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

Pró-fármacos de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos
Planejamento, síntese e determinação da atividade antichagásica dos
ligantes

Márcia Maria Afonso Lima Dias

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares

São Paulo
2005

18.291

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011261

Ficha Catalográfica

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

Dias, Márcia Maria Afonso Lima
D541f Pró-fármacos de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos
planejamento, síntese e determinação da atividade antichagásica
dos ligantes / Márcia Maria Afonso Lima Dias. -- São
Paulo, 2005.
 lv.(paginação irregular)

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

Orientador: Costa, Leoberto

1. Latenciação : Química farmacêutica 2. Doença de
Chagas : Quimioterapia 3. Fármaco : Síntese : Química
farmacêutica I. T. II. Costa, Leoberto, orientador.

615.19 CDD

Márcia Maria Afonso Lima Dias

Pró-fármacos de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos

**Planejamento, síntese e determinação da atividade antichagásica dos
ligantes**

**Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares
Orientador/ Presidente**

**Profa. Tit. Maria Júlia Manso Alves
1º. Examinador**

**Profa. Dra. Veni Andres Felli
2º. Examinador**

São Paulo, 17 de outubro de 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

CERTIFICADO DE DEFESA

Certifico, para os devidos fins, que o(a) Sr(a). **Márcia Maria Afonso Lima Dias** defendeu em sessão pública no dia 17 de outubro de 2005, a dissertação intitulada: "Pró-fármacos de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos planejamento, síntese e determinação da atividade antichagásica dos ligantes", tendo sido aprovado(a), fazendo jus ao título de **Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica**.

São Paulo, 17 de outubro de 2005.

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FCF/USP

Dedico este trabalho:

*À minha PEQUENA-GRANDE
família, cujo amor me fortalece,
protege e guia.*

*À Silvia E. Julião e Rodrigo Secco,
colegas de laboratório que deram os
primeiros passos na execução
deste trabalho.*

Agradecimentos

- *Ao Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares, pela orientação deste trabalho.*
- *À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela oportunidade de realização deste trabalho.*
- *A mestre Maria das Graças Baptista dos Santos, pela ajuda na execução dos ensaios biológicos e revisão de alguns textos.*
- *Aos colegas de laboratório, Andréa Masunari, Fábio Levi Lopes do Nascimento, Marcos Furlaneto e Vanderson Galan, que contribuíram para o bom andamento deste trabalho.*
- *À Profa. Dra. Márcia da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, por mostrar-me o caminho da pesquisa.*
- *Aos meus amigos que a despeito da distância física e de algumas ausências sempre manifestaram apoio às minhas buscas, compartilhando os bons momentos e ajudando-me nos momentos de dúvida e dificuldade.*
- *À Andréa, AMIGA, com quem compartilhei angústias, alegrias, temores, esperanças neste período de convivência fraterna exemplo como profissional mas sobretudo como pessoa.*
- *À Profa. Tit. Maria Júlia Manso Alves, do Instituto de Química da USP, pela coordenação dos ensaios biológicos e disponibilização de seus laboratórios e materiais, principalmente pela cepa Y de Trypanosoma cruzi, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.*
- *A mestre Marinei F. Gonçalves, pelos ensinamentos passados e atenção dispensada durante a realização dos ensaios.*

-
- *À Profa. Tit. Thereza Christina Vessoni Penna e ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr., pela disponibilização de seus laboratórios para realização dos ensaios com formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.*
 - *A Dra. Carlota O. Rangel Yagui e a Helen W. L. Hsu, pela ajuda na manutenção da cepa de *Trypanosoma cruzi*.*
 - *A Dra. Maria Inês de Almeida Gonçalves, pela execução dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.*
 - *À Profa. Dra. Veni F. Nakasone, pela disposição com que esclareceu dúvidas das análises espectrométricas realizadas.*
 - *À Profa. Chung Man Chin, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela doação dos aminoácidos BOC-alanina e BOC-fenilalanina, pela gentileza e disposição com que esclareceu dúvidas quanto à utilização destes.*
 - *As bibliotecárias do Conjunto das Químicas pela revisão das referências bibliográficas e constante auxílio na localização de livros e periódicos.*
 - *À FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro.*
 - *A todos que, de uma forma ou de outra, participaram comigo nesta jornada e contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.*

Sumário

INDICE

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	3
JUSTIFICATIVA	4
REVISÃO DE LITERATURA	6
1. Doença de Chagas	6
1.1. Aspectos Gerais	6
1.2. Epidemiologia	15
1.3. Tratamento Quimioterápico e Perspectivas	20
2. Modificação Molecular	28
2.1. Processos Gerais	31
2.2. Processos Especiais	32
2.3. Processos de Otimização	33
3. Compostos nitro-heterocíclicos	38
MATERIAIS E MÉTODOS	46
1. Materiais	46
1.1. Regentes e solventes	46
1.2. Equipamentos	47
2. Métodos	47
2.1. Planejamento e síntese dos compostos 5-nitro-2-tiofilidênicos.....	47

2.1.1. Planejamento das séries	47
2.1.2. Método de obtenção dos compostos de partida:	
5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida <i>p</i> -substituída	48
2.2. Modificação Molecular em 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas, com vista à obtenção de pró-fármaco com atividade antichagásica.....	50
2.2.1. Obtenção das oxadizolinas 3-acetil-2,5-substituídas: derivados ciclizados de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida <i>p</i> -substituídas – Série I	52
2.2.2. Método de síntese empregada na obtenção da Série II: Acoplamento do agente espaçante	52
<i>Rota 1 Obtenção do dipeptídeo Serina-alanina</i>	
1. Obtenção do éster metílico da alanina	52
2. Obtenção do dipeptídeo Serina-alanina	53
<i>Rota 2 Acoplamento da alanina aos derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos</i>	
1. Ligação Direta	54
2. Formação do sal sódico de derivados 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida	55
3. Acoplamento do BOC-L-Ala aos derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos	55
4. Acoplamento de derivados 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida a Ala-Cl gerado <i>in situ</i>	56
2.3. Ensaio de atividade biológica com as formas epimastigota da cepa Y de <i>T.</i> <i>cruzi</i>	57
2.3.1. Preparo do inóculo	57
2.3.2. Preparo da solução-mãe dos compostos a serem testados	57
2.3.3. Preparo do ensaio	58
2.3.4. Leitura do ensaio	58

RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
1. Planejamento e síntese dos compostos 5-nitro-2-tiofilidênicos	61
1.1. Planejamento das séries	61
1.2. Método de obtenção dos compostos de partida:	
5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida <i>para</i> -substituída	63
2. Modificação Molecular em 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas, com vista à obtenção de pró-fármaco com atividade antichagásica	66
Série I – Obtenção das oxadizolinas 3-acetil-2,5-substituídas: derivados ciclizados de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida <i>p</i> -substituídas	66
Série II - Acoplamento do agente espaçante	71
<i>Rota 1: Obtenção do dipeptídeo Serina-alanina</i>	71
<i>Rota 2: Tentativa de obtenção do derivado 5-nitro-2-tiofilidênico ligado a alanina</i>	79
2.1. Ligação Direta do aminoácido ao ligante	80
2.2. Ativação do ligante por meio da formação do sal sódico	81
3. Ensaio Biológico	83
CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXO	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas epimastigotas, tripomastigota e amastigota de <i>T. cruzi</i> e suas diferenciações	8
Figura 2. Ciclo biológico da Doença de Chagas	9
Figura 3. <i>Triatoma infestans</i> , conhecido popularmente como “barbeiro”	11
Figura 4. <i>Sinal de Romaña</i>	14
Figura 5. Chagoma de Inoculação	14
Figura 6. Distribuição Geográfica da Doença de Chagas	16
Figura 7. Incidência da Doença de Chagas nos países do Cone Sul frente a implementação de medidas de prevenção a transmissão vetorial e sanguínea	18
Figura 8. Estrutura química do benznidazol e nifurtimox	21
Figura 9. Estrutura química do alopurinol e megazol	24
Figura 10. Estrutura química de imidazóis usados no tratamento da Doença de Chagas	24
Figura 11. Estrutura química de derivado triazol – D0870	25
Figura 12. Fases limitantes da ação do fármaco	29
Figura 13. Alguns exemplos de compostos utilizados na terapêutica obtidos por processos de Associação Molecular.....	32
Figura 14. Estrutura química de fármacos obtidos por Processos Especiais de modificação molecular	33
Figura 15. Ilustração esquemática do conceito de pró-fármaco	35
Figura 16. Mecanismo de endocitose e ativação de pró-fármaco	36
Figura 17. Estrutura química do ácido siálico	38
Figura 18. Estrutura do nitrofural	38

Figura 19. Alguns compostos 5-nitrofurânicos utilizados na terapêutica	39
Figura 20. Estrutura mínima necessária para o desempenho de atividade antimicrobiana de compostos derivados do 5-nitrofurânicos	40
Figura 21. Via biorredutiva dos nitrocompostos aromáticos	41
Figura 22. Estrutura química de compostos análogos à nifuroxazida	44
Figura 23. Rotas de síntese utilizadas na obtenção de derivados 5-nitro-2-tiofilidêno benzidrazidas para-substituídas	51
Figura 24. Diagrama de Craig	62
Figura 25. Mecanismo da reação de ciclização	76
Figura 26. Reação de amidificação via <i>N,N</i> -diclohexilcarbodiimida (DCC)	72
Figura 27. Estrutura química do 1-hidroxibenzotriazol (HOBt)	73
Figura 28. Esquema de reação de obtenção do dipeptídeo Ser-Ala	74
Figura 29. Número de formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> / mL em concentrações variadas de DMSO	99
Figura 30. Figura 29: Forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> em meio LIT.....	102
Figura 31. Forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> em divisão	102
Figura 32. <i>T. cruzi</i> mortos após ação do compostos 5-nitro-2-tiofilidêno 4-bromobenzidrazida	102
Figura 33. Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> deformadas após a introdução dos compostos 5-nitro-2-tiofilidênicos.....	103
Figura 34. <i>T. cruzi</i> em forma de rosáceas	103
Figura 35. Diferenças morfológicas entre as formas epimastigotas encontrados durante os testes realizados	104
Figura 36. Forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> deformadas e mortas após a introdução do composto 5-nitro-2-tiofilidêno 4-hidroxibenzidrazida.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento da reação de formação da ligação imino e faixa de fusão de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	65
Tabela 2. Principais bandas de absorção ν (cm^{-1}) na região do infravermelho de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	65
Tabela 3. Principais sinais de RMN ¹ H (ppm) em DMSO-d ₆ 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	66
Tabela 4. Rendimento e faixa de fusão de oxadiazolina 3-acetil-2,5-tiofilidêno benzidrazida 4-substituída	69
Tabela 5. Número médio de formas epimastigota/ mL após exposição ao 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida	87
Tabela 6. Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 5-nitro-2-tiofilideno 4-bromobenzidrazida	88
Tabela 7: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 5-nitro-2-tiofilideno 4-clorobenzidrazida.....	89
Tabela 8: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 5-nitro-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida	90
Tabela 9: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 5-nitro-2-tiofilideno 4-cianobenzidrazida	91
Tabela 10: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilidêno 4-hidroxibenzidrazida	92
Tabela 11: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilidêno benzidrazida	93
Tabela 12: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilidêno 4-bromobenzidrazida	94
Tabela 13: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilidêno 4-clorobenzidrazida	95

Tabela 14: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilidêno 4-metilbenzidrazida	96
Tabela 15: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilidêno 4-cianobenzidrazida	98
Tabela 16: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilidêno 4-hidroxibenzidrazida	98
Tabela 17: Concentração (mg/mL) responsável por morte celular no período de 24 horas dos compostos de partida e da Série I.....	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Investimento aplicados na interrupção da transmissão da Doença de Chagas	19
Quadro 2. Principais sinais de RMN ¹ H (ppm) em DMSO-d ₆ oxadiazolina 3-acetil-2,5-tiofilidêno benzidrazida 4-substituída	70
Quadro 3 .Principais sinais de RMN ¹ H (ppm) em DMSO-d ₆ do metil éster da alanina	75
Quadro 4. Principais sinais de RMN ¹ H (ppm) em DMSO-d ₆ do dipeptideo Ser-Ala.	78
Quadro 5. Principais sinais de RMN ¹ H (ppm) em DMSO-d ₆ do dipeptideo Ser-Ala após coluna cromatográfica.....	79

ESTRUTURAS QUÍMICAS

5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida
(5-NTB)

5-nitro-2-tiofilideno p-bromobenzidrazida
(5-NTB-Br)

5-nitro-2-tiofilideno p-clorobenzidrazida
(5-NTB-Cl)

5-nitro-2-tiofilideno p-metilbenzidrazida
(5-NTB-Me)

5-nitro-2-tiofilideno p-cianobenzidrazida
(5-NTB-CN)

5-nitro-2-tiofilideno p-hidroxibenzidrazida
(5-NTB-OH)

3-acetil-2,5-tiofilideno benzidrazida
(OXA)

3-acetil-2,5-tiofilideno p-bromobenzidrazida
(OXA-Br)

3-acetil-2,5-tiofilideno p-clorobenzidrazida
(OXA-Cl)

3-acetil-2,5-tiofilideno p-metilbenzidrazida
(OXA-Me)

3-acetil-2,5-tiofilideno p-cianobenzidrazida
(OXA-CN)

3-acetil-2,5-tiofilideno p-hidroxibenzidrazida
(OXA-CN)

BOC-benzil-Serina
(BOC-Bzl-Ser)

Alanina
(Ala)

BOC-Alanina
(BOC-Ala)

1-hidroxibenzotriazol
(HOBT)

diciclohexilcarbodiimida
(DCC)

Introdução

A Doença de Chagas apresenta-se como um dos mais graves problemas de saúde dos países latino-americanos afetando, principalmente, a população das áreas rurais submetidas à miséria, característica do subdesenvolvimento econômico, revelando uma realidade para qual não tem se dado a atenção necessária (BATISTA *et al.*, 1996). Atualmente, cerca de 18 a 20 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* e aproximadamente 40 milhões estão expostas ao risco de contrair a doença (VINHAES, 2003; World Health Organization – WHO, 2004).

A moléstia de Chagas é uma das poucas doenças infecciosas, dentre as grandes endemias brasileiras que não tem tratamento eficiente (BATISTA *et al.*, 1996). Esta situação pode ser explicada, em parte, pela deteriorização do sistema de saúde, diversidades sócio-econômicas e desordem ecológica causada pelo desmatamento que deslocaliza o parasita de seu nicho natural, facilitando assim a transmissão da doença (ROMAÑA *et al.*, 2003).

Não se pode deixar de mencionar a política adotada pelas indústrias farmacêuticas, não desenvolvendo pesquisas para busca de novos fármacos para o combate às doenças tropicais – uma vez que os investimentos são altos e os medicamentos seriam consumidos por países em desenvolvimento, não havendo, portanto, segurança de retorno financeiro. No período de 1975 a 1994, dos 1061 fármacos desenvolvidos, menos de 2,7% deles foram direcionados ao tratamento de doenças tropicais (TROUILLER *et al.*, 2000).

Os dois únicos fármacos disponíveis no mercado para tratamento são nitroderivados, eficientes na diminuição da parasitemia, mas não produzem cura parasitológica. Para que estes fármacos ajam intracelularmente de maneira efetiva seriam necessárias doses que atingiriam níveis tóxicos (IANNI *et al.*, 1998).

Frente a essa necessidade premente de fármacos mais efetivos no combate a essa moléstia, uma das alternativas que os químicos-farmacêuticos têm em mãos, é explorar a atividade de fármacos em uso ou de substâncias que se mostrem promissoras pela aplicação de processos de modificação molecular.

Nos métodos de modificação molecular busca-se diminuir ou até mesmo suprimir as características indesejáveis dos compostos sem alterar as propriedades biológicas, por meio de alterações estruturais, como por exemplo introdução ou retirada de duplas ligações, de anéis, acoplamento de moléculas transportadoras com ou sem atividade, entre outras (KOROLKOLVAS, 1988; FOYE, 1995).

Neste sentido, este trabalho se volta para o planejamento, a síntese e avaliação da atividade antichagásica de análogos a nifuroxazida, *5-nitro-2-fufurilideno 4-hidroxibenzidrazida*, obtidos por duas vias de modificação molecular - Série I e Série II - visando a preparação e avaliação de melhores ligantes para o desenvolvimento de fármacos dirigidos as enzimas trans-sialidases de *T. cruzi*, esperando-se obter, com isso, novas alternativas para o tratamento da Doença de Chagas.

Objetivo

Este trabalho tem como objetivo o planejamento, síntese e determinação da atividade antiparasitária de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos, obtidos por duas vias de modificação molecular – Séries I e II - como primeira etapa no desenvolvimento de pró-fármacos dirigidos específicos à enzima trans-sialidase de *T. cruzi* (TsTc).

Nesta primeira etapa, além da preparação dos ligantes derivados 5-nitro-tiofilidênicos, busca-se avaliar a influência destas modificações moleculares na atividade antichagásica nesses compostos, a fim de estabelecer bases físico-químicas para o planejamento de fármacos mais eficientes no tratamento da Doença de Chagas.

Justificativa

A quimioterapia permanece ainda como o método mais simples, mais efetivo e mais barato para se controlar muitas infecções, dentre elas a Doença de Chagas. Seu êxito, entretanto, não é absoluto, fazendo-se necessária a busca do seu aperfeiçoamento. Deste, faz parte a busca por novos e melhores fármacos com atividade antichagásica.

A procura por melhores fármacos para o combate a Doença de Chagas esbarra na grande semelhança encontrada entre as células parasitadas e o protozoário, o que torna as moléculas disponíveis para o tratamento extremamente tóxicas. Para minimizar os efeitos dessas semelhanças procura-se, hoje, o desenvolvimento de inibidores para alvos específicos do *Trypanosoma cruzi*.

Neste sentido pode-se lançar mão do uso de moléculas dirigidas com o desenvolvimento de pró-fármacos. A latenciação, processo de modificação molecular que visa a preparação de pró-fármaco, permite a otimização da liberação da molécula ativa por meio da ligação de um transportador, que a leva especificamente ao local de ação (CHUNG & FERREIRA, 1999).

A enzima trans-sialidase de *T. cruzi*, TSTc, apresenta-se como alvo interessante para o desenvolvimento de pró-fármacos, já que diferem das sialidases encontradas nas células eucarióticas por utilizarem vias bioquímicas distintas. As TSTc são responsáveis pela captura de ácido siálico do organismo hospedeiro, uma vez que esse protozoário é incapaz de sintetizá-lo (VANDEKERCKHO *et al.*, 1992; CROSS *et al.*, 1993; LUO *et al.*, 1999; JACOBS *et al.*, 2001; PREVIATO *et al.*, 2003).

A atividade anti-protozoária de compostos 5-nitro-heterocíclicos é conhecida a décadas, porém seus severos e constantes efeitos tóxicos restringem a utilização de seus medicamento, é o caso, por exemplo, da nitrofurazona, primeiro derivado 5-nitro-furânico com atividade antichagásica, mas que, a par de sua atividade, teve seu uso descontinuado em função dos seus efeitos tóxicos. Assim, um derivado do ácido siálico, que obedeça a especificidade das TSTc, unido a derivados 5-nitro-tiofilidêncios

com atividade antichagásica, dando origem a fármaco dirigido, abrindo caminho na busca de fármacos mais eficientes para o combate a Doença de Chagas.

Revisão de Literatura

1. DOENÇA DE CHAGAS

1.1. Aspectos Gerais

A Doença de Chagas, Tripossomíase americana ou Esquizotripanose, é uma parasitose exclusiva do continente americano causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*, que utiliza como vetor o inseto hematófago pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae; vulgarmente conhecido pelo nome de barbeiro ou chupão (RASSI, *et al.*, 1991; Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, 2001). Estes insetos têm hábitos noturnos e se alimentam obrigatoriamente de sangue. Durante o dia se abrigam em frestas nas paredes, tetos construídos de palha, atrás de móveis, em paióis, galinheiros e currais (RASSI *et al.*, 1991).

A Tripossomíase Americana era uma infecção exclusiva de animais silvestres, porém, com a migração humana dirigida à áreas nativas, o inseto encontrou ambiente propício à domiciliação e permanência junto aos homens, abrigo-se nas frestas de habitações construídas precariamente (GUHL *et al.*, 2000). Além disso, animais silvestres, que são reservatórios naturais do parasita, foram forçados com o desmatamento a se dirigirem para zona urbana e periurbana, impelindo, assim, os triatomíneos a adaptarem-se a fontes alternativas de alimentos como cães, gatos, ratos e porcos que convivem próximo aos humanos. Dessa forma, o homem passou também, a servir como fonte de repasto sanguíneo para estes insetos, transformando a doença em uma antroponose (FUNASA, 2001).

O *T. cruzi* é um protozoário da ordem Kinetoplastida, classe Mastigophora, família Trypanomatidae. Caracteriza-se pela presença de um flagelo e uma organela especial denominada cinetoplasto – uma mitocôndria modificada rica em DNA. Esse DNA extra-nuclear se constitui como um dos parâmetros utilizados na caracterização bioquímica de diferentes cepas do parasita (LANA *et al.*, 2000).

Entre as cepas de *T. cruzi* observa-se diferenças que vão da morfologia a patogenicidade. Por exemplo, cepas que apresentam formas tripomastigotas delgadas são mais infectantes para células, desenvolvendo parasitemia precoce e são mais

sensíveis à ação dos anticorpos circulantes; porém as que apresentam tripomastigotas mais largas são menos infectantes e mais resistentes aos anticorpos circulantes permanecendo mais tempo na corrente sanguínea (LANA *et al.*, 2000).

O ciclo biológico do parasita envolve vários processos de diferenciação dos quais se obtém três possíveis formas evolutivas (SOUZA, 1999a): forma tripomastigota, amastigota e epimastigota. Apresenta-se, na Figura 1, uma representação esquemática dessas formas e seus processos de diferenciação.

A identificação dessas formas faz-se pela posição relativa do cinetoplasto. As formas tripomastigotas que estão presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado apresentam essa organela e o flagelo em posição oposta ao núcleo; nas formas epimastigotas, adaptadas ao trato digestório do inseto, essas organelas estão próximas e nas formas amastigotas (intracelular) o flagelo é praticamente invisível (CONTRERAS *et al.*, 2002).

O ciclo de vida desse protozoário é bastante complexo, sendo necessária a presença de dois hospedeiros para o seu desenvolvimento, sendo um hospedeiro vertebrado para as formas tripomastigotas e amastigotas e um hospedeiro invertebrado – triatomíneo – para a formas epimastigotas (Figura 2).

O triatomíneo contamina-se com as formas tripomastigotas circulantes da corrente sanguínea do animal reservatório ou do indivíduo doente durante o repasto sanguíneo (1, Figura 2). Ao longo do tubo digestório o parasita sofre modificações passando a forma epimastigota e, finalmente, na porção terminal do reto, diferencia-se em tripomastigota que é a forma infectante para os vertebrados (2, Figura 2) (RASSI *et al.*, 1991).

Figura 1. Formas epimastigotas, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* e suas diferenciações.
(Ilustração adaptada de MEHLHORM, 1998)

Figura 2. Ciclo biológico da Doença de Chagas.

(<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm> acessado em 04/01/2005)

Os tripomastigotas são depositados na pele do hospedeiro juntamente com as fezes do inseto durante ou logo após o repasto sanguíneo (3, Figura 2). Essas formas não têm a capacidade de penetrar na pele íntegra; elas invadem o organismo através das mucosas e/ou do próprio orifício da picada (LANA *et al.*, 2000), ou ainda, por solução de continuidade da pele provocado pelo hospedeiro com o ato de coçar-se.

Assim que penetram na pele essas formas invadem o interior das células locais, principalmente as do tecido conjuntivo e do sistema reticular endotelial (SER), sofrem um processo de regressão, no qual perdem o flagelo (4, Figura 2) e transformam-se em células arredondadas denominadas amastigotas (LANA *et al.*, 2000).

Essa invasão das células do hospedeiro ocorre via fagocitose induzida ou endocitose (LANA *et al.*, 2000). A princípio o parasita e a célula passam por uma fase de adesão celular, na qual o contato membrana-membrana sinaliza o início de eventos bioquímicos que levam a emissão de pseudópodes pela célula formando um vacúolo

fagocitário ao redor do *T. cruzi*. Observam-se, por último, fenômenos intracelulares que facilitam o escape das formas tripomastigota que passam a viver livremente no citoplasma onde se diferenciam em amastigotas.

Componentes das membranas das células envolvidas, como por exemplo, enzimas e macromoléculas de superfície, são muito importantes nesse processo de interiorização do parasita, pois é a partir da interação de algumas dessas estruturas que os processos de adesão e invasão são ativados (LANA *et al.*, 2000).

As formas amastigotas se replicam no citoplasma por divisões binárias sucessivas e, ao fim de aproximadamente cinco dias, evoluem para as formas tripomastigotas que rompem as células liberando-os no interstício (5, Figura 2), ocorrendo assim, o espalhamento da infecção (RASSI *et al.*, 1991). Esse ciclo biológico se repete continuamente.

A principal forma de transmissão no Brasil, durante muitos anos, foi a vetorial, ou seja, através da picada do inseto transmissor (SOUZA, 1999b). Na década de 70 estimava-se que essa forma de veiculação da doença fosse responsável por 80% das infecções humanas (FUNASA, 2001). Essa forma de transmissão ocorre, em geral, por meio das fezes do vetor infectado com as formas tripomastigotas metacíclicas. A contaminação do hospedeiro vertebrado também pode ocorrer pela urina pura ou pela mistura desta com as fezes, já que os tubos de Malpighi que desembocam na luz intestinal do inseto podem ser invadidos pelos parasitas (LANA *et al.*, 2000).

São conhecidas hoje 118 espécies de triatomíneos, 42 destas foram identificados no Brasil e 30 já foram capturados em ambiente domiciliar (LOROSA *et al.*, 2003; SARQUI *et al.*, 2004). Cinco espécies têm especial importância na transmissão ao homem no Brasil: *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans* (Figura 3), *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* (FUNASA, 2001).

Figura 3. *Triatoma infestans*, conhecido popularmente como “barbeiro”
(<http://www.nib.unicamp.br/svol/chagas.htm> acessado em 26/10/01)

A grande mobilização de campanhas de combate a esse inseto fez com que o índice desse tipo de transmissão fosse reduzido, cedendo lugar à contaminação através do uso de sangue (e seus derivados) infectados e a transmissão por via congênita (CONTRERAS *et al.*, 1999; BLANCO *et al.*, 2000).

A transmissão da Doença de Chagas por transfusão sanguínea e pelo uso de produtos hemoderivados foi mencionada por Freitas e colaboradores em 1952 (PRATA, 1999). Essa forma de contágio se constitui como um mecanismo significativo de disseminação em diversos países latino-americanos e ganhou grande importância epidemiológica nas duas últimas décadas em função da migração de indivíduos infectados para os centros urbanos e pela ineficiência no controle das transfusões nos bancos de sangue (FUNASA, 2001). Em 1991 estimava-se que existiam aproximadamente de 15 a 18 milhões de indivíduos infectados por *T. cruzi*, 60% desses vivendo nas áreas urbanas, sendo que 50% deste grupo poderiam vir a ser doadores de sangue (LANA *et al.*, 2000).

O risco da transmissão sanguínea depende de cinco fatores. A saber: prevalência da infecção em doadores de sangue, grau de cobertura sorológica, sensibilidade dos testes usados, segurança de resultados obtidos e risco de infecção. No Brasil, medidas mais rígidas de controle e fiscalização dos serviços de coleta,

banco de sangue e produtos hemoderivados foram adotadas a partir de 1980 com a instituição do Programa Pró-Sangue (SOUZA, 1999b), diminuindo consideravelmente a contaminação por esta via.

A transmissão congênita pode ocorrer quando há formação de ninhos de amastigotas na placenta que permite que as formas tripomastigotas alcancem à circulação fetal. Fatores como tipo de cepas do parasita e lesões prévias da placenta podem facilitar essa passagem. Essa contaminação é passível de ocorrer durante toda gestação, podendo causar partos prematuros com bebês de baixo peso, natimortalidade e abortos (LANA *et al.*, 2000).

A prevalência da infecção por *T. cruzi* entre mulheres na idade fértil, segundo Pinto e colaboradores, varia entre 2% a 51% nas áreas urbanas da América Latina e entre 23% a 81% na área rural. Entre as mães chagásicas crônicas a frequência da infecção é por volta de 1,6% de todas as gestações (PINTO *et al.*, 2001).

A via oral não se apresentava como sendo um meio importante de transmissão da Doença Chagas no Brasil, sendo sugerida apenas em algumas micro epidemias ocorridas em cidades como Teotônia, Castelo da Rocha e na Amazônia (PRATA, 1999). Em março de 2005, porém, o Ministério da Saúde fez um alerta nacional às Vigilâncias Epidemiológicas Estaduais para que essas ficassem atentas à aparição de sintomas agudos da doença. A preocupação partiu da confirmação de uma micro epidemia ocorrida no estado de Santa Catarina, onde três pessoas da mesma família morreram e mais de 20 novos casos de infecção foram confirmados, dos quais 14 precisaram de internação imediata (Revista Pesquisa Fapesp, 2005).

Vale salientar a existência do risco de transmissão da doença de Chagas, assim como de outras doenças, por meio de agulhas contaminadas usadas para a confecção de tatuagens (NISHIOKA *et al.*, 2001). A contaminação por via sexual não é totalmente aceita apesar de estudos mostrarem a presença de formas do parasita na menstruação e na genitália de ratas (HERRERA *et al.*, 2001).

Clinicamente, a doença de Chagas se apresenta com uma *Fase Aguda* inicial com alta parasitemia seguida por uma *Fase Crônica* que pode ser classificada em *Indeterminada ou Latente, Cardíaca e Digestiva* (RASSI *et al.*, 1991).

As manifestações clínicas, bem como o período para surgimento dos problemas pode variar de acordo com a cepa de *T. cruzi*, forma de transmissão e fatores intrínsecos do hospedeiro vertebrado como sexo, idade, estado nutricional e imunológico (LANA *et al.*, 2000).

Estima-se que a fase aguda aparente da doença se manifeste em 3% dos casos nas áreas endêmicas e a forma crônica em 50%, sendo a forma cardíaca presente em 30% e a digestiva em 7% a 8% da população infectada (FUNASA, 2001). A fase aguda da doença caracteriza-se por um conjunto de manifestações inflamatórias de intensidade variável que se iniciam após período de incubação de, no mínimo, quatro dias. Ao final deste período o parasita já se encontra alojado em quase todos os órgãos e tecidos do hospedeiro (RASSI *et al.*, 1991).

As manifestações clínicas na fase aguda da doença são formadas pelos sinais de porta de entrada da infecção, alterações gerais e sistêmicas. Quando a porta de entrada é a região ocular, é comum a ocorrência do *Sinal de Romaña* (50% dos casos), Figura 4, e quando é a pele é comum o surgimento do *Chagoma de inoculação* (25% dos casos), Figura 5. Associados a esses sinais surgem sintomas como febre, mal-estar geral, cefaléia, edemas, hepatomegalia e esplenomegalia (PEREIRA *et al.*, 1999; LANA *et al.*, 2000). Alterações eletrocardiográficas e neurológicas podem aparecer, mas essas são dependentes do grau de acometimento do paciente.

Na fase crônica, o paciente passa por período assintomático de cura aparente por longo tempo. Estes pacientes podem nunca manifestar quaisquer sintomas no decorrer de suas vidas, ou manifestá-los anos mais tarde (IANNI *et al.*, 1998). Os principais problemas dessa fase são os comprometimentos cardíacos e digestivos, que surgem em função das intensas mudanças morfológicas observadas no miocárdio e no tubo digestório - esôfago e cólon principalmente - (LANA *et al.*, 2000) ocasionadas pela grande quantidade de parasitas alojada nesses órgãos.

Figura 4. Sinal de Romaña

(http://www.woiub.org/.../tropical_disease.html, acessado em 01/06/2005)

Figura 5. Chagoma de Inoculação

(http://www.entomology.unl.edu/lgh/ent108/log_page_2002.htm; acessado em 02/06/2005)

Na forma cardíaca da doença os parasitas formam ninhos de amastigotas, às vezes muito grandes e alongados, em torno das fibras levando à destruição da massa muscular. Observa-se, microscopicamente, a formação de áreas de fibrose interrompendo e destruindo as fibras simpáticas e parassimpáticas do Sistema Nervoso Autônomo (DÁVILA *et al.*, 2004; PÉREZ *et al.*, 2005).

As complicações desse quadro podem levar à insuficiência cardíaca congestiva, derrame pericárdico e bloqueios aurículo-ventriculares completos, entre outras (RASSI *et al.*, 1991; FUNASA, 2001). Além desses sintomas provenientes do retardamento da

circulação e da hipóxia, observam-se também fenômenos tromboembólicos (LANA *et al.*, 2000).

A forma digestiva da doença ocorre quando os parasitas atingem as células nervosas do aparelho digestório, causando lesões que são resultados de processos crônicos de miosite focal e intersticial, acompanhados de formação de granulomas e destruição dos plexos nervosos da parede do órgão (REY, 1991). Notam-se alterações morfológicas e funcionais em decorrência da não propagação da onda contrátil ao longo do trato gastrintestinal, levando a incoordenação motora, caracterizando megaesôfago e megacólon (LANA *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2001).

As complicações digestivas mais freqüentes na clínica médica são esofagite, desnutrição, neoplasia, rompimento do esôfago, fistula e alterações pulmonares decorrentes de regurgitação (PINTO *et al.*, 2001).

1.2. Epidemiologia

Atualmente há de 18 a 20 milhões de pessoas infectadas pelo *T.cruzi* e aproximadamente 40 milhões estão expostas ao risco de contrair a Doença de Chagas (VINHAES, 2003; World Health Organization – WHO, 2004). Esta doença é considerada endêmica na América Latina e segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) há de 11 a 12 milhões de pessoas infectadas pelo *T.cruzi* do sul dos Estados Unidos da América (EUA) até a província de Chubut na Argentina pela domiciliação dos triatomíneos (WHO, 2002). A Figura 6 mostra a distribuição geográfica dessa parasitose segundo a OMS.

Figura 6. Distribuição Geográfica da Doença de Chagas.
(<http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm> acessado em 02/01/2005)

As melhores condições de vida da população norte-americana aliada às condições das espécies locais dos insetos vetores, fazem com que a infecção humana via vetor seja extremamente rara nos EUA, no entanto, a intensa migração de latino-americanos nas últimas décadas têm elevado o número de casos da doença nesse país, principalmente pela transmissão sanguínea (NICKERSON *et al*, 1989; GRANT *et al*, 1989).

Levantamentos recentes estimam de 700.000 a 800.000 novos casos da doença por ano e 45.000 mortes em função da forma cardíaca da Doença de Chagas no mundo (MONCAYO *et al.*, 2003). Os mesmos estudos apontam para outro dado preocupante, a Tripanossomíase Americana leva 676 mil pessoas por ano a modificar suas vidas em função dos comprometimentos físicos que essa ocasiona (URBINA *et al.*, 2003).

No Brasil, as estatísticas mostram que de 5 a 6 milhões de indivíduos estão infectados (MONCAYO *et al.*, 2003; SUNCAM, 1987). De 25% a 35% desses pacientes desenvolvem severas complicações cardíacas e digestivas – sendo 75.000 casos de arritmias cardíacas, 30.000 casos de megacólon e 45.000 casos de megaesôfago por ano, segundo dados apurados por IANNI e MADY (IANNI *et al.*, 1988).

Dados da SUCAM - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública do Ministério da Saúde - de 1979 a 1981, mostram que o governo brasileiro perdeu cerca de 237 milhões de dólares e 259 mil anos de vida útil da população economicamente ativa em função dos óbitos e aposentadorias precoces associadas à doença de Chagas e suas complicações (SUNCAM, 1981).

Visando minimizar o impacto social e econômico dessa infecção, alguns países sul-americanos aliaram-se em um *Programa de Interrupção da Transmissão Vetorial e sanguínea do T. cruzi*. Medidas como vaporização de inseticidas em áreas de grande prevalência do triatomíneo, melhoria nas condições de habitação, maior controle dos bancos de sangue e campanhas para esclarecimentos da população, foram maciçamente utilizadas.

Os países envolvidos nessa iniciativa apresentam melhoras significativas quanto à incidência da doença e a presença de vetor nas habitações conforme mostra a Figura 7.

Essa redução é estimada em mais de 70%, sendo verificado casos de eliminação total, como observado na cidade de São Paulo no ano de 1983, onde a incidência de soropositividade em crianças em idade escolar passou para 0% de casos novos, sendo que em 1976, antes da implantação do programa, a incidência era de 60% (SOUZA *et al.*, 1984; MONCAYO *et al.*, 1999).

Figura 7. Incidência da Doença de Chagas nos países do Cone Sul frente a implementação de medidas de prevenção a transmissão vetorial e sanguínea.

(http://www.who.int/tdr/research/progress/chag_afr/southcone.htm acessado em 02/01/2005)

No que diz respeito à qualidade do sangue coletado e aos produtos hemoderivados, ficam evidentes as melhorias ocorridas no Brasil com a criação do Programa Nacional do Sangue, Pró-Sangue, entretanto, esta situação ainda não é o ideal em nosso país.

Dados apresentados a partir da criação desse programa (WHO, 1994a,b, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999 e 2000) levaram a Comissão Internacional de Especialistas constituída pela Organização Panamericana de Saúde - OPAS e pelos países do Cone Sul, a conferir certificado de interrupção da transmissão vetorial pelo *T. infestans* e sanguínea ao Uruguai (1997), Chile (1999) e a seis estados brasileiros: São Paulo, Rio de Janeiro, Paraíba, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás em 2000.

Os gastos para manutenção dessa iniciativa entre os países do Cone Sul ultrapassam 345 milhões de dólares (Quadro 1), o que representa parcela considerável dos fundos internos dos países envolvidos (MONCAYO, 2003).

Países	1991-1994	1995	1996	1997	1998	1999	Total
Argentina	52 000	18 000	18 000	14 000	16 000	13 000	131 000
Bolívia	83	430	706	2 940	4 410	4 500	13 069
Brasil	38 420	48 000	28 000	35 000	15 000	20 000	184 420
Chile	1 200	300	1 000	600	500	500	4 100
Paraguai	2 224	1 250	1 252	2 019	2 400	1 200	10 345
Peru	0	0	0	2 570	ND	2 000	4 570
Uruguai	179	74	74	74	75	100	676

Quadro 1. Investimentos aplicados na interrupção da transmissão da Doença de Chagas
(Quadro adaptado de MONCAYO *et al.*, 2003)

São investimentos bastante altos para países pobres como os sul americanos, mas conforme mostram as estatísticas da doença, essas populações não só apresentam ganhos em qualidade de vida como também em termos econômicos, uma vez que há uma redução considerável dos gastos do governo com tratamentos e aposentadorias precoces. Tais avanços foram tão significativos, que medidas semelhantes a esse Programa de Iniciativa de Interrupção da Transmissão da Doença de Chagas vêm sendo utilizadas em alguns países andinos e na América Central (MONCAYO, 2003).

É nítido o avanço obtido no controle da infecção pelo *T. cruzi*, mas esses não significam a erradicação da doença, sendo necessária não só a manutenção do programa, mas também a constante busca de novas alternativas para o combate ao parasita.

1.3. Tratamento Quimioterápico e Perspectivas

Fármacos arsenicais e antimoniais figuram entre as primeiras substâncias utilizadas no tratamento de doenças parasitárias como malária, leishmaniose e triossomíase americana (KOROLKOVAS, 1988). Derivados orgânicos destes metais ainda permanecem como fármacos recomendados para algumas parasitoses humanas (CROFT, 1999).

Nas décadas subseqüentes a descoberta da Doença de Chagas por Carlos Chagas, em 1909, nenhum medicamento tornou-se disponível para o seu tratamento, mas muitas moléculas foram testadas. Entre 1912 e 1962, Brener e colaboradores testaram 27 compostos e mais de 30 antibióticos, obtendo, em alguns casos, supressão da parasitemia, porém nunca cura definitiva (COURA *et al.*, 1961; CANÇADO, 1968).

Estudos realizados por Packchanian a partir de 1952 (PACKCHANIAN, 1952) abriram caminho para uma promissora classe de substâncias com atividade antichagásica – os compostos nitro-derivados – obtendo resultados significativos na administração oral de nitrofurazona, 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (BRENER, 1961), que, anos mais tarde, teve seu uso abandonado em função dos constantes e severos efeitos adversos.

A partir dos anos 70, dois compostos nitro-heterocíclicos, benznidazol (Rochagan®, Radanil® - Roche; *N*-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) e o nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideno - amino)-tetraidro-4-hidrogeno-1,4-tiazina-1,1-dióxido Lampit® - Bayer), Figura 8, passaram a ser utilizados no tratamento da Triossomíase Americana, sendo considerados o primeiro fármaco de primeira escolha, até hoje, apesar de sua eficácia ser questionável (RASSI *et al.*, 1991; BRAGA *et al.*, 2000; URBINA *et al.*, 2003).

Figura 8. Estrutura química do benznidazol e nifurtimox.

Esses dois fármacos apresentam mecanismo de ação citotóxico que inicialmente envolve uma ou mais reações de redução do grupo nitro, seguido pela inibição de várias enzimas necessárias à célula (DOCAMPO, 1990). O nifurtimox age por meio da formação de radicais livres (nitroânion) como peróxido e superóxido de hidrogênio, que por serem intermediários altamente reativos e nocivos levam a célula a um estado de stress oxidativo intenso, uma vez que esse protozoário não possui mecanismos eficientes de detoxificação radicalar (DOCAMPO *et al.*, 1986; COURA, 2002).

Os danos oxidativos do benznidazol só são verificados quando as doses administradas são bastante altas. O mecanismo de ação desse derivado nitroimidazólico relaciona-se à ligações covalentes ou outras interações entre os nitrointermediários e unidades do parasita como, por exemplo, DNA, lipídeos e proteínas (DIAZ DE TORANZO *et al.*, 1988; PEDROSA *et al.*, 2001; URBINA *et al.*, 2003).

A eficácia do tratamento com essa classe de compostos varia de acordo com a fase da doença, o período de tratamento, dose e características intrínsecas dos pacientes como idade, estado imunológico, sexo, entre outras. Os melhores resultados obtidos até o momento foram na diminuição de parasitemias nas infecções agudas

recentes, congênita e por acidentes de laboratório com aproximadamente 80% de cura em pacientes tratados (COURA, 2002).

Estudos realizados por Braga e Cançado (CANÇADO, 1999; BRAGA *et al.*, 2000) demonstraram a persistência da sorologia positiva anti-*T. cruzi* - avaliadas por técnicas de PCR (ZULANTAY *et al.*, 2004) - na fase crônica mesmo após a utilização desses fármacos. Verificou-se que a diferença entre as médias dos pacientes tratados e dos não-tratados não era estatisticamente significativa, mostrando que o tratamento da Doença de Chagas crônica com esses compostos nitro-derivados é insatisfatório.

Essa aparente seletividade pela fase aguda da doença é atribuída ao fato desses fármacos serem efetivos apenas sobre as formas circulantes, sendo pouco ativos frente às formas tissulares (RASSI *et al.*, 1991). Isso ocorre, em especial, com o nifurtimox, observa-se para este fármaco que as formas tripomastigotas que escapam da ação tripanomicida continuam capazes de penetrar nas células dos vertebrados e, sobre as formas amastigotas inibe apenas o seu desenvolvimento (COURA, 2002). É sabido que para agir no parasito em sua forma intracelular, de maneira efetiva, as doses teriam que atingir níveis tóxicos, não sendo, portanto, recomendados para uso clínico (IANNI *et al.*, 1998).

Apesar das poucas alternativas de tratamento, o uso do benznidazol e do nifurtimox é bastante questionável na comunidade médica, sendo a indicação precedida de avaliação detalhada do paciente em função das freqüentes e graves reações indesejáveis associadas ao uso desses medicamentos. Dentre os efeitos tóxicos resultantes do uso do nifurtimox destaca-se anorexia, perda de peso, distúrbios psíquicos e comportamentais, excitabilidade ou sonolência, parestesias, poli neuropatias e alterações digestivas que variam de náuseas a diarreia (RASSI, 1998; COURA, 2002).

As reações adversas relacionadas ao uso do benznidazol são classificadas em três grupos, sendo o primeiro associado à hipersensibilidade – como dermatite com erupções cutâneas, edemas generalizados, linfadenopatias, dores musculares - o segundo à depressão da medula, trombocitopenia e agranulocitose e o terceiro a

polineuropatia, parestesia e polineurite periférica (CANÇADO, 1999; COURA, 2002). Estudos publicados por Teixeira e colaboradores (TEXEIRA, 1990 e 1994); têm alertado para a ocorrência de atividade mutagênica e carcinogênica desse fármaco em animais de laboratório, porém muitos autores ainda não consideram esses riscos.

Há ainda disponível para o tratamento da moléstia de Chagas, além destes fármacos, o alopurinol (Figura 9) – *4-hidroxipirazolo(3,4-d)piramidina* - que é medicamento eletivo em casos de pacientes com imunodeficiência que apresentam reativação da parasitemia (AMATO NETO, 1999). Análogo estrutural da hipoxantina age servindo como substrato alternativo para a enzima hipoxantina-guanina fosforisotransferase, que ao utilizá-lo leva a formação de um falso nucleotídeo, bloqueando a síntese *de novo* destas (MARR, 1991).

O uso dessa pirazolopirimidina em pacientes chagásicos ainda é controverso. Estudo realizado por Lauri-Pires em 1988 mostrou que esse medicamento é ineficiente no controle da parasitemia (LAURIA-PIRES *et al.*, 1988), porém, publicações mais recentes, indicam que o alopurinol não só promove a negatização da infecção com menor toxicidade (GALLEANO *et al.*, 1990) e também previne a reativação da doença em casos de imunossupressão continuada (TOMIMORE-YAMASHITA *et al.*, 1997). Doenças como leucemia, linfomas, e outras neoplasias, AIDS (DA-CRUZ *et al.*, 2004) e transplantes de órgãos estão diretamente relacionados com esses casos de reativação da doença (COURA, 2002; FERREIRA *et al.*, 2002).

O megazol (Figura 9), derivado nitroimidazólico sintetizado como agente antimicrobiano em 1986 por Berkerlhammer e Asato, foi caracterizado por Brener e colaboradores como um potente agente tripanomicida (CARVALHO *et al.*, 2004). Observaram-se efeitos supressores sobre a síntese protéica de formas amastigotas de cepa Y de *T. cruzi* em concentrações menores que os nitro-derivados (BATISTA *et al.*, 1996), entretanto, apesar dessa boa atividade observou-se perfis carcinogênico e mutagênico em ensaios utilizando *Salmonella*/microsoma (interação com DNA) sendo seu uso descontinuado (CARVALHO *et al.*, 2004).

Figura 9. Estrutura química do alopurinol e do megazol.

Nos casos de reativação que não respondem mais aos fármacos de primeira escolha na quimioterapia antichagásica, os médicos podem lançar mão do uso do cetoconazol, fluconazol e itraconazol (Figura 10).

Figura 10. Estrutura química de imidazóis usados no tratamento da Doença de Chagas.

O primeiro imidazol a mostrar-se ativo frente *T. cruzi* foi o cetoconazol, por meio do acúmulo de metabólitos do esteroide nas formas epimastigotas. Em experimentos com animais, observou-se cura parasitológica após sua administração na fase aguda, mas não na fase crônica (DECASTRO,1993). Resultados mais promissores foram

encontrados com o isômero D(+) do fluconazol (composto D0870 – Figura 11), que mostrou cerca de 30 a 50 vezes mais ativo do que o cetoconazol e o nifurtimox, apresentando atividade também em modelos de fase crônica (URBINA *et al.*, 1996; LIRA *et al.*, 2001).

O aparecimento de resistência aos derivados azóis, como o fluconazol, e de resistência cruzada entre cetoconazol, miconazol e itraconazol observado *in vitro*, indica a necessidade de cuidados especiais no uso desses derivados como agentes quimioterápicos (BUCKNER *et al.*, 1998).

Figura 11. Estrutura química do derivado triazol – D0870
(URBINA *et al.*, 2003)

Deve-se considerar quando da escolha do tratamento da infecção de Chagas a susceptibilidade de algumas linhagens de *T. cruzi* a ação do fármaco (BRENER & CHIARA, 1967; STOPPANI, 1999; VELOSO, 2001). A descontinuidade do uso do nifurtimox no Brasil e Argentina está diretamente relacionada a essa baixa ou quase inexistente susceptibilidade das cepas encontradas nessa região a esse fármaco (VELOSO *et al.*, 2001; COURA *et al.*, 2002; CHUNG *et al.*, 2003). A resistência das cepas à atividade antiparasitária dos compostos nitro-derivados é outra vertente que deve ser considerada (COSTA SILVA *et al.*, 1990; AMATO NETO, 1999; MOLINA *et al.*, 2000; URBINA *et al.*, 2003; VILARREAL *et al.*, 2004).

Grandes avanços são observados na América do Sul no controle da transmissão vetorial e sanguínea da doença, mas ainda é preciso se fazer algo pelas milhares de

peessoas que se encontram contaminadas, já que as possibilidades de tratamento são muito limitadas.

A grande dificuldade em se desenvolver fármacos para Doença de Chagas é a semelhança encontrada entre alguns antígenos presentes nas células de mamíferos no *T. cruzi*, assim uma resposta antiparasitária a esses antígenos poderia vir a afetar células não parasitadas, de modo que as células de mamíferos tornam-se alvos para a resposta imunológica do hospedeiro ao parasito (LANA *et al.*, 2000). Além disso, os endoparasitos como o *T. cruzi*, desenvolvem mecanismos de evasão do sistema imunológico bloqueando os mecanismos efetores de resposta (LUCIUS *et al.*, 2000). Schmunis e colaboradores apontam a capacidade do *T. cruzi* de eliminar de sua superfície o complexo formado pelo antígeno e o anticorpo (ABUIN, 1985).

Observa-se, atualmente, em literatura científica, três grandes áreas no desenvolvimento de quimioterápicos de ação antiparasitária. A saber: a) *screening* de bibliotecas de compostos naturais e semi-sintéticos; b) estudo de moléculas com atividade já conhecida e c) desenho de moléculas por meio da identificação de possíveis alvos no metabolismo do parasita.

Da investigação de produtos naturais com atividade biológica, resultou a identificação de várias classes de compostos com potencial atividade antichagásica, sendo observado para muitos deles atividade superior às classes utilizadas na terapêutica. Dentre esses destacam-se alguns alcalóides (CHATAINIG *et al.*, 1998; RIVAS *et al.*, 1999; FORNET *et al.*, 2000), taxóides, estilbenóides (OLMO *et al.*, 2001), gangliosídeos (LUJAN *et al.*, 1993) e extrato de própolis (HIGASHI *et al.*, 1994; MARCUCCI *et al.*, 2001).

A busca de substâncias que bloqueiem o ciclo biológico do protozoário, atuando sobre suas estruturas, vêm constituindo campo promissor para as pesquisas nesta área (BATISTA *et al.*, 1996). Estudos com a glicoproteína específica da superfície de *T. cruzi* denominada Tc85 e da enzima trans-sialidase, mostram que elas estão envolvidas no mecanismo de adesão e invasão das células de mamíferos (MING *et al.*, 1993; BURLEIGH *et al.*, 1995; GIORDANO, 1995; MAGDESIAN *et al.*, 2001;

VILLALTA *et al.*, 2001), representando, assim, dois interessantes alvos para o desenvolvimento de moléculas mais seletivas.

Os proteomas comparativos das formas amastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*, revelaram atualmente, proteínas específicas relacionadas à sobrevivência do parasito em seu estágio intracelular (TEIXEIRA *et al.*, 2000). Testes também vêm sendo realizados com inibidores de enzimas glicossomais do parasito, tais como tripanotona redutase (CHAN *et al.*, 1998; BONSE *et al.*, 2000; GUTIERREZ-CORREA *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2001; AGUIRRE *et al.*, 2004), cisteína proteinase (McKERROW, 1999; FREYMAN *et al.*, 2000; ROUSH *et al.*, 2000; ASCENZI *et al.*, 2004), hipoxantina-guanina-fosforil-ribosiltransferase (NAKAJIMA-SHIMADA *et al.*, 1996), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (BRESSI *et al.*, 2001; MARCHI *et al.*, 2004), DNA-topoisomerase (GONZALES-PEDROMO *et al.*, 1990), dihidrofolato redutase (ZUCCOTTO *et al.*, 1999), farnesil-pirofosfato sintase (SZAJNMAN *et al.*, 2000) e vários outros (DOGAN *et al.*, 2002; FERNANDEZ *et al.*, 2004; PRESTI *et al.*, 2004).

Os anticorpos monoclonais e seus fragmentos têm desempenhado importante papel no isolamento e purificação de muitos antígenos específicos de *T. cruzi* (LAFAILLE, 1988) que possam ter reação cruzada com os tecidos do hospedeiro, esclarecendo fatores relacionados ao desenvolvimento da doença e auxiliando, assim, no desenvolvimento de fármacos de forma a impedir danos às células de mamíferos (WHO 2000; FUNASA, 2001).

O uso de anticorpos é uma grande promessa de tratamento. Sabe-se que anticorpos específicos da classe IgC têm afinidade por receptores de membrana do *T. cruzi*. Postula-se que, se agentes citotóxicos forem ligados a este anticorpo, poderia se conseguir, de modo eficiente, a morte do parasita (BATISTA *et al.*, 1996). Conjugados de fármacos e imunoglobulinas como sistema de entrega de fármacos em alvos específicos têm merecido atenção por parte dos pesquisadores, assim como o uso de lipossomas (SOLOVEY, 1986) e peptídeos. Experimentos realizados por Carvalhaes e colaboradores (CARVALHAES *et al.*, 1998) com o clorambucil conjugado à imunoglobulinas anti-lipoproteína de baixa densidade apresentaram resultados satisfatórios contra o *T. cruzi* usando modelos animais.

Algumas tentativas foram realizadas para verificar a proteção por utilização da vacinação, entretanto, poucos estudos demonstraram a eficácia desta prática. A utilização do *T. cruzi* atenuado, retém baixa eficácia imunoprotetora, além de efeitos indesejados, como a exacerbação de reações auto-imunes e/ou ação infectiva do parasito atenuado (BATISTA *et al.*, 1996); sem contar a enorme variabilidade antigênica que estes parasitas apresentam (HARDER *et al.*, 2001).

Alguns projetos voltados para o estudo do genoma de parasitas, patrocinados pela Organização Mundial da Saúde, iniciaram-se em 1984, por meio do *The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases* - WHO/TDR; depois do *Genome Network Planning Meeting* realizado no Rio de Janeiro. Cientistas têm se dedicado a mapear as seqüências genéticas de algumas espécies, entre elas o *T. cruzi*, estando já disponíveis bibliotecas e softwares aplicativos com a visualização das estruturas e suas seqüências (DEGRAVE *et al.*, 1997).

2. MODIFICAÇÃO MOLECULAR

A introdução de novos fármacos para o tratamento/ controle de doenças que atingem o homem tem se tornado tarefa difícil, principalmente quando se pensa nos altos investimentos necessários – financeiro e de tempo. Assim, a busca de moléculas com características farmacocinéticas e farmacêuticas ideais torna-se fundamental na construção de um arsenal terapêutico, uma vez que qualquer princípio ativo para ter ação biológica necessita atingir o órgão alvo e, para tanto, é imprescindível que vençam barreiras físico-químicas do sistema biológico e que são limitantes das fases farmacêuticas, farmacocinética e farmacodinâmica (Figura 12).

Figura 12. Fases limitantes da ação do fármaco
(Esquema adaptado de SILVA, 2001)

Frente a estes fatos, muitos pesquisadores têm voltado sua atenção para a otimização de fármacos com atividade biológica conhecida, alterando suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas utilizando métodos de modificação molecular.

As técnicas de modificação molecular visam, em sua maioria, alterar problemas que podem limitar a utilização clínica do fármaco (CHUNG & FERREIRA, 1999) e/ou explorar esses efeitos indesejáveis a fim de se obter diferentes aplicações dos

compostos estudados. Entre os problemas que se deseja alterar (FRIIS & BUNDGAARD, 1996) destacam-se:

- baixa absorção devido a lipofilicidade inadequada de algumas moléculas, o que dificulta ou até mesmo inviabiliza a sua passagem pelas barreiras biológicas, interferindo na absorção, distribuição e biodisponibilidade;
- metabolização total pré-sistêmica;
- velocidades de absorção ou excreção não desejáveis quando o objetivo é prolongar ou abreviar o tempo de ação;
- pouca especificidade pelo sítio de ação - toxicidade provocada pela ação inespecífica do fármaco em outros tecidos.

Os processos de Modificação Molecular, método de variação, método mecanístico ou processo seletivo – são meios que visam, a partir de um protótipo, ou molécula líder, de estrutura química e atividade biológica conhecida, à síntese de estruturas análogas, congêneres ou homólogas com atividade modificada (FOYE, 1995).

Dentre as vantagens associadas à utilização desses processos no desenvolvimento de novos fármacos, citam-se (BURGER, 1995) :

- a] maior probabilidade de obtenção de estruturas com propriedades farmacológicas similares ao protótipo do que compostos selecionados ao acaso;
- b] possibilidade de obtenção de compostos com atividade superior;
- c] produção de novos fármacos com menor custo;
- d] síntese similar a da molécula líder;
- e] os resultados obtidos de atividade biológica associado aos parâmetros estudados ajudam na elucidação da relação estrutura atividade – SAR (*Structure-Activity-Relationship*);

f] uso dos mesmos métodos de determinação da atividade biológica utilizada na molécula líder.

Essa variação molecular visando a descoberta de novos fármacos pode ser realizada por *Processos Gerais*, *Processos Especiais* e *Métodos de Otimização* (KOROLKOVAS, 1988; FOYE, 1995).

1. *Processos Gerais*:

Estão envolvidos neste, dois métodos, a simplificação molecular e a conjunção molecular. Como os próprios nomes indicam, ocorre a formação de estruturas mais simples e análogas com estrutura química mais complexas em cada processo respectivamente.

A conjunção ou associação molecular pode ocorrer por três caminhos principais:

- adição molecular - associação de diferentes fármacos por meio de ligações fracas como atração eletrostática e ligação de hidrogênio,
- replicação molecular - união de fármacos idênticos por meio de ligações covalentes,
- hibridização molecular - ligação covalente unindo diferentes porções moleculares.

A Figura 13 apresenta alguns exemplos de compostos obtidos por esses processos, usados na terapêutica.

Figura 13. Alguns exemplos de compostos utilizados na terapêutica obtidos por processos de Associação Molecular.
(In: KOROLKOVAS, 1988)

2. Processos Especiais

Os processos especiais de modificação molecular foram agrupados por Schueler em duas classes. A saber (KOROLKOVAS, 1988; FOYE, 1995):

- classe 1 - alterações que aumentam ou diminuem as dimensões e a flexibilidade da molécula, tais como abertura e fechamento de anéis, introdução de duplas ligações, de centros quirais e remoção, introdução ou substituição de grupos butil;
- classe 2 - alterações de propriedades químicas e físicas por meio de introdução ou substituição de grupos como, por exemplo, substituição

isotérica – bioisoterismo, mudança de posição ou orientação de grupos inibindo ou promovendo estados eletrônicos.

Apresenta-se na Figura 14 alguns exemplos de fármacos obtidos por esses processos:

Figura 14. Estrutura química de fármacos obtidos por Processos Especiais de modificação molecular.

Apesar das vantagens dos processos mencionados anteriormente, alguns critérios devem ser considerados para o seu total sucesso, pois a possibilidade de síntese apenas considerando os métodos gerais e especiais é imensa, para não dizer infinita, o que tornaria o recurso de modificação molecular em técnica demorada e de alto custo. Para tanto se utiliza *Processos de Otimização* (BURGER, 1995; FOYE, 1995), que envolvem desde métodos desenvolvidos por meio de cálculos matemáticos à modificações específicas como a introdução de estruturas transportadoras na molécula-líder.

O planejamento racional de fármacos por aplicação de estudos de relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica (QSAR – *Quantitative Structure-Activity Relationships*) é uma dessas alternativas. O QSAR estuda a

influência quantitativa das propriedades físico-químicas que determinam a ação do fármaco, definindo modelos matemáticos com boa capacidade preditiva da atividade farmacológica de análogos, orientando assim, o desenvolvimento de forma mais rápida, com menor custo e maior chance de sucesso (HANSCH *et al.*, 1995; FOYE, 1995; TAVARES & FERREIRA, 2002; TAVARES, 2004).

O conceito de estudos quantitativos de substâncias bioativas está baseado no fato de que as propriedades biológicas de um composto são dadas em função de suas propriedades físico-químicas, como hidrofobicidade, efeitos eletrônicos de grupos substituintes, potencial de ionização, estereoquímica, entre outros (MASUNARI & TAVARES, *in press*; TAVARES & FERREIRA, 2002). As propriedades físico-químicas estão diretamente envolvidas na absorção e distribuição no sistema biológico e, nas forças intra e inter-moleculares envolvidas na interação fármaco-receptor (GAUDIO, 1996), pois até que a molécula exerça sua atividade muitos fenômenos já ocorreram em sua estrutura química.

Os principais métodos ou técnicas utilizadas na otimização de moléculas protótipos são: Esquema Operacional de Topliss (TOPLISS, 1972), Diagrama de Craig (CRAIG, 1971) e Método Seqüencial Simplex modificado por Darvas (DARVAS, 1974).

Um outro recurso de modificação molecular bastante utilizado é a Latenciação, objetivo final desse trabalho. Latenciar significa converter um composto conhecido biologicamente ativo, por modificação química em forma de transporte inativo *in vivo*, que após ataque enzimático ou químico libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele (KOROLKOVAS, 1988; CHUNG & FERREIRA, 1999).

Em outras palavras, a latenciação é um recurso que possibilita derivações químicas biorreversíveis de fármacos a fim de obter formas latentes (CHUNG & FERREIRA, 1999) denominadas *pró-fármacos* (WERMUTH, 1996). A Figura 15 esquematiza o conceito de pró-fármaco.

Figura 15. Ilustração esquemática do conceito de pró-fármaco
(Ilustração adaptada de FRIIS & BUNDGAARD, 1996)

O termo pró-fármaco foi utilizado pela primeira vez em 1958 por Albert, para descrever compostos que necessitavam de biotransformação prévia para promover efeito farmacológico. Posteriormente, esse termo foi padronizado e definido como sendo um derivado químico e farmacologicamente inativo da molécula matriz, que requer transformação no organismo para liberar o fármaco ativo (CHUNG & FERREIRA, 1999), sem alteração de seu grupo farmacofórico (TESTA & CALDWELL, 1996).

A importância da latenciação como método de introdução de novas moléculas biologicamente ativas pode ser demonstrado pela estatística publicada por HILLER em 1991: cerca de 20% a 30% dos fármacos introduzidos no mercado no período de 1986 a 1991 foram obtidos utilizando essa estratégia (HILLER, 1991).

Vários fármacos ligados diretamente aos seus transportadores não são hidrolisados pelas enzimas, dificultando a liberação da porção ativa. Nestes casos há necessidade de se introduzir um grupo espaçante (CARVALHO, 2001), que nada mais é do que um grupo intermediário que estabelece a ligação entre o fármaco e seu transportador. O comprimento e a composição deste grupo determinam a liberação do fármaco, dando maior acesso as enzimas (CHUNG & FERREIRA, 1999).

A par da atividade farmacológica de muitos compostos utilizados na terapêutica a elevada toxicidade de algumas dessas mostra-se como fator determinante na falta de eficácia dos tratamentos disponíveis. Assim, a busca por maior seletividade desses fármacos pelo sítio de ação, diminuindo a toxicidade, é uma das mais importantes funções do processo de latenciação (BUNDGAARD, 1991). Nesse sentido, os *FÁRMACOS-DIRIGIDOS*, uma das classes de pró-fármaco, vêm destacando-se no meio científico como alternativa para o desenvolvimento de moléculas mais seletivas no tratamento de várias enfermidades.

Fármacos dirigidos são formas de transporte inativo em que uma substância ativa é unida a um transportador com seletividade por um determinado grupo celular, tecido ou órgão. Receptores na superfície das células alvo devem reconhecer o transportador e ligar-se a ele, permitindo que o conjunto formado pelo fármaco e seu transportador seja levado por endocitose ao interior da célula, com posterior liberação do princípio ativo por ação enzimática ou pH ácido (CARVALHO, 2001; SILVA, 2001). A Figura 16 mostra a esquematização desses eventos.

Figura 16. Mecanismo de endocitose e ativação de pró-fármaco
(Ilustração adaptada de CHUNG & FERREIRA, 1999)

A liberação da porção ativa pela clivagem da ligação fármaco-transportador, no local da ação, possibilita a interação entre a molécula ativa e os receptores localizados na membrana da célula-alvo (GIES, 1996), diminuindo a toxicidade relacionada a inespecificidade do fármaco e aumentando sua seletividade pelo seu sítio de ação (CHUNG & FERREIRA, 1999). Assim, o conhecimento das enzimas específicas que atuam no alvo escolhido, bem como do pH fisiológico das células e dos tecidos alvo e, os possíveis mecanismos de escape ao sistema imunológico, são imprescindíveis para o seu desenvolvimento.

A proposta de fármacos dirigidos para a Doença de Chagas mostra-se uma alternativa promissora de tratamento, uma vez que a inespecificidade das moléculas hoje disponíveis para essa doença leva a efeitos tóxicos graves, que em muitos casos inviabilizam o tratamento.

A existência de sialoglicoconjugados na superfície de *T. cruzi* é conhecida há mais de 15 anos (COLLI *et al.*, 1999) e a identificação das trans-sialidases, importantes no processo de adesão e invasão do parasito às células do hospedeiro (PREVIATO *et al.*, 1985; TOMLINSON *et al.*, 1994; FRASCH, 2000; TODESCHINI *et al.*, 2000; PREVIATO *et al.*, 2003), abrem novas perspectivas para mecanismos de bloqueio da penetração do parasito nas células humanas (SCHAEUER, 1985; PROCÓPIO *et al.*, 1994; AGUSTI *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 2000; AGRELLOS *et al.*, 2003; FREIRE *et al.*, 2003; PARIS *et al.*, 2005) e de transporte seletivo de compostos biologicamente ativos.

A tran-sialidase expressa por *T. cruzi*, TSTc, faz parte da superfamília das sialidases e catalisam a transferência do ácido siálico, Figura 17, de glicoproteínas sializadas do hospedeiro, para depois incorporá-lo a sua membrana (ACOSTA *et al.*, 1994; FRASCH, 2000), uma vez que esse protozoário é incapaz de sintetizar esse ácido.

Aliado a esse fato, observa-se que a atividade enzimática da TS, única sialidase expressa pelo parasito (SCHENKMAN *et al.*, 1993 e 1994) é diferente das sialiltransferases eucarióticas presentes no complexo de Golgi, que usam

exclusivamente CMP-ácido siálico (ácido siálico citidina monofato) como substrato (FRASCH, 2000). Dessa forma, a utilização de derivado do ácido siálico como transportador de moléculas com atividade antichagásica mostra-se como uma possível área de investigação para obtenção de fármaco dirigido.

Figura 17. Estrutura química do ácido siálico.

(In : VAKI *et al.*, 1985)

3. COMPOSTOS NITRO- HETEROCÍCLICOS

Os compostos nitrofurânicos têm sido utilizados desde a década de 40 para o tratamento de infecções sendo os primeiros fármacos nitro-heterocíclicos introduzidos na quimioterapia (FUJITA *et al.*, 1971).

Estudos realizados por Dodd e Stillmans em 1944, resultaram na descoberta do nitrofural, *5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona*, Figura 18, primeiro fármaco 5-nitrofurânico introduzido na terapêutica, que foi amplamente utilizado durante a Segunda Guerra Mundial como agente antimicrobiano (MIURA *et al.*, 1967; DODD *et al.*, 1994).

Figura 18. Estrutura do nitrofural

Em sequência, foram sintetizados e testados vários compostos análogos que em geral apresentavam amplo espectro de ação, agindo não apenas sobre bactérias mas também sobre protozoários. Atualmente, são vários os compostos nitrofurânicos empregados na prática médica, destacando-se entre estes a nitrofurantoína, a furazolidona, o nifuratel e o nifurtimox, entre outros (Figura 19).

Figura 19. Alguns compostos 5-nitrofurânicos utilizados na terapêutica

Experimentos com camundongos infectados com *T. cruzi*, em 1952, abriram caminho para a possível utilização dessa classe de compostos como agentes tripanomicidas: Packchanian obteve 95,4% de cura em animais tratados com nitrofurural via oral por 53 dias consecutivos (PACKCHANIAN, 1952; BRENER, 1961 e 1969). Em seguida, Ferreira e colaboradores utilizaram esse mesmo derivado em dez casos da doença em humanos, obtendo resultados semelhantes, supressão da parasitemia na fase aguda da doença (PESSOA *et al.*, 1988).

Entre os anos de 1962 e 1964, pesquisadores reuniram dados que apresentavam resultados evidentes da ação do nitrofural em esquemas prolongados de tratamento (PESSOA *et al.*, 1988; RASSI *et al.*, 1991), introduzindo-o, desta forma, como fármaco de ação antichagásica. Anos mais tarde esse fármaco teve seu uso abandonado em função dos seus severos e constantes efeitos tóxicos (PESSOA *et al.*, 1988) dando lugar a outros, dentre esses, outro derivado 5-nitro-furânico, o nifurtimox.

Os derivados 5-nitrofurânicos são compostos sintéticos que se caracterizam estruturalmente pela presença de anel furânico substituído na posição 5 pelo grupo nitro, Figura 20, sendo esta a estrutura mínima necessária para a atividade antimicrobiana e antiparasitária destes compostos (FOYE *et al.*, 1995; BURGER, 1995).

Figura 20. Estrutura mínima necessária para o desempenho de atividade antimicrobiana de compostos 5-nitrofurânicos

Quanto ao mecanismo de ação desses fármacos sabe-se que a redução do grupo nitro é pré-requisito para o desempenho da atividade biológica, seja como agente antimicrobiano ou como agente antiparasitário (GOUNOT *et al.*, 1979; VIODÉ *et al.*, 1999).

A atividade antiparasitária parece estar relacionada à sua capacidade de sofrer redução do nitrocomposto ao nitroânion radical, que sofre oxidação até a formação de superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (DOCAMPO, 1990). A reação dos radicais livres com as macromoléculas celulares resulta em dano celular que inclui a peroxidação lipídica e lesão da membrana, inativação enzimática, dano ao ácido desoxirribonucléico – ADN e mutagenese (TRACY *et al.*, 1996; WENT *et al.*, 2004).

A Figura 21 representa, esquematicamente, duas rotas de possíveis reações biorredutoras desempenhadas por essa classe de compostos (VIODE *et al.*, 1999).

Figura 21. Via biorredutiva dos nitrocompostos aromáticos.

SOD = superóxido dismutase; TR = Trypanosoma redutase

TS_2 = Tripanotona dissulfeto, T(SH)_2 = di-hidrotriptanotona

(In: VIODE *et al.*, 1999)

Em condições anaeróbicas, onde o radical nitroânion formado é transformado no derivado nitroso correspondente, esses derivados agem degradando compostos tióis indispensáveis para as células. Em condições aeróbicas o radical nitroânion reage com o oxigênio gerando superóxidos, que são transformados em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido desmutase (SOD). Esse acúmulo de peróxido leva à formação do radical hidroxila, espécie altamente danosa à célula. (VIODE *et al.*, 1999).

Estudos realizados com redutases contidas em frações de microssomas de *T. cruzi* mostram que compostos como o megalol e nifurtimox sofrem redução e subsequente formação de radicais livres por dois processos. A saber: a) formação de radicais livres do oxigênio; b) inexistência de sistema de proteção da célula do parasita à ação antioxidante dos radicais livres resultantes da nitro-redução. Estes processos fazem com que os protozoários atinjam um estado intenso de stress oxidativo (TURRENS, 2004).

Nos organismos aeróbios, como o do protozoário causador da Doença de Chagas, encontram-se dois tipos de defesa aos processos antioxidantes – via ação enzimática e/ou via ação de moléculas antioxidantes de baixo peso molecular. Nas células de mamíferos os danos são diminuídos pela ação das enzimas (TURRENS, 2004):

- a) *Superóxido Desmutase (SOD)* – responsável pela conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio;
- b) *Glutathione Peroxidase* – reduz o peróxido de hidrogênio pela redução da glutathione e,
- c) *Catalase* – proporciona a volta do peróxido a água e a oxigênio.

Muitos tripanosomatídeos não possuem ou são extremamente deficientes em sistemas enzimáticos necessários para a remoção de H_2O_2 . As SOD estão presentes em *T. cruzi*, porém a catalase e glutathione peroxidase estão ausentes em tripanosomatídeos patogênicos. Ao invés dessas enzimas, estes parasitas expressam tripanotiona peroxidase – duas moléculas de glutathione conjugadas com uma molécula de espermidina (TURRENS, 2004) – enzima que parece ser essencial na defesa contra o dano oxidativo (DOCAMPO, 1990).

O sistema de metabolização de H_2O_2 tripanotiona-dependente do tripanosomatídeos utiliza sistema análogo ao do hospedeiro que usa glutathione redutase/glutathione peroxidase, porém seu potencial de oxi-redução é mais negativo que o da glutathione (DOCAMPO, 1990) o que faz com que essa enzima catalise a redução dos nitrofurânicos mais rapidamente que as células dos mamíferos (VIOUË *et al.*, 1999).

A atividade da tripanotiona peroxidase é considerada baixa quando comparada com glutathione peroxidase de mamíferos (VIOUË *et al.*, 1999). Em outras palavras tripanosomatídeos podem ser protegidos do índice endógeno de geração de H_2O_2 , mas são sensíveis ao aumento da concentração do estado de equilíbrio de peróxido de

hidrogênio, ou seja, estes organismos são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo (DOCAMPO, 1990).

Blumentiel e colaboradores (BLUMENSTIEL *et al.*, 1999) observaram que a presença de flavoenzimas catalisa a redução de um elétron nos compostos nitrofurânicos com concomitante geração de ânions superóxidos, contribuindo, desta forma, para que a célula entre em stress oxidativo. A partir da descoberta dessa facilitação das flavoenzimas no mecanismo de ação desses compostos, outros derivados que também interagem com essas enzimas passaram a ser considerados como possíveis fármacos tripanomicidas.

É sabido que a atividade biológica dos fármacos é reflexo de sua estrutura molecular e de interações físico-químicas com seus respectivos receptores. Caso um dos componentes da estrutura molecular seja alterado alteram-se, também, estas propriedades, fato notório que levou ao estudo detalhado de como seria possível trabalhar variações destes parâmetros, a fim de se obter compostos que apresentassem atividade biológica otimizada e redução de efeitos indesejáveis (HANSCH & LEO, 1995; TAVARES & FERREIRA, 2002; TAVARES, *in press*).

Os compostos tiofênicos (AGUIRRE *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 2004; FUJII *et al.*, 2005; PÉREZ *et al.* 2005) têm despertado grande interesse dos pesquisadores, particularmente os derivados 5-nitrotiofênicos. Em 1981 GAYRAL e colaboradores (GAYRAL, P. *et al.* 1981) demonstraram que derivados 5-nitrotiofênicos se mostravam mais ativos contra protozoários que os 5-nitrofurânicos; subsequente foram descritas atividades antiparasitária de derivados hidrazônicos e aldimínicos na série dos tiofenos.

Em 2000, Cerecetto e colaboradores (CERECETTO *et al.*, 2000) publicaram a síntese de 14 semicarbazonas derivadas de 5-nitro-2-furaldeído e 5-nitro-tiofeno-2-carboxaldeído, que em sua grande maioria demonstraram boa atividade antitripanossômica *in vitro*. Chung e colaboradores também obtiveram bons resultados com um derivado hidroximetilado da nitrofurazona como pró-fármaco (CHUNG *et al.*, 2003).

Neste contexto de otimização molecular de fármacos, a nifuroxazida, 5-nitro-2-furfurilideno 4-hidroxibenzidrazida, agente microbiano sintético pertencente à classe dos nitrofurânicos, passou a ser estudada como molécula protótipo no desenvolvimento de derivados farmacologicamente mais eficientes e menos tóxicos, utilizando para isso, estudos das Relações Quantitativas Estrutura-Atividade, QSAR (TAVARES *et al.*, 1991a; 1991b; 1997a; 1997b; 1999a; 1999b; TAVARES 1993; CHISTÉ, 1998; RODRIGUES, 2000; REZENDE, 2002; MASUNARI *et al.*, 2003).

Tavares e colaboradores estudando a atividade de análogos da nifuroxazida através de técnicas de QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationships*), e utilizando as metodologias propostas por Craig (CRAIG, 1971) e Topliss (TOPLISS, 1972), sintetizaram séries de compostos nitrofurânicos e nitrotiofênicos (TAVARES *et al.*, 1991a; 1991b; 1997a; 1997b; 1999a; 1999b; TAVARES 1993). Estes estudos levaram a identificação de séries de análogos a nifuroxazida (Figura 22), com alta atividade antimicrobiana. Acredita-se que estes compostos atuem sobre bactérias e protozoários pelo mesmo mecanismo de ação, sendo que a substituição do anel furânico por tiofênico favoreceu significativamente a atividade antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* com caráter de multi-resistência (REZENDE, 2002; MASUNARI *et al.*, 2003). Estes mesmos compostos apresentam grande possibilidade de boa atividade antichagásica, sendo esta comprovação um dos objetivos deste trabalho.

Figura 22. Estrutura química de compostos análogos à nifuroxazida
(In: TAVARES *et al.*, 1999a e b)

Materiais e Métodos

1. MATERIAIS

1.1. Reagentes e solventes:

- 5-nitro-2-tiofenoxicarboxaldeído 99% - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- benzidrazidas *para*-substituídas disponíveis no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do FBT/FCF/USP;
- ácido sulfúrico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- ácido clorídrico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- ácido acético glacial PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- álcool etílico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- álcool metílico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- álcool isopropílico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- anidrido acético PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- clorofórmio PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- n-hexano PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- *N,N*-dimetilformamida (DMF) PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- sódio metálico - Merck;
- cloreto de tionila - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- BOC-benzil-*L*-serina – Advanced ChemTech ;
- BOC-*L*-alanina - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- diciclohexilcarbodiimida (DCC) - Advanced ChemTech ;
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP) - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- tetrahidrofurano (THF) - Merck;
- trietilamina (TEA) - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório ;
- acetato de etila - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- bicarbonato de sódio - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- ácido cítrico - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) 99,9% – Cambridge Isotope Laboratories, Inc.;

- água deuterada (D₂O) 99,9% – Cambrigde Isotope Laboratories, Inc.;
- dimetilsulfóxido Hybri-max® - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- pentacloreto de fósforo - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- pentóxido de fósforo - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- Silicagel 60 (0,063-0,200mm) – Merck.

1.2. Equipamentos:

- Aparelho digital para determinação da faixa de fusão Micro-Química modelo MQAPF-301;
- Balança analítica digital Ohaus com quatro casas decimais;
- Balança digital Marte com três casas decimais;
- Espectrofotômetro de Infravermelho Shimadzu IR-470;
- Rotaevaporador Fisatom;
- Espectrômetro Bruker, modelo Advance DPX-300MHz;
- Microscópico óptico Olympus BX 60;
- Câmara de NeubauerHausser Scientific – 0.100 mm deep – Lery Hemacytometer.

2. MÉTODOS:

2.1. Planejamento e síntese dos compostos 5-nitro-2-tioflidênicos

2.1.1. Planejamento das séries

Foram planejadas neste trabalho as preparações, por meio de modificações moleculares, de duas séries de compostos a serem, em uma etapa posterior, utilizados como ligantes para obtenção de pró-fármaco dirigido para Doença de Chagas. São elas:

Série I – Derivados oxadiazolínicos: Preparados de por meio da ciclização de 5-nitro-2-tioflidênicos *para*-substituídos (5-NTB);

Série II – formação do conjugado dipeptídeo-derivado tiofilidênico (5-NTB), utilizando os aminoácidos serina e alanina.

Os compostos 5-nitro-2-tiofilidênicos envolvidos nesse projeto foram obtidos no Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, PDF, do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP, sob coordenação do Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares, orientador deste trabalho.

A escolha dos grupos substituintes que compõe a série dos compostos de partida foi feita com base no Diagrama de Craig (CRAIG, 1971), buscando utilizar grupos localizados nos quatro quadrantes deste gráfico.

2.1.2. Método de obtenção dos compostos de partida: 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas *para*-substituídas (5-NTB-X)

Os compostos foram sintetizados partindo-se dos respectivos ácidos benzóicos substituídos, utilizando a seguintes rota sintética:

2.1.2.1 Esterificação dos ácidos benzóicos *para*-substituídos:

Adiciona-se ao ácido benzóico (1), metanol anidro em excesso (1:50) e ácido sulfúrico concentrado em quantidades catalíticas, mantém-se o sistema sob refluxo por

quatro horas. Após esse período reduz-se o volume de metanol em 50% e observa-se a precipitação do produto desejado, que é então, filtrado e lavado com várias porções de água. O éster (2) é seco em presença de pentóxido de fósforo (TAVARES *et al.*, 1999a).

2.1.2.2. Obtenção das benzidrazidas a partir de benzoato de metila:

A uma solução de hidrato de hidrazina 64%, aquecida a 50-60 °C, adiciona-se lentamente o benzoato de metila, sob agitação magnética e mantém-se esse meio reacional em refluxo por aproximadamente 10 minutos. Em seguida resfria-se a solução, em banhos sucessivos de água, gelo e gelo seco/etanol e observa-se a precipitação da benzidrazida (3) que é filtrada e seca em presença de pentóxido de fósforo (TAVARES *et al.*, 1999a).

2.1.2.3. Obtenção da base de Schiff, compostos 5-nitro-2-tiofilidênicos:

Adiciona-se, sob agitação constante, 5-nitro-2-tiofenocarboxaldeído à mistura de água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético glacial e metanol PA na proporção 8:7:8:20, respectivamente. Aquece-se o meio reacional até temperatura de refluxo, procedendo-se a adição lenta e constante da benzidrazida substituída (3). O sólido (4) formado deve ser filtrado, lavado com água destilada gelada e seco em presença de pentóxido de fósforo. A fim de garantir a pureza dos compostos obtidos procede-se à recristalização desses de mistura dimetilformamida/água (TAVARES *et al.*, 1999a).

Observação: neste trabalho foi realizada apenas a preparação da base de Schiff, uma vez que se dispunha no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, PDF, das benzidrazidas *para*-substituídas previamente sintetizadas por REZENDE, 2002 e MASUNARI *et al.*, 2003.

2.2. Modificação Molecular em 5-nitro-2-tiofilidêno benzidrazidas, com vista à obtenção de pró-fármaco com atividade antichagásica

Apresenta-se a seguir, Figura 23, as rotas de síntese utilizadas na modificação molecular nos compostos de partida - 5-nitro-2-tiofilidêno benzidrazidas *para-*substituídas - visando a obtenção das duas séries de compostos a serem, posteriormente, utilizados na obtenção de pró-fármacos de derivado do ácido siálico com potencial atividade antichagásica.

Figura 23 Rotas de síntese utilizadas na obtenção de derivados de 5-nitro-2-tiofilidêno benzidrazidas *para*-substituídas.

2.2.1. Obtenção das oxadiazolinas 3-acetil-2,5-substituídas: derivados ciclizados de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida 4-substituída - **Série I**

Ao composto 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida 4-substituída (4) adiciona-se anidrido acético, na proporção de 1:20 respectivamente. Mantém-se em refluxo o meio reacional por um período de 3-6 horas de acordo com o grupo substituinte. Decorrido o tempo de reação verte-se a solução em gelo picado, levando à precipitação do produto. O sólido obtido (5) é recristalizado de sistema etanol/ água e seco em presença de pentóxido de fósforo.

2.2.2. Método de síntese empregados na obtenção da **Série II**: Acoplamento do Agente Espaçante

Rota 1: Obtenção do dipeptídeo Ser-Ala

1. Obtenção do éster metílico da alanina

Visando a proteção do grupo carboxílico da alanina prepara-se o éster metílico da seguinte forma (ZIELINSKI *et al.*, 2002): adiciona-se lentamente cloreto de tionila, em ambiente anidro, a solução de alanina (6) e metanol anidro, resfriada em banho de

gelo. Após agitação magnética por uma hora sob temperatura ambiente, reduz-se o volume de solvente por rotaevaporação e cristaliza-se o éster formado por resfriamento. O produto (7) obtido deve ser recrystalizado de isopropanol/n-hexano e seco em presença de pentóxido de fósforo.

2. Obtenção do dipeptídeo Serina-Alanina (Ser-Ala)

Dissolve-se a alanina anteriormente esterificada (7), 1-hidroxibenzotriazol, HOBT, e o componente carboxílico (8), na proporção 1:1:1; (n:n:n) em THF seco, resfriando a solução resultante em banho de gelo e acetona. Em seguida adiciona-se dicitlohexilcarbodiimida, DCC. Mantém-se a mistura sob agitação magnética por uma hora a 0 °C e por mais três horas sob temperatura ambiente. A reação deve ser acompanhada por CCD (CHCl_3 :MeOH:AcOH, 95:5:3, v/v/v) e, após seu término, a solução é filtrada para remoção do dicitlohexilurea, DCU, formado. Ao filtrado acrescenta-se solução de Na_2CO_3 0,2 M, esta deve ser extraída com AcOEt e lavada com solução 0,2 M de ácido cítrico. Após secagem com Na_2SO_4 , o solvente é eliminado e o produto (5) deve ser purificado em coluna cromatográfica (A - CH_3Cl :MeOH:HAc, 95:5:3, v/v/v e B - n-hexano:AcEt, 1:1, v/v).

Rota 2: Acoplamento da alanina aos derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos**1. Ligação Direta**

Adiciona-se, sob agitação magnética constante, 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida à mistura de BOC-Ala (10), HOBt e THF. Resfria-se o meio reacional por meio de banho de gelo/ acetona a 0 °C e introduz-se o DCC previamente solubilizado em THF. Após uma hora retira-se o banho e mantém-se a mistura reacional sob a temperatura ambiente. Acompanha-se com CCD (CH₃Cl:MeOH:HAc, 95:5:3, v/v/v). Ao final deste tempo a solução obtida deve ser filtrada e a solução extraída com solução de bicarbonato de sódio 0,2 M, acetato de etila, ácido cítrico 0,2 M e novamente acetato de etila. Após secagem com Na₂SO₄ elimina-se o solvente por rotaevaporação e o produto (11) deve ser dessecado em presença de pentóxido de fósforo.

2. Formação do sal sódico de derivados de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida

Ao etanol previamente seco adiciona-se sódio metálico, sob agitação magnética e ambiente anidro. Acrescenta-se, após formação completa do etóxido de sódio, o derivado de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida (4), mantendo o sistema sob refluxo por três horas. O sólido (12) é isolado por eliminação do solvente por rotaevaporação (SCORDAMAGLIA *et al.*, 2003).

3. Acoplamento do BOC-*L*-alanina aos derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos

À solução de BOC-Ala (10) em DMF/THF (1:1) e banho de gelo, adiciona-se o produto obtido no item anterior (item 2) e ajusta-se o pH para 7-8 com trietilamina (TEA). Em seguida coloca-se o HOBT/DCC previamente dissolvidos em THF e novamente ajusta-se o pH para 7-8 com TEA. Retira-se o banho de gelo após uma hora de reação e mantém-se a mistura sob temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD (CH₃Cl:MeOH:HAc, 95:5:3, v/v/v). Após 12 horas a solução deve ser filtrada e extraída com solução de bicarbonato de sódio 0,2 M, acetato de etila, ácido cítrico 0,2 M e, novamente, acetato de etila. Após secagem com Na₂SO₄ o

solvente deve ser eliminado e o produto (13) dessecado em presença de pentóxido de fósforo.

4. Acoplamento de derivados de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida a Ala-Cl gerado *in situ*

À alanina (6) dissolvida em clorofórmio seco goteja-se lentamente solução de pentacloreto de fósforo (PCl_5) sob condições suaves de temperatura (aproximadamente 18°C). A mistura reacional deve ser agitada até não mais se observar liberação de HCl . O meio reacional deve ser filtrado e o precipitado (14) recolhido para a próxima etapa.

Método 1: reage-se o cloreto da alanina (14) obtido anteriormente com o sal sódico de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida (12) seguindo a metodologia descrita no item 3.

Método 2: Sob atmosfera de N_2 adiciona-se o sal sódico do derivado 5-nitro-2-tiofilidênico (12), DMAP (10%) e DMSO. Aquece-se a solução até 40°C e acrescenta-se alanina previamente tratado com pentacloreto de fósforo (14). Após 15 horas de

reação filtra-se a mistura e as porções obtidas após eliminação do solvente por rotaevaporação devem ser dessecadas em presença de pentóxido de fósforo.

2.3. Ensaio de Atividade Biológica com as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*

2.3.1. Preparo do inóculo

A cultura cepa Y de *T. cruzi* é mantida em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) idealizado por Yagger (in CAMARGO, 1964; FERNANDES & CATELLANI, 1966), cuja composição é: NaCl 0.4%; KCl 0.04%; Na₂HPO₄ 0.8%; glicose 0.2%, triptose 0.5% e infusão de fígado 0.5% (p/v), enriquecido com 10% de soro bovino (v/v); pH ajustado para 7.2 e incubado a 68 °C por uma hora. Após resfriamento até temperatura ambiente, adiciona-se solução de hemoglobina bovina para obter concentração final de 2%(v/v). A esterilização do meio é realizada por filtração em membrana milipore de 0.22 mm e esse é armazenado em frascos de vidro e estocado sob 4 °C até sua utilização (GONÇALVES, 1978).

O preparo deste meio de cultura, bem como os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Parasitas, Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, sob coordenação da Profa. Tit. Maria Júlia Manso Alves e orientação da mestre Marinei F. Gonçalves.

No preparo do inóculo para a realização dos ensaios da atividade de compostos frente ao *T. cruzi*, faz-se, inicialmente, a verificação da morfologia das células contidas em solução por meio da visualização de uma pequena alíquota desta, em microscópio óptico. Verifica-se a forma, coloração e atividade locomotora dos parasitas em cultura.

Em seguida determina-se, por contagem em câmara de Neubauer, o número de parasitas contidos em cada mL da cultura. De posse desse valor calcula-se o volume a ser introduzido em cada tubo do ensaio, de forma a garantir uma concentração inicial de 20×10^6 parasitas/mL, número de parasitas indicado para início dos testes.

2.3.2. Preparo da solução-mãe dos compostos a serem testados

Preparam-se soluções dos compostos a serem ensaiados em 10 mL DMSO. Transfere-se 2,5 mL dessa solução para frasco contendo 7,5 mL de meio LIT. O volume utilizado nos ensaios varia de acordo com a quantidade pesada de cada amostra e a concentração que se deseja ensaiar.

2.3.3. Preparo do ensaio

O ensaio é realizado em tubos tipo falcon, sendo o volume final de solução teste igual 1 mL. Sabendo-se o volume de inóculo e o quanto da amostra de fármaco é preciso para se atingir a concentração desejada, verifica-se a necessidade de adicionar ou não meio de cultura para completar o volume. Sendo necessário, adiciona-se, primeiramente, o meio LIT, em seguida a solução mãe dos compostos e por último o volume de inóculo anteriormente determinado.

Cada série, realizada em duplicata, é composta por:

- a) tubo de controle da cultura de *T. cruzi* utilizada, em que são colocados apenas o meio LIT e o inóculo;
- b) tubo de controle da ação do co-solvente, DMSO, sob os parasitas, no qual se coloca o solvente, o inoculo e completa-se o volume com o meio de cultura;
- c) tubos com o composto que se deseja ensaiar, em diversas concentrações, meio LIT e inóculo.

2.3.4. Leitura do ensaio

A leitura do ensaio é realizada por meio de contagem, em câmara de Neubauer, das formas epimastigotas contidas em alíquotas de aproximadamente 20 μ L do ensaio recém diluída (50x) em meio LIT.

A mesma observação da morfologia realizada no preparo do inóculo é realizada antes de cada leitura, verificando-se assim as possíveis alterações nos parasitas, principalmente na forma da célula e motilidade do flagelo em decorrência da presença dos compostos em solução.

A primeira leitura é realizada logo após a inoculação dos tubos, a fim de se determinar a concentração inicial e os primeiros efeitos dos compostos. As leituras subsequentes são realizadas com 24 e 48 horas.

Resultados e Discussão

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram realizados em espectrômetro Shimadzu IR – 470, utilizando dispersão em KBr. Para análise espectrométrica de RMN-¹H utilizou-se espectrofotômetro BRUKER modelo ADPX Advanced 300MHz, sendo todas as amostras preparadas em DMSO-d₆. Os espectros encontram-se em Anexos.

1. Planejamento e síntese dos compostos 5-nitro-2-tiofilidênicos

1.1. Planejamento das séries

A escolha racional de grupos substituintes para a formação de séries de compostos análogos adequados para estudos de QSAR/SAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships/ Structure-Activity Relationships*) é de fundamental importância para o sucesso do estudo. Neste sentido, o emprego do Diagrama de Craig (CRAIG, 1971) na seleção destes grupos substituintes, tem sido freqüentemente empregada por especialistas da área de desenvolvimento de fármacos (BURGER, 1995; FOYE, 1995; TAVARES, 2004).

O Diagrama de Craig, Figura 24, é um gráfico bidimensional que correlaciona variáveis, propriedades físico-químicas importantes na atividade farmacológica de estruturas químicas como, por exemplo, efeitos hidrofóbicos, eletrônicos (TAVARES & FERREIRA, 2002; TAVARES, 2004).

Ao se planejar o estudo de QSAR utilizando esse método, deve-se escolher a maior dispersão possível no diagrama, utilizando substituintes de todos os quadrantes do gráfico, obtendo dessa uma grande variabilidade dos parâmetros estudados. Quando se deseja analisar apenas um parâmetro, escolhem-se os substituintes próximos a uma linha imaginária paralela ao eixo da propriedade a ser estudada, propiciando, assim, variação mínima em uma das propriedades e ampla na propriedade de interesse (TAVARES & FERREIRA, 2002; TAVARES, 2003 ;TAVARES, 2004).

Os grupos substituintes que compõe a série de compostos escolhida para realização desse trabalho foram selecionados com o auxílio do Diagrama de Craig considerando os parâmetros π de Hansch que se refere à hidrofobicidade e a constante de grupo de Hammett, σ , que se refere à distribuição eletrônica.

Encontram-se, na figura 24, os grupos substituintes selecionados para as duas estratégias de modificação molecular propostas neste trabalho. A saber:

- não-substituído ($R = -H$);
- 4-bromo substituído ($R = -Br$);
- 4-cloro substituído ($R = -Cl$);
- 4-metil substituído ($R = -CH_3$);
- 4-dimetilamino substituído ($R = -N(Me)_2$);
- 4-ciano substituído ($R = -CN$);
- 4-hidroxi substituído ($R = -OH$) e
- 4-amino substituído ($R = -NH_2$).

Figura 24. Diagrama de Craig
(CRAIG, P. N., 1971)

1.2. Método de obtenção dos compostos 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas 4-substituídas

Dentre os derivados escolhidos para o início do trabalho dois deles tiveram que ser sintetizados a partir das benzidrazidas substituídas. São eles:

- *5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida e*
- *5-nitro-2-tiofilideno-4-bromobenzidrazida.*

Os demais análogos desta série: *5-nitro-2-tiofilideno-4-clorobenzidrazida*, *5-nitro-2-tiofilideno-4-metilbenzidrazida*, *5-nitro-2-tiofilideno-4-dimetilamino*, *5-nitro-2-tiofilideno-4-cianobenzidrazida*, *5-nitro-2-tiofilideno-4-hidroxibenzidrazida* e *5-nitro-2-tiofilideno-4-aminobenzidrazida*; já se encontravam disponíveis (MASUNARI & TAVARES, 2005; REZENDE, 2002) no Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos da FCF/USP.

A série de derivados ciclizados, 3-acetil-oxadiazolinas 2,5-substituídas, tem correspondência, em termos de grupos substituintes, com a série extendida acima citada. São elas:

- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno benzidrazida*,
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-bromobenzidrazida*,
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-clorobenzidrazida*,
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-metilbenzidrazida*,
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-dimetilaminobenzidrazida*,
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-cianobenzidrazida*,
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-hidroxibenzidrazida e*
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-aminobenzidrazida.*

O método de síntese dos derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos *p*-substituído a partir das benzidrazidas correspondentes, envolve reação de adição nucleofílica (MORRISON, BOYD, 1996). Inicialmente, em decorrência do pH ácido do meio reacional, ocorre a protonação do oxigênio carbonílico do grupamento aldeído tornando-o suscetível ao ataque do nucleófilo (benzidrazida). A reação se completa com o ataque desse nucleófilo a uma amina primária no centro deficiente em elétrons, ocorrendo, então, a liberação de uma molécula de água.

Para tanto, o meio reacional deve estar suficientemente ácido para que ocorra a protonação de fração apreciável do composto carbonílico, sem permitir decréscimo acentuado da concentração de composto nitrogenado livre, por isso trabalha-se com mistura de ácidos nessa etapa. Dessa forma, nota-se que a basicidade da amina e a reatividade da substância carbonílica são as principais condições envolvidas na determinação da velocidade desta reação (MORRISON, BOYD, 1996).

O sistema de recristalização – DMF/ água – foi escolhido para remoção dos possíveis resíduos de hidrazida que não reagiu. O sólido obtido foi lavado com água destilada gelada, em pequenas porções, diminuindo, assim, a possibilidade de perda do produto da reação (TAVARES, 1999).

A identificação dos compostos obtidos se deu por análise espectrométrica de IV e RMN ^1H (Anexo, figuras I a IV) e o grau de pureza dos produtos foram determinados por comparação da faixa de fusão da literatura com os valores experimentais. Apresenta-se, na Tabela 1, os valores de rendimento e faixas de fusão experimental e da literatura dos compostos obtidos.

Tabela 1. Rendimentos das reações de formação da ligação imino e faixa de fusão de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas 4-substituídas.

R	Concentração molar dos reagentes (mol)		Rendimento (%η)		Faixa de Fusão (° C)	
	(1)	(2)	Lit.*	Exp.	Lit.*	Exp.
H	0.02	0.02	98	98	246,5-247,3	245,8-247,0
Br	0.006	0.006	92	97	274,4-276,6	274,5-276,0

*Literatura de referência: MASUNARI & TAVARES, 2005 e REZENDE, 2003.

Apresenta-se, nas Tabelas 2 e 3, a comprovação das estruturas químicas planejadas por análise espectrométrica de IV e RMN-¹H, respectivamente.

Tabela 2. Principais bandas de absorção ν (cm⁻¹) na região do Infravermelho de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas 4-substituídas.

R	N-H (amida 2ª)	C=O (amida)	C=C (aromático)	N-H (banda II de amida 2ª)	NO ₂ (assim.)	NO ₂ (sim.)	C-H (fora do plano, arom.)	C-S
H	3250	1645	1595 e 1487	1543	1521	1331	701	629
Br	3345	1653	1602 e 1490	1555	1528	1333	812	630

Tabela 3. Principais sinais de RMN-¹H (ppm) em DMSO-d₆ 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas substituídas.

R	N-H (s, 1H)	N=CH (s, 1H)	Ar-H _{tiofênico} (d, 2H)	Ar-H _{benzeno} (d, 2H)
H	12,24	8,69	8,15 e 7,92 (J = 6,65 HZ)	7,65-7,52(m)
Br	12,31	8,67	8,14 e 7,60 (J = 4,27HZ)	7,77-7.61 (J*)

A análise dos espectros confirma a ligação do carboxaldeído à benzidrazida pela observação do aparecimento do sinal do hidrogênio da ligação imina, N=CH, formada – um singlete por volta de 8,60 ppm. Verifica-se também, a confirmação dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos tanto do anel tiofênico como do anel benzênico, Anexo – figuras I e III.

A manutenção da substituição no anel aromático na posição *para* foi verificada pelas bandas no espectro de absorção na região do infravermelho em 1037 cm⁻¹ referente ao estiramento C-Br, Anexo – figuras I e II.

2. Modificação Molecular em 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas, com vistas a obtenção de pró-fármaco com atividade antichagásica

Série I - Obtenção das 3-acetil-oxadiazolinas 2,5-substituídas: derivados ciclizados das 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas 4-substituídas

Estudos recentes realizados por ROLLAS e colaboradores (ROLLAS *et al.*, 2002; DURGUN *et al.*, 1993; ERGENÇ *et al.*, 1989) indicaram aumento pronunciado da atividade antimicrobiana de alguns derivados ciclizados com estrutura semelhante aos

compostos 5-nitro-2-tiofilidênicos, abordados neste trabalho como potenciais ligantes antichagásicos.

Ensaio preliminares realizados no Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos – PDF – sob orientação do Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares, orientador deste trabalho, confirmaram aumento da atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* para o composto ciclizado obtido a partir do derivado 5-nitro-2-tiofilidênico não substituído (dados ainda não publicados).

Atribuí-se a atividade antiparasitária dos compostos 5-nitro-heterocíclicos ao mesmo mecanismo de redução do grupo NO_2 - stress oxidativo - evidenciado para a atividade antibacteriana. Dessa forma, acredita-se que esse aumento da atividade dos compostos ciclizados seja também observado em relação à atividade antichagásica.

A fim de verificar tal evidência, preparou-se uma série de derivados ciclizados (Série I) e avaliou-se a atividade destes frente a cepa Y do *T. cruzi*, vislumbrando assim, alternativas para a obtenção de possíveis ligantes para o pró-fármaco dirigido de derivados tiofilidênicos, objetivo maior deste trabalho.

A formação do anel oxadiazolínico ocorreu em meio de anidrido acético mantido sob refluxo por período de 3 a 6 horas, podendo, esse tempo, variar de acordo com o grupo substituinte no anel aromático. O mecanismo de fechamento desse anel proposto por Durgun e colaboradores (DURGUN *et al.*, 1993) está esquematizado na Figura 25.

Foram preparados os derivados ciclizados do composto não substituído ($\text{R} = \text{H}$), 4-bromosubstituído ($\text{R} = \text{Br}$), 4-clorosubstituído ($\text{R} = \text{Cl}$), 4-metilsubstituído ($\text{R} = \text{CH}_3$) e 4-cianosubstituído ($\text{R} = \text{CN}$) e 4-hidroxisubstituído ($\text{R} = \text{OH}$). Estes compostos foram recristalizados do sistema etanol/ água visando a remoção de impurezas evidenciadas nas análises espectrométricas iniciais. O sistema DMF/ H_2O utilizado para purificação dos compostos de partida mostrou-se inadequado para a série dos derivados ciclizados, fato comprovado através de análises espectrométricas que mostraram sinais

referentes aos compostos de partida, sugerindo a abertura do anel sob essas condições.

Figura 25. Mecanismo de formação do anel oxadiazolínico
(Esquema adaptado de DURGUN *et al.*, 1993)

A não formação das oxadiazolinas dos derivados 4-amino ($R = \text{NH}_2$) e 4-dimetilamino substituídos ($R = \text{N}(\text{Met})_2$) pode ser explicada pelo fato destes grupos substituintes se comportarem como centros reativos frente ao anidrido acético, competindo, assim, com o nitrogênio da ponte azometínica. Sugere-se, no entanto, como alternativa viável para obter esses compostos a utilização de grupos protetores.

Apresenta-se, na Tabela 4, os rendimentos e faixas de fusão dos derivados 3-acetil-2,5-tiofilideno benzidrazida 4-substituídas oxadiazolinas.

Tabela 4. Rendimento e faixa de fusão dos derivados 3-acetil-2,5-tiofilideno benzidrazida 4-substituídas oxadiazolinas.

R	Fórmula Molecular	Massa Molecular	Rendimento (% η)	Faixa de fusão (° C)
H	C ₁₄ H ₁₁ O ₄ N ₃ S	314,30	88	210-212
OH	C ₁₄ H ₁₁ O ₅ N ₃ S	333,30	73	178-179
Br	C ₁₄ H ₁₀ O ₄ N ₃ SBr	395,39	90	141,7-142,9
Cl	C ₁₄ H ₁₀ O ₄ N ₃ SCl	351,79	92	130-132
CH ₃	C ₁₅ H ₁₃ O ₄ N ₃ S	329,30	98	126,4-126,6
CN	C ₁₅ H ₁₀ O ₄ N ₄ S	344,23	83	181,8-182,4

A identificação dos compostos obtidos foi realizada por determinação da faixa de fusão e por análise de ressonância magnética de prótons, Anexo - figuras V a X, uma vez que a modificação estrutural ocorrida nesse caso é facilmente identificada por esses métodos. Apresenta-se, no Quadro 2, os principais sinais de RMN¹H utilizados na comprovação das estruturas químicas planejadas.

Quadro 2. Principais sinais de RMN-¹H (ppm) em DMSO-d₆ 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno benzidrazida-4-substituída.

RMN ¹H (300MHz, DMSO-D₆, δ, J):

- **3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno benzidrazida (R = H):** H₁: d.; 7,47-7,46 ppm (J = 4,25Hz); H₂: d.; 8,07-8,06 ppm (J = 4,27Hz); H₄ a H₆: s. 2,27 ppm; H₇ e H₁₀: m., 7,56-7,52ppm; H₈, H₉ e R : m., 7,47-7,46 ppm (J = 7,57Hz).
- **3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-bromobenzidrazida (R = Br):** H₁: d.; 7,47- 7,46 ppm (J = 4,24Hz); H₂: d.; 8,07-8,05 ppm (J = 4,19Hz); H₃: s.; 7,56 ppm; H₄ a H₆: s., 2,26 ppm; H₇ e H₁₀ s*, 7,76-7,73 ppm .
- **3-acetil-2,5-tiofilideno-4-clorobenzidrazida oxadiazolina (R = Cl):** H₁: d.; 7,47- 7,46 ppm (J = 4,15Hz); H₂: d.; 8,07-8,05 ppm (J = 4,24Hz); H₃: s.; 7,56 ppm; H₄ a H₆: s.; 2,26 ppm; H₇ e H₁₀ d.; 7, 63-7,60 ppm (J = 8,42Hz); H₈, H₉: d.; 7,86-7,83(J = 8,41Hz) .
- **3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-metilbenzidrazida (R = CH₃):** H₁: d.; 8,10- 8,08 ppm (J = 4,26Hz); H₂: d.; 7,48-7,47 ppm (J = 4,25Hz); H₃: s.; 7,57 ppm; H₄ a H₆: s.; 2,29 ppm; H₇ e H₁₀ m.; 7,40-7,38ppm (J = 8,09Hz); H₈, H₉: d.; 7,79-7,76 (J = 8, 51Hz).
- **3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-cianobenzidrazida (R = CN):** H₁: d.; 7,80- 7,79 ppm (J = 3,85Hz); H₂: d.; 7,35-7,34 ppm (J = 3,83Hz); H₃: s.; 7,49 ppm; H₄ a H₆: s.; 2,37 ppm; H₇ a H₁₀ m.; 8,11-8,05 ppm.
- **3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-hidroxibenzidrazida (R = OH):** H₁: d.; 7,55-7,53 ppm (J = 4,24Hz); H₂: d.; 8,14-8,13 ppm (J = 4,24Hz); H₃: s.; 2,36 ppm; H₄ a H₆: s.; 2,47 ppm; H₇ e H₁₀ d., 7,99-7,96 ppm (J = 8,65Hz); H₈ , H₉: d., 7,33-7,31 ppm (J = 8,72Hz); OH: s.; 7,64 ppm; H₆: s.; 7,64ppm.

Para comprovação da estrutura química obtida, observou-se, nesses espectros, o desaparecimento dos sinais dos hidrogênios ligados ao nitrogênio, -CO-NH-, por volta de 12 ppm e do hidrogênio azometínico, -N=CH-, singlete por volta de 9-8 ppm, característicos dos compostos de partida. Aliado a isso, verificou-se em todos os compostos obtidos o surgimento dos prótons metílicos referentes ao grupo acetil – singlete em torno de 2 ppm - e do único hidrogênio do anel oxadiazolínico formado – singlete na região de 6,95-7,18 (DURGUN *et al.*, 1993). Esse deslocamento, não usual, do hidrogênio do anel formado pode ser explicado com base na mudança no estado de hibridização do carbono a esse ligado, que de sp^2 passa para sp^3 (ERGENÇ *et al.*, 1988; DURGUN *et al.*, 1993).

Observa-se, no espectro de RMN¹H do composto não substituído ciclizado, uma distorção em relação à multiplicidade desses hidrogênios, em função da sobreposição do sinal desse ao do hidrogênio em posição *orto* (H₇ e H₁₀) do anel aromático.

Série II. Acoplamento do Agente Espaçante

Rota 1: Obtenção do dipeptídeo Ser-Ala

A ligação entre aminoácidos é conhecida como ligação peptídica e, nada mais é, do que uma reação de amidificação envolvendo o grupo carboxílico de um aminoácido e a porção amino de outro, liberando uma molécula de água. Essa ligação é considerada, atualmente, como sendo uma reação multi-etapas, que se inicia com a ativação do componente carboxílico, seguido pelo ataque do grupamento amino do aminoácido que se deseja anexar. A ativação é o passo mais importante nessa reação, uma vez que possibilita o ataque do grupamento amino (BAYLE, 1990).

Como agente ativante optou-se, neste trabalho, pela utilização da diciclohexilcarbodiimida (DCC) conforme método proposto por Bodanszky (BODANSZKY *et al.*, 1984). A ação dessa carbodiimida inicia-se pela adição do grupo carboxílico à função carbodiimida (carbono deficiente de elétrons) formando o intermediário reativo O-acilusourea. Este intermediário é um potente agente de acilação que faz com que o carbono do grupo carboxílico fique completamente susceptível ao ataque do grupo amina da alanina, Figura 26. Após esse ataque, o agente ativante é convertido em diciclohexilurea (DCU), facilmente removida do meio reacional por filtração, uma vez que é praticamente insolúvel na maioria dos solventes (BODANSZKY *et al.*, 1984; BAYLE, 1990).

Figura 26. Reação de Amidificação via *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

(Esquema adaptado de SOLOMONS, 1996)

A alta reatividade do intermediário O-acilusourea, ao mesmo tempo em que facilita a reação pode levar à formação de produtos indesejáveis através da ocorrência de reações de acil-transferência intramoleculares. Essas reações podem competir com

o ataque do nucleófilo externo, promovendo a formação do intermediário *N*-acilurea, produto menos reativo, que além de reduzir o rendimento acarreta problemas de purificação. Para evitar a formação desse intermediário, adiciona-se, ao meio reacional, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), Figura 27, um eficiente gerador de éster *in situ* que apresenta como principal função o impedimento de tal rearranjo.

Figura 27. Estrutura química do 1-hidroxibenzotriazol.

Uma vez que os aminoácidos caracterizam-se estruturalmente por apresentarem, em uma mesma molécula, as duas funções envolvidas nessa ligação – ácido carboxílico e grupamento amino – faz-se necessário lançar mão de mecanismos que assegurem o direcionamento correto dessa ligação. Para tanto, pode-se proteger as extremidades não envolvidas na formação do peptídeo, assegurando, que ocorra apenas a ligação entre os grupos desejados ocorra (FAUCHEERE *et al.*, 1981; GEIGER *et al.*, 1981; ROESKE, 1981; GREENE *et al.*, 1999).

No presente trabalho, utilizou-se como agente espaçante, para obtenção de pró-fármacos dirigidos, o dipeptídeo serina-alanina. Assim, a ligação peptídica deve ocorrer entre o grupo carboxílico da serina e a porção amino da alanina, Figura 28. Esse direcionamento de ligação, no sentido de formação do dipeptídeo Ser-Ala, envolve a necessidade de proteção dos grupos terminais não envolvidos na ligação – grupo amino da serina e porção ácida da alanina.

Figura 28. Esquema de obtenção do dipeptídeo Ser-Ala.

Uma vez que se parte da serina comercial diprotéida – BOC-benzil-*L*-Serina – iniciou-se a preparação do dipeptídeo pela proteção do outro aminoácido envolvido. A proteção da alanina foi realizada por meio da reação de esterificação a fim de garantir a não participação da função ácida desse aminoácido na ligação. Em princípio, tentou-se a metilação da hidroxila ácida pela passagem de HCl seco em solução do aminoácido em metanol anidro, conforme descrito por Morrison e Boyd (MORRISON e BOYD, 1996).

O resíduo obtido apresentou aspecto oleoso e coloração levemente amarelada, característica mantida mesmo após rotaevaporação de todo o solvente. Na tentativa de isolar o éster da alanina, vários solventes foram testados como sistema de cristalização, tais como *n*-hexano/isopropanol, *n*-hexano/acetato de etila, entre outros. Não foi possível, todavia, isolar o produto esperado.

Partiu-se, então, para a execução de outro método (ZIELINSKI *et al.*, 2002), no qual se utilizou cloreto de tionila como aceptor de prótons, adicionando-o lentamente à solução de metanol anidro e alanina. Obteve-se produto esperado com rendimento

inicial de 88%, que foi elevado para 93% em reações subseqüentes através do aumento do tempo de cristalização em isopropanol/*n*-hexano.

A confirmação estrutural do éster metílico da alanina foi realizada por RMN ^1H , Anexo – figura XI. Observando o desaparecimento do sinal atribuído a hidroxila da porção ácida e o surgimento do sinal característico da metila do éster formado – singleto em 3,70 ppm. Apresenta-se no Quadro 3, os sinais identificados:

Quadro 3. Principais sinais de RMN- ^1H (ppm) em DMSO- d_6 do éster metílico da alanina

Observa-se no espectro de ressonância de hidrogênio do éster metílico da alanina que o sinal dos prótons da metila ligada ao éster (H₇, H₈ e H₉) aparecem deslocados em relação ao sinal da outra metila da molécula (H₄, H₅ e H₆). Essa diferença é explicada pelo fato da primeira estar ligada a um heteroátomo, oxigênio, que por ser mais eletronegativo ocasiona uma maior desproteção dos prótons, deslocando-os para campo mais baixo (PAVIA, 1996) - de 1,41/1,31 ppm para 3,70 ppm.

A ampliação desse espectro na região de $\delta = 8,7$ ppm mostra que o sinal dos hidrogênios H₁ e H₂ – singleto em 8,73 ppm – apresenta uma particularidade em

relação aos outros sinais observados; trata-se de um singlete largo, ou seja, a sua largura é superior à encontrada no duplete e no quarteto analisados. Esse fenômeno é possível uma vez que os H ligados a um átomo de nitrogênio podem sofrer trocas rápidas, intermediárias ou lentas e essa velocidade de troca associada a outros fatores como, por exemplo, o momento do quadrúpulo elétrico do núcleo de ^{14}N são responsáveis pelas características dos sinais desses na RMN ^1H (SILVEIRSTEIN *et al.*, 2000).

Associada à análise espectrométrica, a determinação da faixa de fusão do produto seco (F.f._{lit.} = 107–110°C; F.f._{exp.} = 107,5–110,6°C) e sua proximidade com a da literatura confirmou a identidade e o grau de pureza do produto obtido.

Apesar da utilização do HOBt na preparação do dipeptídeo Ser-Ala, os resultados obtidos nestas sínteses não se mostraram satisfatórios.

Visando obter melhores resultados partiu-se para modificações na metodologia inicialmente proposta, tais como:

- a) troca da base de TEA para DMAP, piridina e até mesmo o uso concomitante de TEA e DMAP;
- b) alterações de pH. Foram testadas faixas acima e abaixo de 7-8.

Em nenhum desses casos observou-se melhora significativa. Apenas isolou-se no final da reação, o material de partida em concentração próxima à inicial.

Em todos os casos acompanhou-se as reações por cromatografia em camada delgada, CCD e, apesar de se observar em alguns procedimentos o aparecimento de uma mancha nova, de R_f próximo ao esperado para o dipeptídeo – R_f_{lit.}: 0,80 e R_f_{exp.}: 0,78 (PARR *et al.*, 1977) – as manchas atribuídas aos aminoácidos livres permaneciam, sendo a da serina a mais perceptível.

Na análise de RMN ^1H observou-se manutenção do sinal atribuído à hidroxila da porção ácida da serina, o que aliado ao fato de a integral do sinal dos hidrogênios do

anel aromático acusar a presença de 10 prótons, ou seja, a existência de dois tipos de anel aromático; sugerem a presença desse aminoácido na sua forma livre. Um vez que não se trabalhou com excesso, concluiu-se que, apesar de ocorrer a formação da ligação, entre os aminoácidos, essa não se completou em maneira apreciável mesmo após 24 horas.

Os melhores resultados foram obtidos nas reações em que se manteve o pH entre 7-8 e utilizou-se como solvente TEA e THF seco. Mesmo assim, o rendimento bruto dessa reação não ultrapassou 10% e o produto obtido, apesar de apresentar características físicas de acordo com o esperado, óleo amarelo de alta viscosidade, estava visualmente impuro. A purificação do óleo por cristalização não foi executada satisfatoriamente, possivelmente pelo fato da estrutura química desses compostos proporcionar a ocorrência de anfotericidade, o que dificulta, em muito, a escolha de um sistema de solventes eficiente para utilização desse método de purificação.

Na tentativa de confirmar a formação da ligação peptídica no produto obtido realizou-se análise de RMN ^1H do material recristalizado em diclorometano, Anexo - figura XII. Os dados obtidos na espectrometria de prótons são demonstrados no Quadro 4.

A partir da análise de espectrometria de prótons, demonstrada no Quadro 4, acredita-se que a formação do dipeptídeo tenha ocorrido, ressaltando, entretanto, que por se tratar de molécula com dois centros quirais(*), os acoplamentos não seguem um padrão. A alta intensidade dos sinais não identificados no espectro confirma a baixa pureza da amostra.

A influência dos carbonos quirais é sentida também pelos prótons metilênicos (H_{12} a H_{15}) que pelos padrões de acoplamento deveriam aparecer na forma de dupletos, no entanto, esses aparecem como multipletos, não sendo possível determinar o seu acoplamento.

RMN ^1H (300MHz, DMSO- D_6 , δ , J):

Dipeptídeo Ser-Ala : H_1 a H_9 : d. *, 2,505-2,500 ppm ($J = 1,42$ Hz); H_{10} : d., 8,98–8,95 ppm ($J = 6,87$ Hz); H_{11} : t**, 4,36 ppm; H_{12} e H_{13} : m. 3,79–3,72 ppm; H_{14} e H_{15} : d., 4,56–4,55 ppm ($J = 2,07$ Hz); H_{16} a H_{20} : m., 7,38-7,29 ppm; H_{22} : s., 4,04 ppm; H_{23} a H_{25} : d., 2,505–2,500 ppm ($J = 1,42$ Hz); H_{26} a H_{28} : s., 3,61 ppm.

*o sinal dos H_1 a H_9 deveria aparecer na forma de um singleto, mas por haver sobreposição com o sinal dos H_{26} a H_{28} o duplete desses prótons sobressaem nessa ampliação.

** o sinal do H_{11} é tripleto porém sua constante de acoplamento não foi calculada pois na ampliação não são colocados os valores de todos os sinais.

Quadro 4. Principais sinais de RMN- ^1H (ppm) em DMSO- d_6 do dipeptídeo Ser-Ala

A análise de absorção na região de infravermelho não acrescentou dados esclarecedores à identificação dos compostos, uma vez que, a quantidade de impurezas presentes deformou os estiramentos, tornando as bandas muito largas e indefiníveis.

Em uma segunda tentativa de purificação utilizou-se o sistema eluente *n*-hexano:acetato de etila, 1:1 (v/v). Novamente apesar da significativa diferença de R_f demonstrada na CCD a separação não foi completa, sendo observada a presença do dipeptídeo na maioria das amostras.

Os sinais encontrados no espectro realizado após a coluna cromatográfica, Anexo - figura XI, apresentam no Quadro 5, confirmam a obtenção do peptídeo. O grau de pureza dessa fração é superior ao encontrado anteriormente, contudo, ainda está longe de ser o ideal.

Quadro 5. Principais sinais de RMN- ^1H (ppm) em DMSO- d_6 do dipeptídeo Ser-Ala após coluna cromatográfica.

Rota 2: Tentativa de obtenção do derivado 5-nitro-2-tiofilidênico ligado a alanina

Paralelamente a obtenção e purificação do dipeptídeo Ser-Ala desenvolveu-se, como rota alternativa, a anexação de cada aminoácido individualmente aos derivados a serem transformados em pró-fármacos, vislumbrando assim facilidade de purificação

do produto formado, etapa limitante, na obtenção do dipeptídeo ligados aos derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos neste trabalho.

2.1. Ligação direta do aminoácido ao ligante

Realizaram-se tentativas de ligação dos derivados tiofilidênicos, aqui chamado de ligante, a alanina, a fim de estabelecer uma outra via de formação do conjugado serina-alanina-ligante, pela anexação de um aminoácido por vez, ou seja, ligação da alanina e posteriormente anexação da serina.

A ligação direta desses não ocorreu, uma vez que a presença da carbonila e da dupla ligação do grupo imina diminuem a reatividade do nitrogênio amiólico do ligante. Mesmo em condições vigorosas de reação como temperatura elevada, agitação intensa e aumento do tempo reacional, não se obteve o produto. Passou-se assim, a trabalhar com a metodologia de ativação dos ligantes. Inicialmente lançou-se mão da mesma metodologia proposta para ligação do dipeptídeo aos ligantes (DCC/HOBt) – descrita em Materiais e Métodos –, uma vez que o tipo de ligação a ser formada – reação de amidificação – é a mesma, modificando-se apenas a ordem de anexação.

Em função dessa modificação, passou-se a utilizar o aminoácido comercial protegido, BOC-L-alanina, já que o grupo funcional envolvido nesta primeira etapa passou a ser o grupamento ácido e não o amino, como anteriormente na formação do dipeptídeo.

O produto obtido nessa primeira reação, um sólido amarelo cristalino, apesar de apresentar faixa de fusão bem estreita e superior ao ligante livre, era apenas a mistura física do material de partida, indicando a não ocorrência da reação.

Os compostos utilizados nesse trabalho destacam-se por sua baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos e, mesmo nos poucos em que são solúveis esses são extremamente dependentes da concentração, pureza e temperatura do sistema. Uma vez que a primeira etapa da reação, necessária para ativação da função ácida pelo DCC, se processa à baixa temperatura fez-se necessário verificar a ocorrência de

precipitação do ligante no meio reacional após o abaixamento da temperatura. A fim de verificar essa possível variação de solubilidade e também analisar a influência do aumento da temperatura como agente ativante na formação dessa ligação realizou-se novamente a reação, sob aquecimento.

No espectro de RMN-¹H constatou-se a ausência do ligante, não se observando o sinal referente aos cinco prótons do anel benzênico (multipeto por volta de 7,60 ppm) bem como os dos hidrogênios do anel tiofênico (dupletos com J por volta de 4,2 Hz). Na análise de todos os sinais observados neste espectro, notou-se que o produto obtido tratava-se apenas de mistura física de DCC, HOBt, THF e BOC-L-ala livre. A partir de tais resultados verificou-se a necessidade de prévia ativação dos grupos envolvidos – grupamento azometínico do ligante e o grupamento ácido da alanina – para que a reação ocorra como desejada.

2.2. Ativação do ligante por meio da formação do sal sódico do ligante

Na tentativa de facilitar a anexação dos ligantes partiu-se para a obtenção de sal sódico desses compostos através da reação com etóxido de sódio gerado *in situ*. A formação desse sal faz-se necessária uma vez que a reação de ligação sem prévia ativação não foi possível, provavelmente em função da baixa reatividade do nitrogênio da ponte azometínica destas moléculas.

A caracterização espectrométrica da formação do sal sódico dos ligantes mostrou-se difícil, uma vez que a modificação estrutural é imperceptível nos métodos espectrométricos utilizados. Análises de RMN-¹H não foram capazes de fornecer dados suficientes para comprovação da formação desse sal, já que os hidrogênios ligados ao nitrogênio azometínico são deslocados por átomos de deutério do solvente utilizado para preparo da amostra (PAVIA, 1996). Nos espectros de absorção no infravermelho não se observou alterações significativas em nenhuma das bandas características.

A mudança brusca de coloração, de tons amarelados para preto, não pode ser considerada indicativo de reação química uma vez que se observou que esses

compostos 5-nitro-2-tiofilidênicos benzidrazidas 4-substituídas podem apresentar mudança de coloração em meio básico.

Visando a purificação destes sais e a verificação da constituição química dos subprodutos formados realizou-se extração com acetato de etila, constatando-se a presença de composto na forma de base livre na fase orgânica, confirmando a conversão incompleta do material de partida, o que inviabiliza ainda mais as análises espectrométricas realizadas anteriormente, não havendo, portanto, como identificar se os sinais eram do sal ou da sua base livre, motivo pelo qual não são apresentados os espectros iniciais.

Análises feitas com a fase aquosa sugerem em alguns casos a quebra da base de Schiff nas tentativas de obtenção do sal, sendo possível identificar os sinais característicos da benzidrazida, todavia os sinais referentes ao anel tiofênicos não foram observados nos espectros.

Para evitar tais problemas passou-se a utilizar excesso de sódio metálico, a fim de garantir quantidade suficiente de etóxido para conversão completa do material de partida. A temperatura durante as 3 horas de reação foi mantida por volta de 45 °C, para evitar que ocorresse quebra da molécula. O sal obtido não foi submetido à estocagem, passando esse a ser utilizado logo após a evaporação do solvente visando diminuir a possível decomposição destes. A utilização desse sal sódico não garantiu a ligação a BOC-L-alanina via DDC/HOBt, uma vez que após várias tentativas só se conseguiu isolar os produtos de partida.

Na tentativa de facilitar o acoplamento do ligante à alanina passou-se a trabalhar com aminoácido ativado, por meio da transformação deste em cloreto de ácido. Essa opção justifica-se pelo fato de que a presença de um átomo de cloro em substituição à hidroxila do aminoácido facilita o ataque do nitrogênio à carbonila da alanina, já que esse é um bom grupo de saída. O cloreto obtido foi utilizado imediatamente após a sua obtenção, visando diminuir os efeitos de sua alta reatividade, assim não foi feito nenhum tipo de caracterização do mesmo, apenas isolou-se o precipitado adicionando-lhe o solvente, o sal sódico do ligante e um agente ativante.

A princípio realizou-se a reação com a participação do agente ativante DMAP – *N,N*-dimetilamino piridina – uma vez que reações entre compostos semelhantes, seguindo essa metodologia, foram realizadas com sucesso em nosso grupo em um outro sistema de reação.

Após algumas horas de reação notou-se mudança no aspecto físico do meio reacional, passando este a ter aspecto oleoso e coloração verde escuro, característico da degradação do produto. O mesmo aspecto foi observado para a reação realizada na presença de DCC/HOBt. Análises espectrométricas posteriores confirmaram as suspeitas de decomposição do material de partida.

Acredita-se que essa decomposição possa ser decorrente da ação de subprodutos de cloração gerados na reação da alanina com PCl_5 , uma vez que a alanina utilizada nessa reação não passou por nenhum tipo de purificação.

3. Ensaio Biológico

Para avaliação da atividade biológica dos derivados tiofilidênicos estudados neste trabalho, utilizou-se cepa Y de *T. cruzi* isolada de um caso agudo da Doença de Chagas em humano (SILVA & NEISSENZWEIG, 1953), cujos clones são mantidos em ágar-LIT (base de ágar 1.5% suplementado com meio LIT) no Laboratório de Bioquímica de Parasitas, sob coordenação da Profa. Tit. Maria Júlia Manso Alves do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

Apesar da forma epimastigota não ser a mais adequada para estudos de avaliação da atividade antichagásica de potenciais fármacos – uma vez que essa forma encontra-se essencialmente no hospedeiro invertebrado, o triatomíneo – iniciou-se os testes com estas a fim de conhecer a rotina do preparo dos ensaios, da leitura e interpretação dos resultados de maneira mais segura, já que a forma epimastigota não é infectante. Além disso, estudos indicam haver boa correlação entre os resultados

obtidos com esta e as demais formas (SERRANO *et al.*, 2002; POZAS *et al.*, 2005), servindo, este ensaio, portanto, como modelo *in vitro* para elaboração dos testes posteriores.

Utilizou-se cultura de quatro dias, sendo os repiques feitos na proporção de 5:25 (mL:mL). Os testes foram realizados em tubos plásticos tipo falcon, a fim de se evitar qualquer tipo de acidente.

Uma vez que se estipulou concentração inicial de 20×10^6 parasitas/mL para todos os ensaios, o volume do inóculo a ser introduzido em cada série foi determinado por contagem, em câmara de Neubauer, das formas epimastigota em solução diluída da cultura. O número de parasitas por mL foi obtido pela fórmula (1) e posteriormente diluídos para o volume a ser adicionado aos tubos pela fórmula (2).

$$\text{número de parasitas/ml} = \text{número contado} \times \text{diluição}^* \times 10\,000^{**} \quad (1)$$

* diluição do inoculo para contagem (50x) / ** volume da câmara de Neubauer

$$\text{Volume do inóculo} = \frac{20 \times 10^6}{\text{número de parasitas/mL}} \quad (2)$$

Vale salientar que antes da inoculação verificou-se, por meio de microscopia óptica, a forma dos parasitas da cultura utilizada, assegurando, assim, a inexistência de irregularidades morfológicas.

Foram ensaiados além dos compostos oxadiazolínicos obtidos na Série I os cinco derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos, compostos de partida. Dessa forma, buscou-se estabelecer dados de atividade biológica frente à mesma cepa e forma do *T. cruzi*.

Os compostos testados foram:

Derivados 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas:

- 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida;
- 5-nitro-2-tiofilideno 4-bromobenzidrazida;
- 5-nitro-2-tiofilideno 4-clorobenzidrazida;
- 5-nitro-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida;
- 5-nitro-2-tiofilideno 4-cianobenzidrazida e
- 5-nitro-2-tiofilideno 4-hidroxibenzidrazida.

Série I - 3-acetil-oxadiazolinas 2,5-tiofilideno-4-benzidrazida substituídas:

- 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilideno benzidrazida;
- 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-bromobenzidrazida;
- 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-clorobenzidrazida;
- 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-metilbenzidrazida;
- 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-cianobenzidrazida e
- 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-hidroxibenzidrazida.

As substâncias ensaiadas foram pesadas em balança analítica digital e colocadas sob ondas de luz ultravioleta por uma hora a fim de esterilizá-las.

A solubilidade dos compostos no meio de cultura apresenta-se como fator limitante nos testes, já que os derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos apresentam baixa solubilidade em meio aquoso. Realizou-se teste de solubilidade desses compostos e, em todos os casos, não houve solubilização em contato com o meio de cultura. Dessa forma o uso de DMSO como solvente fez-se necessário, no entanto, sua utilização não pode ultrapassar 10% da concentração final, pois valores superiores a esta podem

promover alterações na população de *T. cruzi*. Mesmo tomando o cuidado de não ultrapassar esse limite, em todas as séries foram preparados, além do controle do inóculo, um tubo controle para averiguar a influência da presença de DMSO no meio da cultura.

As contagens do número de parasitas foram efetuadas no início do ensaio, com 24 e 48 horas de incubação. Os valores obtidos, em parasitas/mL, bem como suas alterações morfológicas são apresentadas nas Tabelas 5 a 16:

Tabela 5: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 5-nitro-2-tiofildeno benzidrazida.

Concentração (µg/mL)	Tempo (horas)					
	Zero		24		48	
	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características
c.c.	31,2 10 ⁶	f+, m+	44,2 10 ⁶	f+, m+	49,7 10 ⁶	f+, m+
c. DMSO	31,0 10 ⁶	f+, m+	44,5 10 ⁶	f+, m+	50,2 10 ⁶	f+, m+
40,0	30,0 10 ⁶	f+, m+	39,4 10 ⁶	f+, m -	18,0 10 ⁶	f+, m -
50,0	25,0 10 ⁶	f+, m+	17,5 10 ⁶	f+, m - -	10,0 10 ⁶	f+, m - - -
60,0	22,0 10 ⁶	f+, m+	12,7 10 ⁶	f+, m - -	-	mortos
70,0	23,7 10 ⁶	f+, m -	-	mortos	-	mortos
75,0	20,0 10 ⁶	f+, m - -	-	mortos	-	mortos
100,0	-	mortos	-	mortos	-	mortos

Legenda - c.c.: controle da cultura / c. DMSO: controle da influência do DMSO / f+: forma normal / f-: grau de deformação / m+: motilidade do flagelo normal / m - : grau de alteração da motilidade do flagelo.

Tabela 6: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 5-nitro-2-tiofilideno-4-bromobenzidrazida.

Tabela 7 : Número médio de formas epimastigota/ mL após exposição ao 5-nitro-2-tiofilideno 4-clorobenzidrazida.

Concentração (µg/mL)	Tempo (horas)					
	Zero		24		48	
	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características
c.c.	24 10 ⁶	f+, m+	27,5 10 ⁶	f+, m+	30,8 10 ⁶	f+, m+
c. DMSO	25,5 10 ⁶	f+, m+	25,5 10 ⁶	R, m+	31,0 10 ⁶	R, m+
2,5	20,2 10 ⁶	f+, m+	25,0 10 ⁶	f+, m+	35,0 10 ⁶	f+, m -
5,0	19,0 10 ⁶	f+, m -	9,5 10 ⁶	mortos	-	mortos
7,5	17,5 10 ⁶	f+, m --	9,8 10 ⁶	mortos	-	mortos
10,0	14,7 10 ⁶	f+, m --	-	mortos	-	mortos
12,5	6,0 10 ⁶	mortos	-	mortos	-	mortos

Legenda - c.c.: controle da cultura / c. DMSO: controle da influência do DMSO / f+: forma normal / f-: grau de deformação / m+: motilidade do flagelo normal / m -: grau de alteração da motilidade do flagelo / R: formação de rosácea

Tabela 8 : Número médio de formas epimastigota/ mL após exposição ao 5-nitro-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida.

Concentração (µg/mL)	Tempo (horas)					
	Zero		24		48	
	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características
c.c.	20 10 ⁶	f+, m+	37,8 10 ⁶	f+, m+	57,6 10 ⁶	f+, m+
c. DMSO	20,7 10 ⁶	f+, m+	38,6 10 ⁶	f+, m+	59,1 10 ⁶	f+, m+
5,0	21,5 10 ⁶	f+, m+	39,6 10 ⁶	f+, m+	45,1 10 ⁶	f+, m -
10,0	20,3 10 ⁶	f+, m+	40,7 10 ⁶	f+, m - -	-	mortos
15,0	19,4 10 ⁶	f+, m+	-	mortos	-	mortos

Legenda - c.c.: controle da cultura / c. DMSO: controle da influência do DMSO / f+: forma normal / f-: grau de deformação /

m+: motilidade do flagelo normal / m -: grau de alteração da motilidade do flagelo / R: formação de rosácea

Tabela 9: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 5-nitro-2-tioflideno-4-cianobenzidrazida.

Concentração (µg/mL)	Tempo (horas)					
	Zero		24		48	
	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características
c.c.	24,5 10 ⁶	f+, m+	36,5 10 ⁶	f+, m+	58,7 10 ⁶	f+, m+
c. DMSO	23,0 10 ⁶	f+, m+	32,5 10 ⁶	f+, m+	55,2 10 ⁶	f+, m+
5,0	23,0 10 ⁶	f+, m+	32,2 10 ⁶	f+, m+	23,0 10 ⁶	f+, m -
10,0	22,5 10 ⁶	f+, m+	15,5 10 ⁶	f+, m -	-	mortos
15,0	17,2 10 ⁶	f+, m+	-	mortos	-	mortos

Legenda - c.c.: controle da cultura / c. DMSO: controle da influência do DMSO / f+: forma normal / f-: grau de deformação / m+: motilidade do flagelo normal / m -: grau de alteração da motilidade do flagelo / R: formação de rosácea.

Tabela 10: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição ao 5-nitro-2-tiofilideno-4-hidroxibenzidrazida.

Concentração (µg/mL)	Tempo (horas)					
	Zero		24		48	
	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características
c.c.	20,6 10 ⁶	f+, m+				
				f+, m+	50,7 10 ⁶	f+, m+
c. DMSO	20,3 10 ⁶	f+, m+	31,5 10 ⁶	f+, m+		
					54,4 10 ⁶	f+, m+
5,0	22,2 10 ⁶	f+, m+	36,1 10 ⁶	f+, m+		
					52,0 10 ⁶	f+, m +
10,0	20,7 10 ⁶	f+, m -	34,4 10 ⁶	f+, m -		
					35,9 10 ⁶	f+, m - -
15,0	21,7 10 ⁶	f+, m -	32,3 10 ⁶	f -, m - -		
					32,0 10 ⁶	f -, m - -
20,0	20,7 10 ⁶	f+, m - -	31,3 10 ⁶	f+, m - -		
					27,5 10 ⁶	f+, m - -
25,0	23,0 10 ⁶	f+, m - -	29,7 10 ⁶	f -, m - -		
					31,0 10 ⁶	f - -, m - - -
30,0	21,4 10 ⁶	f+, m - -	28,7 10 ⁶	f -, m - -		
					-	mortos
35,0	22,0 10 ⁶	f+, m - - -	20,3 10 ⁶	f -, m - -		
					-	mortos

Legenda - c.c.: controle da cultura / c. DMSO: controle da influência do DMSO / f+: forma normal / f-: grau de deformação / m+: motilidade do flagelo normal / m -: grau de alteração da motilidade do flagelo / R: formação de rosácea.

Tabela 11: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição a 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno benzidrazida.

Concentração (µg/mL)	Tempo (horas)					
	Zero			24		48
	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características
c.c.	22,2 10 ⁶	f+, m+	35,5 10 ⁶	f+, m+	49,7 10 ⁶	f+, m+
c. DMSO	21 10 ⁶	f+, m+	32,0 10 ⁶	R, m+	45,2 10 ⁶	R, m+
40,0	22,5 10 ⁶	f+, m+	31,4 10 ⁶	f+, m -	44,0 10 ⁶	f+, m +
50,0	24,7 10 ⁶	f+, m+	31,5 10 ⁶	f+, m - -	46,5 10 ⁶	f+, m - - -
60,0	23,1 10 ⁶	f+, m+	-	mortos	-	mortos
70,0	18,5 10 ⁶	f+, m -	-	mortos	-	mortos
100,0	-	mortos	-	mortos	-	mortos

Legenda - c.c.: controle da cultura / c. DMSO: controle da influência do DMSO / f+: forma normal / f-: grau de deformação / m+: motilidade do flagelo normal / m -: grau de alteração da motilidade do flagelo / R: formação de rosácea.

Tabela 12: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição a 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilideno-bromobenzidrazida.

Concentração (µg/mL)	Tempo (horas)					
	Zero		24		48	
	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características
c.c.	25,2 10 ⁶	f+, m+	35,5 10 ⁶	f+, m+	47,0 10 ⁶	f+, m+
c. DMSO	23,7 10 ⁶	f+, m+	32,1 10 ⁶	f+, m+	45,2 10 ⁶	f+, m+
2,5	22,2 10 ⁶	f+, m+	35,4 10 ⁶	f+, m+	45,0 10 ⁶	f+, m -
5,0	21,7 10 ⁶	f+, m -	30,5 10 ⁶	f+, m - -	44,8 10 ⁶	f+, m -
7,5	20,0 10 ⁶	f+, m ,	15,3 10 ⁶	mortos	-	mortos
10,0	23,5 10 ⁶	f+, m - -	-	mortos	-	mortos
12,5	13,0 10 ⁶	mortos	-	mortos	-	mortos

Legenda - c.c.: controle da cultura / c. DMSO: controle da influência do DMSO / f+: forma normal / f-: grau de deformação / m+: motilidade do flagelo normal / m -: grau de alteração da motilidade do flagelo / R: formação de rosácea

Tabela 13: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição a 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-clorobenzidrazida.

Concentração (µg/mL)	Tempo (horas)					
	Zero			24		48
	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características
c.c.	25,2 10 ⁶	f+, m+		f+, m+	47,8 10 ⁶	f+, m+
c. DMSO	23,7 10 ⁶	f+, m+	35,5 10 ⁶	f+, m+	45,0 10 ⁶	f+, m+
2,5	22,2 10 ⁶	f+, m+	32,4 10 ⁶	f+, m+	44,8 10 ⁶	f+, m -
5,0	24,0 10 ⁶	f+, m -	32,9 10 ⁶	f+, m -	48,7 10 ⁶	f+, m -
7,5	23,5 10 ⁶	f+, m --	31,7 10 ⁶	f+, m --	47,9 10 ⁶	f+, m --
10,0	17,7 10 ⁶	f+, m --	26,3 10 ⁶	mortos	-	mortos
12,5	7,0 10 ⁶	mortos	-	mortos	-	mortos

CC(=O)C1CN(C1Oc2cc(C)cc2)c3ccc(Cl)cc3

Legenda - c.c.: controle da cultura / c. DMSO: controle da influência do DMSO / f+: forma normal / f-: grau de deformação / m+: motilidade do flagelo normal / m -: grau de alteração da motilidade do flagelo / R: formação de rosácea.

Tabela 14: Número médio de formas epimastigota/ mL após exposição ao 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tiofilideno-4-metilbenzidrazida.

Concentração (µg/mL)	Tempo (horas)					
	Zero		24		48	
	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características
c.c.	22,0 10 ⁶	f+, m+	43,3 10 ⁶	f+, m+	50,1 10 ⁶	f+, m+
c. DMSO	21,7 10 ⁶	f+, m+	41,7 10 ⁶	f+, m+	53,1 10 ⁶	f+, m+
5,0	20,5 10 ⁶	f+, m+	42,1 10 ⁶	f+, m+	49,7 10 ⁶	f+, m -
10,0	19,9 10 ⁶	f+, m+	41,0 10 ⁶	f+, m -	38,5 10 ⁶	mortos
15,0	20,5 10 ⁶	f+, m+	42,1 10 ⁶	f+, m -	39 10 ⁶	mortos
20,0	20,5 10 ⁶	f+, m+	15,1 10 ⁶	f+, m -	1	mortos

Legenda - c.c.: controle da cultura / c. DMSO: controle da influência do DMSO / f+: forma normal / f-: grau de deformação /
m+: motilidade do flagelo normal / m -: grau de alteração da motilidade do flagelo / R: formação de rosácea

Tabela 15: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição a 3-acetil- oxadiazolina 2,5-tioflideno-4-cianobenzidrazida

Concentração (µg/mL)	Tempo (horas)					
	Zero		24		48	
	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características	Parasitas/mL	características
c.c.	27,2 10 ⁶	f+, m+	40,5 10 ⁶	f+, m+	45,5 10 ⁶	f+, m+
c. DMSO	25,0 10 ⁶	f+, m+	44,5 10 ⁶	f+, m+	47,2 10 ⁶	f+, m+
5,0	24,5 10 ⁶	f+, m+	30,2 10 ⁶	f+, m -	51,5 10 ⁶	f+, m -
10,0	24,5 10 ⁶	f+, m+	26,2 10 ⁶	f+, m --	35,0 10 ⁶	f+, m ---
15,0	26,0 10 ⁶	f+, m+	17,0 10 ⁶	f+, m ---	-	mortos

Legenda - c.c.: controle da cultura / c. DMSO: controle da influência do DMSO / f+: forma normal / f-: grau de deformação / m+: motilidade do flagelo normal / m - : grau de alteração da motilidade do flagelo / R: formação de rosácea.

Tabela 16: Número médio de formas epimastigota/mL após exposição a 3-acetil-oxadiazolina 2, 5-tiofilideno-4-hidroxibenzidrazida.

Nos primeiros testes realizados detectou-se redução significativa do número de parasitas por mL nos tubos de controle de DMSO (c.DMSO). Uma vez que essa variação ocorreu apenas nesse controle em cada série considerou-se a possibilidade do co-solvente estar agindo como inibidor apenas nas concentrações utilizadas nestes controles, 3.5%. A fim de se comprovar tal hipótese realizou-se uma série de testes variando a concentração nos tubos c. DMSO. Apresenta-se, na Figura 29, os resultados, em parasita/ mL, obtidos neste estudo.

Figura 29. Número de formas epimastigotas de *T. cruzi* / mL em concentrações variadas de DMSO.

Ao examinar essas soluções controle pode-se concluir que nos tubos onde a concentração de DMSO era maior que 3.5% ocorria a formação de rosáceas, ou seja, aglomerados circulares de parasitas. A existência dessas rosáceas impede a dispersão homogênea das formas mesmo após agitação; dificultando, assim, a determinação do número real de parasitas, seja por serem essas formações difíceis de serem capturados na pipetagem ou por impedir a determinação da quantidade exata de parasitas quando na câmara de contagem. Dessa forma passou-se a trabalhar com concentrações inferiores do solvente, no máximo 2.0%.

Após avaliação da atividade antichagásica dos compostos de partida verificou-se que o derivado 4-cloro substituído apresentou melhor perfil, seguido pelo derivado 4-bromo substituído, sendo obtido inibição celular completa com 5 µg/mL e 7.5 µg/mL em 24 horas de incubação, respectivamente.

Vale ressaltar que nos três análogos mais ativos – 4-cloro, 4-bromo e 4-ciano derivados – não ocorreram alterações morfológicas visíveis nos parasitas, como as observadas para os derivados 4-hidroxi e não substituído. Verificou-se apenas diminuição da motilidade celular e do flagelo, enquanto que na presença desses dois últimos eram nítidas as deformações ocorridas, que de formas alongadas estes passavam a formas arredondadas e com coloração mais escura.

O composto 5-nitro-2-tiofilidêno benzidrazida (R = H) mostrou menor atividade frente às formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, sendo necessário concentrações maiores que 65 µg/mL para se observar efeito inibidor completo em 24 e 48 horas de incubação.

Apesar dessa concentração ser alta quando comparada aos outros compostos análogos desta série, a viabilidade deste composto como potencial ligante com atividade antichagásica não deve ser desprezada, uma vez que o benznidazol, fármaco de escolha no tratamento da Doença de Chagas, em estudo semelhante realizado em nosso grupo demonstrou atividade apenas com 48 horas de incubação e em concentração inicial de 100 µg/mL (FURLANETO, 2005).

Para os compostos obtidos na Série I não houve alteração significativa no padrão de atividade biológica. A Tabela 17 apresenta a os valores de concentração mínima letal das duas séries avaliadas neste trabalho

Tabela 17: Concentração ($\mu\text{g/mL}$) responsável por morte celular no período de 24 horas dos compostos de partida e da Série I.

R	Concentração mínima letal em 24 horas ($\mu\text{g/mL}$)	
	Compostos de partida*	Compostos da Série I**
H	60-70	60-70
Br	7.5-10.0	7.5-10.0
Cl	5.0	7.5
Me	15	15
CN	15	20
OH	35	35

*: 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida.

** : 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno benzidrazida.

Os valores observados nas oxadiazolinas não substituída, 4-bromo, 4-metil e 4-hidroxi, são iguais aos obtidos para o respectivo material de partida. Nos derivados 4-cloro e 4-ciano houve uma pequena diminuição da concentração mínima letal, passando essa a ser 7.5 e 20.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Apresenta-se nas Figuras 30 a 36 algumas imagens coletadas durante os testes realizados.

Figura 30. Forma epimastigota de *T. cruzi* em meio LIT.

Figura 31. Forma epimastigota de *T. cruzi* em divisão.

Figura 32. *T. cruzi* mortos após exposição ao 5-nitro-2-tiofilidêno 4-bromobenzidrazida.

Figura 33. Formas epimastigotas de *T. cruzi* deformadas após a exposição aos compostos 5-nitro-2-tiofilidênicos

Figura 34. *T. cruzi* em forma de rosáceas.

Figura 35. Diferenças morfológicas entre as formas epimastigotas encontrados durante os testes realizados.

Figura 36. Forma epimastigota de *T. cruzi* deformadas e mortas após exposição ao 5-nitro-2-tiofilidêno 4-hidroxibenzidrazida.

Conclusões

Série I:

A série I – *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno benzidrazidas* – foram preparadas utilizando os *5-nitro-2-tiofilidênicos benzidrazidas p-substituídos*, como material de partida. A escolha dos derivados a serem estudados neste trabalho foi orientada pelo Diagrama de Craig, buscando uma boa dispersão entre os eixos. A saber:

- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno benzidrazida;*
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno 4-bromobenzidrazida;*
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno 4-clorobenzidrazida;*
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno 4-metilbenzidrazida;*
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno 4-hidroxibenzidrazida e*
- *3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno 4-cianobenzidrazida.*

A obtenção e identificação desses derivados ciclizados foram realizadas sem muitas dificuldades, sendo necessário apenas alguns ajustes com relação ao tempo reacional, comparativamente ao método descrito na literatura, em função da variação dos grupos substituintes do anel benzidrazídico.

Série II:

A série II – acoplamento do dipeptídeo Ser-Ala aos derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos – não foi verificada nos métodos utilizados, mesmo promovendo-se alterações do meio reacional, como troca de solventes, aumento da temperatura, pH, entre outras.

Na tentativa de facilitar a conjugação do ligante a esses aminoácidos buscou-se a ativação dos derivado benzidrazídico por meio da formação do seu sal sódico. Mesmo assim a reação de acoplamento com a alanina não ocorreu, concluindo-se que a reatividade do nitrogênio é extremamente baixa, sendo necessário a utilização de

meios mais eficientes para abstração do hidrogênio e estabilização dos elétrons, a fim de disponibilizá-los para a formação da ligação amídica. A utilização de DDC/HOBt como catalisador e formação do sal sódico via etóxido de sódio não foi suficiente para promover tal conjugação.

Atividade Biológica:

A par dos resultados de atividade biológica dos compostos estudados verificou-se que a série dos derivados tiofilidênicos utilizados apresentam porcentagens de inibição superior ao benznidazol, fármaco de escolha no tratamento da doença de Chagas.

Para os compostos de partida *4-cloro*, *4-bromo* e *4-ciano* substituídos o aumento da atividade pode ser estimado em mais de 10 vezes. Mesmo nos compostos com menor atividade na série essa ainda foi maior que a observada pelo controle, é o caso do derivado não substituído e do 4-hidroxi que necessitaram de concentração de 70 e 35 µg/mL, respectivamente, para ocasionar inibição total em 24 horas enquanto que o benzindazol, utilizado como referência, necessita de 100 µg/mL e 48 horas para que se perceba alterações no crescimento.

Comparando os resultados obtidos verificou-se que os compostos preparados na Série I, *série das 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno benzidrazida p-substituídas*, mantiveram o mesmo perfil dos compostos de partida, *5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida p-substituídas*, frente as formas epimastigotas usadas nos ensaios. Notou-se pequena diminuição na porcentagem de inibição das oxadiazolinas 4-ciano e 4-cloro derivadas, mas essa redução não foi considerada significativas.

Dessa forma, acredita-se que a série de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos apresentam-se como moléculas promissoras no desenvolvimento de ligantes com atividade antichagásica.

Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2004.

- ABUIN, G.M.S. **Anticorpos monoclonais anti-superfície de *T. cruzi***. São Paulo, 1985. 101p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- ACOSTA, A.; SCHENKMAN, R.P.; SCHENKMAN, S. Sialic acid acceptors of different stages of *Trypanosoma cruzi* are mucin-like glycoproteins linked to the parasite membrane by gpi anchors. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.27, n.2, p.439-442, 1994.
- AGRELLOS, O.A.; JONES, C.; TODESCHINE, A.R.; TREVIATO, J.O.; TREVIATO, M.L.M. A novel sialylated and galactofuranose-containing O-linked glycan, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-6(Galf β 1-4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.126, n.1, p.93-96, 2003.
- AGUIRRE, G.; CABRERA, E.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; SEONAE, G.; DUFFAUT, A.; DENICOLA, A.; GIL, M.J.; MARTINEZ MERINO, V. Design, synthesis and biological evaluation of new potent 5-nitrofuranyl derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agentes. Studies of trypanothione binding site trypanothione reductase as target for rational design. **Eur. J. Med. Chem.**, Amsterdam, v.39, n.5, p.421-431, 2004.
- AGUSTI, R.; COUTO, A.S.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A.C.; DE LEDERKREMER, R.M. Structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchor of the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote forms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.97, n.1/2, p.123-131, 1998.
- AMATO NETO, V.A. Etiological treatment for infection by *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.41, n.4, p.211-213, 1999. [Editorial].
- ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; GENTILE, M.; VISCA, P.; GRADONI, L. Inactivation of parasite cysteine proteinases by the NO-donor 4-(phenylsulfonyl)-3-((2-(dimethylamino)ethyl)thio)-furoxan oxalate. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1703, p.69-77, 2004.
- BATISTA, R.S.; HUGGINS, D.W. Perspectivas para a moléstia de Chagas às portas do século XXI. **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro, v.66, n.2, p.79, 1996.
- BAILEY, P.D. **An introduction to peptide chemistry**. 8.ed. Chichester: Wiley, 1990. 232p.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Biblioteca do Conjunto das Químicas. Serviços Oferecidos. **Normalização técnica de documentos**. Disponível em: http://www.bcq.usp.br/biblioteca_de_quimica.htm. Acesso em: 06 jun. 2005.
- BLANCO, S.B.; SEGURA, E.L.; CURA, E.N.; CHUIT, R.; TULIAN, L.; FLORES, I.; GARBARINO, G.; VILLALONGA, J.F.; GURTNER, R.E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. **Trop. Med. Int. Health**, Oxford, v.5, n.4, p.293-301, 2000.

- BLUMENSTIEL, K.; SCHONECK, R.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Nitrofurán drugs as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. **Biochem. Pharmacol.**, Amsterdam, v.58, n.11, p.1791-1799, 1999.
- BODANSZKY, M.; BODANSZKY, A. **The practice of peptide synthesis**. New York: Springer-Verlag, 1984. (Reactivity and structure: concepts in organic chemistry, v.21). 284 p.
- BONSE, R.; RICHARDS, J.M.; ROSS, S.A.; LOWE, G.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. (2,2':6',2''-Terpyridine)platinum(II) complex are irreversible inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase but not of human glutathione reductase. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.42, p.4812-4821, 2000.
- BRAGA, M.S.; LAURIA-PIRES, L.; ARGANARAZ, E.R.; NASCIMENTO, R.J.; TEIXEIRA, A.R.L. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.42, n.3, p.157-161, 2000.
- BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquema de duração prolongada na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.3, p.43-49, 1961.
- BRENER, Z.; CHIARI, E. Susceptibility of different *Trypanosoma cruzi* strains to various chemotherapeutic agents. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.9, n.4, p.197-207, 1967.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.11, n.3, p.222-228, 1969.
- BRESSI, J.C.; VERLINDE, C.L.M.J.; ARONOV, A.M.; Le SHAW, M.; SHIN, S.S.; NGUYEN, L.N.; SURESH, S.; BUCKNER, F.S.; VAN VOORHIS, W.C.; KUNTZ, I.D.; HOL, W.G.J.; GELB, M.H. Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of trypanosomatidae via structure-based drug design. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.44, n.13, p.2080-2093, 2001.
- BURCKNER, F.S.; WILSON, A.J.; WHITE, T.C.; VAN VOORHIS, W.C. Induction of resistance to azole in *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.42, p.3245-3250, 1998.
- BURGUER, J. **Burger's medicinal chemistry**. 5.ed. New York: Wiley-Interscience, 1994. pt.1, p.1064.
- BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.49, p.175-200, 1995.
- BUNDGAARD, H. Design and applications of prodrugs. In: KROGSAARD-LARSEN, P.; BUNDGAARD, H., eds. **A textbook of drug design and development**. Chur, Philadelphia: Harwood Academic Press, 1991. p.113-191.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.6, p.93-100, 1964.
- CANÇADO, J.R. Criteria of Chagas disease cure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, suppl.1, p.331-335, 1999.

- CANÇADO, J.R., org. **Doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial de Minas Gerais, 1968. p.517-540.
- CARVALHAES, M.S.; SANTANA, J.M.; NÓBREGA, O.T.; ARAGÃO, J.B.; GRÉLLIER, P.; SCHRÉVEL, J.; TEIXEIRA, A.R.L. Chemotherapy of an experimental *Trypanosoma cruzi* infection with specific immunoglobulin-chlorambucil conjugate. **Lab. Invest.**, New York, v.78, n.6, p.707-714, 1998.
- CARVALHO, S.A.; SILVA, E.F.; SANTA RITA, R.M.; CASTRO, S.L.; FRAGA, C.A.M. Synthesis and antitrypanosomal profile of new functionalized 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives, designed as non-mutagenic megazol analogues. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Amsterdam, v.14, n.24, p.5967-5970, 2004.
- CARVALHO, P.B. **Leishmanicidas potenciais: síntese de fármaco dirigido derivados de inibidores de dihidrofolato redutase e pteridina redutase, de ação seletiva em macrófagos**. São Paulo, 2001. 243p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZALEZ, M.; RISSO, M.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; STOPPANI, A.O.; PAULINO, M.; OLEA-AZAR, C.; BASOMBRI, M.A. Synthesis and anti-trypanosomal evaluation of *E*-isomers of 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. Structure-activity relationships. **Eur. J. Med. Chem.**, Amsterdam, v.35, p.343-350, 2000.
- CHAN, C.; YIN, H.; GARFORTH, J.; MCKIER, J.H.; JAOUHARI, R.; SPEERS, P.; DOUGLAS, K.T.; ROCK, P.J.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L.; FAIRLAMB, A.H. Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmania drugs. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.41, p.148-156, 1998.
- CHATAING, B.; CONCEPCIÓN, J.L.; LOBATON, R.; USUBILLAGA, A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth *in vitro* by *Solanum* alkaloids: a comparación with ketoconazole. **Planta Med.**, Stuttgart, v.64, p.31-36, 1998.
- CHISTÉ Jr., J. **Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de análogos à nifuroxazida**. São Paulo, 1998. 86p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Quim. Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p.75-84, 1999.
- CHUNG, C.M.; GUIDO, R.V.C.; MARTINELLI, T.F.; GONÇALVES, M.F.; POLLI, M.C.; BOTELHO, K.C.A.; VARANDA, E.A.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E.I. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hidroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): A new nitrofurazone prodrug. **Bioorg. Med. Chem.**, Amsterdam, v.11, p.4779-4783, 2003.
- COLLI, W.; ALVES, M.J.M. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, suppl.1, p.37-49, 1999.
- CONTRERAS, S.; FERNANDEZ, M.R.; AGUERO, F.; DESSE, J.; ORDUNA, T.; MARTINO, O. Congenital Chagas-mazza disease in Salta, Argentina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.32, n.6, p.633-636, 1999.

- CONTRERAS, S.; NAVARRO, M.C.; DE-LIMA, A.R.; ARTEGA, R.; DURAN, F.; ASKUE, J.; FRANCO, Y. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, suppl.8, p.1213-1220, 2002.
- COSTA SILVA, R.; SANTIAGO, C.M.; PONTES, A.L.; ANDRADE, S.G. Isoenzymatic pattern of *Trypanosoma cruzi* Y strain after specific chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.84, p.81-86, 1990.
- COURA, J.R.; SILVA, J.R. Aspectos atuais do tratamento da doença de Chagas. **Rev. Bras. Med.**, São Paulo, v.51, p.283-290, 1961.
- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.1, p.3-24, 2002.
- CRAIG, P.N. Independence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.14, n.8, p.680-684, 1971.
- CROFT, S.L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.2, p.215-220, 1999.
- CROSS, G.A.; TAKLE, G.B. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.47, p.385-411, 1993.
- DA-CRUZ, A.M.; IGREJA, R.P.; DANTAS, W.; JUNQUEIRA, A.C.V.; PACHECO, R.S.; SILVA-GONÇALVES, A.J.; PIRMEZ, C. Long-term follow-up of co-infected HIV and *Trypanosoma cruzi* Brazilian patients. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Amsterdam, v.98, p.728-733, 2004.
- DARVAS, F. Application of the sequential simplex method in designing drugs analogs. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.17, n.8, p.799-804, 1974.
- DÁVILA, D.F.; DONIS, J.H.; TORRES, A.; FERRER, J.A. A modified and unifying neurogenic hypothesis can explain the natural history of chronic Chagas heart disease. **Int. J. Cardiol.**, Shannon, v.96, p.191-195, 2004.
- DECASTRO, S.L. The challenge of Chagas disease chemotherapy: an update assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**, Amsterdam, v.53, p.83-98, 1993.
- DEGRAVE, W.; MIRANDA, A.B.; AMORIM, A.; BRANDÃO, A.; ASLETT, M.; VANDEYAR, M. *T. cruzi* db, an integrated database, and the www information server for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.92, n.6, p.805-809, 1997.
- DIAZ DE TORANZO, E.G.; CASTRO, J.A.; FRANK DE CAZZULLO, B.M.; CAZZULO, J.J. Interaction of beznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, Basel, v.44, p.880-881, 1988.
- DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chem.-Biol. Interact.**, Amsterdam, v.73, p.1-23, 1990.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed. Proc.**, Washington, v.45, p.2471-2476, 1986.
- DODD, M.C.; STILLMAN, W.B. The in vivo bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v.82, n.1, p.11-18, 1994.

- DOGAN, H.N.; DURAN, A.; ROLLAS, S.; SENER, G.; UYSAL, M.K.; GULEN, D. Síntesis of new 2,5-disubstituted-1,3,4-thiadiazoles and preliminary evaluation of anticonvulsant and antimicrobial activities. **Bioorg. Med. Chem.**, Amsterdam, v.10, p.2893-2898, 2002.
- DURGUN, B.; ÇAPAN, G.; ERGEN, Ç.N.; ROLLAS, S. Synthesis, characterization and biological evaluation of new benzylidenebenzohydrazides and 2,5-disubstituted 2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazoles. **Pharmazie**, Eschborn, v.48, n.12, p.942-943, 1993. [Note].
- ERGENÇ, N.; ROLLAS, S.; TOPALOGLU, Y.; OTUK, G. Synthesis and characterization of new 1,3,4-oxadiazolines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v.322, p.837-838, 1989.
- FAUCHEÈRE, J.L.; SCHWYZER, R. Differential protection and selective deprotection. In: GROSS, E.; MEIENHOFER, J., eds. **The peptides: analysis, synthesis, biology**. New York: Academic Press, 1981. v.3, cap.5, p.205-240. (Protection of functional groups in peptide synthesis, v.3).
- FERNADES, J.F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *T. cruzi*. **Exp. Parasitol.**, New York, v.18, p.195-202, 1966.
- FERNÁNDEZ, D.; WENCK, M.A.; CRAIG, S.P.; DELFINO, J.M. The purine transferase from *Trypanosoma cruzi* as a potential target for bisphosphonate-based chemotherapeutic compounds. **Bioorg. Med. Chem.**, Amsterdam, v.14, p.4501-4504, 2004.
- FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.4, p.443-457, 2002.
- FOUNET, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; FERREIRA, M.E.; NAKAYAMA, H.; TORRES DE ORTIZ, S.; SCHININI, A.; SAMUDIO, M.; BIBALO, V.N.; LAVAUULT, M.; BONTE, F. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v.13, p.189-195, 2000.
- FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. **Principles of medicinal chemistry**. 4.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. 995p.
- FRASCH, A.C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.16, n.7, p.282-286, 2000.
- FREYMAN, D.M.; WENCK, M.A.; ENGEL, J.C.; FENG, J.; FOCIA, P.J.; EARKIN, A.E.; CRAIG, S.P. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. **Chem. Biol.**, Cambridge, v.7, p.957-968, 2000.
- FREIRE, T.; ROBELLO, C.; SOULÉ, S.; FERREIRA, F.; OSINAGA, E. Salyl-Tn antigen expression and O-linked GalNAc-Thr synthesis by *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.312, p.1309-1316, 2003.
- FRIIS, G.J.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U., eds. **A textbook of drug design and development**. 2.ed. Amsterdam: Harwood Academic, 1996. p.351-385.
- FUJII, N.; MALLARI, J.P.; HANSELL, E.J.; MARCKEY, Z.; DOYLE, P.; ZHOU, Y.M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; MCKERROW, J.H.; GUY, R.K. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. **Bioorg. Med. Chem.**, Amsterdam, v.15, p.121-123, 2005.

- FUJITA, T.; BAN, T. Structure-activity study of phenethylamines as substrates of biosynthetic enzymes of sympathetic transmitters. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.14, n.1, p.148-152, 1971.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – FUNASA. **Doença de chagas**. Disponível em <http://www.funasa.gov.br/pub/gve/gve00id.htm>. Acesso em 05 outubro 2001.
- FURLANETTO, M. **Coacervação complexa de compostos nitro-heterocíclicos**: obtenção de microcápsulas e avaliação da atividade antichagásica. São Paulo, 2005. 99p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- GALLEANO, R.H.; MARR, J.J.; SOSA, R.R. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.43, p.159-166, 1990.
- GAUDIO, A.C. Modelos clássicos de estudo quantitativo das relações entre estrutura química e atividade biológica. **Quim. Nova**, São Paulo, v.19, n.3, p.353-364, 2001.
- GAYRAL, P.; RIGOTHIER, M.C.; GANTIER, J.C. Comparaison des activités antiparasitaires de deux series d'aldimines des nitro-5-furane et thiophène. **Eur. J. Med. Chem.**, Amsterdam, v.6, n.2, p.151-155, 1981.
- GEIGER, R.; KÖNIG W. Amine protecting groups. In: GROSS, E.; MEIENHOFER, J., eds. **The peptides**. New York: Academic Press, 1981. v.3, cap.1, p.31-32.
- GIES, J.P. Drug targets – molecular mechanisms of drug action. In: WERMUTH, C.G., ed. **The practice of medicinal chemistry**. London, San Diego: Academic Press, 1996. p.55-80.
- GIORDANO, R.J. **Estudos envolvendo uma família de glicoproteínas (Tc 85) da superfície do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi***. São Paulo, 1995. 123p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- GONÇALVES, M.F. **Fosfodiesterase do AMP cíclico de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***. São Paulo, 1978. 144p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- GONZALES-PERDONO, M.; DE CASTRO, S.L.; MEIRELLES, M.N.; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.34, p.1707-1714, 1990.
- GOUNOT, A.M.; BREVET, C.; VIDEZ, S. Les nitrofuranes: mécanismes d'action. **Ann. Pharm. Fr.**, Issy-Les-Moulineaux, v.37, n.9/10, p.421-428, 1979.
- GRANT, I.H.; GOLD, J.W.; WITTNER, M. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in United States. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.111, p.849-851, p.1989.
- GREENE, T.W.; WUTS, P.G.M. **Protective groups in organic synthesis**. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 1999. 779p.
- GUHL, F.; JARAMILLO, C.; A-ARROYO, F.C.; AUFDERHEIDE, A. Chagas disease and human migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.4, p.553-555, 2000.
- GUTIERREZ-CORREA, J.; FAIRLAMB, A.H.; STOPPANI, A.O. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase is inactivated by peroxidase-generated phenothiazine cationic radicals. **Free Radical Res.**, Basingstoke, v.34, p.363-378, 2001.

- HANSCH, C.; LEO, A. **Exploring QSAR: fundamentals and applications in chemistry and biology**. Washington: American Chemical Society, 1995. v.1, 557p. (ACS professional reference book).
- HARDER, A.; GREIF, G.; HABERKORN, A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: kinetoplastida--current level of knowledge and outlook. **Parasitol. Res.**, Berlin, v.87, n.9, p.778-780, 2001.
- HERRERA, L.; URDANETA-MORALES, S. Experimental transmission of *Trypanosoma cruzi* through the genitalia of albino mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.5, p.713-717, 2001.
- HIGASHI, K.O.; DE CASTRO, S.L. Própolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.43, p.149-155, 1994.
- HILLER, S. A better way to make the medicine go down. **Science**, Washington, v.253, p.1095-1096, 1991.
- IANNI, B.M.; MADY, C. Ponto de vista terapêutica da forma crônica da doença de Chagas: é eficaz o tratamento etiológico? **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro, v.70, n.1, 1998.
- JACOBS, C.L.; GOON, S.; YAREMA, K.J.; HINDERLICH, S.; HANG, H.C.; CHAI, D.H.; BERTOZZI, C.R. Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway. **Biochemistry**, Columbus, v.40, n.43, p.12864-12874, 2001.
- JONES, J. **Amino acid and peptide synthesis**. 2.ed. Oxford, New York: Oxford University Press, 1992. 86p. (Oxford chemistry primers, 7).
- JONES, M.S.; URCH, J.E.; BRUN, R.; HARWOOD, J.L.; BERRY, C.; GILBERT, I.H. Analogues of thiolactomycin as potential anti-malarial and anti-tripanosomal agents. **Bioorg. Med. Chem.**, Amsterdam, v.12, p.683-692, 2004.
- KOROLKOVAS, A. **Essentials of medicinal chemistry**. 2.ed. New York: Wiley, 1988. p.53-139.
- KINNAMMON, K.E.; POON, B.T.; HANSON, W.L.; WAIST, V.B. *Trypanosoma cruzi*: a novel chemical class (nitrobenzofurans) actives against infections of mice (*Mus musculus*). **Exp. Parasitol.**, New York, v.89, p.251-256, 1998.
- LAFAILLE, J.J. **Antígenos de *T. cruzi*, clonagem e caracterização de dois genes**. São Paulo, 1988. 264p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- LANA, A.M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D.P., ed. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2000. cap.11, p.97. (Biblioteca biomédica).
- LAURIA-PIRES, L.; CASTRO, C.N.; EMANUEL, A.; PRATA, A. ineficácia do allopurinol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.21, p.79, 1988.
- LI, Z.L.; FENNIE, M.W.; GANEM, B.; HANCOCK, M.T.; KOBASLIJA, M.; RATTENDI, D.; BACCHI, C.J.; O'SULLIVAN, M.C. Polyamines with *N*-(3-phenylpropyl) substituents are effective competitive inhibitors of trypanothione reductase and trypanocidal agent. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Amsterdam, v.11, n.2, p.251-254, 2001.
- LIRA, R.; CONTRERAS, L.M.; RITA, R.M.; URBINA, J.A. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.47, n.5, p.537-546, 2001.

- LOROSA, E.S.; VALENTE, M.V.M.P.; CUNHA, V.; LENT, H.; JURBEG, J. Foco de doença de Chagas em Arcádia, estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.7, p.885-887, 2003.
- LUCIUS, R.; HARTMANN, S. Molecular and immunological adaptations of parasites. **Nova Acta Leopold.**, Stuttgart, v.83, n.316, p.247-261, 2000.
- LUO, Y.; LI, S.C.; LI, Y.T.; LUO, M. A structure of leech intramolecular trans-sialidase complexes: evidence of its enzymatic mechanism. **J. Mol. Biol.**, Amsterdam, v.285, n.1, p.323-332, 1999.
- LUJAN, H.D.; PAGLINI, P.; FRETES, R.; FERNÁNDEZ, A.; FIDELIO, G.D.; BRONIA, D.H. Effect of gangliosides on *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Life Sci.**, Amsterdam, v.53, p.69-73, 1993.
- MAGDESIAN, M.H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R.I.; COLLI, W.; ALVES, M.J. Infection by *Trypanosoma cruzi*: identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.276, n.22, p.19382-1389, 2001.
- MARCHI, A.A.; CASTILHO, M.S.; NASCIMENTO, P.G.B.; ARCHANJO, F.C.; PONTE, G.D.; OLIVA, G.; PUPO, M.T. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem.**, Amsterdam, v.12, p.4823-4833, 2004.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from brasilian propolis with pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.74, p.105-112, 2001.
- MARR, J.J. Purine analogs as chemoterapeutich agents in leishmaniasis and American trypanosomaisis. **J. Lab. Clin. Med.**, Orlando, v.118, p.111-119, 1991.
- MASUNARI, A.; NASCIMENTO, F. L. L; FURLANETTO, M.; SANTOS, M. G. R.; PENNA, T. C. V.; MAMIZUKA, E. M.; TAVARES, L. C. Aplicação do estudo de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente à MRSA.RBCF/Braz. **Pharm. Sci.**, v., supl., p., 2005. [No prelo].
- MASUNARI, A.; TAVARES, L.C. Propriedades físico-químicas que influenciam a ação de fármacos. In: BARREIRO, E.J.; FERREIRA, E.I., eds. **Fundamentos de química farmacêutica**. São Paulo: Atheneu, 2005. [No prelo].
- MCKERROW, J.H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic disease: Insights on safety, target validation, and mechanism of action. **Int. J. Parasitol.**, Amsterdam, v.29, p.833-837, 1999.
- MEHLHORN, H.; BUNNAG, D., ed. **Parasitology in focus: facts and trends**. Berlin, New York: Springer-Verlag, 1988. 924p.
- MING, M.; CHUENKOVA, M.; ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M.E. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.59, n.2, p.243-252, 1993.
- MIURA, K.; REQUENDORF, H.K. The nitrofurans. **Prog. Med. Chem.**, Amsterdam, v.5, p.320-381, 1967.

- MOLFETTA, F.A.; BRUNI, A.T.; HONÓRIO, K.M.; SILVA, A.B.F. A structure-activity relationship study of quinone compounds with trypanocidal activity. **Eur. J. Med. Chem.**, Amsterdam, v.40, p.329-338, 2005.
- MOLINA, J.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; URBINA, J.A. *In vivo* activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.46, n.1, p.137-140, 2000.
- MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, suppl.1, p.401-404, 1999.
- MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, suppl.5, p.577-591, 2003.
- MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. **Química orgânica**. 13.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. 1510p.
- NAKAJIMA-SHIMADA, J.; HIROTA, Y.; AOKI, T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.40, p.2455-2458, 1996.
- NICKERSON, P.; ORR, P.; SCHROEDER, M.L.; SEKLA, L.; JOHNSTON, J.B. Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.111, n.10, p.851-853, 1989. [Note].
- NISHIOKA, S.D.; GYORKOS, T.W. Tattoos as risk factors for transfusion-transmitted diseases. **Int. J. Infect. Dis.**, Amsterdam, v.5, n.1, p.27-34, 2001.
- OLMO, E.; ARMAS, M.G.; LOPEZ-PEREZ, J.L.; RUIZ, G.; VARGAS, F.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E.; FELICIANO, A.S. Anti-*Trypanosoma* activity of some natural stilbenoids and synthetic related heterocyclic compounds. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Amsterdam, v.11, p.755-757, 2001.
- PACKCHANIAN, A.; Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurantoin compounds. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.38, p.30-40, 1952.
- PARIS, G.; RATIER, L.; AMAYA, M.F.; NGUYEN, T.; ALZARI, P.M.; FRASCH, A.C.C. A sialidase mutant displaying *trans*-sialidase activity. **J. Mol. Biol.**, Amsterdam, v.345, n.4, p.923-934, 2005.
- PARR, W.; HORLZER, G. Synthese des C-terminalen octapeptids mit der vorgeschlagenen Sequenz für Scortophbin. **Justus Liebigs Ann. Chem.**, Weinheim, v.6, n.1832, p.982-989, 1974.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy**: a guide for students of organic chemistry. 2.ed. Fort Worth, London: Harcourt Brace College, 1996. 511p. (Saunders Golden Sunburst Series).
- PEDROSA, R.C.; DE BEM, A.F.; LOCATELLI, C.; PEDROSA, R.C.; GEREMIAS, R.; WILHELM, F.D. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox Rep.**, Leeds, v.6, n.4, p.265-270, 2001.

- PEREIRA, S.A.L.; CORRÊA, B.S.; MINICUCCI, G.P.; LOPES, G.M.A.; CASTRO, E.C.C.; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A. O peso do baço em chagásicos crônicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.32, n.2, p.167-170, 1999.
- RODRIGUEZ PÉREZ, J.M.; CRUZ ROBLES, D.; HERNANDEZ PACHECO, G.; PEREZ HERNÁNDEZ, N.P.; MURGUÍA, L.E.; GRANADOS, J.; REYES, P.A.; ALARCÓN, G.V. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chaga's disease. **Immunol. Lett.**, Amsterdam, v.98, n.1, p.97-102, 2005.
- PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. **Pessoa parasitologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. cap.14, p.175-176.
- PINTO, E.A.L.C.; ALMEIDA, E.A.; FIGUEIREDO, D.; BUCARETCHI, F.; HESSEL, G.; BUCARETCHI, F. Chagasic megaesophagus and megacolon diagnosed in childhood and probably caused by vertical transmission. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.43, n.4, p.227-230, 2001.
- POZAS, R.; CARBALLO, J.; CASTRO, C.; RUBIO, J. Synthesis and *in vitro* antitrypanosomal activity of novel Nifurtimox analogues. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Amsterdam, v.15, n.5, p.1417-1421, 2005.
- PRATA, A. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about chagas disease 90 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, suppl.1, p.81-88, 1999.
- PRESTI, M.S.L.; RIVAROLA, H.W.; BUSTAMANTE, J.M.; FERNÁNDEZ, A.R.; ENDERS, J.E.; FRETES, R.; GEA, S.; OLIVA, P.A.P. Thioridazine treatment prevents cardiopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v.23, p.634-636, 2004.
- PREVIATO, J.O.; WAIT, R.; JONES, C.; REIS, G.A.; TODESCHINE, A.R.; HEISE, N.; TREVIATO, M.L.M. Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. **Adv. Parasitol.**, London, v.56, p.1-41, 2003.
- PREVIATO, J.O.; ANDRADE, A.F.B.; PESSOLANI, M.C.V.; PREVIATO, M.L.M. Incorporation of sialic acid in to *Trypanosoma cruzi* macromolecules: a proposal for a new metabolic route. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.16, n.1, p.185-196, 1985.
- PROCÓPIO, D.O.; MORTARA, R.A. The mechanisms used by two developmental stages of *Trypanosoma cruzi* to invade mammalian cells are different and may be dependent of host cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, suppl.1, p.61, 1994.
- RASSI, A.; AMATO NETO, V.A.; SIQUEIRA, A.F.; LEITE, M.S.B. Efeito protetor do nifurtimox contra a reativação parasitária em pacientes cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com corticóide em virtude de afecções associadas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.31, n.3, p.35-38, 1998.
- RASSI, A., TRANCHESI, J., TRANCHESI, B. Doença de Chagas. In: VERONESI, R., ed. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap.85, p.675-700.
- REZENDE, P. **Relação quantitativas estrutura-atividade de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos**: planejamento, síntese e determinação da atividade antimicrobiana frente a cepa de *Staphylococcus aureus*. São Paulo, 2002. 182p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

- REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.115-151.
- RICH, D.H.; SINGH, J. The carbodiimide method. In: GROSS, E.; MEIENHOFER, J., eds. **The peptides**. New York: Academic Press, 1979. v.1, cap.5, p.243-256.
- RIVAS, P.; CASSELS, B.K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. Effects of some β -carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.**, Oxford, v.122, p.27-31, 1999.
- RODRIGUES, A.M. **Síntese e determinação da concentração inibitória mínima frente a *Staphylococcus aureus* de 5-nitro-2-furfulideno benzidrazida substituídas**. São Paulo, 2000. 101p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- ROESKE, R.W. Carboxyl protecting groups. In: GROSS, E.; MEIENHOFER, J., eds. **The peptides**: protection of functional groups in peptide synthesis. New York: Academic Press, 1981. v.3, cap.2, p.119-132.
- 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. **Farmaco**, Paris, v.57, p.171-174, 2002.
- ROMAÑA, C.A.; BRUNSTEIN, D.; COLLIN-DELAUVAUD, A.; SOUSA, O.; ORTEGA-BARRIA, E. Public policies of development in Latin America and Chagas' disease. **Lancet**, London, v.362, p.579, 2003.
- ROUSH, W.R.; HERNADEZ, A.A.; MACKERROW, J.H.; SELZER, P.M.; HANSELL, E.; ENGEL, J.C. Design, synthesis and evaluation of D-homophenylalanylepoxysuccinate inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Tetrahedron**, Amsterdam, v.56, p.9747-9762, 2000.
- SARQUIS, O.; BORGES-PEREIRA, J.; CORD, J.R.M.; GOMES, T.F.; CABELLO, P.H.; LIMA, M.M. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brasil. I. Presence of tritomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of rural area. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, suppl.3, p.263-267, 2004.
- SCHAUER, R. Sialic acids and their role as biological masks. **Trends Biochem. Sci.**, Haywards Heath, v.10, n.9, p.357-360, 1985.
- SCHENKMAN R.P.; VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, Washington, v.61, n.3, p.898-902, 1993.
- SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, M.E.; NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.48, p.499-523, 1994.
- SCORDAMAGLIA, C.C.; RANDO, D.G.; TAVARES, L.C.; FERREIRA, E.I. Tuberculostáticos potenciais: síntese da succinil-5-nitrotiofilidenobenzidrazida como intermediário para latenciação com quitosana. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.39, suppl.3, p.192-194, 2003. (VII Semana de Ciências e Tecnologia da FCF/USP, São Paulo, 2003).

- SERRANO, S.M.; LE-SENNE, A.; FERNÁNDEZ-PORTILLO, C.; NOGAL, J.J.; OCHOA, C.; GOMEZ-BARRIO, A. *In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel nitro-derivative. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, suppl.4, p.553-557, 1994.
- SILVA, M. **Tuberculostáticos potenciais**: pró-fármacos poliméricos formadores de micela, derivados de isoniazida, rifampicina e pirazinamida. São Paulo, 2001. 166p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- SILVA, L.H.P.; NUSSENSZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. **Folia Clin. Biol.**, São Paulo, v.20, p.191-207, 1953.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 460p.
- SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Organic chemistry**. 7.ed. New York, Chichester: John Wiley, 2000. 1258p.
- SOLOVEY, M.M.S. **Ação de quimioterápicos sobre o *trypanosoma cruzi***: emprego de lipossomos como transportadores de drogas. São Paulo, 1986. 96p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- SOUZA W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, suppl.1, p.17-36, 1999a.
- SOUZA, H.M. Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, suppl.1, p.419-423, 1999b.
- SOUZA, A.G.; WANDERLEY, D.M.V.; BURALLI, Consolidation of the control of Chagas disease vectors in the state of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.79, suppl.1, p.125-131, 1984.
- STOPPANI, A.O.M. The chemotherapy of Chagas disease. **Medicine (Baires)**, v.59, p.147-165, 1999.
- Brasil. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Públicas. **Alguns aspectos de chagas no Brasil**. S.I.: SUCAM, 1987. (Informações Epidemiológicas, v.54).
- SZAJNAMAN, S.H.; YAN, W.; BAILEY, B.N.; DOCAMPO, R.; ELHALEM, E.; RODRÍGUEZ, J.B. Design and synthesis of aryloxyethylthiocynate derivatives as potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.43, p.1826-1840, 2000.
- TAVARES, L.C.; PENNA, T.C.V.; AMARAL, A.T. A QSAR study of nitrofurans derivatives with antimicrobial activity. In: WORKSHOP ON CHEMICAL STRUCTURE-BIOLOGICAL ACTIVITY, São Paulo, 1991. **Resumos dos trabalhos**. São Paulo: Instituto de Química/Universidade de São Paulo, 1991a. p.2.
- TAVARES, L.C.; AMARAL, A.T. Partition coefficient determination of nitrofurans derivatives for a QSAR study. In: WORKSHOP ON CHEMICAL STRUCTURE-BIOLOGICAL ACTIVITY, São Paulo, 1991. **Resumos dos Trabalhos**. São Paulo: Instituto de Química/Universidade de São Paulo, 1991b. p.8.
- TAVARES, L.C. **Relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade antimicrobiana de análogos à nifuroxazida**. São Paulo, 1993. 186p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

- TAVARES, L.C.; MILANI, S.R.; PENNA, T.C.V.; AMARAL, A.T. Relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR) de análogos à nifuroxazida: síntese e determinação da atividade antimicrobiana. **Rev. Farm. Quim.**, São Paulo, v.29, p.63, 1997a.
- TAVARES, L.C.; PENNA, T.C.V.; AMARAL, A.T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. **Boll. Chim. Farm.**, Millan, v.136, n.3, p.244-249, 1997b.
- TAVARES, L.C.; MILANI, S.R.; RODRIGUES, A.M.; SANTOS, M.G.B.; PENNA, T.C.V. Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de derivados do 5-nitro-2-furfurilideno. **Rev. Farm. Quim.**, São Paulo, v.32, n.1, p.44-48, 1999a.
- TAVARES, L.C.; PENNA, T.C.V.; AMARAL, A.T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. **Boll. Chim. Farm.**, Milan, n.8, v.138, p.432-436, 1999b.
- TAVARES, L.C.; FERREIRA, E.I. Relações quantitativas estrutura-atividade, fundamentos e aplicações da análise de Hansch. In: PRADO, M.A.F.; BARREIRO, E.J., org. **Prácticas de química farmacéutica y medicinal**. Pamplona: SYTED-Red Iberoamericana para la Investigación, Diseño, y Desarrollo de Medicamentos, 2002. p.36-66.
- TAVARES, L. C. Relações Quantitativas Estrutura-Atividade, fundamentos e aplicações da Análise de Hansch. **Fundamentos de Química Farmacéutica**. Ed. Barreiro. E. J.; Ferreira, E. I. Atheneu Editora. [No pelo].
- TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Química Nova**, v.27, n.4, p.631-639, 2004.
- TEIXEIRA, A.R.L.; BARBOSA, A.S.; FAUDRY, E.; LOZZI, S.P.; ARGANARAZ, E.R.; AULT, M.S.; SANTANA, J.M. Current millennium biotechniques for biomedical research on parasites and host-parasite interactions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, suppl.1, p.123-131, 2000.
- TEXEIRA, A.R.; CORDOBA, J.C.; SOUTO MAIOR, I.C.; SOLRZANO, E. Chagas disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.43, p.146-158, 1990.
- TEXEIRA, A.R.; CALIXTO, M.A.; TEXEIRA, M.L. Chagas disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.305, p.189-196, 1994.
- TESTA, B.; CALDWELL, J. Prodrugs revisited: the "ad hoc" approach as a complement to ligand design. **Med. Res. Rev.**, Hoboken, v.16, n.3, p.233-241, 1996.
- TODESCHINI, A.R.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J.O.; VARKI, A.; VAN HALBEEK, H. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* catalyzes sialoside hydrolysis with retention of configuration. **Glycobiology**, Cary, v.10, n.2, p.213-221, 2000.
- TOMIMORI-YAMASHITA, J.; DEPS, P.D.; ALMEIDA, D.R.; ENOKIHARA, M.M.S.S.; SEIXAS, M.T.; FREYMULLER, E. Cutaneous manifestation of Chagas' disease after heart transplantation: successful treatment with allopurinol. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.137, n.4, p.626-630, 1997.
- TOMLINSON, S.; PONTES DE CARVALHO, L.C.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V. Role of sialic-acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J. Immunol.**, Bethesda, v.153, n.7, p.3141-3147, 1994.
- TOPLISS, G.J. Utilization of operational scheme for analogues synthesis in drug design. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.15, n.10, p.1006-1010, 1972.

- TRACY Jr., J.W., WEBSTER, L. Fármacos usados nos tratamentos das parasitoses. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. New York: MacGraw-Hill, 1996. cap.31, p.705, 725, 732-733.
- TROUILLER, P.; REY, J.L.; BOUSCHARAIN, P. Pharmaceutical development concerning diseases predominating in tropical regions: the concept of indigent drugs. **Ann. Pharm. Fr.**, Issy-Les-Moulineaux, v.58, n.1, p.43-46, 2000.
- TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defense: a target for the treatment of disease caused by parasitic protozoa. **Mol. Aspects Med.**, Amsterdam, v.25, p.211-220, 2004.
- URBINA, J.A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A.; LAZARDI, K.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY, J.F. Cure of short- and long-term experimental Chagas disease using D0870. **Science**, Washington, v.273, p.969-971, 1996.
- URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, Haywards Heath, v.19, n.11, p.495-501, 2003.
- VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; TOMLINSON, S.; KISO, M.; YOSHIDA, M.; HASEGAWA, A.; NUSSENZWEIG, V. Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, Cary, v.2, n.6, p.541-548, 1992.
- VARKI, A. Diversity in the sialic acid. **Glycobiology**, Cary, v.2, p.25-40, 1992.
- VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; TOLEDO, M.J.O.; LANA, M.; CHAIRA, E.; TAFURI, W.L.; BAHIA, M.T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strain. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, suppl.7, p.1005-1011, 2001.
- VILLALTA, F.; SMITH, C.M.; RUIZ-RUANO, A.; LIMA, M.F. A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.505, n.3, p.383-388, 2001.
- VILLARREAL, D.; BARNABÉ, C.; SERENO, D.; TIBAYNRENC, M. Lack of correlation between *in vitro* susceptibility to Benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **Exp. Parasitol.**, New York, v.108, p.24-31, 2004.
- VINHAES, M.C.; SCHOFIELD, C.J. Trypanosomiasis control: sumounting dismissing returns. **Trends Parasitol.**, Haywards Heath, v.19, p.112-113, 2003.
- VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; CHAVIÉRE, G.; BAKALARA, N.; PÉRIE, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochem. Pharmacol.**, Amsterdam, v.57, n.5, p.549-557, 1999.
- ZIELINSKI, T.; ACHMATOUWICZ, M.; JURCZAK, J. A simple synthesis of chiral macrocyclic tetraamides derived from α -amino acids. **Tetrahedron: Asymmetry**, Amsterdam, v.13, n.18, p.2053-2059, 2002.
- ZUCCOTTO, F.; MARTIN, A.C.; LASKOWSKI, R.A.; THORNTON, J.M.; GILBERT, I.H. Dihydrofolate reductase: a potent drug target in trypanosome and leishmania. **J. Comput.-Aided. Mol. Des.**, Dordrecht, v.12, p.241-257, 1998.
- ZULANTAY, I.; HONORES, P.; SOLARI, A.; APT, W.; ORTIZ, S.; OSUNA, A.; ROJAS, A.; LÓPEZ, B.; SÁNCHEZ, G. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect

- Trypanosoma cruzi in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurionol. **Diagn. Microb. Infect. Dis.**, New York, v.48, n.4, p.253-257, 2004.
- WEN, J.J.; GARG, N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of Trypanosoma cruzi infection. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.37, n.12, p.2072-2081, 2004.
- WILSON, J.C.; KIELF, M.J.; A-ABO, S.; ITZSTEIN, M. Preliminary ¹HRMN investigation of sialic acid transfer by the trans-sialidase from *T. cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Amsterdam, v.10, n.24, p.2791-2794, 2000.
- WERMUTH, C.G. Strategies in search for new lead compound or original working hypothesis. In: _____, ed. **The practice of medicinal chemistry**. London, San Diego: Academic Press, 1996. p.80-99.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, eliminated of transmission in Uruguay. **Wkly Epidemiol. Rec.**, Genève, v.6, p.38-4, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, interruption of transmission in Brazil. **Wkly Epidemiol. Rec.**, Genève, v.2, p.1-15, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, interruption of transmission in Chile. **Wkly Epidemiol. Rec.**, Genève, v.3, p.13-16, 1995.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, progress towards eliminated of transmission in Argentina. **Wkly Epidemiol. Rec.**, Genève, v.2, p.12-15, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, interruption of transmission in Chile. **Wkly Epidemiol. Rec.**, Genève, v.3, p.13-16, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, interruption of transmission in Uruguay. **Wkly Epidemiol. Rec.**, Genève, v.2, p.1-4, 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, interruption of transmission in Venezuela. **Wkly Epidemiol. Rec.**, Genève, v.35, p.289-292, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, interruption of transmission in Brazil. **Wkly Epidemiol. Rec.**, Genève, v.19, p.153-155, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Reported of the Expert Committee on the control of Chagas disease**. Geneve, p.85, 2002. (Technical Report Series, 905).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Brazil to be declared free of chagas disease**. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/tdrnews/news62/chagas.htm>. Acesso em: 26 maio 2004.

Anexo

Figura I. Espectro de IV de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida

Figura II. Espectro de RMN¹H de 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida

Figura III. Espectro de IV de 5-nitro-2-tiofilideno *p*-bromobenzidrazida

Figura V. Espectro de RMN ^1H da 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofildêno benzidrazida

Figura VI. Espectro de RMN ^1H da 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno para-bromobenzidrazida

Figura VII. Espectro de RMN ^1H da 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tiofilideno *para*-clorobenzidrazida

Figura VIII. Espectro de RMN ^1H da 3-acetil-oxadiazolina 2,5-tioflidêno *para*-metilbenzidrazida

Figura XI. Espectro de RMN ^1H do metil éster da alanina.

Figura XII. Espectro de RMN ^1H do dipeptídeo Ser-Ala.

Figura XIII. Espectro de RMN ^1H do dipeptídeo Ser-Ala após coluna cromatográfica.