UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Síntese e avaliação biológica de sulfonil-hidrazonas análogos do nitrofural como
candidatos a antichagásico.

Fernando de Moura Gatti

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profº. Drº. Gustavo Henrique Goulart
Trossini

São Paulo
2015

FERNANDO DE MOURA GATTI

Síntese e avaliação biológica de sulfonil-hidrazonas análogos do nitrofural como
candidatos a antichagásicos

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências: Fármaco e
Medicamentos.

Área de concentração: Insumos
Farmacêuticos

Orientador:
Profº. Drº. Gustavo Henrique Goulart
Trossini

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

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

Gatti, Fernando de Moura

G263s Síntese e avaliação biológica de sulfonil-hidrazonas análogos
do nitrofural como candidatos a antichagásicos / Fernando de
Moura Gatti. -- São Paulo, 2015.
141p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Trossini, Gustavo Henrique Goulart

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Doença
de Chagas 3. Quimioterapia I. T. II. Trossini, Gustavo Henrique
Goulart, orientador.

615.19

CDD

FERNANDO DE MOURA GATTI

Síntese e avaliação biológica de sulfonil-hidrazonas análogos do nitrofural como
candidatos a antichagásicos

Comissão Julgadora da Dissertação da obtenção do grau de Mestre

Profº. Drº. Gustavo Henrique Goulart Trossini
Orientador / Presidente

Profº. Drº. Márcio Weber Paixão
1º examinador

Profº. Drº. Flávio da Silva Emery
2º examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho principalmente à minha família, mãe Maria Renata de Moura, pai Luiz Gatti, irmãs Daniela de Moura Gatti e Camila de Moura Gatti, e ainda assim, em especial a minha namorada e companheira Elys J. C. de Lima. São pessoas especiais em minha vida, e a eles que devo total dedicação e respeito. Tiveram paciência e companheirismo ao me apoiar nos momentos que mais foi preciso, tanto de estresse, como de alegria, e me incentivaram para que fosse possível concluir esse período de minha vida.

Ofereço também, devido a crucial importância nesse trabalho, meu orientador e amigo, Gustavo H. G. Trossini, o qual me recebeu e propôs o projeto para que pudéssemos desenvolver juntos, pela paciência ao aceitar meu modo de trabalhar e pelos ensinamentos e conselhos prestados.

Dedico também com merecimento, à aluna, colega de grupo e amiga, Drielli G. Vital, a qual me direcionou no início do mestrado e auxiliou ao longo dele. Pelo esclarecimento de dúvidas e pelas dúvidas geradas, permitindo que juntos desenvolvêssemos valioso aprendizado durante o mestrado.

E por último, a todos meus amigos de antes do mestrado, bons amigos que mesmo com minha ausência nos períodos de muito trabalho, não hesitaram em proporcionar momentos de lazer e confraternizações sempre que possível, permitindo-me relaxar e distrair a cabeça.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) por ter me permitido realizar o presente trabalho dentro de suas instalações.

À agência de fomento CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por ter me cedido a bolsa de estudos como apoio financeiro durante a realização do trabalho.

Aos Professores das Disciplinas cursadas que deram o embasamento teórico da área e colaboradores que permitiram desenvolver parte do trabalho.

Aos amigos de laboratório, pelo apoio e ensinamentos, pois sem eles não seria possível desenvolver parte desse trabalho, e ainda assim, pela companhia agradável no laboratório ao longo dos “quase” 30 meses. Citando em especial Marco Arribas, por seus ensinamentos de síntese e companhia fora trabalho, Natanael Segretti, também pelos direcionamentos na síntese e companhia fora do laboratório, e à Lorena Paes pela paciência em ministrar o manuseio do HPLC e pelos diversos churrascos cedidos em sua casa. Também agradeço aos mais recentes colegas de laboratório Rosania Yang, Thais Fernandes e Charles Britto, que me acompanharam no encerramento do mestrado.

RESUMO

GATTI, F. de M. **Síntese e avaliação biológica de sulfonil-hidrazonas análogos do nitrofural como candidatos a antichagásicos**. 2015. 89f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A Doença de Chagas é uma protozoose causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Classificada pela Organização Mundial de Saúde como extremamente negligenciada, essa doença é endêmica em 21 países da América Latina, entretanto podem ser encontrados, ainda, casos nos EUA, Canadá, Europa e Japão devido a movimentos migratórios. Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde, no ano de 2012 havia de 8 a 10 milhões de pessoas infectadas mundialmente e cerca de 25 milhões de pessoas sob risco de contrair a doença de Chagas, ainda sim, havia a ocorrência de 56 mil novos casos da doença e cerca de 12 mil mortes por ano, recorrente de complicações da doença. Diante destes números, essa parasitose se apresenta com um sério problema de saúde pública mundial. A terapêutica antichagásica disponível apresenta apenas dois fármacos o Nifurtimox e o Benznidazol, que atuam somente na fase aguda da doença e provocam sérios efeitos adversos, sendo necessária a busca por novos fármacos eficazes contra o parasita. Os métodos modernos de planejamento de fármacos antiparasitários envolvem a seleção de vias metabólicas específicas a serem bloqueadas, nesse contexto se encontram diferentes proteases, enzimas envolvidas em processos essenciais para a sobrevivência do parasita, entre elas a cruzaina, principal cisteíno-protease do *T. cruzi*, a qual é responsável pela sobrevivência, replicação celular e invasão do parasita à célula hospedeira, se apresentando como um excelente alvo bioquímico na pesquisa de novos agentes antichagásicos. Partindo do estudo do nitrofural (5-nitro-2-furfurilidenossemicarbazona), antibacteriano também conhecido por sua ação inibitória da cruzaina, adotamos-o como protótipo na pesquisa de fármaco contra a doença. No presente trabalho, utilizou-se o bioisosterismo como estratégia de modificação molecular no planejamento de compostos antichagásicos, inibidores da cruzaina. Foram sintetizados 27 derivados sulfonil-hidrazônicos, para os quais foi determinada a pureza por CLAE e caracterizados por faixa de fusão, espectroscopia no UV e RMN ^1H e RMN ^{13}C . Os compostos sintetizados foram avaliados frente às formas celulares epimastigota do *T. cruzi*, apresentando atividade inibitória de crescimento celular entre 20 e 100% a 100 μM . Nos ensaios frente a cruzaina, os derivados nitrados se mostraram ativos com IC_{50} em torno de 100 μM . Visto os resultados, podemos sugerir que o grupo nitro presente em alguns compostos pode ser o responsável pela atividade tripanomicida. Face a indicação de toxicidade do grupo nitro, os derivados não nitrados, Ie, IIf e IIle, podem ser considerados promissores, visto sua atividade intermediária como tripanomicida, entre 45 e 60% à 100 μM , sendo que o composto IIf também apresentou atividade inibidora da cruzaina, 23,4% à 100 μM , podendo assim serem utilizados como ponto de partida na busca de eficazes agentes antichagásicos.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, cruzaina, derivados sulfonil-hidrazônicos, nitrofurazona, bioisosterismo

ABSTRACT

GATTI, F. de M. Synthesis and biological evaluation of sulfonylhydrazones analogues of nitrofurals as antichagasic candidates. 2015. 89p. Dissertation (Masters degree) – Faculty of pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

Chagas disease, a protozoonosis caused by the hemoflagellate parasite *Trypanosoma cruzi*, is classified as an extremely neglected disease by World Health Organization. It is an endemic disease in 21 countries on Latin America and cases in the USA, Canada, Europe and Japan were also reported as a consequence of migratory activity. In the last five years, it is estimated that around 8 to 10 million people worldwide were affected by this disease, with nearly 12,000 deaths due to disease complications and approximately 25 million people being at risk of contracting it. Chagas disease is therefore a worldwide public health problem. There are only two available antichagasic therapeutic drugs, nifurtimox and benznidazole, which act only in the acute phase of the disease and cause serious adverse effects, making it necessary to search for novel, more effective drugs against this parasite. The newer methods of antiparasitic drug design involve the selection of specific metabolic pathways to be blocked. Many proteases, enzymes involved in essential processes to the survival of the parasite, such as cruzain, are thought of as potential therapeutic targets. Cruzain, the major cysteine protease of *T. cruzi*, is responsible for cellular replication, survival and invasion of the host cell, being an excellent biochemical target for the drug discovery of new antichagasic agents. Starting from the knowledge of nitrofurals (5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone) as an antibacterial agent and as a known cruzain inhibitor, we used it as a template for the search of new drugs against Chagas disease. In the present work, bioisosteric modifications were used as a strategy to design new compounds as potential cruzain inhibitors. 27 sulfonylhydrazones derivatives were synthesized, had their purity assessed by HPLC and were characterized through their melting point, UV spectroscopy and NMR ^1H and ^{13}C . The synthesized compounds were evaluated against epimastigote strains of *T. cruzi*, showing inhibitory activity on cellular growth between 20 and 100% at 100 μM . In the cruzain enzymatic assays, the nitro derivatives showed activity around 50% of inhibition at 100 μM , and IC_{50} around 100 μM . By the results, we can suggest that the presence of the nitro group in some compounds should be responsible for tripanocidal activity. Given the known toxicity of nitro compounds, the derivatives without the nitro group, Ie, IIf and IIIe, may be considered promising given their intermediate inhibitory activity on cruzain, among 45% and 60% at 100 μM . The compound IIf also showed 23,4% inhibitory activity at 100 μM . Therefore, these compounds could be employed as starting points on the search of new effective antichagasic agents.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, cruzain, sulfonylhydrazones derivatives, nitrofurals, bioisosterism

FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura dos fármacos antichagásicos: benznidazol e nifurtimox.....	18
Figura 2 -	Mecanismo de ação proposto para os fármacos nitro aromáticos exemplificado com o benznidazol e o nifurtimox.....	19
Figura 3 -	Ilustração da cruzaina apresentando os resíduos da tríade catalítica, o resíduo de Gln205 maleável e os principais bolsos do sítio ativo.....	23
Figura 4 -	Estrutura geral das tiossemicarbazonas linear e cíclica sintetizadas e avaliadas frente à cruzaina por DU e colaboradores, 2002.....	24
Figura 5 -	Mecanismo de inibição da cruzaina por tiossemicarbazonas proposto por DU e colaboradores, 2002.....	25
Figura 6 -	Estrutura química do nitrofural (NF).....	26
Figura 7 -	Estrutura química do hidroximetil-nitrofural (NFOH).....	26
Figura 8 -	Exemplo de composto sulfonado que teve aumento de eficácia por aplicação de bioisosterismo não clássico.....	27
Figura 9 -	Estrutura geral dos compostos vinil-sulfônicos propostos por Jaishankar et al., (2008) e seus respectivos grupamentos de interação.....	28
Figura 10-	Mecanismo de inibição de cisteíno- proteases de compostos vinil sulfônicos de aceptores de Michael.....	29
Figura 11-	Planejamento das moléculas de estudo análogas ao nitrofural.....	34
Figura12-	Intermediário I: espectro de RMN ¹ H com estrutura numerada, sinais e sua multiplicidade.....	51
Figura 13-	Intermediário I: espectro de RMN ¹³ C com estrutura numerada, sinais e sua multiplicidade.....	53
Figura 14-	λ _{máx} e a intensidade dos compostos com o anel furânico das subséries a, b e g.....	62
Figura 15-	λ _{máx} e a intensidade dos compostos com o anel tiofênico das subséries c, d e h.....	62
Figura 16-	λ _{máx} e a intensidade dos compostos das subséries e, f e i.....	63
Figura 17-	Picos obtidos na separação cromatográfica do composto Ia: Cromatograma da amostra, cromatograma de comparação da amostra com o branco e tabela com os resultados dos picos obtidos.....	69
Figura 18-	Estrutura numerada do composto Ia, tabela com os sinais e o espectro obtido na análise de RMN ¹ H.....	71
Figura 19-	Estrutura numerada do composto Ia, tabela com os sinais e o espectro obtido na análise de RMN ¹³ C.....	72

TABELAS

Tabela 1 -	Resultados de tempo de reação, rendimento e faixa de fusão obtidos da síntese dos intermediários e os respectivos valores encontrados na literatura.....	48
Tabela 2 -	Valores de RMN ¹ H do intermediário I, obtidos experimentalmente comparados aos valores retirados da literatura.....	51
Tabela 3 -	Valores de RMN ¹ H do intermediário II, obtidos experimentalmente comparados aos valores retirados da literatura.....	52
Tabela 4 -	Valores de RMN ¹ H do intermediário III, obtidos experimentalmente comparados aos valores retirados da literatura.....	52
Tabela 5 -	Resultados de tempo de reação, rendimento e faixa de fusão, obtidos da síntese dos compostos finais, sulfonil-hidrazonas.....	56
Tabela 6 -	Comparativo dos resultados obtidos experimentalmente e na literatura....	59
Tabela 7 -	$\lambda_{\text{máx}}$ e a intensidade do cromóforo dos compostos da série III.....	60
Tabela 8 -	Detalhamento do sistema eluente, fluxo e pH, empregados na metodologia de análise de cada composto e os resultados de tempo de retenção, fator de cauda, resolução e porcentagem de pureza obtida para os composto da série I.....	65
Tabela 9 -	Detalhamento do sistema eluente, fluxo e pH, empregados na metodologia de análise de cada composto e os resultados de tempo de retenção, fator de cauda, resolução e porcentagem de pureza obtida para os composto da série II.....	65
Tabela 10 -	Detalhamento do sistema eluente, fluxo e pH, empregados na metodologia de análise de cada composto e os resultados de tempo de retenção, fator de cauda, resolução e porcentagem de pureza obtida para os composto da série III.....	66
Tabela 11 -	Resultado dos ensaios de inibição enzimática dos compostos obtidos em dose única (100 μ M) e ensaio de IC ₅₀ frente à cruzaína.....	74
Tabela 12 -	Resultados dos ensaios biológicos de avaliação dos compostos obtidos como inibidores do crescimento celular da forma epimastigosta de <i>T. cruzi</i>	76

ESQUEMAS

Esquema 1 - Rota sintética de duas etapas para a obtenção dos compostos sulfonil-hidrazonas planejados.....	38
Esquema 2 - Método de síntese dos intermediários sulfonil-hidrazidas e seus substituintes.....	38
Esquema 3 - Síntese dos compostos finais sulfonil-hidrazonas e seus substituintes.....	40
Esquema 4 - Mecanismo de reação de obtenção de sulfonil-hidrazidas.....	47
Esquema 5 - Mecanismo de reação de obtenção de sulfonil-hidrazidas na presença de Et ₃ N	49
Esquema 6 - Mecanismo reacional de obtenção das sulfonil-hidrazonas a partir de aldeídos e cetonas.....	54

QUADROS

Quadro 1 -	Discriminação dos reagentes, solventes e matérias-primas utilizadas no desenvolvimento de toda a parte experimental do trabalho.....	35
Quadro 2 -	Discriminação dos equipamentos utilizados no procedimento de síntese e caracterização das moléculas.....	36
Quadro 3 -	Discriminação dos equipamentos utilizados no procedimento de cinética enzimática na avaliação biológica das moléculas.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Doenças negligenciadas.....	15
2.2	Doença de Chagas.....	16
2.3	Quimioterapia.....	17
2.4	Cisteíno-proteases como alvo bioquímico.....	20
2.5	Antichagásicos em estudo como inibidores da cruzaina.....	23
2.5.1	<i>Tiossemicarbazonas</i>	24
2.5.2	<i>Nitrofuril (NF)</i>	25
2.5.3	<i>Compostos sulfonados</i>	27
2.6	Descoberta de fármacos.....	29
2.7	Modificação molecular.....	30
2.7.1	<i>Bioisosterismo</i>	31
2.8	Planejamento acional.....	33
3	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Material	35
4.1.1	<i>Reagentes, solventes e matérias-primas</i>	35
4.1.2	<i>Equipamentos</i>	36
4.2	Métodos.....	37
4.2.1	<i>Métodos sintéticos</i>	37
4.2.1.1	<u><i>Síntese dos intermediários I, II e III: obtenção de sulfonil-hidrazida</i></u>	38
4.2.1.2	<u><i>Síntese dos compostos finais (subséries a – i): obtenção de sulfonil-hidrazona</i></u>	40
4.2.2	<i>Métodos analíticos</i>	40
4.2.2.1	<u><i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i></u>	40
4.2.2.2	<u><i>Faixa de fusão, ou intervalo de fusão</i></u>	41
4.2.2.3	<u><i>Espectrofotometria de absorvância no ultravioleta</i></u>	42
4.2.2.4	<u><i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i></u>	42
4.2.2.5	<u><i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i></u>	43
4.2.3	<i>Ensaio Biológicos</i>	44
4.2.3.1	<u><i>Ensaio de inibição e cinética enzimática em cruzaina de T. cruzi</i></u>	44
4.2.3.2	<u><i>Ensaio de IC₅₀ em cruzaina de T. cruzi</i></u>	45
4.2.3.3	<u><i>Ensaio de inibição de crescimento celular das formas epimastigotas de T. cruzi</i></u>	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	Sulfonil-hidrazidas.....	46
5.2	Sulfonil-hidrazonas.....	54
5.2.1	<i>Resultados obtidos da síntese e faixa de fusão</i>	54
5.2.2	<i>Resultados da espectrofotometria de ultravioleta</i>	59
5.2.3	<i>Resultados da pureza cromatográfica (CLAE)</i>	63
5.2.4	<i>Caracterização por RMN ¹H e RMN ¹³C</i>	68
5.3	Ensaio biológicos.....	71
5.3.1	<i>Ensaio de inibição enzimática da cruzaina</i>	71
5.3.2	<i>Ensaio de inibição de crescimento celular das formas epimastigotas de T. cruzi</i>	74
6	CONCLUSÕES.....	76
7	REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS		

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é uma protozoose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Essa doença é considerada como uma doença tropical negligenciada devido seu impacto substancial em termos de mortalidade prematura e por estarem fortemente relacionadas à pobreza e regiões tropicais. (WHO, 2015; CROPTON, 2013; FRANCO-PAREDES, SANTOS-PRECIADO, 2011).

A maioria das infecções ocorre em áreas endêmicas por transmissão vetorial por meio da picada de insetos triatomíneos conhecidos como “barbeiros”. Atualmente vem sendo reportadas formas alternativas de transmissão desta doença, tais como transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão vertical (mãe para filho), por ingestão de alimentos ou líquidos contaminados com o *T. cruzi* ou ainda acidentais, em laboratórios nos quais são manipulados parasitas vivos. (WHO, 2014; CROPTON, 2013; YANO, 2010; FRANCO-PAREDES et al., 2007).

Antigamente considerada um problema da América Latina, a doença de Chagas é atualmente uma infecção parasitária global, devido à crescente migração de populações das áreas de alta incidência para regiões não-endêmicas, e das zonas rurais para áreas urbanas. (WHO, 2015; WHO, 2014; CROPTON, 2013; COURA, BORGES-PEREIRA, 2012; GASCON, BERN, PINAZO, 2010; FRANCO-PAREDES et al., 2007).

Desde sua descoberta pelo Médico Sanitarista Dr. Carlos Justiniano Ribeiro Chagas em 1909 até os dias atuais não existem vacinas eficazes, a quimioprofilaxia não é ideal e a quimioterapia é inadequada. Atualmente, os únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são o benznidazol e o nifurtimox, ambos apresentam sérios efeitos adversos e são ineficazes na fase crônica da doença (DIAS et al., 2009; AGUIRRE et al., 2004; LASCALEA, 1998; DO CAMPO, 1990).

Assim sendo, esses medicamentos são recomendados para a infecção pelo *T. cruzi* na fase aguda, congênita e em casos de reativação da doença (mais frequentemente em doentes co-infectados com HIV). Também são indicados quando há infecção na fase crônica em pacientes com até 18 anos de idade. (WHO, 2015; FRANCO-PAREDES et al., 2007). Esse panorama torna a busca pela cura da doença de Chagas um grande desafio da saúde mundial (CROPTON, 2013; YANO, 2010; FRANCO-PAREDES et al. 2007).

Os avanços em estudos da bioquímica do *T. cruzi*, tornou possível a descoberta de vias metabólicas exclusivas e essenciais para a vida do parasita, as quais, por meio de modernas técnicas de Química Medicinal, estes alvos podem ser utilizados na busca de novos compostos potentes e seletivos a serem empregados na quimioterapia antichagásica (RIVERA et al., 2009).

Em se tratando do sistema bioquímico do *T. cruzi*, encontra-se a cruzaina, uma cisteíno-protease expressa em todos os estágios evolutivos do parasita, responsável entre outras funções pela diferenciação, alimentação, invasão celular e modificação da resposta imune do hospedeiro, sendo assim, um interessante alvo na busca de novos fármacos. (RIVERA et al., 2009; SAJID, McKERROW, 2002)

Dentre as diversas classes químicas testadas contra o *T. cruzi* atuantes na inibição da cruzaina, as semicarbazonas, tiosemicarbazonas e *N*-acil-hidrazonas tem se mostrado promissoras (BLAU et al., 2013; CARVALHO et al., 2012; TROSSINI et al., 2010; RIVERA, 2009; DU et al., 2002). Baseando-se nestes estudos, Trossini e colaboradores (2010) realizaram testes de inibição da cruzaina com o nitrofural (NF) e seu análogo hidroximetil-nitrofural, os quais apresentam um grupo semicarbazona, bioisómero da tiosemicarbazona já reportada como inibidor de cruzaina, confirmando a atividade destes compostos frente à enzima (NF com IC₅₀ de 22,83 µM e o derivado hidroximetilado 10,55 µM).

A modificação molecular de protótipos, tem se apresentado como a técnica mais promissora na introdução de fármacos na terapêutica. Uma das estratégias, o bioisosterismo, é bastante utilizado e com considerado sucesso na introdução de moléculas na terapêutica. O bioisosterismo implicada na troca de grupamentos ou subunidades estruturais, que apresentam características topológicas, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes e têm a capacidade de apresentar propriedade biológica análoga, agonista ou antagonista (BROWN, 2012; BARREIRO, FRAGA, 2009).

Com o intuito de se obter novos compostos candidatos a antichagásicos, o trabalho propõe o planejamento de moléculas pela aplicação do bioisosterismo clássico e não-clássico. Realizar a síntese e caracterização dos compostos propostos, derivados sulfonil-hidrazônicos análogos ao nitrofural. Esses foram submetidos à avaliação biológica com o intuito de verificar a atividade dos compostos em ensaios de inibição enzimática frente à cruzaina e em ensaios contra formas celulares do *T. cruzi*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças negligenciadas

Doenças negligenciadas, também conhecidas como doenças tropicais negligenciadas, são enfermidades que possuem grande relevância médica, responsáveis por uma grande carga de morbidade e mortalidade mundial, sem ter a devida atenção de governos e indústrias farmacêuticas. Tais doenças atingem, em sua maioria, uma população relacionada à pobreza e que vivem em áreas remotas ou rurais, muito comumente havendo ausência de tratamento e diagnóstico eficazes para as tais. (WHO, 2015; INCT-IDN, 2014; WILLYARD, 2013; DNDi, 2010). À exemplo dessas doenças temos a leishmaniose, a dengue, a esquistossomose, a doença de chagas, entre outras. (WHO, 2015; DNDi, 2010).

De acordo com a iniciativa de fármacos para doenças negligenciadas em 2010 (do inglês, *Drug for Neglected Disease initiative*), apesar da alta relevância para a saúde pública, no período de 1975 a 2004, somente 1,3% de todos os fármacos introduzidos na terapêutica foram direcionados as doenças negligenciadas (DNDi, 2010).

Dentre as doenças negligenciadas, considera-se extremamente negligenciada as doenças quais, do financiamento mundial destinado as doenças negligenciadas, tiveram menos de 5% desse investimento, dentre elas destacamos a doença de Chagas, a qual tem alta prevalência no Brasil (DNDi, 2010; MORAN et al., 2009).

Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS, do acrônimo em inglês – WHO, World Health Organization), no ano de 2012, havia de 8 a 10 milhões de pessoas infectadas mundialmente e cerca de 25 milhões de pessoas sob risco de contrair a doença de Chagas, ainda sim, havia a ocorrência de 56 mil novos casos da doença por ano e cerca de 12 mil mortes por ano recorrente de complicações da doença. Tal fato, acarreta em um grande impacto econômico e social (WHO, 2015; DNDi, 2010). Portanto, torna-se fica notória a necessidade de uma atenção maior para as doenças negligenciadas.

2.2 Doença de Chagas

A protozoose causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* se dá o nome de doença de Chagas em homenagem ao seu descobridor, o médico brasileiro Dr. Carlos Chagas (1909) (URBINA, 2010). A principal via de transmissão do *T. cruzi* é a forma vetorial, por meio de insetos triatomíneos, popularmente conhecidos como “barbeiro”. Ao longo das décadas de 1970 e 1980, o perfil epidemiológico tradicional da doença de Chagas foi se modificando devido aos processos migratórios rural-urbanos, transformando a infecção por *T. cruzi* em infecção urbana, podendo ser transmitida por formas alternativas, como a transfusão sanguínea, acidentes em laboratório, transplantes de órgãos, entre outras (WHO, 2015; COURA, VIÑAS, 2010; URBINA, 2010; DIAS et al. 2009; MASSAD, 2008).

Dentre as formas alternativas de transmissão, a transfusão sanguínea é a segunda mais relevante, tendo prevalência de contaminação sanguínea maior que HIV e as hepatites B e C em bancos de sangue de algumas cidades do continente americano (WHO, 2014; WHO/TDR, 2012; MATTHEWS, 2011; DNDi, 2010; DIAS et al., 2009; COURA, 2007). Outra forma de transmissão do *T. cruzi*, que, recentemente despertou interesse, é a contaminação oral, a qual no ano de 2006, desencadeou um surto da forma aguda da doença de Chagas e a morte de muitos indivíduos pela ingestão de formas tripomastigotas do parasita dissolvidas em bebidas, como suco de cana e açaí, conforme divulgado amplamente na mídia e no Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (ROQUE et al., 2008; CARDOSO et al., 2006).

O *T. cruzi* é prevalentemente encontrado desde o Sul dos EUA até o sul da Argentina (WHO, 2014; WHO/TRD, 2012; DNDi, 2010; URBINA, DOCAMPO, 2003). Em um total de 21 países endêmicos, estima-se que 100 milhões de indivíduos se encontrem em áreas de alto risco de infecção, com 300.000 novos casos registrados anualmente (WHO, 2015; DNDi, 2010; URBINA, 2010; DIAS et al., 2009). A doença de Chagas não é somente um problema médico isolado, e sim de âmbito muito mais complexo. Nas áreas endêmicas, está intimamente relacionada com fatores socioeconômicos, como desnutrição, falta de condições básicas de higiene, e outras doenças associadas (COURA, BORGES-PEREIRA, 2012; URBINA, 2010; DIAS, 2007).

A doença de Chagas se apresenta em duas fases mais importantes: fase aguda ou inicial, e fase crônica (RASSI Jr., RASSI, REZENDE, 2012; YANO, 2010).

Devido à baixa parasitemia durante a infecção por *T. cruzi*, a fase aguda tem seus sintomas sinalizado entre 8-10 dias e, no caso de infecção por transfusão sanguínea, os sinais levam 20-40 dias até o aparecimento, ainda assim, a fase aguda é caracterizada como fase sintomática da doença de Chagas (RASSI Jr., RASSI, REZENDE, 2012; YANO, 2010; COURA, 2007).

Na infecção aguda ocorre o aparecimento de reações inflamatórias localizadas no local de penetração do parasita. Nesta região, tem-se a presença de um edema subcutâneo caracterizado pelo sinal de Romaña ou chagoma cutâneo, primeiro sinal para diagnóstico da doença (RASSI Jr., RASSI, REZENDE, 2012; YANO, 2010; COURA, 2007).

Uma fase chamada intermediária, que é assintomática, é apresentada por 60-70% dos indivíduos infectados. Já a fase crônica se inicia 2-3 meses após a fase aguda, sendo que somente 30-40% dos pacientes desenvolvem a fase crônica cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva que pode abranger um período de 10-30 anos após a fase inicial (RASSI Jr., RASSI, REZENDE, 2012; GASCÓN et al. 2007).

Na fase crônica, têm-se, ainda, aparecimento do megaesôfago e do megacólon. Conhecida como forma digestiva da doença, os “megas”, ocorrem resultante da ação de anticorpos do indivíduo infectado, seguido de lesões inflamatórias nas fibras do músculo liso do sistema digestivo e dos nervos autonômicos entéricos, findando no aumento desses órgãos (JABARI et al., 2014, TEIXEIRA, NASCIMENTO, STURM, 2006; MONCAYO, YANINE, 2006). Nessa fase há comprometimento do sistema nervoso autônomo, levando à falta de coordenação motora; ocorre também a hipertrofia muscular e a dilatação desses órgãos. Pode haver o aparecimento de câncer, sendo a maior complicação dessa fase, principalmente no esôfago. Apenas, 10-15% dos infectados desenvolvem os “megas”, e esses ocorrem somente no Brasil, Argentina, Chile e Bolívia; isso se dá devido às diferentes cepas de *T. cruzi* (JABARI et al., 2014, RASSI Jr.; RASSI, REZENDE, 2012).

2.3 Quimioterapia

Após mais de 100 anos desde a descoberta da doença e apesar do genoma e do proteoma do *T. cruzi* serem conhecidos, até o momento nenhum novo fármaco foi desenvolvido especificamente para a doença de Chagas (URBINA, DOCAMPO, 2003; URBINA, 2002).

Atualmente, o tratamento utilizado é mais sintomático que etiológico. Assim, do ponto de vista sintomático, procura-se amenizar as diversas manifestações da doença, por meio da administração de diuréticos para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (VIOTTI et al., 2014; COURA, BORGES-PEREIRA, 2012; AGUIRRE et al., 2004).

Do ponto de vista etiológico, o benznidazol (Rochagan®, Roche) e o nifurtimox (Lampit®, Bayer) (figura 1) são os fármacos indicados há mais de três décadas. Entretanto, esses fármacos são ativos somente na fase aguda da doença, sendo que o nifurtimox, desde 1980 não é mais comercializado no Brasil. Posteriormente outros países vieram proibir sua comercialização deste fármaco, como Argentina, Chile e Uruguai, isso devido aos vários efeitos colaterais provocados aos pacientes (KOROLKOVAS, 2007; COURA, CASTRO, 2002).

Tanto o benznidazol quanto o nifurtimox apresentam sérios efeitos adversos como hiporexia (diminuição do apetite), perda de peso, náuseas, vômitos, alergia cutânea e neuropatia periférica. Além disso, esses fármacos apresentam baixa eficácia, uma vez que algumas cepas estudadas apresentam suscetibilidade diferente para esses fármacos, não promovendo a cura (VIOTTI et al., 2014; KOROKOLVAS, 2007; LA-SCALEA, 1998; GRINGAUZ, 1997; DOCAMPO, 1990; DOCAMPO, MORENO, 1985).

Figura 1 – Estrutura dos fármacos antichagásicos: benznidazol e nifurtimox

Os efeitos adversos causados pelo benznidazol e pelo nifurtimox são referentes à baixa seletividade desses fármacos, pois os mesmos além de agirem em macromoléculas, lipídeos, proteínas e DNA do parasita, acaba afetando também o hospedeiro (DIAS et al., 2009; AGUIRRE et al., 2004).

O mecanismo de ação dos dois fármacos está relacionado ao grupamento nitro (NO₂) do anel hetero-aromático, ilustrado na figura 2. Ambos os fármacos sofrem ação de enzimas

nitroredutases, ocorrendo a total redução do grupo NO_2 à amina (NH_2) (PATTERSON, WYLLIE, 2014; DIAS et al., 2009; AGUIRRE et al., 2004; MORENO et al., 1983).

São sugeridos dois tipos de mecanismos dependentes de nitroredutases envolvendo a ação em moléculas que possuam grupos nitro-aromáticos (PATTERSON, WYLLIE, 2014; DIAS et al., 2009; AGUIRRE et al., 2004; MORENO et al., 1983). Um dos mecanismos, as nitroredutases agem no grupo NO_2 provocando um ânion nitro reativo instável. Sob condições aeróbicas, através do ciclo redox, o ânion nitro reoxida a NO_2 molecular e simultaneamente ocorre a redução do oxigênio a íon superóxido, espécie reativa do oxigênio, gerando estresse oxidativo, o que resulta nos efeitos tóxicos (PATTERSON, WYLLIE, 2014; AGUIRRE et al., 2004; DIAS et al., 2009).

Quanto ao segundo mecanismo, não há atuação através do ciclo redox. Com a ação das nitroredutases ocorre uma redução sequencial do NO_2 através de intermediários, nitroso (NO) e hidroxilamina (-NHOH), resultando em total redução a grupo amina (NH_2). A reatividade dos dois intermediários com as biomoléculas tanto do parasita quanto do hospedeiro, acarreta os efeitos tóxicos e mutagênicos (PATTERSON, WYLLIE, 2014; DIAS et al., 2009; AGUIRRE et al., 2004; MORENO et al., 1983).

Figura 2 - Mecanismo de ação proposto para os fármacos nitro-aromáticos exemplificado com o benznidazol e o nifurtimox.

(Figura adaptada de Dias et al., 2009)

Habitualmente os estudos sugerem que o nifurtimox sofra ação das nitroredutases em condições aeróbicas, e por estresse oxidativo resultem em efeitos citotóxicos, enquanto o benznidazol seja ativado pelas nitroredutases gerando intermediários reativos. Entretanto, não é descartada a hipótese de outras enzimas estarem envolvidas nesse mecanismo, no caso, a tripanotona redutase parasitária (PATTERSON, WYLLIE, 2014; DIAS et al., 2009; AGUIRRE et al., 2004; MORENO et al., 1983).

2.4 Cisteíno-proteases como alvo bioquímico

A identificação e caracterização de vias metabólicas essenciais à sobrevivência de parasitas são bases fundamentais para o planejamento racional de novos agentes quimioterápicos (GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011).

Enzimas-chave têm sido selecionadas como alvos moleculares para o planejamento racional de novas entidades químicas candidatas a novos fármacos (do inglês, *New Chemical Entities* (NCEs)). As proteases de protozoários são alvos interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos devido principalmente ao seu papel na replicação, metabolismo, sobrevivência e na patologia (CASTRO et al., 2011; SAJID et al., 2011; O'BRIEN et al., 2008; DUSCHAK, COUTO, 2007; URBINA, DOCAMPO, 2003; McKERROW, McGRATH, ENGEL, 1995).

Entre as proteases de interesse, a classe das cisteíno-proteases tem recebido grande atenção como alvos promissores para intervenção quimioterápica, pois são encontradas em abundância na maioria dos protozoários responsáveis pelas parasitoses humanas. Essas enzimas apresentam um grupo tiol ($-SH$) da cisteína, com importante papel no processo de reconhecimento molecular (SAJID et al., 2011; SAJID, McKERROW, 2002).

A cruzipaína (EC 3.4.22.51) é a mais importante cisteíno-protease presente no *T. cruzi* (GEA et al., 2006; DEL NERY et al., 1997). Propõe-se que esteja envolvida não só em todos os estágios evolutivos do parasita, mas também, na diminuição da resposta imune do hospedeiro e no aumento da atividade catalítica (STOKA et al., 1998; DEL NERY et al., 1997; SERVEAU et al., 1996).

A cruzipaína encontra-se também envolvida na invasão da célula do hospedeiro, na ligação às células-alvo e na replicação intracelular e diferenciação do parasita (CAZZULO, STOKA, TURK, 2001; DEL NERY et al., 1997; SERVEAU et al., 1996). Tais funções,

importantes nos vários estágios do ciclo biológico do parasita, faz da cruzipaína um excelente alvo para o desenvolvimento de inibidores enzimáticos com elevado potencial de desenvolvimento clínico.

A cruzipaína apresenta uma forma recombinante obtida em laboratório conhecida como cruzaína. A cruzaína apresentou aspectos cinéticos idênticos à enzima original do parasita, a cruzipaína, em estudos realizados por Alves e colaboradores em 2001 (ALVES et al., 2001a; ALVES et al., 2001b).

Como nos estudos realizados neste trabalho foi utilizada a forma recombinante, cruzaína, adotaremos esse nome no decorrer do texto.

Nas duas últimas décadas, com o aumento do conhecimento sobre a bioquímica e a estrutura da enzima, ela se tornou alvo de várias pesquisas com inibidores (SAJID et al., 2011). Sendo assim, o entendimento da especificidade da cruzaína em seu sítio ativo e nas cavidades adjacentes importantes para a atividade catalítica da enzima é de grande importância para o planejamento de candidatos a novos inibidores (JAISHANKAR et al., 2008; CAZZULO, STOKA, TURK, 2001; CHAGAS et al., 1997).

A cruzaína apresenta a tríade catalítica característica das cisteíno-proteases e uma organização estrutural similar à das proteases lisossômicas de mamíferos (DEL NERY et al., 1997; CAZZULO et al., 1990a; CAZZULO et al. 1990b). É uma enzima membro da superfamília de proteases parasitárias denominada “*papaína like*”, apresentando no sítio catalítico e no C terminal elevada semelhança estrutural com a enzima que dá nome a essa família, a papaína (DUSCHAK, COUTO, 2007; CAZZULO, STOKA, TURK, 2001).

Além disso, a cruzaína apresenta semelhança estrutural não só com a papaína, mas também com as catepsinas, que fazem parte desta família, principalmente as catepsinas L e S (CAZZULO, STOKA, TURK, 2001). A tríade catalítica da família da papaína (envolvendo os resíduos cisteína 25 (Cys25), histidina 159 (His159) e asparagina 175 (Asn175)) é preservada e possui uma cavidade para acomodar um oxânion, proveniente da catálise no sítio S1’ (relacionado ao sentido oposto ao bolso S1) (Cys25 e glutamina 19 (Gln19)) (OTTO, SCHIRMEISTER, 1997).

Os primeiros inibidores de cruzaína apresentaram resíduos com grupamentos aromáticos em P2 (sendo P2, o segundo aminoácido do substrato peptídico enumerado a partir da ligação de clivagem da enzima) (MEIRELLES et al., 1992). O subsítio S1 das cisteíno-proteases (sendo S1, região da enzima de interação com primeiro aminoácido do substrato seguinte a região de hidrólise enzimática), incluindo na cruzaína, possui especificidade menos

definida que o subsítio S2 e a maioria dos seus substratos comuns contêm arginina (Arg) como resíduo P1, resíduo com características básicas. A cruzaína mostrou preferência marcante por resíduos de fenilalanina (Phe), (Cys), leucina (Leu) e tirosina (Tyr) em P1, ao passo que os substratos contendo cadeias laterais ramificadas em β , tais como isoleucina (Ile) e valina (Val), foram mais resistentes à hidrólise (BRINEN et al., 2008; ALVES et al., 2001a; DEL NERY et al., 1997).

A cruzaína mostrou grande suscetibilidade aos substratos com His na posição P1, o que foi consistente com a observação de clivagem autocatalítica no resíduo His na região do propeptídio (DEL NERY et al., 1997).

Em estudos previamente reportados, o sítio ativo da cruzaína revelou possuir algumas características e afinidades, tais como afinidade por grupos hidrofóbicos, aromáticos e grupos básicos em S2 e nos bolsos S1 e S1' disponibilidade de fazer interações de hidrogênio com outros grupos (TROSSINI, 2008; LECAILLE et al., 2001; ALVES et al., 2001a; ALVES et al., 2001b).

Em trabalho de nosso grupo avaliando compostos bioisostéricos ao nitrofural, os resultados de ancoramento molecular associam também a uma preferência do bolso S2 por grupos hidrofóbicos, aromáticos, e/ou básicos. Além disso, pode-se constatar que no bolso S2 está presente um resíduo de glutamina 205 (Glu205) flexível, o qual permite novas interações com grupos que façam interação de hidrogênio ou iônica, resultado da abertura do bolso S2 (vide figura 3) (VITAL, 2013).

Para ilustrar as particularidades observadas na cruzaína (figura 3), utilizamos as estruturas cristalográficas do banco de dados de proteínas PDB (do inglês, *Protein Data Bank* (PDB), de código 1ME4 e 3I06 (MOTT et al., 2010; HUANG, BRINEN, ELLMAN, 2003). Na figura podemos observar a enzima cruzaína, sendo realçados seu sítio ativo, os principais bolsos contidos nele (S1, S2, S3, S1' e S2'), a tríade catalítica (Cys25, His159 e Asn175) e o resíduo de Glu208 flexível, resíduo esse que permite a abertura ou o fechamento do bolso S2 citado anteriormente (VITAL, 2013)

Figura 3 – Ilustração da cruzaina apresentando os resíduos da tríade catalítica, o resíduo flexível em suas duas disposições e os principais bolsos do sítio ativo

(Figura gentilmente produzida por Drielli Vital utilizando as enzimas 1ME4 e 3I06 do PDB)

2.5 Antichagásicos em estudo como inibidores da cruzaina

A pesquisa de inibidores da cruzaina é, atualmente, realizada com auxílio de técnicas modernas de planejamento de fármacos buscando a melhoria e a seletividade de compostos ativos contra essa enzima e selecionando com sucesso classes de compostos não-peptídicos como inibidores, entre elas semicarbazonas e tiosemicarbazonas, chalconas, isatinas, hidroximetil-cetonas, acil-hidrazidas, tiazolil-hidrazonas, vinyl-sulfonas, aril-uréias, macrociclos e complexos metálicos (VITAL, ARRIBAS, TROSSINI, 2014; BLAU et al., 2013; CARVALHO et al., 2012; HERNANDES et al., 2010; TROSSINI et al., 2010; BRYANT et al., 2009; BORCHHARDT et al., 2009; CHEN et al., 2008; JAISHANKAR et al., 2008; BRAK et al., 2008; ZANATTA et al. 2008; DUSCHAK, COUTO, 2007; SILES et al., 2006; AGUIRRE et al., 2006; DU et al., 2002).

2.5.1 Tiossemicarbazonas

Alguns inibidores seletivos para a cruzáina foram planejados racionalmente por síntese e estudos de relação estrutura química/ atividade biológica (REA) (do inglês, *Structure-Activity Relationship* (SAR)) (DU et al., 2002). Os inibidores atuam bloqueando a proliferação tanto das formas extracelulares epimastigotas quanto das formas intracelulares amastigotas e impedem a metaciclogênese *in vitro* (transformação das formas epimastigotas em tripomastigotas), reforçando o papel essencial dessa enzima na sobrevivência e no crescimento do parasita (URBINA, DOCAMPO, 2003).

Como mecanismo de ação proposto para a inibição da cruzáina por derivados tiossemicarbazonas lineares e cíclicas (figura 4), sugere-se que a Cys25 do sítio catalítico da cruzáina ataque o carbono tiocarbonílico do inibidor e por consequência ocorra à transferência do próton da His159 para o enxofre tiocarbonílico, formando uma ligação covalente reversível, conforme ilustrado na figura 5 (TROSSINI et al., 2009; AGUIRRE et al., 2004; DU et al., 2002; DU et al., 2000).

Figura 4 – Estrutura geral das tiossemicarbazonas linear e cíclica sintetizadas e avaliadas frente à cruzáina por DU e colaboradores (2002).

(Figura adaptada de Du et al., 2002)

Figura 5 - Mecanismo de inibição da cruzaina por tiossemicarbazonas proposto por DU e colaboradores (2002)

(Figura adaptada de Du et al., 2002)

2.5.2 Nitrofural (NF)

O composto de nome IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) 5-nitro-2-furfurilidenossemicarbazona também conhecido como, nitrofurazona ou nitrofural (NF) (figura 6), é um derivado de semicarbazona, sintetizado com base na atividade bacteriostática do ácido furóico e seus derivados, alquilados e mercuriais (DODD et al., 1944). Empregado inicialmente durante a II Guerra Mundial, o NF apresentou amplo espectro de atividade antibacteriana, contudo, em razão da resistência bacteriana, o espectro de atividade foi se modificando ao longo do tempo (KOROLKOVAS, 2007; CRENSHAW et al., 1976).

Em 1969, Andrade e Brener observaram que o NF provocava destruição do *T. cruzi*. Mais tarde na história, Henderson e colaboradores (1988) constataram a inibição de naftoquinonas e nitrofuranos, incluindo o NF, sobre a tripanotiona redutase.

Figura 6 - Estrutura química do nitrofural (NF)

A formação do nitro radical aniônico a partir do nitrofural, anteriormente observada por Moreno em 1983, é responsável pelo mecanismo de ação tripanomicida do fármaco, sendo também comprovada, por meio de geração eletroquímica, com o uso de eletrodo de carbono vítreo (LA-SCALEA, CHUNG, FERREIRA, 1999).

Em trabalho desenvolvido por Chung e seu grupo de pesquisa (2003), pesquisando a atividade de bases de Mannich, observaram que o intermediário hidroximetil-nitrofural (NFOH) (figura 7), possuía maior atividade e menor toxicidade relativo ao nitrofural. O composto, além da atividade tripanomicida *in vitro*, apresentou a diminuição da toxicidade em quatro vezes, comparativamente ao NF, segundo o observado nos testes de mutagenicidade (CHUNG et al., 2003).

Figura 7 - Estrutura química do hidroximetil-nitrofural (NFOH)

Em trabalho realizado em nosso grupo, foi demonstrada a atividade inibitória da cruzafina pelo NF e pelo NFOH com valores de IC_{50} de $22,83 \pm 1,2 \mu M$ e $10,55 \pm 0,8 \mu M$, respectivamente. A maior atividade do NFOH em relação a seu precursor NF foi relacionada à deficiência eletrônica no carbono carbonílico do NFOH, com valores mais negativo que o NF, observado em estudos de modelagem molecular, a qual favorece o ataque da Cys25. (TROSSINI et al., 2010).

Assim sendo, o NF pode ser encarado como um *hit* de interessante atividade antichagásica, com necessidade de melhoria quanto a sua eficácia e toxicidade vislumbrando a busca de um líder e até fármaco para o tratamento da doença de Chagas.

2.5.3 Compostos sulfonados

Compostos sulfonados são utilizados na terapêutica para diversos fins, dentre as várias vertentes podemos citar as sulfonamidas como antimicrobianos, os tiazídicos utilizados como diuréticos, entre outros (LEMKE et al., 2012).

Exemplificando uma das aplicações do bioisosterismo, Lima e Barreiro (2005), na busca de candidatos a anti-inflamatórios e analgésicos, utilizando o bioisosterismo não-clássico, verificou que a reposição de *N*-acil-hidrazonas por sulfonil-hidrazonas alterou sutilmente os valores de *p*_{ka} dos candidatos de estudo, o que aumentou a eficiência dos mesmos (figura 8) (LIMA, BARREIRO, 2005).

Figura 8 – Exemplo de composto sulfonado que teve aumento de eficácia por aplicação de bioisosterismo não-clássico

(LIMA, BARREIRO, 2005)

Diferentes compostos sulfonados, entre eles, sulfonatos de ésteres, sulfonamidas e vinil-sulfonas, vem sendo pesquisados como inibidores de proteases e apresentaram efeito inibitório da cruzaina *in vitro*. Os mesmos compostos inibidores de cruzaina foram ativos em ensaios “*in vivo*” de culturas de células de *T. cruzi*, apresentando-se como uma promissora classe química na pesquisa de antichagásicos. Entre os compostos testados os derivados *N*-alquil-sulfonamidas foram os mais efetivos contra formas intracelulares de *T. cruzi*

(BRYANT et al., 2009; SANTOS, MOREIRA, 2007; REDDICK, CHENG, ROUSH, 2003; ROUSH et al., 2001).

Na busca de inibidores seletivos para a cruzaina e outras cisteíno-proteases de tripanossomatídeos, Jaishankar e colaboradores (2008) fizeram modificações moleculares com o objetivo de estudar as relações de SAR de compostos vinil-sulfônicos com interação seletiva (P2/P3) (figura 9). Tais informações são de grande importância no planejamento de inibidores com alta potência e seletividade pela cruzaina.

Figura 9 – Estrutura geral dos compostos vinil-sulfônicos propostos por Jaishankar et al., (2008) e seus respectivos grupamentos de interação

(Figura adaptada de Jaishankar et al., 2008)

Para derivados vinil-sulfônicos foi sugerido diferente mecanismo de inibição de cisteíno-proteases, por meio de adição de Michael. Tal mecanismo é demonstrado a seguir na figura 10, no qual a adição ocorre no carbono β aceptor de Michael, por meio do ataque do grupo tiol (SH) do resíduo catalítico Cys25. Com isso, é induzida uma protonação do carbono α pelo hidrogênio oriundo do resíduo His159, formando um derivado tio-éter estável (SANTOS, MOREIRA, 2007; REDDICK, CHENG, ROUSH, 2003).

Apesar de diferentes propostas mecanísticas, não se tem ao certo um mecanismo definido para inibição da cruzaina, sendo essa uma importante área de estudo para a obtenção de fármacos mais potentes. Estudos previamente realizados demonstram que compostos sulfonados, dentre outras aplicações, podem ser uma alternativa na busca de novos agentes antichagásicos, visto a classe dos compostos sulfonil-hidrazônicos não foram testados frente à cruzaina, até o momento.

Figura 10 - Mecanismo de inibição de cisteíno-proteases de compostos vinil-sulfônicos aceptores de Michael

(Figura adaptada de SANTOS, MOREIRA, 2007)

2.6 Descoberta de fármacos

A descoberta de fármacos iniciou-se de forma empírica com o uso de plantas medicinais e seus derivados, como o tabaco e o ópio. Tradicionalmente a descoberta de fármacos girava em torno da tentativa e erro, tal processo que demandava muito tempo e dinheiro. Com o passar dos anos, novas técnicas de descobrimento de drogas foram desenvolvidas para minimizar esse ônus. Unindo informações obtidos de técnicas experimentais, como a cristalografia e ressonância magnética nuclear, e técnicas teóricas, como as modernas técnicas computacionais, permiti-se planejar racionalmente fármacos de acordo com o alvo, otimizando o processo de desenvolvimento de uma nova molécula com potencial atividade (KHAN et al., 2011; BARREIRO, FRAGA, 2009; VIEGAS Jr., BOLZANI, BARREIRO, 2006; DAVIS, TEAGUE, KLEYWEGT, 2003; NEWMAN, CRAGG, KINGSTON, 2002; HOPFINGER, 1985).

A evolução da descoberta de fármacos destacou-se por quase um século baseada no conhecimento específico principalmente em três áreas: química, farmacologia e farmacologia clínica. Acompanhada de perto pela biologia, e com o alto investimento em genética, obtiveram-se muitos avanços, dando suporte para o conhecimento mais aprofundado de muitas doenças e suas bases moleculares. Dessa forma, como é feito atualmente, fica inevitável a interação e interdisciplinariedade das áreas de conhecimento envolvidas na

descoberta de fármacos (WARREN, 2011; WERMUTH, 2008; GUIDO, OLIVA, ADRICOPULO, 2008; LOMBARDINO, LOWE, 2004).

Apesar do uso de novas e avançadas tecnologias, especialmente as computacionais, persiste o desafio de que para um ligante (ou *hit*) se tornar um fármaco (AJAY, WALTERS, MURCKO, 1998; KUBINYI, 1998). Considerando o desafio, alguns autores vêm propondo diferentes abordagens para que as estruturas químicas tenham características ou propriedades físico-químicas, de um potencial ligante (lead-like), ou de um fármaco (drug-like) (TEAGUE et al., 1999; LIPINSKI, 2000). Dentre as propriedades envolvidas estão: massa molecular, coeficiente de partição octanol-água (LogP), grupos funcionais que façam interações de hidrogênios, quantidade de átomos de nitrogênio e oxigênio na molécula, pKa, solubilidade em água, além da afinidade a um receptor (GUIDO, OLIVA, ADRICOPULO, 2008; ROCHE, GUBA, 2005; LIPINSKI, 2000; TEAGUE et al., 1999; AJAY, WALTERS, MURCKO, 1997).

Em se tratando de planejar novos fármacos, também deve ser dada a devida atenção aos chamados alertas estruturais, os quais são subestruturas de moléculas responsáveis pelas propriedades tóxicas da mesma. A identificação desses grupos no planejamento dos fármacos pode prevenir uma característica de toxicidade, que possam vir a aumentar seu potencial, mutagênico, hepatotóxico e cardiotoxico. Temos como exemplo compostos nitro-aromático, aminas aromáticas, epóxidos, aldeídos α , β -insaturados, hidrazinas, hidrazidas, halogenetos alifáticos, hidroquinonas, entre outros (SUSHKO et al., 2012; STEPAN et al., 2011; HAKIMELAH, KHODARAHMI, 2005; WILLIAMS, NAISBITT, 2002).

Portanto, a partir de técnicas de modificação molecular é possível alterar propriedades desejadas ou indesejadas da molécula, alterando grupos químicos presente nela. Dessa forma, podemos auxiliar a interação entre ligante-receptor e consequentemente influenciar em sua atividade biológica (BARREIRO, FRAGA, 2009; WERMUTH, 2008; RAUTIO et al., 2008).

2.7 Modificação molecular

A modificação molecular está entre umas das técnicas tradicionais utilizadas no desenvolvimento racional de um fármaco, assim como, a utilização de produtos naturais, química combinatória, triagem virtual, entre outras. Principalmente utilizada no desenvolvimento de análogos, a modificação molecular aplica-se com diferentes objetivos,

entre eles, busca-se melhorar propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas de um protótipo, obter propriedades similares de interação com o alvo e em alguns casos, revelar uma atividade inesperada em outro alvo (GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011).

Tais objetivos podem ser alcançados através de processos laboratoriais sintéticos como: substituição de elementos ou pequenos grupos estruturais, troca de fragmentos da molécula, substituição do esqueleto original do análogo, introdução e retirada de grupos químicos, entre outros. Como consequência, tem-se a participação determinante na atividade biológica, podendo assim auxiliar na interação com o receptor (GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011; WERMUTH, 2008).

Dos fármacos introduzidos na terapêutica, apesar de não utilizar as bases moleculares das doenças como suporte para o planejamento de novos fármacos, entre uma das mais profícuas técnicas está à modificação molecular (BARREIRO, FRAGA, 2009; WERMUTH, 2008).

2.7.1 Bioisosterismo

Bioisósteros são conceituados como compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos, que apresentam características topológicas, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes e têm a capacidade de apresentar propriedade biológica análoga, agonista ou antagonista, em relação ao seu protótipo. (BROWN, 2012; BARREIRO, FRAGA, 2009; LIMA, BARREIRO, 2005; SILVERMAN, 2004; WERMUTH, 2008; PATANI, LaVOIE, 1996). Além de melhorar as propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas de um protótipo, permite vencer barreiras patentárias, o que desperta o interesse de indústrias farmacêuticas (BARREIRO, FRAGA, 2009; SHOWELL, MILLS, 2003). Entre as estratégias de modificação molecular, o bioisosterismo é muito utilizado com o objetivo de introduzir novas moléculas biologicamente ativas na terapêutica (BARREIRO, FRAGA, 2009).

O termo bioisosterismo é derivado do conceito de isosterismo, que teve início com o desenvolvimento completo das teorias de Química Geral e das propriedades dos elementos químicos (WERMUTH, 2008; PATANI, LAVOIE, 1996).

Em 1919, Langmuir verificou a relação entre a distribuição eletrônica e as propriedades físico-químicas de moléculas, definindo isósteros como: “Duas moléculas são isósteros se apresentarem na última camada eletrônica o mesmo número e arranjo de elétrons. As comoléculas, isósteros, devem, conseqüentemente, conter o mesmo número dos átomos, sendo a diferença essencial entre os isósteros, as cargas constituintes do núcleo dos átomos”. (WERMUTH, 2008)

Em seguida, GRIMM e colaboradores, em 1925, introduziram a lei do deslocamento de hidreto (LIMA, BARREIRO, 2005; BARREIRO, FRAGA, 2009). Mais adiante na história, em 1932, Erlenmeyer e colaboradores verificaram de que não apenas o número e o arranjo eletrônico estavam relacionados às características e propriedades similares dos elementos químicos, expandindo o conceito de isosterismo, considerando como isosterismo elementos situados na mesma coluna na tabela periódica, equivalência entre anéis aromáticos, semelhança entre os pseudo-halogênios (Ex: $\text{Cl} \cong \text{CN} \cong \text{SCN}$), entre outros (BROWN, 2012).

A observação da grande utilidade dos conceitos de isosterismo em fenômenos biológicos e na de ação de fármacos levou FRIEDMAN, em 1951, a criar o termo “bioisosterismo”, que pode ser explicado como um grupo de moléculas as quais têm similaridade química e física e produzem efeitos biológicos similares ou antagônicos em um mesmo sítio receptor (BROWN, 2012; BARREIRO, FRAGA, 2009; WERMUTH, 2008; PATANI, LaVOIE, 1996).

O bioisosterismo pode ser subdividido em bioisosterismo clássico, que abrange a definição de Erlenmeyer (átomos, íons ou moléculas em que as camadas periféricas de elétrons podem ser consideradas idênticas). Podem-se citar como exemplo grupos da classificação periódica, univalentes, bivalentes, e assim por diante, e equivalentes anelares; e bioisoterismo não-clássico, compreendendo átomos ou grupos de átomos que apresentam disposição estérica e configuração eletrônica semelhante, exemplo: $-\text{CO}-$ e $-\text{SO}_2-$, entre outros (BROWN, 2012; MEANWELL, 2011; SILVERMAN, 2004). O bioisosterismo entre H e F, antes considerado como não-clássico, é, hoje, classificado como clássico por alguns pesquisadores (MEANWELL, 2011; PATANI, LaVOIE, 1996).

Dentre as diferentes aplicações, o bioisosterismo pode melhorar propriedades farmacocinéticas do fármaco, aumentar pontos de interação com o alvo, diminuir a toxicidade, evitar processos de biotransformação, alterar a seletividade, entre as mais diferentes funções, amplamente utilizado no planejamento de novos candidatos a fármaco (BROWN, 2012; MEANWELL, 2011; WAGENER, LOMMERSE, 2006; LIMA, BARREIRO, 2005).

2.8. Planejamento Racional

Considerando a técnica de modificação molecular como efetiva, de simples aplicação e com resultados promissores, propusemos estruturas químicas análogas ao nitrofural, utilizando da estratégia do bioisosterismo clássico e não-clássico na busca da complementaridade com a estrutura conhecida do sítio ativo da cruzaina. Podemos observar o planejamento das moléculas ilustrado na figura a seguir (figura 11).

Figura 11 – Planejamento das moléculas de estudo, análogos ao nitrofural

Aplicamos o bioisosterismo clássico de anéis aromáticos na substituição do anel furânico do nitrofural por anéis hetero-aromáticos de cinco membros e anéis de seis membros substituídos.

Para que pudéssemos comparar a efetividade do grupamento nitro, alguns compostos continham o nitro na posição 5 do anel de cinco membros, assim como no nitrofural. Visando a diminuição da toxicidade dos compostos, também foram elaboradas moléculas sem o grupo nitro.

Aplicamos também o bioisosterismo não-clássico na reposição do grupo semicarbazona ($\text{H}_2\text{NCONHN}=\text{C}$) do protótipo NF, pelo grupo sulfonil-hidrazona ($\text{SO}_2\text{NHN}=\text{C}$).

A amina primária do nitrofural foi retirada e foi substituída pelo anel aromático, buscando um novo ponto de interação hidrofóbico e apolar com os bolsos da enzima, principalmente o bolso S2, qual aceita inteirações desse tipo.

Assim sendo, para concluir sobre a efetividade do planejamento realizado, avaliamos a atividade dos compostos propostos através do ensaio de cinética enzimática frente à cruzaina e ensaio de inibição do crescimento celular de formas epimastigota de *T. cruzi*.

3 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Adotamos como foco de nosso trabalho a doença de Chagas por essa ser responsável por um perfil epidemiológico/migratório de alto impacto econômico e na saúde pública mundial, sem ainda, possuir tratamento eficaz até os dias de hoje (WHO, 2015; DNDi, 2014, INCT-IDN, 2014; WILLYARD, 2013). Ainda assim, não há tratamento para a fase crônica da doença e os medicamentos utilizados na terapêutica para a fase aguda (nifrutimox e benznidazol), apesar de possuir eficácia, apresentam alta toxicidade e inúmeros efeitos adversos (KOROKOLVAS, 2007; LA-SCALEA, 1998; GRINGAUZ, 1997; DOCAMPO, 1990; DOCAMPO, MORENO, 1985).

Face o exposto e tendo como situação atual a necessidade de novos compostos anti-chagásicos mais potentes e menos tóxicos, o presente trabalho propõe como objetivo geral avaliar a aplicação do bioisosterismo sob o nitrofural na busca de compostos anti-chagásicos mais eficazes.

Como objetivo específico e metodologia desenvolvida e aplicada, o trabalho propoz:

- a síntese de compostos da classe das sulfonil-hidrazonas;
- caracterização dos compostos por técnicas espectrométricas e espectroscópicas;
- avaliação de pureza por cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE);
- avaliação inibitória frente à cruzaina e,
- avaliação da inibição do crescimento celular das formas epimastigotas do parasita *T. cruzi*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Reagentes, solventes e matérias-primas

Quadro 1 - Discriminação dos reagentes, solventes e matérias-primas utilizadas no desenvolvimento de toda a parte experimental do trabalho

2-acetilfurano (Sigma-Aldrich®)	ácido clorídrico (Synth®)	hidrato de hidrazina 80% (Riedel-Haën®)
2-acetiltiofeno (Sigma-Aldrich®)	caféina anidra (Vetec®)	hidróxido de amônio (Synth®)
3',4'-(metilenodioxo)acetofenona (Sigma-Aldrich®)	carbonato de sódio (Synth®)	hidróxido de sódio em pastilhas (Synth®)
4-(dimetilamino)benzaldeído (Riedel-Haën)	cloreto de 4-acetamido benzenossulfonila (Sigma-Aldrich®)	metanol (Synth®)
5-nitrofurano-2-carboxaldeído (Sigma-Aldrich®)	cloreto de 4-cloro benzenossulfonila (Sigma-Aldrich®)	metanol grau HPLC (Merck®)
5-nitrotiofeno-2-carboxaldeído (Sigma-Aldrich®)	cloreto de 4-toluenossulfonila (Sigma- Aldrich®)	ninidrina (Merck®)
acetato de amônio (Synth®)	cloreto de sódio (Synth®)	pirrol-2-carboxaldeído (Sigma-Aldrich®)
acetato de etila (Synth®)	diclorometano (Synth)	sulfanilamida (Vetec®)
acetato de sódio (Synth®)	dimetilsulfóxido deuterado (Cambridge Isotope Laboratories Inc.)	sulfato de sódio anidro (Synth®)
acetona (Synth®)	dimetilsulfóxido (Synth®)	tetrahidrofurano (Synth®)
acetonitrila (Synth®)	Etanol (Synth®)	tiofeno-2-carboxaldeído (Sigma-Aldrich®)
ácido acético (Synth®)	DL-ditiotreitol (Sigma-Aldrich®)	trietilamina (Synth®)
	furano-2-carboxaldeído ou furfural (Sigma-Aldrich®)	vanilina (Quimex®)
	hexano (Synth®)	Triton® X- 100

4.1.2 Equipamentos

Quadro 2 - Discriminação dos equipamentos utilizados no procedimento de síntese e caracterização das moléculas

Agitadores magnéticos - Fisatom e IKA
Aparelho capilar Büchi para determinação de faixa de fusão
Balança semi-analítica
Barra magnética
Bomba de alto vácuo, EDWARDS modelo nXDS6
Bomba de vácuo/compressor de ar - Vacuubrand – ME 1C
Câmara de ultra-violeta (UV)
Coluna para CLAE Phenomenex, C-18 Gemini; 5 μ ; 110Å; 150 x 4,60mm; 5 micron
Cromatoplasmas de sílica-gel 60 F _{254nm} - Macherey-Nagel, Alugram® (20cm x 20cm x 0,20 mm).
Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) - Shimadzu
Espectrofotômetro de ultravioleta/fluorescência – TECAN – Infinite® 200 PRO
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advance DPX-300
Evaporador rotatório modelo R-215 - Büchi
Lâmpada de radiação ultravioleta Spectroline, modelo ENF-260C
Mantas de aquecimento - Fisatom
Soprador térmico - Instruterm – AS-300-220
Tubo capilar sem heparina (Precision Glass Inc.)

Quadro 3 - Discriminação dos equipamentos utilizados no procedimento de cinética enzimática na avaliação biológica das moléculas

Espectrofotômetro de ultravioleta/fluorescência – TECAN infinite 200 PRO
micropipeta multicanal (HTL Multimate)
Placa 96 poços de fundo chato, preta (Jet Biofil® Luminescence tes plates)

4.2 Métodos

Os solventes e reagentes comercialmente adquiridos apresentaram qualidade satisfatória não sendo necessária prévia purificação. Quando necessária purificação foi realizada conforme procedimentos descritos por Armarego & Chai (2009). Todas os processos sintéticos foram monitorados por cromatografia de camada delgada (CCD) para determinação do fim da reação, usando como fase móvel misturas hexano/acetato de etila (Hex/AcOEt) ou acetato de etila/metanol (AcOEt/MeOH). A determinação da faixa de fusão foi realizada para todas as substâncias obtidas. A caracterização foi feita por RMN ^1H e RMN ^{13}C e os compostos finais (sulfonil-hidrazonas) foram submetidos à análise de absorção no ultravioleta (UV) e avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (sigla em inglês *HPLC*, *High Performance Liquid Chromatography*). Os produtos finais, compostos planejados, foram submetidos aos ensaios biológicos.

4.2.1 Métodos sintéticos

Os compostos propostos foram obtidos a partir de duas etapas sintéticas (esquema 1). Na primeira etapa foi realizada a reação de sulfonilação da hidrazina em meio básico (alcançado pelo excesso de hidrazina) na presença de derivados clorossulfônicos aromáticos, obtendo assim os intermediários sulfonil-hidrazidas de acordo metodologia apresentada por

Friedman, Litle, e Reichle (1973). Na segunda etapa, realizada segundo Asiri, Zayed, e Ng (2010), os intermediários obtidos foram submetidos à reação de formação de iminas por adição nucleofílica de aminas a aldeídos ou cetonas aromáticas. A reação ocorre em solvente polar prótico e aquecimento, obtendo como compostos finais sulfonil-hidrazonas.

Esquema 1 - Rota sintética de duas etapas para a obtenção dos compostos sulfonil-hidrazonas planejados

Condições reacionais: *i.* $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ exc., THF, -8°C , 3-5 h; *ii.* Aldeído ou cetona, MeOH, 60°C , 0,5-72h.

4.2.1.1 Síntese dos intermediários I, II e III: obtenção de sulfonil-hidrazida

Esquema 2 - Método de síntese dos intermediários sulfonil-hidrazida e seus substituintes

Na síntese do intermediário I, em um balão de fundo redondo (50 mL) adicionou-se uma solução de hidrato de hidrazina ($\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}_{(80\%)}$) (1,3 mL, 25 mmol) em THF (10 mL), mantendo a mistura reacional resfriada a -8°C (banho de gelo, cloreto de sódio (NaCl) e etanol (EtOH)), sob agitação magnética. Prosseguiu-se com a adição gota-a-gota de uma solução previamente preparada de cloreto de 4-toluenossulfonila (1,9150 g, 10 mmol) dissolvido em tetra-hidrofurano (THF) (5 mL). A duração da adição foi de 45 minutos e a reação foi mantida por mais 2 horas determinado por CCD. Ao final, à mistura reacional

foram adicionados 5 mL de água gelada e a mistura foi submetida a refrigeração por 24 horas. Ocorrendo a precipitação do produto, prosseguiu-se com filtração a vácuo, lavando o precipitado com THF gelado ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Do sólido obtido foi retirado o resíduo de solvente por secagem a pressão reduzida, utilizando bomba de alto vácuo por 24 horas, obtendo um precipitado cristalino branco.

Para síntese do intermediário II, o procedimento foi realizado conforme o anterior, utilizando uma solução de $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}_{(80\%)}$ (2,0 mL, 41 mmol) em THF (15 mL) e o cloreto de 4-cloro-benzenossulfonila (2,1297 g, 10 mmol) em THF (5 mL). O tempo de adição foi de 45 minutos e a reação foi continuada por mais 1,5 horas (CCD). Para a precipitação do produto procedeu-se da mesma forma que no procedimento anterior, assim como a retirada do resíduo de solvente, obtendo um precipitado branco.

O intermediário III também foi sintetizado conforme os procedimentos acima, entretanto por apresentar formação de subprodutos indesejáveis e rendimento inferior em relação aos intermediários I e II, propôs-se uma nova metodologia de síntese na qual ocorre adição de trietilamina (Et_3N) ao meio reacional.

A síntese do intermediário III foi feita em um balão de fundo redondo (50 mL), contendo uma solução de $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}_{(80\%)}$ (1,5 mL, 32 mmol) e Et_3N (0,9 mL, 11 mmol) em THF (20 mL), mantendo sob agitação à uma temperatura de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, o cloreto de 4-acetamido benzenossulfonila (2,4073 g, 10 mmol) foi adicionado à mistura reacional. Por ser insolúvel em THF, a adição foi dividida em três partes, adicionada uma a cada 15 minutos, totalizando um período de 45 minutos de adição. Prosseguiu-se com a reação por mais 30 minutos. Ao final da reação, observou-se a formação de precipitado na mistura reacional, a qual foi submetida a filtração a vácuo, lavado com THF a frio. O precipitado obtido foi suspenso em água gelada e em seguida basificou-se com hidróxido de amônio (NH_4OH). O precipitado resultante suspenso foi filtrado a pressão reduzida, então fez-se a retirada de resíduos de solvente em bomba de alto vácuo por 24 horas, obtendo um precipitado branco.

4.2.1.2 Síntese dos compostos finais (subséries a – i): obtenção de sulfonil-hidrazona

Esquema 3 - Síntese dos compostos finais sulfonil-hidrazona e seus substituintes

Em um balão de fundo redondo (50 mL), contendo o intermediário sintetizado na etapa anterior (1 mmol) e MeOH (15 mL), foi mantido sob agitação em aquecimento, até alcançar a temperatura de 60 °C. Em seguida adicionou-se lentamente uma solução do aldeído ou cetona (1 mmol) em MeOH (5 mL), sob a mistura reacional. A reação foi mantida até o total consumo de um dos materiais de partida (acompanhado por CCD). Ao final, com a mistura reacional ainda quente, foi adicionada H₂O gelada até ocorrer turvação da solução (respeitando o limite máximo 5 mL) e posterior refrigeração por 24 horas ou até total precipitação. Procedeu-se com filtração a pressão reduzida e retirada de resíduos de solvente por bomba de alto vácuo durante 24 horas.

4.2.2 Métodos analíticos

4.2.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para monitoramento das reações, a qual foi realizada em placas de sílica-gel 60 F_{254nm}. A visualização das manchas características dos reagentes e produtos formados foi feita por lâmpadas ultra-violeta (UV)

(254 nm e 365 nm) e, também, utilizando como revelador solução ácida de ninidrina à 0,3% (dissolvida em 3% de H_3CCOOH e EtOH q.s.p. (quantidade suficiente para 100% de solução); ou solução ácida de vanilina à 1% (dissolvida em 45 % de água destilada, 45 % MeOH e 10 % de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)). Quando necessário, as placas foram imergidas na solução reveladora e aquecidas com soprador térmico até colorir as manchas (JORK et al., 1994).

4.2.2.2 Faixa de fusão, ou intervalo de fusão

Para obtenção da faixa de fusão dos compostos utilizou-se aparelho de fusão capilar Büchi – M565.

A análise procedeu de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Ed (p. 82-83) (ANVISA, 2010). Todos os compostos avaliados em triplicata, previamente secos em dessecador com sílica gel por 24 horas.

A aferição do aparelho de fusão capilar foi realizada com três substâncias de faixas de fusão distintas, sugeridas pela Farmacopeia Brasileira 5ª Ed (ANVISA, 2010), sendo utilizada a vanilina (81,0 - 83,0 °C); sulfanilamida (163,9 - 166,4 °C); e cafeína anidra (235,6 - 237,5 °C), previamente seca em dessecador com sílica gel por 24 horas. Essas três substâncias foram utilizadas como padrão para verificação da aferição do aparelho.

Para a análise dos compostos inicialmente fez-se uma varredura de 100 – 250 °C, com elevação da temperatura de 20 °C/minuto para assim determinar o intervalo aproximado de fusão de cada composto.

Para cada análise da triplicata, iniciou-se a mensuração com 5 °C abaixo do ponto de fusão pressuposto e com elevação de temperatura de 1 °C/minuto, até verificar a completa fusão. Evidenciado o início da fusão até total desaparecimento da fase sólida, foi determinada faixa de fusão da substância.

O aparelho de faixa de fusão foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Substâncias Bioativas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

4.2.2.3 Espectrofotometria de absorbância no ultravioleta

O espectro de absorção no ultravioleta (UV) foi obtido através do Espectrofotômetro de ultravioleta/fluorescência – TECAN - Infinite® 200 PRO, disponível no Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais no Planejamento de Fármacos (LITEC – FCF/USP), utilizando o software Tecan I-control para obtenção de dados.

O experimento foi feito em placa de 96 poços de fundo chato, transparente e de poliestireno. Avaliados em duplicata, cada um dos compostos foi diluído à concentração de 50 nM em MeOH (grau *HPLC*, > 99% de pureza e reduzida absorção nos comprimentos de onda baixo (~200 nm)) e foram comparados a solução do branco (MeOH grau *HPLC*).

A solução foi agitada por 30 segundos e a medida de absorbância foi obtida fazendo uma varredura do comprimento de onda com amplitude de 1 nm, de 230nm a 500 nm. Dos valores obtidos fez-se o gráfico de intensidade de absorbância (OD) por comprimento de onda (λ), obtendo como resultados os valores de comprimento de onda de absorção máximo e a intensidade de absorção para cada composto.

4.2.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) todos os solventes utilizados foram grau *HPLC* (> 99% de pureza), as matérias-primas de grau analítico de pureza e a água ultra-pura foi obtida por ultrafiltrador Gehaka.

As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo líquido LC-20AT (Shimadzu), integrado com degaseificador DGU-20A₅ (Shimadzu), controlador CBM-20A (Shimadzu), sistema de dispensação de solventes múltiplo, amostrador automático SIL-10AD (Shimadzu) e detector UV/VIS SPD-20A (Shimadzu).

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna C₁₈ (150 x 4,60 mm, 5 μ m, 110 Å Phenomenex – Gemini), usando sistema de solvente por gradiente contendo misturas de MeOH e tampão (acetato de amônio (NH₄OAc) - pH = 4,5); ou (acetato de sódio (NaOAc) - pH = 5,5).

A solução tampão foi preparada no dia da análise de acordo com a Farmacopéia Europeia 5.0 (COUNCIL OF EUROPE, 2005).

Para o preparo do tampão NaOAc (pH = 5,5) foram dissolvidos 32,812 g de NaOAc anidro em 250 mL de água ultrapura, aferindo com o pHmetro, adicionou-se cerca de 4 mL de ácido acético glacial (H_3CCOOH) até atingir o pH desejado (pH = 5,5) e por fim completou-se a solução para 1000 mL com água. A concentração final do tampão foi de 1,6 M.

Para a solução tampão acetato de amônio (NH_4OAc) (pH = 4,5), foram dissolvidos 77,1 g de NH_4OAc em 250 mL de água ultrapura, em seguida foi adicionado 70 mL de H_3CCOOH glacial, ajustando o pH para 4,5 e ao fim completou-se o volume com água para 1000 mL de solução. A concentração final do tampão foi 1,0 M.

As soluções tampão foram filtradas por membrana de 0,45 μm de tamanho de poro e em seguida degaseificadas em banho de ultrassom.

A eluição foi feita por gradiente, iniciando com mistura de MeOH e tampão linearmente por 5 minutos com elevação para 90% de MeOH até 9 minutos, mantendo em 90% até os 17 minutos de corrida, diminuindo a proporção de MeOH para a inicial da corrida, totalizando 25 minutos de corrida cromatográfica para cada amostra.

O fluxo utilizado variou entre as amostras e a detecção foi feita à 254nm. As separações cromatográficas foram realizadas a temperatura ambiente (em média 22 °C).

Todas as amostras foram imediatamente preparadas para uso, sendo todas diluídas a mesma concentração (500 nM). O solvente utilizado na diluição da amostra foi o de mesma proporção que a fase móvel inicial, exceto para os compostos que possuíam grupamento nitro (subséries b e d), o qual foram diluídos apenas em MeOH.

As amostras foram adicionadas ao cromatógrafo por injetor automático, utilizando 25 μL da amostra. Antes da adição, estabilizou-se a linha de base com o solvente de eluição por tempo suficiente para que o detector não aferisse uma variação da altura do pico (intensidade do sinal) maior que 1 mAU por um período de 10 minutos.

A análise foi realizada na Central Analítica do Departamento de Farmácia – FCF-USP.

4.2.2.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A caracterização dos intermediários e produtos obtidos foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C), foram registrados em 300 MHz e 75 MHz respectivamente, utilizando aparelho Bruker ADVANCE DPX-300. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em partes por

milhão (ppm) e calibrados de acordo com o sinal do dimetil-sulfóxido deuterado (DMSO-d₆), sendo 2,51 ppm para RMN ¹H, e 39,5 ppm para RMN ¹³C. Exceto quando citado utilizou-se trimetilsilano (TMS), como padrão interno (0 ppm).

As abreviações usadas para a multiplicidade do pico são: singleto (*s*), singleto largo (*sl*), duplete(*d*), duplo duplete (*dd*), tripleto (*t*), quarteto (*q*) e multiplete (*m*) e a constante de acoplamento (*J*) é dada em Hertz (Hz).

Em todos os espectros de RMN ¹H poderão ser observados os sinais correspondentes ao solvente da análise (DMSO-d₆, sinal em 2,51 ppm) e dos hidrogênios da água presente no meio (na região de 3,30 ppm).

A espectroscopia de RMN foi realizada com auxílio da técnica de nível superior Dr. Maria Inês de Almeida Gonçalves, no equipamento disponível no Departamento de Farmácia – FCF-USP.

4.2.3 Ensaios biológicos

4.2.3.1 Ensaio de inibição e cinética enzimática em cruzaína de *T. cruzi*

A inibição e cinética enzimática foram determinadas por espectrofotometria de fluorescência, utilizando placa de 96 poços, preta e de fundo chato. A atividade da enzima foi medida por monitoramento da clivagem do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-7-amido-4-metil cumarina (Z-PheArg-AMC). O ensaio foi realizado em colaboração com o Prof^o Dr. Adriano D. Andricopulo do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP), auxiliado pela Doutoranda Ivani Pauli (IFSC/USP).

Para o ensaio foram preparadas previamente algumas soluções estoque: solução dos compostos sintetizados (100 mM em DMSO), solução tampão de NaOAc (0,1 M - pH = 5,5) e do substrato utilizado, cloridrato Z-PheArg-AMC (10 µM em DMSO), sendo esse último, utilizado em uma concentração final de ensaio de 5 µM.

Foi utilizada a enzima recombinante cruzaína de *T. cruzi* previamente expressada e isolada conforme, FERREIRA et al., 2014, utilizada na concentração de ensaio de 2 nM.

A enzima foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente em tampão atividade. O tampão atividade é composto por tampão NaOAc (0,1 M), 5 mM ditioneitol (DTT), TRITONTM X-100 (TX-100) (0,01%).

O fluorímetro foi mantido a uma temperatura de 30 °C para preparação da placa para ensaio. Primeiramente foi realizado um ensaio sem incubação prévia do inibidor com a enzima, para isso, foi adicionado o inibidor (1 µL, 100 µM), o substrato (99 µL, 10 µM) e o tampão atividade contendo a enzima (100 µL). Foi utilizado o comprimento de onda de 360 nm para excitação e 470 nm para emissão, sendo a obtenção dos dados feita em ciclo cinético de 5 minutos.

A fim de identificar se os compostos eram inibidores tempo-dependente ou não, foi realizado um segundo ensaio com prévia incubação. Preparou-se cada poço da placa com tampão atividade (100 µL) e foi adicionado o inibidor (1 µL, 100 µM), incubando a mistura de ensaio por 10 minutos em temperatura ambiente. Após esse período foi feita a adição de substrato (99 µL, 10 µM) e a leitura foi realizada da mesma forma como descrita anteriormente.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizamos como controle negativo 1 µL de DMSO em substituição ao composto. Os compostos que apresentaram inibição acima de 50% a uma concentração de 100 µM, foram submetidos aos ensaios de concentração inibitória mínima de 50% (IC₅₀). O IC₅₀ verifica a concentração mínima necessária do composto para inibir 50% da enzima.

4.2.3.2 Ensaio de IC₅₀ em cruzaína de *T. cruzi*

O procedimento para ensaio de IC₅₀ ocorreu da mesma forma que o ensaio anterior e utilizou-se das mesmas condições descritas anteriormente, apenas modificando a concentração do inibidor. Foram utilizados os inibidores nas concentrações finais de ensaio de 300 µM, 200 µM, 100 µM, 25 µM, 6,25 µM, 1,56 µM, 0,39 µM, 98 nM e 24 nM, em triplicata.

4.2.3.3 Ensaio de inibição de crescimento celular das formas epimastigotas de *T. cruzi*

Os ensaios de inibição de crescimento celular foram feitos segundo metodologia descrita por Magdaleno e colaboradores (2009). O experimento foi realizado pela Doutoranda Flávia Silva Damasceno e pela Pós-Doutoranda Ludmila Nakamura Rapado, em colaboração com o Prof^o Dr. Ariel Mariano Silber do Instituto de Ciências Biológicas/ USP.

O ensaio *in vitro* foi realizado contra as formas epimastigotas em fase de crescimento exponencial (aproximadamente 50×10^6 células/ mL). Essas células foram lavadas três vezes e ressuspensas em tampão fosfato. Em seguida, foram cultivadas em meio de cultura LIT (do inglês, *Liver Infusion Tryptose*) contendo ou não os inibidores em três concentrações (70, 100 e 150 μ M) a 28 °C. Em placas de 96 poços, foi inoculado $2,5 \times 10^6$ células/ mL em 200 μ L de meio de cultura.

O crescimento celular foi estimado por absorbância (leituras em 620 nm, por dez dias) e esse valor foi transformado em densidade celular (células/mL) em combinação com uma equação de calibração linear previamente obtida sob as mesmas condições ($R^2=0,9981$, $p<0,05$).

Para controle da inibição de crescimento celular, foram adicionados 200 μ M de rotenona e 0,5 μ M de antimicina ao meio de cultura e foi realizado o crescimento em paralelo à todos os outros experimentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sulfonil-hidrazidas

As classe das sulfonil-hidrazidas de acordo com El-Sayed (2004), geralmente é de fácil obtenção, com bom rendimento e alta pureza, obtida a partir da reação de um cloreto de sulfonila com 2 equimolares de hidrato de hidrazina, sob baixa temperatura. O método de síntese de sulfonil-hidrazidas utilizado foi adaptado de Friedman, Litle e Reichle (1973), por meio da reação de sulfonilação da hidrazina, nos proporcionando a obtenção de três intermediários sulfonil-hidrazídicos.

A reação de sulfonilação trata-se de uma reação de adição/eliminação, como ilustrado no esquema 4 (McMURRY, 2011).

Esquema 4 – Mecanismo de reação de obtenção de sulfonil-hidrazidas

(Esquema adaptado de McMURRY, 2011)

Nessa reação, a hidrazina age como nucleófilo, promovendo o ataque ao átomo eletronicamente deficiente, no caso o átomo de enxofre tetravalente do cloreto de sulfonila. Esse ataque ocorre em posição oposta ao grupo de saída (180 °C). Por sua vez, o cloreto de sulfonila possui alta reatividade, devido o cloro ser um bom grupo de saída, possibilitando a formação da ligação sulfonil-hidrazídica. A reação ocorre em solvente polar aprótico (McMURRY, 2011), nesse caso utilizou-se o THF.

A diferença entre os intermediários se dá no substituinte na posição *para* do anel aromático do cloreto de sulfonila aromático utilizado na reação. Assim sendo, cada um dos intermediários deu origem a uma série de compostos finais (série I - *p*-CH₃, série II - *p*-Cl, série III - *p*-acetamida).

Os substituintes foram selecionados de acordo com o diagrama de Craig (PATRICK, 2009). A ideia inicial seria obter quatro séries, sendo cada série com um substituinte de cada quadrante do diagrama. Entretanto, não foi possível a obtenção do substituinte do 4° quadrante, o ácido carboxílico, devido à insuficiência do reagente de partida disponível, o ácido 4-(clorossulfonil)-benzóico. Assim sendo, tal série foi excluída do planejamento dos inibidores propostos.

As sulfonil-hidrazidas apresentaram rendimento entre 50-65%, tempo de reação de 1-2 horas, aspecto sólido e cor branca ou cristalino e incolor. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 1 (mais adiante, p. 48), a qual contém a numeração, as estruturas, o tempo de reação, o rendimento e a faixa de fusão dos intermediários, assim como os valores encontrados na literatura.

Os intermediários I e II foram sintetizados com rendimento entre 50-65% e tempo médio de 2 horas utilizando o método descrito no item 4.2.1.1 (1º parágrafo – p. 38). Dos valores de faixa de fusão, constatou-se uma discrepância aos valores mencionados da literatura, sendo necessário avaliar o resultado de RMN ^1H e RMN ^{13}C para determinar que o produto obtido correspondesse ao produto desejado.

Com o propósito de aumentar a velocidade de reação e o rendimento obtido, optou-se por utilizar excesso de $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}_{(80\%)}$ (nucleófilo neutro), buscando deslocar o equilíbrio para o produto final, ou seja, o intermediário planejado (McMURRY, 2011).

Tabela 1 - Resultados de tempo de reação, rendimento e faixa de fusão obtidos da síntese dos intermediários e os respectivos valores encontrados na literatura

#	produto	Valores experimentais			Valores da literatura		
		(h)	%	(°C)	(h)	%	(°C)
I		2	60	109-111	0,5 ^a	90 ^a	105 ^a
II		2	53	113-114	0,25 ^b	89 ^b	115 – 116 ^b
III		4 / 1*	30 / 62*	177d	-	95 ^c	178d ^c

(*) Resultados obtidos na síntese usando Et_3N

(^a) ZHANG et al. 2014.

(^b) HOUSE, GAA, VANDERVEER, 1983

(^c) CREMLYN et al., 1981

O rendimento abaixo do esperado dos intermediários I e II pode estar relacionado à perda de produto na purificação. Outro fator que pode ter influenciado negativamente no rendimento foi a quantidade de água presente na hidrazina comercial (~20%). A água age como nucleófilo e converte o cloreto de sulfonila, em ácido sulfônico, diminuindo a quantidade de cloreto de sulfonila disponível para reagir. (McMURRY, 2011, MORRISON, BOYD, 1966).

A quantidade de água no sistema ainda, pode também ter influenciado consideravelmente na velocidade de reação. Reações de $\text{S}_{\text{N}}2$ tem sua velocidade reduzida quando há no meio reacional solvente polar prótico (no caso, H_2O), pois esses solvatam o

nucleófilo dificultando o ataque ao substrato (McMURRY, 2011). Sendo assim, a quantidade de água presente no hidrato de hidrazina comercial 80% (20% de água) pode ter influenciado consideravelmente na reação.

No caso do intermediário III, num primeiro momento, procedeu-se com a síntese de acordo com o método utilizado para os intermediários I e II (FRIEDMAN, LITTLE, REICHLE, 1973). No entanto, apesar da obtenção do produto, o rendimento (30%) e a purificação do composto não foram satisfatórios.

Na tentativa de melhorar os resultados obtidos, optou-se por utilizar o método citado no item 4.2.1.1 (4º parágrafo – p. 38), no qual, além do excesso de hidrazina, foi adicionado à mistura reacional a Et₃N. Essa condição reacional possibilitou a formação do produto com rendimento de 62% e diminuição do tempo de reação de 4 horas para 1 hora. O mecanismo desta reação é sugerido no esquema 5.

Esquema 5 – Mecanismo de reação de obtenção de sulfonil-hidrazidas na presença de Et₃N

(Esquema adaptado de Clayden e colaboradores (2001))

Embora tenhamos melhorado o rendimento para o intermediário III (62%) em relação aos primeiros resultados, ainda assim não conseguimos reproduzir os dados da literatura (95%) (CREMLYN et al., 1981).

O primeiro método utilizado para avaliar formação e pureza dos intermediários foi por faixa de fusão, os quais são apresentados na tabela 1 (p. 48). Os dados experimentais de faixa de fusão obtidos para os intermediários I e II, apresentaram-se diferentes dos da literatura (ZHANG et al., 2014, HOUSE, GAA, VANDERVEER, 1982) de 2 e 4 °C de diferença, respectivamente. Apesar destas diferenças, foi confirmada a formação dos intermediários por técnicas de RMN, demonstrando a obtenção dos intermediários planejados. Já para o intermediário III, os dados de faixa de fusão, mostraram-se muito próximos aos da literatura, com 1 °C de diferença e ambos sofreram decomposição.

A elucidação estrutural dos intermediários foi realizada por RMN ^1H e RMN ^{13}C . De modo a ilustrar o perfil dos sinais espectroscópicos característicos das sulfonil-hidrazidas, utilizamos como exemplo os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos para o intermediário I (figuras 12 e 13, respectivamente). Os espectros dos intermediários II e III podem ser visualizados no ANEXO A.

Na figura 12 apresentamos o espectro de RMN ^1H do intermediário I, no qual podem ser observados dois dupletos entre 7,0 – 8,0 ppm ($J = 8,0$ Hz), deslocamentos químicos característicos de hidrogênios de anel aromático *para*-substituído.

Podemos observar ainda, para o intermediário I, singlete em 2,39 ppm, sinal esse, atribuído a metila em posição *para* do anel aromático. Já no espectro do intermediário II (*p*-Cl), pode-se apenas observar os dois dupletos do anel aromático entre 7,0-8,0 ppm, acoplando com $J = 8,0$ Hz (vide ANEXO A). Enquanto que para o intermediário III, observar-se no espectro de RMN ^1H dois sinais característicos do substituinte *p*-acetamida, sendo o primeiro atribuído a metila (CH_3), pouco deslocado (blindado) em 2,10 ppm e o segundo atribuído ao hidrogênio do nitrogênio da ligação amídica, que aparece desblindado em 10,3 ppm (vide ANEXO A).

Os dois sinais que determinam a formação dos intermediários podem ser vistos em torno de 4,0 ppm e entre 8,0 - 8,5 ppm. Em 4,0 ppm, observa-se um singlete largo com dois hidrogênios, o qual foi atribuído a amina primária. Já o sinal entre 8,0 - 8,5 ppm, foi atribuído ao hidrogênio ácido (desblindado) do nitrogênio ligado à sulfonila, estes sinais nos indicam a formação do intermediário desejad

Figura 12 – Intermediário I: espectro de RMN ^1H com estrutura numerada, sinais e sua multiplicidade

Os sinais de RMN ^1H obtidos experimentalmente foram comparados aos descritos na literatura para cada um dos intermediários. Avaliando as tabelas 2, 3 e 4, verifica-se correspondência entre eles, indicando a obtenção dos intermediários propostos.

Tabela 2 – Valores de RMN ^1H do intermediário I, obtidos experimentalmente comparados aos valores retirados da literatura.

Intermediário	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
(400 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	(s, 3H)	(d, J = 8,0 Hz, 2H)	(d, J = 8,0 Hz, 2H)	(s, 1H)	(s, 2H)
REF.	2,38	7,39	7,68	8,29	4,05
(300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	(s, 3H)	(d, J = 7,95 Hz, 2H, H-2)	(d, J = 8,24 Hz, 2H)	(s, 1H)	(sl, 2H)
EXP.	2,39	7,40	7,70	8,27	4,04

(REF.) ZHANG et al. 2014

Tabela 3 – Valores de RMN ¹H do intermediário II, obtidos experimentalmente comparados aos valores retirados da literatura.

Intermediário		H-1	H-2	H-3	H-4
	(300 MHz, DMSO-d6, ppm)	(d, J = 8,0 Hz, 2H)	(d, J = 8,0 Hz, 2H)	(sl, 1H)	(sl, 2H)
	REF.	7,61	7,86	7,34	3,70
	(300 MHz, DMSO-d6, ppm)	(d, J = 8,40 Hz, 2H)	(d, J = 8,41 Hz, 2H)	(s, 1H)	(sl, 2H)
	EXP.	7,68	7,82	8,47	4,20

(REF.) HOUSE, GAA, VANDERVEER, 2014

Tabela 4 – Valores de RMN ¹H do intermediário III, obtidos experimentalmente comparados aos valores retirados da literatura.

Intermediário		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
	(400 MHz, DMSO-d6, ppm)	(s, 3H)	(d, J = 8,0 Hz, 2H)	(s, 4H)		(sl, 3H)	
	REF.	2,20	10,3	7,9		3,7	
	(300 MHz, DMSO-d6, ppm)	(s, 3H)	(s, 1H)	(d, J = 9,03 Hz, 2H)	(d, J = 8,91 Hz, 2H)	(s, 1H)	(sl, 2H)
	EXP.	2,10	10,3	7,74	7,78	8,22	4,04

(REF.) CREMLYM et al., 1981

Os sinais obtidos no espectro de RMN ¹³C (figura 13) referente ao composto I, nos permite evidenciar a formação do produto.

Na figura 13, podemos observar no espectro dois sinais mais intensos em 127,6 ppm e 129,4 ppm que correspondem os carbonos em *orto* e *meta*, totalizando 4 carbonos; os outros dois sinais desblindados e menos intensos com deslocamento em 135,2 ppm e 142,8 ppm correspondem, respectivamente, ao carbono do anel aromático ligado ao substituinte em *para* e ao carbono ligado à sulfonila; e, por fim, observa-se o sinal do carbono da metila em 20,96 ppm, sinal pouco intenso e blindado.

Figura 13 – Intermediário I: espectro de RMN ^{13}C com estrutura numerada, sinais e sua multiplicidade

Os espectros de RMN ^{13}C dos intermediários II e III apresentaram o mesmo perfil que o intermediário I e podem ser observados no ANEXO A.

Para o intermediário II, observamos os sinais dos carbonos *orto* e *meta* mais intensos (129,1 ppm e 129,6 ppm), sendo dois carbonos para cada sinal e os carbonos menos intensos ligado ao cloro (137,2 ppm) e o carbono ligado à sulfonila (137,5 ppm), correspondendo a um carbono cada sinal.

No espectro do intermediário III (ANEXO A), observamos um sinal de carbono blindado da metila da acetamida (24,08 ppm), observamos sinais semelhantes aos sinais dos compostos anteriores (118,5 ppm e 128,7 ppm) mais intensos (total de 4 carbonos), e menos intensos e mais desblindado do carbono ligado a sulfonila (131,6 ppm), e o carbono ligado ao nitrogênio da acetamida (143,0 ppm). E confirmando a estrutura nota-se a presença de um sinal em 169,0 ppm do deslocamento do carbono carbonílico da acetamida.

5.2 Sulfonil-hidrazonas

5.2.1 Resultados obtidos da síntese e faixa de fusão

A segunda etapa de síntese foi realizada para obtenção dos compostos finais, sulfonil-hidrazona, a partir de um método adaptado de (ASIRI, ZAYED, NG, 2010), do qual obtivemos 27 compostos finais, sendo 9 derivados de cada série.

Nesse mecanismo, a amina primária ataca o átomo de carbono eletronicamente deficiente da carbonila formando um intermediário tetraédrico, seguido de uma transferência de próton e consequente desidratação, resultando na formação do grupo imina (N=C) do produto final (McMURRY, 2011).

Esquema 6 - Mecanismo reacional de obtenção das sulfonil-hidrazonas a partir de aldeídos e cetonas.

(Esquema adaptado de Clayden e colaboradores (2001))

A reação de formação de imina, normalmente acontece em presença de ácido como catalizador (pH ótimo entre 5,0 e 6,0), entretanto não é uma limitação, já que a reação ocorre mesmo em sua ausência (acontecendo em solventes polar próticos, por exemplo) apesar de ocorrer de forma mais lenta (CLAYDEN et al., 2001; McMURRY, 2011).

Segundo Clayden e colaboradores (2011), iminas são instáveis e podem sofrer hidrólise, no entanto quando um átomo eletronegativo está adjacente ao nitrogênio ou ao

carbono imínico, ocorre uma delocalização da ligação imínica diminuindo a deficiência eletrônica do carbono da dupla ligação, tornando a ligação menos suscetível ao ataque nucleofílico, estabilizando compostos como as sulfonil-hidrazonas, o que proporcionou uma fácil obtenção e isolamento dos produtos formados.

Dos produtos isolados, as três séries sofreram variações quanto ao aldeído ou a cetona utilizada na reação. Na tabela a seguir (tabela 5 - pág. 55) podemos verificar os compostos sintetizados e também: a numeração, as estruturas, o tempo de reação, o rendimento e o ponto de fusão de cada um dos compostos obtidos.

As variações para cada série incluíram a adição de anéis hetero-aromáticos como furano, tiofeno e pirrol. Entre esses derivados, o furano e o tiofeno também foram substituídos na posição 5 do anel com o grupamento nitro e também derivados do furano e do tiofeno com um grupo metila no carbono imínico da sulfonil-hidrazona. Além disso, obtivemos derivados bioisostéricos não hetero-aromáticos, equivalentes de anel, como no caso dos compostos com o grupamento *p*-benzeno-dimetilamina e derivados com o grupo benzodioxol, esse último com uma metila ligada ao carbono imínico.

Tabela 5 - Resultados de tempo de reação, rendimento e faixa de fusão, obtidos da síntese dos compostos finais, sulfonil-hidrazonas

Série I					Série II					Série III				
#	produto	(h)	%	(°C)	#	produto	(h)	%	(°C)	#	produto	(h)	%	(°C)
Ia		0,75	68	113-114	IIa		0,5	52	120-121	IIIa		1	76	179d
Ib		0,75	93	143d	IIb		0,75	85	146d	IIIb		0,5	68	222d
Ic		2	76	143-145	IIc		2	80	159-160	IIIc		1,5	68	177d
Id		0,5	94	139d	IId		2	97	153-154	IIId		0,5	54	212d
Ie		0,5	61	178d	IIe		3	63	167d	IIIe		2	47	178d
If		1	75	166-167	IIIf		2,5	79	155-157	IIIIf		1,5	68	216d
Ig		3	59	143-145	IIg		3,5	63	153-154	IIIg		72	76	218d
Ih		3	51	205-206	IIh		3	42	143-145	IIIh		2	55	221-222
Ii		24	52	164-165	IIi		3	26	166-167	IIIi		27	66	217-218

(d) decomposição

No procedimento de síntese das sulfonil-hidrazonas, no qual utilizamos MeOH e aquecimento como condições reacionais, obtivemos todos os produtos planejados, confirmando que não há a necessidade de adição de ácido como catalisador para que a reação ocorra. Contudo, para as reações realizadas com aldeídos obtivemos rendimentos bons (entre 47 – 97%) e tempo de reação entre 0,5 – 3 horas. Já para as reações realizadas com cetonas, apesar da obtenção do produto, algumas delas apresentaram tempo de reação considerado longo (24 – 72 horas), sendo que a melhor alternativa para síntese desses derivados seria utilizando HCl em quantidades catalíticas (BORTOLUZZI et al., 2011).

O rendimento para as sulfonil-hidrazonas no geral foi bom, apesar de uma grande variação de 26 a 97%. Obtivemos 17/30 compostos com rendimento acima de 60%, considerado o método de síntese descrito anteriormente como aceitável para produtos da classe das sulfonil-hidrazonas.

Dos compostos com rendimento menor que 60%, 6/9 compostos são sulfonil-hidrazonas originadas da reação com as cetonas. Esse fato é explicado pela menor reatividade das cetonas frente aos aldeídos, logo para esse tipo de reação há a necessidade de utilizar um catalisador, como por exemplo, H_3CCOOH (pH ideal entre 5 e 6) para melhorar o rendimento das reações nesses casos.

Comparando o rendimento entre as três séries de compostos, notamos que o substituinte na posição *para* dos intermediários pouco afetam na reatividade da amina primária da sulfonil-hidrazida, prevalecendo à reatividade dos aldeídos e cetonas para o aumento ou diminuição do rendimento e tempo de reação.

Dos compostos obtidos a partir de aldeídos (subséries a-f), os que apresentaram menor tempo de reação e maiores rendimento foram os compostos nitrados na posição 5 do anel hetero-aromático, o qual podemos ponderar que está relacionado com o efeito retirador de elétrons do grupamento nitro no sistema aromático, aumentando, assim, a reatividade no carbono carbonílico do aldeído.

Dentre aldeídos menos reativos está o pirrol-2-carboxaldeído, o qual gerou os compostos Ie, IIf e IIIf, com rendimento de síntese entre 45-65%. As características eletrônicas e de ressonância do anel pirrólico o torna menos reativo, blindando o carbono carbonílico, dificultando o ataque do nucleófilo (MORRINSON, BOYD, 1966 e VOLHARDT et al., 2004).

Os compostos obtidos a partir do furfural apresentaram rendimento razoável (52 – 76%), mas vale ressaltar, que a purificação prévia do furfural obtido comercialmente foi

essencial, visto a degradação deste reagente quando em contato com o ar e sob ação da luz, tornando-o suscetível a polimerização na presença de bases. Esses produtos de degradação na reação, dificulta a formação e a purificação do produto (BUDAVARI, et al. 1996). A purificação foi feita por destilação, de acordo com Armarego & Chai (2009), sendo que de um líquido escuro, obtivemos um óleo incolor suavemente amarelado.

A avaliação da faixa de fusão dos compostos apresentou-se com variação de 1-2 °C, o que nos permite atribuir a análise de uma substância com alto grau de pureza. Dos compostos com valores de faixa de fusão descritos na literatura, todos apresentaram valores próximos (diferença de até 3 °C), exceto o composto Ie, o qual apresentou 8 °C de diferença divergindo da faixa de fusão da referência e baixo grau de pureza (tabela 6).

Uma característica observada quanto aos compostos da série III com o substituinte *p*-acetamina, os quais sofrem decomposição, exceto os compostos IIIh e IIIi. Da mesma forma, ocorre decomposição os compostos com o anel pirrólico e os compostos que possuem o grupamento nitro, exceto o composto nitrato IIId.

Foram encontrados dados na literatura para alguns dos compostos sintetizados e, estes, foram comparados aos resultados obtidos experimentalmente (tabela 6). É possível notar que a reação apresenta bom rendimento e baixo tempo de reação mesmo sem o uso de catalisador.

Tabela 6 – Comparativo dos resultados obtidos experimentalmente e na literatura

#	R ₁	R ₂	Valores experimentais			Valores da literatura		
			(h)	%	(°C)	(h)	%	(°C)
Ia^a	H		0,75	68	113-114	-	82	110-113
Ic^b	H		2	76	143-145	0,5	83	142-143
Ie^a	H		0,5	61	178d	-	82	186d
Ig^c	CH ₃		3	59	143-145	0,5	-	148-150

(a) KABALKA et al., 1997

(b) PHARR et al., 2012

(c) CHEN et al., 2013

Obs: nenhum dos autores utilizou ácido como catalizador

De acordo com os dados obtidos da síntese e do intervalo de fusão, prosseguimos com as análises por espectrofotometria de absorbância no ultravioleta e pureza cromatográfica por CLAE dos compostos finais.

5.2.2 Resultados da espectrofotometria de ultravioleta

Os métodos espectrofotométricos nos permite obter algumas informações para a identificação e caracterização de substâncias (ANVISA, 2010). Comumente se obtêm informações quanto ao comprimento de onda (λ), expresso em nanômetros (nm), nos quais acontece absorção de energia e transições eletrônicas em regiões da molécula, regiões estas, nomeadas de cromóforo. De acordo com o cromóforo presente na molécula, cada substância apresentará um comprimento de onda de máxima absorção e de muita ou pouca intensidade. Assim, os métodos espectrofotométricos podem auxiliar na caracterização molecular (ANVISA, 2010).

Apesar de menos específica que as outras técnicas espectrofotométricas, como o infravermelho e fluorescência, a espectrofotometria no UV é uma técnica sensível, rápida e de fácil execução. A técnica nos fornece resultados os quais corrobora para a identificação dos produtos, somados aos resultados dos outros métodos de caracterização, tais como ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, por exemplo (SIDDQUI, ALOTHMAN, RAHMAN, 2013; ANVISA, 2010).

Além da caracterização estrutural as substâncias, os espectros de absorção no UV dos compostos finais, também nos auxiliaram na determinação do comprimento de onda ideal para a análise de pureza cromatográfica por CLAE, a qual foi realizada com detector no UV.

Os dados obtidos geraram um espectro da relação entre o comprimento de onda de absorção (λ) entre a faixa de 230 nm à 500 nm, e a intensidade da absorbância expresso em densidade óptica (em inglês *optical density* - OD), numa escala de 0 à 4 OD.

Foi possível notar algumas características comuns de absorção dos compostos sintetizados, tal semelhança pode ser observada nas ilustrações adiante (tabela 7 e figuras 14, 15 e 16).

Relacionando as três séries dos compostos com a influência dos substituintes em *para* do anel benzênico (CH₃, Cl ou acetamida), observamos que os compostos com o substituinte acetamida apresentam uma banda de absorção característica na região dos 260 nm, o qual está

presente em todos os espectros da série III, porém as intensidades das bandas de absorção variam. Podemos verificar o $\lambda_{\text{máx}}$ e a intensidade do cromóforo para cada composto da série III na tabela seguir (tabela 7).

Tabela 7 - $\lambda_{\text{máx}}$ e a intensidade do cromóforo dos compostos da série III

#	cromóforo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Intensidade (OD)
IIIa		265	3,2
IIIb		258	0,27
IIIc		263	2,7
IIId		258	0,48
IIIe		258	0,54
IIIf		258	0,52
IIIg		261	0,58
IIIh		256	0,46

Nas figuras dos espectros a seguir, todos os compostos da série III apresentam duas bandas de absorção, uma banda referente ao grupo acetamida no anel benzênico ($\lambda_{\text{máx}}$ expresso na tabela 7) e outra banda referente ao cromóforo oriundo do aldeído ou cetona utilizado na etapa sintética, correspondente a subsérie.

Analizando os compostos que possuem um grupo furano em sua estrutura (subsérie a, b e g – figura 14, p. 61) observa-se um efeito hiperocrômico nos espectros da subsérie a, caracterizado pela alta intensidade de absorção (2,3 – 2,6 OD). A intensidade da banda atenua-se (efeito hipocrômico) quando o composto possui um grupo metila na ligação imínica (subsérie g; 0,58 – 1,8 OD), porém mantém a região de absorção em 295 nm. Quanto ao grupamento nitro (NO_2) substituído na posição 5 do anel furânico (subsérie b), resulta em efeito hipocrômico mais pronunciado (0,27 – 0,38 OD), e resulta também, num efeito batocrômico, alterando a absorção para um $\lambda_{\text{máx}}$ maior, passando de 285 nm para 350 nm. O efeito batocrômico nesse caso pode-se relacionar com a transição de elétrons n para o estado excitado do grupamento NO_2 ($n \rightarrow \pi^*$), o qual é somado à transição dos elétrons π do anel hetero-aromático para um estado excitado, π^* ($\pi \rightarrow \pi^*$) (BIRD, CHEESEMAN, 1984).

Assim como os derivados furânicos, os compostos das subséries c, d e h, derivados tiofênico, demonstraram perfil semelhante nos espectros de UV. A metila provocou um efeito hipocrômico e o grupo NO_2 provocou efeito hipocrômico e batocrômico (figura 15- p. 61).

O espectro dos compostos com o anel tiofênico da subsérie c e h, apresentaram duas bandas de absorção. Uma das bandas aparece próximo aos 264 nm, consequente da promoção do elétron do par livre do heteroátomo para o orbital π do anel hetero-aromático ($n \rightarrow \pi^*$) (BIRD, CHEESEMAN, 1984). Essa banda coincide com a região da banda dos compostos da série III, que também aparece em torno dos 260 nm, o que pode ter contribuído com a intensificação da banda nos compostos IIIc e IIIh. A outra banda, na região dos 300 nm deve-se corresponder, a transição ($\pi \rightarrow \pi^*$) dos elétrons do anel hetero-aromático.

No caso do furano, apesar de possuir o par de elétrons livres que não participa da ressonância do anel como no caso do tiofeno, observamos apenas uma banda no espectro de alta intensidade, que pode ter sido decorrente da soma das duas transições, ($n \rightarrow \pi^*$) e ($\pi \rightarrow \pi^*$).

Figura 14 - $\lambda_{\text{máx}}$ e a intensidade dos compostos com o anel furânico das subséries a, b e g

Figura 15 - $\lambda_{\text{máx}}$ e a intensidade dos compostos com o anel tiofênico das subséries c, d e h

#	cromóforo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Intensidade (OD)
Ic		268	1,2
		300	1,9
IIc		264	1,7
		301	2,5
IIIc		264	2,7
		301	1,7
Ih		259	0,33
		296	0,34
IIh		254	0,34
		298	0,34
IIIh		256	0,46
		303	0,33
Id		364	0,33
IIId		366	0,30
IIIId		366	0,30

Ao analisarmos o espectro dos compostos da subsérie e, com o anel pirrólico (figura 16), era esperado que o não aparecimento da banda de transição ($n \rightarrow \pi^*$), presente nos derivados com anel tiofênico e furânico. Isso devido ao fato do par de elétrons livres do nitrogênio participar da nuvem de elétrons π do anel, sendo assim, nesse caso pode-se observar em 300 nm, apenas uma banda de absorção, resultante da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel pirrólico (BIRD, CHEESEMAN, 1984).

Os compostos da subsérie f (figura 16), apresentam uma banda em comprimento de onda mais próximo do espectro da luz visível (efeito batocrômico), registrada em 338 nm. Nesse caso, tal efeito pode ser atribuído ao substituinte dimetilamina em *para* no anel benzênico (grupo auxócromo - absorve por si só radiação UV), o qual contribui com o aumento da conjugação do sistema eletrônico dos compostos, deslocando a região de absorção.

Da subsérie i (figura 16), o composto IIIi foi insolúvel nos solventes de análise, inviabilizando a obtenção do espectro. Os compostos Ii e Iii apresentaram mesmo perfil de absorção, com duas bandas de baixa intensidade, uma em 273 nm e a outra em 303 nm, sendo ambas resultando em fraca intensidade de absorção da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel aromático afetada pelo sistema dioxólico ligado à ele, o qual diminui a ressonância da molécula.

Figura 16 – $\lambda_{\text{máx}}$ e a intensidade dos compostos das subséries e, f e i

Obtidos os indícios de caracterização dos compostos sintetizados pela espectrometria no ultravioleta e com a faixa de fusão do composto determinada, descrita anteriormente, prosseguiu-se com a avaliação de todos os compostos quanto a sua pureza cromatográfica por CLAE para que, posteriormente, pudéssemos elucidar estruturalmente as substâncias por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono 13 (RMN ^{13}C).

5.2.3 Resultados da pureza cromatográfica (CLAE)

A análise de pureza foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A técnica de CLAE apresenta uma excelente especificidade, e precisão suficiente para nos fornecer dados da pureza dos compostos (SIDDQUI, ALOTHMAN, RAHMAN, 2013).

A separação cromatográfica foi realizada a fim de separar o pico de maior intensidade dos demais e relacionar sua área (%), podendo assim atribuir a pureza do composto de análise. Os cromatogramas e a tabela com os resultados de cada separação cromatográfica podem ser visualizados no ANEXO B.

De todos os compostos obtidos apenas para o IIIi não foi possível obter resultado da pureza devido a insolubilidade nos solventes polares como MeOH, acetonitrila (CH_3CN), água ou soluções tampão, impossibilitando sua análise por CLAE. Sendo assim, o composto necessitaria de um outro método de avaliação de pureza, como por exemplo análise elementar, a qual será realizada no Instituto de Química (IQ-USP).

Os sistemas eluentes variaram em proporções de tampão de 35-50% e MeOH de 65-50%, selecionado de acordo com o perfil de separação mais adequado para cada composto, obtido experimentalmente. Nas tabelas a seguir (tabelas 8, 9 e 10 – p. 64 e 65), apresentamos o detalhamento do método utilizado, e os resultados obtidos para cada composto.

As soluções tampão utilizadas foram de NaOAc ($\text{pH} = 5,5$) e tampão de acetato de amônio (NH_4OAc) ($\text{pH} = 5,5$). Os tampões foram utilizados com o intuito de manter as moléculas não ionizadas, evitando assim, o alargamento dos picos nos cromatogramas e, conseqüentemente, evitando mascarar possíveis impurezas (JARDIM, COLLINS, GUIMARÃES, 2006). Para obtenção do pH ideal para cada composto, foi verificado o pK_a teórico por meio de cálculo no software MarvinSketch (disponível online, vide item 7 Referências). Deste modo, determinamos a faixa de pH 4,5 - 5,5 como a ideal para análise.

Tabela 8 – Detalhamento do sistema eluente, fluxo e pH, empregados na metodologia de análise de cada composto e os resultados de tempo de retenção, fator de cauda, resolução e porcentagem de pureza obtida para os compostos da série I

SÉRIE I	METODOLOGIA				RESULTADOS			
	% tampão	% metanol	fluxo (mL/min)	pH	fator de retenção (min)	fator de cauda	resolução	pureza (%)
a	50	50	1,0	5,5	5,32	1,45	3,09	98,4
b	45	55	1,0	4,5	5,06	1,33	3,24	99,5
c	40	60	1,0	5,5	5,14	1,41	5,29	99,1
d	40	60	1,0	4,5	5,32	1,34	2,57	99,9
e	40	60	1,0	5,5	4,00	1,77	8,33	98,2
f	35	65	1,0	5,5	5,43	1,39	1,90	96,3
g	40	60	1,0	5,5	4,26	1,43	0,97	97,2
h	40	60	1,0	5,5	6,26	1,36	4,28	99,7
i	35	65	1,0	5,5	4,83	1,44	1,71	97,0

Tabela 9 – Detalhamento do sistema eluente, fluxo e pH, empregados na metodologia de análise de cada composto e os resultados de tempo de retenção, fator de cauda, resolução e porcentagem de pureza obtida para os compostos da série II

SÉRIE II	METODOLOGIA			pH	RESULTADOS			
	% tampão	% metanol	Fluxo (mL/min)		fator de retenção (min)	fator de cauda	resolução	Pureza (%)
a	40	60	1,0	5,5	4,67	1,42	1,62	98,8
b	40	60	1,0	4,5	4,10	1,35	3,40	99,3
c	40	60	1,0	5,5	7,33	1,47	6,30	98,6
d	35	65	1,0	4,5	6,58	1,34	3,25	99,1
e	40	60	1,0	5,5	5,23	1,41	3,03	99,3
f	35	65	1,0	5,5	7,63	1,37	2,45	87,6
g	60	40	1,0	4,5	12,7	1,35	8,76	99,7
h	40	60	1,0	5,5	9,24	1,94	9,71	95,9
i	35	65	1,0	5,5	6,59	1,43	2,85	95,8

Tabela 10 – Detalhamento do sistema eluente, fluxo e pH, empregados na metodologia de análise de cada composto e os resultados de tempo de retenção, fator de cauda, resolução e porcentagem de pureza obtida para os compostos da série III

SÉRIE III	METODOLOGIA			pH	RESULTADOS			
	% tampão	% metanol	Fluxo (mL/min)		Fator de retenção (min)	Fator de cauda	resolução	Pureza (%)
a	50	50	0,8	5,5	3,68	1,69	2,63	98,1
b	50	50	1,0	4,5	3,17	1,28	-	99,6
c	40	60	1,0	5,5	2,75	1,58	2,08	98,2
d	40	60	1,0	4,5	2,84	1,40	1,99	98,7
e	50	50	0,8	5,5	3,16	1,44	1,82	73,5
f	35	65	1,0	5,5	3,06	1,60	0,58	98,5
g	50	50	0,8	5,5	4,29	1,40	2,26	94,3
h	40	60	1,0	5,5	3,06	1,56	1,34	97,7
i	-	-	-	-	-	-	-	-

Para os derivados nitrados foi necessário aumentar a acidez do sistema, de modo a evitar o alargamento do pico. Entretanto os compostos Ia e IIg apresentaram uma boa resolução a pH 5,5. O aumento da acidez do sistema foi necessário, pois o grupamento nitro influencia na acidez do hidrogênio ligado ao nitrogênio da sulfonil-hidrazona, aumentando-a, e consequentemente, ionizando a molécula em pH mais elevados. Portanto, o tampão em pH= 4,5, aumentaria a proporção do composto não ionizado na análise, evitando uma má resolução do pico.

Para a grande maioria dos compostos o fluxo comum utilizado foi de 1 mL/minuto, sendo necessário reduzir para 0,8 mL/minuto na análise de 3 compostos (IIIa, IIIe e IIIg). Tal mudança de fluxo foi necessária, para estava ocorrendo sobreposição de picos o que poderia mascarar impurezas no cromatograma, resultando em uma pureza superestimada para os compostos.

Adequou-se o perfil de gradiente de solvente de maneira que o pico principal, ou seja, o produto majoritário aparecesse nos primeiros 10 minutos de eluição, a fim de obtermos análises rápidas e precisas. Para a estabilização da linha de base, o tempo total de corrida foi de 25 minutos, permitindo assim, a limpeza adequada da coluna e ambientação do sistema com o solvente de eluição da próxima análise.

Todas as amostras foram diluídas em mesma concentração (500 nM). Foi utilizado mistura de tampão e MeOH para diluição da maioria das amostras exceto para os compostos com grupamentos nitro (Ib, IIb, IIIb, Id, IId, IIId), diluídos apenas em MeOH.

No caso dos compostos nitrados foi possível observar que, ao dissolvê-los em MeOH, a solução apresentava coloração amarela, e ao adicionarmos o tampão, a solução passava de coloração amarelo à laranja. Essas amostras contendo tampão foram avaliadas por CLAE e detectou-se a presença de alta porcentagem de impureza. Ao avaliarmos os compostos usando somente MeOH para a diluição, obtivemos um resultado de pureza maior e ausência dos demais picos que antes apareciam. Sendo assim, suspeita-se que ocorra a degradação desses compostos em soluções tampão, recorrente da presença do grupamento nitro, porém seriam necessários mais estudos para verificar como a degradação ocorre e se a decomposição desses compostos afetaria nos resultados biológicos.

Para todos os compostos utilizou-se 254 nm como comprimento de onda ideal de detecção, o qual foi determinado previamente por visualização da varredura de absorbância dos compostos em espectrofotômetro de ultravioleta.

De acordo com Snyder e Kirkland (1979), é preferível a adoção da área como método quantitativo para CLAE quando na separação cromatográfica obtêm-se picos assimétricos, entre o analito e as impurezas. Como nossos compostos apresentaram casos de assimetria dos picos, adotamos a porcentagem de área de cada pico como melhor técnica para avaliar a pureza de todos nossos compostos. No entanto, para avaliação de pureza pela porcentagem de área é necessário avaliar outros parâmetros como altura do pico, largura do pico a 50% da altura, fator de cauda e resolução do pico.

Considerou-se 95% ou mais de pureza como porcentagem ideal para que não houvesse interferência causada por impurezas nos ensaios biológicos dos compostos.

Dos 27 compostos, 23 apresentaram 95% ou mais de pureza. Três compostos tiveram menos que 95% de pureza (II_f (87,6%), III_e (73,5%) e III_g (94,3%)). A purificação dos compostos foi feita por recristalização, e de acordo com tais resultados, consideramos não ser necessário a utilização de outras técnicas de purificação. Entretanto, para as substâncias que apresentaram pureza insatisfatória será feita uma nova recristalização até que atinjam a pureza desejada de 95%. A fim de verificar como os compostos se comportariam no ensaio, todos foram submetidos a ensaio biológico, mesmo os que não atingiram o valor pretendido de pureza.

A seguir, na figura 17, apresentamos a separação cromatográfica do composto Ia obtida por CLAE. Observamos dois cromatogramas, o primeiro com a separação cromatográfica da amostra, o segundo observamos a comparação da amostra com a amostra do branco, a qual foi preparada na mesma proporção do solvente de eluição. Abaixo dos cromatogramas, podemos observar os resultados gerados pelo software expressos em forma de tabela, a qual descreve os picos das substâncias encontradas na amostra sendo o pico principal, avaliado como nosso composto, já que tivemos indícios de ser nosso composto por outras técnicas anteriormente mencionadas.

Para o composto Ia, o pico teve tempo de retenção de 5,1 minutos, apresentando uma boa resolução (3,09). Os valores de altura indicam ser o 5º pico, o pico de interesse. Em relação à largura, nesse caso os picos apresentam simetria, entre 0,1 e 0,2 cm de largura a 50% da altura. O pico principal apresentou um pico adjacente muito próximo, entretanto, comparando a altura de ambos, nota-se o pico 5 ser o majoritário. Ainda assim, a comparação

dos picos demonstrou 98% de área para o pico principal, equivalente a 98 % de pureza do composto na amostra.

Assim como para o composto Ia, os demais compostos também foram analisados e os cromatogramas da separação cromatográfica podem ser observados no ANEXO B. Realizada a análise de todos os compostos por CLAE, prosseguimos com a caracterização por RMN.

Figura 17 – Picos obtidos na separação cromatográfica do composto Ia: Cromatograma da amostra (lado esquerdo), cromatograma de comparação da amostra com o branco (lado direito) e tabela com os resultados dos picos obtidos (abaixo)

5.2.4 Caracterização por RMN ^1H e RMN ^{13}C

Todos os compostos foram caracterizados por RMN ^1H e RMN ^{13}C . De modo a exemplificar a caracterização estrutural, utilizamos os dados espectrométricos de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto Ia. Os demais espectros podem ser visualizados no ANEXO C.

A numeração, o espectro, assim como os sinais obtidos para o composto Ia estão dispostos na figura 18 a seguir.

Nos espectros de RMN ^1H das sulfonil-hidrazonas podem ser observados sinais correspondentes aos seus intermediários, como demonstrado no item 5.1 (p. 46). No caso do composto Ia, os dupletos do anel aromático *p*-substituído aparecem na região do 7,40 e 7,75 ppm, o qual o segundo duplete está sobreposto com outro hidrogênio da estrutura. Podemos notar, também, o sinal dos hidrogênios da metila (2,37 ppm) assim como no intermediário I (item 5.1, figura 12, p. 50).

O sinal do hidrogênio hidrazídico, anteriormente observado em 8,27 ppm no intermediário I, aparece mais desblindado nas sulfonil-hidrazonas, agora como um singlete largo e de baixa intensidade em 11,4 ppm no caso do composto Ia. Essa mudança de região do sinal pôde ser observada em todos os espectros de RMN ^1H das sulfonil-hidrazonas como indicativo da formação do produto na síntese.

A caracterização de formação dos produtos originados de reações com aldeídos corresponde ao hidrogênio da ligação imínica da sulfonil-hidrazona, presente em todos esses compostos. Esse hidrogênio apresenta-se desblindado, na região do 7,0 – 8,0 ppm, em se tratando do composto Ia, tal hidrogênio (H-5), é registrado em 7,79 ppm (figura 18).

No anel furânico, o hidrogênio mais blindado é o H-7 (6,56 ppm) o qual gerou um duplo duplete do acoplamento com os hidrogênios H-6 e H-8. O H-6 (6,80 ppm), foi registrado como um duplete acoplado com $J = 3,37$ Hz ao H-7. O H-8 (7,75 ppm), é visto sobreposto com o duplete dos hidrogênios do anel aromático. Os hidrogênios dos anéis aromáticos das demais subséries foram registrados em regiões específicas para cada uma das séries, e estão expressos como anexo (ANEXO C).

Nos compostos da subsérie g, h e i, originados de cetonas, o sinal referente à formação do produto apresenta-se como um singlete blindado, com os três hidrogênios da metila da ligação imínica, visto na região de 2,0 ppm.

Figura 18 – Estrutura numerada do composto Ia, tabela com os sinais e o espectro obtido na análise de RMN ^1H

Em seguida, discutiremos o espectro de RMN ^{13}C do composto Ia. A numeração da estrutura, os sinais e o espectro obtido, estão dispostos na figura adiante (figura 19).

O RMN ^{13}C dos intermediários apresentado no item 5.1 (figura 13, p. 52, ANEXO A), nos permitiu traçar o perfil dos deslocamentos para cada série dos compostos finais, onde por comparação, os sinais identificados nos intermediários, nos auxiliaram a atribuir os demais sinais dos compostos finais. Podemos observar também, que a maioria dos sinais correspondem a carbonos desblindados, acima de 6,0 ppm, característicos de compostos aromáticos ou de sistemas insaturados.

No composto do exemplo, os sinais mais intensos correspondem aos dois carbonos C-3 e os dois carbonos C-4 do anel aromático (127,0 – 129,0 ppm). Os carbonos C-7 e C-10 (148,6 e 144,9 ppm), vizinhos ao oxigênio do anel furânico aparecem mais desblindados que os demais carbonos da molécula devido ao efeito da eletronegatividade do oxigênio, que por consequência blinda os carbonos C-8 e C-9 do mesmo anel, registrados em 113,7 e 111,9 ppm, respectivamente.

O carbono resultante da ligação imínica, o qual corresponde a formação do produto, aparece desblindado, registrado em 136,9 ppm no composto Ia. O carbono da ligação imínica sofre deslocamento de acordo com a subsérie em que se encontra, sendo que, o substituinte em *para* do anel benzênico dos intermediários não resultou em alterações significativas no deslocamento do carbono da ligação imínica.

Figura 19 – Estrutura numerada do composto Ia, tabela com os sinais e o espectro obtido na análise de RMN ^{13}C

Os resultados para os demais compostos estão expostos como anexo (ANEXO C). Após análise dos dados de caracterização por RMN ^1H e RMN ^{13}C , que corroboraram com as análises anteriores de faixa de fusão e absorção no ultravioleta foi possível comprovar que os compostos obtidos correspondiam aos compostos propostos. Consequentemente, prosseguimos com os ensaios biológicos dos 27 compostos da classe da sulfonil-hidrazona.

5.3 Ensaios biológico

5.3.1 Ensaios de inibição enzimática da cruzaina

De modo a obter informação biológica e verificar se o planejamento dos bioisósteros obteve o sucesso esperado, os compostos sintetizados foram submetidos a ensaio de inibição enzimática da cruzaina de *T. cruzi* recombinante, a qual foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo do IFSC/USP.

O método de fluorimetria foi utilizado para avaliar a inibição enzimática. A reação se dá pela emissão de fluorescência oriunda da clivagem do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC pela cruzaína. Sendo que o aumento da emissão de fluorescência foi diretamente proporcional ao aumento da atividade da cruzaína e diminuição da inibição provocada pela ação de inibidores na reação catalisada pela enzima.

Uma triagem em dose única na concentração de 100 μM foi feita para todos os compostos sintetizados, no intuito de avaliar quais deles teriam atividade inibitória. Nesta etapa, foi estipulado como valor de corte 50% de inibição da enzima. Assim sendo, os derivados que apresentassem atividade acima de 50% de inibição da cruzaína seriam considerados *hits*, e para eles, então, determinado o valor de concentração inibitória de 50% (IC_{50}) (tabela 11, p. 72).

Podemos observar na tabela 11 a seguir que, dos 27 compostos testados, 18 não apresentaram inibição da cruzaína, com valores menores que 10%.

Podemos observar que as subséries b e d apresentaram melhores resultados de inibição da cruzaína. Essas duas subséries, como característica estrutural comum possui o grupamento nitro na posição 5 do anel hetero-aromático. Dentre os compostos que apresentaram acima de 50% de inibição a 100 μM , o que apresentou maior potência foi o composto Ib, com valor de $\text{IC}_{50} = 85,9 \mu\text{M}$.

Avaliou-se ainda, nesta etapa, se os compostos atuariam por mecanismo tempo-dependente na inibição. Não foi possível observar nenhuma relação tempo-dependente para os compostos.

(-) compostos que não apresentaram valores de inibição de crescimento celular significativo

Os compostos da subsérie f apresentaram em torno de 20% de inibição à 100 μM , sendo assim, a fim de verificar se tais compostos apresentariam valores mais promissores de inibição, tais foram submetidos a ensaio de IC_{50} . Entretanto, devido a baixa hidrossolubilidade, os compostos precipitaram na solução de análise em concentrações mais elevadas, não sendo possível obter os resultados de IC_{50} .

Os resultados para os compostos da subsérie f ainda assim apresentaram valores significativos de inibição, de modo que como consequência do trabalho poderão ser feitas alterações em suas estruturas, afim de melhor a hidrossolubilidade desses compostos e verificar se ocorrem melhorias em sua atividade biológica frente à cruzaina.

5.3.2 Ensaio de inibição de crescimento celular das formas epimastigotas de *T. cruzi*

Os ensaios de inibição celular foram feitos com o intuito de verificar a atividade tripanomicida dos compostos nas formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os compostos foram avaliados em três diferentes concentrações (70, 100 e 150 μM), em epimastigotas em fase de crescimento exponencial ($\pm 50 \times 10^6$ células/ mL). Os resultados estão expostos na tabela a seguir (tabela 12, p. 74).

Podemos observar na tabela 12, que 14/27 compostos não apresentaram valores significativos de inibição do crescimento celular em nenhuma das concentrações utilizadas no ensaio. O composto Ic apresentou baixa porcentagem de inibição a 150 μM (15%), não sendo essa significativa. Os compostos da subsérie e, apresentaram moderada inibição a partir de 100 μM de concentração, de 25 – 55% de inibição e a 150 μM , entre 78 – 85% de inibição, podendo esses serem considerados promissores.

Foi possível observar também que, assim como no ensaio enzimático, os compostos que apresentam porcentagem de inibição mais relevante, foram os compostos com o grupamento nitro (subséries b e d) e o composto IIf, o qual possui o grupamento *p*- benzeno-dimetilamina em sua estrutura.

Tabela 12 – Resultados dos ensaios biológicos de avaliação dos compostos obtidos como inibidores do crescimento celular da forma epimastigota de *T. cruzi*

Série I					Série II					Série III				
#	produto	% de inibição			#	produto	% de inibição			#	produto	% de inibição		
		70 μ M	100 μ M	150 μ M			70 μ M	100 μ M	150 μ M			70 μ M	100 μ M	150 μ M
Ia		-	-	-	IIa		-	-	-	IIIa		-	-	-
Ib		20,5	93,0	94,0	IIb		62,5	96,0	98,2	IIIb		37,7	92,8	97,5
Ic		-	-	-	IIc		-	-	15,4	IIIc		-	-	-
Id		73,7	97,6	98,0	IId		65,9	95,0	95,0	IIId		67,0	95,5	96,3
Ie		-	54,7	84,7	IIe		-	24,8	84,0	IIIe		-	46,8	78,2
If		7,67	20,2	2,64	IIIf		32,8	60,5	68,8	IIIIf		-	-	-
Ig		-	-	-	IIg		-	-	-	IIIg		-	-	-
Ih		-	-	-	IIh		-	-	-	IIIh		-	-	-
Ii		-	-	-	IIi		12,9	25,7	61,7	IIIi		-	-	-

(-) compostos que não apresentaram valores de inibição de crescimento celular significativo

Os compostos com o grupamento nitro apresentaram quase total inibição (acerca de 95%) nos ensaios realizados a partir de 100 μ M. Apesar dos bons resultados, como inibidores de cruzaina, devemos ressaltar que compostos nitratos são amplamente criticados, visto que comumente apresentam alta toxicidade. No entanto, análises de toxicidade serão realizadas de modo a avaliar se há relação entre atividade biológica e a toxicidade desses compostos. avaliação importante para que o estudo com esses compostos avance.

Nesse ensaio, um fato importante observado foi que, apesar dos compostos nitrados apresentarem inibição num primeiro momento, com o passar dos dias o crescimento celular aumentava gradativamente, assim sendo, sugere-se que por estarem sofrendo degradação na solução de ensaio, tais compostos percam sua atividade em função do tempo. Há também a possibilidade de tais compostos apresentarem atividade pelos mesmos mecanismos que outros nitroderivados, como citado anteriormente. Assim sendo, sua atividade biológica seria resultante da redução do grupo NO_2 , atividade essa, suscetível ao longo do tempo consequente do total consumo das moléculas ativas, ou total redução do grupamentos NO_2 das moléculas no ensaio. Entretanto, para nos certificar, serão feitos testes de degradação dos mesmos e verificar se há relação com a perda de atividade. Podemos observar os gráficos obtidos do ensaio em epimastigota de todos os compostos, no ANEXO D.

O composto IIf, inibiu 60,5% do crescimento celular à 100 μ M de concentração, nos aparenta ser promissor. Além de apresentar inibição celular das formas epimastigotas, apesar de fraca, também apresenta inibição da cruzaina ($\pm 20\%$ a 100 μ M). Tais resultados nos permite avaliar um consequente planejamento de modificações estruturais com base na estrutura do composto IIf, buscando melhorias em sua atividade biológica e buscar relacionar com a sua estrutura química, tanto frente a cruzaina como frente ao crescimento celular do parasita do *T. cruzi*.

6 CONCLUSÕES

Tendo em vista o objetivo geral, apesar de alguns dos compostos apresentarem atividade inibitória frente a enzima cruzaina e atividade inibitória do crescimento celular das formas epimastigotas do parasita *T. cruzi*, tais compostos apresentam menor eficácia ($\text{IC}_{50} = 100 \mu\text{M}$) frente ao fármaco comercializado, o benznidazol, o qual apresenta IC_{50} entre 7,6 μM e 32 μM , dependendo da cepa avaliada (MORENO, et al., 2010).

Dos objetivos específicos, foram sintetizados três intermediários da classe da sulfonil-hidrazida, caracterizados por faixa de fusão, RMN ^1H e RMN ^{13}C , comprovando sua obtenção, entretanto, os resultados por nós obtidos, desencontram com dados encontrados na literatura, como rendimento inferior, maior tempo de reação e pequenas variações na faixa de fusão (até 4 °C de diferença).

Os compostos finais da classe da sulfonil-hidrazona foram sintetizados com sucesso, sendo que obtivemos 27 compostos, divididos em três séries de 9 compostos cada, sendo elas as subséries de a – i. Tivemos bons rendimentos na maioria das sínteses (60% de rendimento para 17 dos 27 compostos), sendo o pior resultado obtido para o composto IIh (rendimento = 26%) e o melhor resultado obtido para o composto IId (rendimento = 97%).

Para os compostos originados de cetonas aromáticas, sugere-se que a síntese seja feita em presença de ácido como catalisador para otimizá-la..

Todos compostos sulfonil-hidrazona foram avaliados quanto à sua faixa de fusão, as quais apresentaram resultados satisfatórios à primeira instância. Entretanto com os resultados obtidas da pureza dos compostos sugere que os valores dos compostos IIIf, IIIe e IIIg possam estar alterados por apresentarem impurezas, sendo necessária nova purificação e posterior análise de faixa de fusão.

A pureza cromatográfica obtida por CLAE nos indicou que apenas 3 dos 27 compostos (IIIf, IIIe e IIIg) tiveram pureza cromatográfica insatisfatória, sendo necessário a purificação dos mesmos para que possam ser feitos futuros ensaios biológicos.

Durante a análise por CLAE, os compostos nitrados (subsérie b e d) apresentaram indícios de possível instabilidade, que acarretaria na perda de sua atividade ao longo do tempo. Fato esse pode ser observado também, no ensaio de inibição do crescimento celular das formas epimastigotas, sendo necessários estudos aprofundados sobre a estabilidade e o modo de ação desses compostos.

A caracterização dos compostos foi auxiliada por técnicas de absorção no ultravioleta, pôr essa mostrar-se uma técnica rápida e com resultados relevantes para compostos como os sintetizados nesse trabalho, os quais apresentam cromóforos e insaturações em sua estrutura.

A caracterização por RMN ^1H e RMN ^{13}C confirmou a obtenção dos 27 compostos finais por elucidação estrutural dos mesmos.

Os ensaios biológicos nos apresentaram que os compostos da subsérie b e d são os de maior atividade tanto frente à cruzaina, quanto à inibição do crescimento celular de células epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Uma semelhança observada em tais compostos é a

presença do grupo nitro, aromático, o qual é sabido apresentar toxicidade, assim sendo devemos avaliar o risco/benefício desses compostos.

Os demais compostos que não possuíam grupo nitro, não apresentaram atividade frente à cruzaina, exceto os compostos da subsérie f, os quais apresentaram moderada a baixa atividade ($\pm 20\%$) a uma concentração de 100 μM , podendo assim, avaliarmos se é válida a modificação estrutural do mesmo buscando aprimorar a atividade.

Quanto aos ensaios frente às formas celulares do parasita, os compostos com grupo nitro apresentaram atividade expressiva, aproximadamente 100% de inibição a 100 μM . Dos demais compostos, os compostos Ie, IIf, IIIe, IIIf e IIi, demonstraram baixa atividade de inibição de crescimento celular, sendo que podemos dar atenção à esses compostos quanto a modificações estruturais para melhoras a atividade dos mesmos.

De todos os compostos, o IIIf foi o único o qual apresentou inibição da cruzaina e do crescimento celular sem possuir o grupo nitro aromático. Portanto, um estudo mais detalhado pode nos gerar resultados que permitam compreender melhor como o composto interage com o alvo e como se dá a inibição do crescimento do parasita, para que possamos avançar com a busca para tratamento da doença.

7 REFERÊNCIAS

AGUIRRE, G. et al. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. **Bioorganic Medicinal Chemistry**. Uruguai, v. 12, p. 4885-4893, 2004.

AGUIRRE, G. et al. New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. 3D-QSAR (CoMFA) studies. **European Journal Of Medicinal Chemistry**. Montevideo, Uruguai. v. 41, n. 4, p. 457-466, 23 fev. 2006.

AJAY, W.; WALTERS, P.; MURCKO, M. A. Can we learn to distinguish between "drug-like" and "nondrug-like" molecules? **Journal of Medicinal Chemistry**. Massachussets, USA. v. 41, n. 18, p. 3314-3324, 23 jul. 1998.

ALVES, L. C. et al. Analysis of the S-2 subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of *Leishmania mexicana*; and cruzain of *Trypanosoma cruzi*; using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. **Molecular and Biochemical Parasitology**. São Paulo, Brasil. v. 117, n. 2, p. 137-143, out. 2001a.

ALVES, L.C. et al. S-1 subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase; CPB, of *Leishmania mexicana* compared with cruzain; human cathepsin L and papain using substrates

containing non-natural basic amino acids. **European Journal of Biochemistry**. São Paulo, Brasil. v. 268, n. 5, p. 1206-1212, mar. 2001b

ANDRADE, Z. A.; BRENNER, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, Brasil. v. 11, p. 222-228, 1969.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**. (2010). 5ª ed. Brasília-DF, Brasil. v.1, p. 82-83, Determinação do ponto ou intervalo de fusão; p. 99-102, Espectrofotometria no ultravioleta, visível e infravermelho.

ARMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. L. L. **Purification of laboratory chemicals**. (2009). 6ª ed. Elsevier, Amsterdam, 743p.

ASIRI, A. M.; ZAYED, M. E. M.; NG, S. W. (*E*)-*N*'-(2-thienylmethylidene)-*p*-toluene-sulfonohydrazide. **Acta Crystallographica Section E – Structure Reports**. E66, o2360, 2010.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da terapêutica**, (2009). Artmed: Porto Alegre. p. 271-341.

BIRD, C. W.; CHEESEMAN, G. W. H. Structure of five-membered rings with one heteroatom. University of London. In: KATRITZKY, A. R.; REES, C. W. **Comprehensive Heterocyclic Chemistry**. The structure, reactions, synthesis, and uses of heterocyclic compounds. (1984). Elsevier Science. v. 4, part. 3, p. 1-38.

BLAU, L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 67, p. 142-151, maio, 2013.

BORCHHARDT, D. M. et al. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Brazilian Society**. São Carlos-SP, Brasil. v. 21, n. 1, p. 142-150, 2009.

BORTOLUZZI, A. J. et al. 4-[1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo-[*de*]isoquinolin-2-yl)methyl]-*N*'-[(*E*)-4-nitrobenzylidene]benzenesulfono-hydrazide dimethyl sulfoxide monosolvate. **Acta Crystallographica Section E – Structure Reports**. E67, o627-o628, 2011.

BRAK, K. et al. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzaina. **Journal of American Chemical Society**. Califórnia, USA. v. 130, n. 20, p. 6404-6410, 21 maio 2008.

BRINEN, L. S. et al. A target within the target: probing cruzain's P1' site to defining structural determinants for the Chagas' disease protease. **Research Article: Structure**. San Francisco, USA. v. 8, n. 8, p. 831-840, 15 ago. 2008.

BROWN, N. **Bioisosteres in medicinal chemistry**. (2012) Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha, v. 54, 237p. Methods and principles in medicinal chemistry.

BRYANT, C. et al. Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. San Francisco, USA. v. 19, n. 21, p. 6218-6221, 1 nov. 2009.

BUDAVARI, S. et al. **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals drugs, and biological.**, (1996), 12^o Ed., Merck & CO., Inc., Whitehouse, NJ, p. 729.

CARDOSO, A. V. N. et al. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo. v. 48, n. 5, p. 287-289, set./out. 2006.

CARVALHO, S. A. et al. Design and synthesis of new (*E*)-cinnamic *N*-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 54, p. 512 – 521, jun. 2012.

CASTRO, H. C. et al. Looking at the proteases from a simple perspective. **Journal of molecular recognition**. Rio de Janeiro – Brasil. v.24, n. 2, p. 165-181, mar./abr. 2011.

CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: A valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**. v. 7, n. 12, p. 1143-1156, 2001.

CAZZULO, J. J. et al. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta**. Buenos Aires, Argentina. v. 1037, n. 2, p. 186-191, 9 fev. 1990a.

CAZZULO, J. J. et al. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*: Absence of phosphorylated mannose residues. **Molecular and Biochemical Parasitology**. Buenos Aires, Argentina. v.38, n. 1, p. 41-48, 1 jan. 1990b.

CHAGAS, J.R. et al. A comparison of the enzymatic properties of the major cysteine proteinase from *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. Tours, França., v.88, n. 1-2, p. 85-94, set. 1997.

CHEN, Y. T. et al. Synthesis of macrocyclic trypanosomal cysteine protease inhibitors, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Florida, USA. v. 18, n. 22, p. 5860-5863, 15 nov. 2008.

CHEN, Z. et al. Reductive coupling reactions: a new strategy for C(sp³)-P bond formation. **Tetrahedron**. Xi'an, China. v. 69, n. 3, p. 1065-1068, 21 jan. 2013.

CHUNG, M. C. et al. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Araraquara-SP, Brasil. v. 11, n. 22, p. 4779-4783, 3 nov. 2003.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. (2001). 1^a ed. Oxford University Press, USA. Cap. 14, p. 339-360.

COUNCIL OF EUROPE. **European Pharmacopoeia**. (2005). 5th ed. Main Volume 5.0. Editora: Council of Europe (2004). Cap. 4 – Reagents, n. 4.1.3. Buffer Solutions, p. 430-435.

COURA, J. R.; VINÃS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature: Outlook Chagas disease**. p. 56-57, 24 jun. 2010.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Doença de Chagas. O que é conhecido e o que deve ser melhorado: uma visão sistêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical**. Rio de Janeiro. v. 45, n° 3, p. 286-296, maio-jun. 2012.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 102 (supl. I), p. 113-122, 30 nov. 2007.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 97, n. 1, p. 3-24, jan. 2002.

CREMLYN, R. et al. Salicylic acid sulfonyl derivatives and related compounds. **Phosphorus and Sulfur and the Related Elements**. Herfordshire, Inglaterra. v. 10, p. 323-332, 1981.

CRENSHAW, C. A. et al. Nitrofurazone therapy in “middle burns”: a review. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**. v. 19, n. 4, p. 487-492, abr. 1976.

CROPTON, D. W. T. Sustaining the drive to overcome the global impact of Neglected Diseases: Second WHO report on neglected diseases. **World Health Organization (WHO)**. France, p. 57-59, 2013.

DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J.; KLEYWEGT, G. J. Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. **Angewandte Chemie International Edition in English-Communications**. v. 23, p. 2718-2736, 2003.

DEL NERY, E. et al. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**. Rio de Janeiro, Brasil. v. 272, p. 25713-25718, 10 out. 1997.

DIAS, L.C. et al. Quimioterapia da Doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**. São Paulo, Br. v. 32, p. 2444-2457, n. 9, nov. 2009.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública. v. 23, supl. 1, p. 13-22, jan. 2007.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASE INITIATIVE (DNDi). **Doenças e Projetos/ Doença de Chagas**. 2010. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>>, acesso em: 23 jul. 2014.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, Irlanda. v. 73, ed. 1, p. 1-27, 1990.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of American trypanosomes. **Reviews in Biochemical Toxicology**. v. 7, p. 159-204, 1985.

DODD, M. C. et al. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Nova Iorque, USA. v. 82, n. 1, p. 11-18, set. 1944.

DU, X.; et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the Trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, n. 13, p. 2695-2707, maio, 2002.

DU, X. et al. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. **Chemistry and Biology**. Califórnia, USA. v. 7, p. 733-742, 1 ago. 2000.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An Insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**. Buenos Aires – Argentina. v. 2, n. 1, p. 19-51, jan. 2007.

EL-SAYED, R. A. Review on the chemistry of sulfonohydrazides and sulfonazides. **Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements**. Cairo, Egito. v. 179, n. 2, p. 237-266, 2004.

FERREIRA, R. S. et al. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of potent noncovalent and nonpeptidic cruzain inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. Belo Horizonte, Brasil. v. 57, p. 2380-2392, 17 fev. 2014.

FRANCO-PAREDES, C.; SANTOS-PRECIADO, J. Freedom, Justice, and Neglected Tropical Diseases. **A peer-reviewed open Access Journal (PLOS)**. México. v. 5, c. 8, p. e1235 – e1236, ago. 2011.

FRANCO PAREDES, et al. Chagas disease: an impediment in achieving the Millenium Development Goals in Latin America. **BioMedCentral International Health Human Rights (BMC)**. México. V. 7, c. 7, p. 1-6, ago. 2007.

FRIEDMAN, L.; LITTLE, R. L.; REICHLE, W. R. *p*-toluenesulfonylhydrazide [*p*-toluenesulfonic acid, hydrazide]. **Organic Synthesis Collection**. v. 5, p.1055 (1973); v. 40, p.93 (1960).

GASCÓN, J. et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Revista Española de Cardiologia**. Barcelona, Espanha. v. 60, n. 3, p. 385-293, 2007.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**. Espanha. v. 115, n°. 1-2, p. 22-27, jul-ago. 2010.

GEA, S. et al. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* cystein protease in the jost-parasite interplay. **Imunologia**. Córdoba, Argentina. v. 25, n. 4, p. 225-238, out./dez. 2006.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações** (1987), Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

GRINGAUZ, A. **Introduction to medicinal chemistry – How drugs act and why.** (1997), New York: Wiley-VCH, p. 265-230.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Modern drug Discovery Technologies: Opportunities and challenges in lead discovery. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening.** São Carlos – SP, Brasil. v. 14, n. 10, p. 830-839, 2011.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual Screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry.** São Carlos – SP, Brasil. v. 15, n. 1, p. 37-46, 2008.

HAKIMELAHI, G. H.; KHODARAHMI, G. A. The identification of toxicophores for the prediction of mutagenicity, hepatotoxicity and cardiotoxicity. **Journal of the Iranian Chemical Society.** v. 2, n. 4, p. 244-267, dez. 2005.

HENDERSON, G. B. et al. “Subversive” substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States (PNAS-USA).** Nova Iorque, USA. v. 85, n. 15, p. 5374-5378, ago. 1988.

HERNANDES, M. Z. et al. Studies toward the structural optimization of novel thiazolyldrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** Recife, Brasil. v. 18, n. 22, p. 7826-7835, 15 nov. 2010.

HOPFINGER, A.J. Computer-assisted drug design. **Journal of Medicinal Chemistry.** v. 28, p. 1133-1139, 1985.

HOUSE, H. O.; GAA, P. C.; VANDERVEER, D. Perhydroazulenes. 3. Conformation of the 4-oxoperhydroazulene. **Journal of Organic Chemistry.** v. 48, n. 10, p. 1661-1670, maio 1983.

HUANG, L.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Crystal structure of reversible ketone-based inhibitors of the cysteine protease cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** San Francisco, USA. v. 11, p. 21-29, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE INOVAÇÃO EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS (INCT-IDN). **Fundação Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.cdts.fiocruz.br/inct-idn/doencasNegligenciadas.php>>, Acesso em: 10 dez 2014.

JABARI, S. et al. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. **Histochemistry and Cell Biology.** v. 142, p. 235-244, jul. 2014.

JAISHANKAR, P. et al. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. San Francisco, USA. v. 18, n. 2, p. 624-628, 15 jan. 2008.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. (2006), Editora Unicamp. Campinas-SP, Brasil. cap. 9, p. 273-397.

JORK, H. et al. **Thin-Layer Chromatography**. Reagents and Detections Methods. (1994). VCH, Weinheim, Alemanha. v. 1, 497p. Physical and chemical detection methods, v. 1a, v. 1b.

JOSEPH-NATHAN, P., DIAZ T., E. **Introducion a la ressonância magnética nuclear**. (1970), Ed. Limusa – Wiley, S. A. México.

KABALKA, G. W. et al. Alkylation of aldehyde (arenesulfonyl)hydrazones with trialkylboranes. **Journal of Medicinal Chemistry**. Tenesse, USA. v. 62, p. 3688-3695, 1997.

KHAN, F. et al. Modern methods & web resources in drug design & discovery. **Letters in Drug Design & Discovery**. Lucknow, Índia. v. 8, n. 5, p. 469-490, 2011.

KOPPITZ, M., EIS, K. Automated medicinal chemistry. *Drug. Discov. Today*, v. 11, p. 561-568, 2006.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. (2007). Ed. 2007/2008, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 18.6-18.13.

KUBINYI, H. Structure-based design of enzyme inhibitors and receptor ligands. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**. Ludwigshafen, Alemanha. v. 1, n. 1, p. 4-15, jul. 1998.

LA-SCALEA, M. A.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. Geração eletroquímica do nitro radical aniônico a partir do NF utilizando-se eletrodo de carbono vítreo. **10º Encontro Nacional de Química Analítica**, Química Analítica e qualidade das águas, Santa Maria, RS, 1999. *Livro de Resumos*, Res. EL-4.

LA-SCALEA, M. A. Comportamento voltamétrico e mecanismo de ação biológica de nitroimidazóis. **Revista de farmácia e bioquímica da Universidade de São Paulo**. São Paulo. DBD – Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto de Químicas. v.34, p. 59-75, jul-dez. 1998.

LECAILLE, F. et al. Subsite specificity of trypanosoma cathepsin L-like cysteine proteases. Probing the S2 pocket with phenylalanine-derived amino acids. **European Journal of Biochemistry**. v. 268, n. 9, p. 2733-2741, maio 2001.

LEMKE, T. L. et al. Foye's principles of Medicinal Chemistry. **Principles of Medicinal Chemistry** (2012), 7ª ed., p. 736-739.

LEVY, G. C., NELSON, G. L., **Carbon-13 nuclear magnetic resonance for organic chemists**. General electric corporate research and development. (1972). Wiley-interscience. c. 4, p. 79-108.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**. Rio de Janeiro, Brasil. v. 1, n. 1, p. 23-49, 2005.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. Groton, USA. v. 44, n. 1, p. 235-249, jul./ago. 2000.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. 3rd. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 10, n. 3, p. 853-862, out. 2004.

MAGDALENO, A. et al. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. **Public Library of Science- PLOS ONE**. São Paulo, Brasil. v. 4, n. 2, p. e4534, 2009

MARVINSKETCH, Advanced chemical editor for drawing chemical structures, queries and reactions. **Chemaxon**. Disponível em: <
<https://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/>>, Acesso em: 2013-2015.

MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. Review article. **Epidemiology & Infection**. Reino Unido. Cambridge University Press 2007. v. 136, p. 1153-1164, 2008.

MATTHEWS, K. R. Controlling and coordinating development in vector-transmitted parasites. **Science**. v. 331, p. 1149-1153, 4 mar. 2011.

McGRATH, M. E. et al. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. **Journal of Molecular Biology**. v.247, p.251-9, 1995.

McKERROW, J. H.; McGRATH, M. E.; ENGEL, J. C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. **Parasitology Today**. v. 11, n. 8, p.272-82, ago. 1995.

McMURRY, J. **Química Orgânica**. (2011) 7ª ed. Cengage Learning. São Paulo, Brasil. v. 1 e 2. cap. 11, p. 336-349; cap. 19, p. 656-695; cap. 24, p. 855-898.

MEANWELL, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**. Connecticut, USA. v. 54, p. 2529-2591, 17 mar. 2011.

MEIRELLES, M. N. L. et al. Inibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. Rio de Janeiro, Brasil. v. 52, n. 2, p. 175-84, jun. 1992.

MONCAYO, A.; YANINE, M. I. O. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. Bogotá, Colômbia. v. 100, n. 6, p. 1-15, 2006.

MORAN, M. et al. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **Public Library of Science Medicine (PLOS Medicine)**. v. 6, c. 6, p. 0137-0146, fev. 2009.

MORENO, S. N. et al. Generation of free radicals from metronidazole and other nitroimidazoles by *Trichomonas foetus*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 258, n. 7, p. 4051-4054, abr. 1983.

MORENO, M. et al. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. vol. 105, n. 7, p. 918-924, nov. de 2010.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Organic Chemistry: Second Edition** (1966). Allyn and Bacon, Inc.. New York University, Boston, USA. p. 615-659; p. 852-875.

MOTT, B. T. et al. Identification and optimization of inhibitors of trypanosomal cysteine protease: Cruzain, Rhodesain, and TbCatB. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 53, n. 1, p. 52-60, 2010.

NEWMAN, D.; CRAGG, G.; KINGSTON, D. Natural products as pharmaceutical and sources for lead structures. In: WERMUTH, C.G., Ed. **The practice of medicinal chemistry**. (2003) San Diego: Academic Press. p. 91-111.

O'BRIEN, T. C. et al. A parasite cysteine protease is key to host protein degradation and iron acquisition. **The Journal of Biological Chemistry**. California – USA. v. 283, n. 43, p. 28934-28943, out. 2008.

OTTO, H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. **Chemical Reviews, American Chemical Society**. Freiburg, Alemanha. v. 97, n. 1, p. 798-802, 1997.

PATANI, G. A.; LaVOIE, E. J. Bioisosterism: A rational approach in drug design. **Chemical Reviews**. v. 96, n. 8, p. 3147-3176, 1996.

PATRICK, G. L. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) – Craig plot. In: PATRICK, G. L. **An introduction to Medicinal Chemistry**. 4^a ed. Oxford: Oxford University Press, 2009. p. 387-388.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**. Cell Press – Review. v. 30, n. 6, p. 289-298, jun. 2014.

PHARR, C. R. et al. Photochemistry of furyl- and thienyldiazomethanes: Spectroscopic characterization of triplet 3-thienylcarbene. **Journal of American Chemical Society**. Wiscosin, USA. v. 134, n. 14, p. 6443-6454, 30 mar. 2012.

PRETSCH, E. et al. **Tables of Spectral Determination of Organic Compounds**. (1985), 2^a ed. Springer-verlag, Berlin Heidelberg, Alemanha.

RASSI Jr., A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, c. 2, p. 275-291, jun. 2012.

RAUTIO, J. et al. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery**. Kuopio, Finlândia. v. 7, n. 3, p. 255-270, mar. 2008.

REDDICK, J. J.; CHENG, J.; ROUSH, W. R. Relative rates of Michael reactions of 2'-(phenethyl)thiol with vinyl sulfones, vinyl sulfonate esters, and vinyl sulfonamides relevant to vinyl sulfonyl cysteine protease inhibitors. **Organic Letters** v. 5, n. 11, 1967-1970, 29 maio 2003.

RIVERA, G. et al. New therapeutic targets for drug design against *Trypanosoma cruzi*, advances and perspectives. **Current Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 3286-3293, 2009.

ROCHE, O.; GUBA, W. Computational chemistry as an integral component of lead generation. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 5, p. 677-683, 2005..

ROQUE, A. L. et al. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Rio de Janeiro. v. 79, c. 5, p. 742-749, nov. 2008.

ROUSH, W. R. et al. Potent second generation vinyl sulfonamide Inhibitors of trypanosomal cysteine protease cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Michigan, USA. v. 11, n. 20, p. 2759-2762, 22 out. 2001.

SAJID, M.; McKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 120, ed. 1, p. 1-21, mar. 2002.

SAJID, M. et al. Cruzain: the path from target validation to the clinic. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Leiden – Holanda. v. 712, p. 100-115, 2011.

SANTOS, M. M.; MOREIRA, R. Michael acceptors as cysteine protease inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. Lisboa, Portugal. v. 7, n. 10, p. 1040-1050, out. 2007.

SERVEAU, C. et al. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrates and inhibitors. **Biochemical Journal**. Tours, France. v. 313, pt. 3, p. 951-956, 1 fev. 1996.

SHOWELL, G. A.; MILLS, J. S. Chemistry challenges in lead optimization: silicon isosteres in drug discovery. **Drug Discovery Today**. Milton Road, Reino Unido. v. 8, n. 12, p. 551-556, 15 jun. 2003.

SHYAM, K.; COSBY, L. A.; SARTORELLI, A. C. Relationship between structure and antineoplastic activity of (arylsulfonyl)hydrazones of 4-pyridinecarboxaldehyde. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 28, p. 149-152, 1985.

SIDDIQUI, M. R.; ALOTHMAN, Z. A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. **Arabian Journal of Chemistry**. Article In Press: 2013.

SILES, R. et al. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Texas, USA. v. 16, n. 16, p. 4405-4009, 15 ago. 2006.

SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of drug design and drug action** (2004), 2ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p. 29-34.

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C., **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. (1979), John Wiley & Sons, Inc. 299p.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. **Princípios da análise instrumental**. (2002) ed. 10.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. (1979), 2ª ed. John Wiley & Sons, Inc. Nova Iorque, USA. 863p.

STEPAN, A. F. et al. Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: A perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. **Chemical Research in Toxicology**. Washington, USA. v. 24, p. 1345-1410, 24 jun. 2011.

STOKA, V. et al. Substrate inhibition of cruzipain is not affected by the C-terminal domain. **Federation of European Biochemical Societies Journal (FEBS)**. v. 429, n. 2, p. 129-133, 12 jun. 1998.

SUSHKO, I. et al. ToxAlerts: A web server of structural alerts for toxic chemicals and compounds with potential adverse reactions. **Journal of Chemical Information and Modeling**. v. 52, p. 2310-2316, 10 ago. 2012.

TEAGUE, S. J. et al. The design of leadlike combinatorial libraries. **Angewandte Chemie International Edition in English-Communications**. v. 38, n. 24, p. 3743-3748, 16 dez. 1999.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease – A review. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 101, c. 5, p. 463-491, ago. 2006.

TROSSINI, G. H. G. et al. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 25, ed. 1, p. 62-67, 2010.

TROSSINI, G. H. G. et al. Quantitative structure-activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. Molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. **Journal of Molecular Graphics and Modeling**. São Paulo, Brasil, v. 28, n. 1, p. 3-11, ago. 2009.

TROSSINI, G. H. G. **Antichagásicos potenciais: Busca racional de compostos com ação seletiva pela cruzaina**. São Paulo: 2008, 321p. [Tese de doutorado: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

TROSSINI, G. H. G. **Antichagásicos potenciais: Síntese de bases de Mannich do hidroximetilnitrofural**. São Paulo: 2004, 130 p. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**. v. 8, c. 4, p. 287-295, 2002.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**. v. 19, n. 11, p. 495-501, nov. 2003.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**. v. 115, p. 55-68, jul.-ago. 2010. Chagas disease: 100 years of the discovery and beyond.

VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**. São Paulo, Brasil. v. 29, n. 2, p. 326-337, mar./abr. 2006.

VIOTTI, R. et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58, n. 2, p. 635-639, fev. 2014.

VITAL, D.; ARRIBAS, M. TROSSINI, G. Molecular modeling and docking application to evaluate cruzain inhibitory activity by chalcones and hydrazides. **Letters in Drug Design & Discovery**. São Paulo, Brasil. v.11, n. 3, p. 249-255, 2014.

VITAL, D. G. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos bioisotéricos da nitrofurazona: variações de anéis (pirrol e 4-dimetilaminobenzil) e cadeias laterais (semicarbazona, tiosemicarbazona e aminoguanidina)**. São Paulo: 2014, 100p. [Dissertação (mestrado): Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia].

VOLHARDT, K. PETER C., SCHORE, NEIL E., **Química orgânica: estrutura e função**. (2004), 4ª ed. Ed. Bookman, p. 950-960.

WARREN, J. Drug discovery: lessons from evolution. **British Journal of Clinical Pharmacology**. Londres, Reino Unido. v. 71, n. 4, p. 497-503, 2011.

WAGENER, M.; LOMMERSE, J. P. M. The quest for bioisosteric replacements, **Journal of Chemical Information and Modeling**. v. 46, p. 677-685, 2006.

WERMUTH, C. G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypothesis. c. 6, 125-143p. In: WERMUTH, C. G., Ed **The practice of medicinal chemistry** (2008), 2 ed. London: Academic Press, p. 67-91.

WILLIAMS, D. P.; NAISBITT, D. J. Toxicophores: Groups and metabolic routes associated with increased safety risk. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**. Liverpool, Reino Unido. v. 5, n. 1, p. 104-115, jan. 2002.

WILLIAMS, DUBLEY H., FLEMING, IAN, **Spectroscopic methods in organic chemistry**. (1966). McGraw-Hill, London, p. 77-129..

WILLYARD, C. Neglected diseases see few new drugs despite upped investment. **Nature Medicine**. v.19, p. 2, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis), **WHO media centre**. Fact Sheet n° 340. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 25 de mar. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on vector-borne diseases. Gêneva, Suíça. Chagas disease (American trypanosomiasis). Seção 2, p. 22-29, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/TROPICAL DISEASE RESEARCH (WHO/TDR) Research priorities for Chagas disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **WHO Technical Report Series**. n. 975, c. 3, p. 11, 2012. Report of the TDR Disease Reference group on Chagas disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis, 2009-2010.

YANO, C. Açaí pode transmitir doença de Chagas. **EXAME.com**. Brasil, maio 2010. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/tecnologia/noticias/acai-pode-transmitir-doenca-chagas-558972>>. Acesso em: 21 de dez. de 2013.

ZANATTA, N. et al. Convergent synthesis and cruzain inhibitory activity of novel 2-(N'-benzylidenehydrazino)-4-trifluoromethyl-pyrimidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 10236-10243, 2008.

ZHANG, D. et al. Synthesis of sulfonylhydrazone- and acylhydrazone-substituted 8-ethoxy-3-nitro-2*H*-chromenes as potent antiproliferative and apoptosis inducing agents. **Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences**. Jinan, China. v. 347, n. 8, p. 576-588, ago. 2014.

ANEXO A –

***Dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C –
intermediários sulfonyl-hidrazidas***

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
4,20	(sl, 2H, H-4)
7,68	(d, J= 8,40 Hz, 2H, H-1)
7,82	(d, J= 8,41 Hz, 2H, H-2)
8,47	(s, 1H, H-3)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
129,1	C-3
129,6	C-2
137,2	C-1
137,5	C-4

(II) 4-clorobenzeno-1-sulfonyl-hidrazida

(III) *N*-[4-(sulfonil-hidrazina)fenil]-acetamida

ANEXO B –
Pureza cromatográfica obtida por CLAE –
sulfonil-hidrazonas - série I

(Ib) *N'*-[(1*E*)-(5-nitrofurano-2-il)metilideno]-4-metilbenzeno-1-sulfonil-hidrazida

(Ic) *N'*-[(1*E*)-tiofeno-2-ilmetilideno]-4-metilbenzeno-1-sulfonil-hidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	4,138	125	0,260	-	1,446	0,023	0,023
2	5,323	440206	0,302	2,574	1,344	99,970	99,970
3	8,586	29	0,336	5,954	-	0,007	0,007
total	25	440360				100,0	

(Id) *N'*-[(1*E*)-(5-nitrotiofeno-2-il)metilideno]-4-metilbenzeno-1-sulfonil-hidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,324	463	0,111	-	1,500	0,084	0,084
2	3,279	2013	0,140	4,229	-	0,582	0,582
3	4,004	388582	0,150	2,790	1,432	99,334	99,334
total	25	291058				100,0	

(Ie) 4-metil-*N'*-[(1*E*)-1*H*-pirrol-2-ilmetilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	1,718	421	0,139	-	0,614	0,111	0,111
2	1,961	583	-	0,567	-	0,215	0,215
3	2,178	1268	0,139	0,509	-	0,449	0,449
4	2,657	464	0,155	1,917	-	0,118	0,118
5	2,833	183	-	0,311	-	0,040	0,040
6	3,215	6103	0,122	0,708	1,517	1,423	1,423
7	4,456	1183	0,166	4,827	-	0,363	0,363
8	4,823	598	0,175	1,202	-	0,198	0,198
9	5,435	269658	0,186	1,906	1,398	96,311	96,311
10	13,759	3054	0,109	31,625	-	0,648	0,648
11	14,070	361	-	1,108	-	0,091	0,091
12	15,438	140	0,143	4,450	1,371	0,033	0,033
Total	25	452941				100,0	

(If) *N'*-[(1*E*)-[4-(dimetilamino)fenil]metilideno]-4-metil-benzeno-1-sulfonohidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,413	9823	0,094	-	1,100	1,119	1,119
2	3,058	189	0,172	2,858	-	0,041	0,041
3	3,475	232	0,203	1,391	-	0,047	0,047
4	3,742	110	-	0,476	-	0,018	0,018
5	4,260	535396	0,150	0,977	1,433	97,204	97,204
6	4,823	8036	0,146	2,157	1,340	1,287	1,287
7	5,643	109	0,174	2,962	1,331	0,020	0,020
8	6,278	586	0,208	1,922	-	0,139	0,139
9	6,764	341	0,262	1,187	-	0,101	0,101
10	8,713	97	0,251	4,376	1,273	0,025	0,025
Total	25	554920				100,0	

(Ig) *N'*-[(1*E*)-1-(furano-2-il)etilideno]-4-metil-benzeno-1-sulfonohidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	1,736	332	-	-	-	0,045	0,045
2	1,86	167	-	0,113	-	0,018	0,018
3	2,944	1256	0,118	0,950	1,706	0,163	0,163
4	3,469	175	0,254	1,695	1,713	0,042	0,042
5	4,874	143	0,159	4,109	1,077	0,023	0,023
6	6,261	430445	0,211	4,287	1,365	99,710	99,710
total	25	432518				100,0	

(Ih) 4-metil-*N'*-[(1*E*)-1-(tiofen-2-yl)etilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	1,729	300	0,115	-	-	0,049	0,049
2	1,851	315	-	0,370	-	0,048	0,048
3	1,957	327	-	0,223	-	0,070	0,070
4	2,175	679	0,146	0,589	-	0,154	0,154
5	2,577	323	0,245	1,378	-	0,118	0,118
6	3,152	1619	0,128	2,004	1,289	0,376	0,376
7	4,343	4348	0,154	4,,705	-	1,079	1,079
8	4,834	339313	0,169	1,717	1,449	97,032	97,032
9	9,466	66	0,272	12,392	1,307	0,027	0,027
10	13,584	4107	0,114	12,525	3,884	0,971	0,971
11	16,695	119	0,347	7,849	2,148	0,077	0,077
Total	25	351516				100,0	

(Ii) *N'*-[(1*E*)-1-(2*H*-1,3-benzodioxol-5-il)etilideno]-4-metilbenzeno-1-sulfonohidrazida

***Pureza cromatográfica obtida por CLAE –
sulfonil-hidrazonas série II***

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	3,347	395	0,290	-	-	0,153	0,153
2	3,825	97	-	0,820	-	0,023	0,023
3	4,671	401842	0,167	1,619	1,428	98,831	98,831
4	6,279	315	0,206	4,896	1,340	0,093	0,093
5	11,577	336	0,153	16,825	1,060	0,071	0,071
6	12,060	4286	0,135	1,892	1,365	0,828	0,828
total	25	407270				100,0	

(IIa) *N*'-[(1*E*)-furano-2-ilmetilideno]-4-clorobenzeno-1-sulfonil-hidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,666	225	0,137	-	1,101	0,040	0,040
2	3,039	135	0,117	1,757	0,786	0,022	0,022
3	4,103	272050	0,258	3,409	1,351	99,338	99,338
4	9,328	1264	0,344	10,326	1,162	0,600	0,600
total	25	273673				100,0	

(IIb) *N*'-[(1*E*)-(5-nitrofurano-2-il)metilideno]-4-clorobenzeno-1-sulfonil-hidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,707	602	0,105	-	1,321	0,073	0,073
2	3,471	125	0,190	2,924	1,211	0,025	0,025
3	4,539	1291	0,169	3,404	1,780	0,298	0,298
4	7,337	337307	0,240	7,818	1,401	98,582	98,582
5	10,262	851	0,294	6,306	1,473	0,296	0,296
6	11,443	2065	0,188	2,809	1,458	0,456	0,456
7	12,052	1707	0,130	2,160	1,552	0,270	0,270
total	25	34949				100,0	

(IIc) *N'*-[(1*E*)-tiofeno-2-ilmetilideno]-4-clorobenzeno-1-sulfonil-hidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,437	369	0,177	-	1,393	0,053	0,053
2	2,889	116	0,147	1,688	1,214	0,013	0,013
3	3,184	480	0,162	1,163	1,257	0,062	0,062
4	3,558	850	0,208	1,208	1,294	0,140	0,140
5	4,315	198	-	1,818	-	0,027	0,027
6	4,561	365	0,236	0,548	-	0,066	0,066
7	5,198	360	0,231	1,600	1,368	0,070	0,070
8	6,582	422122	0,269	3,248	1,340	99,100	99,100
9	8,255	2073	0,273	3,613	1,249	0,470	0,470
total	25	426933				100,0	

(IIId) *N'*-[(1*E*)-(5-nitrotiofeno-2-il)metilideno]-4-clorobenzeno-1-sulfonil-hidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,350	1423	0,097	-	-	0,284	0,284
2	2,683	436	0,164	1,466	-	0,150	0,150
3	3,030	151	0,233	1,127	1,583	0,064	0,064
4	3,459	192	0,199	1,265	-	0,067	0,067
5	3,733	478	0,137	0,937	-	0,133	0,133
6	4,061	1545	0,153	1,268	1,407	0,498	0,498
7	5,229	254195	0,182	3,943	1,414	98,804	98,804
total	25	258419				100,0	

(Ie) 4-cloro-*N'*-[(1*E*)-1*H*-pirrol-2-ilmetilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,405	1541	0,101	-	-	0,388	0,388
2	2,659	1695	0,106	1,321	-	0,444	0,444
3	2,988	712	-	1,444	-	0,195	0,195
4	3,211	8504	0,122	0,926	1,480	2,492	2,492
5	4,814	660	0,141	6,824	1,182	0,203	0,203
6	5,628	825	0,178	2,911	1,218	0,323	0,323
7	6,678	592	0,204	3,162	1,302	0,271	0,271
8	7,637	150131	0,247	2,543	1,371	87,694	87,694
9	13,740	29639	0,106	19,518	1,599	7,930	7,930
10	14,973	265	0,105	6,450	1,265	0,059	0,059
total	25	194564				100,0	

(IIf) 4-cloro-*N'*-[(1*E*)-[4-(dimetilamino)fenil]metilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	5,086	111	0,036	-	-	0,006	0,006
2	8,335	102	0,532	7,050	-	0,057	0,057
3	12,740	949925	0,090	8,765	1,357	99,796	99,796
4	16,039	1127	0,112	17,795	1,252	0,141	0,141
total	25	951265				100,0	

(IIg) 4-cloro-*N'*-[(1*E*)-1-(furan-2-yl)etilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,944	451	0,120	-	1,633	0,060	0,060
2	3,465	154	0,177	1,991	1,308	0,028	0,028
3	4,553	106	0,153	3,773	1,261	0,017	0,017
4	9,248	284815	0,291	12,116	1,345	95,923	95,923
5	12,635	176	0,125	9,719	1,945	0,022	0,022
6	13,646	273	0,086	5,770	1,172	0,024	0,024
7	14,166	29210	0,101	3,027	2,305	3,926	3,926
Total	25	315184				100,0	

(IIh) 4-cloro-*N'*-[(1*E*)-1-(tiofen-2-il)etilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,282	210	-	-	-	0,025	0,025
2	2,404	762	0,101	0,542	-	0,124	0,124
3	2,657	232	0,118	1,230	-	0,042	0,042
4	3,149	1723	0,123	2,223	-	0,373	0,373
5	4,152	1964	0,692	1,412	-	2,168	2,168
6	5,574	4369	0,189	1,860	1,421	1,372	1,372
7	6,593	259645	0,218	2,859	1,430	95,898	95,898
total	25	268905				100,0	

(III) *N'*-[(1*E*)-1-(2*H*-1,3-benzodioxol-5-yl)etilideno]-4-clorobenzeno-1-sulfonohidrazida

***Pureza cromatográfica por CLAE –
sulfonil-hidrazonas série III***

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,332	3104	0,155	-	-	0,165	0,165
2	2,563	33718	0,122	0,909	1,842	1,600	1,600
3	3,053	909	0,121	2,255	1,343	0,035	0,035
4	3,688	1794947	0,151	2,634	1,695	98,092	98,092
5	4,733	1809	0,175	3,361	1,548	0,108	0,108
total	25	1834485				100,0	

(IIIa) *N*-(4-{*N*'-[(1*E*)-furan-2-ilmetilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	3,173	561240	0,303	-	1,280	99,690	99,690
2	8,201	91	0,335	9,889	-	0,016	0,016
3	14,388	6562	0,081	17,988	1,025	0,294	0,294
total	25	567894				100,0	

(IIIb) *N*'-[(1*E*)-(5-nitrofuran-2-il)metilideno]-hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	1,801	1962	-	-	-	0,118	0,118
2	1,921	1750	-	0,391	-	0,114	0,114
3	2,305	25456	0,114	1,478	1,814	1,424	1,424
4	2,754	1659281	0,123	2,086	1,583	98,257	98,257
5	10,230	349	0,354	18,405	2,239	0,064	0,064
6	11,419	302	0,175	2,652	1,236	0,024	0,024
total	25	1689100				100,0	

(IIIc) *N*-(4-{*N'*-[(1*E*)-tiofen-2-ilmetilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,144	11502	0,185	-	-	1,295	1,295
2	2,849	710480	0,234	1,995	1,403	98,705	98,705
total	25	721983				100,0	

(IIIId) *N'*-[(1*E*)-(5-nitrotiofen-2-il)metilideno]-hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	1,996	452278	0,153	-	1,764	23,325	23,325
2	2,690	55351	0,161	2,485	-	2,911	2,911
3	3,165	1018631	0,213	1,441	1,828	73,593	73,593
4	5,533	152	0,310	5,266	1,323	0,014	0,014
5	16,224	3358	0,168	27,081	0,893	0,158	0,158
total	25	1529770				100,0	

(IIIe) *N*-(4-{*N'*-[(1*E*)-1*H*-pirrol-2-ilmetilideno]hidrazinasulfonil}fenil)acetamida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	1,761	2202	0,264	-	-	0,240	0,240
2	2,180	631	-	0,759	-	0,033	0,033
3	2,349	1897	0,134	0,378	-	0,129	0,129
4	2,650	634	-	0,785	-	0,037	0,037
5	2,846	3486	-	0,380	-	0,154	0,154
6	3,063	1529106	0,128	0,583	1,607	98,517	98,517
7	13,139	210	0,122	44,845	1,465	0,011	0,011
8	13,498	239	-	1,329	-	0,017	0,017
9	13,913	14643	0,109	1,587	1,496	0,838	0,838
10	15,646	232	0,141	7,726	1,493	0,016	0,016
11	17,616	89	0,220	6,556	1,498	0,008	0,008
total	25	1553370				100,0	

(IIIff) *N*-(4-{*N'*-[(1*E*)-[4-(dimetilamino)fenil]methilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	2,330	5622	0,133	-	-	0,293	0,293
2	2,556	55878	0,120	0,969	1,947	2,915	2,915
3	3,079	19458	0,134	2,261	-	1,049	1,049
4	3,411	6878	0,147	1,304	-	0,426	0,426
5	3,910	603	-	1,177	-	0,046	0,046
6	4,290	1406488	0,165	0,873	1,503	94,395	94,395
7	4,933	12025	0,159	2,269	1,405	0,710	0,710
8	5,767	381	0,191	2,759	1,284	0,028	0,028
9	6,435	1708	0,206	1,940	1,397	0,139	0,139
Total	25	1509040				100,0	

(IIIg) *N*-(4-{*N'*-[1-(furan-2-il)etilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

# pico	Tempo de retenção (min.)	Altura (mAu)	Largura a 50% da altura (cm)	Resolução	Fator de cauda	Área (%)	Concentração (%)
1	1,819	8322	-	-	-	0,271	0,271
2	1,925	12505	-	0,423	-	0,556	0,556
3	2,156	28237	0,108	1,063	-	1,364	1,364
4	2,568	273	0,092	2,275	1,245	0,009	0,009
5	2,802	1007	0,082	1,538	0,881	0,033	0,033
6	3,061	1674614	0,136	1,340	1,565	97,767	97,767
total	25	1724957				100,0	

(IIIh) *N*-(4-{*N'*-[1-(tiofen-2-il)etilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

ANEXO C –

***Dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C – série I
sulfonil-hidrazonas***

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)		
2,38	(s, 3H, H-1)	
7,14	(d, J = 3,84 Hz, 1H, H-6)	
7,44	(d, J = 8,06 Hz, 2H, H-2)	
7,70	(d, J = 8,36 Hz, 1H, H-7)	
7,78	(d, J = 8,12 Hz, 2H, H-3)	
7,89	(s, 1H, H-5)	
12,1	(s, 1H, H-4)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)		
20,96	C-1	
114,4	C-9	
115,2	C-8	
127,1	C-4	
129,8	C-3	
134,6	C-5	
135,9	C-6	
143,8	C-2	
150,7	C-7	
151,8	C-10

(Ib) *N'*-[(1*E*)-(5-nitrofuran-2-yl)methylidene]-4-metilbenzeno-1-sulfonil-hidrazida

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , ppm)	
2,37	(s, 3H, H-1)
7,06	(t, $J = 3,67$ Hz, $J = 4,92$, 1H, H-7)
7,36	(d, $J = 3,29$ Hz, 1H, H-6)
7,40	(d, $J = 7,93$ Hz, 2H, H-2)
7,58	(d, $J = 4,84$ Hz, 1H, H-8)
7,74	(d, $J = 8,08$ Hz, 2H, H-3)
8,09	(s, 1H, H-5)
11,3	(s, 1H, H-4)

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , ppm)	
20,96	C-1
127,1	C-4
127,7	C-10
128,6	C-8
129,5	C-3
130,6	C-9
136,0	C-5
138,2	C-6
142,1	C-7
143,4	C-2

(**1c**) N' -[(1*E*)-tiofeno-2-ilmetilideno]-4-metilbenzeno-1-sulfonil-hidrazida

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , ppm)		
2,38	(s, 3H, H-1)	
7,46	(m, 3H, H-6 (1H); H-2 (2H))	
7,78	(d, $J = 8,18$ Hz, 2H, H-3)	
8,04	(d, $J = 4,30$ Hz, 1H, H-7)	
8,11	(s, 1H, H-5)	
12,0	(s, 1H, H-4)

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , ppm)		
20,97	C-1	
127,2	C-4	
129,3	C-8	
129,8	C-3	
130,3	C-9	
135,7	C-5	
140,0	C-6	
143,8	C-2	
145,5	C-7	
150,7	C-10

(Id) N' -[(1E)-(5-nitrothiophen-2-yl)methylidene]-4-metilbenzeno-1-sulfonil-hidrazida

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
2,36	(s, 3H, H-1)
6,08	(m, 3H, H-7)
6,36	(m, 2H, H-6)
6,85	(m, 1H, H-8)
7,38	(m, 2H, H-2)
7,78	(m, 3H, H-5 (1H); H-3 (2H))
10,9	(s, 1H, H-9)
11,24	(s, 1H, H-4)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
20,97	C-1
109,1	C-9
112,9	C-8
122,2	C-10
126,4	C-7
127,3	C-4
129,4	C-3
136,3	C-5
140,5	C-6
143,1	C-2

(Ie) 4-metil-N'-[(1E)-1H-pirrol-2-ilmetilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

(1f) *N'*-[(1*E*)-[4-(dimetilamino)fenil]metilideno]-4-metil-benzeno-1-sulfonohidrazida

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
2,11	(s, 3H, H-1)
2,37	(s, 1H, H-5)
6,54	(s, 1H, H-7)
6,82	(s, 1H, H-6)
7,40	(d, J = 7,58 Hz, 2H, H-2)
7,72	(s, 1H, H-8)
7,80	(d, J = 7,65 Hz, 2H, H-3)
10,48	(s, 1H, H-4)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
13,66	C-11
20,92	C-1
111,1	C-9
111,7	C-8
127,5	C-4
129,4	C-3
136,3	C-5
143,3	C-2
144,4	C-6
145,1	C-10
151,1	C-7

(Ig) *N'*-[(1*E*)-1-(furan-2-il)etilideno]-4-metil-benzeno-1-sulfonohidrazida

(Ih) 4-metil-*N'*-[(1*E*)-1-(tiofen-2-yl)etilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)		
2,14	(s, 3H, H-5)	
2,37	(s, 3H, H-1)	
6,04	(s, 2H, H-8)	
6,90	(d, J = 7,68 Hz, 1H, H-7)	
7,15	(s, 2H, H-6; H-9)	
7,42	(d, J = 7,02 Hz, 2H, H-2)	
7,82	(d, J = 7,12 Hz, 2H, H-3)	
10,4	(s, 1H, H-4)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)		
14,48	C-14	
20,96	C-1	
101,3	C-11	
105,6	C-13	
107,8	C-9	
120,6	C-8	
127,6	C-4	
129,4	C-3	
131,6	C-7	
136,2	C-5	
143,3	C-2	
147,4	C-10	
148,4	C-12	
152,8	C-6

(II) *N'*-[(1*E*)-1-(2*H*-1,3-benzodioxol-5-yl)etilideno]-4-metillbenzeno-1-sulfonohidrazida

*Dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C –
série II sulfonyl-hidrazonas*

(IIa) *N'*-[(1*E*)-furan-2-ylmetilideno]-4-clorobenzene-1-sulfonyl-hidrazida

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
7,17	(s, 3H, H-1)
7,73	(m, 3H, H-1, H-5)
7,90	(m, 3H, H-2, H-6)
12,3	(s, 1H, H-3)

H-4 ausente

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
114,3	C-8
115,4	C-7
129,0	C-3
129,6	C-2
135,3	C-5
137,5	C-1
138,3	C-4
150,5	C-6
151,8	C-9

(IIb) N'-[(1E)-(5-nitrofurano-2-il)metilideno]-4-clorobenzeno-1-sulfonil-hidrazida

(IIc) N' -[(1*E*)-tiofeno-2-ilmetilideno]-4-clorobenzeno-1-sulfonil-hidrazida

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)		
7,48	(d, J= 4,33 Hz, 1H, H-5)	
7,74	(d, J= 8,66 Hz, 2H, H-1)	
7,90	(d, J= 8,61 Hz, 2H, H-2)	
8,06	(d, J= 4,32 Hz, 1H, H-6)	
8,14	(s, 1H, H-4)	
12,2	(s, 1H, H-3)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)		
129,1	C-3	
129,6	C-2	
129,6	C-7	
130,3	C-8	
137,3	C-1	
138,4	C-4	
140,7	C-5	
145,2	C-6	
150,9	C-9

(IIId) *N'*-[(1*E*)-(5-nitrothiophen-2-yl)methylidene]-4-chlorobenzenesulfonohydrazide

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
6, 09	(s, 1H, H-6)
6,39	(s, 1H, H-5)
7,88	(s, 1H, H-7)
7,66	(d, J = 8,48 Hz, 2H, H-1)
7,79	(s, 1H, H-4)
7,92	(d, J = 8,46 Hz, 2H, H-2)
11,1	(s, 1H, H-3)
11,3	(s, 1H, H-8)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
109,1	C-8
113,2	C-7
122,4	C-9
126,3	C-6
129,2	C-2, C-3
137,8	C-1
137,9	C-4
141,1	C-5

(IIe) 4-cloro-*N'*-[(1*E*)-1*H*-pirrol-2-ilmetilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)		
2,93	(s, 6H, H-7)	
6,68	(d, J= 8,87 Hz, 1H, H-6)	
7,38	(d, J= 8,83 Hz, 2H, H-5)	
7,68	(d, J= 8,58 Hz, 2H, H-1)	
7,80	(s, 1H, H-4)	
7,88	(d, J= 8,61 Hz, 2H, H-2)	
8,50	(s, 1H, H-4)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)		
39,66	C-10	
111,6	C-8	
120,8	C-6	
128,2	C-7	
129,1	C-3	
129,2	C-2	
137,8	C-1	
138,0	C-4	
148,9	C-5	
151,6	C-9

(II_f) 4-cloro-*N'*-[(1*E*)-[4-(dimetilamino)fenil]metilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

(IIg) 4-cloro-*N'*-[(1*E*)-1-(furan-2-yl)etilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
2,21	(s, 3H, H-4)
7,04	(dd, J= 3,71 Hz, J = 5,05, 1H, H-6)
7,40	(d, J= 3,65 Hz, 1H, H-5)
7,53	(d, J= 5,06 Hz, 1H, H-7)
7,72	(d, J= 8,68 Hz, 2H, H-1)
7,92	(d, J= 8,68 Hz, 2H, H-2)
10,6	(s, 1H, H-3)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
14,6	C-10
127,5	C-9
127,9	C-7
128,8	C-8
129,1	C-3
129,5	C-2
137,6	C-1
138,0	C-4
142,3	C-6
150,5	C-5

(IIIh) 4-cloro-N'-[(1E)-1-(tiofen-2-il)etilideno]benzeno-1-sulfonohidrazida

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
2,16	(s, 3H, H-4)
6,04	(s, 2H, H-7)
6,90	(d, J= 8,58, 1H, H-6)
7,15	(s, 2H, H-5; H-8)
7,70	(d, J= 8,52 Hz, 2H, H-1)
7,94	(d, J= 8,46, 2H, H-2)
10,5	(s, 1H, H-4)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
14,48	C-13
101,4	C-10
105,6	C-12
107,8	C-8
120,8	C-7
129,2	C-3
129,5	C-2
131,5	C-6
137,9	C-1
137,9	C-4
147,5	C-9
148,5	C-11
153,7	C-5

(III) *N'*-[(1*E*)-1-(2*H*-1,3-benzodioxol-5-yl)etilideno]-4-clorobenzeno-1-sulfonohidrazida

*Dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C –
série III sulfonyl-hidrazonas*

(IIIa) *N*-(4-*N'*-[(1*E*)-furan-2-ylmetilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

(IIIb) *N'*-[(1*E*)-(5-nitrofuran-2-yl)methylideno]-hidrazinosulfonil}fenil}acetamida

(IIIc) *N*-(4-{*N'*-[(1*E*)-tiofen-2-ilmetilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
2,08	(s, 3H, H-1)
7,44	(d, J= 4,31 Hz, 1H, H-7)
7,81	(s, 4H, H-3; H-4)
8,04	(d, J= 4,31 Hz, 1H, H-8)
8,09	(s, 1H, H-6)
10,3	(s, 1H, H-2)
11,9	(s, 1H, H-5)

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	
24,08	C-1
118,6	C-4
128,4	C-5
129,2	C-9
130,3	C-10
131,9	C-6
139,9	C-7
143,6	C-3
145,6	C-8
150,7	C-11
169,0	C-2

(IIIId) *N'*-[(1*E*)-(5-nitrotiufen-2-il)metilideno]-hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

(IIIe) *N*-(4-{*N'*-[(1*E*)-1*H*-pirrol-2-ilmetilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

(IIIe) *N*-(4-{*N'*-[*(1E)*-[4-(dimetilamino)fenil]metilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)		
2,09	(s, 3H, H-1)	
2,11	(s, 3H, H-6)	
6,53	(m, 1H, H-8)	
6,82	(m, 1H, H-7)	
7,72	(s, 1H, H-9)	
7,78	(d, J= 8,59 Hz, 2H, H-3)	
7,86	(d, J= 8,57 Hz, 2H, H-4)	
10,3	(s, 1H, H-2)	
10,4	(s, 1H, H-5)

RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)		
13,65	C-12	
24,08	C-1	
111,0	C-10	
111,7	C-9	
118,4	C-4	
128,7	C-5	
132,6	C-6	
143,2	C-3	
144,4	C-7	
145,1	C-11	
151,1	C-8	
169,0	C-2

(IIIg) *N*-(4-{*N'*-[1-(furan-2-yl)etilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

(IIIh) *N*-(4-{*N'*-[1-(tiofen-2-il)etilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

(IIIi) *N*-(4-{*N'*-[1-(2*H*-1,3-benzodioxol-5-yl)etilideno]hidrazinosulfonil}fenil)acetamida

ANEXO D –

***Ensaio de inibição do crescimento celular em formas
epimastigota de T. cruzi.***

Composto Ia

(26)70 uM
(26)100 uM
(26)150 uM

% inhibition

-5.61427
-0.53597
3.360485

Composto Ib

(7)70 uM
(7)100 uM
(7)150 uM

% inhibition

73.74631
97.56673
98.0223

Composto Ic

(20)70 uM
(20)100 uM
(20)150 uM

% inhibition

-10.1794
-12.1985
-2.54583

Composto Id

(8)70 uM
(8)100 uM
(8)150 uM

% inhibition

15.04534
79.9925
93.20935

Composto Ie

(17)70 uM
(17)100 uM
(17)150 uM

% inhibition

-8.74276
54.68968
84.73577

Composto If

(23)70 uM
(23)100 uM
(23)150 uM

% inhibition

7.666983
20.15757
2.636935

Composto Ig

(28)70 uM
(28)100 uM
(28)150 uM

% inhibition

-4.6385
-1.91339
-9.56159

Composto Ih

(27)70 uM
(27)100 uM
(27)150 uM

% inhibition

-26.2285
3.43016
-4.49138

Composto Ii

(21)70 uM
(21)100 uM
(21)150 uM

% inhibition

3.693723
6.667378
8.328863

Composto IIa

(12)70 uM
(12)100 uM
(12)150 uM

% inhibition
-12.6236
-1.16304
2.390392

Composto IIb

(16)70 uM
(16)100 uM
(16)150 uM

% inhibition
62.50318
95.95884
98.25276

Composto IIc

(9)70 uM
(9)100 uM
(9)150 uM

% inhibition
-1.06981
4.298421
15.44645

Composto IId

(10)70 uM
(10)100 uM
(10)150 uM

% inhibition
65.88105
94.95659
94.87619

Composto IIf

(19)70 uM
(19)100 uM
(19)150 uM

% inhibition
-0.79038
24.79365
83.99614

Composto IIg

(24)70 uM
(24)100 uM
(24)150 uM

% inhibition
32.77076
60.53167
68.78551

Composto IIhg

(30)70 uM
(30)100 uM
(30)150 uM

% inhibition
-5.06232
0.144706
0.369811

Composto IIh

(33)70 uM
(33)100 uM
(33)150 uM

% inhibition
-5.83932
7.910812
38.39104

Composto IIf

(32)70 uM
(32)100 uM
(32)150 uM

% inhibition
12.9302
25.74231
61.72151

Composto IIIa

(13)70 uM -11.2577
(13)100 uM -1.64541
(13)150 uM -3.49984

% inhibition

Composto IIIb

(14)70 uM 37.66967
(14)100 uM 92.83417
(14)150 uM 97.52385

% inhibition

Composto IIIc

(11)70 uM -14.1326
(11)100 uM -8.01265
(11)150 uM -4.72184

% inhibition

Composto IIId

(15)70 uM 67.03002
(15)100 uM 95.49255
(15)150 uM 96.28578

% inhibition

Composto IIIe

(18)70 uM -3.49596
(18)100 uM 46.84853
(18)150 uM 78.17022

% inhibition

Composto IIIf

(25)70 uM 0.067841
(25)100 uM -2.23497
(25)150 uM -5.74553

% inhibition

Composto IIIg

(29)70 uM -5.48449
(29)100 uM -9.61518
(29)150 uM -4.89871

% inhibition

Composto IIIh

(31)70 uM -5.30872
(31)100 uM -3.38729
(31)150 uM -6.84425

% inhibition

Composto IIIi

(22)70 uM -1.15433
(22)100 uM -6.21182
(22)150 uM -12.7238

% inhibition

Curriculum Lattes

Fernando de Moura Gatti - Curriculum Vitae Lattes

Dados pessoais

Nome Fernando de Moura Gatti
Filiação Luiz Gatti e Maria Renata de Moura
Nascimento 06/03/1987 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade 435382457 SSP - SP - 13/06/2001
CPF 318.440.848-50

Formação acadêmica/titulação

- 2013** Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Síntese e avaliação biológica de sulfonil-hidrazonas análogos do nitrofural como candidatos a antichagásicos
Orientador: Gustavo Henrique Goulart Trossini
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: Trypanosoma cruzi, cruzafina, derivados sulfonil-hidrazônicos, nitrofural
Áreas do conhecimento: Planejamento de fármacos; Síntese Orgânica, inibição enzimática
- 2006 - 2011** Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, São Paulo, Brasil.
Título: AYAHUASCA: Farmacologia e seus efeitos no sistema serotoninérgico e relações neurológicas
Orientador: Dra. Edna Bertini

Formação complementar

- 2009 - 2009** Curso de curta duração em XX curso de Toxicologia Clínica.
Instituto da Criança – HCFMUSP, HCFMUSP, Brasil.
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Técnicas de Expressão Oral.
Instituto Biológico, IB, São Paulo, Brasil.
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Responsabilidade Social e Prevenção ao Uso de Drogas.
Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, São Paulo, Brasil.
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em II Curso de Perícia Criminal.
Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, São Paulo, Brasil.

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: estudante de mestrado. Carga horária: 40. Regime: Dedicção exclusiva

2. WELEDA - Pompéia

Vínculo institucional

2011 - 2012 Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico Substituto.

Carga horária: 44. Regime: Dedicção exclusiva.

3. Instituto Biológico - IB

Vínculo institucional

2007 - 2010

Vínculo: bolsista PIBIC, Enquadramento funcional: estagiário. Carga horária: 20. Regime: Dedicção exclusiva

Projetos

Projetos de pesquisa

2013 - Atual

Síntese e avaliação biológica de sulfonil-hidrazonas análogos do nitrofural como candidatos a antichagásicos

Descrição: Devido a situação atual da necessidade de novos compostos anti-chagásicos mais potentes e menos tóxicos, o trabalho propôs a síntese de compostos da classe das sulfonil-hidrazonas utilizando como protótipo o nitrofural, caracterização por faixa de fusão e técnicas espectrométricas e espectroscópicas (RMN e UV), avaliar de pureza por cromatográfica líquida de alta eficiência, avaliar atividade inibitória frente à cruzafina por fluorimetria e a inibição do crescimento celular de formas epimastigotas do parasita *T. cruzi*.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Fernando de Moura Gatti; Gustavo Henrique Goulart Trossini (Responsável)

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Número de produções C,T & A: 2/

2009 - 2010

“Avaliação Fitoquímica do Látex de *Cróton celtidifolius* (Euphorbiaceae)”

Descrição: Pesquisa e desenvolvimento de extrato vegetal por diferentes métodos cromatográficos para isolamento, purificação e identificação de compostos ativos do extrato vegetal.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Fernando de Moura Gatti (Responsável); Karina Bettega Felipe; Rozangela Curi Pedrosa; Maria Helena Rossi

2007 - 2009

Estudo fitoquímico de extratos ativos de *Casearia Sylvestris* (Flacourtiaceae)

Descrição: Preparação de extratos vegetais; Fracionamento dos extratos; Análises Qualitativas e Quantitativas dos extratos vegetais por diferentes métodos cromatográficos; Teste de atividade antifúngica em ensaios microbiológicos.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Fernando de Moura Gatti (Responsável); Rozangela Curi Pedrosa; Maria Helena Rossi

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. KVIECINSKI, MAICON ROBERTO, FELIPE, KARINA BETTEGA, GOMES CORREIA, JOÃO FRANCISCO, FERREIRA, EDUARDO ANTONIO, ROSSI, MARIA HELENA, **MOURA GATTI, FERNANDO DE**, FILHO, DANILO WILHELM, CURI PEDROSA, ROZANGELA

Brazilian *Bidens pilosa* Linné yields fraction containing quercetin-derived flavonoid with free radical scavenger activity and hepatoprotective effects. *Libyan Journal of Medicine*. , v.6, p.5651 - , 2011.

Artigos aceitos para publicação

1. SHAMIM, ANWAR, SOUZA, FREDERICO B., TROSSINI, GUSTAVO H. G., **GATTI, FERNANDO M.**, STEFANI, HÉLIO A.

Synthesis of C-glycosyl-bis-1,2,3-triazole derivatives from 3,4,6-tri- O -acetyl-D-glucal. *Molecular Diversity*. , 2015.

Apresentação de trabalho e palestra

1. GATTI, Fernando de M., ROSSI, M. H., PEDROSA, R. C., FELIPE, K. B.
Avaliação Fitoquímica de *Casearia sylvestris*, Espécie com Potencial Atividade Antitumoral, 2008.
(Congresso, Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Casearia sylvestris, diterpeno clerodânico, casearina
2. GATTI, Fernando de M., FELIPE, K. B., PEDROSA, R. C., ROSSI, M. H.
avaliação fitoquímica de *Casearia sylvestris*, espécie com potencial atividade antitumoral, 2008.
(Congresso, Apresentação de Trabalho)
3. FELIPE, K. B., GATTI, Fernando de M., ROSSI, M. H., PEDROSA, R. C.
In vivo antitumoraç activity of crude extract and fractions from *Casearia sylvestris*, 2008.
(Congresso, Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Casearia sylvestris, antitumoral, Erlich carcinoma

Eventos

Participação em eventos

1. **I Workshop de Jovens Pesquisadores em Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos**, 2015. (Outra)
2. **XX Escola de Verão em Química**, 2014. (Outra).
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III International Symposium on Drug Discovery**, 2013. (Simpósio).
“Design and synthesis of sulfonylhydrazones derivatives as cruzain inhibitors”.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **36º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2013. (Congresso)
“Síntese e avaliação da atividade inibitória da cruzaina de bioisósteros sulfonilidrazônicos do NF, planejados como candidatos a antichagásicos”.
5. **Simpósio de Dendrímeros: Importância no contexto da nanotecnologia**, 2012. (Simpósio)
6. Apresentação Oral no(a) **8º Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais (8º CICAM)**, 2010. (Congresso)
“AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DO LÁTEX DE *Croton celtidifolius* (EUPHORBIACEA)”.
7. Apresentação Oral no(a) **7º Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais (7º CICAM)**, 2009. (Congresso)
“Avaliação Fitoquímica das Frações Ativas do Extrato de *Casearia sylvestris* (FLACOURTIACEAE)”.
8. Apresentação Oral no(a) **6º Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais (6º CICAM)**, 2008. (Congresso)
“Avaliação Fitoquímica de *Casearia sylvestris*, Espécie com Potencial Atividade Anti-Tumoral”.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIII Reunião da FESBE**, 2008. (Congresso)
In vivo antitumoral activity of crude and fractions from *Casearia sylvestris*.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 8178427/2 - Fernando de Moura Gatti

Email:	mouragatti@usp.br
Data de Nascimento:	06/03/1987
Cédula de Identidade:	RG - 435382457 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Faculdades "Oswaldo Cruz" - Brasil - 2011

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula:	01/02/2013
Início da Contagem de Prazo:	01/02/2013
Data Limite para o Depósito:	03/08/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Gustavo Henrique Goulart Trossini - 01/02/2013 até o presente. Email: trossini@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 01/02/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 10/04/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 01/02/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015
Impresso em: 05/06/2015 10:54:40

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 8178427/2 - Fernando de Moura Gatti

Sígl	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5704-6/1	Análise Espectrométrica de Fármacos	04/03/2013	16/06/2013	150	10	90	A	N	Concluída
FBF5777-2/8	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	07/03/2013	19/06/2013	45	3	92	B	N	Concluída
FBF5779-2/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	16/08/2013	17/10/2013	90	6	90	B	N	Concluída
FBT5737-6/5	Tecnologia de Síntese de Fármacos	12/09/2013	13/11/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5802-1/2	Alvos Bioquímicos no Planejamento de Fármacos	04/02/2014	19/05/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5734-7/3	Mecanismos de Ação dos Fármacos aos Níveis Molecular e Eletrônico	04/02/2014	19/05/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5708-5/2	Relação entre Estrutura Química e Atividade Biológica	21/02/2014	15/05/2014	120	8	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	45
Estágios:			
Total:	0	25	45

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 05/06/2015 10:54:40

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 8178427/2 - Fernando de Moura Gatti

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
3578907	Gustavo Henrique Goulart Trossini	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 05/06/2015 10:54:40