UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Planejamento, síntese e avaliação da atividade
anti-*T. cruzi* de derivados furfurilidênicos com
estruturas azometínica e oxadiazolínica**

Fanny Palace-Berl

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Assoc. **Leoberto Costa Tavares**

SÃO PAULO
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Palace-Berl, Fanny
P153p Planejamento, síntese e avaliação da atividade anti-*T. cruzi*
de derivados furfurilidênicos com estruturas azometínica e
oxadiazolínica / Fanny Palace-Berl. -- São Paulo, 2012.
236p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico- Farmacêutica.

Orientador: Tavares, Leoberto Costa

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Síntese :
Química orgânica 3. Ensaios biológicos : Farmacologia 4. Quimiometria
I. T. II. Tavares, Leoberto Costa, orientador.

615.19 CDD

Fanny Palace-Berl

**Planejamento, síntese e avaliação da atividade
anti-*T. cruzi* de derivados furfurilidênicos com
estruturas azometínica e oxadiazolínica**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre
- versão corrigida -

Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares
Orientador

Prof. Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso
FM-IMT/USP

Prof. Dr. Roberto Parise Filho
FCF/USP

São Paulo, 27 de junho de 2012.

DEDICATÓRIA

*Ao Johann H. Berl, marido,
companheiro e amigo.*

*“We can't solve problems by using the same
kind of thinking we used when we created them.”*

Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares pela orientação, oportunidade concedida de integração ao grupo de pesquisa, apoio e confiança, fundamentais para desenvolvimento pessoal e acadêmico-científico em mais uma etapa de minha formação.

Ao Prof. Ângelo, Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso, do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical, IMT, LIM 38 - HC FM/USP, pela oportunidade de realização dos ensaios de citotoxicidade e orientações relacionadas. À Profa. Dra. Hiro Goto por permitir a realização desta etapa do trabalho em seu laboratório.

Ao Dr. Salomão Dória Jorge pelo apoio, atenção, orientações, ensinamentos práticos e teóricos repassados, imprescindíveis na elaboração deste trabalho e pela amizade e acompanhamento e auxílio em mais uma etapa de minha formação.

À Profa. Dra. Marina Ishii pela amizade, atenção, ensinamentos, pelos valiosos conselhos profissionais e pessoais e também pelo acompanhamento em mais uma etapa de minha formação.

À Profa. Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto pelos ensinamentos na área de modelagem molecular e análise exploratória, orientação e colaboração neste trabalho e nas publicações geradas. Assim como à Bárbara Vaz da Silva e Kely Medeiros Turra pelo auxílio e ensinamentos nesta área.

À Profa Dra. Andrea Masunari pelo apoio e indicação, o que possibilitou o ingresso neste grupo de pesquisa. Ao Me. Alex Alfredo de Oliveira pela colaboração e apoio neste trabalho. Ao técnico João Sussumo Murayama pelo apoio, colaboração e auxílio nos ensaios. Ao mestrando Rodrigo Rocha Zorzi pelo auxílio e colaboração durante a realização de seu trabalho de iniciação científica. Ao mestrando Leandro de Sá Bortolozzo pela participação durante a realização de seu trabalho de iniciação científica. À técnica Maria das Graças Baptista dos Santos pelos conselhos, apoio e ensinamentos. Aos colegas Ieda Sonehara e Fávero Reisdorfer Paula.

Ao grupo do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT, LIM 38 - HC FM/USP. À Dra. Lúcia Maria Almeida Braz pela disponibilidade e ensinamentos na

etapa de estudos do parasita, assim como à Érika Gakiya pelo auxílio na realização de alguns procedimentos. À Dra. Édna Barbosa de Souza pela paciência, ensinamentos e apoio na realização da etapa de cultivo celular e por disponibilizar as células utilizadas neste trabalho. À Me. Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro pelos ensinamentos relativos ao cultivo celular, assim como à Mussya Cisotto Rocha por compartilhar a cultura celular. À Dra. Sandra Regina Castro Soares pelo auxílio na realização dos ensaios realizados no IMT. À Viviane da Silva Reis pela colaboração nesta etapa do trabalho. À Simone Carolina Soares Petri pelo auxílio e apoio na realização dos ensaios de citotoxicidade.

À Professora Dra. Maria Júlia Manso Alves do Laboratório do Instituto de química, IQ/USP, pela disponibilização das cepas do *Trypanosoma cruzi* e meio de cultura utilizados neste trabalho, além de seus ensinamentos e esclarecimentos científicos sobre a manipulação deste parasita. Aos técnicos Célia e Roberto, IQ/USP, pelo auxílio no manuseio e preparo destes materiais. À Dra. Maria Inês de Almeida Gonçalves, FCF/USP, pela realização e discussão dos espectros de RMN.

À Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira, do Departamento de Farmácia-FCF/USP pelo acesso à licença acadêmica do programa MOLSIM 3.2. (*The Chem21 Group*) instalado no LAPEN.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela oportunidade de realização deste trabalho. À Miriam, Elza e Joarez, da Secretária do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - FCF/USP e ao Jorge e Elaine da Secretaria de Pós-Graduação da FCF/USP pela atenção e solicitude.

A todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Elizabete, pela compreensão e apoio, e Jerônimo (*in memoriam*). À Miriam Billerbeck Berl pelo apoio. Aos amigos Elisangela e Vagner pelo apoio.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro e bolsa concedida, essenciais para realização deste trabalho. À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

A busca de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas é de grande importância, visto que atualmente existem apenas dois fármacos disponíveis, o benznidazol e o nifurtimox. Ambos apresentam efeitos adversos consideráveis, sendo utilizado, no Brasil, apenas o benznidazol. Compostos nitro-heterocíclicos com atividade frente ao *Trypanosoma cruzi*, agente causal da doença de Chagas, tem apresentado resultados promissores. Assim, este trabalho abrange o planejamento, síntese, identificação, avaliação da atividade anti-*T. cruzi* de 5-nitro furfurilidênicos ($IC_{50} T. cruzi$) e a citotoxicidade destes compostos frente a macrófagos de linhagem J774 ($IC_{50} J774$). A nifuroxazida, composto-protótipo, inspirou as modificações moleculares originando duas séries de compostos furfurilidênicos, uma com estrutura azometínica, série I, e outra com estrutura oxadiazolínica, série II. A escolha de substituintes foi baseada no diagrama de Craig, sendo selecionados dez substituintes para cada série. Foi avaliada a atividade dos vinte compostos planejados frente ao *T. cruzi*, dos quais os mais ativos foram: 4-butil-[*N'*-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida (**4g** - $IC_{50} T. cruzi = 1,05 \mu M$, DP = 0,07) e 3-Acetil-5-(4-butilfenil)-2-(5-nitrofurano-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol (**5g** - $IC_{50} T. cruzi = 8,27 \mu M$, DP = 0,42). Comparados com os fármacos de referência, benznidazol ($IC_{50} T. cruzi = 22,69 \mu M$, DP = 1,96) e nifurtimox ($IC_{50} T. cruzi = 3,78 \mu M$, DP = 0,10), o composto **4g** demonstrou atividade anti-*T. cruzi* superior a ambos. Todos os compostos apresentaram atividade maior do que a nifuroxazida ($IC_{50} T. cruzi = 120,46 \mu M$, DP = 4,06). Para os ensaios de citotoxicidade, obteve-se para o composto mais ativo frente ao *T. cruzi*, **4g**, $IC_{50} J774 = 28,05 \mu M$, DP = 1,05, e para o composto **5g**, obteve-se $IC_{50} J774 > 400 \mu M$, o que representa que a concentração máxima avaliada deste composto não afetou as células. Ambos apresentaram boa seletividade ao efetuar a relação entre o $IC_{50} J774$ e o $IC_{50} T. cruzi$. Adicionalmente, foram realizados cálculos de propriedades físico-químicas das estruturas tridimensionais dos compostos, seguido pela análise exploratória de dados por análise de agrupamentos hierárquicos (*hierarchical clusters analysis* – HCA) e análise de componentes principais (*principal component analysis*, PCA), possibilitando a identificação das propriedades que mais influenciam na atividade anti-*T. cruzi* nas séries dos compostos estudados. Os resultados indicaram uma forte influência das propriedades ClogP e momento dipolo, evidenciando a necessidade de um equilíbrio lipofílico/hidrofílico no planejamento de novas moléculas com ação anti-*T. cruzi*.

ABSTRACT

The search for alternative therapies for the treatment of Chagas disease presents great importance, since there are only two currently available drugs, nifurtimox and benznidazole. Both have considerable adverse effects and, in Brazil, is used only benznidazole. Nitro-heterocyclic compounds with activity against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, has shown promising results. Thus, this work includes the design, synthesis, identification, evaluation of anti-*T. cruzi* activity of 5-nitro-2-furfuriliden ($IC_{50} T. cruzi$) and cytotoxicity of these compounds against J774 macrophages cell line ($IC_{50} J774$). The nifuroxazide, as a lead compound, inspired the molecular modification leading to two series of furfuriliden compounds, a azometinic structure, series I, and other with oxadiazolinic structure, series II. The choice of substituents was based on the Craig's diagram, and ten substituents were selected for each series. We evaluated the activity of twenty compounds designed against *T. cruzi*, and the most active compounds were: 4-butyl-[N'-(5-nitrofuran-2-yl) methylene] benzidrazide (**4g** - $IC_{50} T. cruzi$ = 1.05 μM , SD = 0.07) and 3-acetyl-5-(4-butylphenyl)-2 -(5-nitrofuran-2-yl)-2,3-dihydro, 1,3,4-oxadiazole (**5g** - $IC_{50} T. cruzi$ = 8.27 μM , SD = 0.42). Compared to the reference drugs, benznidazole ($IC_{50} T. cruzi$ = 22.69 μM , SD = 1.96) and nifurtimox ($IC_{50} T. cruzi$ = 3.78 μM , SD = 0.10), the compound **4g** demonstrated anti-*T. cruzi* activity superior to both drugs. All compounds showed better activity than nifuroxazide ($IC_{50} T. cruzi$ = 120.46 μM , SD = 4.06). For cytotoxicity assays, was found for the most active compound against *T. cruzi*, **4g**, $IC_{50} J774$ = 28.05 μM , SD = 1.05, and for compound **5g** was obtained $IC_{50} J774$ = >400 μM , that represents the maximum concentration of the compound evaluated which did not affect the cells. Both showed good selectivity in the calculation of the ratio between the $IC_{50} T. cruzi$ and $IC_{50} J774$. Additionally, we performed calculations of the physicochemical properties of three-dimensional structures of the compounds, followed by exploratory data analysis including hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA), which contributed to the identification of properties that influence the activity anti-*T. cruzi* in the series of compounds studied. The findings indicated a significant influence of ClogP and dipole moment properties, pointing out the need of a lipophilic/hydrophilic balance in the designing of novel anti-*T. cruzi* molecules.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribuição dos casos de doença de Chagas e presença do vetor de transmissão.....	25
Figura 2. Aspectos gerais da ultra-estrutura das formas amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C) do <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
Figura 3. Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 4. Estrutura química do benznidazol e do nifurtimox	33
Figura 5. Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos	36
Figura 6. Principais interações fármaco-receptor	40
Figura 7. Modelo do mosaico fluido da membrana celular	42
Figura 8. Esquema do grau de ionização e absorção passiva de ácidos ou bases fracas do meio extracelular para intracelular.....	44
Figura 9. Reação de ionização de ácidos benzóicos <i>para</i> ou <i>meta</i> substituídos.....	45
Figura 10. Prováveis vias de biorredução de nitrocompostos.....	47
Figura 11. Fármacos nitrofurânicos utilizados na terapêutica humana.....	49
Figura 12. Estrutura química da nifuroxazida, compostos furfurilidênicos azometínicos e oxadiazolínicos.....	52
Figura 13. Diagrama de Craig - compostos planejados, em vermelho.	53
Figura 14. Rota sintética das séries I e II.	55
Figura 15. Etapa sintética da obtenção das benzidrazidas substituídas.	56
Figura 16. Etapa sintética da obtenção de derivados azometínicos.	57
Figura 17. Etapa sintética da obtenção dos compostos furfurilidênicos oxadiazolínicos.	57
Figura 18. Esquema do procedimento geral dos ensaios de determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> na forma epimastigota.	60
Figura 19. Esquema de diluições dos compostos, fármacos e solução controle de DMSO, utilizadas em ensaio para determinação de atividade anti- <i>T. cruzi</i>	61
Figura 20. Esquema de preparação da suspensão parasitária utilizada no ensaio de determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	63
Figura 21. Esquema da preparação do ensaio para determinação de atividade anti- <i>T. cruzi</i>	65

Figura 22. Esquema do procedimento geral dos ensaios de determinação de citotoxicidade em macrófagos de linhagem J774	67
Figura 23. Esquema de diluição dos compostos e fármacos e montagem das microplacas para o ensaio de determinação de citotoxicidade em macrófagos de linhagem J774	72
Figura 24. Rota sintética para preparação de benzidrazidas substituídas em dois caminhos sintéticos.	79
Figura 25. Mecanismo de esterificação de Fischer	80
Figura 26. Mecanismo de reação de amonólise	81
Figura 27. Espectro de RMN ^1H do composto intermediário 4-nitro-benzidrazida - reação de amonólise em banho de gelo.	84
Figura 28. Espectro de RMN ^1H do composto intermediário 4-nitro-benzidrazida reduzido à amino - reação de amonólise em refluxo.	84
Figura 29. Mecanismo de reação de obtenção de bases de Schiff	85
Figura 30. Mecanismo de reação para obtenção de 2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazolínico	92
Figura 31. Placa de CCD realizada na síntese do derivado oxadiazolínico 4-metoxi (-OCH ₃) substituído	93
Figura 32. Espectro de RMN ^1H do reagente anidrido acético impuro.	94
Figura 33. Espectro de RMN ^1H do reagente anidrido acético de maior pureza.	94
Figura 34. Espectro RMN ^1H do composto <i>4h</i> com destaque para sinais característicos da série I.	97
Figura 35. Espectro RMN ^1H do composto <i>5h</i> com destaque para sinais característicos da série II.	97
Figura 36. Representação gráfica da relação entre a absorbância e o tempo de incubação em três condições: controle de solvente (1,0% e 0,5% de DMSO) e controle positivo.	102
Figura 37. Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto <i>4g</i> e valor de IC ₅₀	104
Figura 38. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco nifuroxazida e valor de IC ₅₀	105
Figura 39. Composto tetrazólico MTT, de coloração amarela, reduzido a formazan, de coloração azul.	107
Figura 40. Representação gráfica do dados da absorbância em relação a variação do número de células J774/ml em potência.	108

Figura 41. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^3 células/mL.	109
Figura 42. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^4 células/mL.	109
Figura 43. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^5 células/mL.	110
Figura 44. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^2 células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.	111
Figura 45. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^3 células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.	111
Figura 46. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^4 células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.	112
Figura 47. Representação gráfica do dados da absorbância e concentrações de SFB na ordem de grandeza de 10^4 células/mL em 2 h, 24 h e 48 h.	113
Figura 48. Representação gráfica dos dados de porcentagem de inibição do crescimento e concentrações do composto 4g em diferentes ordens de grandeza de $2,0 \cdot 10^3$ (A), $1,0 \cdot 10^4$ (B), $1,0 \cdot 10^5$ (C) células/mL e diferentes concentrações de SFB (1%, 5%, 10% e 20%).....	114
Figura 49. Curva de crescimento celular em cultura, em que μ' representa a taxa de crescimento celular, e fase lag (A), fase log (B), fase estacionária (C), fase de declínio (D).....	115
Figura 50. Representação gráfica dos dados da absorbância de células J774 a $1,0 \cdot 10^4$ células/mL em $\lambda=570$ nm e $\lambda=595$ nm	116
Figura 51. Representação gráfica dos dados da absorbância de células J774 a $1 \cdot 10^4$ células/mL com solvente DMSO	116
Figura 52. Curva dose-resposta da inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto 4g e valor de IC_{50}	117
Figura 53. Curva dose-resposta da inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto 4f e valor de IC_{50}	118
Figura 54. Curva dose-resposta da inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto 4g e valor de IC_{50}	118
Figura 55. Curva dose-resposta da inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto 5f e valor de IC_{50}	119
Figura 56. Curva dose-resposta da inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto NFX. e valor de IC_{50}	119

Figura 57. Representação da construção dos modelos moleculares 3D (NF e 5a) a partir das coordenadas cartesianas das estruturas cristalografadas.....	123
Figura 58. Representação da estrutura da NF nas duas conformações.....	123
Figura 59. Mapas de potencial eletrostático, MPEs, dos compostos 4g e 5g, fármacos de referência, BZ e NFX, e compostos-protótipos, NF.....	126
Figura 60. Mapas de potencial lipofílico, MLPs, dos compostos 4g e 5g, fármacos de referência, BZ e NFX, e compostos-protótipos, NF.	128
Figura 61. Mapas de distribuição de orbitais moleculares de HOMO (A) e LUMO (B) calculados com o método HF/3-21G* para os compostos 4g e 5g.....	129
Figura 62. Vetores de dipolo para os compostos 4g e 5g.	130
Figura 63. Valores de IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> em potência (log1/C) do composto protótipo, NF, fármacos de referência, BZ e NFX, e compostos das séries I e II.	133
Figura 64. Gráficos de dispersão da variável x16, ClogP _{SV} , e x26, PSA em relação a y, atividade anti- <i>T. cruzi</i> . Valores do coeficiente de correlação de Person, R.....	133
Figura 65. Dendograma dos compostos estudados das séries I e II.....	135
Figura 66. Dendograma dos descritores estudados.....	136
Figura 67. Gráfico de escores entre PC1 e PC2, grupo dos compostos mais ativos em destaque e os compostos 4g e 5g mais isolados.....	138
Figura 68. Gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis com os compostos 4g e 5g isolados como amostras atípicas.	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diluições realizadas para os compostos <i>4g</i> e <i>4j</i> , e para os fármacos NF e NFX como auxílio na determinação do IC ₅₀ frente ao <i>T. cruzi</i> .	63
Tabela 2. Variação do número de células e volume da suspensão celular e meio de cultura utilizados nos ensaios.	70
Tabela 3. Dados experimentais das benzidrazidas 4-R-substituídas: rendimento, faixa de fusão e massa molar	82
Tabela 4. Rendimentos experimentais na obtenção de benzidrazidas 4-R-substituídas comparados aos rendimentos descritos na literatura.	83
Tabela 5. Dados experimentais de derivados azometínicos 4-R-substituído, série I: rendimento, faixa de fusão e massa molar	86
Tabela 6. Rendimentos parciais e global das etapas de obtenção dos derivados azometínicos 4-R-substituídos, série I	87
Tabela 7. Principais sinais de RMN ¹ H (ppm) em DMSO – <i>d</i> ₆ de derivados azometínicos 4-R-substituídos, série I	89
Tabela 8. Principais sinais de RMN ¹³ C (ppm) em DMSO – <i>d</i> ₆ de derivados azometínicos 4-R-substituídos, série I	90
Tabela 9. Dados da análise elementar de derivados azometínicos 4-R-substituídos, série I	91
Tabela 10. Dados experimentais dos derivados oxadiazolínicos 4-R-substituído, série II: rendimento, faixa de fusão e massa molar	95
Tabela 11. Rendimentos parciais e global das etapas de obtenção dos derivados oxadiazolínicos 4-R-substituídos, série II	96
Tabela 12. Principais sinais de RMN ¹ H (ppm) em DMSO – <i>d</i> ₆ de derivados oxadiazolínicos 4-R-substituídos, série II	98
Tabela 13. Principais sinais de RMN ¹³ C (ppm) em DMSO – <i>d</i> ₆ de derivados oxadiazolínicos 4-R-substituídos, série II	99
Tabela 14. Dados da análise elementar de derivados oxadiazolínicos 4-R-substituídos, série II	100
Tabela 15. Relação entre absorbância e o tempo de incubação em três condições: controle de solvente (1% e 0,5% de DMSO) e controle positivo.	102
Tabela 16. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto <i>4g</i> .	104

Tabela 17. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco NF.	105
Tabela 18. Atividade anti- <i>T. cruzi</i> dos compostos e fármacos representados como IC ₅₀ <i>T. cruzi</i>	106
Tabela 19. Dados da absorbância relacionados a variação do número de células J774/mL em potência.	108
Tabela 20. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10 ³ células/mL.	109
Tabela 21. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10 ⁴ células/mL.	109
Tabela 22. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10 ⁵ células/mL.	110
Tabela 23. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10 ² células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.	111
Tabela 24. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10 ³ células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.	111
Tabela 25. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10 ⁴ células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.	112
Tabela 26. Dados da absorbância e concentrações de SFB na ordem de grandeza de 10 ⁴ células/mL em 2 h, 24 h e 48 h.	113
Tabela 27. Porcentagem de inibição do crescimento e concentrações do composto 4g em diferentes ordens de grandeza de 2,0*10 ³ (A), 1,0*10 ⁴ (B), 1,0*10 ⁵ (C) células/mL e diferentes concentrações de SFB (1%, 5%, 10% e 20%).	114
Tabela 28. Dados da absorbância de células J774 a 1,0*10 ⁴ células/mL em λ=570 nm e λ=595 nm	116
Tabela 29. Dados da absorbância de células J774 a 1*10 ⁴ células/mL com solvente DMSO	116
Tabela 30. Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto 4e.	117
Tabela 31. Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto 4f.	118
Tabela 32. Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto 4g.	118
Tabela 33. Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto 5f.	119

Tabela 34. Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto NFX.....	119
Tabela 35. . Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto 5e.	120
Tabela 36. . Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto 5g.	120
Tabela 37. . Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto BZ.	121
Tabela 38. Citotoxicidade dos compostos e fármacos em macrófagos de linhagem J774, representados como IC ₅₀ J774.....	121
Tabela 39. Atividade anti- <i>T. cruzi</i> , representado por IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade dos compostos e fármacos em macrófagos de linhagem J774, representados como IC ₅₀ J774	122
Tabela 40. Valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para osconfômeros de energia mais baixa selecionados do PAC da NF e do composto 5a.	125
Tabela 41. Valores dos coeficientes de partição calculados por diferentes metodologias.....	127
Tabela 42. Descritores calculados e obtidos de literatura para os compostos das séries I e II.....	131
Tabela 43. Atividade anti- <i>T. cruzi</i> , representado por IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> , dos composto-protótipo, fármacos referência e compostos da séries I e II.....	132
Tabela 44. Resultados obtidos da análise de PCA quanto a contribuição das PCs e valores dos pesos dos descritores.....	138

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A: Absorbância

AM1: *Austim model 1*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASA: Superfície acessível à solvente

ASA+: Superfície acessível à solvente de todos os átomos com carga parcial positiva

ASA-: Superfície acessível à solvente de todos os átomos com carga parcial negativa

ASA_h: Superfície acessível à solvente de todos os átomos hidrofóbicos

ASA_p: Superfície acessível à solvente de todos os átomos hidrofílicos

B1 e B5: Parâmetros de STERIMOL (VERLOOP, 1987)

B.O.D.: *Biochemical oxygen demand* (Demanda bioquímica de oxigênio)

BZ: benznidazol

%C: Porcentagem de citotoxicidade

CCD: Cromatografia em camada delgada

CDC: *Center for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CHELPG : *Charges from electrostatic potentials using a grid based method* (cargas de potencial eletrostático baseado no método *grid*)

ClogP: Coeficiente de partição calculado

CP: Controle positivo

CS: Solução controle

DM: Dinâmica molecular

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMSO-*d*₆: Dimetilsulfóxido deuterado

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DNDi: *Drugs for Neglected Diseases initiative* (iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas)

DP: Desvio padrão

DTU: *Discrete typing units* (Discretas unidades de tipagem)

E_{HOMO}: Energia do orbital de fronteira HOMO

E_{LUMO}: Energia do orbital de fronteira LUMO

FDA: *Food and Drug Administration* (Administração Federal de Alimentos e Medicamentos)

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

fs: Fentosegundo

GAO: U.S. *Government Accountability Office* (Escritório de Prestação de Contas do Governo dos EUA)

G-FINDER: *Global Fundation of Innovation for Neglected Diseases* (Fundo Global de Inovação para Doenças Negligenciadas)

GAP: Diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO}

HF: Método *ab initio* Hartree-Fock

HCA: *Hierarchical cluster analysis* (análise de agrupamentos hierárquicos)

IC: Inibição do crescimento

$IC_{50 \text{ } T. \text{ cruzi}}$: Concentração inibitória de 50% das células do *Trypanosoma cruzi*

$IC_{50 \text{ J774}}$: Concentração inibitória de 50% de macrófagos J774

IMS: Consultoria e serviços na área da saúde - IMS Health

INCOSUR: Organização denominada "Chagas: iniciativa do Cone Sul para controlar/eliminar a doença de Chagas"

J : Constante de acoplamento

K_a : Constante de ionização ácida

K_b : Constante de dissociação da base

L : Parâmetros de STERIMOL (VERLOOP, 1987)

LAFEPE: Laboratório farmacêutico do estado de Pernambuco

LIT: *Liver infusion triptose* (Infusão de fígado e triptose)

$\log P$: Coeficiente de partição

MPEs: *Maps of electrostatic potential* (Mapas de potencial eletrostático)

MLPs: *Maps of lipophilicity potential* (Mapas de potencial lipofílico)

MM2: Campo de força empírico

MM+: Campo de força derivado do MM2

MR: Refratividade molar

MS: Ministério da Saúde

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

N: Normalidade

NCE: *New chemical entity* (Nova entidade química)

NDA: *New drug application* (Aplicação nova de medicamento)

NF: nifuroxazida

NFX: nifurtimox

NP: Número de parasitas

ONG: Organização não-governamental

OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde

P&D: Pesquisa e desenvolvimento

PA: *Pro-analyse* (Reagente grau analítico)

PAC: Perfil de amostragem conformacional

PBS: *Phosphate buffered saline* (Solução salina tamponada com fosfato)

PC: Componente principal

PCA: Principal component analysis (análise de componentes principais)

PhRMA: *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America* (Pesquisa e Manufatura Farmacêutica da América)

PSA: Área de superfície polar

pKa: Logaritmo do inverso da constante de ionização ácida, K_a

QSAR: *Quantitative structure-activity relationships* (Relações quantitativas estrutura-atividade)

r^2 : Coeficiente de determinação

R: Coeficiente de correlação de Pearson

R_f : Fator de retenção

R_{fator} : Uma medida, em Å, de quanto os dados originais um modelo cristalográfico explica, sendo proporcional à resolução

RMSD: *Root mean square deviation* (desvio médio da raiz quadrada)

RMN ^{13}C : Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN ^1H : Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPMI 1640: Meio de cultura desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial[®]

SFB: Soro fetal bovino

S.O.D.: Superóxido desmutase

SAR: *Structure-activity relationships* (Relações estrutura-atividade)

T(SH₂): Tripanotiona ditiol

TMS: Tetrametilsilano

TR: Tripanotiona redutase

TS₂: Dissulfeto de tripanotiona

UV/VIS: Ultravioleta visível

UV: Ultravioleta

V_m : Volume molar

V_w : Volume de van der Waals

WHO/OMS: *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

$\eta\%$: Porcentagem de rendimento

δ : Deslocamentos químicos em ressonância magnética nuclear

π : Constante de grupo de Hansch

σ : Constante de grupo de Hammett

λ : Comprimento de onda

μ : Momento de dipolo

μ' : Representa a taxa específica de crescimento celular

$\mathcal{F}$ ou F: Constante de efeito indutivo de Swain e Lupton

$\mathcal{R}$ ou R: Constante de efeito de ressonância de Swain e Lupton

.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVO.....	24
3 FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 Doença de Chagas.....	25
3.1.1 Características da doença de Chagas	28
3.1.2 Características do <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
3.1.3 Fármacos disponíveis para a doença de Chagas	33
3.2 Planejamento e desenvolvimento de novos fármacos.....	35
3.2.1 Estudos de relações entre estrutura química e atividade biológica.....	39
3.2.2 Propriedades físico-químicas que influenciam a ação de fármacos.....	41
3.3 Compostos nitrofurânicos	46
4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	51
4.1 Planejamento das séries de compostos	51
5 MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1 Obtenção dos compostos planejados	55
5.1.1 Obtenção de benzidrazidas substituídas.....	55
5.1.2 Obtenção de derivados azometínicos.....	56
5.1.3 Obtenção de derivados oxadiazolínicos.....	57
5.2 Identificação dos compostos	58
5.3 Determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> frente a forma epimastigota	59
5.3.1 Procedimento geral do ensaio de determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	59
5.3.2 Preparo das soluções dos compostos e dos fármacos	60
5.3.3 Preparo da suspensão parasitária	63
5.3.4 Preparo do ensaio para determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	64
5.3.5 Tratamento dos dados obtidos	66
5.4 Determinação da citotoxicidade em macrófago murino de linhagem J774.....	66

5.4.1 Procedimento geral do estudo de citotoxicidade	67
5.4.2 Determinação de parâmetros do ensaio de citotoxicidade	69
5.4.3 Determinação da citotoxicidade dos compostos e fármacos.....	71
5.4.4 Tratamento dos dados obtidos	73
5.5 Estudos de relações estrutura-atividade	74
5.5.1 Construção dos modelos moleculares tridimensionais (3D).....	74
5.5.2 Cálculos das propriedades moleculares	76
5.5.3 Análise exploratória dos dados: HCA e PCA	76
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
6.1 Síntese e identificação dos compostos	79
6.1.1 Obtenção e identificação das benzidrazidas substituídas.....	79
6.1.2 Obtenção e identificação dos derivados azometínicos.....	85
6.1.3 Obtenção e identificação de derivados oxadiazolínicos	92
6.2 Determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> frente a forma epimastigota	101
6.3 Determinação da citotoxicidade em macrófago murino de linhagem J774.....	107
6.3.1 Determinação de parâmetros do ensaio de citotoxicidade	108
6.3.2 Determinação da citotoxicidade dos compostos e fármacos.....	115
6.4 Estudos de relações estrutura-atividade	122
6.4.1 Construção dos modelos moleculares 3D	122
6.4.2 Cálculos das propriedades moleculares	125
6.4.3 Análise exploratória dos dados	134
7 CONCLUSÕES	141
REFERÊNCIAS.....	142
Anexo 1 - Esquema de distribuição dos compostos e fármacos em cubetas utilizado na execução dos ensaios de atividade anti- <i>T. cruzi</i>	155
Anexo 2 - Esquema de distribuição dos compostos e fármacos em microplacas para execução dos ensaios de citotoxicidade em macrófagos de linhagem J774	157
Anexo 3 - Espectros de RMN ¹ H e RMN ¹³ C dos compostos da série I azometínica	159

Anexo 4 - Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto-protótipo nifuroxazida	181
Anexo 5 - Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos da série II oxadiazolínica	185
Anexo 6 - Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos fármacos benznidazol e nifurtimox	207
Anexo 7 - Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário em diferentes concentrações dos compostos da série I.....	213
Anexo 8 - Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário em diferentes concentrações dos compostos da série II	219
Anexo 9 - Curva dose-resposta da inibição de crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto-protótipo nifuroxazida	225
Anexo 10 - Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário em diferentes concentrações dos fármacos de referência, benznidazol e nifurtimox	227
Anexo 11 - Representação gráfica dos confôrmeros e suas energias totais da simulação de dinâmica molecular	229
Anexo 12 - Propriedades calculadas e obtidas em literatura dos compostos das séries I e II.....	233

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas pertence a um grupo de enfermidades que acometem, principalmente, populações mais pobres de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Estas enfermidades são consideradas negligenciadas, em razão de receberem pouco investimento na pesquisa de novos fármacos, principalmente devido ao baixo retorno financeiro (LIESE, ROSENBERG, SCHRATZ, 2010).

Estima-se atualmente que esta doença afete entre 8 e 10 milhões de indivíduos em países da América Latina, sendo crescente o número de casos em regiões ainda não endêmicas, demonstrando a necessidade de direcionar esforços no controle desta doença em regiões de maior incidência (DNDi, 2012, WHO, 2010, RASSI JR, RASSI, MARINETO, 2010).

Considerando a farmacoterapia, desde a década de 70, os únicos fármacos disponíveis para a doença de Chagas são o benznidazol e o nifurtimox. Ambos apresentam efeitos adversos consideráveis, sendo que, em muitos países, como Brasil, Venezuela, Chile, entre outros, utiliza-se apenas o benznidazol, principalmente devido apresentar menor toxicidade em relação ao nifurtimox. Além disso, estes fármacos são ineficazes na fase crônica da doença, limitando seu emprego (COURA, CANÇADO, 2007, COURA, CASTRO, 2002).

A necessidade de pesquisar novas alternativas para o combate da doença de Chagas é evidente e, derivados nitrofurânicos com atividade frente ao *Trypanosoma cruzi*, agente causal da doença de Chagas, apresentam-se como alternativa bastante viável para estudos de modificação molecular focando a busca de novos compostos-protótipos otimizados (JORGE, 2011, ISHII *et al.*, 2011).

Diante deste quadro, o presente trabalho foi direcionado para a obtenção de compostos furfurilidênicos visando identificar propriedades físico-químicas e estruturais que possam favorecer a atividade frente ao *T. cruzi*. Para tanto, foram abordadas, neste trabalho, as etapas de planejamento, síntese e identificação dos compostos, avaliação da atividade biológica frente ao parasita em sua forma epimastigota, avaliação da citotoxicidade frente a macrófagos de alguns dos compostos obtidos e o estudo da relação entre a estrutura planejada e a atividade biológica verificada, com o objetivo de identificar compostos com características promissoras para o tratamento desta enfermidade.

2 OBJETIVO

Este estudo tem por objetivo avaliar a atividade anti-*T. cruzi* e a citotoxicidade de derivados furfurilidênicos com estruturas azometínica e oxadiazolínica, envolvendo as etapas de planejamento, síntese e identificação dos compostos, a fim de verificar as relações entre estrutura química e atividade biológica que possam auxiliar na previsão de novos compostos com perfil farmacológico otimizado e direcionar para a seleção de novos candidatos a fármaco.

Objetivos específicos:

- Planejar duas séries de compostos nitrofurânicos;
- Sintetizar e identificar os compostos planejados;
- Determinar a atividade anti-*T. cruzi in vitro* dos compostos obtidos frente à cepa Y do parasita em sua forma epimastigota;
- Determinar a citotoxicidade em macrófagos murino, linhagem J774, de alguns compostos selecionados considerando a atividade anti-*T. cruzi* observada;
- Realizar os estudos das relações entre as propriedades físico-químicas das estruturas planejadas com a atividade anti-*T. cruzi* aplicando a análise exploratória de dados HCA e PCA.

3 FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doença de Chagas

Caracterizada como enfermidade parasitária, a tripanossomíase americana ou doença de Chagas é considerada endêmica em 21 países da América Latina. Estudos epidemiológicos recentes desta doença estimam que existam cerca de 8 a 10 milhões de pessoas contaminadas nas regiões endêmicas, sendo que a cada ano surgem 41.200 novos casos e, 100 milhões de pessoas estão vivendo em área sob risco de contrair a doença. A mortalidade anual estimada decorrente da doença de Chagas é 12.000 pessoas (DNDi, 2012, WHO, 2010).

No Brasil, região endêmica da doença, estima-se que cerca de 3 milhões de pessoas estejam contaminadas (BRASIL, 2009). As distribuições estimadas dos casos de doença de Chagas mundial bem como a presença do vetor de transmissão estão ilustrados na figura 1 (WHO, 2010, COURA, VIÑAS, 2010).

Figura 1. Mapa de distribuição dos casos de doença de Chagas e presença do vetor de transmissão.

Reproduzido com a permissão de WHO, SAVIOLI, L., DAUMERIE, D. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - Report 2010*, 184p. Copyright (2010).

Atualmente estão ocorrendo aumento do número de casos em regiões não endêmicas devido, principalmente, ao crescente índice da migração de indivíduos

contaminados de regiões endêmicas para outras regiões. As principais regiões não endêmicas que apresentam casos da doença estão na América do Norte (Estados Unidos e Canadá), na região do Pacífico ocidental (principalmente Japão e Austrália) e, mais recentemente, na Europa (sobretudo a Bélgica, Espanha, França, Itália, Reino Unido e Suíça, e em menor grau, Alemanha, Áustria, Croácia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Romênia e Suécia). Estima-se que haja mais de 300.000 pessoas portadoras desta doença nos Estados Unidos, no Canadá mais de 5.500, na Europa e na região do Pacífico ocidental mais de 80.000, no Japão mais de 3.000 e na Austrália mais de 1.500 pessoas (DNDi, 2012, WHO, 2010, COURA, VIÑAS, 2010).

Considerando que a doença de Chagas no Brasil afeta cerca de 3 milhões de pessoas e que o índice de contaminados em países não endêmicos é de aproximadamente 390.000 pessoas, pode-se inferir que o índice de contaminados em países não endêmicos representa apenas 13% em relação ao total de contaminados no Brasil. Adicionalmente, comparado com o número de contaminados na América Latina, entre 8 a 10 milhões de indivíduos, esta relação decresce ainda mais (DNDi, 2012, WHO, 2010, RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010). Estes dados demonstram a necessidade de esforços direcionados aos países endêmicos no controle desta doença.

A doença de Chagas é considerada negligenciada e pertence a um grupo de enfermidades parasitárias, que acometem principalmente populações pobres de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (DNDi, 2012, MORAN *et al.*, 2011, WHO, 2010). Entre as principais doenças negligenciadas citam-se: a malária, a tuberculose, as doenças diarréicas, a dengue, as infecções por helmintos, a leishmaniose, a salmonelose, a doença do sono, a doença de Chagas, a hanseníase, a úlcera de Buruli, o tracoma, a febre reumática e a febre amarela (MORAN *et al.*, 2011, LIESE, ROSENBERG, SCHRATZ, 2010). Dentre estas, há subdivisão conforme direcionamento de investimentos, colocando a malária e tuberculose como as doenças que recebem maiores recursos, enquanto que, a doença de Chagas, se encontra classificada entre as doenças mais negligenciadas (MORAN *et al.*, 2011).

Apesar do baixo interesse no combate destas doenças, existem algumas organizações que promovem seu controle, sendo uma das principais a *iniciativa* de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi, *Drug for Neglected Diseases initiative*). A DNDi é uma organização criada em 2003 pela organização não-

governamental (ONG) Médicos Sem Fronteiras, tendo como parceiros fundadores o Instituto Pasteur na França, a Fiocruz no Brasil, o Ministério da Saúde da Malásia e os institutos de pesquisa clínica da Índia e do Quênia. Esta organização visa pesquisar e desenvolver novos tratamentos para as doenças mais negligenciadas, incentivando a pesquisa em países endêmicos (DNDi, 2012).

Outra organização, porém com direcionamento apenas para o tratamento da doença de Chagas, é a "Chagas: Iniciativa do Cone Sul para controlar/eliminar a doença de Chagas" (INCOSUR), a qual foi criada em Brasília em 1991 pelos Ministros da Saúde da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, contribuindo com projetos sub-regionais apoiado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (WHO, 2012, LIESE, ROSENBERG, SCHRATZ, 2010).

É interessante citar que algumas indústrias farmacêuticas realizam programas de doação de medicamentos destinados às doenças negligenciadas, tendo como exemplo o programa sustentado pela Bayer *Healthcare*, em acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), de doação de comprimidos do fármaco nifurtimox, indicado para o combate da doença na fase aguda em alguns países. Este programa foi estendido recentemente, passando de cerca de 2,5 milhões de comprimidos doados desde 2007 para 5 milhões de comprimidos a serem doados entre 2012 a 2017 (WHO, 2012, LIESE, ROSENBERG, SCHRATZ, 2010).

Outra exemplo relevante é a indústria farmacêutica Glaxo Smith Kline, GSK, a qual tem investido em pesquisa e desenvolvimento para doenças negligenciadas. Sua filial em Três Cantos, na Espanha, é dedicado à descoberta de novos medicamentos para tratar doenças como malária e tuberculose. A partir de 2010, a GSK ampliou a missão da unidade espanhola para incluir doenças tropicais negligenciadas, usando o conceito e a abordagem de "inovação aberta", o que facilita a colaboração entre o meio acadêmico e a indústria, sendo realizadas parcerias com Universidades e agências de fomento no Brasil (FIOCRUZ, 2010).

3.1.1 Características da doença de Chagas

A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico Carlos Justiniano Ribeiro Chagas como sendo uma infecção tecidual e hematológica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Seus vetores naturais pertencem ao grupo de insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo o *Triatoma infestans* o vetor mais importante da doença, popularmente conhecido por “barbeiro” (BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

Em 2006, o Brasil foi certificado pela OMS como livre da transmissão da doença pelo *T. infestans*, porém a ausência do vetor não representa a erradicação da doença (SOARES SOBRINHO *et al.*, 2007). O contato com as fezes ou urina contaminadas do vetor infectado é a causa mais comum de infecção, contudo, o *T. cruzi* pode ser transmitido ao homem por vias alternativas (DNDi, 2012, RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010). Entre elas, cita-se a transfusão sanguínea, que ocorre pela transfusão de hemocomponentes ou sangue de doadores infectados a receptores sadios, assim ocorre também no transplante de órgãos; a transmissão congênita, que ocorre pela passagem de parasitas de mulheres infectadas pelo *T. cruzi* para seus filhos durante a gestação, durante o parto ou até pelo leite materno; a transmissão por via oral, que ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com parasitas provenientes de secreções de triatomíneos infectados; e a contaminação laboratorial acidental, que ocorre principalmente pelo contato da pele ferida ou de mucosas com material contaminado durante manipulação em laboratório (JACKSON *et al.*, 2009, NOBREGA *et al.*, 2009, LUNARDELLI *et al.*, 2007, ARRIETA *et al.*, 2004).

A transmissão desta doença por transfusão sanguínea e por transmissão congênita são as principais formas de contaminação de seres humanos em zonas urbanas e em países não endêmicos (O'BRIEN *et al.*, 2012, RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010). A transmissão oral da doença de Chagas é geralmente responsável por surtos regionais de infecção aguda, resultando normalmente em quadro clínico agudo grave e apresentando alta mortalidade. Os acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos e via leite materno são formas menos comuns de transmissão da doença (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010).

Os sintomas da doença de Chagas podem ser divididos em dois estágios principais, a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda é caracterizada por elevada parasitemia e poucas manifestações clínicas, como febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Esta fase pode apresentar manifestações locais indicando local da porta de entrada do parasita, como o sinal de Romaña, o qual ocorre quando o parasita penetra pela conjuntiva ocular formando edema bipalpebral unilateral, ou quando o parasita penetra por lesões na pele, apresentando o chagoma de inoculação. Estas manifestações aparecem em 50% dos casos agudos dentro de 4 a 10 dias após contágio (BRASIL, 2010, REY, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

A fase crônica ou tardia, desenvolve-se em 30 a 40% dos pacientes infectados. Esta fase corresponde à lenta destruição das células infectadas pelo parasita, ocorrendo diminuição da parasitemia e tropismo por tecidos ricos em macrófagos, fibras musculares esqueléticas, miocardiócitos, sendo dependente do tipo de cepa parasitária (REY, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000). É uma fase altamente incapacitante e pode levar à falência do órgão acometido, tendo a morte como consequência. Inicialmente, essa fase é assintomática, sendo denominada fase indeterminada, não apresentando sinais de comprometimento cardíaco e/ou digestivo. Posteriormente, pode se apresentar principalmente como crônica cardíaca, provocando alterações cardíacas, como arritmias e cardiomiopatias, ou como crônica digestiva, afetando o esôfago (megaesôfago) ou o intestino (megacólon) (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

O diagnóstico da doença de Chagas é realizado em função do estágio da doença. Na fase aguda, a parasitemia é alta, permitindo a pesquisa dos parasitas ao microscópio de amostras sanguíneas do paciente. Durante a fase crônica ocorre uma resposta imunológica mais consistente o que a torna a base do diagnóstico, juntamente com as alterações clínicas (DNDi, 2012, ARRIETA *et al.*, 2004).

O tratamento utilizado atualmente se limita a dois fármacos, benznidazol e o nifurtimox, sendo eficazes principalmente na fase aguda da doença, com índice de cura de 80%. Na maior parte dos casos a fase crônica da doença acaba tendo seu tratamento direcionado para os sinais e sintomas, pois o índice de cura cai para aproximadamente 20% (DNDi, 2012, RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010, COURA, 2009).

3.1.2 Características do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*. A denominação da ordem Kinetoplastida é decorrente da presença de uma estrutura chamada cinetoplasto que é constituída por uma rede de moléculas de DNA (kDNA), localizada na mitocôndria única do protozoário (REY, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

Este parasita possui três tipos morfológicos distintos, sendo estes a forma amastigota, a epimastigota e a tripomastigota. A forma amastigota, figura 2A, é caracterizada pela pequena dimensão, contorno circular, ovóide ou fusiforme, núcleo excêntrico e flagelo contido no bolso flagelar não ultrapassando a borda celular. A forma epimastigota, figura 2B, apresenta-se alongada (fusiforme), cinetoplasto discóide próximo ao núcleo, bolso flagelar estreito abrindo-se lateralmente, flagelo longo com membrana flagelar. A forma tripomastigota, figura 2C, possui característica alongada e achatada, cinetoplasto arredondado e distante do núcleo, bolso flagelar próximo ao núcleo. O flagelo percorre toda extensão celular (REY, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

Na figura 2, estão ilustradas as características principais e aspectos gerais da estrutura das formas do *T. cruzi*. Observa-se o posicionamento e o formato do cinetoplasto nos três tipos morfológicos, verificando a diferença entre as formas epimastigota e tripomastigota.

Figura 2. Aspectos gerais da ultra-estrutura das formas amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C) do *Trypanosoma cruzi* (BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

A forma epimastigota é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor; a forma tripomastigota é encontrada na porção terminal do tubo digestivo do vetor, sendo denominada tripomastigota metacíclico, e na circulação do hospedeiro mamífero, denominada tripomastigota sanguínea; e por fim, a forma amastigota que é encontrada no citoplasma de células de mamíferos (REY, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi*, figura 3, apresenta as formas do parasita em seus diferentes estágios. A forma infectante encontrada no inseto, tripomastigota metacíclico, é introduzida no hospedeiro mamífero a partir das fezes do inseto. Estas formas penetram nas células do hospedeiro definitivo, transformam-se em amastigotas que se reproduzem por fissão binária no citoplasma (CDC, 2012, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

Figura 3. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

Reproduzido com a permissão de CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.
Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 04 Jan 2012.

As formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que, após ruptura celular, migram para a corrente sanguínea e invadem novas células. Quando os tripomastigotas são ingeridos por um inseto triatomíneo, transformam-se em epimastigotas que se multiplicam no tubo digestivo do vetor. As formas epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos na porção terminal do tubo digestivo, sendo aptos a contaminar outro hospedeiro (CDC, 2012, REY, 2002).

O *T. cruzi* é um organismo diplóide que se multiplica por divisão binária. Como consequência de sua evolução, estes parasitas apresentam grande diversidade genotípica que se manifesta por diferenças no comportamento biológico como, por exemplo, adaptação a diversas espécies de triatomíneos, variações na sensibilidade aos fármacos, diferentes graus de virulência para animais experimentais e humanos, tropismo tissular preferencial e indução de manifestações clínicas da doença (WHO, 2010, ZINGALES *et al.*, 2009, ANDRADE, 1985).

Alguns estudos do comportamento biológico de cepas do *T. cruzi* agrupam os isolados ou cepas em três tipos ou biotipos. O tipo I, representado principalmente pela cepa Y, é constituído por cepas com predomínio de formas delgadas e macrofagotropismo na fase inicial da infecção, com multiplicação rápida, apresentando elevada parasitemia e mortalidade dos camundongos, que evoluem para o óbito entre o 7º e 12º dia após a inoculação. O tipo II, representado principalmente pela cepa São Felipe, se revela com predominância de formas largas, miocardiotropismo, multiplicação relativamente lenta e picos de parasitemia irregulares entre o 12º e 20º dias após a infecção, período este de mortalidade máxima. O tipo III, representado principalmente pela cepa Colombiana, é composto por cepas com predomínio de formas largas, baixa multiplicação, picos de parasitemia tardios entre os dias 20º e 30º após a infecção, tropismo por musculatura esquelética e óbito com 50 dias após a infecção (DEVERA *et al.*, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000, ANDRADE, 1985).

Atualmente, devido à ampla diversidade genética do *T. cruzi*, a espécie é dividida em seis discretas unidades de tipagem (DTU, *Discrete Typing Units*), denominadas *T. cruzi* I a VI. (TcI a TcVI), sendo que a cepa Y é classificada como TcII, com predominância em São Paulo, Brasil, e possui o homem como principal hospedeiro (ZINGALES *et al.*, 2009). O DTU TcII é caracterizado por apresentar cardiopatias e mega síndromes como manifestações clínicas da doença (ZINGALES *et al.*, 2012).

3.1.3 Fármacos disponíveis para a doença de Chagas

Atualmente existem apenas dois fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, sendo estes o nifurtimox e o benznidazol representados na figura 4.

Figura 4. Estrutura química do benznidazol e do nifurtimox

O nifurtimox (NFX, Lampit[®] - Bayer), 4-(5-nitrofurfurilideno)-amino-1,1-dióxido-3-metiltiomorfolina, já foi utilizado no Brasil até os anos 80 como agente anti-*T. cruzi*, porém atualmente seu uso está proibido em função do seu alto grau de toxicidade, provocando reações adversas como anorexia, perda de peso, excitabilidade psíquica ou sonolência e manifestações digestivas como náuseas, vômitos e ocasionalmente cólicas intestinais (COURA, CANÇADO, 2007). Acredita-se que este atue por redução do grupo nitro a radical instável, o nitroânion, que reage e produz metabólitos de oxigênio, como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, tóxicos ao *T. cruzi* (SOARES SOBRINHO *et al.*, 2007, URBINA *et al.*, 2003, MAYA *et al.*, 2003, BRENER, 1975).

No Brasil, o tratamento desta doença dispõe de um único fármaco, o benznidazol ou benzonidazol (BZ, Rochagan[®], Roche), N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, produzido atualmente pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE. Este fármaco é administrado por via oral, com tratamento de 30-60 dias com uma dose diária de 5-7mg/kg (COURA, CASTRO, 2002). Acredita-se que atue por modificação covalente de macromoléculas por redução de nitrocompostos intermediários e inibe a síntese de DNA (CERECETTO, 1998, DOCAMPO, 1990). No entanto, este fármaco apresenta eficácia somente na fase aguda da doença, em que prevalece a forma tripomastigota do parasita. Além desta limitação, este fármaco apresenta reações adversas graves como dermatite por hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica que, muitas vezes, limita ou até impede o seu uso (SOARES SOBRINHO *et al.*, 2007).

Desde a descoberta do benznidazol e nifurtimox, vários compostos foram estudados quanto à atividade antichagásica. Entre eles destacam-se: o alopurinol, análogo da hipoxantina (COURA, CANÇADO, 2007, SOUZA *et al.*, 1998); derivados azólicos como o cetaconazol, fluconazol e itraconazol (ASTELBAUER, WALOCHNIK, 2011, COURA, 2009, COURA, CANÇADO, 2007). Porém nenhum apresentou desempenho vantajoso em relação aos dois fármacos indicados para a doença.

Apesar do benznidazol e do nifurtimox serem os únicos fármacos eficazes contra a doença de Chagas disponíveis nas últimas décadas, ambos não cumprem os preceitos de um fármaco ideal conforme critérios da OMS para o tratamento desta doença, destacando-se entre eles: propiciar a cura parasitológica de casos agudos e crônicos da infecção; ser efetivo em dose única ou poucas doses; não apresentar efeitos colaterais ou teratogênicos; não apresentar necessidade de hospitalização para tratamento; ser acessível aos pacientes e não apresentar resistência induzida pelo agente etiológico. Além disso, estes fármacos apresentam ação efetiva apenas na fase aguda da doença e os pacientes necessitam em torno de 60 dias de tratamento, com doses diárias e administração restrita a clínicas especializadas, pois é necessário o acompanhamento médico durante o tratamento. Ainda, induzem efeitos colaterais significativos, como citados anteriormente para cada fármaco, e algumas cepas de *T. cruzi* apresentam resistência ao tratamento (WHO, 2010, COURA, 2009, COURA, CASTRO, 2002).

Com objetivo de melhorar as características desfavoráveis do benznidazol, foi desenvolvida, por meio de uma parceria entre a DNDi e o LAFEPE, uma nova formulação para uso pediátrico deste medicamento. A nova formulação possui dose do comprimido reduzida de 100 mg para 12,5 mg e é desintegrado rapidamente em líquido, o que facilita sua administração em crianças de até dois anos. Estas crianças adquirem a doença, normalmente, por transmissão congênita e, em 90% dos casos, podem eliminar o parasita se tratadas no primeiro ano de vida (DNDi, 2012). Outra parceria promissora da DNDi foi realizada com a empresa farmacêutica Eisai (Eisai Company, Ltda., Tóquio, Japão) tendo como resultado um composto denominado E1224, um pró-fármaco do ravuconazol (antifúngico triazólico de nova geração), e se encontra na fase II do estudo clínico (DNDi, 2012).

Devido à considerável parcela da população acometida por esta enfermidade e às reduzidas opções terapêuticas, pesquisas de novos agentes quimioterápicos devem ser

incentivadas com finalidade de encontrar alternativas para o tratamento da doença e com redução de efeitos adversos, como os exemplos mencionados. Os investimentos destinados a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos para doenças negligenciadas em 2010 foi de US\$ 3,1 bilhões porém, este valor representa apenas 4,6% do investimento total em P&D de fármacos neste mesmo ano, o que ilustra o baixo interesse financeiro direcionado para estas doenças (*PhRMA*, 2011, *MORAN et al.*, 2011). Do montante de US\$ 3,1 bilhões, apenas US\$ 20,1 milhões foram destinados a doença de Chagas, o que representa 0,6% do investimento em doenças negligenciadas e 0,03% do investimento total em P&D de novos fármacos (*MORAN et al.*, 2011). Nos últimos 25 anos, apenas 1% de todos os medicamentos desenvolvidos no mundo foram para tratar as doenças negligenciadas (DNDi, 2012).

3.2 Planejamento e desenvolvimento de novos fármacos

Conforme a Associação Representativa de Indústrias Farmacêuticas Norte-Americana (*PhRMA*, *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*) o setor farmacêutico é um dos setores que mais investe em P&D e, apesar do desafiador momento econômico mundial, este setor investiu US\$ 67,4 bilhões no ano de 2010 nesta área e estima-se que 3.050 medicamentos estão em desenvolvimento (*PhRMA*, 2011).

No Brasil, o desenvolvimento de fármacos não é muito representativo comparado aos Estados Unidos e Europa. Dentre as companhias associadas ao *PhRMA*, as indústrias farmacêuticas brasileiras, em 2010, contribuíram com apenas 0,2% do capital total investido em P&D de novos fármacos (*PhRMA*, 2011).

Apesar do baixo investimento na área de P&D, o mercado farmacêutico no Brasil mostra-se promissor. De acordo com dados da consultoria *IMS Health* (*IMS*, 2010) as vendas totais de medicamentos no país, em 2009, somaram R\$ 30,2 bilhões, com crescimento previsto entre 8% e 11% até o ano de 2013, sendo o principal foco os medicamentos genéricos (*IMS*, 2010).

O desenvolvimento de novos fármacos de estrutura química inédita demanda alto investimento e tempo de pesquisa até seu registro perante a agência regulatória, representada no Brasil pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde). Já nos Estados Unidos, o órgão responsável é o FDA (*Food and*

Drug Administration), o qual apresenta impacto mundial no registro e controle de medicamentos.

Em geral, o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é dividido em duas grandes fases: a fase pré-clínica, ou fase de descoberta, e a fase clínica, ou fase de desenvolvimento, figura 5 (PhRMA, 2011; 2010, ANVISA, 2010).

Figura 5. Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos

Reproduzido com a permissão de Pharmaceutical Industry Profile 2010. Washington, DC: PhRMA - Report 2010, Copyright (2010).

A fase pré-clínica engloba a descoberta de novas entidades químicas candidatas a fármaco (NCEs, *New chemical entities*) e demanda de 3 a 6 anos (PhRMA, 2011; 2010,

ANVISA, 2010, GAO, 2006). Esta fase envolve várias etapas de pesquisa básica, como a abordagem do problema fisiológico, a seleção de um alvo, o desenvolvimento de estratégias, os estudos *in silico*, a síntese e caracterização de moléculas, os ensaios *in vitro*, os ensaios *in vivo* (modelos em animais) e avaliação toxicológica básica (ANVISA, 2010, ANDERS, VIELHAUER, 2007, GAO, 2006, SILVERMAN, 2004).

A segunda fase, fase clínica, envolve as etapas de desenvolvimento das NCEs. Esta fase inicia-se com a investigação das NCEs pela agência regulatória baseada nos testes pré-clínicos, realização de patente destas NCEs e planejamento da triagem clínica nas fases I, II e III, com objetivo de verificar a segurança dos compostos para testes em humanos (PhRMA, 2011; 2010). Após parecer favorável da agência regulatória, iniciam-se os testes do estágio clínico. A fase I da triagem clínica aborda testes de verificação da dose ideal dos princípios ativos em humanos saudáveis e avaliação preliminar dos níveis de toxicidade; na fase II são realizados testes farmacológicos em um número de pacientes maior que a fase I, para avaliação do ajuste da dose, eficácia e segurança da composição; a fase III engloba testes em um número maior de pacientes da fase anterior para avaliação das propriedades farmacocinéticas, além de eficácia e segurança (ANVISA, 2010, GAO, 2006, SILVERMAN, 2004). Estas etapas podem durar de 6 a 7 anos (PhRMA, 2011; 2010). A fase clínica é finalizada com a solicitação de reconhecimento de um novo fármaco (NDA, *New drug application*) à agência regulatória, seguida por estudos da síntese em escala industrial, sendo estas duas últimas etapas com duração de 6 meses a 2 anos (PhRMA, 2011; 2010). Após regulamentação, o novo fármaco permanece em estudo com objetivo de verificar seus efeitos em diferentes populações onde é comercializado, e esta etapa é denominada fase IV, a qual é caracterizada pela farmacovigilância (ANVISA, 2010).

Assim, para inserir um fármaco novo no mercado são necessários de 10 a 15 anos, compreendendo desde os estudos preliminares da doença até a comercialização deste fármaco, além de um investimento estimado de US\$ 880 milhões, podendo alcançar a US\$ 1,3 bilhões (PhRMA, 2011; 2010, GAO, 2006). O desenvolvimento de novos fármacos inicia-se com 5.000 a 10.000 compostos, sendo registrados como NCE apenas 5 compostos e aprovado para comercialização apenas 1 composto (PhRMA, 2011; 2010).

Considerando o alto investimento e o longo período para se desenvolver um novo fármaco, é interessante ressaltar que pode ocorrer grande número de insucessos neste

processo, normalmente relacionados com alguns pontos críticos intrínsecos à P&D de fármacos, como a farmacocinética e biodisponibilidade inapropriadas das NCEs, verificação da toxicidade em animais na fase pré-clínica, detecção de efeitos adversos nas fases clínicas e problemas administrativos, como falhas no gerenciamento do projeto ou abandono do projeto devido desinteresse econômico da empresa (BROWN, 2007).

A descoberta de compostos com uma determinada atividade biológica desejada é uma etapa de embasamento em P&D de novos fármacos e pode ocorrer por diferentes processos, como a descoberta de fármacos ao acaso ou intuitivamente e descobertas mais direcionadas, como estratégias racionais que se fundamentam na estrutura do alvo terapêutico ou modificações moleculares planejadas baseadas na estrutura de um composto-protótipo com atividade semelhante à desejada (BARREIRO, FRAGA, 2005, SILVERMAN, 2004).

Exemplo clássico da descoberta de fármacos de modo empírico e intuitivo foi a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming em 1928, que observou a inibição do crescimento de cepas da bactéria *Staphylococcus* spp em placa de cultura, devido contaminação por fungos do gênero *Penicillium* spp, viabilizando assim a descoberta deste antibiótico. Vários fármacos disponíveis no mercado foram descobertos desta maneira por meio de observações inesperadas de fatos cotidianos ou em etapas de triagem clínica (LEMKE, WILLIAMS, 2008, BARREIRO, FRAGA, 2008, SILVERMAN, 2004).

Na descoberta de novos fármacos pode-se citar ainda a triagem randômica, a qual é empregada quando não há fármacos ou compostos que demonstrem a atividade biológica desejada, avaliando-se assim vários compostos com características diferentes em busca de estruturas que apresentem a resposta biológica de interesse (SILVERMAN, 2004).

Outra estratégia é a modificação estrutural de fármacos conhecidos, o que leva à identificação de novos compostos que atuam pelo mesmo mecanismo farmacológico do composto de origem, porém de forma otimizada (LEMKE, WILLIAMS, 2008, SILVERMAN, 2004). Já o processo de planejamento racional de novas moléculas é baseado no mecanismo farmacológico envolvido no processo fisiopatológico e representa importante estratégia para inovação em fármacos pois, neste estudo, são obtidas

moléculas que possuem propriedades farmacoterapêuticas particulares (BARREIRO, FRAGA, 2005).

Estratégias de descoberta de novos fármacos que envolvem o planejamento racional direcionam a busca de compostos com melhor perfil farmacodinâmico e farmacocinético, podendo reduzir o custo e tempo no processo de P&D de novos fármacos (BARREIRO, FRAGA, 2005). Neste conceito, a seletividade do fármaco é bastante visada, pois direciona a ação deste ao sítio-ativo de interesse, reduzindo assim os efeitos colaterais ocasionados por possíveis interações com outros biorreceptores (BARREIRO, FRAGA, 2008, WERMUTH, 2008).

A abordagem escolhida no planejamento de fármacos tem como limitante a disponibilidade de informações do alvo biológico, muitas vezes direcionando a estudos de compostos-protótipos, os quais são compostos que possuem atividade biológica determinada, mas não são adequados para o uso clínico em razão de apresentarem características como toxicidade elevada e efeitos colaterais indesejáveis (WERMUTH, 2008, SILVERMAN, 2004, THOMAS, 2003).

A modificação molecular realizada nos compostos-protótipos originam os análogos que apresentam similaridade terapêutica e/ou química em relação ao composto de origem e são estudados com o objetivo de obter um composto-protótipo otimizado através da alteração de suas propriedades farmacológicas, sendo estas alterações embasadas nos estudos de relações estrutura-atividade (WERMUTH, 2008, BARREIRO, FRAGA, 2008, BURGER, 1994).

3.2.1 Estudos de relações entre estrutura química e atividade biológica

Os estudos das relações entre a estrutura química e atividade biológica consideram que modificações relativamente pequenas na molécula do fármaco podem resultar em alterações importantes na resposta farmacológica, uma vez que, para produzir a resposta biológica, o fármaco necessita realizar interações com o alvo biológico (BARREIRO, FRAGA, 2008, TAVARES, 2004, SILVERMAN, 2004).

O grupo funcional ou subunidade estrutural de uma molécula responsável pela resposta biológica é denominado grupo farmacofórico, já o grupo funcional que promove o reconhecimento do composto pelo biorreceptor é denominado grupo farmacofórico

auxiliar ou grupo auxofórico. Por outro lado, alguns grupos podem desencadear uma resposta tóxica, sendo estes grupos denominados grupos toxicofóricos da molécula (BARREIRO, FRAGA, 2008).

As interações intermoleculares do composto em estudo e o alvo biológico compreendem principalmente as interações eletrostáticas como interações iônicas, dipolo-dipolo, íon-dipolo, ligação de hidrogênio e transferência de carga, assim como forças de dispersão ou interações de van der Waals e interações hidrofóbicas (WERMUTH, 2008, BARREIRO, FRAGA, 2008, THOMAS, 2003). Na figura 6 estão ilustradas algumas das principais interações intermoleculares entre um composto e um receptor biológico hipotético.

Figura 6. Principais interações fármaco-receptor (THOMAS, 2003).

O estudo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica podem ser abordados de forma qualitativa ou quantitativa. A abordagem qualitativa é denominada estudos das relações estrutura-atividade (REA ou SAR, *Structure-activity relationships*), sendo determinada geralmente pelo estudo qualitativo da influência de modificações realizadas em um composto-protótipo e a atividade biológica avaliada (LEMKE, WILLIAMS, 2008, THOMAS, 2003).

Neste estudo, a seleção das alterações no composto-protótipo são realizadas considerando-se a atividade biológica já conhecida de compostos com estruturas semelhantes. Estas alterações podem ser realizadas por modificação do tamanho e da conformação da molécula, como por exemplo, alterando-se o tamanho de cadeias alquílicas ou anéis, grau de insaturações ou quantidade de sistemas de anéis (THOMAS,

2003). Outra modificação realizada neste estudo é a introdução ou alteração de grupos substituintes já existentes no composto-protótipo, conforme características intrínsecas de cada grupamento (BARREIRO, FRAGA, 2008, LEMKE, WILLIAMS, 2008, THOMAS, 2003).

O estudo quantitativo das relações entre a estrutura química e atividade biológica (QSAR, *Quantitative structure-activity relationships*), envolve abordagem qualitativa e quantitativa, complementando assim o SAR. Para tanto, estuda-se as relações entre as propriedades físico-químicas e estruturais mensuráveis responsáveis pela atividade biológica de séries de compostos com estruturas semelhantes, possibilitando a construção de modelos matemáticos, com capacidade preditiva, e direcionando as modificações estruturais de interesse biológico (LEMKE, WILLIAMS, 2008, THOMAS, 2003). Os modelos precursores deste estudo foram a Análise de Hansch, a qual demonstrou a correlação da atividade biológica de compostos orgânicos com parâmetros físico-químicos, e o modelo de Free-Wilson, o qual demonstrou que, em uma série de compostos, a contribuição para a atividade biológica é aditiva e dependente somente do tipo e da posição do substituinte (LEMKE, WILLIAMS, 2008, WERMUTH, 2008, KUBINYI, 1993).

Para a análise de dados, precedentes ao estudo de relação estrutura-atividade, os métodos multivariados são os mais adequados, porque permitem o estudo com várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência ou não de diferenças espectrais marcantes entre elas nem a existência de alta correlação nos dados. A análise de componentes principais e de agrupamento hierárquico são técnicas de estatística multivariada complementares que têm grande aceitação na análise de dados químicos (MONTANARI, 2011, FERREIRA, 2002, MOITA NETO, MOITA, 1998).

3.2.2 Propriedades físico-químicas que influenciam a ação de fármacos

As propriedades físico-químicas que mais influenciam a atividade de um fármaco são a hidrofobicidade, os efeitos eletrônicos e a estereoquímica da molécula. Estas propriedades podem ser abordadas de forma qualitativa ou podem ser expressas por parâmetros que representam quantitativamente suas características (BARREIRO, FRAGA, 2008, TAVARES, 2004, SILVERMAN, 2004).

A hidrofobicidade é definida como a solubilidade de um determinado composto em um sistema bifásico constituído por uma fase aquosa e uma não-aquosa em condições de equilíbrio (KUBINYI 1993). Para que um composto chegue ao seu sítio-alvo é necessário que este apresente um equilíbrio hidro-lipofílico que confira a capacidade de ultrapassar barreiras biológicas (WERMUTH, 2008, SILVERMAN, 2004).

O modelo mais aceito de membrana celular é o modelo do mosaico fluido, proposto primeiramente por Singer e Nicholson (1972), figura 7, em que a estrutura da membrana é formada por dupla camada lipídica com extremidades hidrofóbicas voltadas para o interior e as hidrofílicas voltadas para o exterior. Participam de sua composição proteínas (integrals ou periféricas) e glicídios ligados às proteínas (glicoproteínas) ou lipídios ligados (glicolipídios).

Esta estrutura é permeável à água e soluções lipossolúveis, porém impermeáveis a íons e às moléculas polares (THOMAS, 2003). Assim a hidrofobicidade representa uma propriedade de grande importância para a regulação do transporte e da distribuição do fármaco pelo sistema biológico (HANSCH, LEO, 1995, KUBINYI, 1993).

Figura 7. Modelo do mosaico fluido da membrana celular (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Na expressão quantitativa desta propriedade, os descritores estruturais que representam a hidrofobicidade de uma molécula ou grupos substituintes são o logaritmo do coeficiente de partição, $\log P$ (SILVERMAN, 2004, KUBINYI, 1993), e a constante de grupo, π , proposta por Hansch e Fujita (HANSCH, LEO, 1995, KUBINYI, 1993). O coeficiente de partição, P , é definido como sendo a relação entre as concentrações, C , em ambas as fases, orgânica e aquosa, no estado de equilíbrio, equação 1 (KUBINYI, 1993).

$$\log P = \log C_{org} - \log C_{aq} \quad \text{equação 1}$$

Em que:

P = coeficiente de partição;

C_{org} = concentração de composto na fase orgânica em condições de equilíbrio;

C_{aq} = concentração de composto na fase aquosa em condições de equilíbrio.

A constante de hidrofobicidade π é definida como sendo a relação entre o logaritmo do coeficiente de partição de um composto substituído ($\log P_x$) e o logaritmo do coeficiente de partição de seu análogo não-substituído ($\log P_H$), equação 2 (HANSCH, LEO, 1995, KUBINYI, 1993).

$$\pi = \log P_x - \log P_H \quad \text{equação 2}$$

Em que:

$\log P_H$ = Logaritmo do coeficiente de partição 1-octanol/água do composto benzênico não substituído (X = H);

$\log P_x$ = Logaritmo do coeficiente de partição 1-octanol/água do composto benzênico X-substituído;

π = constante de hidrofobicidade de Hansch para o substituinte X.

O efeito eletrônico está relacionado com a distribuição de elétrons em uma molécula, o que influencia consideravelmente na distribuição do fármaco pelo organismo, assim como suas interações com o receptor (THOMAS, 2003, KUBINYI, 1993).

A maior parte dos fármacos consiste em bases ou ácidos fracos presentes em solução nas formas não-ionizada e ionizada. Essa característica influencia consideravelmente na farmacocinética, pois as moléculas não-ionizadas são mais lipossolúveis e podem difundir-se através da membrana celular por transporte passivo, figura 8 (BARREIRO, FRAGA, 2008, KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988).

Por outro lado, as moléculas ionizadas geralmente não conseguem atravessar as membranas biológicas por causa de sua baixa lipossolubilidade e, por normalmente, se encontrarem solvatadas por moléculas de água, dificultando o processo de difusão passiva (BARREIRO, FRAGA, 2008, SILVERMAN, 2004, KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988). Desta maneira, a distribuição de alguns fármacos é condicionada à constante de dissociação/ionização e ao pH do meio (TAVARES, 2004).

Figura 8. Esquema do grau de ionização e absorção passiva de ácidos ou bases fracas do meio extracelular para intracelular (adaptado de BARREIRO, FRAGA, 2008).

A constante de ionização ácida, K_a , é expressa pela relação das concentrações das espécies ionizadas sobre as espécies não-ionizadas, o que embasa o cálculo do logaritmo inverso da constante de ionização ácida, pK_a , sendo este considerado um parâmetro eletrônico e representado pela equação de Henderson-Hasselbach, equação 3, atribuído como exemplo o cálculo para ácidos (WERMUTH, 2008, BARREIRO, FRAGA, 2008, KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988):

$$pK_a = pH + \log [\text{ácido não-ionizado}]/[\text{ácido ionizado}] \quad \text{equação 3}$$

Em que:

pK_a = logaritmo inverso da constante de ionização ácida

Da mesma maneira é calculado para fármacos de caráter básico, alterando-se a fração da equação 3 pela razão entre a concentração da base dissociada sobre a base não-dissociada, obtendo-se assim o pK_b , logaritmo inverso da constante de dissociação da base (KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988).

Para fármacos ácidos, valores mais altos de seu pK_a representa que este se encontra, predominantemente, na sua forma não-ionizada, tendo seu transporte passivo pelas membranas facilitado, da mesma maneira pode-se avaliar as bases. (THOMAS, 2003, KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988).

Outro parâmetro eletrônico importante é a constante de grupo σ de Hammett. Este autor verificou que os valores de efeito eletrônico de grupos substituintes determinados em uma reação orgânica padrão poderiam ser utilizados para estimar o comportamento de reações similares (SILVERMAN, 2004, HANSCH, LEO, 1995, HAMMETT, 1937). Assim estudou a constante de ionização de ácidos benzóicos *para* ou *meta* substituídos, em água a 25 °C, figura 9.

Figura 9. Reação de ionização de ácidos benzóicos *para* ou *meta* substituídos (HAMMETT, 1937).

A relação logarítmica entre os valores de $\log K_x$ (logaritmo da constante de ionização para o correspondente ácido benzóico X -substituído) e de $\log K_H$ (logaritmo da constante de ionização para o correspondente ácido benzóico não-substituído) foi verificada e o parâmetro eletrônico do substituinte, σ de Hammett, foi definido, sendo representado na equação 4 (SILVERMAN, 2004, HANSCH, LEO, 1995, HAMMETT, 1937).

$$\sigma = \log K_x - \log K_H \quad \text{equação 4}$$

Em que:

σ = parâmetro que reflete a contribuição eletrônica do grupo substituinte X ;

K_x = constante de ionização do ácido benzóico X -substituído;

K_H = constante de ionização do ácido benzóico não-substituído (quando $X=H$).

As constantes σ são denominadas constantes de grupo, uma vez que caracterizam o comportamento eletrônico de um dado grupo substituinte. Os valores absolutos de σ refletem a grandeza do efeito eletrônico, sejam eles indutivos ou de ressonância. Valores positivos de σ são observados para grupos substituintes retiradores de elétrons, enquanto

valores negativos são observados em substituintes doadores de elétrons (TAVARES, FERREIRA, 2011, TAVARES, 2004, HANSCH, LEO, 1995, HANSCH, FUJITA, 1964).

O estudo estereoquímico de uma molécula está relacionado com aspectos de estereo seletividade entre o fármaco e o receptor (TAVARES, FERREIRA, 2011, TAVARES, 2004, HANSCH, LEO, 1995). Para que um fármaco estabeleça interações com o receptor, as dimensões dos grupos farmacofóricos e auxofóricos da molécula devem ser complementares ao sítio-alvo. Desta forma, uma molécula pode apresentar corretamente os grupos responsáveis pela resposta biológica, porém possuir arranjo espacial inadequado, o que impossibilita sua ação (BARREIRO, FRAGA, 2008, SILVERMAN, 2004, THOMAS, 2003).

Esta propriedade pode ser expressa por alguns descritores estruturais, sendo que os mais utilizados para expressar o efeito estereoquímico de grupos substituintes, principalmente em estudos bidimensionais, são o volume de van der Waals, V_w , que está relacionado com o relevo de uma determinada estrutura ou sub-estrutura molecular; o volume molar, V_m ; e os parâmetros de STERIMOL, desenvolvidos por Verloop que considera um conjunto de parâmetros que se mostram mais adequados na expressão do aspecto tridimensional de grupos substituintes ou de sub-estruturas, pois utiliza a medida do tamanho do substituinte considerando cinco diferentes direções por meio de programa computacional (TAVARES, FERREIRA, 2011, WERMUTH, 2008, TAVARES, 2004, HANSCH, LEO, 1995, VERLOOP, 1987).

3.3 Compostos nitrofurânicos

Derivados nitrofurânicos apresentam atividade antimicrobiana de amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e também sobre alguns protozoários (KOROLKOVAS, FRANÇA, 2011, TAVARES *et al.*, 1998, CERECETTO *et al.*, 1998, BRENER, 1961). Porém, apenas alguns destes derivados nitrofurânicos são utilizados na prática médica, devido ao fato de apresentarem alta toxicidade (KOROLKOVAS, FRANÇA, 2011).

Os efeitos tóxicos mais comuns relacionados a nitrocompostos são estomatite, anorexia, diarreia e náuseas além de dermatites, polineurites e discrasias sanguíneas, quadros que podem ser agravados em decorrência de hipersensibilidade e da dose empregada (KOROLKOVAS, FRANÇA, 2011, PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009,

KATZUNG, 2007). Considerando estas características, esta classe de compostos vem sendo estudada com a finalidade de identificação de análogos terapeuticamente promissores que apresentem maior seletividade e redução da toxicidade (ISHII *et al.*, 2011, SRIRAM *et al.*, 2010, PAULA *et al.*, 2009, JORGE *et al.*, 2009).

Acredita-se que a ação desta classe de compostos é decorrente da biorredução enzimática do grupo nitro. Estes compostos têm sua passagem transmembrana por difusão passiva e sua presença intracelular provoca aumento de radicais livres, provenientes do processo de biorredução. Com isso, a membrana celular desestabiliza aumentando a sua permeabilidade ao composto e, por consequência, ocorre o aumento do estresse oxidativo devido ao crescente número de radicais livres gerados neste processo (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009, POZAS *et al.*, 2005, VIODÉ *et al.*, 1999, SQUELLA *et al.*, 1996). Na figura 10 encontram-se esquematizadas as prováveis vias de biorredução dos nitrocompostos propostas por Viodé e colaboradores (1999).

Figura 10. Prováveis vias de biorredução de nitrocompostos.

Reproduzido com a permissão de VIODÉ, C., BETTACHE, N., CENAS, N., KRAUTH-SIEGEL, R.L., CHAVIÉRE, G., BALAKARA, N., PÉRIE, J. Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles. *Biochem Pharmacol.* v. 57, p. 549-557, 1999. Copyright (1999), Elsevier.

O processo ilustrado na figura 10 envolve duas rotas, a via anaeróbica e a aeróbica. Primeiramente o grupo nitro (ArNO_2) sofre redução gerando um radical nitro ânion ($\text{ArNO}_2^{\bullet-}$). Na via anaeróbica este nitro radical ($\text{ArNO}_2^{\bullet-}$) é transformado em derivado nitroso (ArNO), o qual gera o intermediário hidroxilamino (ArNHOH) que

posteriormente, em nova reação de redução, ocorre a geração do derivado amina (ArNH_2). Nesta via o radical nitró ($\text{ArNO}_2\bullet^-$) e o derivado hidroxilamina (ArNHOH) podem interagir com o DNA celular do micro-organismo, provocando sua morte. Na via aeróbia, o ânion nitró ($\text{ArNO}_2\bullet^-$) reage com oxigênio gerando o ânion superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), que posteriormente é convertido pela enzima superóxido dismutase (S.O.D.) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo comum no citosol de células eucariotas. O peróxido formado reage com enzimas ferredoxinas, promovendo a formação de hidroxila radicalar ($\text{OH}\bullet$, OH^-), a qual pode ligar-se a lipídeos, proteínas e DNA, provocando danos biológicos (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009, MAYA *et al.*, 2003, VIODÉ *et al.*, 1999, SQUELLA *et al.*, 1996). Adicionalmente, suspeita-se que, em parasitas como o *T. cruzi*, a presença de nitró radicais ($\text{ArNO}_2\bullet^-$) e peróxidos (H_2O_2) podem inibir a enzima tripanotona redutase (TR), que atua por conversão de dissulfeto de tripanotona, TS_2 , a tripanotona ditiol, T(SH)_2 . O substrato ditiol, sendo o substrato ativo, sofre reações metabólicas redox comuns no parasita, voltando a dissulfeto, necessitando da ação enzimática para retornar ao ciclo. Assim, quando inibida a enzima TR, acarreta no desequilíbrio entre os dois substratos com tendência de aumento do dissulfeto. Acredita-se que este desequilíbrio provoque a morte do parasita e/ou a inibição de seu crescimento (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009, SCHMIDT, KRAUTH-SIEGEL, 2002, BLUMENSTIEL *et al.*, 1999, FAIRLAMB, 1992).

Diante dos prováveis mecanismos descritos, o grupo nitró ($-\text{NO}_2$) representa um importante grupo. É interessante ressaltar também o possível sinergismo do anel 5-nitrofurano com o grupo azometínico ($-\text{CH}=\text{N}<$) devido serem grupos comuns em agentes antimicrobianos (LEMKE, WILLIAMS, 2008, KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988).

Pode-se verificar estas subestruturas em alguns fármacos utilizados na terapêutica humana, como o NFX (Lampit[®], Roche), utilizado no tratamento da doença de Chagas; nitrofurantoína (Macrofantina[®], Mantecorp), fármaco antibacteriano oral utilizado no tratamento de infecção urinária; nitrofurazona, (Furacin[®], Mantecorp) antibacteriano tópico; nifuroxazida (NF) (Passifuril[®], Millet Roux), antibacteriano oral utilizado principalmente para infecções intestinais; furazolidona (Giarlam[®], UCI-Pharma), antibacteriano utilizado para infecções intestinais, possuindo também atividade contra o parasita *Giardia lamblia* (LEMKE, WILLIAMS, 2008, MERCK, 1996,

KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988). Estes fármacos se encontram ilustrados da figura 11.

Figura 11. Fármacos nitrofurânicos utilizados na terapêutica humana.

Alguns estudos demonstraram que compostos nitroheterocíclicos, além da sua ação antimicrobiana, apresentam atividade anti-*T. cruzi* (ISHII *et al.*, 2011, PAULA *et al.*, 2009, BLUMENSTIEL *et al.*, 1999). Blumenstiel e colaboradores (1999) estudaram a atividade de diversos derivados nitrofurânicos frente ao *T. cruzi* e verificaram que a NF não apresenta efeitos tóxicos às células de mamíferos quando utilizada em concentrações menores que 10 μM (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009, BLUMENSTIEL *et al.*, 1999). Adicionalmente, a NF é considerada como candidato potencial à modificação molecular em diversos estudos de relação estrutura-atividade (ISHII *et al.*, 2011, JORGE *et al.*, 2011, PAULA *et al.*, 2009, JORGE *et al.*, 2009, RANDO *et al.*, 2008, MASUNARI, TAVARES, 2006, RANDO *et al.*, 2002, TAVARES *et al.*, 1998, TAVARES, PENNA, AMARAL, 1996).

Diante das informações expostas, salienta-se que a doença de Chagas é considerada negligenciada e endêmica em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, incluindo o Brasil, e que o planejamento de compostos furfurilidênicos, tendo como composto-protótipo a NF, apresenta-se como uma técnica

viável. Consequentemente, o emprego da modificação molecular da NF em busca de compostos com atividade frente ao *T. cruzi* e com menor toxicidade pode contribuir no combate desta enfermidade.

4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Direcionado à identificação de estruturas químicas com atividade anti-*T. cruzi*, este trabalho foi dividido em cinco etapas principais, a saber:

- Planejamento de duas séries de compostos nitrofurânicos;
- Síntese e identificação dos compostos planejados;
- Determinação da atividade anti-*T. cruzi* frente a forma epimastigota do parasita;
- Determinação da citotoxicidade em macrófagos murinos da linhagem J774;
- Estudos das relações entre as propriedades físico-químicas das estruturas planejadas e a atividade biológica determinada.

4.1 Planejamento das séries de compostos

O planejamento dos compostos foi direcionado para obtenção de derivados nitrofurânicos. Para tanto foi planejada a síntese de compostos derivados furfurilidênicos com estruturas azometínicas e oxadiazolínicas, **séries I e II**, análogos à NF, elegida como composto-protótipo devido características promissoras. As modificações realizadas na estrutura deste fármaco estão representadas na figura 12.

No contexto deste trabalho, a modificação molecular realizada para **série II** foi planejada considerando que a ciclização da porção central da molécula da **série I**, formando o anel 1,3,4-oxadiazolínico juntamente com o grupo acetil, podem conferir características importantes à molécula, como a alteração conformacional de sua estrutura e mudança em seu equilíbrio lipo-hidrofílico a fim de buscar favorecimento para o transporte passivo através das membranas (LEMKE, WILLIAMS, 2008, KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988). Adicionalmente, a subestrutura do anel 1,3,4-oxadiazolínico demonstrou, em alguns estudos, atividade antimicrobiana (OSÓRIO *et al.*, 2012, ALMEIDA, 2009, ROLLAS, GULERMAN, ERDENIZ, 2002), anticonvulsivante (PARMAR *et al.*, 1975), antifúngica (ROLLAS, GULERMAN, ERDENIZ, 2002), anti-inflamatória (KALSI *et al.*, 1989), anti-Parkinson (MACCIONI *et al.*, 2011) e antiparasitária (ISHII *et al.*, 2011).

Figura 12. Estrutura química da nifuroxazida, compostos furfurilidênicos azometínicos e oxadiazolínicos.

Na **série I** a estrutura da NF foi mantida, alterando-se apenas o substituinte na posição 4 (*para*) do anel benzênico. Assim, as modificações realizadas conferem características distintas entre as séries I e II, possibilitando análise das relações estrutura-atividade destes compostos frente ao *T. cruzi*.

A seleção dos grupos substituintes na posição *para* do anel benzênico nas duas séries foi baseada no Diagrama de Craig, o qual consiste em método de seleção de grupos que permite inter-relacionar duas propriedades físico-químicas, direcionando o planejamento de novos análogos. Craig (1971) estudou as relações entre vários descritores estruturais e demonstrou que a constante de hidrofobicidade π , determinada por Hansch para sistemas benzênicos *para* ou *meta* substituídos, é estatisticamente independente da constante σ , de efeito eletrônico, determinada por Hammett. A dispersão gráfica resultante da correlação entre as propriedades efeito eletrônico e hidrofobicidade auxilia a seleção de grupos substituintes, evitando o direcionamento do estudo ao selecionar substituintes colineares, ou seja, redundantes (CRAIG, 1971).

Neste trabalho foram selecionados dez substituintes: cloro (-Cl), bromo (-Br), iodo (-I), nitro (-NO₂), hidrogênio (-H), ciano (-CN), trifluorometila (-CF₃), metoxila (-CH₃O), metila (-CH₃) e butila (-C₄H₉), indicados na figura 13, na cor vermelha, com a finalidade de obter correlações entre as propriedades físico-químicas dos compostos e a atividade

biológica desempenhada, além de auxiliar na busca de novas alternativas terapêuticas para a doença de Chagas.

Figura 13. Diagrama de Craig - compostos planejados, em vermelho.

Reproduzido com a permissão de (CRAIG, P.N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. *J Med Chem.* v. 14, n.8, 680-684, 1971) Copyright (1971), American Chemical Society.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos compostos planejados

A rota de síntese dos compostos furfurilidênicos azometínicos, **série I**, foi constituída de duas etapas: esterificação seguida da amonólise, para obtenção de benzidrazidas substituídas, **3a - j**, e reação de condensação para obtenção de bases de Schiff, **4a - j**. Para obtenção dos compostos furfurilidênicos oxadiazolínicos, **5a - j** da **série II**, foi realizada ciclização oxidativa dos compostos da **série I**. Estas etapas estão representadas na figura 14 e foram realizadas no Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos (LPDF) da FCF/USP.

Figura 14. Rota sintética das séries I e II.

5.1.1 Obtenção de benzidrazidas substituídas

O caminho sintético utilizado neste trabalho para obtenção de benzidrazidas, figura 15, apresentou como primeira etapa uma reação de esterificação (SOLOMONS, FRYHLE, 2004, CAREY, SUNDBERG, 2000, MARCH, 2001).

Figura 15. Etapa sintética da obtenção das benzidrazidas substituídas.

Na reação de esterificação, 0,01 mol dos ácidos benzóicos substituídos com pureza de 98% (Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc), **1a-j**, foram dissolvidos em álcool metílico PA anidro (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório), em excesso (1:50, 20 mL), e adicionado pequeno volume de ácido sulfúrico PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório), 0,5 mL (1,0 mmol), para agir como catalisador, acidificando o meio reacional. Este sistema foi mantido sob refluxo por quatro horas. Em seguida, sem isolar o intermediário benzoato de metila, **2a-j**, adicionou-se este meio reacional da esterificação em 10 mL de hidrato de hidrazina aquosa 80% (v/v) em excesso (Merck Chemicals), mantendo-se refluxo por trinta minutos, ocorrendo a reação de amonólise entre os benzoatos de metila e hidrato de hidrazina. Após este período, resfriou-se o sistema e manteve-se a temperatura entre 4 e 8 °C até formação de cristais. A benzidrazida precipitada, **3a-j**, foi filtrada e seca em presença de pentóxido de fósforo PA (Vetec Química Fina) (JORGE *et al.*, 2011, SOLOMONS, CAREY, SUNDBERG, 1996, MORRISON, BOYD, 1994, MARCH, 2001). A benzidrazida 4-nitro (-NO₂) substituída teve sua amonólise realizada em temperatura ambiente, reagindo com hidrato de hidrazina aquosa 80% (v/v) por 1 h (JORGE *et al.*, 2011).

5.1.2 Obtenção de derivados azometínicos

Para obtenção dos compostos furfurilidênicos azometínicos, **4a-j** da *série I*, figura 16, ocorre a reação de condensação entre a benzidrazida, **3a-j**, e o *diacetato de 5-nitro-2-furfuraldeído* com pureza de 98% (Sigma - Aldrich Chemical Company, Inc) (CAREY, SUNDBERG, 2000, SOLOMONS, FRYHLE, 2004, MARCH, 2001).

Figura 16. Etapa sintética da obtenção de derivados azometínicos.

Adicionou-se o *diacetato de 5-nitro-2-furfuraldeído* (0,01 mol) sobre solução de água, ácido sulfúrico PA, ácido acético PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) e álcool metílico PA na proporção 8:7:8:20 v/v, respectivamente (TAVARES, 1996). Aqueceu-se o meio reacional até temperatura de refluxo adicionando-se a benzidrazida substituída **3a - j**, lentamente e sob agitação magnética constante. Adicionou-se água destilada a baixa temperatura e observou-se a formação imediata de sólido amorfo do derivado furfurilideno azometínico **4a - j**, que foi filtrado, lavado com água destilada gelada e recristalizado de *N,N*-dimetilformamida PA, DMF, (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório). O sólido obtido foi filtrado e seco em presença de pentóxido de fósforo (CAREY, SUNDBERG, 2000, SOLOMONS, FRYHLE, 2004, MARCH, 2001).

O composto-protótipo NF foi sintetizado seguindo o mesmo protocolo de obtenção dos compostos da **série I**, partindo-se de benzidrazida comercialmente disponível *4-hidroxibenzidrazida* 97% (Sigma - Aldrich Corporation).

5.1.3 Obtenção de derivados oxadiazolínicos

Para obtenção dos compostos furfurilidênicos oxadiazolínicos **5a - j**, **série II**, figura 17, faz-se uma ciclização oxidativa dos compostos da **série I**, compostos furfurilidênicos azometínicos **4a - j**, em presença de anidrido acético PA, pureza $\leq 99\%$ (Sigma - Aldrich Chemical Company, Inc).

Figura 17. Etapa sintética da obtenção dos compostos furfurilidênicos oxadiazolínicos.

Adicionou-se o anidrido acético à *5-nitro-2-furfurilideno benzdrazida para-*substituída **4a - j**. Aqueceu-se o sistema até 100-105 °C sob agitação constante e pressão positiva de nitrogênio gasoso (White Martins Praxair Inc) por 10-12 h, sendo o desenvolvimento da reação acompanhado por cromatografia de camada delgada (CCD) (Sigma - Aldrich Chemical Company, Inc), utilizando-se como eluente clorofórmio PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) e hexano PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) na proporção 4:1, respectivamente. O sistema foi resfriado e adicionou-se água destilada, na mesma proporção do volume de anidrido acético, mantendo-se sob agitação constante até formação de precipitado. Os derivados oxadiazolínicos **5a - j** foram recristalizados de acetona PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) e água, filtrados e secos em presença de pentóxido de fósforo. (ISHII *et al.*, 2011, MACCIONI *et al.*, 2011, OLIVEIRA, 2011, ALMEIDA, 2009, LI, MA, CAO, 2009, SOMOGYI, 2007, ROLLAS, GULERMAN, ERDENIZ, 2002).

O composto oxadiazolínico 4-metoxi (-OCH₃) substituído, **5i**, teve sua síntese realizada a uma temperatura de 115 °C por 18 h sendo acompanhada por cromatografia de camada delgada e utilizando-se eluente clorofórmio/hexano 6:1.

5.2 Identificação dos compostos

A estrutura química dos compostos sintetizados foram comprovadas utilizando-se análise de espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono (RMN ¹³C) e a pureza foi verificada por determinação da faixa de fusão e análise elementar.

A faixa de fusão dos compostos obtidos foi determinada em lamínulas de vidro, utilizando-se aparelho digital de marca Micro-química, modelo MQAPF-301 e confirmada em capilar utilizando aparelho digital de modelo M-560, marca Büchi. Todos os compostos sintetizados tiveram suas faixas de fusão determinadas. A identificação dos compostos intermediários, benzdrazidas, **3a - j**, foi baseada na comparação das faixas de fusão obtidas com a descrita em literatura.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e de carbono foram realizados em espectrômetro Brüker, modelo Advance DPX-300 Mhz, no Laboratório de Análise Instrumental/FCF/USP. Utilizou-se dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) com 0,05% tetrametilsilano (TMS) (Cambridge Isotope Laboratories Inc)

como solvente e padrão de referência interna, respectivamente. Os espectros foram analisados com auxílio do programa *MestRe-C* (versão 5.0, MestreLab Research, Trial, Inc: 2006, Santiago de Compostela, Spain).

A análise elementar dos compostos foi realizada em analisador CHN modelo Elementar Analyser 24013 CHN, Perkin-Elmer, na Central Analítica/IQ/USP.

5.3 Determinação da atividade anti-*T. cruzi* frente a forma epimastigota

Os ensaios de atividade anti-*T. cruzi* frente a forma epimastigota do parasita foram realizados no LPDF/FCF/USP, conforme protocolo desenvolvido pelo grupo de pesquisa (ISHII *et al.*, 2011, JORGE, 2011). Neste trabalho foi utilizada a cepa Y, isolada pela primeira vez por Silva e Nussenszweig em 1953, a qual foi gentilmente disponibilizada pela Professora Maria Júlia Manso Alves do Laboratório de Bioquímica Parasitária, Departamento de Bioquímica/IQ/USP.

5.3.1 Procedimento geral do ensaio de determinação da atividade anti-*T. cruzi*

O procedimento geral dos ensaios de determinação da atividade anti-*T. cruzi* nas formas epimastigota deste parasita está ilustrado na figura 18 e o protocolo utilizado para estes ensaios foi baseado em Ishii e colaboradores (2011), Jorge (2011), modificado e adaptado a partir de Cerecetto e colaboradores, 1998.

O parasita foi cultivado em meio LIT (*liver infusion tryptose*) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) estéril (Vitrocell, S0011) (REY, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000). Este meio foi preparado no Laboratório de Bioquímica Parasitária, Departamento de Bioquímica/IQ/USP e cedido para a realização dos experimentos.

O ensaio foi dividido em três fases, sendo que na primeira fase dos ensaios analisou-se as concentrações de 10, 20 e 50 μM dos compostos e dos fármacos de referência frente ao parasita, seguida pela segunda fase, analisando-se as concentrações de 2, 4 e 8 μM . Em uma terceira fase, alguns compostos foram analisados em concentrações maiores ou menores do que estas seis concentrações inicialmente avaliadas para possibilitar o cálculo de IC₅₀. Estes ensaios são constituídos de quatro etapas principais, em que a primeira etapa compreende a preparação das soluções dos compostos sintetizados, assim como as diluições dos fármacos de referência, BZ e NFX, e do

composto-protótipo NF, a segunda etapa refere-se ao preparo da suspensão parasitária, a terceira, ao preparo das cubetas para o ensaio e a quarta, refere-se à leitura e tratamento dos dados obtidos.

Figura 18. Esquema do procedimento geral dos ensaios de determinação da atividade anti-*T. cruzi* na forma epimastigota.

5.3.2 Preparo das soluções dos compostos e dos fármacos

O ensaio foi realizado em cabine de fluxo laminar da marca Veco. As diluições, ilustradas na figura 19, foram realizadas partindo-se de massa equivalente a $50.000 \mu M$, calculada e pesada em balança analítica digital de 4 casas decimais (marca Ohaus) de acordo com a massa molar de cada composto ou fármaco analisado e foram diluídos em 5 mL de dimetilsulfóxido PA, (DMSO) (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório). Esta primeira diluição foi denominada solução A, apresentando concentração final de $10.000 \mu M$. As diluições foram realizadas utilizando-se pipetas monocal das marcas Gilson® (capacidade de 5 e 1 mL) e Eppendorf® (capacidade de 100 μL).

Figura 19. Esquema de diluições dos compostos, fármacos e solução controle de DMSO, utilizadas em ensaio para determinação de atividade anti-*T. cruzi*.

Em destaque as concentrações utilizadas para obter 10, 20 e 50 µM, 1º FASE, e 2, 4 e 8 µM, 2º FASE.

Partindo-se da solução A foram obtidas as principais diluições realizadas nas duas primeiras fases de ensaio. Na primeira fase, para se obter as concentrações de 50, 20 e 10 µM, foi transferido 0,1 mL da solução A para tubo de ensaio contendo 4,9 mL de meio LIT, homogeneizando-se em agitador Vórtex Thermolyne modelo 16400, o que originou solução de concentração equivalente a 200 µM, denominada solução B1. Transferiu-se 2,5 mL da solução B1 para tubo contendo 2,5 mL de meio LIT, obtendo-se a solução C1 com concentração equivalente a 100 µM, a qual foi utilizada posteriormente nos ensaios para se obter a concentração de 50 µM contendo, após esta diluição consecutiva, 1% de DMSO. Para obter as concentrações de 20 e 10 µM, foi transferido 1,0 mL da solução A para tubo contendo 4,0 mL de DMSO, originando a solução D1 com concentração equivalente a 2.000 µM. Em seguida transferiu-se 0,1 mL da solução D1 para tubo contendo 4,9 mL de meio LIT, originando a solução E1 de 40 µM, utilizada nos ensaios para obter a concentração de 20 µM contendo 2% de DMSO. Transferiu-se 2,0 mL da

solução **E1** para tubo contendo 2,0 mL de LIT, obtendo-se a solução **F1** de 20 μM , utilizada nos ensaios para obter a concentração de 10 μM contendo 1% de DMSO. Para obtenção da solução de controle de solvente, foi transferido 0,1 mL de DMSO em tubo contendo 4,9 mL de LIT, obtendo-se solução de 2% de DMSO, denominada solução **CS**.

Para a diluição dos compostos e fármacos na segunda fase dos ensaios, em que se analisou as concentrações de 2, 4 e 8 μM , partiu-se da solução **A** de 10.000 μM , transferindo 0,4 mL desta solução para tubo de ensaio contendo 4,6 mL de DMSO, de forma a originar solução de concentração equivalente a 800 μM , denominada solução **B2**. Transferiu-se 0,1 mL da solução **B2** para tubo contendo 4,9 mL de meio LIT, obtendo-se a solução **C2** com concentração equivalente a 16 μM , a qual foi utilizada posteriormente nos ensaios para se obter a concentração de 8 μM com 2% de DMSO. Em seguida transferiu-se 2,5 mL da solução **C2** para tubo contendo 2,5 mL de meio LIT, originando a solução **D2** de 8 μM , utilizada nos ensaios para obter a concentração de 4 μM contendo 1% de DMSO. Transferiu-se 2,0 mL da solução **D2** para tubo contendo 2,0 mL de LIT, obtendo-se a solução **E2** de 4 μM , utilizada nos ensaios para obter a concentração de 2 μM contendo 0,5% de DMSO. A solução de controle de solvente, **CS**, foi mantida a 2% v/v de DMSO.

A terceira fase do ensaio foi realizada para dois compostos da **série I**, butila (-C₄H₉, **4g**) e iodo (-I, **4j**) substituídos, para o fármaco de referência, **NFX**, e para o composto-protótipo **NF**. Para estes compostos e fármacos foram realizadas diluições menores que 2 μM e maiores que 50 μM , a fim de obter dados de atividade biológica em concentrações intermediárias que possibilitassem a determinação do IC₅₀. As concentrações utilizadas estão relacionadas na tabela 1.

Tabela 1. Diluições realizadas para os compostos **4g** e **4j**, e para os fármacos **NF** e **NFX** como auxílio na determinação do IC₅₀ frente ao *T. cruzi*.

Fármaco / composto	Massa ^a (μM)	Solução A (μM)	Solução B (μM)	Solução C (μM)	Solução D (μM)	Solução E (μM)
4g -C₄H₉	50.000	10.000	80	16,0*	8,0*	4,0*
	50.000	10.000	600	12,0*	6,0*	3,0*
	50.000	10.000	160	3,2*	1,6*	0,8*
	50.000	10.000	100	2,0*	1,0*	0,5*
4j -I	50.000	2.000	40	20*	-	-
	50.000	10.000	600	12*	6*	3*
	50.000	10.000	80	16*	8*	4*
NF	90.000	18.000	360*	180*	90*	-
	80.000	16.000	320*	160*	80*	40*
	70.000	14.000	280*	140*	70*	35*
	60.000	12.000	240*	120*	60*	30*
	50.000	10.000	200*	100*	50*	-
NFX	50.000	10.000	200	100*	-	-
	50.000	2.000	40*	20*	-	-
	50.000	10.000	80	16*	8*	4*
	50.000	10.000	600	12*	6*	3*

a: massa dos compostos utilizada para os ensaios e transformada em μM

* concentrações utilizadas nos ensaios biológicos.

NF: nifuroxazida

NFX: nifurtimox

5.3.3 Preparo da suspensão parasitária

A preparação da suspensão de *T. cruzi* foi realizada segundo esquema apresentado na figura 20, sendo a segunda etapa do ensaio.

Figura 20. Esquema de preparação da suspensão parasitária utilizada no ensaio de determinação da atividade anti-*T. cruzi*.

Assim, para seu preparo, partiu-se da suspensão parasitária inicial na fase estacionária (inóculo ou cultura parasitária de dez dias), transferindo-se 0,5 mL desta suspensão para cubetas descartáveis. Adicionou-se 0,5 mL de LIT e realizou-se a leitura no espectrofotômetro UV/VIS ($\lambda = 580$ nm), quantificando a diluição de 1:1 do inóculo. Em seguida, calculou-se o número de parasitas/mL do inóculo inicial de dez dias e o volume necessário deste para se obter 50 mL de uma suspensão a $4,0 \times 10^6$ parasitos/mL. A suspensão parasitária obtida foi quantificada novamente em espectrofotômetro UV/VIS ($\lambda = 580$ nm), sendo a diluição reajustada, quando necessário, para concentração de $4,0 \times 10^6$ parasitos/mL.

Para a quantificação de parasitas no inóculo utilizou-se espectrofotômetro UV/VIS modelo T80+ (PG Instruments LTD), sendo mensurado pela equação gerada pela curva de calibração construída por Jorge (2011), no programa UVWin 5.0 (Spectrophotometer Software, PG Instruments) que relaciona a absorbância no UV/VIS de suspensões parasitárias em diferentes concentrações com o número de parasitas/mL quantificados em câmara de Neubauer.

5.3.4 Preparo do ensaio para determinação da atividade anti-*T. cruzi*

Nesta terceira etapa do protocolo de determinação da atividade anti-*T. cruzi* utilizou-se, para cada ensaio realizado, uma caixa com 100 cubetas descartáveis de poliestireno com capacidade de 1,5 mL (Bioagency). A porcentagem de inibição de crescimento foi determinada em triplicata, juntamente com os respectivos brancos, dos compostos sintetizados e dos fármacos BZ, NFX e NF, assim como o controle positivo e o controle de solvente, DMSO. O esquema utilizado na elaboração das caixas encontra-se no Anexo 1, “Esquema de distribuição dos compostos e fármacos em cubetas utilizado na execução dos ensaios”.

As cubetas foram preparadas conforme figura 21, sendo que para os compostos sintetizados e fármacos foram utilizadas as soluções anteriormente preparadas nas concentrações de 100 μM , solução **C1**, 40 μM , solução **E1** e 20 μM , solução **F1**, das quais foram retiradas alíquotas de 0,5 mL, transferidas para cubetas e completadas com 0,5 mL de suspensão parasitária, previamente preparada na concentração de $4,0 \times 10^6$ parasitos/mL. Este procedimento foi realizado em triplicata obtendo-se concentrações finais de 10, 20 e 50 μM , correspondentes à primeira fase dos ensaios, e à

concentração final de $2,0 \times 10^6$ parasitos/mL em cada cubeta. Para cada triplicata de diluição foi realizado um branco contendo 0,5 mL da solução correspondente e 0,5 mL de LIT.

Figura 21. Esquema da preparação do ensaio para determinação de atividade anti-*T. cruzi*

Para a segunda fase manteve-se o protocolo descrito, sendo utilizadas as soluções anteriormente preparadas nas concentrações de $16 \mu M$, solução **C2**, $8 \mu M$, solução **D2** e $4 \mu M$, solução **E2**, obtendo-se assim concentrações finais de 2, 4 e $8 \mu M$. Em todos os ensaios foram preparados controles de solvente a 1% e 0,5% de DMSO, os quais partiram da solução **CS**, preparada anteriormente, adicionando-se 0,5 mL desta solução a 2% de DMSO e 0,5 mL do inóculo com $4,0 \times 10^6$ parasitos/mL, obtendo-se solução controle a 1% de DMSO, contendo $2,0 \times 10^6$ parasitos/mL em cada cubeta. O branco do controle de solvente foi preparado substituindo o volume do inóculo pelo equivalente em LIT. O controle de solvente a 0,5% de DMSO foi preparado da mesma maneira, alterando-se apenas o volume coletado para 0,25 mL da solução **CS** a 2% de solvente, completando com 0,25 mL de LIT para cada cubeta. Para cada caixa foi preparado também os controles positivo contendo 0,5 mL de inóculo e 0,5 mL de LIT, obtendo-se também concentração de $2,0 \times 10^6$ parasitos/mL, sendo este realizado em quadruplicata. Todas as cubetas foram vedadas e homogeneizadas. A leitura das cubetas foi realizada em espectrofotômetro de UV/VIS ($\lambda = 580 \text{ nm}$). Após a leitura, as cubetas foram incubadas

em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD, *Biochemical oxygen demand*, Tecnal modelo TE 391), a 28 °C por 120 horas (5 dias).

5.3.5 Tratamento dos dados obtidos

Completado o período de incubação, foi realizada nova leitura da absorbância, $\lambda = 580$ nm, A_{580} , e foram calculadas as porcentagens de inibição de crescimento (%IC). Neste cálculo foi considerado a diferença da absorbância no dia inicial do ensaio (dia 0) e o final (dia 5), para cada cubeta, aplicando-se a equação 5 (JORGE, 2011, GERPE *et al.*, 2010, CERECETTO *et al.*, 1998):

$$\%IC = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} * 100 \quad \text{equação 5}$$

Em que:

$A_p = A_{580}$ da cultura contendo composto no dia 5;

$A_{0p} = A_{580}$ da cultura contendo o composto logo após adição de inóculo no dia 0;

$A_c = A_{580}$ da cultura na ausência de qualquer composto (controle positivo);

$A_{0c} = A_{580}$ da cultura na ausência de qualquer composto no dia 0.

Os dados obtidos da %IC de cada triplicata foram tratados realizando-se sua média e desvio padrão para posterior utilização no cálculo da IC_{50} com auxílio do programa *OriginPro8.0* (versão 8.0 SR00 - Trial, OriginLab Corporation: 2007, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA, USA) empregando-se o modelo não-linear sigmoidal de dose-resposta.

5.4 Determinação da citotoxicidade em macrófago murino de linhagem J774

Os ensaios para determinação da citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical, FM/USP - IMT sob orientação do Professor José Ângelo Lauletta Lindoso. As células macrofágicas murinas de linhagem J774 são provenientes de sarcoma de células reticulares de camundongo Balb/c fêmea (RALPH, NAKOINZ, 1975) e foram disponibilizadas pela Dra. Edna Barbosa de Souza.

O ensaio de citotoxicidade foi baseado em trabalhos semelhantes, os quais abrangem estudos de compostos nitroderivados e a utilização de método colorimétrico para determinação da viabilidade celular do macrófago J774 pela redução mitocondrial do brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio, MTT, a um composto corado,

denominado formazan (FRESHNEY, 2010, PARDO, 2010, GERPE *et al.*, 2010, ROMEIRO *et al.*, 2009, MUELAS *et al.*, 2001).

5.4.1 Procedimento geral do estudo de citotoxicidade

A determinação da citotoxicidade em macrófagos foi dividida em duas fases, onde a primeira teve a finalidade de determinar parâmetros iniciais do ensaio e a segunda, a determinação da citotoxicidade dos compostos e fármacos de referência, **BZ** e **NFX**. O procedimento geral dos ensaios de citotoxicidade estão ilustrado na figura 22.

Figura 22. Esquema do procedimento geral dos ensaios de determinação de citotoxicidade em macrófagos de linhagem J774

A metodologia empregada nos ensaios foi dividida em cinco etapas principais: manutenção da cultura celular em frascos, estabelecimento da cultura celular em microplacas, preparação e distribuição das soluções de compostos e fármacos, distribuição da solução de MTT, coleta e tratamento dos dados.

Os ensaios iniciaram-se com o cultivo dos macrófagos em meio RPMI 1640 com fenolftaleína (Cultilab, R010), previamente preparado com água destilada e suplementado com 100 UI de penicilina, 100 µg/mL de gentamicina e esterilizado por filtração com membrana de 0,22 µm (TPP, 99722). O cultivo celular foi realizado em frasco de cultura de poliestireno com área de crescimento de 75 cm² (TPP, 90076). As células foram incubadas em estufa (Binder, CB150) a 37 °C, com atmosfera úmida, 5% de CO₂ e o meio RPMI 1640 foi suplementado com 10% de SFB nos primeiros 3 dias de cultivo. Posteriormente foi realizada a troca do meio de cultura a cada 48 h com suplemento de 5% de SFB até confluência celular, obtida entre o 12º e 15º dia de cultivo. O acompanhamento da cultura foi realizado em microscópio óptico invertido (Carl Zeiss, Axiovert 10).

Preparou-se, em seguida, uma suspensão celular da cultura confluenta, mantida em frasco, pela remoção por raspagem das células aderidas com auxílio de haste de plástico com lâmina de 18 mm, *cell scraper*, (Corning, 3010). Esta suspensão foi quantificada em câmara de Neubauer espelhada (NewOptik) em solução de Azul de Tripán (Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc) a 1%. Diluiu-se a suspensão celular nesta solução na proporção de 1:100 e observou-se em microscópio óptico (Olympus, BX41). As células coradas em azul não foram consideradas na contagem, pois as não coradas representam as células viáveis, uma vez que o corante é impermeável a membrana íntegra (FRESHNEY, 2010).

Após a quantificação celular da suspensão inicial, foi calculado o volume necessário desta para obter o número de células de interesse para cada ensaio. Utilizou-se microplaca de 96 poços com fundo chato (TPP, 92096) e meio RPMI 1640 sem fenol (Cultilab, R1428), suplementado com SFB. A microplaca foi incubada em estufa (37 °C, com atmosfera úmida, 5% de CO₂), no período determinado para cada ensaio. Após esta etapa de estabelecimento da cultura celular na microplaca, adicionou-se as soluções de compostos e fármacos para o estudo de citotoxicidade e incubou-se, nas mesmas

condições, por 48 h. Nos ensaios de determinação de parâmetros não foram adicionados os compostos e fármacos, seguindo-se com o protocolo.

A etapa seguinte foi a distribuição da solução de MTT, assim, a microplaca foi centrifugada a 1200 rpm, a 28 °C por 10 min em centrífuga com adaptador de microplacas (Eppendorf, 5810R). Foram retirados 100 µL do sobrenadante com pipeta multicanal e as células foram lavadas com 100 µL de solução salina tamponada PBS, em condições estéreis, na concentração de 4 mg/mL. A cada poço, contendo a cultura com 100 µL de meio, foram adicionados 20 µL de solução de MTT e 80 µL de meio RPMI 1640 sem fenol, obtendo-se concentração final de MTT de 0,4 mg/mL. A microplaca foi incubada por 3 h (37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂) e, após este período, foi realizada a centrifugação da placa (1200 rpm, 28 °C, 10 min). Foram retirados 150 µL do sobrenadante, adicionados 150 µL de DMSO e homogeneizou-se em agitador de microplacas (Ciencor Scientific Industries, Microplate Genie) até completa lise celular e solubilização do formazan. A coleta de dados foi realizada em leitora de microplacas (Titertek Uniscience, Multiskan MCC/340) no comprimento de onda de 595 nm (TWENTYMAN, LUSCOMBE, 1987).

5.4.2 Determinação de parâmetros do ensaio de citotoxicidade

Foram realizados ensaios para a determinação do número de células, determinação da porcentagem de SFB e verificação da variação destes parâmetros em presença de composto. Estes ensaios foram realizados conforme protocolo geral descrito no item 5.4.1, modificando-se, para cada ensaio, o número de células inicial, concentração do SFB e tempo de incubação antes da etapa de distribuição da solução de MTT.

Foi estudado, primeiramente, a variação celular nas ordens de grandeza de 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ células/mL. Para este ensaio, na etapa de preparo da microplaca, utilizou-se meio RPMI 1640 sem fenol, suplementado com 5% de SFB. O período de incubação da microplaca na etapa antes da adição do MTT foi de 2 h em estufa (37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂) para adesão celular, a qual foi verificada em microscópio óptico invertido. O ensaio foi realizado em triplicata e a coleta de dados realizada em leitora de microplacas no comprimento de onda de 595 nm (TWENTYMAN, LUSCOMBE, 1987).

Para o estudo de variação celular na mesma ordem de grandeza, foi preparado suspensão de $50,0 \times 10^x$ células/mL, onde x é o expoente de interesse (2, 3, 4 e 5). A variação do número de células foi realizada conforme tabela 2 (SATYANARAYANAJAIS, 2011). O meio utilizado foi o RPMI 1640 sem fenol e suplementado com 5% de SFB. A microplaca foi incubada por 2 h, para adesão celular, em estufa (37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂). O ensaio foi realizado em triplicata e a coleta de dados realizada em $\lambda = 595$ nm.

Tabela 2. Variação do número de células e volume da suspensão celular e meio de cultura utilizados nos ensaios

nº da suspensão	Quantidade de células (10 ^x células / mL) ^a	Volume da suspensão celular (µL)	Volume do meio RPMI 1640 (µL)
1	0	0	200
2	0,5	10	190
3	1	20	180
4	1,5	30	170
5	2	40	160
6	2,5	50	150
7	3	60	140
8	4	80	120
9	5	100	100
10	6	120	80
11	8	160	40
12	10	200	0

a: x é o expoente de interesse (2, 3, 4 e 5)

O crescimento celular foi avaliado realizando-se ensaio com suspensões celulares variando nas ordens de grandeza de 10^2 , 10^3 e 10^4 células/mL. A cada ordem de grandeza variou-se o número de células de 0 a $2,0 \times 10^x$ células/mL, onde x é o expoente de interesse. Para a montagem das microplacas considerou-se os volumes apresentados na tabela 2. Na etapa do ensaio, que precede a adição da solução de MTT, incubou-se as microplacas em estufa (37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂) por períodos diferentes. Assim os dados foram coletados em 24 h, 48 h e 72 h. O ensaio foi realizado em triplicata e a coleta de dados realizada em $\lambda = 595$ nm.

O estudo da variação de SFB foi realizado utilizando-se suspensão celular de $1,0 \times 10^4$ células/mL. As concentrações de SFB estudadas foram de 1%, 5% e 10% e foram adicionadas em meio RPMI 1640 sem fenol na etapa de preparo das microplacas. Incubou-se as microplacas em estufa (37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂) por períodos diferentes. Assim os dados foram coletados no período de incubação de 2 h, dia inicial do

teste, e após 24 h e 48 h. O ensaio foi realizado em triplicata e a coleta de dados realizada em $\lambda = 595$ nm.

Foi realizado, também, estudo abrangendo variações do número de células, SFB e composto. Para isso, utilizou-se suspensões de $2,0 \times 10^3$, $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$ células/mL e concentrações de SFB de 1%, 5%, 10% e 20% na etapa de preparação das microplacas. Após período de incubação (37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂) de 24 h, adicionou-se diferentes concentrações do composto da **série I**, (-C₄H₉) **4g**, variando-se de 400 a 0,78 μ M. Incubou-se as células com os compostos por 48 h e seguiu-se para o protocolo geral a partir da etapa de utilização do MTT. O ensaio foi realizado em sextuplicata.

5.4.3 Determinação da citotoxicidade dos compostos e fármacos

Para realização do ensaio de citotoxicidade foram eleitos alguns compostos de maior, menor e de atividade biológica intermediária, conforme dados obtidos destes compostos frente a forma epimastigota do parasita, descrito no item 5.3. O ensaio foi baseado nos resultados obtidos nos ensaios de determinação de parâmetros descrito no item 5.4.2.

As etapas do ensaio foram realizadas conforme protocolo geral descrito no item 5.4.1. Na primeira etapa utilizou-se suspensão a $1,0 \times 10^4$ células/mL e meio de cultura RPMI 1640 sem fenol, suplementado com 5% de SFB, para o estabelecimento da cultura celular na microplaca, incubando-se por 24 h (37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂) (ROMEIRO *et al.*, 2009).

Precedendo-se a etapa de adição das soluções dos compostos e fármacos, foram realizadas as diluições para obter concentrações entre 400 a 0,78 μ M, conforme ilustrado na figura 23. Estas diluições foram realizadas partindo-se de massa equivalente a 80.000 μ M, calculada e pesada em balança analítica digital com quatro casas decimais, de acordo com a massa molar de cada composto ou fármaco analisado, e foram diluídos em 1 mL de DMSO. Esta primeira diluição foi denominada solução **A**, apresentando concentração final de 80.000 μ M, a qual foi diluída em meio RPMI 1640 sem fenol para obter a solução **B** com 800 μ M e com 1% de DMSO. Partindo-se da solução **B**, foram obtidas as concentrações entre 400 a 0,78 μ M, com máximo de concentração de DMSO de 0,5%, sendo estas realizadas com auxílio de reservatório com 12 divisões (Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc, Dual solution™). Estas soluções foram preparadas

realizando-se diluição seriada no reservatório por adição de meio RPMI 1640 sem fenol à solução de 800 μM , inicialmente distribuída, obtendo-se sempre metade da concentração anterior. Cada diluição obtida foi adicionada à microplaca, como ilustrado na figura 23.

Figura 23. Esquema de diluição dos compostos e fármacos e montagem das microplacas para o ensaio de determinação de citotoxicidade em macrófagos de linhagem J774

Foram preparados controles de solvente com 0,5% e 0,1% de DMSO, os quais partiram de solução com 1% de DMSO. Preparou-se também o controle positivo de crescimento celular, sem adição de compostos, fármacos ou DMSO, e o controle negativo, adicionando-se 50% de DMSO. Em todos os ensaios foram considerados os brancos de cada diluição dos compostos, fármacos, solvente DMSO e meio RPMI 1640 sem fenol com 5% de SFB. O esquema utilizado para o preparo das microplacas encontra-se no Anexo 2, "Esquema de distribuição dos compostos e fármacos em

microplacas para execução dos ensaios de citotoxicidade em macrófagos de linhagem J774".

Após o preparo das microplacas, incubou-se estas por 48 h (37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂). Seguiu-se o protocolo geral, item 5.4.1, a partir da etapa de distribuição da solução de MTT. O ensaio foi realizado em sextuplicata e a coleta de dados realizada em $\lambda = 595$ nm.

5.4.4 Tratamento dos dados obtidos

Após coleta dos dados em leitora de microplacas, os ensaios para determinação de parâmetros de variação e crescimento celular, foram analisados construindo-se gráfico por regressão linear de absorbância em relação ao número de células/mL, equação 6.

$$A = a (NC) + b \quad \text{equação 6}$$

Em que:

A = absorbância;

a e b = coeficientes da análise de regressão linear de primeira ordem;

NC = número de células/mL.

Os dados obtidos no ensaio para determinação de citotoxicidade foram analisados e calculou-se a porcentagem de citotoxicidade, %C, empregando-se a equação 7 (ROMEIRO *et al.*, 2009):

$$\%C = 100 - \{[(DO_d - DO_{dm}) / (DO_c - DO_{cm})] * 100\} \quad \text{equação 7}$$

Em que:

$DO_d = DO_{595}$ de macrófagos contendo diferentes concentrações de compostos;

$DO_{dm} = DO_{595}$ contendo diferentes concentrações de compostos;

$DO_c = DO_{595}$ de macrófagos na ausência de qualquer composto (controle positivo);

$DO_{cm} = DO_{595}$ de meio de cultura.

As porcentagens de citotoxicidade calculadas de cada sextuplicata foram tratados realizando-se sua média e desvio padrão para posterior utilização no cálculo da IC₅₀ com auxílio do programa *OriginPro* (versão 8.0), empregando-se o modelo não-linear sigmoidal de dose-resposta.

5.5 Estudos de relações estrutura-atividade

Os estudos das relações entre propriedades físico-químicas dos compostos nitrofurânicos e atividade biológica frente *T. cruzi* iniciaram com a construção dos modelos moleculares tridimensionais destes compostos, subsequente cálculo de propriedades moleculares e análise exploratória dos dados.

Nesta etapa foi utilizado computador com o sistema operacional *Windows* de configuração Intel® Core i5™ 2.40 GHz, RAM 6.0 GB, NVIDIA® GeForce® GT 310M 512 MB e computador com sistema *Red Hat Enterprise Linux* de configuração Intel® Core 2™ QUAD Q6600, 2,40GHz, RAM 4.0G, NVIDIA® GeForce® 9600GT 512MB.

5.5.1 Construção dos modelos moleculares tridimensionais (3D)

Os modelos moleculares 3D dos compostos das duas séries foram construídos, inicialmente, no programa *Hyperchem 8.0* (Hypercube, Inc: 2008. Gainesville, FL, EUA). Utilizou-se como geometria de referência, para a **série I**, a estrutura cristalografada do fármaco **NF** (código LEQTAC, $R_{\text{factor}} = 0,11$) (PNIEWSKA, JANUCHOWSKI, 1998), proveniente do CSD, *Cambridge Structural Database*. Para a **série II**, os modelos moleculares 3D foram construídos a partir da estrutura cristalografada da **NF** e da estrutura análoga, 2-[4-acetil-5-(bifenil-4-il)-4,5-di-idro-1,3,4-oxadiazol-2-il]fenil-acetato, contendo o anel oxadiazolínico ($R_{\text{factor}} = 0,035$) (YEHYE, ARIFFIN, RAHMAN, 2010), obtendo-se o modelo molecular do composto **5a**. Para os fármacos de referência, as informações cristalográficas do fármaco **BZ** foram utilizadas ($R_{\text{factor}} = 0,025$) (SOARES-SOBRINHO *et al.*, 2008) e para o fármaco **NFX**, foram utilizadas as coordenadas cartesianas de um de seus análogos como partida ($R_{\text{factor}} = 0,0417$) (CARACELLI *et al.*, 1996).

Procedeu-se a otimização de geometria do composto **5a** em método de campo de força empírico MM+ (derivado do MM2) (ALLINGER, 1977) (programa *Hyperchem 8.0*). Calcularam-se as cargas atômicas parciais de ponto único para as estruturas **5a** e **NF** com o método de mecânica quântica, semi-empírico Hamiltoniano AM1 (AustinModel 1) (DEWAR *et al.*, 1985).

Em seguida, a minimização de energia dos modelos moleculares 3D das estruturas **5a** e **NF** foi realizada com o programa *MOLSIM 3.2* (DOHERTY, 2002; *MOLSIM 3.2*;

The Chem21 Group, Inc.: 1997, Lake Forest, IL, EUA), o qual teve acesso disponibilizado gentilmente no laboratório LAPEN da Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira. Utilizaram-se os métodos de declive máximo (*steepest descent*) e de gradientes conjugados (*conjugated gradient*) com critério de convergência de 0,01 kcal/mol.

As estruturas minimizadas seguiram para as simulações de dinâmica molecular (DM) de 1ns (1.000.000 passos, cada passo de 1 fs), 301 K (28 °C), a fim de gerar o perfil de amostragem conformacional (PAC). Constante dielétrica de 3,5 foi utilizada para simular o ambiente das membranas biológicas e sítio de interação de enzimas. Foi necessário adotar restrição de posição para alguns átomos a fim de manter a integridade estrutural dos modelos moleculares (fixar as posições atômicas por meio da atribuição de massas fictícias de 5.000 u.m.a.). Arquivos trajetória foram salvos a cada 20 passos de simulação, resultando assim em 50.000 confôrmeros (PAC). Selecionaram-se confôrmeros de energia mais baixa do PAC e comparou-se com o modelo molecular inicial e com o minimizado a fim de se verificar se a integridade estrutural foi mantida após a simulação. O critério utilizado foi o valor do desvio quadrático médio de posições atômicas (RMSD, *root-mean-square deviation*). Quanto menor o valor de RMSD mais semelhante são as estruturas. Esta medida auxiliou a escolha do confôrmero de energia mais baixa para prosseguir os estudos. Os confôrmeros de energia mais baixa selecionados nesta etapa foram novamente minimizados de acordo com o mesmo protocolo mencionado para o programa *MOLSIM 3.2*.

Os confôrmeros de mínimo local, da **NF** e do composto **5a**, foram utilizados como modelo para construção dos análogos da **série I e II**, respectivamente. Os análogos foram construídos no programa *Hyperchem 8.0*, e, para cada composto, foi realizada a otimização de geometria com o método de campo de força empírico MM+, apenas para os grupos substituintes alterados na posição 4 do anel benzênico, preservando as coordenadas do restante da estrutura. Calcularam-se as cargas atômicas parciais de ponto único com o método de mecânica quântica, semi-empírico Hamiltoniano AM1 para cada composto. A energia foi minimizada no programa *MOLSIM 3.2* (DOHERTY, 2002) com os métodos de declive máximo (*steepest descent*) e de gradientes conjugados (*conjugated gradient*) e critério de convergência de 0,01 kcal/mol.

5.5.2 Cálculos das propriedades moleculares

As propriedades termodinâmicas, obtidas com o programa *MOLSIM 3.2*, foram as seguintes: a energia potencial total obtida na etapa de minimização (E_{total}), a contribuição de energia intramolecular de solvatação (E_{solv}), utilizando o modelo de camada de hidratação proposto por Forsythe e Hopfinger (1973), e a contribuição de energia intramolecular de ligação de hidrogênio (E_{ligH}). As duas últimas propriedades foram obtidas realizando-se uma simulação curta a 301 K com constante dielétrica de 3,5 e para o cálculo de E_{solv} utilizou-se como solvente a água.

As propriedades eletrônicas foram calculadas com o programa *Gaussian 03W* (*Gaussian 03W for Windows*, version 6; Gaussian Inc.: 1995-2003, Pittsburgh, PA, EUA). Calcularam-se as cargas parciais atômicas ajustadas pelo potencial eletrostático (*CHELPG*, *Charges from Electrostatic Potentials using a Grid based method*) (BRENEMAN, WIBERG, 1990), momento de dipolo (total e nos eixos x, y e z) e energia de orbitais moleculares de fronteira (E_{HOMO} e E_{LUMO}), empregando o método *ab initio* Hartree-Fock (MORGON, COUTINHO, 2007) com conjunto de base 3-21G*. Nesta mesma etapa, foram obtidos os mapas de potencial eletrostático (MPE) dos ligantes.

Os mapas de potencial lipofílico (MPL) e os valores do coeficiente de partição *n*-octanol/água calculado (ClogP) foram obtidos com o programa *Sybyl 8.0* (*Sybyl 8.0 for Linux*; Tripos, Inc.: 2007. St. Louis, EUA). Os mapas foram calculados em superfície molecular de Connolly, obtida com sonda de raio de 1,4 Å, utilizando dois métodos disponibilizados no programa: ClogP_{SG-SLN} (SLN, *Sybyl line notation*) (GHOSE *et al.*, 1998) e ClogP_{SV} (VISVANADHAN *et al.*, 1989).

Calcularam-se com o programa *Marvin Beans* (*Marvin Beans*, version 5.0.4.1; ChemAxon Ltd.: 1998-2010, Budapeste, Hungria) as propriedades estéricas, topológicas e o ClogP_{MB}, sendo este último calculado pelo método de pesos do programa, que atribui pesos iguais para os métodos de VISVANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1994 e PHYSPROP[®] database. As propriedades referentes aos grupos substituintes foram coletadas de dados da literatura (HANSCH, LEO, HOEKMAN, 1995).

Calculadas as propriedades moleculares, gerou-se uma matriz com 40 colunas (variáveis independentes ou descritores ou propriedades calculadas) mais a atividade

biológica linearizada ($\log 1/C$) avaliada frente *T. cruzi* (variável dependente) e 21 linhas, que correspondem ao número de compostos. Destes 21 compostos, 11 compõem a **série I**, incluindo a **NF**, e 10 compostos constituem a **série II**. Os compostos foram classificados em gradientes de atividade biológica (menos ativos, moderados, mais ativos).

Procedeu-se à pré-seleção das propriedades moleculares mais representativas. Os dois filtros utilizados neste estudo foram: (i) o coeficiente de correlação linear de Pearson entre cada propriedade ou descritor e o valor de atividade biológica (variável dependente) e os gráficos de dispersão (*scatter plots*) entre atividade biológica e cada propriedade calculada (Ferreira, 2002).

A matriz final obtida foi utilizada para a análise exploratória dos dados (WERMUTH, 2008).

5.5.3 Análise exploratória dos dados: HCA e PCA

A etapa de análise exploratória foi realizada no programa *Pirouette 3.11* (*Pirouette 3.11*, Infometrix Inc., 1990-2003, Woodinville). A matriz gerada com os dados de propriedades e de atividade biológica teve seus dados pré-processados por auto-escalamento, devido às distintas ordens de magnitude entre as variáveis independentes calculadas.

A análise de HCA foi desenvolvida com método de agrupamento completo e as distâncias entre as amostras foram calculadas por meio da distância Euclidiana. Os dados foram apresentados em gráfico bidimensional, dendograma. As distâncias calculadas entre as amostras foram definidas em uma matriz de similaridade cujos elementos são os chamados índices de similaridade que variam entre 0 e 1, sendo o valor de 1 equivalente à máxima similaridade. O HCA foi realizado para amostras e para variáveis. No primeiro caso, a atividade biológica é considerada como variável dependente e obtêm-se agrupamentos por compostos. No segundo, a atividade biológica é considerada variável independente e obtêm-se a distribuição por descritores (*Pirouette*, 2003, FERREIRA, 2002, MOITA NETO, MOITA, 1998, BEEBE, PELL, SEASHOLTZ, 1998).

Para a análise de PCA, na matriz de dados, a atividade biológica foi considerada como variável dependente. Os dados foram decompostos em duas matrizes, uma de escores, relacionando as amostras, e outra de pesos (*loadings*), relacionando as variáveis

(MONTANARI, 2011, FERREIRA, 2002, BEEBE, PELL, SEASHOLTZ, 1998). O número de componentes principais (PCs) que explica a maior parte dos dados foi determinado e a análise foi desenvolvida para até 10 PCs ou fatores. As análises realizadas foram direcionadas a fim de estabelecer relações entre as propriedades físico-químicas e a atividade biológica.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese e identificação dos compostos

Sendo a síntese e identificação dos compostos planejados das séries **I** e **II** a primeira parte experimental, os resultados obtidos estão descritos e discutidos abaixo.

6.1.1 Obtenção e identificação das benzidrazidas substituídas

As benzidrazidas substituídas foram obtidas por caminho sintético otimizado, ocorrendo assim a reação de esterificação seguida da amonólise, sem o isolamento dos respectivos benzoatos de metila intermediários, como descrito no item 5.1.1 (JORGE *et al.*, 2011, JORGE, 2011).

O caminho sintético convencional (**A**), figura 24, realizado em duas etapas, envolve a obtenção dos benzoatos de metila **2a - j**, a partir de seus correspondentes ácidos benzóicos **1a - j**, isolando-os. Posteriormente são obtidas as benzidrazidas substituídas **3a - j**, a partir de seus correspondentes benzoatos de metila (JORGE, 2009, MASUNARI, TAVARES, 2006, TAVARES *et al.*, 1998). As benzidrazidas substituídas neste trabalho foram obtidas diretamente dos seus correspondentes ácidos benzóicos **1a - j**, caminho (**B**), excluindo-se a etapa de isolamento

Figura 24. Rota sintética para preparação de benzidrazidas substituídas em dois caminhos sintéticos.

Este procedimento de redução de uma etapa sintética foi adotado a partir de dados de literatura, os quais relatam que um dos fatores facilitadores da reação de amonólise é dissolver o éster em um álcool (MORRISON, BOYD, 1994). Outro aspecto facilitador é que o álcool e o ácido, presentes na primeira etapa de esterificação, favorecem a protonação do carbono carbonílico do éster, tornando-o mais susceptível ao ataque nucleofílico pela hidrazina, promovendo a amonólise e, conseqüentemente, a formação das benzidrazidas (JORGE, 2011, MORRISON, BOYD, 1994).

O mecanismo da esterificação de Fischer, figura 25, inicia-se pela protonação do oxigênio carbonílico do ácido carboxílico (**1**). Este próton é proveniente da transferência do metanol (**A**), o qual se apresenta protonado devido ao meio reacional ácido. Em seguida ocorre ataque nucleofílico do metanol (**B**) no carbono carbonílico do intermediário protonado (**1.1**). Após este ataque, o intermediário formado (**1.2**) perde um próton formando intermediário tetraédrico neutro (**1.3**). Posteriormente este intermediário sofre protonação em uma de suas hidroxilas, desencadeando a perda de uma molécula de água (**1.4**). Por fim, ocorre a perda de um próton deste intermediário (**1.5**) obtendo-se assim o benzoato de metila (**2**) (SOLOMONS, FRYHLE, 2004, MARCH, 2001, CAREY, SUNDBERG, 2000).

Figura 25. Mecanismo de esterificação de Fischer (adaptado de MARCH, 2001).

A reação de esterificação de Fischer é caracterizada por ser reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta, a formação de éster, como a reação inversa, que consiste na

hidrólise do éster formado. Assim, quando o equilíbrio é atingido, permanece no meio reacional uma considerável quantidade dos reagentes (SOLOMONS, FRYHLE, 2004). Para deslocar o equilíbrio no sentido da formação dos produtos, pode-se remover um dos produtos ou utilizar excesso de um dos reagentes. Levando-se em consideração estas condições, optou-se pela utilização de excesso de metanol, por ter baixo custo, além de ser favorável a reação subsequente, a amonólise (MARCH, 2001, CAREY, SUNDBERG, 2000).

A amonólise, segunda etapa da rota sintética dos compostos, consiste em reação de substituição nucleofílica por adição-eliminação, figura 26. Esta reação ocorre quando o carbono carbonílico do éster (**2**), deficiente em elétrons, sofre ataque nucleofílico da hidrazina (**A**), formando intermediário instável (**2.1**), que resulta no intermediário (**2.2**). Este é dissociado, (**2.3**), ocorrendo a eliminação de alcóxila (**B**) obtendo-se assim a benzidrazida (**3**) (SOLOMONS, FRYHLE, 2004, MARCH, 2001, CAREY, SUNDBERG, 2000).

Figura 26. Mecanismo de reação de amonólise (adaptado de MARCH, 2001).

As benzidrazidas substituídas foram identificadas por meio da faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados da literatura, sendo verificado que para todas as benzidrazidas o intervalo da faixa de fusão foi estreito e próximo ao da literatura, o que indica pureza destes intermediários. O rendimento médio encontrado nesta etapa foi de 90%. Os dados experimentais referentes a esta etapa sintética estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Dados experimentais das benzidrazidas 4-R-substituídas: rendimento, faixa de fusão e massa molar

Composto	(R)	Rendimento (η%)		Faixa de fusão (°C)		Massa molar (g)
		Exp. ^a	Lit. ^{b, c}	Exp. ^a	Lit. ^b	
3a	H	95	88	112-113	113-117 ^c	136,15
3b	CH ₃	82	-	115-116	114-116 ^e	150,18
3c	CN	81	-	197-198	197-198 ^g	161,16
3d	OCH ₃	94	-	137-139	136-140 ^g	166,18
3e	Cl	85	85	164-165	164-165 ^d	170,60
3f	NO ₂	91	76	215-217	217-219 ^d	181,15
3g	C ₄ H ₉	97	-	79-80	74-76 ^g	192,26
3h	CF ₃	89	81	107-108	115-119 ^g	204,15
3i	Br	96	95	167-168	163-165 ^d	215,05
3j	I	93	91	166-167	164-165 ^f	262,05
Média do rendimento (%)		90				

a: Exp. - dados obtidos experimentalmente

b: Lit. - dados encontrados em literatura

c: Jorge *et al.*, 2011; Jorge, 2011

d: Tavares, Penna, Amaral, 1996

e: Rezende, 2002

f: Masunari, 2005

g: Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie

Na tabela 4 apresenta-se um comparativo entre os rendimentos experimentais com uma etapa sintética, sem isolar o éster, e dados de literatura com duas etapas sintéticas. Verifica-se que a síntese das benzidrazidas em uma única etapa apresentou valores de rendimento maiores para todos os compostos sintetizados, demonstrando viabilidade sintética no procedimento com redução de uma etapa. Verifica-se que para os substituintes **3a** e **3d**, a relação entre o rendimento experimental e o da literatura representa um acréscimo maior que 100%.

Tabela 4. Rendimentos experimentais na obtenção de benzidrazidas 4-R-substituídas comparados aos rendimentos descritos na literatura

Composto (R)		Rendimento Experimental ($\eta\%$)	Rendimento Literatura ($\eta\%$)			Relação de rendimento EXP:LIT _{global} (%)
			Éster ^a	Benzidrazida ^a	Global ^b	
3a	H	95	80	56	45	+ 111
3b	CH ₃	82	83	56	46	+ 77
3c	CN	81	91 ^d	70 ^d	64	+ 27
3d	OCH ₃	94	81	53	43	+ 119
3e	Cl	85	82	68	56	+ 53
3f	NO ₂	91	98	64	63	+ 44
3g	C ₄ H ₉	97	90 ^c	82 ^c	74	+ 31
3h	CF ₃	89	80	65	52	+ 72
3i	Br	96	78	85	66	+ 45
3j	I	93	96 ^c	76 ^c	73	+ 27
Média(%)		90	86	67	58	

a: Tavares, Penna, Amaral, 1996

b: $\eta\%$ global = ($\eta\%$ éster x $\eta\%$ benzidrazida) / 100

c: Masunari, 2005

d: Rezende, 2002

A obtenção da benzidrazida 4-nitro (-NO₂) substituída ocorreu pela reação de amonólise realizada em banho de gelo (JORGE *et al.*, 2011), devido à característica redutora do hidrato de hidrazina frente a grupos nitro aromáticos, reduzindo-os a grupo amino (CAI, ZHOU, YUE, 2009, CAI *et al.*, 2007). Para a identificação deste intermediário, além do comparativo de faixa de fusão, foi necessária a confirmação de sua estrutura química por RMN ¹H, o qual indicou a correta formação com a presença dos sinais característicos, sem a presença de grupo amina na posição 4 do anel benzênico, o que provocaria deslocamento dos sinais relativos ao hidrogênios do anel benzênico para campo abaixo de 7,8 ppm, além da presença de dois hidrogênios referentes ao grupo amino no espectro (SILVERSTEIN, 2007). Os espectros de RMN ¹H do intermediário de interesse em reação realizada em banho de gelo, 4-nitro, se encontra na figura 27, e o intermediário que sofreu redução em reação realizada em refluxo, 4-amino, está ilustrado na figura 28. Estes espectros foram analisados com auxílio do programa *MestRe-C* (versão 5.0).

Figura 27. Espectro de RMN ^1H do composto intermediário 4-nitro-benzidrazida - reação de amonólise em banho de gelo.

Figura 28. Espectro de RMN ^1H do composto intermediário 4-nitro-benzidrazida reduzido à amino - reação de amonólise em refluxo.

6.1.2 Obtenção e identificação dos derivados azometínicos

A síntese dos compostos planejados da **série I** consistiu na obtenção de bases de Schiff (MORRISON, BOYD, 1994) a partir de compostos carbonílicos, *diacetato de 5-nitro-2-furfuraldeído*, e aminas, benzidrazida substituída, envolvendo reação de adição nucleofílica (MARCH, 2001, CAREY, SUNDBERG, 2000, MORRISON, BOYD, 1994), figura 29.

Figura 29. Mecanismo de reação de obtenção de bases de Schiff (MARCH, 2001).

Nesta reação ocorre, primeiramente, ataque nucleofílico da amina primária (3), proveniente da benzidrazida, no carbono carbonílico deficiente em elétrons, proveniente da degradação do *5-nitro-2-furaldeído diacetato* (A) em meio ácido. Em seguida os intermediários (3.1 e 3.2) resultam na liberação de uma molécula de água (3.3). A reação se completa com a desprotonação do intermediário imina (3.4), obtendo-se sua forma neutra (4) correspondente a base de Schiff, compostos da **série I** (MARCH, 2001, CAREY, SUNDBERG, 2000).

Neste mecanismo de adição nucleofílica, o meio reacional deve estar suficientemente ácido para que ocorra a protonação do composto carbonílico, sem permitir decréscimo da concentração de composto nitrogenado livre, por isso a necessidade de mistura de ácidos nesta etapa (TAVARES *et al.*, 1998, TAVARES, PENNA, AMARAL, 1996). Assim, se o meio reacional apresentar acidez elevada, a amina pode se converter em sua forma protonada, perdendo sua capacidade nucleofílica e consequentemente reduzindo a velocidade da reação (MORRISON, BOYD, 1994).

Os compostos azometínicos da **série I** foram identificados, primeiramente, pela faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados da literatura, sendo verificado que, para todos os compostos, o intervalo de faixa de fusão foi estreito, o que indica pureza destes compostos. O rendimento médio encontrado nesta etapa ficou em cerca de 93%. Os dados experimentais referente a esta etapa sintética estão descritos na tabela 5.

Em sequência, na tabela 6, estão demonstrados os rendimentos parciais e totais obtidos na preparação dos intermediários e dos compostos desta **série I**. Observou-se que o rendimento global médio obtido nesta etapa ficou em torno de 84%. Este rendimento médio foi favorecido pela obtenção das benzidrazidas com redução de uma etapa sintética, já que, como demonstrado na tabela 4, os rendimentos destes intermediários por este caminho sintético foram maiores para todos os substituintes, apresentando-se superiores a 80%.

Tabela 5. Dados experimentais de derivados azometínicos 4-R-substituído, **série I**: rendimento, faixa de fusão e massa molar

Composto (R)		Rendimento (η%)		Faixa de fusão (°C)		Massa molar (g)
		Exp. ^a	Lit. ^{b,c}	Exp. ^a	Lit. ^{b,c}	
4a	H	91	86	211-212	214-215	259,06
4b	CH ₃	96	95	230-231	233-235	273,07
4c	CN	89	-	217-220	-	284,23
4d	OCH ₃	96	80	240-241	237-239	289,24
4e	Cl	79	90	228-229	225-227	293,66
4f	NO ₂	99	97	236-238	237-239	304,22
4g	C ₄ H ₉	97	48 ^d	192-194	189-191 ^d	315,32
4h	CF ₃	89	85	207-208	199-201	327,22
4i	Br	97	80	242-243	240-242	338,11
4j	I	93	81 ^d	257-258	253-255 ^d	385,11
Média do rendimento (%)		93				

a: Exp. - dados obtidos experimentalmente

b: Lit. - dados encontrados em literatura

c: Tavares, Penna, Amaral, 1996

d: Rodrigues, 2000

Tabela 6. Rendimentos parciais e global das etapas de obtenção dos derivados azometínicos 4-R-substituídos, **série I**

Composto (R)		Rendimento ($\eta\%$)		
		Benzidrazida	Imina	Global ^a
<i>a</i>	H	95	91	86
<i>b</i>	CH ₃	82	96	79
<i>c</i>	CN	81	89	71
<i>d</i>	OCH ₃	94	96	90
<i>e</i>	Cl	85	79	67
<i>f</i>	NO ₂	91	99	90
<i>g</i>	C ₄ H ₉	97	97	94
<i>h</i>	CF ₃	89	89	80
<i>i</i>	Br	96	97	93
<i>j</i>	I	93	93	86
Média (%)		90	93	84

a: $\eta\%$ global = ($\eta\%$ benzidrazida x $\eta\%$ imina) / 10²

Os compostos da **série I** em análise de RMN apresentaram deslocamentos químicos (δ) correspondentes às estruturas químicas propostas. Os sinais de RMN ¹H e RMN ¹³C dos derivados azometínicos 4-R-substituídos se encontram nas tabelas 7 e 8, respectivamente. Os espectros obtidos foram analisados com auxílio do programa *MestRe-C* (versão 5.0) e estão disponíveis no anexo 3 "Espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C dos compostos da série I azometínica". Evidencia-se a formação destes compostos pela presença dos sinais característicos de RMN ¹H em $\approx 12,20$ ppm - 1H, singlete, referente ao próton ligado ao nitrogênio benzamídico; em $\approx 8,40$ ppm - 1H, singlete, próton ligado ao carbono azometínico; $\approx 7,20$ e $7,70$ ppm - dupletos correspondentes aos hidrogênios do anel furânico apresentando cada um - 1H; duplete em $\approx 8,30$ - $7,00$ ppm correspondentes aos hidrogênios do anel benzênico, apresentando 4H. Os sinais característicos no RMN ¹³C são: ≈ 132 - 114 ppm dos carbonos do anel aromático; ≈ 163 - 162 ppm carbono do grupo carbonílico de amida; ≈ 136 - 134 ppm carbono azometínico; ≈ 152 - 151 ppm carbono do anel furano ligado à porção azometínica da molécula. Na confirmação da pureza dos compostos da **série I** por análise elementar foi determinada a composição centesimal dos principais átomos constituintes da molécula, carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N). Todas as porcentagens se apresentaram muito próximas aos valores calculados e os dados estão relacionados na tabela 9.

A síntese do composto-protótipo NF segue o mesmo protocolo de obtenção dos derivados azometínicos planejados, sendo que seu composto intermediário, benzdrazida, foi obtido comercialmente. Assim, foi realizada apenas a etapa sintética para adição nucleofílica para obtenção da base de Schiff. O rendimento sintético obtido deste composto foi de 98% que, comparado com literatura no valor de 88% (TAVARES, PENNA, AMARAL, 1996), foi bastante satisfatório. Sua identificação inicial foi a determinação da faixa de fusão, sendo a experimental 293-294 °C e a encontrada em literatura 298 °C (MERCK, 1996), apresentando-se próxima e com intervalo da faixa pequeno. Foram realizadas também a espectrometria de RMN ^1H e RMN ^{13}C , apresentando correspondência dos sinais a estrutura química deste fármaco, sendo estes dados apresentados nas tabelas 7 e 8 e os espectros obtidos no anexo 4 "Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto-protótipo nifuroxazida". A análise elementar, tabela 9, indica baixa variação das porcentagens obtidas experimentalmente em relação as calculadas, comprovando assim grau de pureza satisfatório.

Tabela 7. Principais sinais de RMN ^1H (ppm) em DMSO – d_6 de derivados azometínicos 4-R-substituídos, **série I**

Composto (R)		N-H	N=CH	Ar-H _{furano}				Ar-H _{benzeno}			
		(s,1H ₈)	(s,1H ₆)	(d,H ₄)	J (Hz)	(d,H ₃)	J (Hz)	(d,H ₁₁ e H ₁₅)	J (Hz)	(d,H ₁₂ e H ₁₄)	J (Hz)
4a	H	12,25	8,44	7,78	3,9	7,27	3,6	7,95	7,3	7,66-7,54 (m) ^a	-
4b	CH ₃ ^b	12,15	8,40	7,75	3,9	7,22	4,7	7,83	8,1	7,33	8,0
4c	CN	12,23	8,42	7,43	3,9	7,24	3,9	8,06	8,4	7,99	8,3
4d	CH ₃ O ^c	12,11	8,41	7,78	3,9	7,24	3,9	7,93	8,8	7,08	8,8
4e	Cl	12,30	8,43	7,77	3,9	7,27	3,4	7,97	8,3	7,61	8,5
4f	NO ₂	12,29	8,43	7,71	3,6	7,24	3,9	8,14	8,4	8,35	8,7
4g	C ₄ H ₉ ^d	12,17	8,44	7,78	3,9	7,26	3,6	7,86	8,1	7,36	7,8
4h	CF ₃	12,42	8,46	7,79	3,8	7,31	3,3	8,15	7,8	7,92	8,1
4i	Br	12,24	8,37	7,71	3,4	7,21	3,2	7,84	8,1	7,69	8,1
4j	I	12,27	8,42	7,77	3,6	7,26	-	7,69	7,6	7,92	7,8
Nifuroxazida^e		12,02	8,39	7,78	3,9	7,23	3,9	7,82	8,8	6,89	8,7

Nota: s: singlete; d: duplete, m: multiplete

a: multiplete acopla H da posição 13 do anel benzeno não substituído com H12 e H14

b: apresenta δ (ppm): 2,37 (s, 3H, CH₃) correspondente ao substituinte metil

c: apresenta δ (ppm): 3,85 (s, 3H, CH₃) correspondente ao substituinte metoxi

d: apresenta correspondente ao substituinte butil δ (ppm): 2,66 (t, 2H, CH₂); 1,61 (m, 2H, CH₂); 1,35 (m, 2H, CH₂); 0,91 (t, 3H, CH₃)

e: apresenta δ (ppm): 10,17 (s, 1H, OH) correspondente ao substituinte hidroxi - nifuroxazida

Tabela 8. Principais sinais de RMN ^{13}C (ppm) em DMSO – d_6 de derivados azometínicos 4-R-substituídos, **série I**

Composto (R)	C2	C3	C4	C5	C6	C9	C10	C11/15	C12/C14	C13
4a H	151,8	114,5	115,1	150,1	135,5	163,4	132,8	127,7	128,5	132,1
4b CH ₃ ^a	151,9	114,6	114,9	151,8	135,1	163,3	129,8	127,8	129,0	142,3
4c CN ^b	151,3	114,5	114,0	150,1	136,5	162,1	136,8	128,6	132,6	119,7
4d OCH ₃ ^c	152,2	114,2	114,4	151,8	134,7	162,4	125,1	129,3	113,8	163,4
4e Cl	151,8	114,5	115,2	151,6	135,7	162,3	131,3	129,6	128,5	137,0
4f NO ₂	151,9	114,2	115,0	151,5	136,4	162,2	138,6	129,4	123,4	149,5
4g C ₄ H ₉ ^d	151,9	114,6	114,9	151,8	135,1	163,3	130,2	127,8	128,3	147,0
4h CF ₃ ^e	151,9	114,4	115,5	151,5	136,2	162,2	136,5	128,6	125,4	132,0
4i Br	151,8	114,5	115,2	151,6	135,7	162,5	131,7	129,8	131,7	125,5
4j I	152,4	115,1	115,8	152,1	136,3	163,2	132,6	130,1	137,9	100,5
Nifuroxazida	152,0	114,6	114,6	151,7	134,4	161,1	123,1	129,9	115,1	163,1

a: apresenta δ (ppm): 20,9 (CH₃) correspondente ao substituinte metil

b: apresenta δ (ppm): 118,1 (CN) correspondente ao substituinte ciano

c: apresenta δ (ppm): 55,5 (OCH₃) correspondente ao substituinte metoxi

d: apresenta correspondente ao substituinte butil δ (ppm): 34,7(CH₂); 32,7(CH₂); 21,7(CH₂); 13,6 (CH₃)

e: apresenta δ (ppm):121,9 (CF₃) correspondente ao substituinte trifluorometil

Tabela 9.Dados da análise elementar de derivados azometínicos 4-R-substituídos, **série I**

<div style="text-align: center;"> </div>												
Composto (R)		Fórmula molecular	Massa molar (g)	% C			% H			% N		
				Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ
4a	H	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₄	259,06	55,33	55,60	0,27	3,60	3,50	0,10	16,08	16,21	0,13
4b	CH ₃	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₄	273,07	57,52	57,14	0,38	4,41	4,06	0,35	15,35	15,38	0,03
4c	CN	C ₁₃ H ₈ N ₄ O ₄	284,05	54,52	54,93	0,41	3,08	2,84	0,24	19,39	19,71	0,32
4d	OCH ₃	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₅	289,24	53,57	53,98	0,41	3,80	3,83	0,03	14,15	14,53	0,38
4e	Cl	C ₁₂ H ₈ ClN ₃ O ₄	293,02	48,95	49,08	0,13	2,82	2,75	0,07	14,18	14,31	0,13
4f	NO ₂	C ₁₂ H ₈ N ₄ O ₆	304,22	46,98	47,38	0,40	3,02	2,65	0,37	18,31	18,42	0,11
4g	C ₄ H ₉	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄	315,12	60,61	60,94	0,33	5,41	5,43	0,02	13,32	13,33	0,01
4h	CF ₃	C ₁₃ H ₈ F ₃ N ₃ O ₄	327,22	47,88	47,72	0,16	2,65	2,46	0,19	12,74	12,84	0,10
4i	Br	C ₁₂ H ₈ BrN ₃ O ₄	336,97	42,32	42,63	0,31	2,74	2,83	0,09	11,85	12,43	0,58
4j	I	C ₁₂ H ₈ IN ₃ O ₄	384,96	37,17	37,42	0,25	2,30	2,09	0,21	10,53	10,91	0,38
Nifuroxazida		C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅	275,05	52,66	52,37	0,29	3,37	3,30	0,07	14,87	15,27	0,40

Δ = |experimental -calculado|

6.1.3 Obtenção e identificação de derivados oxadiazolínicos

A síntese da **série II** consistiu na obtenção do anel *2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazolínico* por ciclização oxidativa das bases de Schiff, **4a - j**, em presença de anidrido acético. O mecanismo de reação, ilustrado na figura 30, inicia-se quando a amina terciária da base de Schiff (**4**) realiza ataque nucleofílico no carbono carbonílico do anidrido acético (**A**), ocorrendo sua clivagem e resultando em grupo acetila e íon acetato (**B**). O grupo acetila liga-se a amina terciária (**4.1**), apresentando carga parcial positiva, gerando um carbocátion transitório. O íon acetato ataca o próton amínico (**4.2**) e, de sua desprotonação, resulta o ácido acético (**C**). O oxigênio azometínico, com carga parcial negativa, ataca o carbocátion (**4.2**) ocorrendo a ciclização oxidativa e obtendo-se o composto final (**5**) (OLIVEIRA, 2011, MACCIONI *et al.*, 2011, ALMEIDA, 2009, LI, MA, CAO, 2009, SOMOGYI, 2007, JOULE, MILLS, 2007, ROLLAS, GULERMAN, ERDENIZ, 2002).

Figura 30. Mecanismo de reação para obtenção de 2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazolínico (OLIVEIRA, 2011, ALMEIDA, L.V., 2009, JOULE, MILLS, 2007)

Os compostos furfurilidênicos oxadiazolínicos da **série II** tiveram sua reação acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD), sendo o sistema eluente utilizado clorofórmio/hexano (4:1).

As alíquotas do meio reacional para análise nas placas cromatográficas foram coletadas em diferentes momentos, sendo considerado o final da reação a formação de um

concentrado único diferente do obtido no início da reação, indicando presença de apenas um composto no meio reacional. As placas foram reveladas com luz ultravioleta (UV). Na figura 31 é apresentado, como exemplo, placa cromatográfica realizada na síntese do derivado oxadiazolínico 4-metoxi (-OCH₃) substituído, sendo avaliada uma alíquota do início da reação e outra no final, após 18h. O fator de retenção (R_f), que representa a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel, foi calculado para as duas amostras, o que possibilitou a verificação da formação do composto de interesse (AQUINO NETO, NUNES, 2003).

Figura 31. Placa de CCD realizada na síntese do derivado oxadiazolínico 4-metoxi (-OCH₃) substituído

Na obtenção dos compostos furfurilidênicos oxadiazolínicos ocorreram inicialmente problemas de ordem sintética, como a não formação dos compostos, baixo rendimento e presença de impurezas, sendo atribuídos à necessidade de utilizar o reagente anidrido acético mais puro e utilizar atmosfera inerte com gás nitrogênio, já que a presença de água neste meio reacional prejudica a formação do produto devido hidrólise deste reagente. O anidrido acético foi adquirido comercialmente apresentando grau de pureza maior ($\geq 99\%$). A pureza deste reagente foi verificada por RMN ¹H, apresentando sinais característicos do anidrido acético e ácido acético, no caso do reagente degradado (SILVERSTEIN, 2007), sendo apresentada na figura 32 as atribuições de sinais identificados do reagente impuro, e na figura 33 o reagente com grau de pureza maior.

Figura 32. Espectro de RMN ^1H do reagente anidrido acético impuro.

Figura 33. Espectro de RMN ^1H do reagente anidrido acético de maior pureza.

A primeira análise físico-química para caracterização dos compostos oxadiazolínicos, **série II**, foi a determinação da faixa de fusão, sendo verificado que todos

os intervalos de faixa de fusão foram pequenos, com variação de 1 °C, o que indica pureza destes compostos. Os dados experimentais referente a esta etapa sintética estão descritos na tabela 10.

Tabela 10. Dados experimentais dos derivados oxadiazolínicos 4-R-substituído, **série II**: rendimento, faixa de fusão e massa molar

Composto	(R)	Rendimento (η%)		Faixa de fusão (°C)		Massa molar(g)
		Exp. ^a	Lit. ^b	Exp. ^a	Lit. ^b	
5a	H	78	-	161-162	-	301,25
5b	CH ₃	72	-	140-141	-	315,28
5c	CN	55	-	177-178	-	326,26
5d	OCH ₃	63	-	164-165	-	331,28
5e	Cl	71	-	178-179	-	335,70
5f	NO ₂	64	-	175-176	-	346,25
5g	C ₄ H ₉	52	-	89-90	-	357,36
5h	CF ₃	86	-	166-167	-	369,25
5i	Br	67	-	160-161	-	380,15
5j	I	78	-	175-176	-	427,15
Média do rendimento (%)		69				

a: Exp. - dados obtidos experimentalmente

b: Lit. - dados encontrados em literatura

O rendimento médio encontrado nesta etapa foi de 69%, sendo os compostos que apresentaram menor rendimento foram os derivados **5g** e **5j**, correspondentes aos substituintes ciano (-CN) e butila (-C₄H₉) com 55% e 52%, respectivamente. Os rendimentos parciais e totais obtidos na preparação dos intermediários e dos compostos da **série II** estão apresentados na tabela 11. Os rendimentos ainda apresentam-se baixos, mesmo utilizando-se reagente mais puro e atmosfera inerte, sendo esta a etapa crítica do processo sintético, o que desfavorece o rendimento global que apresentou média de 57%.

Tabela 11. Rendimentos parciais e global das etapas de obtenção dos derivados oxadiazolínicos 4-R-substituídos, **série II**

Composto (R)		Rendimento (η%)			
		Benzidrazida	Imina	Oxadiazol	Global ^a
A	H	95	91	78	67
B	CH ₃	82	96	72	58
C	CN	81	89	55	39
D	OCH ₃	94	96	63	57
E	Cl	85	79	71	48
F	NO ₂	91	100	64	58
G	C ₄ H ₉	97	97	52	49
H	CF ₃	89	89	86	69
I	Br	96	97	67	63
J	I	93	93	78	68
Média (%)		90	93	69	57

a: $\eta\%$ global = $(\eta\% \text{ benzidrazida} * \eta\% \text{ imina} * \eta\% \text{ oxadiazol})/10^4$

A estrutura química dos compostos da **série II** foram também comprovadas por RMN ¹H e RMN ¹³C. Todos os compostos desta série apresentaram os deslocamentos químicos (δ) correspondentes a sua estrutura química. Os sinais de RMN ¹H e RMN ¹³C da **série II** encontram-se nas tabelas 12 e 13, respectivamente e foram analisados com auxílio do programa *MestRe-C* (versão 5.0), estando disponíveis no anexo 5 "Espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C dos compostos da série II oxadiazolínica". Evidenciou-se a formação destes compostos pela presença dos principais sinais característicos de RMN ¹H em ≈7,4-7,3 ppm - 1H, singlete, referente ao próton do anel oxadiazol e ≈2,3-2,2 ppm - 3H, singlete, equivalente aos três hidrogênios da metila do grupo acetil ligado ao átomo de nitrogênio do anel 1,3,4-oxadiazolínico. Os sinais característicos no RMN ¹³C são ≈ 152-151 ppm e 90-84 ppm referente aos carbonos do anel oxadiazólico, ≈172-166 ppm referente ao carbono carbonílico ligado ao átomo de nitrogênio do anel 1,3,4-oxadiazolínico e ≈26-20 ppm da metila do grupo acetila. Nas figuras 34 e 35 ilustrados os espectros dos compostos **4h** e **5h** para representar os sinais principais que evidenciam a formação dos compostos da **série II**. Para confirmação da pureza por análise elementar foi determinada a composição centesimal dos principais átomos constituintes da molécula, carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) e todas as porcentagens se apresentaram muito próximas aos valores calculados e os dados estão relacionados na tabela 14.

Figura 34. Espectro RMN ^1H do composto **4h** com destaque para sinais característicos da **série I**.

Figura 35. Espectro RMN ^1H do composto **5h** com destaque para sinais característicos da **série II**.

Tabela 12. Principais sinais de RMN ^1H (ppm) em DMSO – d_6 de derivados oxadiazolínicos 4-R-substituídos, **série II**.

Composto (R)		Ar-H _{benzeno}				Ar-H _{furano}				Ar-H _{oxadiazol}	Acetil
		(d,H ₁₉ e H ₁₅)	<i>J</i> (Hz)	(d,H ₁₈ e H ₁₆)	<i>J</i> (Hz)	(d,H ₈)	<i>J</i> (Hz)	(d,H ₇)	<i>J</i> (Hz)	(s,H ₂)	(s,3H ₂₂)
5a	H	7,84	7,9	7,62-7,51 (m) ^a	-	7,64	3,8	7,15	3,9	7,35	2,29
5b	CH ₃ ^b	7,74	8,2	7,36	8,0	7,70	3,8	7,22	3,8	7,36	2,29
5c	CN	7,99	8,7	7,96	8,7	7,65	3,8	7,20	3,8	7,41	2,32
5d	OCH ₃ ^c	7,78	8,8	7,08	8,8	7,70	3,8	7,21	3,8	7,34	2,27
5e	Cl	7,84	8,8	7,59	8,8	7,64	3,8	7,16	3,8	7,36	2,28
5f	NO ₂	8,09	8,7	8,37	8,7	7,73	3,8	7,28	3,8	7,46	2,33
5g	C ₄ H ₉ ^d	7,76	8,2	7,36	8,0	7,72	3,8	7,23	3,8	7,37	2,30
5h	CF ₃	8,06	8,1	7,92	8,4	7,73	3,8	7,28	3,8	7,45	2,33
5i	Br	7,76	-	7,76	-	7,70	3,7	7,23	3,7	7,38	2,28
5j	I	7,58	8,2	7,91	8,2	7,70	3,8	7,23	3,8	7,38	2,29

Nota: s: singlete; d: duplete; t: triplete; m: multiplete

a: multiplete acopla H da posição 17 do anel benzeno não substituído com H18 e H16

b: apresenta δ (ppm): 2,38 (s, 3H, CH₃) correspondente ao substituinte metil

c: apresenta δ (ppm): 3,83 (s, 3H, CH₃) correspondente ao substituinte metoxi

d: apresenta δ (ppm): 2,65 (t, 2H, CH₂); 1,56 (t, 2H, CH₂); 1,31 (t, 2H, CH₂); 0,89 (t, 3H, CH₃) correspondente ao substituinte butil

Tabela 13. Principais sinais de RMN ^{13}C (ppm) em DMSO – d_6 de derivados oxadiazolínicos 4-R-substituídos, **série II.**

Composto (R)	C2	C5	C6	C7	C8	C9	C14	C17	C16/C18	C15/C19	C20	C22
5a H	84,4	151,7	154,5	114,0	113,1	150,5	132,2	123,4	129,1	126,6	167,2	21,1
5b CH ₃ ^a	84,2	151,7	154,7	114,4	113,2	150,6	120,6	142,4	129,7	126,6	167,1	21,0
5c CN ^b	85,1	151,8	153,3	114,4	112,9	150,3	127,7	117,8	132,9	127,3	167,4	20,9
5d OCH ₃ ^c	84,0	151,7	154,6	114,3	113,2	150,7	115,5	162,2	114,6	128,5	167,0	21,1
5e Cl	84,7	151,8	153,9	114,2	113,0	150,6	131,1	137,0	128,4	129,3	167,2	20,9
5f NO ₂	85,2	151,8	153,0	114,8	113,1	150,1	129,2	149,2	124,3	127,9	167,5	21,1
5g C ₄ H ₉ ^d	84,2	151,7	154,7	114,3	113,1	150,6	129,3	147,1	126,6	128,9/128,3	167,3	21,0
5h CF ₃ ^e	90,2	157,0	158,6	119,9	118,4	155,5	137,1	136,7	131,4/131,3	132,7	172,6	26,3
5i Br	84,7	151,8	153,8	114,2	112,9	150,3	125,8	122,6	132,3	128,5	167,2	21,1
5j I	84,6	151,8	154,1	114,5	113,1	150,4	122,8	99,7	138,0	128,2	167,2	21,1

a: apresenta δ (ppm): 21,1 (CH₃) correspondente ao substituinte metil

b: apresenta δ (ppm): 118,0 (CN) correspondente ao substituinte ciano

c: apresenta δ (ppm): 55,48 (OCH₃) correspondente ao substituinte metoxi

d: apresenta correspondente ao substituinte butil (C₄H₉) δ (ppm): 34,7(CH₂); 32,7(CH₂); 21,0(CH₂); 13,6 (CH₃)

e: apresenta δ (ppm): 127,1 (CF₃) correspondente ao substituinte trifluorometil

Tabela 14. Dados da análise elementar de derivados oxadiazolínicos 4-R-substituídos, **série II.**

Composto (R)		Fórmula molecular	Massa molar (g)	% C			% H			% N		
				Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ
5a	H	C ₁₄ H ₁₁ N ₃ O ₅	301,07	55,59	55,82	0,23	3,70	3,68	0,02	14,35	13,95	0,40
5b	CH ₃	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₅	315,09	56,74	57,14	0,40	4,23	4,16	0,07	12,95	13,33	0,38
5c	CN	C ₁₅ H ₁₀ N ₄ O ₅	326,07	54,88	55,22	0,34	2,92	3,09	0,17	17,18	17,17	0,01
5d	OCH ₃	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₆	331,28	54,43	54,38	0,05	3,97	3,96	0,01	12,25	12,68	0,43
5e	Cl	C ₁₄ H ₁₀ ClN ₃ O ₅	335,03	50,37	50,09	0,28	2,92	3,00	0,08	12,33	12,52	0,19
5f	NO ₂	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₇	346,05	48,78	48,56	0,22	2,89	2,91	0,02	15,89	16,18	0,29
5g	C ₄ H ₉	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₅	357,36	60,11	60,50	0,39	5,47	5,36	0,11	11,58	11,76	0,18
5h	CF ₃	C ₁₅ H ₁₀ F ₃ N ₃ O ₅	369,25	48,80	48,79	0,01	2,66	2,73	0,07	11,25	11,38	0,13
5i	Br	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O ₅	378,98	44,13	44,23	0,10	2,55	2,65	0,10	10,73	11,05	0,32
5j	I	C ₁₄ H ₁₀ IN ₃ O ₅	426,97	39,47	39,37	0,10	2,29	2,36	0,07	9,68	9,84	0,16

 $\Delta = |\text{experimental} - \text{calculado}|$

Quanto aos fármacos utilizados como referência no ensaio de determinação de atividade anti-*T. cruzi*, ressalta-se que o benznidazol (BZ) encontrava-se disponível no LPDF - FBT/FCF - USP e o nifurtimox (NFX) foi gentilmente disponibilizado pela Professora Bianca Silvana Zingales, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos - IQ/USP. Para a identificação destes fármacos foi determinada a faixa de fusão, sendo que para o BZ obteve-se a faixa de fusão de 188-189 °C e a encontrada em literatura foi de 188-190 °C (MERCK, 1996). Para o NFX foi de 180-181 °C, sendo a encontrada em literatura de 180-182 °C (MERCK, 1996). Os fármacos apresentaram faixas de fusão próximas aos da literatura e com pequeno intervalo, indicando sua pureza. Foram realizadas também análises de RMN ¹H e RMN ¹³C, apresentando correspondência dos sinais com a estrutura química destes fármacos. Os espectros obtidos estão apresentados no anexo 6 "Espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C dos fármacos benznidazol e nifurtimox".

6.2 Determinação da atividade anti-*T. cruzi* frente a forma epimastigota

A determinação da atividade biológica neste trabalho frente a forma epimastigota do *T. cruzi* foi realizada a fim de fornecer dados para os estudos de relações estrutura-atividade neste tipo morfológico. A forma epimastigota é considerada como uma forma não-infectante do parasita encontrada, predominantemente, no intestino do vetor triatomíneo (barbeiro). Porém, alguns trabalhos identificaram a presença de variações deste tipo morfológico, em pequenas quantidades (menos que 1%) em células de mamíferos (TYLER, ENGMAN, 2001, ALMEIDA-DE-FARIA *et al.* 1999, FAUCHER, BALTZ, PETRY, 1995).

Dentre as etapas de realização do ensaio para determinação de atividade anti-*T. cruzi*, sendo estas a diluição dos compostos e fármacos, o preparo do inóculo e o preparo do ensaio em cubetas para determinação da atividade biológica, descritas no item 5.3, cita-se que na segunda etapa foi utilizada a curva de calibração desenvolvida por Jorge (2011) para verificação da concentração do inóculo. Esta curva foi construída com 15 pontos representados pela relação das absorbâncias, obtidas em espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda (λ) de 580 nm, com diferentes diluições de concentrações de suspensões parasitárias, determinada pela contagem do parasita em

câmara de Neubauer. Assim foi gerado, por modelo linear, uma equação representada pela equação 6, apresentando coeficiente de determinação (r^2) de 0,996 (JORGE, 2011).

$$A = 0,01718 \cdot (NP) + 0,01591 \quad \text{equação 6}$$

Em que:

A= absorbância determinada;

NP = número de parasitas por mL.

Utilizando esta curva determinou-se a concentração do inóculo inicial com 10 dias e preparou-se suspensão de $4,0 \times 10^6$ parasitas/mL para utilização no ensaio, com objetivo de obter $2,0 \times 10^6$ parasitas/mL após adição da solução dos compostos. Esta metodologia para quantificação de parasitas em suspensões por espectroscopia UV/VIS para posterior determinação da porcentagem de inibição de crescimento (%IC) e determinação do IC₅₀, é bastante empregada em estudos relacionados ao *T. cruzi*, indicando reprodutibilidade dos ensaios (JORGE, 2011, ISHII *et al.*, 2011, GERPE *et al.*, 2010, CERECETTO *et al.*, 1998).

Em todos os ensaios foram realizados o controle do solvente DMSO nas mesmas concentrações utilizadas para a solubilização dos compostos e fármacos, e não ultrapassaram 1,0% de DMSO. Conforme tabela 15 e a representação gráfica dos dados, figura 36, essa concentração de solvente, comparado com o controle positivo, não influenciou o crescimento parasitário.

Tabela 15. Relação entre absorbância e o tempo de incubação em três condições: controle de solvente (1% e 0,5% de DMSO) e controle positivo.

	Média das Absorbâncias			
	dia 0	DP	dia 5	DP
CP	0,049	0,004	0,625	0,065
CS - 1%	0,047	0,006	0,601	0,040
CS - 0,5%	0,050	0,006	0,612	0,060

CP: Controle positivo

CS - 1%: Controle do DMSO a 1%

CS - 0,5%: Controle do DMSO a 0,5%

DP: desvio padrão

Figura 36. Representação gráfica da relação entre a absorbância e o tempo de incubação em três condições: controle de solvente (1,0% e 0,5% de DMSO) e controle positivo.

Os dados foram expressos em absorbância e foram comparados no dia inicial e 5 dias após incubação. Estudos similares também observaram que concentrações até 1% de DMSO em cultura de *T. cruzi* na forma epimastigota não afetam o crescimento parasitário (JORGE, 2011, ISHII *et al.*, 2011, GERPE *et al.*, 2010, CERECETTO *et al.*, 1998).

Para a determinação da atividade biológica, os ensaios foram divididos em fases como descrito no item 5.3. Na primeira fase foi avaliada a porcentagem de inibição de crescimento parasitário, %IC, nas concentrações de 10, 20 e 50 μM , seguida pela segunda fase, analisando-se as concentrações de 2, 4 e 8 μM . Em terceira etapa, os compostos **4g** e **4j** e os fármacos **NF** e **NFX** foram avaliados em outras concentrações para auxiliar na determinação do IC_{50} . As concentrações da primeira fase foram estabelecidas baseadas em trabalhos anteriores com compostos de estrutura semelhante, e variaram, na maioria dos ensaios, de 50 a 5 μM (JORGE, 2011, ISHII *et al.*, 2011).

Os valores de IC_{50} e do coeficiente de determinação, r^2 , foram obtidos utilizando-se modelo não-linear, dose-resposta, sigmoidal realizados no programa OriginPro 8.0. As porcentagens de IC apresentadas nas tabelas se referem aos dados calculados após as leituras de absorbância realizadas no ensaio biológico e obtidos empregando-se a equação 5 apresentada no item 5.3. Os ensaios foram realizados em triplicata e assim calculou-se os respectivos desvios-padrões para cada concentração. Para construção da curva sigmoidal foram atribuídos 5 ou mais pontos, sendo que curvas com 5 pontos representam a exclusão de um ponto para obter melhor ajuste da curva. Já, curvas contendo mais de seis pontos representam que, para determinar o IC_{50} , foi necessário realizar o ensaio em concentrações maiores ou menores, dependendo da atividade encontrada para o composto ou fármaco.

Os resultados obtidos para os compostos da **série I** são apresentados no anexo 7, "Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário em diferentes concentrações dos compostos da série I". Os dados do composto **4g** são apresentados na tabela 16 e a curva dose-resposta com o valor da IC_{50} encontra-se na figura 37. Este composto necessitou realizar ensaios para determinar a %IC em concentrações abaixo de 2 μM a fim de traçar a curva dose-resposta e obter o seu IC_{50} .

Para os compostos da **série II**, os resultados obtidos são apresentados no anexo 8, "Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário em diferentes concentrações

dos compostos da série II". Para estes compostos não foi necessário a realização de ensaios para determinar a %IC em concentrações acima de 50 μM ou abaixo de 2 μM .

Tabela 16. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4g**.

Concentração (μM)	(log μM)	IC ^a (%)	DP
8,00	0,903	100	1,1
6,00	0,778	100	0,4
4,00	0,602	100	0,4
3,00	0,477	100	0,2
2,00	0,301	96	0,5
1,60	0,204	88	3,4
1,50	0,176	84	2,1
1,00	0,000	54	3,5
0,80	-0,097	39	4,6
0,50	-0,301	24	2,9
0,40	-0,398	20	3,5
0,25	-0,602	12	3,2

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Figura 37. Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4g** e valor de IC₅₀.

Para determinação do IC₅₀ do composto-protótipo, **NF**, o modelo matemático utilizado foi o exponencial no programa *OriginPro 8.0*, o qual demonstrou melhor correspondência aos dados obtidos e melhor coeficiente de determinação, r^2 . Os resultados obtidos para a **NF** são apresentados no anexo 9, "Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto-protótipo nifuroxazida". A fim de traçar a curva dose-resposta e obter o IC₅₀ da **NF**, foi necessário realizar ensaios para determinar a %IC em concentrações acima de 50 μM . Os dados do composto-protótipo são apresentados na tabela 17 e a curva dose-resposta com o valor da IC₅₀ encontra-se na figura 38.

Os dados dos fármacos **BZ** e **NFX** são apresentados no anexo 10, "Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário em diferentes concentrações dos fármacos de referência, benznidazol e nifurtimox". Para o fármaco **NFX**, assim como para o composto **4g**, foi necessário determinar a %IC em concentrações abaixo de 2 μM a fim de traçar a curva dose-resposta e obter o seu IC_{50} .

Tabela 17. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco NF.

Concentração (μM)	(log μM)	IC ^a (%)	DP
180	2,255	67	2,5
160	2,204	65	1,0
140	2,146	62	0,5
120	2,079	48	4,1
100	2,000	41	6,9
90	1,954	37	4,1
80	1,903	28	3,0
70	1,845	25	5,3
60	1,778	16	3,3
50	1,699	10	5,6
45	1,653	10	2,9
40	1,602	6	1,9
35	1,544	3	2,4
30	1,477	2	3,5
25	1,398	1	6,9
20	1,301	0	5,7
17,5	1,243	0	0,9
15	1,176	0	3,0

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

NF: nifuroxazida

Figura 38. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco nifuroxazida e valor de IC_{50} .

Na tabela 18 encontra-se a relação dos dados de IC_{50} determinados. Verifica-se que todos os compostos da **série I** apresentaram-se com atividade biológica superior a **série II**, e as duas séries mostraram-se mais ativas que o composto-protótipo **NF**, o que indica que as modificações moleculares realizadas na etapa de planejamento dos compostos foram pertinentes. O fármaco de referência **BZ**, único fármaco disponível no Brasil para o tratamento da doença de Chagas, apresentou menor capacidade de inibição de crescimento do parasita, comparado com os compostos sintetizados. Os compostos **4g** e **4j** da **série I** demonstraram atividade superior ao **NFX**.

Tabela 18. Atividade anti-*T. cruzi* dos compostos e fármacos representados como IC_{50} *T. cruzi*

Compostos (R)		IC_{50} <i>T. cruzi</i> (μM) ^a	DP	Compostos (R)		IC_{50} <i>T. cruzi</i> (μM) ^a	DP
4a	H	4,44	0,53	5a	H	10,22	0,41
4b	CH ₃	3,71	0,15	5b	CH ₃	9,84	0,59
4c	CN	12,51	0,95	5c	CN	13,44	0,80
4d	OCH ₃	3,95	0,36	5d	OCH ₃	9,29	1,02
4e	Cl	4,03	0,23	5e	Cl	11,46	0,81
4f	NO ₂	9,45	0,54	5f	NO ₂	13,91	0,95
4g	C ₄ H ₉	1,05	0,07	5g	C ₄ H ₉	8,27	0,43
4h	CF ₃	4,42	0,14	5h	CF ₃	11,14	1,07
4i	Br	3,74	0,16	5i	Br	9,59	0,31
4j	I	3,21	0,19	5j	I	11,52	0,99
benznidazol							
		22,69	1,96				
nifurtimox							
		3,78	0,10				
nifuroxazida							
		120,46	4,06				

a: dados correspondentes a média da triplicata

IC_{50} : concentração inibitória de 50% das células parasitárias

DP: desvio padrão

6.3 Determinação da citotoxicidade em macrófago murino de linhagem J774

A avaliação da citotoxicidade dos compostos sintetizados e fármacos de referência neste trabalho teve como finalidade determinar a concentração inibitória de 50% das células macrofágicas J774, IC_{50} J744.

Os macrófagos são considerados como uma das células hospedeiras do parasita em mamíferos (ANDRADE, ANDREWS, 2005, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000), assim, há trabalhos que estão utilizando a linhagem THP-1, monócitos humano proveniente de leucemia, apresentando como vantagem a utilização de células humanas para avaliar a ação de compostos e fármacos (LOPES *et al.*, 2012). Porém, devido disponibilidade de cultura dos macrófagos de linhagem J774 e facilidade de seu manuseio, os ensaios neste trabalho foram realizados com células murinas. É interessante citar que muitos trabalhos utilizam as células J774 para a determinação da citotoxicidade (PARDO, 2010, GERPE *et al.*, 2010, ROMEIRO *et al.*, 2009, MUELAS *et al.*, 2001).

Os ensaios de citotoxicidade tiveram como princípio a verificação da morte celular do macrófago murino da linhagem J774 por meio de método colorimétrico baseado na redução metabólica do MTT pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase em um composto de cor azul denominado formazan, figura 39, o que possibilita a leitura em espectrofotômetro. Devido a proporcionalidade da quantidade de cristais de formazan gerados e a funcionalidade mitocondrial das células é possível verificar o número de células viáveis. Este método foi desenvolvido por Mosmann, em 1983, sendo alterada em 1986 por François Denizot e Rita Lang (PARDO, 2006, DENIZOT, LANG, 1986, MOSMANN, 1983).

Figura 39. Composto tetrazólico MTT, de coloração amarela, reduzido a formazan, de coloração azul

6.3.1 Determinação de parâmetros do ensaio de citotoxicidade

Dentre as etapas de determinação de parâmetros para os ensaios de citotoxicidade em macrófagos J774, foram realizados a determinação do número ideal de células, a determinação da concentração de SFB e a verificação da variação do número de células e SFB em presença de composto.

Para escolha do número ideal de células foram avaliados os resultados obtidos em alguns ensaios realizados, em que, no primeiro ensaio, variou-se o número de células em $1,0 \cdot 10^3$, $1,0 \cdot 10^4$, $1,0 \cdot 10^5$ e $1,0 \cdot 10^6$ células/mL, dados apresentados na tabela 19 e figura 40. Verificou-se que, na ordem de $1,0 \cdot 10^5$ e $1,0 \cdot 10^6$ células/mL, o dado de absorbância obtido foi muito elevado e foi observado maior desvio padrão no valor de absorbância para o dado de $1,0 \cdot 10^6$ células/mL.

Tabela 19. Dados da absorbância relacionados a variação do número de células J774/mL em potência.

nº de células/mL	Absorbância ^a $\lambda=595\text{nm}$	DP
$1,0 \cdot 10^3$	0,205	0,035
$1,0 \cdot 10^4$	0,540	0,040
$1,0 \cdot 10^5$	1,849	0,086
$1,0 \cdot 10^6$	3,437	0,261

DP: desvio padrão

a: dados correspondentes a média da triplicata

Figura 40. Representação gráfica do dados da absorbância em relação a variação do número de células J774/ml em potência.

Em um segundo ensaio variou-se o número de células na mesma ordem de grandeza, obtendo-se 10 variações para cada ordem, 10^3 , 10^4 e 10^5 células/mL. Os dados deste ensaio estão apresentados nas tabelas 20 a 22 e nas figuras 41 a 43. A variação do número de células na mesma ordem de grandeza possibilitou a utilização destas curvas como curvas padrão, devido a relação do número de células com a absorbância obtida (SATYANARAYANAJOS, 2011).

Tabela 20. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^3 células/mL.

nº de células * 10^3 /mL	Absorbância ^a $\lambda=595\text{nm}$	DP
0,0	0,202	0,012
0,5	0,214	0,016
1,0	0,215	0,012
1,5	0,217	0,010
2,0	0,227	0,012
2,5	0,239	0,013
3,0	0,254	0,021
4,0	0,269	0,018
5,0	0,273	0,021
6,0	0,299	0,021
8,0	0,358	0,019
10,0	0,350	0,020

DP: desvio padrão

a: dados correspondentes a média da triplicata

Figura 41. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^3 células/mL.

Tabela 21. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^4 células/mL.

nº de células * 10^4 /mL	Absorbância ^a $\lambda=595\text{nm}$	DP
0,0	0,144	0,015
0,5	0,285	0,023
1,0	0,440	0,016
1,5	0,537	0,031
2,0	0,686	0,017
2,5	0,820	0,035
3,0	0,909	0,040
4,0	1,205	0,086
5,0	1,423	0,093
6,0	1,849	0,114
8,0	2,388	0,145
10,0	2,919	0,111

DP: desvio padrão

a: dados correspondentes a média da triplicata

Figura 42. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^4 células/mL.

Tabela 22. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^5 células/mL.

nº de células * 10^5 /mL	Absorbância ^a $\lambda=595\text{nm}$	DP
0,0	0,149	0,019
0,5	1,132	0,102
1,0	2,349	0,221
1,5	2,567	0,352
2,0	3,052	0,030
2,5	3,184	0,157
3,0	3,417	0,345
4,0	3,394	0,276
5,0	3,473	0,374
6,0	3,378	0,117
8,0	3,391	0,199
10,0	3,437	0,459

DP: desvio padrão

a: dados correspondentes a média da triplicata

Figura 43. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^5 células/mL.

Verificou-se que, na ordem de 10^3 células/mL, os valores de absorbância foram muito baixos e sem variação significativa ao aumentar o número de células. Já na ordem de 10^4 células/mL, o ensaio apresentou-se mais sensível com a variação celular. Estas duas ordens de grandeza apresentaram resultados com tendência linear e proporcionalidade crescente entre valores de absorbância e número de células, sendo resultados coerentes ao princípio do método.

Os resultados obtidos na ordem de 10^5 células/mL mostrou-se linear apenas até $3,0 \cdot 10^5$ células/mL e platô acima desta quantidade. Este fato ocorreu devido ao limite da leitora de microplacas, apresentando leituras imprecisas em absorbâncias altas. Adicionalmente encontrou-se dificuldade em promover a lise celular e solubilizar o formazan nesta quantidade de células.

Como alternativa ao problema, foi avaliada uma solução a 0,04 N de ácido clorídrico PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) em álcool isopropílico PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) para solubilização do formazan. Porém esta solução apresentou-se menos eficaz que o DMSO quanto a capacidade de lisar as células e solubilizar o formazan, mantendo-se este último como solvente nesta etapa do ensaio (TWENTYMAN, LUSCOMBE, 1987).

Outro ensaio foi o de avaliação de crescimento celular nas variações de 0 a 2,0 $\times (10^2, 10^3, 10^4)$ células/mL em 24 h, 48 h e 72 h. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 23 a 25 e figuras 44 a 46. Nestes ensaios foram desconsiderados a variação na ordem de 10^5 células/mL devido a dificuldade de leitura dos dados, demonstrado no ensaio anterior, figura 43.

Tabela 23. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^2 células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.

nº de células $\times 10^2$ /mL	A ^a 24 h	DP	A ^a 48 h	DP	A ^a 72 h	DP
0,0	0,126	0,014	0,120	0,007	0,086	0,006
0,5	0,130	0,004	0,120	0,011	0,100	0,005
1,0	0,125	0,004	0,115	0,006	0,095	0,007
1,5	0,132	0,007	0,134	0,010	0,131	0,013
2,0	0,129	0,002	0,133	0,005	0,137	0,013

A: Absorbância / leitura $\lambda=595$ nm

DP: desvio padrão

a: dados correspondentes a média da triplicata

Figura 44. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^2 células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.

Tabela 24. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^3 células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.

nº de células $\times 10^3$ /mL	A ^a 24 h	DP	A ^a 48 h	DP	A ^a 72 h	DP
0,0	0,142	0,015	0,120	0,015	0,118	0,011
0,5	0,138	0,004	0,120	0,011	0,178	0,012
1,0	0,152	0,011	0,115	0,022	0,276	0,002
1,5	0,173	0,019	0,134	0,014	0,385	0,009
2,0	0,144	0,012	0,133	0,026	0,523	0,055

A: Absorbância / leitura $\lambda=595$ nm

DP: desvio padrão

a: dados correspondentes a média da triplicata

Figura 45. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^3 células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.

Tabela 25. Dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^4 células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.

n° de células * 10^4 /mL	A ^a 24 h	DP	A ^a 48 h	DP	A ^a 72 h	DP
0,0	0,623	0,007	0,606	0,003	0,597	0,004
0,5	0,710	0,015	0,782	0,017	1,442	0,102
1,0	0,830	0,023	1,025	0,052	1,926	0,157
1,5	0,968	0,043	1,273	0,044	2,118	0,142
2,0	1,075	0,008	1,471	0,086	2,393	0,155

A: Absorbância / leitura $\lambda=595$ nm

DP: desvio padrão

a: dados correspondentes a média da triplicata

Figura 46. Representação gráfica do dados da absorbância e número de células J774 na ordem de grandeza de 10^4 células/mL em 24 h, 48 h e 72 h.

Foi observado que o ensaio em 10^2 células/mL não apresentou sensibilidade ao variar o número de células e o tempo de crescimento, demonstrando ser uma quantidade celular inapropriada. Em relação aos dados obtidos na ordem de 10^3 células/mL, observou-se que o número inicial de $2,0 \cdot 10^3$ células/mL apresentou absorbância de 0,537 após 72 h, figura 44, o que corresponde aproximadamente $1,0 \cdot 10^4$ células/mL. Esta correspondência foi obtida pela correlação deste dado de absorbância, obtido a $2,0 \cdot 10^3$ células/mL após 72 h, com o número de células, utilizando-se, para tanto, a curva apresentada na figura 42. Apesar da quantidade final de células de $1,0 \cdot 10^4$ por mL apresentar boa sensibilidade ao método, o valor inicial de $2,0 \cdot 10^3$ células/mL não se mostrou sensível nos ensaios de citotoxicidade, sendo este um dos ensaios preliminares decisivos para escolha da quantidade inicial de células. Já os dados obtidos na ordem de 10^4 células/mL apresentaram boa sensibilidade ao variar o número celular e o tempo de incubação nas condições do método, sem a presença de compostos ou fármacos.

Outro parâmetro analisado foi a variação da concentração de SFB durante o crescimento celular. Os dados obtidos, tabela 26 e figura 47, demonstraram que em 2 h de incubação não houve diferença no crescimento celular com a variação da porcentagem de SFB no meio de cultura e, comparado com os resultados em 24 h e 48 h, observa-se proporcionalidade crescente entre o tempo de crescimento celular e a quantidade de SFB no meio de cultivo.

Tabela 26. Dados da absorbância e concentrações de SFB na ordem de grandeza de 10^4 células/mL em 2 h, 24 h e 48 h.

SFB (%)	A ^a 2 h	DP	A ^a 24 h	DP	A ^a 48 h	DP
1,0	0,445	0,122	0,931	0,216	0,899	0,236
5,0	0,432	0,138	1,011	0,27	1,272	0,246
10,0	0,438	0,297	1,198	0,296	2,109	0,252

A: Absorbância / leitura $\lambda=595$ nm

DP: desvio padrão

a: dados correspondentes a média da triplicata

Figura 47. Representação gráfica do dados da absorbância e concentrações de SFB na ordem de grandeza de 10^4 células/mL em 2 h, 24 h e 48 h.

Estes resultados demonstraram-se coerentes em relação a metodologia empregada e a literatura, pois o soro é utilizado na suplementação de meio de cultura celular com o objetivo de fornecer nutrientes e estimular o cultivo por disponibilizar fatores de crescimento, hormônios e proteases ao meio (MORAES, AUGUSTO, CASTILHO, 2007). Assim, optou-se por utilizar 5% de SFB com a finalidade de manter as mesmas condições de cultivo estabelecidas nos frascos de cultura, uma vez que o crescimento celular em 48 h não foi tão expressivo quanto ao obtido com 10% de SFB.

Com a finalidade de verificar a variação do número de células e porcentagem de SFB em presença de um dos compostos em estudo, foi realizado ensaio variando-se o número de células de $2,0 \cdot 10^3$, $1,0 \cdot 10^4$ e $1,0 \cdot 10^5$ células/mL, concentrações de SFB de 1%, 5%, 10%, 20% e concentração do composto da **série I**, ($-C_4H_9$) **4g**, de 400 a 25 μM , dados apresentados na tabela 27 e figura 48.

Foi possível verificar que em $1,0 \cdot 10^5$ células/mL os desvios-padrões obtidos foram maiores que nos outros dois ensaios com concentração celular menor. Outro aspecto observado nesta quantidade celular foi a variação considerável de IC em diferentes concentrações de SFB. No ensaio a $1,0 \cdot 10^4$ células/mL, também ocorreu variação na IC ao variar a porcentagem de SFB, porém não muito expressiva e, adicionalmente, apresentou boa reprodutibilidade, devido aos valores menores dos desvios-padrões. Na quantidade de $2,0 \cdot 10^3$ células/mL a variação de IC celular foi baixa, porém não apresentou sensibilidade quanto a variação da concentração dos compostos e fármacos.

Tabela 27. Porcentagem de inibição do crescimento e concentrações do composto **4g** em diferentes ordens de grandeza de $2,0 \cdot 10^3$ (A), $1,0 \cdot 10^4$ (B), $1,0 \cdot 10^5$ (C) células/mL e diferentes concentrações de SFB (1%, 5%, 10% e 20%)

	C (μ M)	IC (%) ^a 1% SFB	DP	IC (%) ^a 5% SFB	DP	IC (%) ^a 10% SFB	DP	IC (%) ^a 20% SFB	DP
$2,0 \cdot 10^3$ células/mL									
A	400	100	4,6	100	3,3	100	3,8	100	9,9
	200	98	3,5	100	4,9	100	1,1	100	0,2
	100	98	3,5	100	5,1	100	1,0	100	1,8
	50	99	2,6	100	3,2	100	1,6	100	1,7
	25	99	3,0	96	7,7	96	2,3	88	3,0
$1,0 \cdot 10^4$ células/mL									
B	400	100	9,7	100	2,8	100	2,0	100	7,8
	200	100	4,3	100	4,5	94	9,8	100	8,3
	100	93	3,9	100	9,8	100	9,9	100	8,5
	50	92	2,7	84	3,8	89	6,8	98	6,5
	25	74	2,9	63	8,2	50	8,1	60	7,4
$1,0 \cdot 10^5$ células/mL									
C	400	100	19,1	100	13,4	100	4,1	100	15,9
	200	78	8,0	59	14,3	90	2,9	90	13,3
	100	41	11,8	7	12,3	79	4,1	60	17,0
	50	0	36,9	0	16,0	42	1,6	82	14,1
	25	0	66,4	0	10,7	0	7,6	0	13,0

C: concentração do composto butil substituído série I

IC: inibição do crescimento celular

a: dados correspondentes a média da sextuplicata

DP: desvio padrão

Figura 48. Representação gráfica dos dados de porcentagem de inibição do crescimento e concentrações do composto **4g** em diferentes ordens de grandeza de $2,0 \cdot 10^3$ (A), $1,0 \cdot 10^4$ (B), $1,0 \cdot 10^5$ (C) células/mL e diferentes concentrações de SFB (1%, 5%, 10% e 20%)

6.3.2 Determinação da citotoxicidade dos compostos e fármacos

Um aspecto importante a ser considerado na determinação de citotoxicidade é o comportamento da cultura celular. As células em cultura apresentam padrão sigmóide de atividade proliferativa que reflete a adaptação da cultura, o condicionamento do ambiente, a disponibilidade de nutrientes e, no caso das células aderentes, a disponibilidade de superfície livre para adesão. Esta curva apresenta como principais fases um período de adaptação da cultura, fase lag, uma fase de proliferação exponencial, fase log, uma fase estacionária ou platô e uma fase de declínio, quando a porcentagem de células em divisão é menor que as em processo de morte. Estas fases estão ilustradas na figura 49 (MORAES, AUGUSTO, CASTILHO, 2008).

Figura 49. Curva de crescimento celular em cultura, em que μ' representa a taxa de crescimento celular, e fase lag (A), fase log (B), fase estacionária (C), fase de declínio (D) (MORAES, AUGUSTO, CASTILHO, 2008).

Conforme descrito nos itens 5.4.1 e 5.4.3, o ensaio de determinação de citotoxicidade foi realizado em 72 h com $1,0 \cdot 10^4$ células/mL, onde as primeiras 24 h corresponderam ao tempo de adaptação da cultura de macrófagos nas microplacas e o período de 48 h foi o tempo de exposição dos compostos e fármacos. Verificou-se em literatura que o tempo de exposição das células aos agentes citotóxicos é dependente do tempo de duplicação da população celular, recomenda-se que tempos de duplicação inferiores a 24 h, como no caso do macrófago J774 de 17 h, o tempo de exposição aos compostos analisados não seja muito longo, sendo denominado de ensaio curto (FRESHNEY, 2010, RALPH, NAKOINZ, 1975). Assim, nestes ensaios, foi estabelecido um período de 48 h de contato com compostos e fármacos, sendo estes adicionados após

24 h de cultivo em microplaca (GERPE *et al.*, 2010, ROMEIRO *et al.*, 2009, MUELAS *et al.*, 2001).

Foi estudado também o comprimento de onda para a leitura das microplacas na etapa final do ensaio para determinação da absorbância após solubilizar o formazan, tabela 28 e figura 50. Para verificação do melhor comprimento de onda, realizou-se leitura em dois comprimentos de onda diferentes, 570 nm e 595 nm, e não apresentaram grande diferença, apenas a absorbância obtida em 570 nm apresentou-se um pouco mais elevada que em 595 nm. Os ensaios foram realizados a 595 nm, comprimento de onda também utilizado em trabalhos semelhantes (GERPE *et al.*, 2010, ROMEIRO *et al.*, 2009). Adicionalmente, algumas literaturas indicam que o intervalo de comprimento de onda para leitura do formazan em DMSO é de 550 nm a 600 nm (TWENTYMAN, LUSCOMBE, 1987).

Tabela 28. Dados da absorbância de células J774 a $1,0 \times 10^4$ células/mL em $\lambda=570$ nm e $\lambda=595$ nm

Absorbância $\lambda=570\text{nm}$	Absorbância $\lambda=595\text{nm}$
1,358	1,236
1,344	1,207
1,271	1,140
1,131	1,021

Figura 50. Representação gráfica dos dados da absorbância de células J774 a $1,0 \times 10^4$ células/mL em $\lambda=570$ nm e $\lambda=595$ nm

Em todos os ensaios foram realizados o controle do solvente DMSO nas mesmas concentrações utilizadas para a solubilização dos compostos e fármacos, e não ultrapassaram 0,5% de DMSO. Conforme tabela 29 e a representação gráfica dos dados, figura 51, essa concentração de solvente, comparado com o controle positivo, não influenciou o crescimento parasitário.

Tabela 29. Dados da absorbância de células J774 a 1×10^4 células/mL com solvente DMSO

	A ^a	DP
CS - 0,5 %	1,917	0,141
CS - 0,1 %	1,980	0,170
CP	2,043	0,253

CP: Controle positivo

CS - 1%: Controle do DMSO a 1%

CS - 0,5%: Controle do DMSO a 0,5%

DP: desvio padrão

a: dados correspondentes a média da sextuplicata

Figura 51. Representação gráfica dos dados da absorbância de células J774 a 1×10^4 células/mL com solvente DMSO

Para os ensaios de determinação da citotoxicidade dos compostos e fármacos de referência, BZ e NFX, foram eleitos dois compostos com maior atividade anti-*T. cruzi*, um de cada série, sendo estes os compostos com substituinte butila ($-C_4H_9$), **4g** e **5g**, compostos com menor atividade, substituinte nitro ($-NO_2$), **4f** e **5f**, e compostos de atividade biológica intermediária, substituinte cloro ($-Cl$), **4e** e **5e**.

Os dados de citotoxicidade estão apresentados nas tabelas 30 a 34 e figuras de 52 a 56. Os valores de IC_{50} e do coeficiente de determinação, r^2 , foram obtidos utilizando-se modelo não-linear, dose-resposta, sigmoidal realizados no programa *OriginPro 8.0*. As porcentagens de IC celular, apresentadas nas tabelas, se referem aos dados calculados após as leituras de absorbância realizadas no ensaio biológico e obtidos empregando-se a equação 7 apresentada no item 5.4.4. Os ensaios foram realizados em sextuplicata, devido a variação das leituras obtidas, e calculou-se os respectivos desvios-padrões para cada concentração, considerando-se pelo menos 4 replicas da sextuplicata. Para construção da curva sigmoidal foram atribuídos entre 10 e 7 pontos. No ensaio foram obtidos 10 pontos, sendo eliminados até 3 pontos para melhor ajuste da curva. Dentre os seis compostos testados e os dois fármacos de referência, foram apresentados graficamente apenas os que obtiveram curvas sigmóides nas concentrações avaliadas. Os compostos e fármaco não representados graficamente, obtiveram IC_{50} maior que $400 \mu M$, concentração máxima avaliada nos ensaios, sendo estes, **5e**, cloro ($-Cl$), **5g**, butil ($-C_4H_9$), e BZ, apresentados nas tabelas 35 a 37.

Tabela 30. Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto **4e**.

Concentração (μM)	Concentração ($\log \mu M$)	IC ^a (%)	DP
400,00	2,602	100	3,3
200,00	2,301	100	1,0
100,00	2,000	91	0,0
50,00	1,699	59	1,1
25,00	1,398	34	6,3
12,50	1,097	27	3,5
3,13	0,495	24	1,7
1,56	0,194	26	3,9
0,78	-0,107	27	10,9

IC: inibição do crescimento celular

a: dados correspondentes a média da sextuplicata

DP: desvio padrão

Figura 52. Curva dose-resposta da inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto **4g** e valor de IC_{50} .

Tabela 31. Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto **4f**.
O=[N+]([O-])c1ccc(cc1)C(=O)N=N/C=C/c2cc([N+](=O)[O-])co2

Concentração (μM)	Concentração ($\log \mu M$)	IC ^a (%)	DP
400,00	2,602	94	6,4
200,00	2,301	92	7,8
100,00	2,000	70	2,6
50,00	1,699	41	5,0
25,00	1,398	31	9,8
12,50	1,097	29	5,3
3,13	0,495	27	4,3
1,56	0,194	27	5,2

IC: inibição do crescimento celular

a: dados correspondentes a média da sextuplicata

DP: desvio padrão

Figura 53. Curva dose-resposta da inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto **4f** e valor de IC₅₀.**Tabela 32.** Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto **4g**.
CCCCc1ccc(cc1)C(=O)N=N/C=C/c2cc([N+](=O)[O-])co2

Concentração (μM)	Concentração ($\log \mu M$)	IC ^a (%)	DP
400,00	2,602	101	0,8
200,00	2,301	99	1,2
100,00	2,000	100	3,6
50,00	1,699	90	1,6
25,00	1,398	45	3,6
12,50	1,097	16	3,3
3,13	0,495	14	8,3
0,78	-0,107	15	8,7

IC: inibição do crescimento celular

a: dados correspondentes a média da sextuplicata

DP: desvio padrão

Figura 54. Curva dose-resposta da inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto **4g** e valor de IC₅₀.

Tabela 35. . Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto **5e**.

Concentração (μM)	Concentração ($\log \mu M$)	IC ^a (%)	DP
400,00	2,602	30	3,1
200,00	2,301	34	3,1
100,00	2,000	33	3,2
50,00	1,699	28	2,8
25,00	1,398	29	0,8
12,50	1,097	20	1,8
6,25	0,796	21	1,7
3,13	0,495	26	1,9
1,56	0,194	24	2,4
0,78	-0,107	31	1,1

IC: inibição do crescimento celular

a: dados correspondentes a média da sextuplicata

DP: desvio padrão

Tabela 36. . Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto **5g**.

Concentração (μM)	Concentração ($\log \mu M$)	IC ^a (%)	DP
400,00	2,602	42	2,6
200,00	2,301	40	1,5
100,00	2,000	37	2,0
50,00	1,699	37	1,8
25,00	1,398	22	1,7
12,50	1,097	21	2,3
6,25	0,796	26	1,8
3,13	0,495	22	2,0
1,56	0,194	23	2,2
0,78	-0,107	20	0,1

IC: inibição do crescimento celular

a: dados correspondentes a média da sextuplicata

DP: desvio padrão

Tabela 37. . Inibição do crescimento celular em diferentes concentrações do composto **BZ**.

Concentração (μM)	Concentração ($\log \mu M$)	IC ^a (%)	DP
400,00	2,602	22	1,3
200,00	2,301	20	1,6
100,00	2,000	21	2,1
50,00	1,699	20	1,8
25,00	1,398	20	2,1
12,50	1,097	22	2,1
6,25	0,796	24	1,9
3,13	0,495	22	2,1
1,56	0,194	21	1,4

IC: inibição do crescimento celular

a: dados correspondentes a média da sextuplicata

DP: desvio padrão

Os dados dos compostos e fármacos avaliados encontram-se na tabela 38. Foi observado que o fármaco de referência **NFX** apresentou proximidade do dado obtido experimentalmente, 292,75 μM , ao dado de citotoxicidade em células J774 de literatura, 316 μM (ROMEIRO *et al.*, 2009). Os compostos **5e** e **5g** apresentaram baixa citotoxicidade, assim como o fármaco **BZ**. Os compostos da **série I** apresentaram-se mais citotóxicos que a **série II**.

Tabela 38. Citotoxicidade dos compostos e fármacos em macrófagos de linhagem J774, representados como IC₅₀ J774

Compostos (R)		IC ₅₀ J774 μM^a	DP	Compostos (R)		IC ₅₀ J774 μM^a	DP
4e	Cl	54,28	0,51	5e	Cl	>400	-
4f	NO ₂	83,23	1,81	5f	NO ₂	114,28	4,67
4g	C ₄ H ₉	28,05	1,05	5g	C ₄ H ₉	>400	-
benznidazol (BZ)		>400	-				
nifurtimox (NFX)		292,75	6,14				

IC: inibição do crescimento de 50% das células

a: dados correspondentes a média da sextuplicata

DP: desvio padrão

Com a finalidade de comparação dos dados obtidos de citotoxicidade com os dados de atividade anti-*T. cruzi*, foi realizado a razão dos valores de IC₅₀ de cada ensaio, obtendo-se assim o valor de seletividade, tabela 39 (GERPE *et al.*, 2010, ROMEIRO *et al.*, 2009, MUELAS *et al.*, 2001).

Tabela 39. Atividade anti-*T. cruzi*, representado por IC₅₀ *T. cruzi* e citotoxicidade dos compostos e fármacos em macrófagos de linhagem J774, representados como IC₅₀ J774

Compostos (R)		IC ₅₀ J774 μM ^a	DP	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> μM ^a	DP	IS ^b
4e	Cl	54,28	0,51	4,03	0,23	13,47
4f	NO ₂	83,23	1,81	9,45	0,54	8,81
4g	C ₄ H ₉	28,05	1,05	1,05	0,07	26,71
5e	Cl	>400	-	11,46	0,81	>34,9
5f	NO ₂	114,28	4,67	13,91	0,95	8,21
5g	C ₄ H ₉	>400	-	8,27	0,43	>48,37
benznidazol (BZ)		>400	-	22,69	1,96	>17,63
nifurtimox (NFX)		292,75	6,14	3,78	0,1	77,45

a: dados correspondentes média da triplicata (IC₅₀ *T. cruzi*) e sextuplicata (IC₅₀ J774)

b: IS - índice de seletividade (IS=IC₅₀ J774/IC₅₀ *T. cruzi*)

IC₅₀: concentração inibitória de 50% das células parasitárias/macrófagos

DP: desvio padrão

Verificou-se que os compostos com maior índice de seletividade foram dois compostos da **série II**, **5e** (-Cl) e **5g**, (-C₄H₉), apesar de não encontrar um dado exato, e sim aproximado. Para a **série I**, o composto **4g** (-C₄H₉) apresentou seletividade maior entre a série. Já para os fármacos de referência, o **NFX** apresentou alto índice de seletividade.

6.4 Estudos de relações estrutura-atividade

O estudo das propriedades físico-químicas que mais influenciam na atividade anti-*T. cruzi*, como descrito no item 5.5, foi dividido em: construção dos modelos moleculares 3D dos compostos, cálculos das propriedades moleculares e análise exploratória dos dados.

6.4.1 Construção dos modelos moleculares 3D

A construção dos modelos moleculares iniciou com a estrutura cristalografada do composto-protótipo **NF** (PNIEWSKA, JANUCHOWSKI, 1998), utilizada como molde

da **série I**, e da união das estruturas cristalografadas deste composto-protótipo e do composto 2-[4-acetil-5-(bifenil-4-il)-4,5-di-idro-1,3,4-oxadiazol-2-il]fenil acetato, análogo aos compostos da **série II** (YEHYE, ARIFFIN, RAHMAN, 2010). A figura 57 ilustra a construção dos modelos moleculares baseada nas coordenadas cartesianas (x, y, z) das estruturas cristalografadas.

Figura 57. Representação da construção dos modelos moleculares 3D (NF e 5a) a partir das coordenadas cartesianas das estruturas cristalografadas.

Em vermelho porções da estrutura do composto-protótipo nifuroxazida (NF) modificadas para obtenção do composto modelo 5a da **série II**. No composto cristalografado 2-[4-acetil-5-(bifenil-4-il)-4,5-di-idro-1,3,4-oxadiazol-2-il]fenil acetato, em azul está a porção da estrutura utilizada na construção do composto 5a. A NF foi considerada como estrutura modelo para **série II**.

Um aspecto importante é que o composto-protótipo NF apresenta duas conformações, *cis* e *trans*, e a conformação cristalografada, ou seja, de menor energia, é a *trans*, sendo ilustrado na figura 58 as duas conformações (PAULA *et al.*, 2009).

Figura 58. Representação da estrutura da NF nas duas conformações.

Após a construção dos modelos moleculares a partir das estruturas cristalografadas, cálculo de cargas atômicas parciais e otimização de geometria, procedeu-se as simulações de DM. Obtiveram-se 50.000 confôrmeros, e destes foram selecionados confôrmeros de energia mais baixa para cada série. Os confôrmeros de menor energia foram investigados quanto à manutenção de integridade estrutural em relação à estrutura inicial da simulação de DM (*output* da minimização), utilizando como critério os valores de RMSD, calculados no programa *Hyperchem 8.0*. Quanto menor o valor de RMSD, menor a distância em Å entre as posições atômicas dos confôrmeros que estão sendo comparados, indicando a manutenção de integridade estrutural (BABER *et. al.*, 2009). Para a **NF**, o valor de RMSD encontrado para o confôrmero de menor energia selecionado da DM e a estrutura minimizada foi de 0,07 Å, enquanto que para o composto **5a** foi de 0,14 Å. O valor mais baixo obtido para o confôrmero da **NF** é provavelmente devido ao fato da simulação de DM ter iniciado com a estrutura cristalografada. Já para o composto **5a**, a estrutura inicial foi construída a partir da junção de diferentes estruturas cristalografadas e não da estrutura do próprio composto. No entanto, avaliando-se o valor de RMSD deste composto apenas na porção do grupo 5-nitro furano, obteve-se um valor de RMSD de 0,07 Å, indicando que a integridade estrutural desta porção se manteve durante a simulação.

Um gráfico dos confôrmeros em relação às energias totais foi construído. A energia total corresponde à somatória das contribuições de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Waals (E_{vdW}), interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}). As contribuições de energia intramolecular de ligação de hidrogênio e de solvatação não foram consideradas. Os gráficos obtidos e o confôrmero escolhido para cada série estão ilustrados no anexo 11: "Representação gráfica dos confôrmeros e suas energias totais da simulação de dinâmica molecular".

O confôrmero selecionado na simulação da DM da **NF** foi o de número 41.848 com energia potencial total de 19,90 kcal/mol e o confôrmero do composto **5a** selecionado foi o de número 36.243 com energia potencial total de 30,86 kcal/mol. As contribuições de energia intramolecular de solvatação (E_{solv}) e de ligação de hidrogênio ($E_{\text{lig H}}$) foram consideradas no cálculo da energia potencial total. Na tabela 40 encontram-se os valores das contribuições de energia resultantes da simulação de DM para o

confômero de energia mais baixa selecionado da região de equilíbrio do PAC da **NF** e do composto **5a**.

Tabela 40. Valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para os confômeros de energia mais baixa selecionados do PAC da **NF** e do composto **5a**.

Confômero	E _{STRETCH}	E _{BEND}	E _{TORS}	E ₁₋₄	E _{VdW}	E _{CHARGE}	E _{solv}	E _{lig H}	E _{TOT}
NF	0,91	12,83	-5,13	-1,33	-0,14	3,86	-13,20	-1,97	-4,19
5a	0,84	14,12	0,93	2,27	-1,84	1,71	-10,52	-0,93	6,57

Energias em kcal/mol. E_{STRETCH} (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E₁₋₄ (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{VdW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática), E_{solv} (contribuição de energia de solvatação), E_{lig H} (contribuição de energia de ligação H), E_{TOT} (energia potencial total).

Os confômeros selecionados foram minimizados (programa MOLSIM 3.2) e utilizados como modelo para construção dos análogos da **série I** e **II**. Os análogos construídos passaram pela otimização de geometria, apenas para os grupos substituintes alterados na posição 4 do anel benzênico, cálculo de cargas atômicas parciais de ponto único e outra minimização de energia, no programa *MOLSIM 3.2* (Doherty, 2002).

6.4.2 Cálculos das propriedades moleculares

As propriedades termodinâmicas, obtidas no programa *MOLSIM 3.2*, foram: energia total obtida na etapa de minimização (E_{total}), contribuição intramolecular de energia de solvatação (E_{solv}) e contribuição intramolecular de energia de ligação de hidrogênio (E_{lig H}).

Algumas propriedades eletrônicas estudadas foram obtidas do cálculo de carga de ponto único realizado com método *ab initio* Hartree-Fock (MORGON, COUTINHO, 2007) e conjunto de base 3-21G*. O algoritmo CHELPG foi utilizado para calcular o potencial eletrostático das moléculas (BRENEMAN, WIBERG, 1990). Este método tem o objetivo de avaliar cargas atômicas pontuais que representam de maneira satisfatória o potencial eletrostático molecular em um conjunto de pontos pré-definidos ao redor da molécula (GUADAGNINI, BRUNS, SOUZA, 1996).

Os MPEs calculados em superfície molecular de Connolly foram visualizados para os compostos que apresentaram maior atividade frente *T. cruzi* de cada série, comparados com os fármacos de referência, **BZ** e **NFX**, e composto-protótipo, **NF**. A interpretação

destes mapas é por meio de um esquema de cores, neste caso, em uma faixa de -0,1 (vermelho intenso; regiões de maior distribuição de densidade eletrônica) a 0,1 (azul intenso; regiões de menor distribuição de densidade eletrônica). Os MPEs estão ilustrados na figura 59.

Figura 59. Mapas de potencial eletrostático, MPEs, dos compostos **4g** e **5g**, fármacos de referência, BZ e NFX, e compostos-protótipos, NF.

Coloração vermelha indica regiões de maior distribuição de densidade eletrônica (-0,1) e coloração azul denota regiões de menor distribuição de densidade eletrônica (0,1); as moléculas são exibidas no modelo tubo (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, enxofre em amarelo e os átomos de hidrogênio são apresentados em branco). Composto **4g**: 4-butil-[N'-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida; composto **5g**: 3-Acetil-5-(4-butilfenil)-2-(5-nitrofurano-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol. Fármacos de referência BZ e NFX, e composto-protótipo, NF.

Os compostos mais ativos, **4g** e **5g**, apresentaram baixa distribuição de densidade eletrônica na posição *para* do anel benzênico (coloração verde), devido à presença do substituinte alquílico, butila, com caráter doador de elétrons. Ao comparar com o composto-protótipo, **NF**, é evidente que a densidade eletrônica é maior nesta região (coloração vermelha), devido à presença da hidroxila. Da mesma maneira, comparando-se as duas séries, verifica-se que a distribuição da densidade eletrônica é discrepante, sendo que, na **série I**, pode-se observar maior densidade eletrônica na região do provável grupo farmacofórico, anel nitrofurânico (coloração vermelha e amarela), já para a **série II** verifica-se menor densidade eletrônica nesta mesma região (coloração amarela).

Realizaram-se, também, estudos para explorar as propriedades hidrofóbicas dos compostos, a partir dos mapas de potencial lipofílico e cálculo de valores de coeficiente de partição (ClogP), conforme descrito no item 5.5.2. Na tabela 41 estão relacionados os coeficientes de partição dos compostos investigados calculados por diferentes métodos.

Tabela 41. Valores dos coeficientes de partição calculados por diferentes metodologias

Compostos (R)		ClogP SG-SLN	ClogP SV	ClogP MB	Compostos (R)		ClogP SG-SLN	ClogP SV	ClogP MB
4a	H	0,70	3,21	2,05	5a	H	0,38	3,43	2,36
4b	CH ₃	1,18	3,67	2,57	5b	CH ₃	0,87	3,90	2,87
4c	CN	0,57	3,24	1,91	5c	CN	0,26	3,47	2,21
4d	OCH ₃	0,68	5,66	1,89	5d	OCH ₃	0,36	3,18	2,20
4e	Cl	1,36	3,72	2,66	5e	Cl	1,04	3,95	2,96
4f	NO ₂	-1,56	3,16	1,99	5f	NO ₂	-1,88	3,39	2,30
4g	C ₄ H ₉	2,55	4,86	3,90	5g	C ₄ H ₉	2,23	5,09	4,21
4h	CF ₃	1,64	4,09	2,93	5h	CF ₃	1,32	4,31	3,24
4i	Br	1,44	4,00	2,82	5i	Br	1,13	4,22	3,13
4j	I	1,27	4,46	2,98	5j	I	0,96	4,69	3,29
nifuroxazida NF		0,43	2,92	1,75					

Os valores calculados de coeficiente de partição foram equivalentes entre os métodos, ou seja, compostos com caráter lipofílico apresentam valores de ClogP alto utilizando os três métodos, como por exemplo os compostos **4g** e **5g**. Este comparativo foi realizado com a finalidade de verificar as características lipo-hidrofílicas entre as séries. Observa-se que os valores de ClogP_{SV} e ClogP_{MB} indicam que a **série II** é um pouco mais lipofílica que a **série I**, dado esperado pela característica das estruturas, enquanto que os dados do ClogP_{SG-SLN}, indica o inverso. Porém, as diferenças em valores de ClogP_{SG-SLN} entre as duas séries não são significativas. A figura 60 ilustra os mapas calculados em superfície molecular de Connolly e valores de ClogP_{SG-SLN} para os compostos que apresentaram maior atividade anti-*T.cruzi*.

Figura 60. Mapas de potencial lipofílico, MLPs, dos compostos **4g** e **5g**, fármacos de referência, BZ e NFX, e compostos-protótipos, NF.

Coloração marrom indica regiões hidrofóbicas (0,13) e coloração azul denota áreas hidrofílicas (-0,13); as moléculas são exibidas no modelo tubo (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, enxofre em amarelo e os átomos de hidrogênio são apresentados em ciano). Composto **4g**: 4-butil-[N'-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida; composto **5g**: 3-Acetil-5-(4-butilfenil)-2-(5-nitrofurano-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol. Fármacos de referência BZ e NFX, e composto-protótipo, NF. ClogP_{SG-SLN} calculado pelo método *GHOSE et al.*, 1998 - SLN, *Sybyl line notation*.

Os mapas resultantes foram analisados de acordo com o esquema de cores, que varia em uma faixa de marrom (0,13; região mais lipofílica) a azul (-0,13; região mais elevada hidrofílica). O esquema de cores mostra-se de fácil interpretação onde azul é associado com a água e marrom como o óleo. Nota-se que a variação da hidrofobicidade não é muito pronunciada comparando-se as duas séries. Observa-se, também, que na região do anel benzênico, onde ocorre a substituição molecular, há uma região bastante lipofílica (coloração marrom), sendo esta uma característica do grupo substituinte alquílico.

Para melhor entendimento da contribuição eletrônica para atividade biológica, as energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO também foram calculadas. Estas duas propriedades eletrônicas fornecem informações sobre o caráter elétron-doador e/ou elétron-aceitador de um composto e, conseqüentemente, a formação de um complexo de transferência de carga (ARROIO, HONORIO, SILVA, 2010). A energia do HOMO (E_{HOMO}) está relacionada com o potencial de ionização e mede o caráter elétron-doador de

um composto, ou seja, sua suscetibilidade de sofrer um ataque por eletrófilos, enquanto que a energia do LUMO (E_{LUMO}) está relacionada com a afinidade química e mede o caráter elétron-aceitador de um composto. Assim, quanto maior a energia do HOMO, maior a capacidade elétron-doadora e, quanto menor a energia do LUMO menor será a resistência para aceitar elétrons. Quanto maior a diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO} (gap) maior é a estabilidade química da molécula e sua reatividade em reações químicas será menor (ARROIO, HONORIO, SILVA, 2010).

Em conjunto com o momento de dipolo, E_{LUMO} tem demonstrado ser uma propriedade eletrônica relevante no entendimento das relações de compostos com características semelhantes aos nitrocompostos e a atividade anti-*T. cruzi*, uma vez que esta propriedade está diretamente relacionada à capacidade da molécula de receber um elétron para que ocorra a redução do grupo nitro (JORGE, 2011). Na figura 61 estão ilustrados os mapas de distribuição de orbitais moleculares de HOMO (A) e LUMO (B) calculados com o método HF/3-21G* para os compostos mais ativos, **4g** e **5g**.

Figura 61. Mapas de distribuição de orbitais moleculares de HOMO (A) e LUMO (B) calculados com o método HF/3-21G* para os compostos **4g** e **5g**.

A isossuperfície calculada foi de 0,02 eV. As moléculas são exibidas em modelo tubo (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e os átomos de hidrogênio são apresentados em branco).

Figura 62. Vetores de dipolo para os compostos **4g** e **5g**.

Os dipolos foram calculados pelo método HF/3-21G* com cálculo das cargas CHELPG. O valor do momento de dipolo total para o composto **4g** foi de 15,15 Debye e para o composto **5g** foi de 6,75 Debye. As moléculas são exibidas em modelo tubo (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e os átomos de hidrogênio são apresentados em branco).

Observa-se que o valor do momento de dipolo total (μ), figura 62, para o composto **4g** é maior que para o composto **5g**, indicando maior polaridade do **4g**. Assim foi realizada a razão entre o coeficiente de partição e o momento dipolo das estruturas estudadas, ou seja, o balanço lipófilo/hidrófilo global. Para o composto **4g**, observou-se um valor de ClogP relativamente elevado (ClogP_{MB} = 3,90) e elevado momento dipolo (15,15 Debye) e o equilíbrio lipófilo/hidrófilo é de 0,26. Para o composto **5g**, observou-se um valor de ClogP relativamente elevado (ClogP_{MB} = 4,21) e baixo momento dipolo (6,75 Debye) e o equilíbrio lipófilo/hidrófilo de 0,62. Estes resultados indicam que há valor ótimo para o equilíbrio lipófilo/hidrófilo, distinto nos dois conjuntos, para favorecer a atividade anti-*T. cruzi*.

As propriedades moleculares estudadas nas duas séries de compostos abrangeram propriedades termodinâmicas, eletrônicas, hidrofóbicas, topológicas e estéricas, as quais estão listadas na tabela 42.

Calculadas as propriedades, gerou-se uma matriz com 40 colunas (variáveis independentes ou descritores o propriedades calculadas) e mais a coluna da atividade biológica avaliada frente ao *T. cruzi*. Esta última foi transformada em potência da atividade (log1/C) e corresponde à variável dependente. Os compostos foram agrupados de acordo com um gradiente de atividade biológica, sendo menos ativos de 3,36 a 4,49, moderados de 4,51 a 4,77 e mais ativos de 4,86 a 5,46. Na tabela 43 estão relacionadas as atividades anti-*T. cruzi* dos compostos e fármacos estudados.

Tabela 42. Descritores calculados e obtidos de literatura para os compostos das séries I e II.

Códigos	Descritores	Propriedades	Descrições	Programas
x1	E_{total}	termodinâmica	energia total após minimização	MOLSIM
x2	E_{solv}	termodinâmica	contribuição da energia de solvatação	
x3	$E_{lig H}$	termodinâmica	contribuição da energia de ligação de hidrogênio intramolecular	
x4	E_{HOMO}	eletrônica	energia do orbital de fronteira HOMO	GAUSSIAN 03W
x5	E_{LUMO}	eletrônica	energia do orbital de fronteira LUMO	
x6	GAP	eletrônica	diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO}	
x7	μ	eletrônica	momento de dipolo	
x8	ChelpG_O 9/1	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio carbonílico para série I e do oxigênio do anel oxadiazolínico para série II, calculados por ChelpG	
x9	ChelpG_O 1/10	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio do anel furânico para as séries I e II, calculados por ChelpG	
x10	ChelpG_N 7/4	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de nitrogênio de ligação N=C na porção azometínica para série I e no anel oxadiazolínico para série II, calculados por ChelpG	
x11	ChelpG_N 8/3	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de nitrogênio de ligação N-H na porção amídica para série I e no anel oxadiazolínico para série II, calculados por ChelpG	
x12	ChelpG_N 5/11	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de nitrogênio do grupo nitro ligado ao anel furânico para as séries I e II, calculados por ChelpG	
x13	ChelpG_C 13/17	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de carbono do anel benzênico realizando ligação com substituintes na posição 4 para as séries I e II, calculados por ChelpG	
x14	ChelpG_C 5/9	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de carbono do anel furânico ligado ao grupo nitro para as séries I e II, calculados por ChelpG	
x15	ClogP _{SG-SLN}	hidrofóbica	coeficiente de partição calculado pelo método GHOSE <i>et al.</i> , 1998 - SLN	SYBYL 8.0
x16	ClogP _{SV}	hidrofóbica	coeficiente de partição calculado pelo método VISVANADHAN <i>et al.</i> , 1989	
x17	ClogP _{MB}	hidrofóbica	coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISVANADHAN <i>et al.</i> , 1989, KLOPMAN <i>et al.</i> , 1993 e PHYSPROP [®] database	MARVIN BEANS
x18	I_{Platt}	topológica	índice que descreve a soma dos graus de contorno da superfície molecular	
x19	I_{Randic}	topológica	índice que descreve a soma harmônica das médias geométricas dos graus dos vértices	
x20	$I_{Balaban}$	topológica	índice que descreve a média da somatória da distância de conectividade da molécula	
x21	I_{Harary}	topológica	índice que descreve a metade da somatória da diagonal externa, distância matricial recíproca, dos elementos da molécula	
x22	$I_{Hyper Wiener}$	topológica	descreve uma variação do índice de Wiener	
x23	I_{Szeged}	topológica	estende o índice de Wiener para gráficos cíclicos pela contagem do número de átomos em ambos os lados de cada ligação (considera aqueles átomos que estão mais perto de um lado da ligação do que do outro)	
x24	I_{Wiewer}	topológica	índice que descreve a distância atômica topológica média (metade da soma de todas as distâncias atômicas) na molécula	
x25	Dreiding	estereoquímica	energia relacionada com a estabilidade da conformação da molécula.	
x26	PSA	estereoquímica	área de superfície polar	
x27	V_W	estereoquímica	volume de van der Waals	
x28	ASA	estereoquímica	superfície acessível a solvente, calculada usando o raio do solvente (1,4 Å para a molécula de água)	
x29	ASA+	estereoquímica	superfície acessível a solvente de todos os átomos com carga parcial positiva	
x30	ASA-	estereoquímica	superfície acessível a solvente de todos os átomos com carga parcial negativa	
x31	ASA _h	estereoquímica	superfície acessível a solvente de todos os átomos hidrofóbicos	
x32	ASA _p	estereoquímica	superfície acessível a solvente de todos os átomos hidrofílicos	
x33	π	hidrofóbica	constante π de Hansch	HANSCH, LEO, HOEKMAN, 1995
x34	σ	eletrônica	constante σ de Hammett	
x35	F	eletrônica	constante de efeito indutivo de Swain e Lupton	
x36	R	eletrônica	constante de efeito de ressonância de Swain e Lupton	
x37	L	estereoquímica		
x38	B1	estereoquímica	parâmetros de STERIMOL (VERLOOP, 1987)	
x39	B5	estereoquímica		
x40	MR	estereoquímica / hidrofóbica	refratividade molar	

Tabela 43. Atividade anti-*T. cruzi*, representado por IC₅₀ *T. cruzi*, dos composto-protótipo, fármacos referência e compostos da **séries I e II**.

Compostos (R)	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> μM ^a	DP	Massa Molar	log 1/C ^b		Compostos (R)	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> μM ^a	DP	Massa Molar	log 1/C ^b	
4a H	4,44	0,53	259,06	5,35		5a H	10,22	0,41	301,25	4,99	
4b CH ₃	3,71	0,15	273,07	5,43		5b CH ₃	9,84	0,59	315,28	5,01	
4c CN	12,51	0,95	284,05	4,90		5c CN	13,44	0,8	326,26	4,87	
4d OCH ₃	3,95	0,36	287,27	5,40		5d OCH ₃	9,29	1,02	329,31	5,03	
4e Cl	4,03	0,23	289,24	5,39		5e Cl	11,46	0,81	331,28	4,94	
4f NO ₂	9,45	0,54	293,02	5,02		5f NO ₂	13,91	0,95	335,7	4,86	
4g C ₄ H ₉	1,05	0,07	304,22	5,98		5g C ₄ H ₉	8,27	0,43	346,25	5,08	
4h CF ₃	4,42	0,14	327,22	5,35		5h CF ₃	11,14	1,07	369,25	4,95	
4i Br	3,74	0,16	336,97	5,43		5i Br	9,59	0,31	380,15	5,02	
4j I	3,21	0,19	384,96	5,49		5j I	11,52	0,99	427,15	4,94	
benznidazol (BZ)	22,69	1,96	260,25	4,64							
nifurtimox (NFX)	3,78	0,1	287,29	5,42							
nifuroxazida (NF)	120,46	4,06	275,22	3,91							

a: dados correspondentes a média da triplicata

b: conversão do valor de IC₅₀ em potência (concentração C em M)

IC₅₀: concentração inibitória de 50% das células

DP: desvio padrão

Para a avaliação dos dados quanto à atividade anti-*T. cruzi*, representada em potência, foi elaborado um gráfico, figura 63, a fim de verificar a distribuição da atividade biológica dos compostos e fármacos. Verifica-se que os valores em potência de atividade biológica da série azometínica alteraram ao modificar o substituinte na posição 4 do anel benzênico, obtendo-se um desvio padrão para estes valores de 0,28. Por outro lado, a série oxadiazolínica apresentou um desvio padrão inferior, de 0,07.

As propriedades calculadas e coletadas de literatura estão listadas no anexo 12 "Propriedades calculadas e obtidas em literatura".

Figura 63. Valores de IC₅₀ *T. cruzi* em potência (log1/C) do composto protótipo, NF, fármacos de referência, BZ e NFX, e compostos das séries I e II.

Para a pré-seleção das propriedades moleculares foram utilizados dois filtros: o coeficiente de correlação linear de Pearson, valor de corte em 0,4, e os gráficos de dispersão (*scatter plots*) para avaliação de cada propriedade em relação à atividade biológica (MONTANARI, 2011, FERREIRA, 2002). Na figura 64 estão ilustrados dois exemplos: (1) propriedade molecular com boa dispersão e coeficiente de correlação de Pearson (R) alto, indicando ser um bom descritor (ClogP_{SV}=x16) em um programa como o Pirouette, que só considera funções lineares; e (2) um descritor considerado ruim (PSA = x26), pois apesar de um coeficiente de correlação alto em módulo (R = -0,45), não apresenta boa dispersão.

Figura 64. Gráficos de dispersão da variável x16, ClogP_{SV}, e x26, PSA em relação a y, atividade anti-*T. cruzi*. Valores do coeficiente de correlação de Person, R.

6.4.3 Análise exploratória dos dados

A etapa de análise exploratória, aplicação dos métodos de HCA e PCA, foi realizada com o programa *Pirouette 3.11* (Infometrix, Ltd., 2003). Estes estudos têm como propósito avaliar os compostos, ou amostras, com base nos descritores considerados na etapa de seleção. Assim, a matriz gerada após a seleção dos descritores foi utilizada como dado inicial, a qual possui 10 descritores selecionados (colunas), mais a atividade biológica, e 21 compostos (linhas).

Um ponto importante é o pré-processamento dos dados devido às distintas ordens de grandeza entre os descritores, necessitando uniformizá-las. A matriz gerada teve seus dados tratados por auto-escalamento, o qual implica em subtrair de cada elemento de uma coluna da matriz de dados o valor médio da respectiva coluna e dividir o resultado pelo desvio padrão da mesma, conforme a equação 8 (MOITA NETO, MOITA, 1998).

$$X_{ij} = (X_{ij} - \bar{X}_j) / \sigma_j \quad \text{equação 8}$$

Em que: X_{ij} é o valor do descritor j para o composto i ; $\bar{X}_j$ é a média dos valores para o descritor j e σ_j é o desvio padrão dos valores para o descritor j .

O HCA, sendo uma análise de agrupamentos hierárquicos não supervisionada, tem a finalidade de agrupar um conjunto de dados de atributos semelhantes. O método matemático mais utilizado é agrupar os pares de pontos que estão mais próximos, usando a distância euclidiana, equação 9 (MONTANARI, 2011, FERREIRA, 2002).

$$d_{kl} = \left[\sum_{j=1}^m (x_{kj} - x_{lj})^M \right]^{1/M} \quad \text{equação 9}$$

Em que: d_{kl} é a distância entre dois vetores de amostras, k e l são as amostras, m é o número total de variáveis, M é a ordem da distância, sendo $M = 2$ para distância Euclidiana, j é o descritor.

Os valores de distância entre pares de amostras são transformados em uma matriz de similaridade S cujos elementos correspondem aos índices de similaridade, representado na equação 10 (FERREIRA, 2002).

$$S_{kl} = 1 - (d_{kl} / d_{max}) \quad \text{equação 10}$$

Em que: S_{kl} é o índice de similaridade entre duas amostras k e l , d_{kl} é a distância entre duas amostras, d_{max} é a maior distância no conjunto de dados.

Os índices de similaridade variam entre 0 e 1, sendo o valor de 1 equivalente à máxima similaridade. A matriz de similaridade gera o dendograma, que é um mapa em forma de árvore construído a partir das distâncias de dados. A análise de HCA foi realizada para uma matriz, considerando a atividade biológica como variável dependente, obtendo os agrupamentos por compostos, figura 65, e outra matriz considerando-a como independente, obtendo a distribuição por descritores, figura 66 (Pirouette, 2003, FERREIRA, 2002, MOITA NETO, MOITA, 1998, BEEBE, PELL, SEASHOLTZ, 1998).

Figura 65. Dendograma dos compostos estudados das séries I e II.

Os compostos analisados, **4a-j, série I**, **5a-j, série II** e **NF**, foram classificados quanto a atividade biológica, sendo baixa de 3,36 a 4,49, grupo 1 representado no dendograma, média de 4,51 a 4,77, grupo 2, e alta de 4,86 a 5,46, grupo 3. Formou-se três grupos, classificados como A, B e C.

No dendograma de amostras, figura 64, utilizando como referência um cursor de similaridade de 0,502 (linha pontilhada), os compostos foram agrupados em 3 categorias:

A, B e C. Os compostos **4g** e **5g** estão agrupados em C com similaridade de 0,591. Estes dois compostos possuem como grupo substituinte o grupo butila (-C₄H₉), sendo o substituinte mais ativo em relação aos compostos da mesma série. Considerando a classificação utilizada quanto ao gradiente de atividade biológica: baixa, média e alta. O grupo A apresenta os compostos com caráter mais lipofílico e se divide em A', agrupando os compostos mais ativos da série II, e A'', agrupando os compostos de maior atividade da série I. Considerando estes agrupamentos, verifica-se grande influência da lipofilicidade, uma vez que os compostos com atividade mais elevada são caracterizados por ter maior lipofilicidade.

Figura 66. Dendrograma dos descritores estudados.

Descritores selecionados e avaliados com a atividade biológica como variável independente e seus agrupamentos foram nomeados A, B, C e D.

Verifica-se que os descritores, figura 66, que apresentaram maior similaridade com a atividade biológica, y, estão no grupo A. Estas propriedades são relacionadas com a hidrofobicidade, sendo o **x33** a constante π de Hansch e **x17** e **x15** os coeficientes de partição $\text{ClogP}_{\text{SG-SLN}}$ e ClogP_{MB} . As propriedades com seus códigos se encontram na tabela 42. O grupo B é formado por propriedades estéricas, **x37** (L), **x39** (B5), **x31** (ASA_h), propriedade mista estereoquímica/hidrofóbica **x40** (MR) e hidrofóbica **x16** (ClogP_{sv}). A propriedade termodinâmica **x2** (E_{solv}) e eletrônica **x7** (μ) possuem menor similaridade com a atividade.

O PCA, sendo uma análise de componentes principais também não supervisionada, teve como finalidade correlacionar os descritores, encontrando outras variáveis, as PCs, que possam descrever a informação dos dados originais (MONTANARI, 2011, MOITA NETO, MOITA, 1998).

Os dados originais foram decompostos em duas matrizes, uma de escores, relacionando as amostras, e outra de pesos (*loadings*), relacionando as variáveis. O novo conjunto de eixos gerado originou as PCs, as quais agrupam descritores de informações correlacionadas. Assim, foi determinado o número de PCs que explica a maior parte dos dados, sendo estas PCs não correlacionadas e ortogonais entre si (MONTANARI, 2011, FERREIRA, 2002, BEEBE, PELL, SEASHOLTZ, 1998). A equação 11 representa a obtenção das PCs.

$$X = TL^T = T_A L_A^T + E \quad \text{equação 11}$$

Em que: X é a matriz dos dados auto-escalados, T é a matriz de escores e L é a matriz de pesos (*loadings*), E é a matriz de resíduos e A é o número de componentes principais significativas.

Assim, uma vez que a matriz de escores T expressa as relações entre as amostras, a matriz de pesos L contém a informação do quanto cada variável original contribui na formação de uma PC (MONTANARI, 2011). Os pesos variam entre -1 e 1, desta maneira altos pesos significam que a PC gerada e a variável original são aproximadamente lineares. Na geração das matrizes L e T calcula-se também a porcentagem da variância explicada, a qual representa a quantidade de informação contida em cada PC (MONTANARI, 2011, FERREIRA, 2002).

Os resultados da análise de componentes principais mostram que a primeira componente principal, PC1, descreve 55,5 % da informação de entrada, tabela 44. A PC2 descreve 15,5 % e divide os compostos em série I e II ao traçar uma reta perpendicular em seu eixo 0, apenas com a exceção dos compostos **4f** e **5f**, nitro substituídos ($-\text{NO}_2$), figura 66. Observa-se também um grupo com os compostos de alta atividade da série I, **4b**, **4d**, **4e**, **4h**, **4i**, **4j**, e os compostos mais ativos de cada série, **4g** e **5g** apresentaram-se isolados no gráfico de escores, assim como no dendograma de compostos, figura 67.

Quanto aos pesos das variáveis nas componentes principais, tabela 44, verifica-se que os descritores, em sua maioria, possuem maior peso na PC1, exceto o descritor

termodinâmico, x_2 (E_{solv}) e o eletrônico x_7 (μ), porém com maior peso em PC2. Assim é verificado que a PC1 representa variáveis de natureza estérica e hidrofóbica.

Tabela 44. Resultados obtidos da análise de PCA quanto a contribuição das PCs e valores dos pesos dos descritores

Pesos (<i>loadings</i>)				Seleção das componentes principais			
Descritores	PC 1	PC 2	PC 3		Variância	Porcentagem	Acumulativo
E_{solv}	0,07	-0,65	0.04	PC 1	111,1	55,5	55,5
μ	-0,04	0,67	0.03	PC 2	37,5	18,8	74,3
ClogP _{SY-SLN}	0,29	0,15	0.61	PC 3	19,6	9,8	84,1
ClogP _{SV}	0,34	0,10	0.09	PC 4	8,5	4,3	88,3
ClogP _{MB}	0,38	-0,09	0.26	PC 5	7,7	3,8	92,2
ASA _h	0,33	-0,27	-0.06	PC 6	6,1	3,1	95,2
π	0,39	0,06	0.32	PC 7	5,1	2,5	97,8
L	0,36	0,09	-0.42	PC 8	3,6	1,8	99,6
B5	0,34	0,10	-0.41	PC 9	0,6	0,3	99,9
MR	0,38	0,07	-0.32	PC 10	0,2	0,1	100,0

Figura 67. Gráfico de escores entre PC1 e PC2, grupo dos compostos mais ativos em destaque e os compostos **4g** e **5g** mais isolados.

Para diagnosticar possíveis amostras atípicas (*outliers*), foi avaliado o gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis, figura 68.

A distância Mahalanobis é uma medida de distância baseada nas correlações entre variáveis e é invariante à escala, ou seja, não depende da escala das medições. Neste caso, corresponde à distância calculada a partir do número de k fatores (PCs) (Pirouette, 2003), representada na equação 12.

$$MD_i = (t_i - \bar{t})^T S_k^{-1} (t_i - \bar{t}) \quad \text{equação 12}$$

Em que: S é a matriz de pontuações de covariância e t é o vetor de escores médio.

A distância Mahalanobis é normalmente distribuída, e um valor crítico (MDcrit) pode ser determinado a partir de uma distribuição qui-quadrado com k graus de liberdade. Se uma amostra excede MDcrit, significa que a amostra pode ser uma amostra crítica.

Figura 68. Gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis com os compostos **4g** e **5g** isolados como amostras atípicas.

Os compostos **4g** e **5g** apresentaram-se fora da linha limítrofe (95% confiança) em relação à distância de Mahalanobis, eixo x, o que significa que apresentam um valor crítico. Estes compostos apresentam maior atividade em relação aos compostos da mesma série e possuem como grupo substituinte a butila ($-C_4H_9$) além de características mais hidrofóbicas que o restante do conjunto. Assim, possivelmente estas características

contribuíram para o comportamento mais atípico destes compostos, porém não suficiente para desclassificá-los ou descartá-los da análise.

Considerando os resultados da análise exploratória, verifica-se que as propriedades que apresentaram maior correlação com a atividade anti-*T. cruzi* foram, principalmente, descritores hidrofóbicos e estéreo. Verificou-se também a contribuição da propriedade termodinâmica, representada pela energia de solvatação, e eletrônica, representada pelo momento de dipolo. Outro aspecto verificado foi que o composto mais ativo entre as duas séries, **4g** butil substituído, apresentou alta hidrofobicidade, valor de ClogP elevado, e momento dipolo elevado, indicando que o equilíbrio hidrófilo/lipófilo tem papel importante para a atividade anti-*T. cruzi*.

7 CONCLUSÕES

Diante do objetivo deste trabalho de avaliar a atividade anti-*T. cruzi* e a citotoxicidade de compostos furfurilidênicos de estruturas azometínica e oxadiazolínica, assim como avaliar as relações entre estrutura química e atividade biológica de forma a indicar quais propriedades mais influenciam na resposta biológica, foram colocadas algumas conclusões que se descrevem a seguir.

Os compostos planejados foram sintetizados e identificados com resultados satisfatórios quanto a pureza e rendimento. O rendimento médio das reações dos compostos azometínicos foi de 93% e dos oxadiazolínicos 69%.

Quanto a resposta biológica avaliada, os dados obtidos de atividade frente ao *T. cruzi* demonstraram que, dentre os vinte compostos sintetizados, sendo 10 substituintes em cada série (I e II), todos apresentaram atividade superior ao composto-protótipo **NF** (nifuroxazida). Em relação ao fármaco de referência **BZ** (benznidazol), todos os compostos demonstraram atividade biológica superior e, comparado com o fármaco **NFX** (nifurtimox), o composto **4g** mostrou atividade superior.

Os resultados da citotoxicidade mostraram que, de modo geral, os compostos da série II, apesar de apresentarem menor atividade frente ao parasito, apresentou menor citotoxicidade. Os compostos **5e** e **5g** apresentaram citotoxicidade inferior a 400 μ M, semelhante ao fármaco benznidazol.

Verificando-se o índice de seletividade para as duas séries, os compostos com substituinte butila foram os que apresentaram melhor seletividade, o que os tornam bastante promissores, uma vez que apresentaram atividade anti-*T. cruzi* superior aos fármacos de referência, nifurtimox e benznidazol. Outro aspecto relevante é que estes compostos obtiveram índice de seletividade maior que o único fármaco utilizado no Brasil para o tratamento da doença de Chagas, o benznidazol.

Considerando os dados obtidos, a análise de relações estrutura-atividade indica que a atividade anti-*T. cruzi* está relacionada ao equilíbrio lipofílico/hidrofílico, principalmente pela relação de coeficiente de partição e momento dipolo. Outras características como a estereoquímica e, em menor proporção, a termodinâmica, também estão correlacionadas à atividade anti-*T. cruzi*. Porém, a modificação realizada para a

série II, com a ciclização da porção central da molécula, não apresentou incremento na resposta biológica, porém apresentou menor citotoxicidade frente a macrófagos J774.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram-se muito promissores, tanto pela atividade anti-*T. cruzi* pronunciada de alguns compostos planejados, principalmente o composto **4g** com atividade anti-*T. cruzi* três vezes superior ao nifurtimox, quanto no sentido de abrir possibilidades de estudos mais aprofundados em relação à busca e entendimento de características físico-químicas que mais influenciam a resposta biológica analisada.

Como perspectivas deste trabalho citam-se algumas abordagens que possam contribuir para trabalhos futuros:

- conforme os dados deste trabalho, estudos de novas moléculas que apresentem equilíbrio lipófilo/hidrófilo indicam ser bastante promissores para a atividade anti-*T. cruzi* na forma epimastigota do parasito;

- a avaliação da atividade biológica dos compostos na forma amastigota do agente etiológico também se apresenta promissora, uma vez que esta forma caracteriza a doença em sua fase crônica, para a qual não existe medicamento disponível atualmente;

- a ampliação dos grupos substituintes das duas séries e realização da separação dos confôrmers *R* e *S* dos compostos da série II podem contribuir significativamente para os estudos de relações estrutura-atividade;

- o estudo do mecanismo de ação da classe de compostos nitro-heterocíclicos frente a parasitos da ordem *Kinetoplastida* é de grande valia para proposições de melhorias estruturais dos compostos;

- a busca de modelos celulares e metodologias alternativos para a investigação da citotoxicidade mostra-se relevantes para estes estudos;

- melhorias na farmacocinética dos compostos mais promissores, aplicando-se a nanotecnologia, indicam outro segmento importante na busca de análogos com melhor biodisponibilidade e seletividade.

REFERÊNCIAS

- ALLINGER, N.L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J Am Chem Soc.* v. 99, p. 8127 – 8134, 1977.
- ALMEIDA, L.V. Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazolinas frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*. São Paulo, 2009. 133p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- ALMEIDA-DE-FARIA, M., FREYMULLER, E., COLLI, W., ALVES, M.J.M. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Experim Parasitol.* v. 92, p.263-274, 1999.
- ANDERS, H. J., VIELHAUER, V. Identifying and validating novel targets with in vivo disease models: guidelines for study design. *Drug Discov Today.* v. 12, p. 446-451, 2007.
- ANDRADE, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev Soc Bras Med.* v. 18, p. 39-46, 1985.
- ANDRADE, L.O., ANDREWS, N.W. The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology Online*, 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n10/pdf/nrmicro1249.pdf>>. Acesso em: 16 Jan 2012.
- ANVISA/MS, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Medicamentos Novos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 Out 2010.
- AQUINO NETO, F.R., NUNES, D.S.S. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 188p.
- ARRIETA, R., DAQUINO, B., ROSSO, N., FERRERAS, M.G., JUÁREZ, N. Evaluación de una metodología de tamizaje en la enfermedad de Chagas en San Luis, Argentina. *Salud Pública de México.* v.46, p. 430-437, 2004.
- ARROIO, A., HONORIO, K.M., SILVA, A.B.F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Quim Nova.* v. 33, p. 694-699, 2010.
- ASTELBAUER, F., WALOCHNIK, J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. *Int J Antimicrob Agents* v. 38, p. 118– 124, 2011.
- BABER, J.C., THOMPSON, D.C., CROSS, J.B., HUMBLET, C. GARD: A Generally Applicable Replacement for RMSD. *J Chem Inf Model.* v. 49, p. 1889-1900, 2009.
- BARREIRO, E.J., FRAGA, Z.A.M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR). *Quim nova.* v.28, p. S53-S63, 2005.
- BARREIRO, E.J., FRAGA, Z.A.M. *Química Medicinal: as bases moleculares de ação dos fármacos*. 1 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2008. 536 p.

BEEBE, K.R., PELL, R.J., SEASHOLTZ, M.B. *Chemometrics: a Pratical Guide*. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1998. 348 p.

BEILSTEIN'S *Handbuch der Organischen Chemie*. 5 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1979.

BLUMENSTIEL, K., SCHÖNECK, R., YARDLEY, V., CROFT, S. L., KRAUFT-SIEGEL, R. L., Nitrofuran Drugs as Common Subversive Substrates of *Trypanosoma cruzi* Lipoamine Dehydrogenase and Trypanothione Reductase. *Biochem Pharmacol.* v. 58, p.1791-1799, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). *Casos de Doença de Chagas Aguda (DCA)*. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas de 2005 a 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos>>. Acesso em: 02 Out 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia de vigilância epidemiológica*. 7 ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

BRENEMAN, C.M., WIBERG, K.B. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. *J Comp Chem.* v. 11, p. 361 – 373, 1990.

BRENER, Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Pharmacol Chemother.* v. 13, p.1-44, 1975.

BRENER, Z. Therapeutic activity of furaltadone, furazolidine, and furadantin in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Hospital.* v. 60, p. 947-951, 1961.

BRENER, Z., ANDRADE, Z.A., BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431 p.

BROWN, D. Unfinished business: target-based drug discovery. *Drug Discov Today.* v.12, p. 1007-1012, 2007.

BURGER, J. *Burger's Medicinal Chemistry*. 5ed. New York: Willey-Interscience, 1994. 1088 p.

CARACELLI, I., STAMATO, F. M. L. G., MESTER, B., PAULINO M., CERECETTO, H. A New Analogue of Nifurtimox. *Acta Cryst. Sect C*, v.52, p. 1281 - 1282, 1996.

CAI, K., DING, M., ZONG, Z., WEI, X. Study on reduction of nitro aromatic compounds with hydrazine hydrate in water. *Huaxue Shijie.* v. 48, p. 232-234, 2007.

CAI, K., ZHOU, Y., YUE, W. FeO(OH)/C-catalyzed reduction of aromatic nitro compounds to anilines with hydrazine hydrate. *Huaxue Shijie.* v. 50, p. 418-420, 2009.

CAREY, F.A., SUNDBERG, R.J. *Advanced Organic Chemistry*. 4 ed. New York: Plenum Press, 2000. 1275 p.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 04 Jan 2012.

CERECETTO, H., DI MAIO, R., IBARRURI, G., SEOANE, G., DENICOLA, A., PELUFFO, G., QUIJANO, C., PAULINO, M. Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. *IlFarmaco*. v. 53, p. 89-94, 1998.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.1, p.159-218, 1909.

COURA, J.R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.104, p. 549-554, 2009.

COURA, J.R., CANÇADO, J.R. A história da terapêutica da doença de Chagas. Portal da Doença de Chagas da Fiocruz, 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/>>. Acesso em: 20 Nov 2010.

COURA, J.R., CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J.R., VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature Outlook*. v.465, p. S6-S7, 2010.

CRAIG, P.N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. *J Med Chem*. v. 14, n.8, 680-684, 1971.

DENIZOT, F., LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol Methods*. v. 89, p. 271-277, 1986.

DEVERA, R., ILLARRAMENDI, X., MONTROYA-ARAÚJO, R., PIRMEZ, C., FERNANDES, O., COURA, J.R. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. *Rev Bras Med Trp*. v.35, p. 323-330, 2002.

DEWAR, M.J.S.E., ZOEBISCH, G., HEALY, E.F., STEWART, J.J.P. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J Am Chem Soc*. v. 107, p. 3902 – 3909, 1985.

DNDi, DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES *initiative*. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/>>. Acesso em: 02 Jan 2012.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interact*. v.73, p.1-27, 1990.

DOHERTY, D. *MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software*, version 3.2 – User's Guide. The Chem21 Group Inc., 1780 Wilson Dr., Lake Forest, IL, 60045, EUA, 2002.

FAIRLAMB, A.H., CERAMI, A. Metabolism and functions of tripanothione in the kinetoplastida. *Ann Rev Microbiol*. v. 46, p. 695-759, 1992.

FAUCHER, J.F., BALTZ, T., PETRY, K.G. Detection of an "epimastigote-like" intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol research*. v. 81, p. 441-443, 1995.

FERREIRA, M.M.C. Multivariate QSAR. *J Braz Chem Soc*. v. 13, nº 6, p. 742-753, 2002.

FIOCRUZ, Agência FIOCRUZ de notícias. *Glaxo Smith Kline e Fiocruz ampliam colaboração para doenças negligenciadas*. (2010) Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home/>>. Acesso em: 09 Jan 2012.

FORSYTHE, K.H.; HOPFINGER, A. J. The Influence of Solvent on the Secondary Structures of Poly(L-alanine) and Poly(L-proline). *Macromolecules*. v. 6, p. 423-437, 1973.

FRESHNEY, I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6 ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2010. 732 p.

GAO, UNITED STATES GOVERNMENT ACCOUNTABILITY OFFICE. *New drug Development. Science, business, regulatory and intellectual property issue cited as hampering drug development efforts*, 2006. Disponível em: <<http://www.gao.gov/>>. Acesso em: 10 Out 2010.

Gaussian 03W (*Gaussian 03W for Windows*, version 6; Gaussian Inc.: 1995-2003, Pittsburgh, PA, EUA. Disponível em: <<http://www.gaussian.com/>> . Acesso em: 24 Jan 2011.

GERPE, A., BOIANI, L., HERNÁNDEZ, P., SORTINO, M., ZACCHINO, S., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H. Naftifine-analogues as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Eur J Med Chem*. v. 45, p. 2154–2164, 2010.

GHOSE, A.K., VISWANADHAN, V.N., WENDOLOSKI, J.J. Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods. *J Phys Chem. A*. v. 102, p. 3762-3772, 1998.

GUADAGNINI, P.H., BRUNS, R.E., SOUZA, A.A. Cargas atômicas em moléculas. *Quim Nova*. v. 19, p. 148-155, 1996.

HAMMETT, L.P.J. The effect of structure upon the reactions of organic compounds. *Am Chem Soc*. v.59, p.96-103, 1937.

HANSCH, C., FUJITA, T. ρ - σ - π analysis: a method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J Am Chem Soc*. v.86, p.1616-1626, 1964.

HANSCH, C., LEO, A., *Exploring QSAR: fundamental and applications in chemistry and biology*. Washington: American Chemical Society, 1995.580 p.

HANSCH, C., LEO, A., HOEKMAN, D. *Exploring QSAR: hydrophobic, electronic, and steric constants*. Washington: American Chemical Society, 1995.368 p.

Hyperchem 8.0 (Hypercube, Inc: 2008. Gainesville, FL, EUA. Disponível em: <<http://www.hyper.com>> . Acesso em: 24 Jan 2011.

IMS, HEALTH CONSULTORIA. *IMS Health Forecasts Global Pharmaceutical Market Growth*, 2010. Disponível em: <<http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth>>. Acesso em: 12 Nov 2010.

ISHII, M., JORGE, S.D., OLIVEIRA, A.A., PALACE-BERL, F., CECHINEL, C.A., SONEHARA, I.Y., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L.C. Synthesis, molecular modeling and preliminary biological evaluation of a set of novel 3-acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines as potential antibacterial, anti- *T. cruzi*, and antifungal agents *Bioorg. Med. Chem.* v. 19, p. 6292-6301, 2011.

JACKSON, Y., MYERS, C., DIANA, A., MARTI, H.P., WOLF, H., CHAPPUIS, F., LOUTAN, L., GERVAIS, A. Congenital Transmission of Chagas Disease in Latin American Immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Disease*. v.15, p. 601-603, 2009.

JORGE, S.D. Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR de derivados benzofuroxânicos com atividade frente *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi*. São Paulo, 2011. 328p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo).

JORGE, S.D., MASUNARI, A., RANGEL-YAGUI, C.O., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L. C. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem.* v.17, p. 3028-3036, 2009.

JORGE, S.D., PALACE-BERL, F., MASUNARI, A., CECHINEL, C.A., ISHII, M., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L.C. Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay. *Bioorg Med Chem.* v.19, p. 5031-5038, 2011.

JOULE, J.A., MILLS, K. *Heterocycles Chemistry* 4 ed. Berlin: Blackwell Science. 2007.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488 p.

KALSI, R., BALLA, T.N., PARMAR, S.S., BARTHWAL, J.P. Anti-inflammatory and analgesic activities of 5-(4-[aryl(aryl azo)methyleneamino]phenyl)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thiones. *Pharmacology*. v.39, p. 103-108, 1989.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 1088 p.

KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: ABDR, 1988. 783 p.

KOROLKOVAS, A., FRANÇA, F.F.C. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. 18 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2011. 716 p.

KLOPMAN, G., LI, J.Y., WANG, S., DIMAYUGAT, M. Computer Automated log P Calculations Based on an Extended Group Contribution Approach. *J Chem Inf Comput Sci.* v.34, p. 752-781, 1994.

KUBINYI, H. *QSAR: Hansch analysis and related approaches*. New York: VCR, 1993. 240 p.

LEMKE, T.L., WILLIAMS, D.A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 6 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2008. 1377 p.

LI, C.-K., MA, Y.-J., CAO, L.-H. Synthesis of Novel 3-Acetyl-2-aryl-5-(3-aryl-1-phenyl-pyrazol-4-yl)-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazoles. *J Chin Chem Soc.* v. 56, p. 182-185, 2009.

LIESE, B., ROSENBERG, M., SCHRATZ, A. Neglected Tropical Diseases 1: Programmes, partnerships, governance for elimination and control of neglected tropical diseases. *Lancet.* v. 375, p. 67-76, 2010.

LOPES, R., ELEUTÉRIO, C.V., GONÇALVES, L.M.D., CRUZ, M.E.M., ALMEIDA, A.J., Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis. *European J Pharm Sciences.* v. 45, p. 442-450, 2012.

LUNARDELLI, A., BORGES, F.P., MELLO, K.F., ZEFERINO, A.S.A. Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. *RBAC*, v. 39, n.2, p. 139-141, 2007.

MACCIONI, E., ALCARO, S., CIRILLI, R., VIGO, S., CARDIA, M.C., SANNA, M.L., MELEDDU, R., YANEZ, M., COSTA, G., CASU, L., MATYUS, P., DISTINTO, S. 3-Acetyl-2,5-diaryl-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazoles: A New Scaffold for the Selective Inhibition of Monoamine Oxidase B. *Med Chem.* v. 54, p. 6394-6398, 2011.

MARCH, J. *Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structures*. 4 ed. New York: John Wiley, 2001. 1512 p.

MarvinBeans (*MarvinBeans*, version 5.0.4.1; ChemAxon Ltd.: 1998-2010, Budapest, Hungria. Disponível em: <<http://www.chemaxon.com>> . Acesso em: 26 Jan 2011.

MASUNARI, A. Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR-2D e QSAR-3D de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente *Staphylococcus aureus* multirresistente (CEB-Clone Endêmico Brasileiro). São Paulo, 2005. 282p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

MASUNARI, A., TAVARES, L.C. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* multiresistente (MRSA.) *Braz J Pharm Sci.* v.42, n.3, p.461-471, 2006.

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

MERCK INDEX, Merck & Company, Inc. 12 ed. New York: White House Station, 1996. 360 p.

MestRe-C versão 5.0, MestreLab Research, Trial, Inc: 2006, Santiago de Compostela, Spain.

MOITA NETO, J.M., MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quim Nova*. v. 21, p. 467-469, 1998.

MOLSIM 3.2 *MOLSIM 3.2; The Chem21 Group, Inc:* 1997, Lake Forest, IL, EUA. Disponível em: <<http://www.infometrix.com/software/softdesc.html>> . Acesso em: 24 Jan 2011.

MONTANARI, C.A. *Química Medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*. 1 ed. São Paulo: Edusp, 2011. 712 p.

MORAN, M., GUZMAN, J., ABELA-OVERSTEEGEN, L., LIYANAGE, R., OMUNE, B., WU, L., CHAMPMAN, N., GOUGLAS, D. *Neglected Disease Research & development: Is innovation under threat? G-FINDER. - Report 2011*. Helth Policy Division, The George Institute for International Health, 2011. Disponível em: <<http://www.thegeorgeinstitute.org/>>. Acesso em: 04 Jan 2012.

MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P., CASTILHO, L.R. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*. 1 ed. São Paulo: Rocca, 2007. 503 p.

MORGON, N.H., COUTINHO, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. 1 ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. 539 p.

MORRISON, R., BOYD, R. *Química orgânica*. 11 ed. Lisboa: Fundação Caloust Gulbenkian, 1994. 1360 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. v.65, p.55-63, 1983.

MUELAS, S., DI MAIO, R., CERECETTO, H., SEOANE, G., OCHOA, C., ESCARIO, J.A., GÓMEZ-BARRIO, A. New thiadiazine derivatives with activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Folia Parasitol*. v. 48, p. 105, 108, 2001.

NOBREGA, A.A., GARCIA, M.H., TATTO, E., OBARA, M.T., COSTA, E., SOBEL, J., ARAUJO, W.N. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. *Emerg Infect Disese*. 15, p. 653-655, 2009.

O'BRIEN, S.F., ZOU, S., LAPERCHE, S., BRANT, L.J., SEED, C.R., KLEINMAN, S.H. Surveillance of Transfusion-Transmissible Infections: Comparison of Systems in Five Developed Countries. *Transfus Med Rev*, v. 26, p. 38-57, 2012.

OLIVEIRA, A. A. Planejamento, síntese, determinação da atividade biológica e estudos de QSAR-2D de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos frente *Trypanosoma cruzi*. São Paulo, 2011. 125p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo).

OriginPro versão 8.0 SR00 - Trial, OriginLab Corporation: 2007, One Roundhouse Plaza, Northhampton, MA, USA. Disponível em: <<http://www.originlab.com/>> Acesso em: 15 Junho 2010.

OSÓRIO, T. M., MONACHE, F.D., CHIARADIA, L.D., MASCARELLO, A., STUMPF, T.R., ZANETTI, C.R., SILVEIRA, D.B., BARARDI, C.R.M., SMÂNIA, E.F.A., VIANCELLI, A., GARCIA, L.A.T., YUNES, R.A., NUNES, R.J., SMÂNIA Jr., A. Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem Letters*. v. 22, p. 225-230, 2012.

PARDO, C.C. Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the MTT test. 1 de dezembro de 2006. Disponível em: <http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/>. Acesso em: 10 Set 2010.

PARMAR, S.S., GUPTA, A.K., GUPTA, T.K., STENBERG, V.I. Synthesis of substituted benzyldinohydrazines and their monoamine oxidase inhibitory and anticonvulsant properties. *J Pharm Sci*. v.64, p.154-157, 1975.

PAULA, F.R., JORGE, S.D., ALMEIDA, L.V., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L.C. Molecular modeling studies and in vitro bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitro-heterocyclic derivatives as anti-*T. cruzi* agents. *Bioorg Med Chem*.v.17, p. 2673-2679, 2009.

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

PHYSPROP© database. Disponível em: <<http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>>. Acesso em: 10 Abril 2012.

PhRMA, PHARMACEUTICAL RESEARCH AND MANUFACTURERS OF AMERICA. Pharmaceutical Industry Profile 2011. Washington, DC: PhRMA.Abril, 2011. Disponível em: <http://www.phrma.org/profiles_and_reports>. Acesso em: 10 Out 2011.

PhRMA, PHARMACEUTICAL RESEARCH AND MANUFACTURERS OF AMERICA. Pharmaceutical Industry Profile 2010. Washington, DC: PhRMA.Março, 2010. Disponível em: <http://www.phrma.org/profiles_and_reports>. Acesso em:15 Nov 2010.

Pirouette 3.11, Infometrix Inc., 1990-2003, Woodinville.

PNIEWSKA, B., JANUCHOWSKI, M. Structural Investigations of Nifuroxazide, *p*-Hydroxy-N'-(5-nitrofurfurylidene)benzhydrazide. *Pol J Chem*. v.72, p. 2629-2634, 1998.

POZAS, R., CARBALLO, J., CASTRO, C., RUBÍO, J., Synthesis and in vitro antitrypanosomal activity of novel Nifurtimox analogues. *Bioorg Med Chem Lett*.v.15, p. 1417 – 1421, 2005.

RALPH, P., NAKOINZ I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature*. v. 257, p. 393-394, 1975.

RANDO, D.G, SATO, D.N., SIQUEIRA, L., MALVEZZI, A., LEITE, C.Q.F., AMARAL, A.T., FERREIRA, E.I., TAVARES, L.C. Potential Tuberculostatic Agents. Topliss Application on Benzoic Acid [(5-Nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide Series. *Bioorg Med Chem*. v.10, p. 557-560, 2002.

RANDO, D.G, AVERY, M.A., TEKWANI, B.L., KHAN, S.I., FERREIRA, E.I. Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzyldene hydrazides. *Bioorg Med Chem.* v.16, p. 6724-6731, 2008.

RASSI JR, A., RASSI, A., MARIN-NETO, J.M. Chagas disease. *Lancet.* v. 375, p. 1388-1402, 2010.

REY, L. *Bases da Parasitologia Médica.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 379 p.

REZENDE, P. Relações quantitativas estrutura-atividade de derivados de 5-nitro-2-tiofilidênicos: planejamento, síntese e determinação da atividade antimicrobiana frente cepas de *Staphylococcus aureus*. São Paulo, 2002. 182p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

RODRIGUES, A.M. Síntese e determinação da concentração inibitória mínima frente *S. aureus* de 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazidas substituídas. São Paulo, 2000. 101p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).

ROMEIRO, N.C., AGUIRRE, G., HERNANDÉZ, P., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H., ALDANA, I., PÉRES-SILANES, S., MONGE, A., BARREIRO, E.J., LIMA, L.M. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. *Bioorg Med Chem.* v. 19, p. 641-652, 2009.

ROLLAS. S., GULERMAN, N., ERDENIZ, H. Synthesis and antimicrobial activity of some new hydrazones of 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines. *IL Farmaco.* v.57, p.171-174, 2002.

SATYANARAYANAJAIS, S.D. *Drug Design and Discovery Methods and Protocols.* 1 ed. New York: Humana Press, 2011.

SCHMIDT, A., KRAUTH-SIEGEL, R.L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Curr Topics Med Chem.* v. 2, p. 1239-1259, 2002.

SILVA, L.H.P., NUSSENSZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol.* v.20, p.191, 1953.

SILVERMAN, R.B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action.* 2 ed. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2004.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. *Spectrometric identification of organic compounds.* 7 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

SINGER, S.J, NICHOLSON, C.L. The fluid mosaic model of the structure of the cell membrane. *Science.* v.175, p.720-731, 1972.

SOARES SOBRINHO, J.L., MEDEIROS, F.P.M., LA ROCA, M.F., SILVA, K.E.R., LIMA, L.N.A., NETO, P.J. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de chagas. *Rev Pat Trop.* v. 36, p. 103-118, 2007.

SOARES-SOBRINHO, J. L., CUNHA-FILHO, M. S. S., ROLIM NETO, P. J., TORRES-LABANDEIRA, J. J., DACUNHA-MARINHO, B. Benznidazole. *Acta Cryst.* Sect. E, v. 64, p.634 - 645, 2008.

SOLOMONS, G., FRYHLE, C. *Organic Chemistry*. 8 ed. New York: John Wiley & Sons, 2004.1344 p.

SOMOGYI, L. Synthesis, Oxidation and Dehydrogenation of Cyclic N,O- and N,S-acetals. Part III. [1,2] Transformation of N,O-acetals: 3-Acyl-1,3,4-Oxadiazolines. *J Heterocyclic Chem.*v.44, p.1235, 2007.

SOUZA, E.R., AMATO NETO, V., BRAZ, L.M.A., CARIGNANI, F.L., OKUMURA, M. Tratamento, por meio do alopurinol, da infecção aguda de camundongos pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Cín Terap.* v. 24, p. 50-52, 1998.

SQUELLA, J.A., LETELIER, M. E., LINDERMEYER, L., NUNES-VERGARA, L. J. Redox behaviour of nifuroxazide: generation of the one-electron reduction product. *Chem Biol Interact.* v. 99. p. 227-238. 1996.

SRIRAM, D., YOGEE SWARI, P., VYAS, D.R.K., SENTHILKUMAR, P., BHAT, P., SRIVIDYA, M., 5-Nitro-2-furoic acid hydrazones: Design, synthesis and in vitro antimycobacterial evaluation against log and starved phase cultures. *Bioorg Med Chem Letters.* v. 20, p. 4313–4316, 2010.

Sybyl 8.0 (Sybyl 8.0 for Linux; Tripos, Inc.: 2007. St. Louis, EUA.

TAVARES, L.C., FERREIRA, E.I. *Quantitative Structure Activity Relationships*: Fundamental and application of the Hansch Analysis. In: MONGE, A., GANELLING, R.C. (Org.). *Practical Studies for Medicinal Chemistry*: An integrating approach for developing countries. Pamplona: Editorial Universidade Nacional de Rio Cuarto, 2011. p. 143-170.

TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. *Quim Nova.* v. 27, p. 631-639, 2004.

TAVARES, L.C., CHISTÉ, J.J., SANTOS, M.G.B., PENNA, T.C.V. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. *Boll Chim Farm.* v. 138, pt. 2, p. 432-436, 1998.

TAVARES, L.C., PENNA, T.C.V., AMARAL, A.T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. *Boll Quim Farm.* v.136, pt. 1, p.244-249, 1996.

THOMAS, G. *Química Medicinal: Uma introdução*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.432 p.

TWENTYMAN, P.R., LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer*, v. 56, p. 278-285, 1987.

TYLER, K.M., ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Internat J Parasitol.* v. 31, p. 472-481, 2001.

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

VERLOOP, A. *The STERIMOL Approach to Drug Design*. Marcel Dekker: New York, 1987. 112 p.

VIODÉ, C., BETTACHE, N., CENAS, N., KRAUTH-SIEGEL, R.L., CHAVIÈRE, G., BALAKARA, N., PÉRIE, J. Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles. *Biochem Pharmacol.* v. 57, p. 549-557, 1999.

VISWANADHAN, V.N., GHOSE, A.K., REYANKAR, G.R., ROBINS, R.K. Atomic Physicochemical Parameters for Three Dimensional Structure Directed Quantitative Structure-Activity Relationships. 4. Additional Parameters for Hydrophobic and Dispersive Interactions and Their Application for an Automated Superposition of Certain Naturally Occurring Nucleoside Antibiotics. *J Chem Inf Comput Sci.* v. 29, p. 163-172, 1989.

WERMUTH, C.G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 ed. Oxford: Elsevier, 2008. 942 p.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/WHO_Bayer_agreement/en/>. Acesso em: 10 Jan 2012.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. SAVIOLI, L., DAUMERIE, D. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases (2010)* – Disponível em: <<http://who.int/en/>>. Acesso em: 02 Nov 2010.

YEHYE, W.A., ARIFFIN, A., RAHMAN, N.A., Ng, S. W. 2-[4-Acetyl-5-(biphenyl-4-yl)-4,5-dihydro-1,3,4-oxadiazol-2-yl]phenyl acetate. *Acta Cryst. Sect. E*, v.66, p. 878 - 886, 2010.

ZINGALES, B., ANDRADE, S.G., BRIONES, M.R.S., CAMPBELL, D.A., CHIARI, E., FERNANDES, O., GUHL, F., LAGES-SILVA, E., MACEDO, A.M., MACHADO, C.R., MILES, M.A., ROMANHA, A.J., STURM, N.R., TIBAYRENC, M., SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, p.1051-1054, 2009.

ZINGALES, B., MILES, M.A., CAMPBELL, D.A., TIBAYRENC, M., MACEDO, A.M., TEIXEIRA, M.M.G., SCHIJMAN, A.G., LLEWELLYN, M.S., LAGES-SILVA, E., MACHADO, C.R., ANDRADE, S.G., STURM, N.R., The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009, 2012.

Anexo 1

**Esquema de distribuição dos compostos e fármacos em cubetas
utilizado na execução dos ensaios de atividade anti-*T. cruzi***

Data ensaio: __/__/__

Massa dos compostos e fármacos

A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	
H	

1 A 50 µM	2 A 20 µM	3 A 10 µM	4 B 50 µM	5 B 20 µM	6 B 10 µM	7 C 50 µM	8 C 20 µM	9 C 10 µM	10 Controle positivo
11 A 50 µM	12 A 20 µM	13 A 10 µM	14 B 50 µM	15 B 20 µM	16 B 10 µM	17 C 50 µM	18 C 20 µM	19 C 10 µM	20 Controle positivo
21 A 50 µM	22 A 20 µM	23 A 10 µM	24 B 50 µM	25 B 20 µM	26 B 10 µM	27 C 50 µM	28 C 20 µM	29 C 10 µM	30 Controle positivo
31 A (branco) 50 µM	32 A (branco) 20 µM	33 A (branco) 10 µM	34 B (branco) 50 µM	35 B (branco) 20 µM	36 B (branco) 10 µM	37 C (branco) 50 µM	38 C (branco) 20 µM	39 C (branco) 10 µM	40 Controle positivo
41 D 50 µM	42 D 20 µM	43 D 10 µM	44 E 50 µM	45 E 20 µM	46 E 10 µM	47 F 50 µM	48 F 20 µM	49 F 10 µM	50 Controle DMSO 1%
51 D 50 µM	52 D 20 µM	53 D 10 µM	54 E 50 µM	55 E 20 µM	56 E 10 µM	57 F 50 µM	58 F 20 µM	59 F 10 µM	60 Controle DMSO 1%
61 D 50 µM	62 D 20 µM	63 D 10 µM	64 E 50 µM	65 E 20 µM	66 E 10 µM	67 F 50 µM	68 F 20 µM	69 F 10 µM	70 Controle DMSO 1%
71 D (branco) 50 µM	72 D (branco) 20 µM	73 D (branco) 10 µM	74 E (branco) 50 µM	75 E (branco) 20 µM	76 E (branco) 10 µM	77 F (branco) 50 µM	78 F (branco) 20 µM	79 F (branco) 10 µM	80 Controle DMSO 0,5%
81 G 50 µM	82 G 50 µM	83 G 20 µM	84 G 20 µM	85 G 10 µM	86 G 10 µM	87	88 LIT (branco)	89 DMSO 1% (branco)	90 Controle DMSO 0,5%
91 G 50 µM	92 G (branco) 50 µM	93 G 20 µM	94 G (branco) 20 µM	95 G 10 µM	96 G (branco) 10 µM	97	98 LIT (branco)	99 DMSO 0,5% (branco)	100 Controle DMSO 0,5%

PREPARO DAS SOLUÇÕES

A) **50.000 µM** + 5 mL DMSO = 10.000 µM (100% DMSO)

B) 0,1 mL A + 4,9 mL LIT = 200 µM (2% DMSO)

C) **2,5 mL B + 2,5 mL LIT = 100 µM (1% DMSO)**

D) 1 mL A + 4 mL DMSO = 2000 µM (100% DMSO)

E) **0,1 mL D + 4,9 mL LIT = 40 µM (2% DMSO)**F) **2,5 mL E + 2,5 mL LIT = 20 µM (1% DMSO)****Controle DMSO (CS) = 0,1 mL DMSO + 4,9 mL LIT = 2% DMSO****50 µM** = 0,5 mL C + 0,5 mL inóculo (0,5%DMSO)**20 µM** = 0,5 mL E + 0,5 mL inóculo (1%DMSO)**10 µM** = 0,5 mL F + 0,5 mL inóculo (0,5%DMSO)

c.DMSO 1% = 0,5 mL SC + 0,5 mL inóculo (1%DMSO)

c. DMSO 0,5% = 0,25 mL SC + 0,25 mL LIT + 0,5 mL inóculo (0,5%DMSO)

c. positive = 0,5 mL LIT + 0,5 mL inóculo

inóculo utilizado: _____parasitas/mL

Anexo 2

Esquema de distribuição dos compostos e fármacos em microplacas para execução dos ensaios de citotoxicidade em macrófagos de linhagem J774

Data ensaio: ____/____/____

**Massa dos compostos
e fármacos**

A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	
H	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	CS 0,5%	CP
B	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	CS 0,5%	CP
C	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	CS 0,5%	CP
D	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	CS 0,5%	CP
E	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	CS 0,1%	CN
F	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	CS 0,1%	CN
G	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	CS 0,1%	CN
H	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	CS 0,1%	CN

CS: controle do solvente DMSO nas concentrações de 0,1% e 0,5%**CP: controle positivo****CN: controle negativo com 50% de DMSO****Diluição seriada nas concentrações de 400 a 0,78 μM** **PREPARO DAS SOLUÇÕES****A) 80.000 μM + 1 mL DMSO = 80.000 μM (100% DMSO)****B) 0,1 mL A + 9,9 mL RPMI 1640 = 800 μM (1% DMSO)****Controle DMSO (CS) = 0,1 mL DMSO + 9,9 mL RPMI 1640 (1% DMSO)**

Anexo 3

Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos da série I azometínica

Espectro de RMN ¹H do composto *N'*-(5-nitrofuran-2-il)metileno benzidrazida, **4a**

Espectro de RMN ^{13}C do composto N' -(5-nitrofurano-2-il)metileno benzidrazida, **4a**

Espectro de RMN ^1H do composto 4-metil-[N'-(5-nitrofuran-2-il)metileno]benzidrazida, *4b*

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4-metil-[N' -(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, **4b**

Espectro de RMN ^1H do composto 4-ciano-[N'-(5-nitrofuran-2-il)metileno]benzidrazida, *4c*

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4-ciano-[*N'*-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, **4c**

Espectro de RMN ^1H do composto 4-metoxi-[N' -(5-nitrofuran-2-il)metileno]benzidrazida, **4d**

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4-metoxi-[N'-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, *4d*

Espectro de RMN ^1H do composto 4-cloro-[N'-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, *4e*

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4-cloro-[*N'*-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, *4e*

Espectro de RMN ^1H do composto 4-nitro-[N' -(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, *4f*

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4-nitro-[N'-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, *4f*

Espectro de RMN ^1H do composto 4-butil-[N'-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, 4g

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4-butil-[*N'*-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, 4g

Espectro de RMN ^1H do composto 4-trifluorometil-[N' -(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, *4h*

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4-trifluorometil-[N' -(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, *4h*

Espectro de RMN ^1H do composto 4-bromo- $[N'$ -(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, **4i**

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4-bromo-[*N'*-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, 4i

Espectro de RMN ^1H do composto 4-iodo-[N' -(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, **4j**

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4-iodo-[*N'*-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, **4j**

Anexo 4

Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto-protótipo nifuroxazida

Espectro de RMN ^1H do composto-protótipo nifuroxazida

Espectro de RMN ^{13}C do composto-protótipo nifuroxazida

Anexo 5

Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos da série II oxadiazolínica

Espectro de RMN ^1H do composto 3-Acetil-5-(4-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5a

Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-Acetil-5-(4-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5a

Espectro de RMN ^1H do composto 3-Acetil-5-(4-metil-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, *5b*

Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-Acetil-5-(4-metil-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, *5b*

Espectro de RMN ^1H do composto 3-Acetil-5-(4-ciano-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5c

Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-Acetil-5-(4-ciano-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5c

Espectro de RMN ^1H do composto 3-Acetil-5-(4-metoxi-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5d

Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-Acetil-5-(4-metoxi-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5d

Espectro de RMN ^1H do composto 3-Acetil-5-(4-cloro-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, *5e*

Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-Acetil-5-(4-cloro-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5e

Espectro de RMN ^1H do composto 3-Acetil-5-(4-nitro-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5f

Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-Acetil-5-(4-nitro-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5f

Espectro de RMN ^1H do composto 3-Acetil-5-(4-butil-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5g

Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-Acetil-5-(4-butil-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5g

Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-Acetil-5-(4-trifluorometil-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, *5h*

Espectro de RMN ^1H do composto 3-Acetil-5-(4-bromo-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5i

Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-Acetil-5-(4-bromo-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5i

Espectro de RMN ^1H do composto 3-Acetil-5-(4-iodo-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5j

Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-Acetil-5-(4-iodo-fenil)-2-(5-nitrofurfuriliden-2-il)-2,3-di-idro-1,3,4-oxadiazol, 5j

Anexo 6

Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos fármacos benznidazol e nifurtimox

Espectro de RMN ^1H do fármaco de referência benznidazol

Espectro de RMN ^{13}C do fármaco de referência benznidazol

Espectro de RMN ^1H do fármaco de referência nifurtimox

Espectro de RMN ^{13}C do fármaco nifurtimox

Anexo 7

Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário em diferentes concentrações dos compostos da série I

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4a**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50 1,699	100	0,7
10 1,000	92	1,9
8 0,903	84	1,8
4 0,602	51	3,7
2 0,301	22	3,3

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4b**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50 1,699	100	0,5
20 1,301	100	0,4
8 0,903	94	0,6
4 0,602	65	0,9
2 0,301	30	2,7

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4c**.

Concentração (μM) (log μM)		IC ^a (%)	DP
50	1,699	100	1,3
20	1,301	80	1,4
10	1,000	47	0,6
8	0,903	42	5,3
4	0,602	21	5,5
2	0,301	12	4,2

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4d**.

Concentração (μM) (log μM)		IC ^a (%)	DP
50	1,699	100	1,4
20	1,301	100	0,9
10	1,000	97	0,7
8	0,903	93	1,1
4	0,602	65	3,2
2	0,301	35	1,7

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4e**.

Concentração (μM) (log μM)		IC ^a (%)	DP
50	1,699	100	0,3
20	1,301	100	0,6
10	1,000	99	0,9
8	0,903	94	0,9
4	0,602	59	1,9
2	0,301	23	2,5

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4f**.

Concentração (μM) (log μM)		IC ^a (%)	DP
50	1,699	100	0,2
20	1,301	100	0,4
10	1,000	72	1,1
8	0,903	54	4,5
4	0,602	32	3,4

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4g**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
8,00	0,903	100
6,00	0,778	100
4,00	0,602	100
3,00	0,477	100
2,00	0,301	96
1,60	0,204	88
1,50	0,176	84
1,00	0,000	54
0,80	-0,097	39
0,50	-0,301	24
0,40	-0,398	20
0,25	-0,602	12

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4h**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50	1,699	100
20	1,301	100
10	1,000	98
8	0,903	96
4	0,602	56
2	0,301	30

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4i**.

Concentração (μM) (log μM)		IC ^a (%)	DP
50	1,699	100	0,5
20	1,301	100	0,5
10	1,000	100	0,4
8	0,903	99	0,6
4	0,602	70	2,3
2	0,301	29	2,9

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **4j**.

Concentração (μM) (log μM)		IC ^a (%)	DP
10	1,000	100	0,9
8	0,903	100	0,4
6	0,778	95	0,7
4	0,602	83	1,9
3	0,477	63	1,4
1,5	0,176	38	1,2

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Anexo 8

Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário em diferentes concentrações dos compostos da série II

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5a**.

Concentração (μM)	(log μM)	IC ^a (%)	DP
50	1,699	100	0,3
20	1,301	96	1,1
10	1,000	55	1,4
8	0,903	37	1,9
4	0,602	18	1,8
2	0,301	13	0,7

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5b**.

Concentração (μM)	(log μM)	IC ^a (%)	DP
50	1,699	100	0,6
20	1,301	96	1,0
10	1,000	56	1,7
8	0,903	39	2,5
4	0,602	16	2,9
2	0,301	7	2,9

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5c**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50 1,699	99	0,2
20 1,301	75	1,6
10 1,000	34	1,2
4 0,602	8	3,2
2 0,301	0	4,9

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5c** e valor de IC_{50} .

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5d**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50 1,699	100	0,4
20 1,301	99	0,3
10 1,000	86	1,0
8 0,903	5	4,1
4 0,602	3	4,0
2 0,301	3	4,0

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5d** e valor de IC_{50} .

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5e**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50 1,699	100	0,1
20 1,301	94	0,9
10 1,000	44	1,7
4 0,602	18	3,3
2 0,301	10	3,8

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

. Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5e** e valor de IC_{50} .

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5f**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50 1,699	95	0,3
20 1,301	72	1,3
10 1,000	35	1,6
8 0,903	31	4,9
4 0,602	10	3,3
2 0,301	8	4,5

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5f** e valor de IC_{50} .

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5g**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50 1,699	99	0,4
20 1,301	97	1,5
10 1,000	85	1,5
8 0,903	43	4,3
4 0,602	8	4,2
2 0,301	0	2,9

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5g** e valor de IC₅₀.

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5h**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50 1,699	89	2,3
20 1,301	87	0,6
10 1,000	32	2,7
8 0,903	24	2,6
4 0,602	0	4,6
2 0,301	0	4,7

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5h** e valor de IC₅₀.

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5i**.

IC: inibição do crescimento parasitário
a: dados correspondentes a média da triplicata
DP: desvio padrão

Figura 70. Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5i** e valor de IC₅₀.

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5j**.

IC: inibição do crescimento parasitário
a: dados correspondentes a média da triplicata
DP: desvio padrão

Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **5j** e valor de IC₅₀.

Anexo 9

**Curva dose-resposta da inibição de crescimento parasitário
em diferentes concentrações do composto-protótipo
nifuroxazida**

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco NF.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
180	2,255	67
160	2,204	65
140	2,146	62
120	2,079	48
100	2,000	41
90	1,954	37
80	1,903	28
70	1,845	25
60	1,778	16
50	1,699	10
45	1,653	10
40	1,602	6
35	1,544	3
30	1,477	2
25	1,398	1
20	1,301	0
17,5	1,243	0
15	1,176	0

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

NF: nifuroxazida

Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco nifuroxazida e valor de IC_{50} .

Anexo 10

**Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário
em diferentes concentrações dos fármacos de referência,
benznidazol e nifurtimox**

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco **BZ**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50	1,699	89
20	1,301	54
10	1,000	30
4	0,602	18
2	0,301	11

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

BZ: benznidazol

Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco benznidazol e valor de IC₅₀.

Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco **NFX**.

Concentração (μM) (log μM)	IC ^a (%)	DP
50	1,699	100
20	1,301	100
10	1,000	97
8	0,903	93
6	0,778	86
4	0,602	65
3	0,477	50
2	0,301	35
1,5	0,176	26

IC: inibição do crescimento parasitário

a: dados correspondentes a média da triplicata

DP: desvio padrão

NFX: nifurtimox

Curva dose-resposta da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco nifurtimox e valor de IC₅₀.

Anexo 11

Representação gráfica dos confôrmeros e suas energias totais da simulação de dinâmica molecular

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confôrmeros do composto-protótipo **NF**, resultante da simulação de DM (1ns, 301 K) *versus* a energia total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição das energias de interação de: E_{STRETCH} (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E_{1-4} (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{VDW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática).

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros do composto **5a** da **série II**, resultante da simulação de DM (1ns, 301 K) *versus* a energia total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição das energias de interação de: E_{STRETCH} (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E_{1-4} (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{vdW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática).

Anexo 12

**Propriedades calculadas e obtidas em literatura
dos compostos das séries I e II**

Compostos (R)		log 1/C <i>T. cruzi</i>	E _{TOT}	E _{solv}	E _{lig H}	E _{HOMO}	E _{LUMO}	GAP	μ	ChelpG_ O 9/1	ChelpG_ O 1/10	ChelpG_ N 7/4	ChelpG_ N 8/3	ChelpG_ N 5/11	ChelpG_ C 13/17	ChelpG_ C 5/9	ClogP _{SG-SLN}	ClogP _{SV}	ClogP _{MB}	I _{Platt}	I _{Randic}
		y	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	x9	x10	x11	x12	x13	x14	x15	x16	x17	x18	x19
4n	NF	3.36	16.29	-10.89	0.49	-220.92	-24.27	-196.66	13.19	-0.67	-0.44	-0.36	-0.23	0.62	0.71	0.40	0.43	2.92	1.75	90.00	13.43
4a	H	4.77	13.65	-10.18	0.46	-220.83	-24.30	-196.53	14.52	-0.65	-0.43	-0.33	-0.24	0.63	-0.05	0.37	0.70	3.21	2.05	88.00	12.89
4b	CH ₃	4.87	14.16	-11.14	0.46	-219.81	-23.49	-196.33	15.06	-0.65	-0.44	-0.33	-0.24	0.62	0.31	0.39	1.18	3.67	2.57	100.00	14.11
4c	CN	4.36	17.27	-11.72	0.04	-225.94	-28.51	-197.43	10.99	-0.63	-0.43	-0.33	-0.25	0.63	-0.01	0.38	0.57	3.24	1.91	90.00	13.43
4d	OCH ₃	4.86	15.91	-11.87	0.46	-219.81	-23.27	-196.53	13.77	-0.68	-0.44	-0.39	-0.22	0.62	0.67	0.39	0.68	5.66	1.89	102.00	14.58
4e	Cl	4.86	25.48	-16.12	-0.01	-223.13	-26.17	-196.97	12.76	-0.65	-0.44	-0.34	-0.24	0.62	0.20	0.40	1.36	3.72	2.66	88.00	12.89
4f	NO ₂	4.49	18.63	-9.03	0.45	-229.53	-43.67	-185.85	9.80	-0.62	-0.43	-0.35	-0.25	0.62	0.12	0.39	-1.56	3.16	1.99	94.00	13.81
4g	C ₄ H ₉	5.46	21.10	-12.66	0.46	-219.42	-22.78	-196.64	15.15	-0.67	-0.44	-0.37	-0.22	0.61	0.38	0.39	2.55	4.86	3.90	136.00	17.86
4h	CF ₃	4.87	16.81	-11.14	0.46	-226.01	-28.41	-197.60	11.07	-0.63	-0.44	-0.33	-0.24	0.62	-0.21	0.39	1.64	4.09	2.93	100.00	14.11
4i	Br	4.95	16.98	-11.14	0.46	-211.51	-6.92	-204.58	11.46	-0.56	-0.37	-0.35	-0.21	0.53	0.00	0.34	1.44	4.00	2.82	88.00	12.89
4j	I	5.08	10.99	-13.20	-1.97	-211.46	-6.97	-204.49	11.74	-0.56	-0.36	-0.33	-0.21	0.54	-0.03	0.33	1.27	4.46	2.98	88.00	12.89
5a	H	4.47	19.03	-8.33	0.00	-191.36	36.05	-227.41	5.57	-0.50	-0.17	-0.60	0.00	1.00	-0.09	0.02	0.38	3.43	2.36	114.00	15.03
5b	CH ₃	4.51	16.67	-7.48	0.00	-206.24	5.57	-211.81	6.72	-0.56	-0.25	-0.55	-0.27	0.57	0.27	0.26	0.87	3.90	2.87	126.00	16.25
5c	CN	4.39	16.67	-8.47	0.00	-221.04	1.00	-222.04	7.22	-0.56	-0.26	-0.52	-0.28	0.57	-0.01	0.27	0.26	3.47	2.21	116.00	15.57
5d	OCH ₃	4.55	21.72	-9.02	0.00	-202.72	5.11	-207.84	6.20	-0.56	-0.27	-0.56	-0.26	0.54	0.62	0.29	0.36	3.18	2.20	128.00	16.72
5e	Cl	4.46	18.28	-9.18	0.00	-214.17	3.04	-217.20	6.40	-0.55	-0.26	-0.54	-0.26	0.56	0.07	0.27	1.04	3.95	2.96	114.00	15.03
5f	NO ₂	4.38	23.66	-13.41	0.00	-231.63	-33.80	-197.83	9.34	-0.56	-0.25	-0.51	-0.26	0.55	0.27	0.27	-1.88	3.39	2.30	120.00	15.95
5g	C ₄ H ₉	4.62	22.09	-6.29	0.00	-205.32	5.81	-211.13	6.75	-0.57	-0.27	-0.56	-0.26	0.54	0.30	0.29	2.23	5.09	4.21	162.00	20.00
5h	CF ₃	4.52	20.98	-9.94	0.00	-221.71	1.88	-223.59	6.61	-0.57	-0.26	-0.52	-0.28	0.56	-0.18	0.27	1.32	4.31	3.24	126.00	16.25
5i	Br	4.60	18.53	-8.47	0.00	-210.94	2.72	-213.65	6.30	-0.57	-0.25	-0.54	-0.27	0.56	-0.03	0.27	1.13	4.22	3.13	114.00	15.03
5j	I	4.57	18.36	-8.46	0.00	-207.07	3.32	-210.39	6.41	-0.58	-0.25	-0.54	-0.29	0.56	-0.05	0.28	0.96	4.69	3.29	114.00	15.03

log1/C *T. cruzi*: atividade frente ao *T. cruzi* (log1/C), E_{TOT}: energia potencial total, E_{solv}: contribuição de energia de solvatação, E_{lig H}: contribuição de energia de ligação H, E_{HOMO}: energia do orbital de fronteira HOMO (eV), E_{LUMO}: energia do orbital de fronteira LUMO (eV), GAP: diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO}, μ: momento de dipolo (debye), CHELPG _O9/1: carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio carbonílico para série I e do oxigênio do anel oxadiazolínico para série II, CHELPG _O1/10: carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio do anel furânico para as séries I e II, CHELPG _N7/4: carga do potencial eletrostático do átomo de nitrogênio de ligação N=C na porção azometínica para série I e no anel oxadiazolínico para série II, CHELPG _N8/3: carga do potencial eletrostático do átomo de nitrogênio de ligação N-H na porção amídica para série I e no anel oxadiazolínico para série II, CHELPG _N5/11: carga do potencial eletrostático do átomo de nitrogênio do grupo nitro ligado ao anel furânico para as séries I e II, CHELPG _N13/17: carga do potencial eletrostático do átomo de carbono do anel benzênico realizando ligação com substituintes na posição 4 para as séries I e II, CHELPG _N5/9: carga do potencial eletrostático do átomo de carbono do anel furânico ligado ao grupo nitro para as séries I e II, ClogP_{SG-SLN}: coeficiente de partição calculado pelo método GHOSE et al., 1998 - SLN, ClogP_{SV}: coeficiente de partição calculado pelo método VISVANADHAN et al., 1989, ClogP_{MB}: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISVANADHAN et al., 1989, KLOPMAN et al., 1993 e PHYSPROP© database, I_{Platt}: índice que descreve a soma dos graus de contorno da superfície molecular, I_{Randic}: índice que descreve a soma harmônica das médias geométricas dos graus dos vértices.

Compostos (R)		I _{Balaban}	I _{Harary}	I _{Hiper Wiener}	I _{Szeged}	I _{Wiener}	Dreiding	PSA	V _W	ASA	ASA+	ASA-	ASA_h	ASA_p	π	σ	F	R	L	B1	B5	MR
		x20	x21	x22	x23	x24	x25	x26	x27	x28	x29	x30	x31	x32	x33	x34	x35	x36	x37	x38	x39	x40
4n	NF	1.59	61.58	3,968.00	1,244.00	981.00	168.13	120.65	384.04	515.39	269.13	246.27	281.81	233.59	-0.67	-0.37	0.33	-0.70	2.74	1.35	1.93	0.29
4a	H	1.43	57.13	3,271.00	1,055.00	845.00	162.39	100.42	336.99	508.26	264.04	244.22	319.23	189.03	0.00	0.00	0.00	0.00	2.06	1.00	1.00	0.10
4b	CH ₃	1.59	61.58	3,968.00	1,244.00	981.00	164.19	100.42	369.24	549.36	297.55	251.81	360.34	189.02	0.56	-0.17	0.01	-0.18	2.87	1.52	2.04	0.57
4c	CN	1.51	65.80	4,821.00	1,453.00	1,137.00	164.83	124.21	354.98	520.63	264.18	256.45	292.15	228.48	-0.57	0.66	0.51	0.15	4.23	1.60	1.60	0.63
4d	OCH ₃	1.51	65.80	4,821.00	1,453.00	1,137.00	173.93	109.65	385.04	575.11	360.99	214.12	367.92	207.19	-0.02	-0.27	0.29	-0.56	3.98	1.35	3.07	0.79
4e	Cl	1.59	61.58	3,968.00	1,244.00	981.00	161.31	100.42	353.58	525.51	252.82	272.69	336.47	189.04	0.71	0.23	0.42	-0.19	3.52	1.80	1.80	0.60
4f	NO ₂	1.46	70.52	5,677.00	1,664.00	1,295.00	206.66	146.24	379.90	559.63	295.21	264.42	286.95	272.68	-0.28	0.78	0.65	0.13	3.44	1.70	2.44	0.74
4g	C ₄ H ₉	1.56	73.99	7,080.00	1,935.00	1,513.00	172.00	100.42	460.97	640.11	381.34	258.76	451.58	188.53	2.13	-0.16	-0.01	-0.15	6.17	1.52	4.54	1.96
4h	CF ₃	1.62	75.75	6,536.00	1,877.00	1,455.00	165.38	100.42	386.43	558.88	251.92	306.97	266.37	292.52	0.88	0.54	0.38	0.16	3.30	1.99	2.61	0.50
4i	Br	1.59	61.58	3,968.00	1,244.00	981.00	160.84	100.42	357.58	530.28	253.18	277.10	341.00	189.04	0.86	0.23	0.45	-0.22	3.82	1.95	1.95	0.89
4j	I	1.59	61.58	3,968.00	1,244.00	981.00	160.68	100.42	363.10	536.71	240.61	296.10	347.68	189.03	1.12	0.18	0.42	-0.24	4.23	2.15	2.15	1.39
5a	H	1.64	76.62	3,612.00	1,408.00	1,051.00	110.76	100.86	382.66	520.43	310.47	209.97	364.99	155.44	0.00	0.00	0.00	0.00	2.06	1.00	1.00	0.10
5b	CH ₃	1.56	81.51	4,338.00	1,636.00	1,204.00	158.19	100.86	422.47	580.61	379.58	201.03	417.48	163.13	0.56	-0.17	0.01	-0.18	2.87	1.52	2.04	0.57
5c	CN	1.48	86.12	5,240.00	1,887.00	1,380.00	164.19	124.65	408.63	552.80	311.96	240.84	349.50	203.30	-0.57	0.66	0.51	0.15	4.23	1.60	1.60	0.63
5d	OCH ₃	1.48	86.12	5,240.00	1,887.00	1,380.00	199.02	110.09	433.60	594.82	385.85	208.97	413.11	181.71	-0.02	-0.27	0.29	-0.56	3.98	1.35	3.07	0.79
5e	Cl	1.56	81.51	4,338.00	1,636.00	1,204.00	156.77	100.86	406.85	557.18	308.08	249.10	394.05	163.13	0.71	0.23	0.42	-0.19	3.52	1.80	1.80	0.60
5f	NO ₂	1.42	91.23	6,145.00	2,140.00	1,558.00	289.99	146.68	434.84	593.39	348.40	244.99	342.36	251.04	-0.28	0.78	0.65	0.13	3.49	1.70	2.44	0.74
5g	C ₄ H ₉	1.55	94.97	7,669.00	2,462.00	1,805.00	177.63	100.86	511.20	659.79	426.59	233.20	496.66	163.13	2.13	-0.16	-0.01	-0.15	6.17	1.52	4.54	1.96
5h	CF ₃	1.60	96.84	7,053.00	2,395.00	1,738.00	161.27	100.86	438.74	589.18	307.09	282.09	322.73	266.45	0.88	0.54	0.38	0.16	3.30	1.98	2.61	0.50
5i	Br	1.56	81.51	4,338.00	1,636.00	1,204.00	155.56	100.86	410.84	561.88	294.91	266.97	398.75	163.13	0.86	0.23	0.45	-0.22	3.82	1.95	1.95	0.89
5j	I	1.56	81.51	4,338.00	1,636.00	1,204.00	155.31	100.86	416.29	568.15	295.20	272.94	405.01	163.13	1.12	0.18	0.42	-0.24	4.23	2.15	2.15	1.39

I_{Balaban}: índice que descreve a média da somatória da distância de conectividade da molécula, I_{Harary}: índice que descreve a metade da somatória da diagonal externa, distância matricial recíproca, dos elementos da molécula, I_{Hiper Wiener}: descreve uma variação do índice de Wiener, I_{Szeged}: estende o índice de Wiener para gráficos cíclicos pela contagem do número de átomos em ambos os lados de cada ligação (considera aqueles átomos que estão mais perto de um lado da ligação do que do outro), I_{Wiener}: índice que descreve a distância atômica topológica média (metade da soma de todas as distâncias atômicas) na molécula, *Dreiding*: energia relacionada com a estabilidade da conformação da molécula (kcal/mol), PSA: área de superfície polar, V_W: volume de Van der Waals (Å²), ASA: superfície acessível a solvente, calculada usando o raio do solvente (1,4 Å para a molécula de água) (Å²), ASA+: superfície acessível a solvente de todos os átomos com carga parcial positiva (Å²), ASA-: superfície acessível a solvente de todos os átomos com carga parcial negativa (Å²), ASA_h: superfície acessível a solvente de todos os átomos hidrofóbico (Å²), ASA_p: superfície acessível a solvente de todos os átomos hidrofílicos (Å²), π : constante de hidrofobicidade π de Hansch, σ : constante σ de Hammett, F: constante de efeito indutivo de Swain e Lupton, R: constante de efeito de ressonância de Swain e Lupton, MR: refratividade molar da molécula (10⁶ [m³ mol⁻¹]), L, B1 e B5: parâmetros de STERIMOL, desenvolvidos por Verloop, MR: refratividade molar do grupo substituinte.