Schistosoma mansoni*. **Mol. Pharmacol.** v.6, p.532-539, 1970.

BUSCHINI, A; GIORDANI, F; ALBUQUERQUE, C.N; PELLACANI, C.N; PELOSI, G; ROSSI, C; ZUCCHI, T.M.A.D; POLI, P. Trypanocidal nitroimidazole derivatives: Relationships among chemical structure and genotoxic activity. **Biochem. Pharmacol.** v.73, p.1537-1547, 2007.

BUSCHINI, A; FERRARINI, L; FRANZONI, S; GALATI, S; LAZZARETTI, M; MUSSI, F; ALBUQUERQUE, C.N; ZUCCHI, T.M.A.D; POLI, P. Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole. **J. Parasitol. Res.** p.1-11, 2009.

Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. v.23, nº 2, p.409-417, 2007

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic Tripanosomes in Liquid Media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.12, p.93-100, 1964.

CALDEIRA, R.L; TEODORO, T.M; JANNOTTI-PASSOS, L.K; LIRA-MOREIRA, P.M; GOVEIA, C.O; CARVALHO, O.S. Characterization of South American Snails of the Genus *Biomphalaria* (Basommatophora: Planorbidae) and *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Trematoda) in Molluscs by PCR-RFLP. **J. BioMed. Biotechnol.** v.2016, p.1-5, 2016.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origino f metacyclic Trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.12, p.93-100, 1964.

CAMPOS, F.M.F. **Caracterização do gene que codifica a enzima álcool desidrogenase (TcADH) e associação de sua baixa expressão com o fenótipo de resistência *in vitro* do *Trypanosoma cruzi* ao Benzonidazol.** 2007. 77p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2007.

CARDOSO, M.V.O. **Síntese e avaliação de tiossemicarbazonas e tiazolinonas como inibidores da protease cruzaina do *Trypanossoma cruzi* (TCC).** 2008. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2008.

CAPOBIANCO-PEREZ, M; CORDERO DE TROCONIS, M.I. Diseño racional de compuestos antibacterianos derivados del 5-nitrofurano usando modelado molecular. **Bol. Soc. Chil. Quím.** v.46, nº2, p.113-119, 2001.

CARVALHO, A.S., MENNA-BARRETO, R.F., ROMEIRO, N.C., DE CASTRO S.L., BOECHAT, N. Design, synthesis and activity against *Trypanosoma cruzi* of azaheterocyclic analogs of megazol. **Med. Chem.** v.3, nº5, p.460-465, 2007.

CARVALHO, O.S; COELHO, P.M.Z; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Editora Fiocruz. 1ª Edição. Rio de Janeiro (RJ), 2008.

CARVALHO, S.A. Tratamento da esquistossomose mansoni. **Rev. Med.** v.16, nº1, p.17-20, 1982.

CASTRO, S.L; MEIRELLES, M.Z. Mechanism of action of a nitroimidazole thiazole derivative upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.85, nº1, p.95-99, 1990.

CATTO, B.A; TRACY, J.W; WEBSTER, L.T. 1-Thiocarbamyl-2-imidazolidinone, a metabolite of niridazole in *S.mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.10, p.111-120, 1984.

CHEN, M; ZHAI, L; CHRISTESEN, S.B; THEANDER, T.G; KHARAZMI, A. Inhibition of Fumarate Reductase in *Leishmania major* and *L.donovani* by Chalcones. **Antimicrob. Agents Chemoter.** v.45, nº7, 2001.

CHEN, Y.T; BRINEN, L.S; KERR, I.D; HANSELL, E; DOYLE, P.S; MC KERROW, J.H; ROUSH, W.R. In Vitro and In Vivo Studies of the Trypanocidal Properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. **Plos. Negl. Trop. Dis.** V4, nº9, e825, 2010.

CHIYANZU, I; HANSELL, E; GUT, J; ROSENTHAL, P.J; MC KERROW, J.H; CHIBALE, K. Synthesis and evaluation of isatins and thiosemicarbazone derivatives against cruzain, falcipain-2 and rhodesain. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.13, nº20, p.3537-3530, 2003.

CHOI, J.S.; JO, B.W. Enhanced paclitaxel bioavailability after oral administration of pegylated paclitaxel prodrug for oral delivery in rats. **Int. J. Pharm.** v.6, p.221-227, 2004.

CHUNG, M.C, FERREIRA, E.I. O processo de latência no planejamento de fármacos. **Quím. Nova.** v.22, nº1, p.75-84, 1999.

CHUNG, M-C; SILVA, A.T.A; CASTRO, L.F; GUIDO, R.V.C; NASSUTE, J.C; FERREIRA, E.I. Latência e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** v.41, nº5, p.155-179, 2005.

CIOLI, D.; PICA- MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, presente...and future ?. **Pharmacol. Ther.** v.68, p.35-85, 1995.

COLLEY, D.G; BUSTINDUY, A.L; SECOR, W.E; KING, C.H. Human schistosomiasis. **Lancet**. v.383, p.2253-2264, 2014.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. **Substâncias carboniladas e seus derivados**. Bookman. 1ª Edição. Porto Alegre (MG), 2003.

COURA, J.R; DIAS, C.P.D. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease- 100 years of its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.104, p.31-40, 2009.

COURA, J.R; BORGES- PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated ? A comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.106. nº 6, p.641- 645, 2014.

CROVARO, F.; REBORA, A. Chagas' disease: a potential plague for Europe? **Dermatology**. v.195, p.184–185, 1997.

DALTON, J.P; CLOUGH, K.A; JONES, M;K; BRINDLEY, P.J. Characterization of the Cathepsin-Like Cysteine Proteinases of *Schistosoma mansoni*. **Infect. Immun**. v.64, nº4, p.1328-1334, 1996.

DAMASCENO, F.S; BARISON, M.J; E.M, PRAL; L.S, PAES; A.M, SILBER. "Memantine, an antagonist of the NMDA glutamate receptor, affects cell proliferation, differentiation and the intracellular cycle and induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*." **PLoS. Negl. Trop. Dis**. v.8, nº2, e2717, 2014.

DARSAUD, A; CHEVRIER, C; BOURDON, L; DUMAS, M; BUGUET, A; BOUTEILLE, B. Megazol combined with suramin improves a new diagnosis index of the early meningo-encephalitic phase of experimental African trypanosomiasis. **Trop. Med. Int. Health**. v.9, nº1, p.83-91, 2004.

DE KONING, H.P; JARVIS, S.M. Adenosine transporters in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*: Substrate recognition motifs and affinity for trypanocidal drugs. **Mol. Pharm**. v. 56, p.1162–1170, 1999.

DA SILVA, S.P; NOEL, F. Time course of the effect of Praziquantel on *Schistosoma mansoni* attachment in vitro: comparison with its effects on worm length and motility. **Parasitol. Res**. v.81, p.543- 548, 1995.

DELCROIX, M; MEDZIHRADESKY, K; CAFFREY, C.R; FETTER, R.D; MC KERROW, J.H. Proteomic analysis of adult *S. mansoni* gut contents. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.154, p.95–97, 2007.

DENICOLA-SEOANE. A., RUBBO, H., PRODANOV, E., TURRENS, J.F. Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.54, p.43-50, 1992.

DIAS, L.C; DESSOY, M.A; SILVA, J.J.N; THIEMANN, O.H; OLIVA, G; ANDRICOPOULO, A.D. Quimioterapia da Doença de Doença de Chagas: estado de arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quím. Nova.** v.32, n°9, p.2444-2457, 2009.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Rev Soc. Bras. Med. Trop.** v.44, n° 3, p.375-379, 2011.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: clínica e terapêutica. **Ministério da Saúde, SUCAM.** Brasília (DF), 1990.

DOENHOFF, M.J; CIOLI, D; UTZINGER, JURG. Praziquantel: mechanisms of actions, resistances and new derivatives for schistosomiasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.** v.21, p.659-667, 2008.

DOENHOFF, M.J; HAGAN, P; CIOLI, D; SOUTHGATE, V; PICA- MATTOCCIA, L; BOTROS, S; COLES, G; TCHUEM TCHUENTÉ, L.A, MBAYE, A; ENGELS, D. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. **Parasitology.** v.136, n°13, p.1825-1835, 2009.

DORN, P.L.; PERNICIARO, L.; YABSLEY, M.J; ROELLIG, D.M.; BALSAMO, G.; DIAZ, J.; WESSON, D. Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Emerg. Infect. Dis.** v.13, p.605–607, 2007.

DU, X; GUO, C; HANSELL, E; DOYLE, P.S; CAFFREY, C.R; HOLLER, T.P; MC KERROW, J.H; COHEN, F.E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **J. Med. Chem.** v.45, n° 13, p. 2695- 2707, 2002.

DUARTE, D.C; FRAGA, B.E.; FRAGA, C.A.M. Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates. **Mini Rev. Med. Chem.** v.7, p.1108-1119, 2007.

DUNSFORD, H. A; KEYSER, C. H; DOLAN, P. M; SEED, J. L; BUEDING, E, Carcinogenicity of the antischistosomal nitrofurans trans-5-amino-3-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-1,2,4-oxadiazole. **J. Natl. Cancer. Inst.** v.73, nº1, p.151-160, 1984.

EDWARDS, D. I. **Biochem. Pharm.** v. 35, nº1, p.53-58, 1986.

ENANGA, B; KEITA, M; CHAUVIERE, G; DUMAS, M; BOUTEILLE, B. Megazol combined with suramin: a chemotherapy regimen which reversed the CNS pathology in a model of human African trypanosomiasis in mice. **Trop. Med. Int. Health.** v.3, p.736-741, 1998.

ENANGA, B; BOUDRA, H; CHAUVIERE, G; LABAT, C; BOUTEILLE, B; DUMAS, M; HOUIN, G. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol, a new potent trypanocidal drug in animals. **Arzneimittelforschung.** v.45, nº5, p.441-447, 1999.

ESPÍNDOLA, J.W; CARDOSO, M.V; FILHO, G.B; OLIVEIRA E SILVA, D.A; MOREIRA, D.R; BASTOS, T.M; SIMONE, C.A; SOARES, M.B; VILLELA, F.S; FERREIRA, R.S; CASTRO, M.C; PEREIRA, V.R; MURTA, S.M; SALES JUNIOR, P.A; ROMANHA, A.J; LEITE, A.C. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxy thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **Eur. J. Med. Chem.** v.101, p.818-835, 2015.

FAIRLAMB, A.H. **Target discovery and validation with special reference to triphanothione.** In: Fairlamb, A.H. RIDLEY, R.H; VIAL, H.J. Drugs against parasitic diseases: R & D Methodologies and issues-Discovery and drug development. Geneva. TDR. p.107-119, 2003.

FERREIRA, M.U. **Parasitologia contemporânea.** Guanabara Koogan. Rio de Janeiro (RJ), 2012.

FERREIRA, R.C.C; FERREIRA, L.C.S. CL 64,855 a potent anti-trypanosoma drug is also mutagenic in the *Salmonella*/Microsome assay. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.81, nº1, p.49-52, 1986a

FERREIRA, P.A; VARGAS, P; COSTA, M.P; MACHADO, I.L; COSTA, F.C; BORGES, J.D.S. Aspectos da Síntese Orgânica no Desenvolvimento de Métodos e de Moléculas Biologicamente Ativas. **Revista Processos Químicos.** v.2, nº3, 2008.

FEUN, L; MODIANO, M; LEE, K; MAO, J; MARINI, A; SAVARAJ, N; PLEZIA, P; ALMASSIAN, B; COLACINO, E; FISCHER, J; MAC DONALD, S. Phase I and

pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.50, n°3, p.223-229, 2002.

FILARDI, L.S; BRENER, Z. A rapid method for testing *in vivo* the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to chemotherapeutic agents. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.79, p.221-225, 1982.

FORSYTH, C.J; HERNANDEZ, S; OLMEDO, W; ABUHAMIDAH, A; TRAINA, M.I; SANCHEZ, D.R; SOVEROW, J; MEYMANDI, S.K. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. **Clin. Infect. Dis.** v.63, n°8, p.1056-1062, 2016.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Disponível em: <http://cmm.fiocruz.br/>. Acesso em: 02/09/2016.

GAZZINELLI, G., LAMBERTUCCI, J.R., KATZ, N., ROCHA, R.S., LIMA, M.S., COLLEY, D.G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XI. Immunological status of patients with acute infection after treatment. **J. Immunol.** v.135, p.2121–2127, 1985.

GITHEKO, A.K; LINDSAY, S.W; CONFALONIERI, U.E; PATZ, J.A. Climate change and vector-borne diseases: A regional analysis. **Bull. World Health Organ.** V.78, p.1136–1147, 2000.

GRAYSON, M.L; COSGROVE, S.E; CROWE, S; HOPE, W; MC CARTHY, J.S; MILLS, J; MOUTON, J.W; PATERSON, D.L. **Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs.** CRC Press. 7ª Edição. Boca Raton (FL), 2017.

GREENBAUM, D.C, MACKEY, Z; HANSELL, E; DOYLE, P; GUT, J; CAFFREY, C.F; 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*. **J. Med. Chem.** v.47, n°12, p.3212- 3219, 2004.

HALL, B.S; BOT, C; WILKINSON, S.R. Nifurtimox Activation by Tripanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. **J. Biol. Chem.** v.286, n°15, p.13088-13095, 2011.

HALL, B.S; WILKINSON, S.R. Activation of Benzonidazol by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glioal Formation. **Antimicrob. Agents Chemoter.** v.56, nº1, p.115-123, 2012.

HARISH, K.P; MOHANA, K.N; MALLSHA, L. Synthesis of Pyrazine Substituted 1,3,4-Thiadiazole Derivatives and Their Anticonvulsant Activit. **Organic Chemistry International.** 2013, p.1-8, 2013.

HILL, J; RUST, M. A; PELLEGRINO, J; FARIA, J, Use of the oogram to reveal the effect of a nitrofurylacrylamide on the eggs of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.** v.52, nº4,p.822, 1966.

HORAK, P; MIKES, L; RUDOLFOVA, J; KOLAROVA, L. Penetration of Trichobilharzia cercariae into mammals: Dangerous or negligible event? **Parasite.** v.15, nº3, p.15, 299–303, 2008.

HOTEZ, P.J. Southern Europe's Coming Plagues: VectorBorne Neglected Tropical Diseases. **PLoS Negl. Trop. Dis.** e0004243, 2016.

JACKSON, Y; ALIROL, E; GETAZ, A; WOLFF, H; COMBESURE, C; CHAPPUIS, F. Tolerance and safety of Nifurtimox in patients with chronic chagas disease. **Clin. Infec. Dis.** v.51, nº15, p.69- 75, 2010.

JAGER, T; KOCH, O; FLOHÉ, L. **Tripanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery.** Wiley-Blackwell. v.4, Weinheim, Germany, 2013.

JENNINGS, F. W; CHAUVIÉRE, G; VIODÉ, C; MURRAY, M. Topical chemotherapy for experimental African trypanosomiasis with cerebral involvement: the use of melarsoprol combined with the 5-nitroimidazole, megazol. **Trop. Med. Int. Health.** v.1, p.363–366, 1996.

KASNY, M; MIKES, L; HAMPL, V; DVORAV, J; CAFFREY, C.R; DALTON, J.P; HORAK, P. **Peptidases of Trematodes.** In: ROLLINSON, D; HAY, S,I. *Advances in Parasitology.* Oxford (UK). Elsevier. v.69, p.206-279, 2009.

KATZ, A; COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. **Acta Tropica.** v.108. p.72–78, 2008.

KATZ, N. **Terapêutica clínica na esquistossomose mansonica.** In: CARVALHO, OS; COELHO, P.M.Z; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni e esquistossome: uma visão multidisciplinar.* Rio de Janeiro (RJ). Fiocruz. p.849-870, 2008.

KATZ, N; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciênc. Cult.** v. 55, nº1, p.38-43, 2003.

KATZ, GRINBAUM, E; CHAVES, A; ZICKER, F; PELLGRINO, J. Clinical trials with oxamniquine, by oral route, in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.18, nº5, p.371-377, 1976.

KHABNADIDEH, S; REZAEI, Z; KHALAFI- NEZHAD; R, BAHRIAJAFI; R, MOHAMADIA; A, FARROKHROZA. Synthesis of N-alkylated Derivatives of Imidazole as Antibacterial Agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.13, p.2863-2865, 2003.

KOEHLER, J.W; MORALES, M.E; SHELBY, B.D; BRINDLEY, P.J. Aspartic protease activities of schistosomes cleave mammalian hemoglobins in a host-specific manner. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.102, p.83–85, 2007

KOKATE, A; LI, X; JASTE, B. Effect of Drug Lipophilicity and Ionization on Permeability Across the Buccal Mucosa: A Technical Note. **AAPS PharmSci Tech.** v.9, nº2, p.501-504, 2008.

KROPF, S.P; SÁ, M.R. The Discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **Hist. Ciênc. Saúde-Manguinhos.** v.16. nº1. p.13-34, 2009.

LAGES-SILVA, E; FILARDI, N.S; BRENER, Z. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal forms. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.85, nº4, p.401-405, 1990.

LAMBERT, C.R. Chemotherapy of experimental *Schistosoma mansoni* infection with a nitro-thiazole derivative CIBA 32,644-BA. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v. 58. p.292-303, 1964.

LAMBERTUCCI, J.R. Acute schistosomiasis mansoni: Revisited and reconsidered. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.105, p.422-438, 2010.

LEESON, P. Chemical beauty contest. **Nature.** v.481, p.455-456, 2012.

LEI, H. H; CHANG, L. C; HSUE, M. L; CHANG, S. P; TZIN, K. C; YEN, M, A New Class of Chemotherapeutic Agents Orally Effective against Schistosomiasis Japonica. **Sci. Sin.** v., p.523-524, 1964.

LEE, B.Y; BACON, K.M; BOTTAZZI, M.E; HOTEZ, P.J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect. Dis.** v.13, p.342-438, 2013.

LEMKE, T.L; WILLIAMS, D.A; ROCHE, V.F; ZITO, S.W. **Foye's principles of Mecinal Chemistry**. Lippincott Williams & Wilkins (LWW). 7ª Edição. Philadelphia (PA), 2012.

LIMA, J.P; FREIRE, J.M; ZEBIAN, K.K; DELMONDES, P.H. Latenciação como técnica no direcionamento de fármacos. **Revista Eletrônica da Univar.** v.1, nº8, p.47-50, 2012.

MANSOORY, J.H; RAJPUT, S.S. Synthesis, reactivity and biological evaluation of triazole: recente developments. **Int J Pharm Pharm Sci.** v.7, nº5, p.20-32, 2015.

MARKELL, E.K; JOHN, D.T; KROTOSKI, W.A. Markell e Voge: **Parasitologia Médica**. Guanabara Koogan. 8ª Edição. Rio de Janeiro (RJ): 2003.

MASSI, L; CERRUTTI, B.M; QUEIROZ, S.L. Metodologia de ensino *Jigsaw* em disciplinas de Química Medicinal. **Quím. Nova.** v. 36, nº 6, S1- S2, 2013.

MAYA, J.D; BOLLO, D; NUÑEZ-VERGARA, L.J; SQUELLA, J.A; REPETTO, Y; MORELLO, A; PÉRIÉ, J; CHAUVIÉRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. **Biochem. Pharmacol.** v.65, p.999-1006, 2003.

MAYA, J.D; CASSELS, B.K; ITURRIAGA- VASQUEZ, P; FERREIRA, J; FAÚNDEZ, M; GALANTI, N; FERREIRA, A; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interection with mammalian host. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** v.146, nº4, p.601-620, 2007.

MELLO, F.V.C; CARVALHO, A.S; BASTOS, M.M; BOECHAT, N; AIUB, C.A.F; FELZENSZWALB, I. Evaluation of genotoxic effections of new molecules with possible tripanocidal activity for Chagas Disease.treatment. **ScientificWorld Journal.** v. 2013, 2013.

MENDONÇA- SILVA, D.L; PESSOA, R.F; NOEL, F. Evidence for the presence of glutamatergic receptors in adult *Schistosoma mansoni*. **Biochem. Pharmacol.** v.64, p.1337- 1344, 2002.

MENEGATTI, R; FRAGA, C.A.M; BARREIRO, E.J. A importância da síntese de fármacos. **Cadernos Temáticos da Química Nova na Escola**. nº 3, 2001.

MITRA, A.K; MAWSON, A.R. Neglected Tropical Diseases: Epidemiology and Global Burden. **Trop. Med. Infect. Dis.** v.2, nº36, 2017.

MOLYNEUX, D. Neglected tropical diseases. **Community Eye Health**. v.26, nº82, 2017.

MORAES, J; NASCIMENTO, C; LOPES, P.O; NAKANO, E; YAMAGUCHI, L.F; KATO, M.J; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of pipartine. **Exp. Parasitol.** v.127. p. 357- 364, 2011.

MORETH, M; ORNELAS, D; GOMES, C.R.B; DE SOUZA, M.V.N. Nitroimidazóis – Uma Promissora Classe de Substâncias para o Tratamento da Tuberculose. **Rev. Virtual Quím.** v.2, nº2, p.105-117, 2010.

MORETTO, S.A.G. **Otimização da rota de síntese do megalol, potencial anti-chagásico**. 2002, 86p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MORILLO, C.A; MARIN-NETO, J.A; AVEZUM, A; SOSA-ESTANI, S; RASSI JR, A; ROSAS, F; VILLENA, E; QUIROZ, E; BONILLA, R; BRITTO, C; GUHL, F; VELAZQUEZ, E; BONILLA, L; MEEKS, B; RAO-MELACINI, POGUE, J; MATTOS, A; LAZDINS, A; RASSI, A; CONNOLY, S.J; YUSUF, S. Randomized trial of Benzonidazole for chronic chagas cardiomyopathy. **N. Engl. J. Med.** v.373, nº14, p.1295-1306, 2015.

NASCIMENTO, G.L. **Formas graves da esquistossomose mansoni: carga epidemiológica e custos no Brasil em 2010**. 2013, 73p. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Brasília, 2013.

NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Artmed. 6ª Edição. São Paulo (SP), 2014.

NOEL, F. **Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto**. In: CARVALHO, O.S; COELHO, P.M.Z; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: um visão multidisciplinar (online). Rio de Janeiro (RJ). Fiocruz. p.207- 244, 2008.

NOVAES, M.R.C.G; SOUZA, J.P; ARAUJO, H.C. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. **Quím. Nova.** v. 22, nº1, p. 5-10, 1999.

OLIVEIRA, M.F; NAGAO-DIAS, A.T; PONTES, V.M.O; SOUZA JÚNIOR, A.S; COELHO, H.L.L; COELHO, I.C.B. Tratamento etiológico da Doença de Chagas no Brasil. **Rev. Patol. Trop.** v.37, nº3, p.209-228, 2008.

PARISE FILHO, R; POLLI, M.C; BARBERATO FILHO, S; GARCIA, M; FERREIRA, E.I. Prodrugs available on the Brazilian pharmaceutical market and their corresponding bioactivation pathways. **Braz. J. Pharm. Sci.** v.46, nº3, 2010.

PATTERSON, S. WYLLIW, S. Nitro drugs for the treatment of tripanosomatid diseases: past, present and future prospects. **Trends Parasitol.** v.30, nº6, p. 289-298, 2014.

PAULA, F.R; SERRANO, S.H.P; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade dos nitrocompostos. **Quím. Nova.** v.32, nº4, p.1013-1020, 2009.

PEDRA, R.A; OLIVEIRA, R.A; BEYRODT, C.G.P; FRANÇA, H.H. Desafio em saúde pública: tratamento etiológico da Doença de Chagas na fase crônica. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba.** v.12, nº2, p.5-9, 2011.

PELLEGRINO, J; KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansonica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.6, p.233- 290, 1960.

PEREIRA, D.G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quim. Nova.** v.30, nº1, p.171-177, 2007.

PICCA-MATTOCCIA, L; CARLINI, D; GUIDI, A; CIMICA, V; VIGOROSI, F; CIOLI, D. The schistosome enzyme that activates oxamniquine has the characteristics of a sulfotransferase. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.101, p.307-312, 2006.

PIMENTA, R.N; MATTOS, A.C.A; ORFANO, A.S; BARBOSA, L. PIMENTA, P.F.P; COELHO, P.M.Z. Schistosoma mansoni in Susceptible and Resistant Snail Strains Biomphalaria tenagophila: In Vivo Tissue Response and In Vitro Hemocyte Interactions. **PLoS One.** v.7, nº9, p.1-12, 2012.

PITTA, M.G.R; PITTA, M.G.R; REGO, M.J.B.M; GALDINO, S.L. The evolution of drugs on *Schistosoma* treatment: looking to the past to improve the future. **Mini Rev. Med. Chem.** v.13, nº3, p.493-508, 2013.

POLI, P; MELLO, M.A; BUSCHINI, A; MORTARA, R.A; ALBUQUERQUE, C.N; SILVA, S; ROSSI, C; ZUCCHI, T.M.A.D. Citotoxic and genotoxic effects of megalol, an anti- Chagas disease drug, assessed by different short- term tests. **Biochem. Pharmacol.** v.64, p.1617-1627, 2002.

QUENTAL, C; SALLES FILHO, S. Ensaios clínicos: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. **Rev. Bras. Epidemiol.** v.9, nº4, p.408-424, 2006.

RAETHER, W; HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol. Research.** v.90, p.19–39, 2003.

RASSI JR, A; RASSI, A; MARIIN- NETO, J. A. Chagas Disease. **Lancet.** v.375, p.1388-1402, 2010.

REMERS, W.A; GIBBS, G.J; WEISS, M.J. Preparation of halomethyl 1,3,4-thiadiazole, conversion 2- amino 5-(1- methyl- 2-imidazolyl)- 1,3,4- thiadiazole), na importante anti- microbial agente. **J. Heterocyclic Chem.** v.6, p.835-840, 1969.

REY, L. **Parasitologia:** parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. Guanabara Koogan. 4ª Edição. Rio de Janeiro (RJ), 2011.

RIENTE, R; SOUZA, P; CARVALHO, S; KAISER, M; BRUN, M; SILVA, E. Leishmanicidal activity of new megalol derivatives. **Med. Chem.** v.5, nº4, 392-397, 2009.

ROBERTS, L. S.; JANOVY, J.JR. **Foundations of Parasitology.** Mc Graw Hill. 7ª Edição. Nova York (NY), 2009.

ROBINSON, M.W; DALTON, J;P. **Cysteine Proteases of Patogenic Organisms.** Springer. v.712. New York (NY), 2011.

RODRIGUES, C.R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.** v.1, nº3, 2001.

ROMANHA, A.J; ALVES, R.O; MURTA, S.M; SILVA, J.S; ROPERT, C; GAZZINELLI, R.T. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of interferon gamma in mediating parasitologic cure. **J. Infect. Dis.** v.186. n°6, p.823-828, 2002.

ROZENSKI, J; DE RANTER, C.J; VERPLANKEN, H. Quantitative Structure-Activity Relationships for Antimicrobial Nitroheterocyclic Drugs. **Quant. Struct.-Act. Relat.** v.14, n°2, p.134-141, 1995.

SAJID, M; ROBERTSON, S.A; BRINEN, L.S; MC KERROW, J.H. **Cruzain: The Path from Target Validation to the Clinic.** In: Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms. Springer. New York (NY). p.100-115, 2011.

SANCHEZ-LERMEN, R. L. P.; DICK, E.; SALAS, J. A. P.; FONTES, C. J. F. Sintomas do trato digestivo superior e distúrbios motores do esôfago em pacientes portadores da forma indeterminada da doença de Chagas crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 40, n°2, p.197-203, 2007.

SCHAEFER, C.W. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Systematic questions and some others. **Neotrop. Entomol.** v.32, n°1, 2003.

SCHMUNIS, G.A; YADON, Z.E. Chagas Disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica.** v.115, p.14-21, 2010.

SCHUHMACHER, A, GERMANN, P.G; TRILL, H; GASSMANN, O. Models for open innovation in the pharmaceutical industry. **Drug Discov. Today.** v.18, n°23/24, 2013.

SILVA, L.L; MARCET-HOUBEN, M; ZERLOTINI, A; GABALTON, T; OLIVEIRA, G; NAHUM, L.A. Evolutionary histories of expanded peptidase families in *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.106, n°7, p.864-877, 2011.

SILVA, L. C; SETTE JR, H, CHAMONE, D.A.F; ALQUEZAR, A.F; PUNSKAS, J.A; RAI, S. Clinical trials with oral oxamniquine (UK 4271) for the treatment of mansoni schistosomiasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.16, n°2, p.103-109, 1974.

SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F.X; KIEMLE, D.J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds.** Wiley. Seventh Edition. Nova York (EUA), 2005.

SILVEIRA, A.C. Profilaxia In: BRENNER, Z; ANDRADE, Z; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro (RJ). p.48-63, 2000.

SIMÕES, L.F; CAMARGO, E.A.F; BASTOS, L.D; NEVES, M.F; CARVALHO, J.F; MAGALHÃES, L.A; MAGALHÃES, E.M.Z. Susceptibility of Argentinean *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to infection by *Schistosoma mansoni* and the possibility of geographic expansion of mansoni schistosomiasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.46, n°5, p.611-616, 2013.

SINGH, S; BHARTI, N; NAGVI, F; AZAN, A. Synthesis, characterization and in vitro antiamebic activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their Palladium (II) and Ruthenium (II) complexes. **Eur. J. Med. Chem.** v.39, n°5, p. 459- 465, 2004.

SMITH, D.A; ALLERTON, C; KALGUTKAR, A.T; VAN DER WATERBEEMD, H; WALKER, D.K. **Pharmacokinetics and metabolismo in drug design**. Wiley-VCH. 3ª Edição. Weinheim, Germany, 2012.

SMITHERS, S.R; TERRY, R.J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the reconvert with adult worms. **Parasitology**. v. 55, p.695-700, 1965.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química orgânica**. LTC – Livros técnicoscientíficos Ed. S. A. 7ª Edição. Rio de Janeiro (RJ), v.2, 2002.

SOUZA, W. **O parasita e sua interação com os hospedeiros**. In: BRENER, Z. *et al.* **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (RJ), p. 88-123, 1999.

STEINMANN, P; KEISER, J; BOS, R; TANNER, M; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet**. v.6, p.411-425, 2006.

STEFANI, H.A. **Introdução à química dos compostos heterocíclicos**. Guanabara Koogan. 1ª Edição. Rio de Janeiro (RJ), 2009.

SZAJNMAN, S.H; RAVASCHINO, R.L; DOCAMPO, R; RODRIGUEZ, J. B. Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1-bisphosphonates derived from fatty acids against *Trypanosoma cruzi* targeting farnesyl pyrophosphate synthase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.15, p.4685-4690, 2005.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., CERON, C. R. Problemática vetorial da doença de Chagas. **Arq. Ciênc. Saúde**. v.11, n°1, p.44-47. 2004.

TAYLOR, J.E; JONES, M.D; WILLIAMS, J.M.J; BULLS, S.D. N-Acyl DBN tetraphenylborate salts as N-acylating agents. **J. Org. Chem**. v.77, p.2808-2818, 2012.

TEITZ, Y; RONEN, D; VANSOVER, A; STEMATSKY, T; RIGGS, J.L. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin-beta 4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin-beta-4':4'-diallylthiosemicarbazone. **Antiviral Res**. v.24, n°4, p.305-314, 1994.

TENÓRIO, R.P; GÓES, A.J.S; LIMA, J.G; FARIA, A.R; ALVES, A.J; AQUINO, T.M. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Quím. Nova**. v.28, n°6, p.1030-1037, 2005.

TOCHER, J. H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. **Gen. Pharmacol**. v.28, n°4, p.485-487, 1997.

TORGERSON, P. R.; DE SILVA, N. R.; FEVRE, E. M.; KASUGA, F.; ROKNI, M. B.; ZHOU, X. N.; SRIPA, B.; GARGOURI, N.; WILLINGHAM, A. L.; STEIN, C. The global burden of foodborne parasitic diseases: an abdate. **Trends Parasitol**. v.1, p.20-26, 2014.

TRACY, J.W; CATTO, B.A;WEBSTER, L.T. Reductive metabolism of Niridazole by adult *Schistosoma mansoni*. **Mol. Pharmacol**. v.24, p.291-299, 1983.

TRIVEDI, M.N; GABHE, S.Y; VACCHANI, U.D; PATEL, R.B; SHAH, C.P. Synthesis of some 2-methyl-5-nitroimidazole derivatives as potential antimicrobial agentes. **J. Chem. Pharm. Res**. v.3, n°1, p.313-319, 2011.

TROSSINI, G.H.G. **Antichagásicos potenciais: busca racional de compostos com ação seletiva pela cruzaina**. 2008, 293p. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TROSSINI, G.H.G; MALVEZZI, A; DO AMARAL, A.T; RANGEL-YAGUI, C.O; IZIDORO, M.A; CEZARI, M.H; JULIANO, L; CHUNG, M.C; MENEZES, C.M.S; FERREIRA, E.I. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*, **J. Enzym. Inhib. Med. Chem**. v.25, p.62-67, 2010.

TROUILLER, P; OLLIARO, P; TORREELE, E; ORBINSKI, J; LAING, R; FORD, N. Drug development for neglected disease: a deficient Market, and a public health policy failure. **Lancet**. v.359, p.2188-2194, 2002.

TRUNZ, B.B; JEDRYSIK, R; TWEATS, D; BRUN, R; KAISER, M; SUWINSKI, J; TORREELE, E. 1-Aryl-4-nitro-1H-imidazoles, a new promising series for the treatment of human African trypanosomiasis. **Eur. J. Med. Chem.** v.46. p.1524-1535, 2011.

TURRENS, J.F. The role of succinate in the respiratory chain of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes. **Biochem. J.** v.259, p.363-368, 1989.

ULRICH, K; FINKENZELLER, C; MERKER, S; ROJAS, F; MATTHEWS, K; RUPPERT, T; KRAUTH-SIEGEL, L. Stress-Induced Protein S-Glutathionylation and S-Trypanothionylation in African Trypanosomes—A Quantitative Redox Proteome and Thiol Analysis. **Antioxid. Redox Signal.** v.27, n°9, p.517-533, 2017.

URBINA, J.A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, p.349-355, 1999.

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

VINHAES, M.C; DIAS, J.P.C. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública.** v.16, p.7-12, 2000.

VIODÉ, C; BETTACHE, N; CENAS, N; KRAUTH-SIEGEL, R.L; CHAUVIÉRE, G; BAKALARA, N; PÉRIÉ, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochem. Pharmacol.** v.57, p.549–557, 1999.

WARDMAN, P. Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution, **J. Phys. Chem.** v.18, n°4, p.1637-1756, 1989.

WHITMORE, G.F; VARGHESE, A.J. The biological properties of reduced nitroheterocycles and possible underlying biochemical mechanisms. **Biochem. Pharmacol.** v.35, p.97–103, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A major public health problem.** Disponível em: www.who.int/schistosomiasis/en/. Acesso em 21/07/2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas Disease. (American trypanosomiasis) fact sheet. **Weekly epidemiological record**. v.85, nº 34, p.334-336, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 03/07/2017.

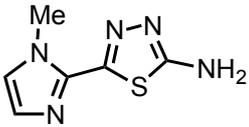
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis: epidemiological situation**. Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/en/>. Acesso em: 17/07/2017.

XIAO, S.H; KEISER, J; CHOLLET, J; UTZINGER, J; DONG, Y; ENDRISS, Y; VENNERTSTROM, J.L; TANNER, M. In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrob. Agent Chemother**. v.51, p.1440-1445, 2007

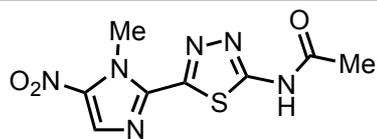
APÊNDICE

Análise da mortalidade, motilidade e acasalamento

Efeito do composto 2 nos parâmetros analisados.

 1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazolil)-imidazol					
Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes Separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
2	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
3	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
4	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
5	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL

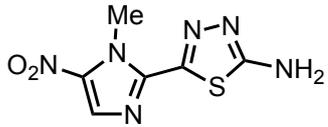
Efeito do composto 3 nos parâmetros analisados.



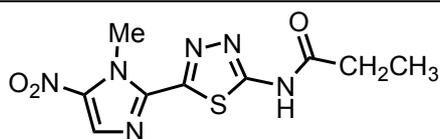
1- metil- 2- (5- acetamida- 1,3,4- tiadiazolil)- 5- nitroimidazol

Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes Separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
2	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
3	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
4	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
5	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE

Efeito do composto 4 nos parâmetro analisados.

					
Megazol					
Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes Separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
2	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
3	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
4	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
5	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE

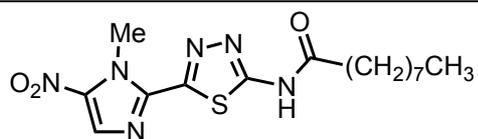
Efeito do composto 5 nos parâmetros analisados.



1- metil-2-(5-propionamida-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol

Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes Separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
2	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	NORMAL
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
3	2	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
4	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
5	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL

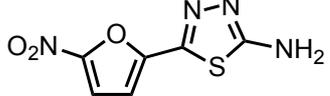
Efeito do composto 6 nos parâmetros analisados.



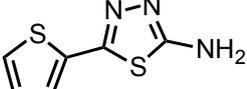
1- metil-2-(5-nonanoilamida-1,3,4-tiadiazolil)-5-nitroimidazol

Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes Separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	SIM	NORMAL	LEVEMENTE
	96	0	SIM	NORMAL	LEVEMENTE
2	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	SIM	NORMAL	LEVEMENTE
	96	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
3	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
4	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	NORMAL
	72	0	NÃO	NORMAL	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
5	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	NORMAL	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE

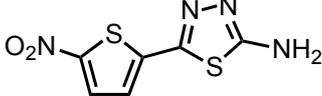
Efeito do composto 9 nos parâmetro analisados.

 2- (5- amino- 1,3,4- tiadiazolil)- 5- nitrofurano					
Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes Separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	SIM	LEVEMENTE	SIGNIFICATIVO
2	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
3	2	0	NÃO	NORMAL	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	SIM	LEVEMENTE	SIGNIFICATIVO
4	2	0	NÃO	NORMAL	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	SIM	LEVEMENTE	SIGNIFICATIVO
5	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE

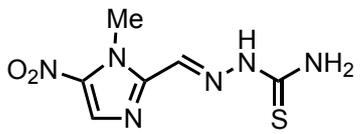
Efeito do composto 11 nos parâmetros analisados.

 2- (5- amino- 1,3,4- tiadiazolil)- 5-tiofeno					
Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes Separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
2	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
3	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
4	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
5	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL

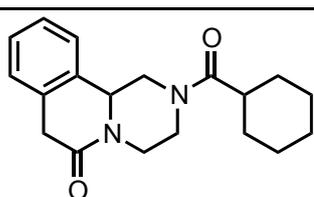
Efeito do composto 13 nos parâmetros analisados.

 2- (5- amino- 1,3,4- tiadiazolil)- 5-nitrotiofeno					
Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes Separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	SIM	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
2	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
3	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
4	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
5	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE

Efeito do composto 14 nos parâmetros analisados.

 1-metil-2-imidazolil-5-nitro-tiossemicarbazona					
Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes Separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	SIM	NORMAL	NORMAL
	24	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	SIM	LEVEMENTE	SIGNIFICATIVO
2	2	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	100	SIM	LEVEMENTE	MORTO
3	2	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	SIM	LEVEMENTE	SIGNIFICATIVO
4	2	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	SIM	LEVEMENTE	SIGNIFICATIVO
5	2	0	SIM	NORMAL	LEVEMENTE
	24	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	SIM	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	100	SIM	LEVEMENTE	MORTO

Efeito do controle positivo nos parâmetros analisados



Praziquantel (3µg/ml) + DMSO 3%

Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	NÃO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO
	24	0	NÃO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO
	48	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
	72	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
	96	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
2	2	0	NÃO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO
	24	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
	48	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
	72	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
	96	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
3	2	0	NÃO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO
	24	0	NÃO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO
	48	0	NÃO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO
	72	0	NÃO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO
	96	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
4	2	0	NÃO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO
	24	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
	48	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
	72	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
	96	50	NÃO	MORTO	SIGNIFICATIVO
5	2	0	NÃO	SIGNIFICATIVO	SIGNIFICATIVO
	24	100	NÃO	MORTO	MORTO
	48	100	NÃO	MORTO	MORTO
	72	100	NÃO	MORTO	MORTO
	96	100	NÃO	MORTO	MORTO

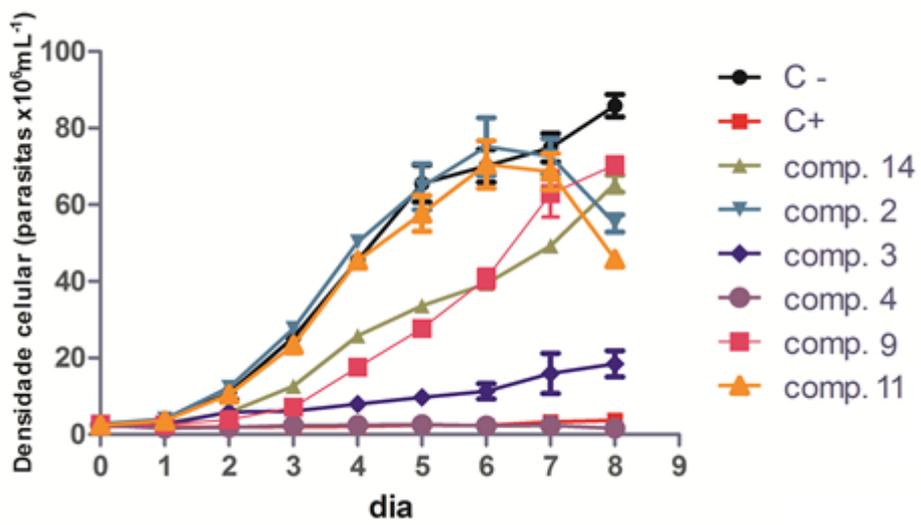
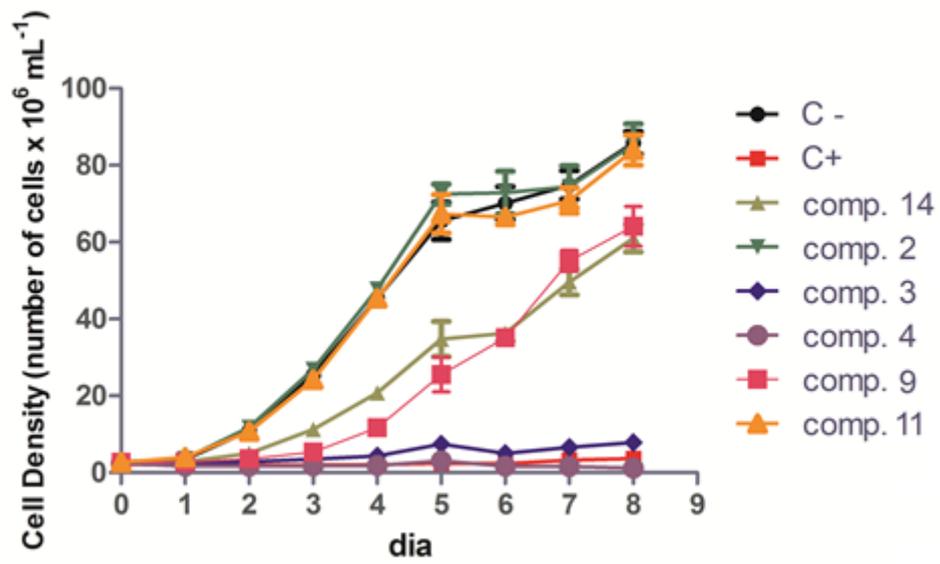
Efeito do controle negativo nos parâmetros analisados.

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Me}-\text{S}-\text{Me} \end{array}$ </div> <div style="text-align: center;"> <p>DMSO- 1,5%</p> </div> </div>					
Casal	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Vermes separados	Motilidade	
				Macho	Fêmea
1	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
2	2	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	96	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
3	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	48	0	NÃO	LEVEMENTE	LEVEMENTE
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
4	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
5	2	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	24	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	48	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	72	0	NÃO	NORMAL	NORMAL
	96	0	NÃO	NORMAL	NORMAL

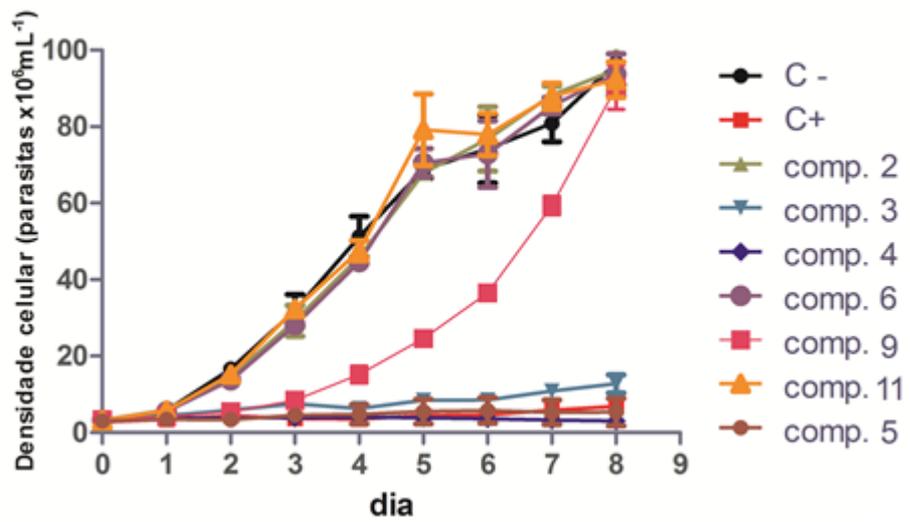
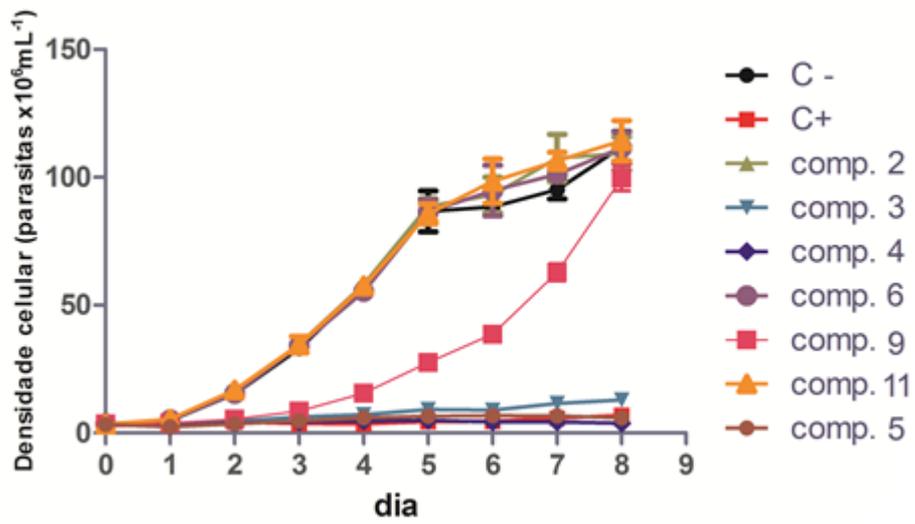
ANEXO 1

Ensaio de inibição frente ao *Trypanosoma cruzi*

Curva de inibição frente ao *Trypanosoma cruzi* – Primeiro ensaio e sua réplica



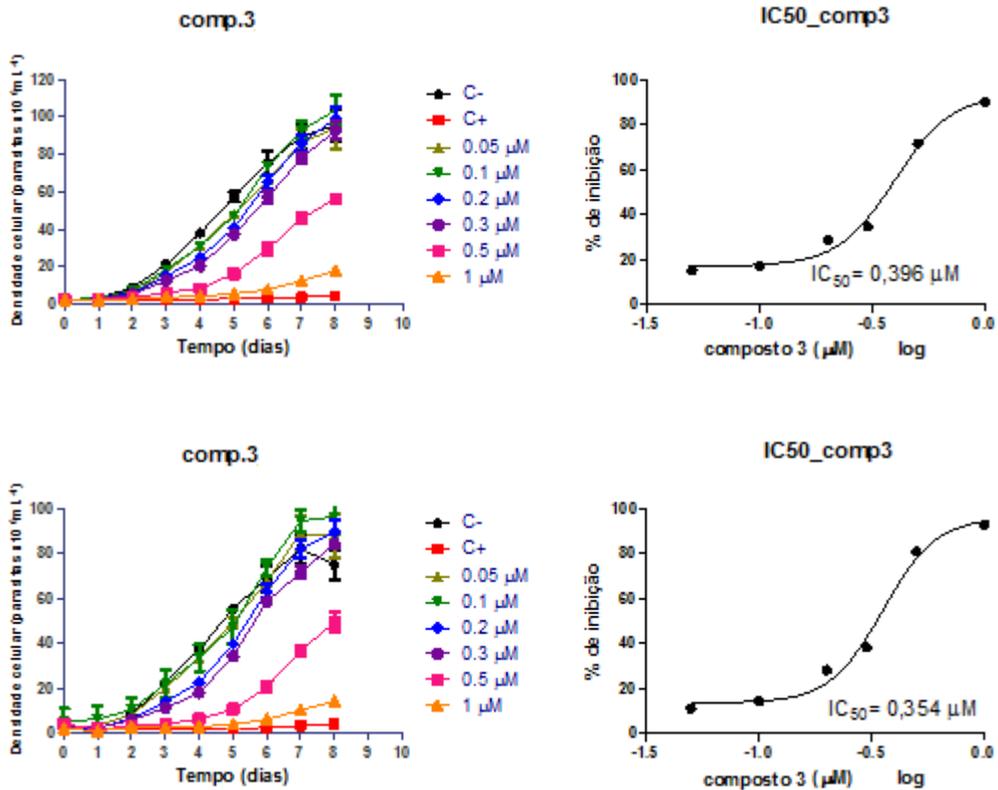
Curva de inibição frente ao *Trypanosoma cruzi* – segundo ensaio e sua réplica



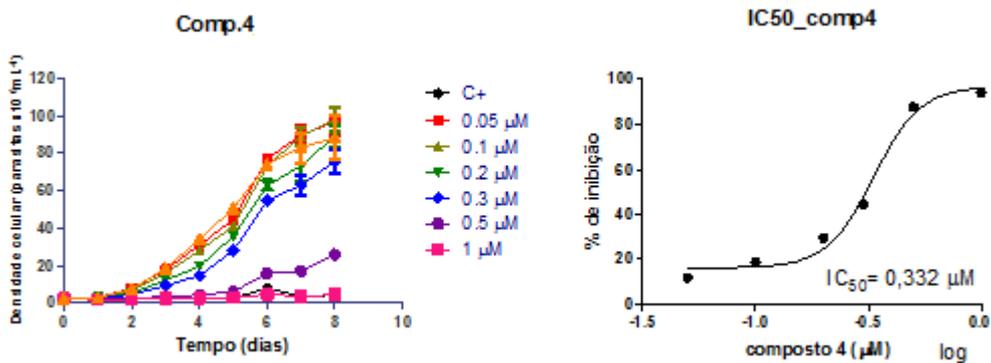
ANEXO 2

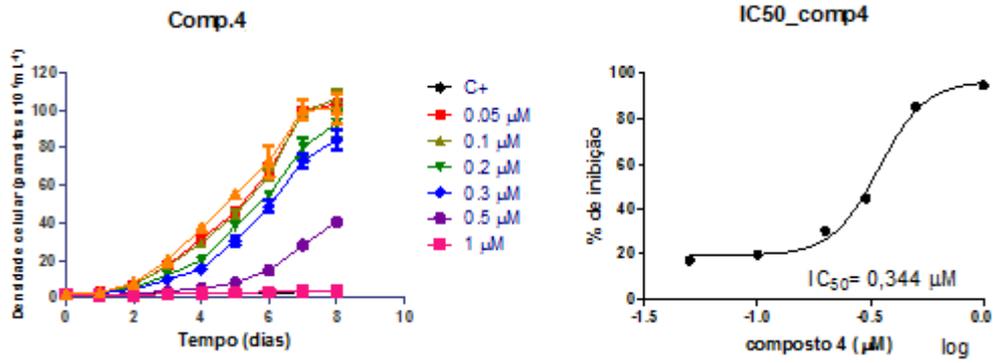
Ensaaios de IC₅₀ dos compostos 3,4 e 5

Curva de inibição (proliferação celular) em diferentes concentrações ao longo dos 8 dias e curva dose-resposta no quinto dia (IC₅₀) – composto 3 (réplica 1 e 2)



Curva de inibição em diferentes concentrações ao longo dos 8 dias e curva dose-resposta no quinto dia (IC₅₀) – composto 4 (réplica 1 e 2)





Curva de inibição em diferentes concentrações ao longo dos 8 dias e curva dose-resposta no quinto dia (IC_{50}) – composto 5 (réplica 1 e 2)

