UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: SÍNTESE E MODELAGEM MOLECULAR DE HÍBRIDOS DE HIDRAZONAS E LIBERADORES DE ÓXIDO NÍTRICO

Ricardo Augusto Massarico Serafim

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: SÍNTESE E MODELAGEM MOLECULAR DE HÍBRIDOS DE HIDRAZONAS E LIBERADORES DE ÓXIDO NÍTRICO

Ricardo Augusto Massarico Serafim

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Tese para obtenção do título de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo

2016

Ricardo Augusto Massarico Serafim

ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: SÍNTESE E MODELAGEM MOLECULAR DE HÍBRIDOS DE HIDRAZONAS E LIBERADORES DE ÓXIDO NÍTRICO

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do título de Doutor

_____

Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira

orientadora/presidente

_____

1º. examinador

_____

2º. examinador

_____

3º. examinador

_____

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

“<u>PRESS ON</u>

Nothing in the world can take the place of persistence. Talent will not; nothing is more common than unsuccessful men with talent. Genius will not; unrewarded genius is almost a proverb. Education alone will not; the world is full of educated derelicts. Persistence and determination alone are omnipotent”

(Autor desconhecido)

Agradecimentos

Quero agradecer, primeiramente, a minha família (meu pai Nicola, minha mãe Rosa Maria, minha irmã Cynthia, meu cunhado Guilherme, meu sobrinho Davi e minhas avós Rosa Terezinha e Maria do Carmo). Vocês são a ESSÊNCIA da minha vida. Meu AGRADECIMENTO ETERNO!

À minha orientadora, Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira, por toda a orientação no decorrer do trabalho, por ter aceitado algumas das minhas teimosias (rsrs), pela amizade e pela fonte inesgotável de inspiração. Não tenho como agradecer apenas com palavras... o meu mais sincero muito obrigado!

A todos os amigos do LAPEN (alguns ex-membros): Fred, Vanessa, Andressa, Lorena, Ana, Giulia, Guilherme, Marco, Marina, Natanael, Charles, Rodrigo, Soraya, Tacila, Heloisa, Moisés, Fabrício e Jenny.

Aos Professores, Dra. Jeanine Giarolla e Dr. Roberto Parise, pelas conversas, amizade e orientações durante o PAE.

À Profa. Dra. Carlota Yagui, pela carta de recomendação para o estágio sanduíche.

Aos meus amigos de pós-graduação de outros laboratórios: Stanley (Lili), Luiz (Morango), Fred, Natália, Hugo, Flávia, Fernando (Fê), Jú Pachioni, Jú Magalhães, Luciana, Fernando (Fefê), Elys, Rose, Mariana e Thaís, pela amizade e agradável convívio nos corredores e fora da USP.

Ao meu aluno de IC, Filipe (Fi), pela amizade e pela grande ajuda na síntese dos compostos das séries finais do trabalho.

À Dra. Kerly Pasqualoto, pelo auxílio na elaboração da parte computacional deste trabalho.

Aos colaboradores deste trabalho, Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo, Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, Dr. José Eduardo Gonçalves, Profa. Dra. Silvia Storpirtis, e, antecipadamente, ao Dr. Lúcio Freitas e Dra. Carolina Borsoi, por todas as etapas de avaliações biológicas.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Dias, por me aceitar como aluno especial, durante meu estágio sanduíche nacional, em seu grupo de pesquisa no IQ/UNICAMP e por todos os ensinamentos de Química Orgânica aplicados à Química Medicinal. Em especial, agradeço seus ex-alunos Emílio, Ellen e Danilo, por me

receberem tão bem no grupo e pela amizade que continua até hoje. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Gary Molander, por me aceitar como "visiting scholar", durante meu estágio sanduíche no exterior, em seu grupo de pesquisa na UPENN (EUA) e por todos os ensinamentos da Química de Boro.

Aos meus amigos da UPENN: Yohei, Idris, Fatima e Peng. Em especial à ex-pós doutoranda Mirna El Khatib, por toda ajuda, ensinamento e amizade durante meu período na UPENN. "Thank you for everything, my dear friend".

Aos meus amigos de Philly (Ihouse): Selin, Li, Queja, Milene, Chu, Pamela, Felipe, Tamara, Daniel, Ricardo. Vocês tornaram a maior experiência da minha vida muito mais "awesome".

Ao meu amigo Davit e ao Sensei Joe Chiu, pelas companhias e ensinamentos nos treinos do Penn Judo Club.

Aos meu alunos e amigos das Faculdades Oswaldo Cruz (FOC), direta ou indiretamente, vocês também me incentivaram para a conclusão deste trabalho.

Aos meus grandes amigos São-Manuelenses: Danilo, Paulo e Dorfo, com os quais sempre pude contar quando precisei. Muito obrigado!

Aos meus ex-professores Dra. Elisabeth Brossi, Dr. Antônio J. Calixto de Souza e Dr. Luiz Paulo Geraldo, pela inspiração da época de graduação.

Aos prestativos funcionários do IQ/UNICAMP, Penn Chemistry e, em especial, aos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP): David, Elisabete, Alexandre, Kelma, Irineu e Mirian.

À Dra. Maria Inês de Almeida Gonçales pela elaboração de muitos espectros presentes nessa tese.

À maquina de café do B14, pois o café proveniente dela foi muito importante na etapa final desse trabalho.

À Capes, pelas bolsas de Doutorado e Doutorado Sanduíche no Exterior concedidas no decorrer deste trabalho.

Resumo

SERAFIM, R. A. M. **Antichagásicos potenciais: síntese e modelagem molecular de híbridos de hidrazonas e liberadores de óxido nítrico**. 2016. 280f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A doença de Chagas é uma parasitose extremamente negligenciada, cujo agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Atualmente, 21 países da América Latina são considerados regiões endêmicas, onde 75-90 milhões de pessoas estão expostas à infecção, 6-7 milhões estão infectadas e mais de 41 mil novos casos surgem por ano. Entretanto, apenas os fármacos nifurtimox e benznidazol estão disponíveis no mercado. Estes, além da baixa eficácia na fase crônica da parasitose, apresentam diversos efeitos adversos, sendo que no Brasil apenas o benznidazol é utilizado. Este fato mostra a importância de se ampliar o número de fármacos disponíveis e propor quimioterapia mais eficaz para o tratamento da doença de Chagas. Como forma de contribuir para essa busca, este trabalho objetiva a síntese de compostos híbridos bioisostéricos *N*-acilidrazônicos e sulfonilidrazônicos, contendo grupo liberador de óxido nítrico, com potencial de interação com cisteíno-proteases parasitárias, tais como a cruzaína. Nestes derivados, os grupos liberadores de óxido nítrico utilizados foram os grupos furoxano (contendo substituinte metílico e fenílico) e éster nitrato. Propôs-se a variação de anéis aromáticos substituídos e não-substituídos, com o intuito de avaliar a possível relação estrutura-atividade (REA) desses análogos. Até o momento, somente os compostos da série *N*-acilidrazônica tiveram avaliação biológica realizada. Os valores de IC_{50} dos compostos na forma amastigota do parasita variaram entre >100 a 2,88 µM, sendo este último valor comparável ao fármaco de referência. A atividade inibitória frente à cruzaína foi de 25,2 µM a 2,2 µM. Já a liberação de óxido nítrico foi avaliada pelo método indireto de detecção de nitrato e os valores variaram entre 52,0 µM e 4.232,0 µM. Estes são bem inferiores ao composto padrão, além de não se identificar correlação direta entre a atividade biológica e a liberação de NO. Na sequência, os dois compostos mais ativos (6 e 14) foram submetidos a estudos de permeabilidade e de citotoxicidade. O composto 6 foi considerado o de maior permeabilidade segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e todos os compostos apresentaram a taxa de fluxo menor que 2, indicando a ausência de mecanismo de efluxo. Na avaliação do potencial citotóxico desses compostos em células humanas, o derivado 6 apresentou índice de seletividade superior ao do benznidazol. Em estudos de modelagem molecular usando análise exploratória de dados (HCA e PCA), propriedades estéricas/geométricas e eletrônicas foram consideradas as mais relevantes para a atividade biológica. Além disso, estudos de *docking* mostraram que a posição do grupo nitro no anel aromático é importante para a interação com a cruzaína. Ademais o composto 6 não provocou mudanças significativas no ciclo celular e na fragmentação de DNA em células humanas, mostrando-se como líder promissor para futuros estudos *in vivo*. Atividade tripanomicida, citotoxicidade, potencial de liberação de NO e estudos de permeabilidade dos 23 derivados sulfonilidrazônicos e ésteres nitrato estão sendo avaliados.

Palavras-Chaves: Doença de Chagas; Antichagásicos potenciais; Hidrazonas; Liberadores de óxido nítrico; Híbridos moleculares; Bioisósteros; Modelagem molecular.

Abstract

SERAFIM, R. A. M. **Potential antichagasic agents: synthesis and molecular modeling of hydrazones and nitric oxide releasing hybrids**. 2016. 280f. Thesis (PhD) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2016.

Chagas disease is an extremely neglected parasitic disease whose etiologic agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Currently 21 Latin American countries are considered endemic regions, where 75-90 million people are exposed to infection, 6-7 million are infected and more than 41,000 new cases occur annually. However only nifurtimox and benznidazole are available on the market. These drugs, besides low efficacy in the chronic phase of the parasite have numerous adverse effects, and in Brazil only benznidazole is used. This fact shows the importance of increasing the number of drugs available and propose more effective chemotherapy for the Chagas disease treatment. As a contribution to the problem, this study aims the synthesis of biososteric compounds from *N*-acylhydrazone and sulfonylhydrazone, which have the potential to interact with parasitic cysteine protease, such as cruzain, containing nitric oxide releasing groups, which also has inhibitory activity in this enzyme class. In these derivatives nitric oxide releasing groups used were furoxan (containing methyl and phenyl substituent) and nitrate ester groups. The variation of aromatic rings substituted and unsubstituted was proposed in order to evaluate the possible structure-activity relationship (SAR) of these analogs. Only *N*-acylhydrazone series had its biological profile evaluated up to now. The IC_{50} values of the compounds against the amastigote form of the parasite ranged from >100 µM to 2.88 µM, the last value being comparable to that of reference drug. Cruzain inhibitory activity ranged from 25.2 µM to 2.2 µM. The nitric oxide releasing potential was evaluated using the indirect method of detection and nitrate values ranged between 52.0 µM and 4,232.0 µM. These results are below than those of the standard compound, and there is no direct correlation between the biological activity and nitric oxide releasing potential as well. Further, the two most active compounds (6 and 14) were submitted to permeability and cytotoxicity studies. Compound 6 showed the highest permeability value according to Biopharmaceutics Classification System (BCS), and both compounds showed flow rate lower than 2, indicating no efflux mechanism. In the cytotoxicity studies of these compounds in human cells, the derivative 6 showed selectivity index greater than benznidazole. In molecular modeling studies using exploratory data analysis (HCA and PCA) steric/geometric and electronic properties were considered the most relevant for biological activity. In addition, docking studies were performed and showed that the position of the nitro group on the aromatic ring is important for the interaction with cruzain. Compound 6 did not cause significant changes in cell cycle and DNA fragmentation in human cells, showing to be a promising lead compound for future *in vivo* studies. Trypanocidal activity, cytotoxicity assay, NO releasing potential and permeability studies of the 23 sulfonylhydrazones and nitrate ester derivatives are being evaluated.

Keywords: Chagas disease; Potential antichagasic agents; Hydrazones; Nitric oxide releasing groups; Molecular hybrids; Bioisosters; Molecular modeling.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL 13
1. INTRODUÇÃO 14
1.1. DOENÇA DE CHAGAS 14
1.1.1. HISTÓRICO 14
1.1.2. EPIDEMIOLOGIA 15
1.1.3. TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO 19
1.1.4. SINTOMATOLOGIA 22
1.1.5. DIAGNÓSTICO 24
1.1.6. PREVENÇÃO 24
1.2. QUIMIOTERAPIA 25
1.2.1. QUIMIOTERÁPICOS DISPONÍVEIS 25
1.2.2. QUIMIOTERÁPICOS EM ESTUDO 26
1.2.2.1. Inibidores da cisteíno-protease 26
1.2.2.2. Inibidores da tripanotiona redutase 31
1.2.2.3 Inibidores da síntese dos esteróis 33
1.2.2.4. Compostos liberadores de óxido nítrico 35
1.2.2.5. Compostos com mecanismos diferenciados 38
1.3. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA MODIFICAÇÃO MOLECULAR 41
1.3.1. BIOISOSTERISMO 41
1.3.2. HIBRIDAÇÃO MOLECULAR 46
1.4. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS E A MODELAGEM MOLECULAR 49
2. OBJETIVOS GERAIS 50
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50
CAPÍTULO 1 61
EM BUSCA DO COMPOSTO LÍDER... 61
1.1. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS 62
1.2. METODOLOGIA 63
1.2.1. SÍNTESE 63
1.2.1.1. Síntese do intermediário 4-formil-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido 64
1.2.1.2. Síntese do intermediário 4-formil-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido 65
1.2.1.3. Procedimento geral para a síntese das hidrazidas intermediárias (IV – VI) 66
1.2.1.4. Procedimento geral para a síntese das *N*-acilidrazonas (1-15) 66
1.2.2. ANÁLISE 67

1.2.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA (ENSAIO *IN VITRO* CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*) 67
1.2.4. LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO 68
1.2.5. ESTUDOS DE PERMEABILIDADE CELULAR 68
1.2.6. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE 69
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 70
1.3.1. SÍNTESE 70
1.3.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA (ENSAIO *IN VITRO* CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*) E LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO 73
1.3.3. ESTUDOS DE PERMEABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE 79
1.4. CONCLUSÕES 81
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82
CAPÍTULO 2 84
ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO E DAS PROPRIEDADES MOLECULARES MAIS RELEVANTES... 84
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS E JUSTIFICATIVAS 85
2.2. METODOLOGIA 85
2.2.1. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA 85
2.2.2. CONSTRUÇÃO DOS MODELOS MOLECULARES, CÁLCULOS DOS DESCRITORES E ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS (HCA E PCA) 86
2.2.3. *DOCKING* 88
2.2.4. ANÁLISE DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR 88
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 89
2.3.1. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA 89
2.3.2. ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS 95
3.3. *DOCKING* 102
2.3.4. ANÁLISE DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR 105
2.4. CONCLUSÕES 106
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 107
CAPÍTULO 3 109
ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO LÍDER... 109
3.1. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS 110
3.2. METODOLOGIA 111
3.2.1. SÍNTESE (SÉRIE SULFONILIDRAZONA) 111

3.2.1.1. Procedimento geral para a síntese das sulfonilidrazidas intermediárias (XII-XXIV) 112
3.2.1.2. Procedimento geral para a síntese das sulfonilidrazonas (16-28) 113
3.2.2. SÍNTESE (SÉRIE ÉSTER NITRATO) 113
3.2.2.1. Síntese do intermediário ácido 3-(nitrooxi) propanoico 114
3.2.2.2. Procedimento geral para a síntese dos ésteres nitrato (29-38) 114
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 115
3.3.1. SÍNTESE (SÉRIE SULFONILIDRAZONA) 115
3.3.2. SÍNTESE (SÉRIE ÉSTER NITRATO) 119
3.3.3. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA (SULFONILIDRAZONAS E ÉSTERES NITRATO) 121
3.4. CONCLUSÕES 121
ANEXO I 122
Métodos de análise e caracterização estrutural dos compostos sintetizados 122
1. MÉTODOS DE ANÁLISE 123
2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL – CAPÍTULO 1 (DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS) 124
3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL – CAPÍTULO 3 (DERIVADOS SULFONILIDRAZÔNICOS) ... 191
4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL – CAPÍTULO 3 (DERIVADOS ÉSTERES NITRATO) 246
ANEXO II 279
Propriedades moleculares e/ou descritores calculados (Capítulo 2) 279
ANEXO III 283
Ficha da Pós-Graduação 283
ANEXO IV 287
Currículo Lattes 287

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE CHAGAS

1.1.1. HISTÓRICO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma antropozoonose frequente na América Latina, sendo Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (*Figura 1*) o descobridor e cientista pioneiro nas pesquisas sobre essa parasitose (NEVES, 2003; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010).

Entre os anos de 1907 e 1909, com o intuito de chefiar projetos no combate à malária em Minas Gerais, Carlos Chagas mudou-se para a cidade de Lassance. Ao analisar insetos comuns na região ("barbeiros"), deparou-se com um hemoflagelado inusitado, o qual apresentava cinetoplasto grande e intensa movimentação, concluindo, posteriormente, de que se tratava de *Trypanosoma* de uma espécie a ser decifrada. Este fato fez com que Chagas procurasse este parasita no sangue de pessoas e animais que estavam em contato com o barbeiro (NEVES, 2003).

Em abril de 1909, Carlos Chagas concretizou sua busca, encontrando o parasita em menina de dois anos de idade, que havia sido picada por barbeiros. Após a descoberta, Chagas aprofundou suas pesquisas sobre as características biológicas e morfológicas do parasita, o qual foi denominado *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (NEVES, 2003).

Essa descoberta foi de alto impacto em nível nacional e internacional, todavia, mantinha-se rodeada de incertezas por parte da comunidade científica da época, em relação à sua relevância, epidemiologia e características clínicas. O médico Cecilio Romaña descreveu, então, algumas peculiaridades clínicas, que facilitariam a identificação de casos agudos da doença de Chagas, levando, assim, ao diagnóstico de centenas de casos, pelo "sinal de Romaña". Em 1937, Evandro Chagas (filho de Carlos Chagas) fundou, no Instituto Oswaldo Cruz, o SEGE (Serviço de Estudos das Grandes Endemias), com a finalidade de encontrar novos casos da doença de Chagas a partir da divulgação do "sinal de Romaña" entre os médicos da região (KROPF, 2005).

No ano do centenário de sua descoberta, realizaram-se eventos, nos quais cientistas de diversos países se reuniram para abordar e discutir temas a

respeito da doença de Chagas. Entre eles, merece realce o Simpósio Internacional do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas, na cidade do Rio de Janeiro (VOELKER, 2009).

O grande feito de Carlos Chagas permanece até os dias de hoje, influenciando grupos de pesquisas em diversos países da América Latina, que atuam na busca ativa para a descoberta de novos quimioterápicos contra o *T. cruzi* (KROPF, 2005; DIAS et al., 2009).

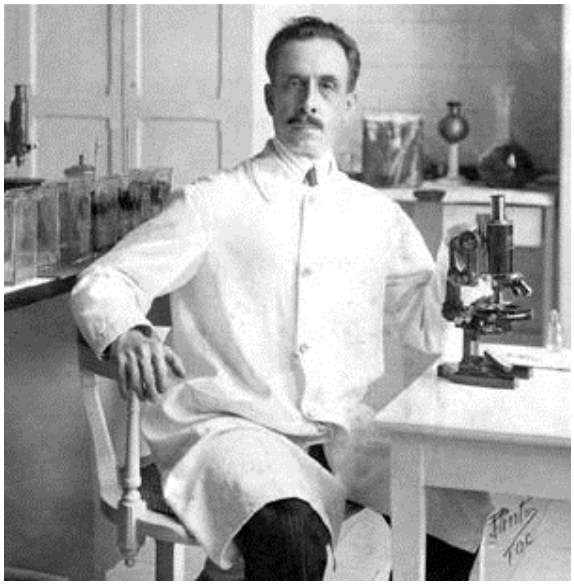


Figura 1: Foto de Carlos Chagas em seu laboratório no Instituto Oswaldo Cruz.
Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/22/Carlos_chagas_2.jpg/200px-Carlos_chagas_2.jpg (Acesso: 10/01/2016).

1.1.2. EPIDEMIOLOGIA

A doença de Chagas tem sua distribuição geográfica em toda a América Latina (*Figura 2*), representando grave problema de saúde pública para o continente. Porém, devido à globalização e, consequentemente, migração legal e ilegal de pessoas provenientes de países endêmicos (*Figura 3*), diversos casos foram relatados na fronteira com os Estados Unidos e no Canadá, além de outros países não endêmicos, principalmente da Europa, como Itália, Alemanha, França, Grécia e Espanha. Neste último país existem mais de 47 mil imigrantes que apresentam a doença (*Figura 4*). Esta tendência tem levado

a maior necessidade de sistemas de vigilância adequados nesses países, levando em consideração a subnotificação e a falta de consciência a respeito da doença pela população (COURA; DIAS, 2009; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; WHO, 2016; GASCON; BERN; PINAZO, 2010; HOTEZ; GURWITH, 2011; STRASEN et al., 2014; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2015; REQUENA-MENDEZ et al. 2015; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015; STANAWAY; ROTH, 2015).

Figura 2: Distribuição da doença de Chagas na América Latina.
Fonte: COURA; DIAS (2009).

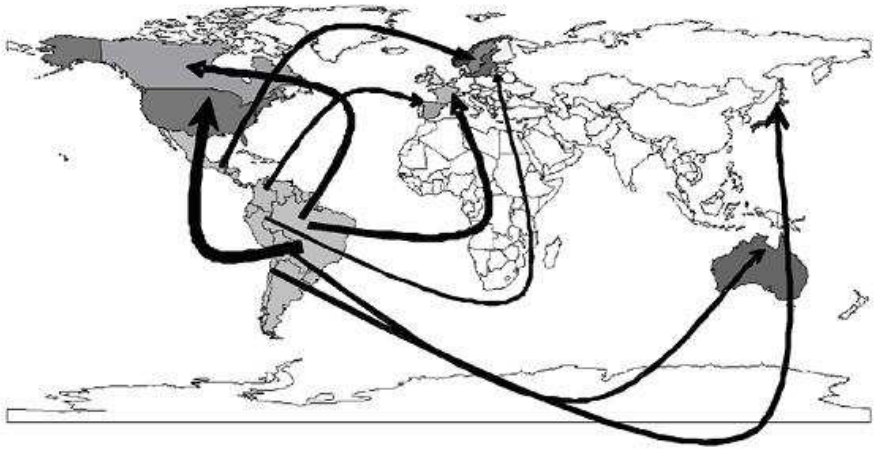


Figura 3: Esquema do fluxo imigratório na Doença de Chagas.
Fonte: WHO (2007).

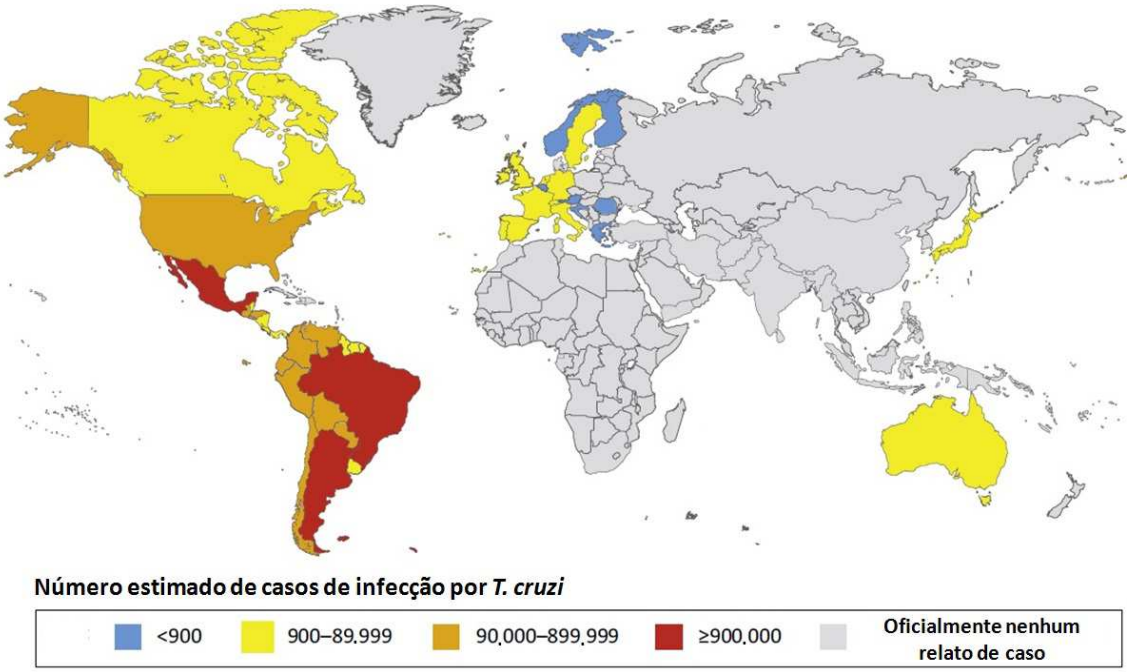


Figura 4: Distribuição global de casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais entre 2006 e 2010.
Fonte: PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015.

Desde o início dos anos 1990, inúmeros esforços por parte de instituições, como a OMS, Organização Mundial da Saúde, estão sendo direcionados em várias regiões das Américas para o controle da doença de Chagas. Estes incluem campanhas para a eliminação do vetor, análise das principais tendências de transmissão e caracterização clínica e epidemiológica da doença nas regiões incidentes, resultando na redução de 50% dos casos de pessoas infectadas, conforme *Tabela I*. Países como Brasil, Uruguai e Chile

estão livres da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, considerado o principal vetor domiciliar nesses países (WHO, 2016; COURA; DIAS 2009; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2015).

Atualmente, nos 21 países considerados regiões endêmicas, estima-se que 75-90 milhões de pessoas estão expostas à infecção, 6-7 milhões estão infectadas e mais de 41 mil novos casos surgem por ano. Tal cenário enfatiza a importância da manutenção dos programas de controle para a eliminação do vetor domiciliar, melhoria nos métodos diagnósticos da doença e pesquisa de novos fármacos ativos contra o agente etiológico (COURA; DIAS, 2009; WHO, 2016; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2015; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015; STANAWAY; ROTH, 2015).

Tabela I: Comparação dos parâmetros epidemiológicos da doença de Chagas entre os anos 1990, 2000 e 2006

Parâmetros Epidemiológicos	**1990**	**2000**	**2006**
Óbitos por Ano	> 45.000	21.000	12.500
Casos de Infecção Humana	30 milhões	18 milhões	15 milhões
Novos Casos	700.000	200.000	41.200
População em Risco	100 milhões	40 milhões	28 milhões
Distribuição	21 países	21 países	21 países

Fonte: WHO (2007).

1.1.3. TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO

A transmissão da doença de Chagas ocorre através da introdução do agente etiológico (*T. cruzi* – *Figura 5*) no organismo humano, estando intimamente associada à pobreza e a insatisfatórias condições de salubridade, principalmente em ambientes rurais, provocando a busca dos infectados por melhores condições médicas nas áreas urbanas (WHO, 2016; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015; COURA, 2015).

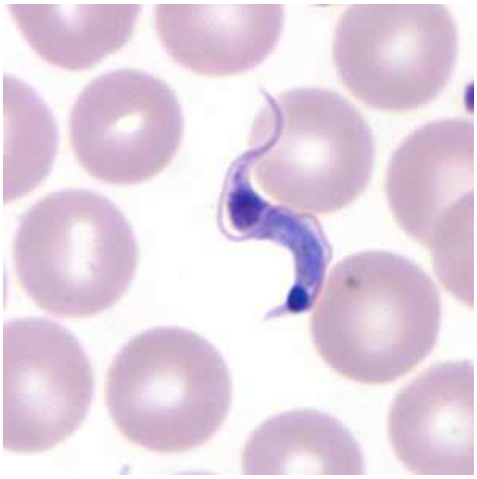


Figura 5: *Trypanosoma cruzi* na forma sanguínea tripomastigota.
Fonte: http://bioneogenios.blogspot.com.br/2014/07/trypanosoma-cruzi-e-doenca-de-chagas.html (Acesso: 10/01/2016).

A doença de Chagas se encontra, frequentemente, em locais onde outras patologias coexistem, porém seus dados epidemiológicos não são precisos devido à subnotificação existente (WHO, 2016; ALVES et al., 2009; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2015; COURA, 2015). Podem-se citar como os principais meios de transmissão:

Transmissão pelo triatomíneo: ocorre pela dejeção do vetor infectado (principalmente o *Triatoma infestans*) sobre a pele humana, sendo o mecanismo de eliminação da forma infectante tripomastigota metacíclica do *T. cruzi*. Essa forma infectante é introduzida na corrente sanguínea pelo orifício da picada, através do ato de coçar o local após a ação do vetor, como resposta alérgica à saliva do inseto. Outras espécies de triatomíneos também podem ser vetores da doença de Chagas em humanos, dentre elas o *Triatoma sordida*, *Panstrogylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Rhodinus prolixus* e *Triatoma*

dimidiata. Atualmente, essa forma de transmissão ainda é responsável por 70% dos casos em países onde não há sistemas para o controle do vetor (COURA; DIAS, 2009; WHO, 2016; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2015).

Transmissão por transfusão sanguínea: mais de 20% da transmissão da doença de Chagas ocorre pelo processo de transfusão sanguínea, principalmente em lugares onde não há controle nos bancos de sangue, como é o caso da Bolívia. O parasita permanece viável no sangue armazenado em geladeiras por cerca de mais de duas semanas, obrigando países a realizarem triagens sanguíneas antes de transfusões (COURA; DIAS, 2009; WHO, 2016; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2015; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015; COURA, 2015).

Transmissão congênita: ocorre durante a gravidez, quando a mãe transmite o *T. cruzi* para o feto. Tem característica assintomática e na maioria das vezes não é diagnosticada em recém-nascidos. Exibe variação de 0,5-10% na influência de transmissão, em países como Chile, Bolívia e Paraguai. Em países de áreas não endêmicas, este tipo de transmissão também vem ocorrendo, principalmente pela falta de triagem sanguínea. Itália, Suíça e Espanha são os únicos exemplos de países de regiões não endêmicas que fazem triagem para avaliar transmissão congênita de *T. cruzi*. (WHO, 2013; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015).

Transmissão por transplante de órgãos: casos de transmissão por transplante de órgãos ocorrem principalmente na América Latina, entretanto, nos EUA, Canadá e países da Europa já foram relatados alguns casos de aquisição da doença através do transplante de órgãos, relacionados com imigrantes da América Central (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; WHO, 2013).

Transmissão por via oral: Embora esse tipo de transmissão seja considerado acidental, devido à ingestão de alimento contaminado, principalmente por caldo de cana e suco de açaí, atualmente pode ser considerada endêmica na região do Amazonas, além de apresentar alta taxa de mortalidade. O Brasil apresenta elevado índice de transmissão por via oral. Entre os anos 2000 e 2001, 70% dos casos de infecções agudas relatados foram atribuídos à transmissão por via oral. Em países não endêmicos, essa forma de transmissão é considerada responsável pela introdução e

manutenção da doença de Chagas. Vários surtos da doença devido ao consumo de bebidas e alimentos contaminados com *T. cruzi* enfatizam a importância desta rota de transmissão em humanos (COURA; DIAS, 2009; WHO, 2016; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; MILES, 2010; DOMINGUES et al., 2015; COURA, 2015).

Após a introdução da forma tripomastigota metacíclica na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (*Figura 6*), o *T. cruzi* interage com as células do sistema fagocítico mononuclear da pele ou mucosas, ocorrendo neste local a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, os quais se multiplicam por divisão binária simples (ANIS; ANIS, MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001).

Após 4 a 6 dias, as formas amastigotas se diferenciam em forma tripomastigota e, desta maneira, após lisarem as células hospedeiras (através do metabolismo parasitário), estas ou são liberadas para o interstício, infectando outras células vizinhas, ou caem na circulação sanguínea ou linfática, terminando por colonizar outras regiões do organismo (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001).

No sangue, os parasitas podem ter vida longa, mas somente nos períodos iniciais de infecção (fase aguda), pois quando sofrem processo de destruição parasitária por parte dos mecanismos imunológicos do hospedeiro, a parasitemia diminui repentinamente. Na fase crônica, a presença do parasita no sangue ocorre raramente, necessitando de diagnósticos especiais para sua demonstração (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001).

As formas intracelulares (amastigotas) possuem tropismo por fibras musculares esqueléticas e cardíacas, sendo comuns patologias cardíacas relacionadas à doença de Chagas (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001).

O *T. cruzi* na corrente sanguínea pode, também, ser ingerido por triatomíneos, fazendo o seu ciclo extracelular no interior dos insetos (NEVES, 2003; REY, 2001).

Figura 6: Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*.
Fonte: http://bestpractice.bmj.com/best-practice/images/bp/en-gb/1160-6-iline_default.gif (Acesso: 10/01/2016).

1.1.4. SINTOMATOLOGIA

A doença de Chagas é uma patologia em que as manifestações clínicas podem ser divididas em três fases: aguda, indeterminada e crônica (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001; WHO 2016; STANAWAY; ROTH, 2015).

Fase aguda: os sintomas podem aparecer entre 8 e 10 dias após a infecção e permanecer durante 8 a 10 semanas. Apenas 1 a 4% dos casos, principalmente crianças, exibem clinicamente os sintomas. Estes podem ser inespecíficos, como: mal-estar, febre, vômitos, diarreias, anorexia, erupções cutâneas, taquicardia e irritação meníngea, fazendo com que os pacientes não recorram a auxílio médico, impedindo, assim, o diagnóstico precoce e facilitando a evolução da doença. Meningoencefalite e miocardite aguda podem contribuir em 5 a 10% dentre todos os casos sintomáticos. Todavia, os sinais mais comuns na fase aguda são conhecidos como o “sinal de Romaña”, em que os olhos se incham devido ao ferimento provocado pela picada do vetor nesta região, ou “chagoma”, quando a picada ocorre na pele, originado nódulos ou furúnculos (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001; WHO 2016; STANAWAY; ROTH, 2015).

Aproximadamente 80% dos pacientes chagásicos sintomáticos desenvolvem “chagoma”. Os sintomas da fase aguda desaparecem

espontaneamente em 90% dos infectados. Entretanto, caso não seja tratada, a fase aguda pode progredir para a fase indeterminada ou para a crônica. (NEVES, 2003; CORBETT et al., 2002; WHO 2016; STANAWAY; ROTH, 2015).

Fase indeterminada: é a denominada fase silenciosa ou fase assintomática dessa patologia, podendo durar cerca de 10 a 30 anos. É capaz de persistir indefinidamente, fazendo com que nem todo indivíduo infectado progrida para a fase crônica. Durante essa fase o parasita migra por todo o corpo via circulação sanguínea e linfática, penetrando nas células hospedeiras e causando lise celular. O eletrocardiograma e os estudos radiográficos do coração, esôfago e cólon normalmente estão inalterados. Todavia, podem ser notadas leves anormalidades cardíacas na ecocardiografia e em testes de estresse (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001; WHO 2016; STANAWAY; ROTH, 2015).

Fase crônica: manifesta-se mais frequentemente pelas complicações cardíacas e os sintomas desenvolvem-se em cerca de 10 a 30% dos indivíduos infectados, normalmente entre homens de 20 a 50 anos de idade. Manifestações cardíacas comuns incluem insuficiência cardíaca congestiva, troboembolismo, cardiomegalia, aneurisma e arritmias geralmente associadas a inflamações viscerais e desnervação parassimpática. As complicações cardíacas geram óbitos em aproximadamente 38% dos casos. Da mesma forma, complicações digestivas, tais como, megacólon e megaesôfago, estão relacionados com fatores de mortalidade. Mais de 30% das pessoas infectadas cronicamente desenvolvem alterações cardíacas e mais de 10%, algum tipo de alterações digestivas, neurológicas ou alterações mistas, que requerem tratamentos específicos. Manifestações neuromusculares também são características nesta fase, devido ao fato de o parasita atingir músculos lisos, esqueléticos e o tecido nervoso (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; NEVES, 2003; REY, 2001; WHO 2016; STANAWAY; ROTH, 2015).

1.1.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico inicia-se com a avaliação clínica do paciente, identificando sinais característicos como o “chagoma”, denominado sinal de porta de entrada (REY, 2001; NEVES, 2003).

Em razão da alta parasitemia na fase aguda, utiliza-se o método direto de identificação do parasita através da visualização microscópica no sangue, podendo-se, também, utilizar métodos como a biópsia do linfonodo por punção, imunofluorescência indireta e hemaglutinação (REY, 2001; NEVES, 2003; WHO, 2016; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010).

Já na fase crônica diagnosticam-se pouco mais de 50% dos casos, através de imunofluorescência, hemaglutinação, reação imunoenzimática (ELISA) e radioimunoensaio, sendo úteis também o xenodiagnóstico, a hemocultura e a inoculação em animais de ensaio. As alterações cardíacas identificadas pelos raios X e eletrocardiogramas são relevantes, porém, os testes laboratoriais são indispensáveis (REY, 2001; NEVES, 2003; WHO, 2016; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010).

1.1.6. PREVENÇÃO

A prevenção da doença de Chagas pode ser realizada através do uso de inseticidas de ação residual desde que se identifique a presença do inseto vetor domiciliado. Melhorias físicas nas habitações também são sugeridas, quando a infestação é geograficamente limitada ou peridomiciliar, entretanto, deve-se considerar como foco maior a promoção e a melhoria da qualidade de vida. Realização de triagem sorológica é de extrema importância para se evitar casos de transmissão transfusional, assegurando a exclusão de todo indivíduo chagásico nos bancos de sangue. Diversos programas para o controle da doença de Chagas, principalmente com foco na eliminação dos vetores, estão sendo realizados em diversos países, com resultados satisfatórios, enfatizando a importância da manutenção desse tipo de estratégia para maior diminuição nos números referentes a novos casos da parasitose. (OPAS, 2001; COURA; DIAS, 2009; WHO, 2016; ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010).

O custo do tratamento para doença de Chagas permanece consideravelmente relevante, comparado com métodos de prevenção. Somente na Colômbia, estimou-se que o custo anual dos cuidados médicos para todos os pacientes com a doença tenha sido de aproximadamente 267 milhões de dólares, em 2008. A distribuição de inseticidas para o controle de vetores custaria em torno de 5 milhões de dólares. (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; WHO, 2016).

1.2. QUIMIOTERAPIA

1.2.1. QUIMIOTERÁPICOS DISPONÍVEIS

Apesar de passados mais de cem anos da descoberta da doença de Chagas, sua quimioterapia ainda continua precária. Mesmo sendo considerada uma das principais doenças negligenciadas, apenas dois fármacos são, atualmente, utilizados no tratamento: nifurtimox e benznidazol (*Figura 7*), sendo que, no Brasil, apenas o benznidazol é utilizado (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2015; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015; STANAWAY; ROTH, 2015; WHO, 2016; MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015).

O nifurtimox é um nitrofurano que age produzindo metabólitos oxigenados altamente reativos, como o peróxido de hidrogênio, uma vez que o *T. cruzi* tem mecanismos ineficientes para a destoxificação destes compostos. É, portanto, mais sensível ao estresse oxidativo em relação às células dos vertebrados. Porém, estudos de Gerpe e colaboradores (2010) mostram que a atividade dessa molécula pode estar relacionada não somente com o estresse oxidativo, mas também com outras vias ou alvos biomacromoleculares. Assim sendo, é importante o correto entendimento do seu metabolismo e mecanismo de ação. Já o benznidazol é um derivado nitroimidazólico, o qual parece atuar através do estresse redutivo, envolvendo ligações covalentes em macromoléculas essenciais para a fisiologia do parasita (DIAS et al., 2009; URBINA; DOCAMPO, 2003; URBINA, 2010; BERMUDEZ et al., 2016; CHATELAIN, 2015).

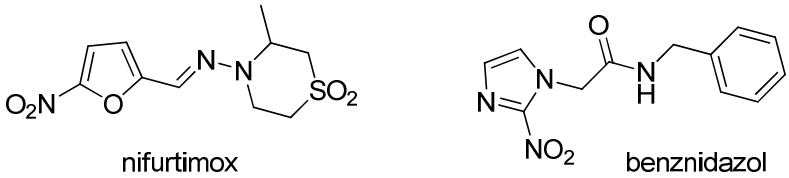


Figura 7: Estrutura molecular dos fármacos atualmente utilizados no tratamento da doença de Chagas.

Ambos os fármacos são ativos na fase aguda da doença, com cura parasitológica acima de 80% em pacientes tratados. Entretanto, eles apresentam baixo índice de eficácia na fase crônica; mais de 80% dos pacientes tratados nesta fase não obtêm a cura parasitológica (DIAS et al., 2009; WILKINSON; KELLY, 2009; URBINA; DOCAMPO, 2003; URBINA, 2010; BERMUDEZ et al., 2016; CHATELAIN, 2015).

Fatores como a presença de diversos efeitos colaterais gerados pelo nifurtimox e benznidazol, como vômitos, formigamento, fraqueza muscular, anorexia, alergia (provavelmente devido a danos oxidativos e redutivos ocasionados no tecido do hospedeiro) e a diferença de suscetibilidade às diferentes cepas do *T. cruzi* também influenciam na adesão e eficácia dos fármacos utilizados na quimioterapia atual (DIAS et al., 2009; WILKINSON; KELLY, 2009; URBINA; DOCAMPO, 2003; URBINA, 2010; BERMUDEZ et al., 2016; CHATELAIN, 2015). Estudos realizados no Brasil mostraram que quase 90% dos pacientes tratados com benznidazol apresentaram reações adversas, e, destes, 28% abandonaram o tratamento em decorrência dos efeitos adversos proeminentes (PONTES et al., 2010).

1.2.2. QUIMIOTERÁPICOS EM ESTUDO

1.2.2.1. Inibidores da cisteíno-protease

A principal endoprotease do *T. cruzi* é denominada cruzipaína, também conhecida como cruzaína (enzima recombinante), cisteíno-protease capaz de hidrolisar diversos tipos de proteínas (CAZZULO, 2005; MARTINEZ-MAYORGA et al., 2015).

A cruzaína (*Figura 8*) é diferencialmente expressa em vários estágios biológicos do parasita, envolvendo-se em diversas etapas do ciclo de vida e

sendo essencial para seu crescimento e sobrevivência. Em sua maior parte, é uma enzima lisossômica, podendo, também, existir isoformas associadas à membrana plasmática do parasita (CAZZULO, 2005; DURRANT et al., 2010; MARTINEZ-MAYORGA et al., 2015). Esta enzima pode estar envolvida na penetração da forma tripomastigota na célula mamífera e, também, no processo de escape do parasita do mecanismo imunológico do hospedeiro. Pelo fato de ela ser a principal protease lisossômica, espera-se que desempenhe papel importante na nutrição parasitária ou, pelo menos, nas formas em desenvolvimento presentes no inseto hematófago vetor (CAZZULO, 2005; URBINA; DOCAMPO, 2003; DURRANT et al., 2010; MARTINEZ-MAYORGA et al., 2015).

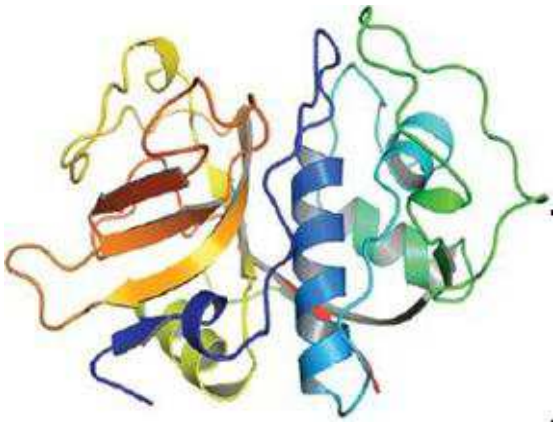
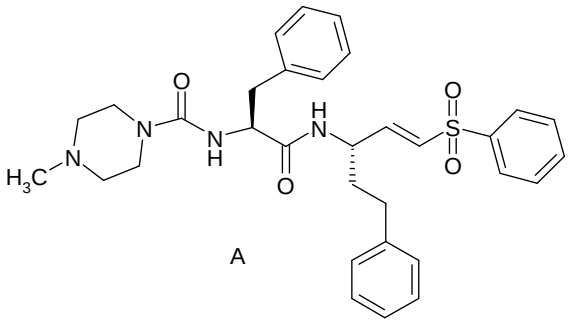


Figura 8: Estrutura cristalográfica da cruzaína (cod. PDB: 1ME4).
Fonte: http://www.pdb.org

Inibidores da cruzaína atuam interferindo com a realização correta do ciclo biológico do parasita, sendo um alvo extremamente visado para a síntese de novos fármacos anti-*T. cruzi* (CAZZULO, 2005; DIAS et al., 2009; MARTINEZ-MAYORGA et al., 2015).

Dentre os compostos em estudos com essa atividade alguns podem ser citados (*Figuras 9-11*): *N*-metil-piperazina-ureia-Phe-homo-Phe-vinil-fenil-sulfona (A), morfolinoureia-Phe-homo-Phe-vinil-fenil-sulfona (B), ariloxitiossemicarbazonas (C), 1,2,3-triazol tetrafluorfenoximetilcetona (D), 2-acetamidotiofeno-3-carboxamida (E) (KERR et al., 2009; DIAS et al., 2009; BRAK et al., 2010; WIGGERS et al., 2013; NEITZ et al., 2015; ESPINDOLA et al., 2015).



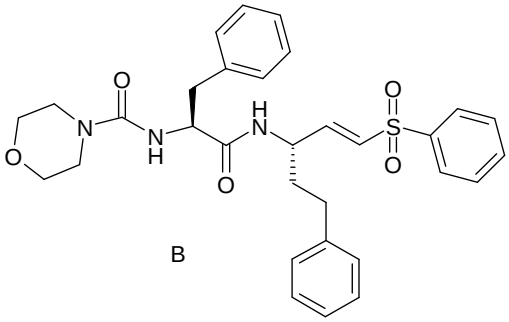
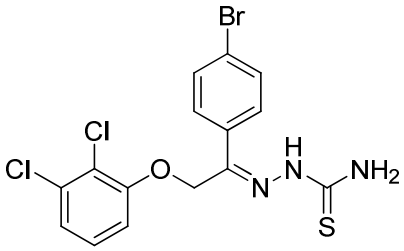


Figura 9: Estrutura dos compostos *N*-metil-piperazina-ureia-Phe-homo-Phe-vinil-fenil-sulfona (A) e morfolinoureia-Phe-homo-Phe-vinil-fenil-sulfona (B).



C

Figura 10: Estrutura de uma ariloxitiossemicarbazona.

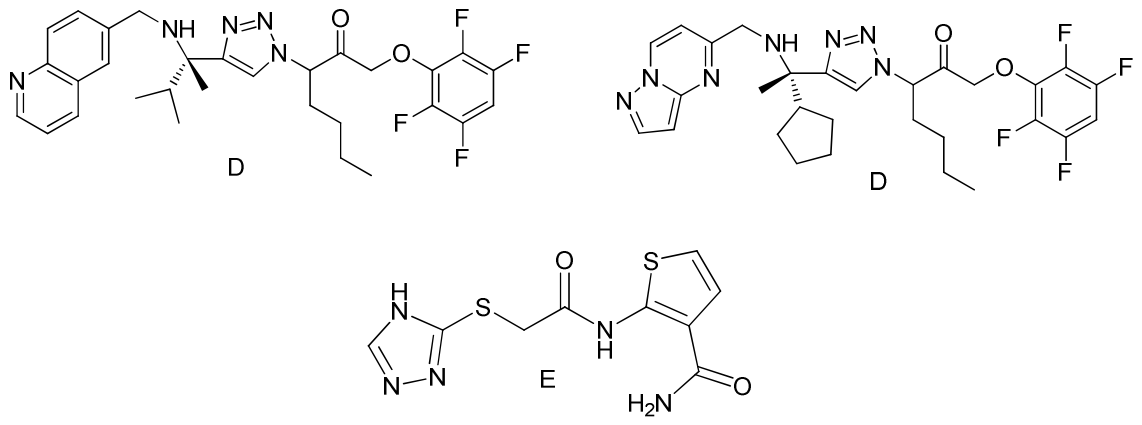


Figura 11: Estruturas das famílias das 1,2,3-triazol tetrafluorfenoximetilcetona (D) e das 2-acetamidotiofeno-3-carboxamida (E).

Os resultados recentes do composto odanacatibe (*Figura 12*), IC_{50} de 1 nM e bom perfil de segurança, têm mostrado seu grande potencial como futuro candidato a fármaco anti-*T. cruzi* inibidor de cisteíno-protease (NDAO et al., 2014).

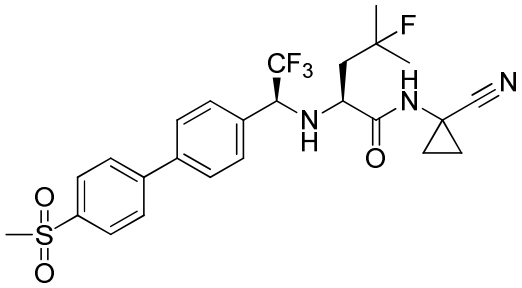


Figura 12: Estrutura química do odanacatibe.

Avelar e colaboradores (2015) sintetizaram uma série de derivados contendo nitrila, mostrando a importância dessa função orgânica como sendo um grupo farmacofórico para inibidores de cruzaína, tendo o composto F como o de melhor perfil entre atividade inibitória e citotóxica (*Figura 13*).

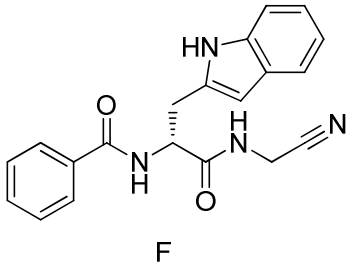
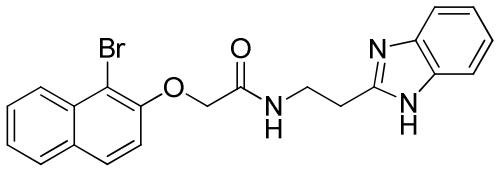


Figura 13: Estrutura química do derivado de nitrila.

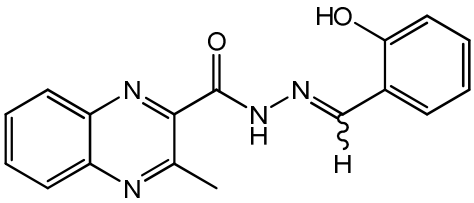
Com o objetivo de alcançar melhor entendimento a respeito da relação entre estrutura química e atividade biológica (REA) de derivados benzimidazólicos, mais de 40 análogos foram planejados e sintetizados por Ferreira e colaboradores (2014), levando à otimização do composto líder e ao desenvolvimento de G (*Figura 14*), o qual apresentou elevada potência inibitória (IC_{50} = 200 nM e K_i = 82 nM).



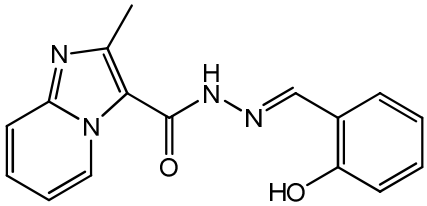
G

Figura 14: Estrutura química do derivado benzimidazólico.

O grupamento *N*-acilidrazona é considerado, em química medicinal, como sendo estrutura privilegiada, pelo fato de apresentar propriedades bioativas em diversos processos fisiopatológicos, tais como inflamação, desordens cardiovasculares e, também, capacidade de interagir com alvos biomacromoleculares parasitários, tais como a cruzaína. Estudos mostram a atividade anti-*T. cruzi* de ligantes (*Figura 15*) contendo *N*-acilidrazonas, assim como estudos de ancoramento molecular ou *docking* mostram a interação dessas moléculas com o sítio ativo da enzima (MOREIRA et al., 2009; ROMEIRO et al., 2009; BARREIRO et al., 2002).



LASSBio - 1022



LASSBio - 334

Figura 15: Compostos contendo *N*-acilidrazonas com atividade anti-*T. cruzi*.

1.2.2.2. Inibidores da tripanotiona redutase

A tripanotiona redutase (TR – *Figura 16*) é um alvo molecular validado para o planejamento de inibidores de utilidade na doença de Chagas (MOREIRA et al., 2009; URBINA; DOCAMPO, 2003; PERSCH et al., 2014).

Esta enzima é dependente de NADPH e catalisa a redução da tripanotiona dissulfeto em tripanotiona ditiol, ocorrendo, assim, cascata de eventos responsáveis pela neutralização de radicais livres e espécies reativas de oxigênio emitidas pelo sistema imune do hospedeiro. Mantém, dessa forma, ambiente redutor no interior do parasita, auxiliando seu crescimento e seu desenvolvimento. Outra característica de extrema relevância é a diferença estrutural da TR em relação à glutationa redutase (enzima utilizada no sistema redox do homem), possibilitando, assim, a inibição seletiva apenas da TR (MOREIRA et al., 2009; URBINA; DOCAMPO, 2003; PERSCH et al., 2014).

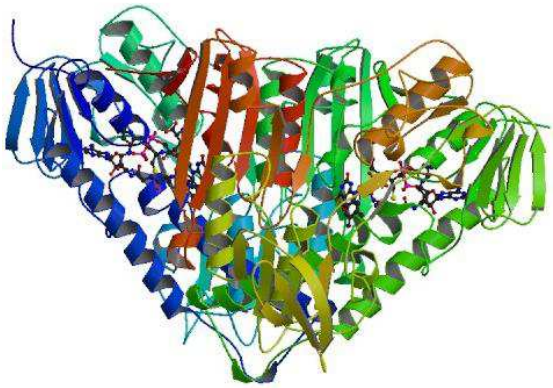


Figura 16: Estrutura cristalográfica da tripanotiona redutase com seus cofatores (cod. PDB: 1GXF).
Fonte: http://www.pdb.org

Alguns derivados tricíclicos são compostos com ação no sistema nervoso central, agindo, especificamente, no bloqueio dos receptores de dopamina. Estudos apontam alguns desses compostos como ativos na inibição da TR em ambos os estágios do *T. cruzi* (epimastigota e tripomastigota), destacando-se pela maior eficiência de ação o derivado fenotiazínico tioridazina e o antidepressivo clomipramina (*Figura 17*). Tal fato mostra que estes compostos são tripanomicidas promissores (RIVAROLA; PAGLINI-OLIVA, 2002; PAGLINI-OLIVA; RIVAROLA, 2003; FAURO et al., 2013; PRESTI et al., 2015).

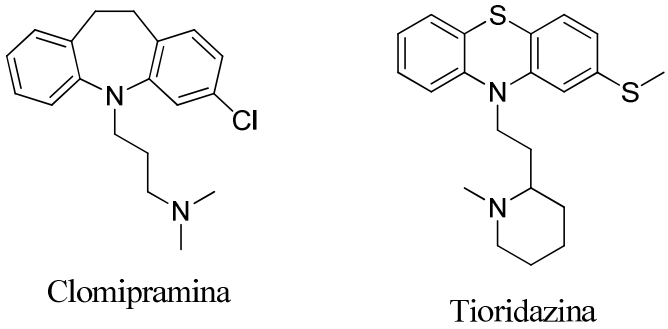
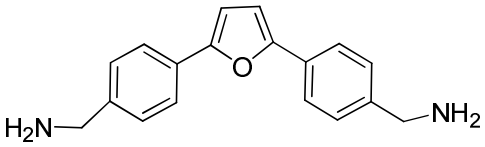


Figura 17: Derivados tricíclicos com atividade anti-*T. cruzi*.

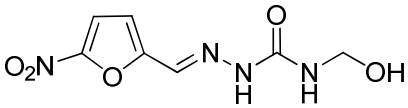
O composto 2,5-*bis*-(4-aminobenzil)furano (*Figura 18*), da classe dos arilfuranos, apresenta ação diferenciada no sítio ativo da enzima, mostrando maior afinidade por esta, além de propriedades farmacocinéticas adequadas, sendo responsável por 63% de inibição da enzima (OLIVEIRA et al., 2008).

Derivados nitrofurânicos apresentam inativação irreversível na enzima TR, como pode ser o caso do composto hidroximetilnitrofural - NFOH-121 (*Figura 18*), utilizado como um intermediário na síntese do pró-fármaco recíproco de nitrofural e primaquina, que mostrou elevada potência antichagásica *in vitro* contra as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, mutagenicidade diminuída e valor da DL_{50} > 2g/kg (CHUNG et al., 2003, 2008; DAVIES et al., 2010).

Uma série de poliaminas contendo anéis tricíclicos como substituintes foi sintetizada e, nos estudos, esses derivados demonstraram atividade tripanomicida pelo mecanismo de inibição competitiva da TR, com destaque para o composto H (*Figura 18*), cujo valor de K_i encontrado foi de 0,26 µM (OSULLIVAN et al., 2015).



2,5-*bis*-(4-aminobenzil)furano



NFOH - 121

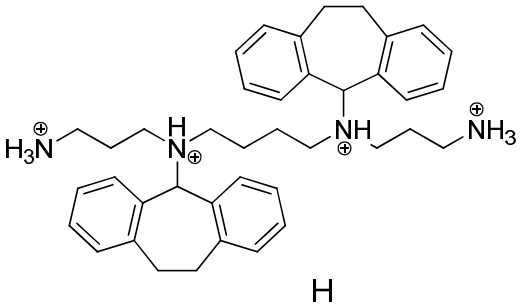


Figura 18: Derivados arilfurano, hidroximetilado do nitrofural e poliamínico com potencial atividade anti-TR.

1.2.2.3 Inibidores da síntese dos esteróis

O *T. cruzi* necessita de determinados esteróis (lanosterol, ergosterol e análogos) para sua proliferação em todos os estágios durante a vida. Esses esteróis são suscetíveis a compostos que inibam enzimas essenciais à sua biossíntese, fazendo com que o sistema imune se encarregue de eliminar o parasita (URBINA; DOCAMPO, 2003; FERRAZ et al., 2007; SOUZA; RODRIGUES, 2009; URBINA, 2010; CHOI; PODUST; ROUSH, 2014).

Alguns fármacos fungicidas (compostos azólicos) apresentam essa propriedade, sendo considerados os primeiros compostos descritos no tratamento de ambas as formas da parasitose, aguda e crônica (URBINA; DOCAMPO, 2003; SOUZA; RODRIGUES, 2009; FERRAZ et al. 2007; URBINA, 2009; URBINA, 2010; CHOI; PODUST; ROUSH, 2014).

O itraconazol e o cetoconazol atuam na enzima 14α-esterol desmetilase (CYP51 – *Figura 19*), a qual é responsável pela biossíntese do ergosterol. Estudos apontam que a utilização de inibidores da oxidosqualeno sintase, juntamente com inibidores de outro esterol, resulta em ação sinérgica relevante. (BUCKNER et al., 2001; URBINA, 2009, CHOI; PODUST; ROUSH, 2014).

O posaconazol (*Figura 20*), análogo estrutural do itraconazol, foi o primeiro derivado desta classe a entrar para testes clínicos em pacientes com

doença de Chagas. Porém, estudos demonstram que, embora menos potentes, derivados nitro-hetrerocíclicos mostraram maior eficácia em diferentes tipos de cepas de *T. cruzi*, comparados com inibidores de CYP51. Ademais, estes se mostraram ineficazes para erradicar infecção mesmo após sete dias de tratamento contínuo em diferentes concentrações (URBINA; DOCAMPO, 2003; URBINA, 2009; URBINA, 2010; MORAES et al., 2014).

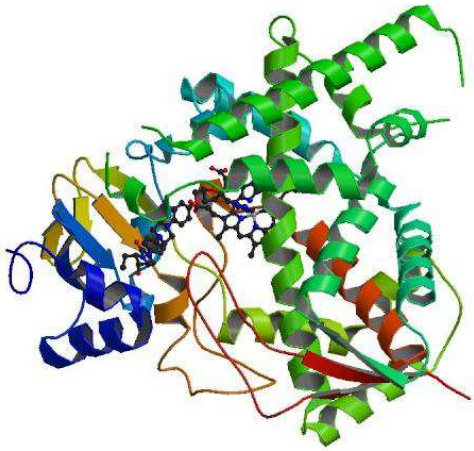


Figura 19: Estrutura cristalográfica da lanosterol 14α-esterol desmetilase com o ligante posaconazol (cod. PDB: 3K1O).
Fonte: http://www.pdb.org

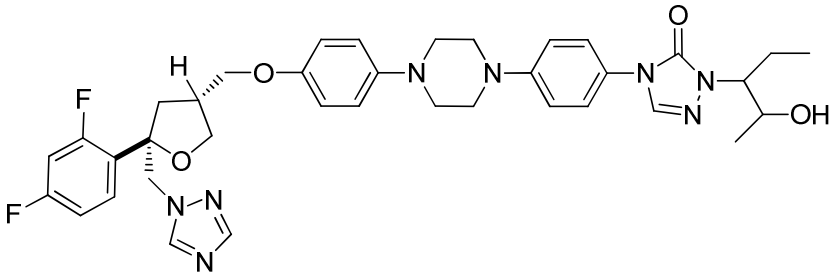


Figura 20: Estrutura molecular do posaconazol.

O agente anticâncer denominado tipifarnibe (*Figura 21*) apresenta atividade contra *T. cruzi* por inibir a enzima CYP51. Após diversas otimizações em sua estrutura, uma série de análogos do tipifarnibe foram descobertos, os quais demonstram interessante seletividade para a enzima parasitária (KRAUS et al., 2010; BUCKNER et al., 2012).

O potente inibidor denominado VNI (*Figura 21*), em estudos experimentais *in vivo,* demonstrou taxa de 100% de cura nos animais tratados

e 100% na taxa de sobrevida. Esse composto tem se mostrado excelente candidato para triagens clínicas (VILALLTA et al., 2013).

A classe química 4-aminopiridina tem sido vastamente explorada através de triagem e otimização de compostos líderes, originando estruturas com adequada biodisponibilidade por via oral e elevada potência, como é o caso do composto I (*Figura 21*) que apresentou um EC_{50} de 29 nM em *T. cruzi* (CHOI et al., 2013; CALVET et al., 2014; FRIGGERI et al., 2014).

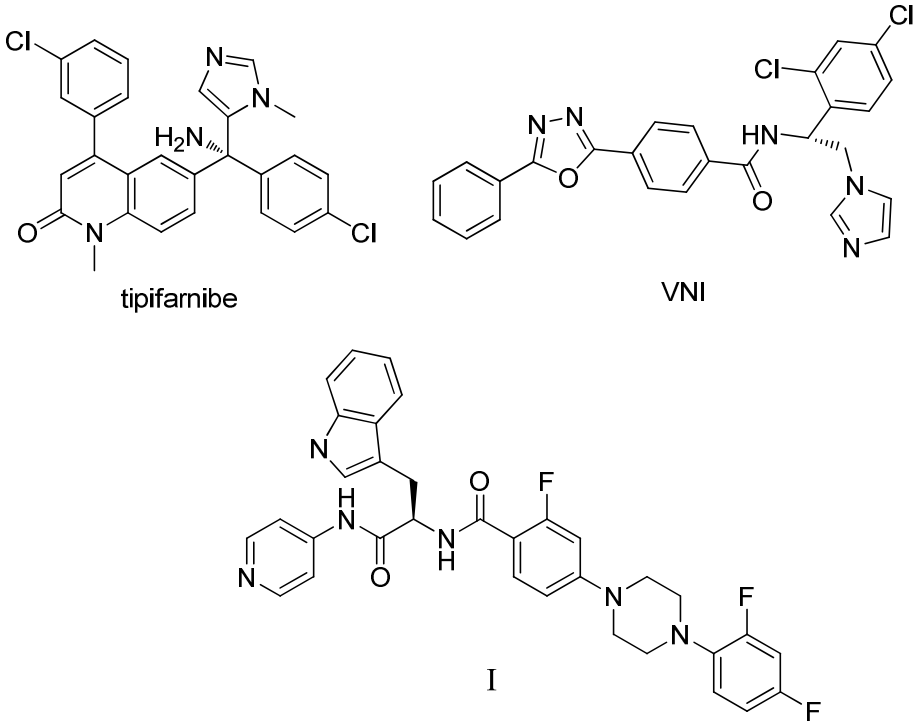


Figura 21: Tipifarnibe, VNI e derivado 4-aminopiridina.

Deste modo, as enzimas correspondentes às rotas biossintéticas dos esteróis são alvos promissores para a síntese de fármacos tripanomicidas (URBINA; DOCAMPO, 2003; URBINA, 2009; FERRAZ et al., 2007; BUCKNER et al., 2001; CHOI; PODUST; ROUSH, 2014).

1.2.2.4. Compostos liberadores de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é considerado importante molécula com propriedades citotóxicas e citostáticas para diversos organismos parasitários. Terapias contra o *T. cruzi* através de compostos liberadores de NO apontam

caminho alternativo interessante para a síntese de novos agentes tripanomicidas (SERAFIM et al., 2012; SILVA et al., 2007; BRUNET, 2001).

Do ponto de vista fisiopatológico, a produção induzida de NO através dos macrófagos durante a fase aguda da doença de Chagas pode atuar lisando o agente etiológico. Estas células apresentam a forma induzida da NO sintase (iNO), cuja ativação ocorre por indução de citocinas (interferona-γ e TNF-α), as quais são liberadas por algumas células do sistema imunológico. Essa liberação é prolongada por diversas horas em concentrações altas para serem tóxicas às células bacterianas ou tumorais. Portanto, os macrófagos constituem-se em fonte de NO no organismo, fazendo com que suas funções sejam devidas à liberação desse composto. Entretanto, a liberação excessiva de NO pode causar consequências para as células hospedeiras, como colapso vascular, por exemplo (BRUNET, 2001; SILVA et al., 2015; PEREIRA et al., 2014). Além disso, NO parece ter importância no processo de diferenciação entre as formas extracelular (tripomastigota) e intracelular (amastigota) do parasita (SOARES et al., 2014).

Diversos estudos sugerem que as cisteíno-proteases são alvos macromoleculares do NO. Doadores de NO, como o nitroprusseto de sódio e o *S*-nitrosoacetilpenicilamina (SNAP), inibem a capacidade catalítica da cruzaína de *T. cruzi* através da formação de *S*-nitrosotiol no resíduo de Cys25 do sítio catalítico da enzima (VENTURINI et al., 1998; COLASANTI et al., 2001). Esse mesmo mecanismo de inibição ocorre pelo derivado furoxânico SNO-102 (*Figura 22*), exibindo atividade antiparasitária dose e tempo dependente (ASCENZI et al., 2004).

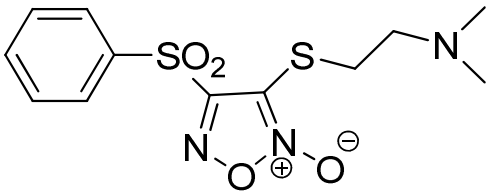


Figura 22: Estrutura da molécula SNO-102.

O uso de complexos metálicos para o tratamento e geração de novos compostos ativos na doença de Chagas ocorre há anos (SÀNCHEZ-DELGADO et al., 1993). Especificamente os complexos de rutênio liberadores de NO

(*Figura 23*) têm recentemente emergido como interessante alternativa no tratamento dessa patologia. Esses compostos apresentam baixa toxicidade e alta taxa de sobrevivência de ratos infectados com *T. cruzi*, alcançando valores de 40% de cura parasitológica e acima de 80%, se utilizados em combinação com benznidazol (SILVA et al., 2007, 2010; GUEDES et al., 2010; BASTOS et al., 2014). A própria utilização dessas estruturas complexadas com o benznidazol (*Figura 23*) tem demonstrado o aumento da eficácia contra o parasita mesmo em concentrações menores, diminuindo, dessa forma, os efeitos adversos relacionados ao fármaco (SESTI-COSTA et al., 2014).

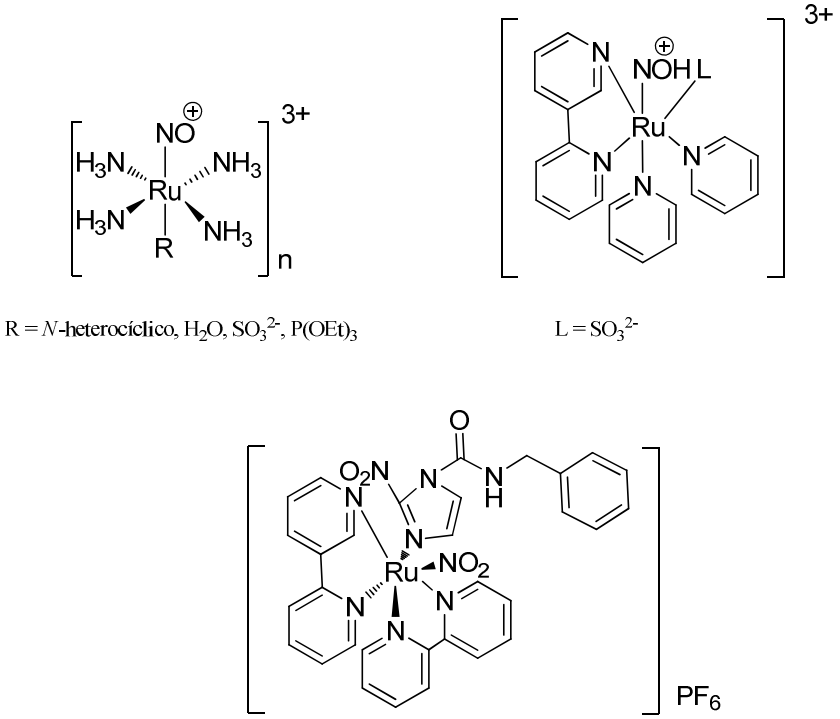


Figura 23: Estrutura geral dos complexos de rutênio liberadores de NO de primeira e segunda gerações e complexado com benznidazol.

Estudos apontam a *S*-nitrosilação na Cys166 catalítica da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GADPH – *Figura 24*) por complexos de rutênio liberadores de NO como importante evento para a inibição da via metabólica glicolítica do parasita. Observam-se de 85 a 97% de inibição enzimática em concentração de 200 mM (SILVA et al., 2010).

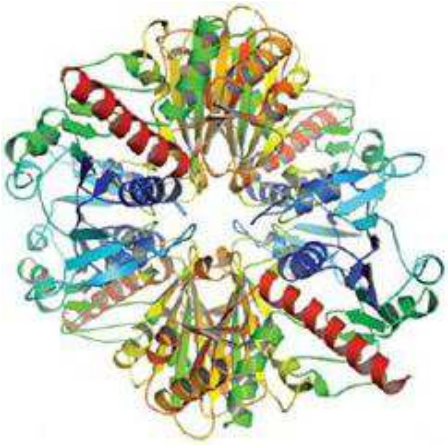


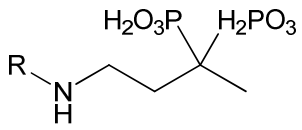
Figura 24: Estrutura da GADPH (cod. PDB 1K3T).
Fonte: http://www.pdb.org

Esses valiosos dados mostram o aspecto promissor dessa abordagem e justificam a busca de novos compostos anti-*T. cruzi* liberadores de NO (SILVA et al., 2007, 2010; GUEDES et al., 2010; SERAFIM et al., 2012; BENITEZ et al., 2014).

1.2.2.5. Compostos com mecanismos diferenciados

O aumento no conhecimento da biologia básica do *T. cruzi* é de grande importância para a inovação nas abordagens do tratamento da doença de Chagas (GARZOLI et al., 2004).

Derivados dos ácidos bifosfônicos (*Figura 25*) e pirofosfônicos podem ser úteis como nova via de ação para a eliminação do tripanossoma, uma vez que o parasita contém uma organela denominada acidocalcissoma. Esta, com a inibição da enzima difosfato de farnesila sintase por esses derivados, acumula minerais no interior do parasita, deixando-o inativo. Estudos também demonstram a eficácia de fármacos utilizados para regular distúrbios na reabsorção óssea, por exemplo, risidronato e alendronato, inibindo a enzima pirofosfato sintase (GARZONI et al., 2004; CASTRO et al., 2004; SZAJNMAN et al., 2008).



R= *n*-hexila ou *n*-octila

Figura 25: Derivados do ácido bifosfônico.

Outro alvo no tratamento é a enzima chave hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT), uma vez que o *T. cruzi* não realiza a biossíntese *de novo* das purinas. O alopurinol é um fármaco normalmente utilizado no tratamento da gota, que atua inibindo esta enzima, impedindo que o parasita incorpore as bases púricas ao seu DNA (URBINA, DOCAMPO, 2003).

É importante ressaltar o fato de as formas amastigotas do *T. cruzi* serem ATP-dependentes. Dessa forma, através da via glicolítica pode-se inativar a GADPH por meio de diversos compostos, entre eles, os derivados do ácido anacárdico reduzido (*Figura 26*), por exemplo, diminuindo o fornecimento de energia ao parasita (PEREIRA et al., 2008; FREILE-DE-LIMA et al., 2015; PARIONA-LLANOS et al., 2015).

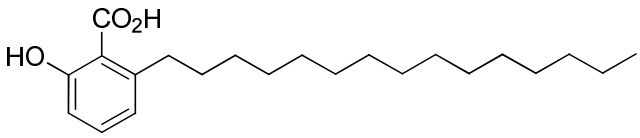


Figura 26: Estrutura química do derivado reduzido do ácido anarcádico reduzido.

Anidrase carbônica de *T. cruzi* (TcAC) tem, recentemente, emergido como um interessante alvo terapêutico. Compostos contendo grupos hidroxâmicos apresentam potencial de inibição dessa enzima, como é o caso do composto J (*Figura 27*), o qual apresentou resultados promissores de inibição enzimática perante a TcAC (K_i = 39,8 nM) e um valor de IC_{50} de 7 µM *in vivo*, além de baixa citotoxicidade em macrófagos (RODRIGUES et al., 2014; GUZEL-AKDEMIR et al., 2013).

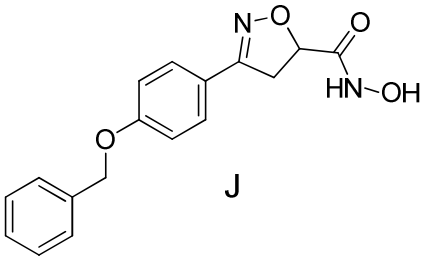


Figura 27: Estrutura química do derivado hidroxâmico inibidor de TcAC.

Produtos de origem natural, como por exemplo, a monalidina A (*Figura 28-K*) e seus derivados alcaloides extraídos da esponja marinha *Monanchora arbuscula* (coletada na costa sudeste do litoral brasileiro), foram ativos contra *T. cruzi*, mostrando a importância da biodiversidade no fornecimento de novos esqueletos moleculares para a química medicinal (SANTOS et al., 2015). Derivados sintéticos da classe dos *N`,N`*-esquaramida (*Figura 28-L*), ativos contra *T. cruzi*, também apresentam um padrão molecular diferenciado, o qual necessita ser mais explorado tanto a relação entre a estrutura química e sua atividade biológica, quanto seu mecanismo de ação ao nível molecular (OLMO et al., 2014).

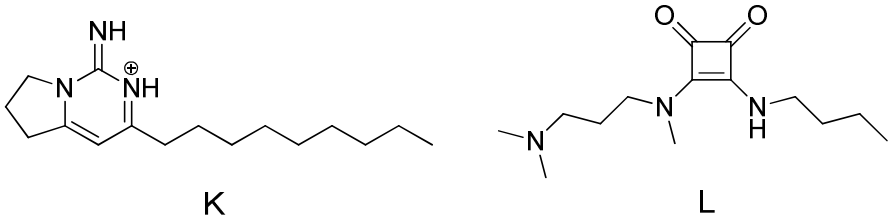


Figura 28: Estrutura química da monalidina A e do derivado *N`,N`*-esquaramida.

Além desses alvos, a nanotecnologia também se constitui, atualmente, em importante ferramenta para otimizar propriedades farmacêuticas e farmacocinéticas de fármacos já existentes e de compostos ativos em estudos (ROMERO; MORILLA, 2010).

1.3. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA MODIFICAÇÃO MOLECULAR

A modificação molecular consiste em metodologia eficiente para a busca de novos compostos biologicamente ativos, facilitada pelo aprimoramento da síntese orgânica ao longo dos tempos (KOROLKOVAS, 1988; BARREIRO; FRAGA, 2015; PATRICK, 2013; WERMUTH, 2015).

Neste processo, utiliza-se uma estrutura química com suas características físico-químicas e biológicas bem elucidadas como composto protótipo para a obtenção de entidades análogas, homólogas ou congêneres ao composto inicial, podendo ter acesso a produtos com características farmacodinâmicas e/ou farmacocinéticas mais qualificadas (BARREIRO; FRAGA, 2015; PATRICK, 2013; WERMUTH, 2015).

Dentre os processos de maior relevância utilizados na modificação molecular, a latenciação, o bioisosterismo e a hibridação molecular estão entre os mais utilizados (BARREIRO; FRAGA, 2015; PATRICK, 2013; WERMUTH, 2015; JORNADA et al., 2016).

1.3.1. BIOISOSTERISMO

A primeira definição de compostos isósteros foi expressa por Langmuir, em 1919, que os considerou como grupos de átomos ou moléculas orgânicas e inorgânicas contendo o mesmo número e/ou arranjo eletrônico, caracterizando-se por possuírem semelhanças em suas propriedades físicas (KIER, HALL, 2004; LIMA, BARREIRO, 2005; CIAPETTI, GIETHLEN, 2015).

Posteriormente, Erlenmeyer propôs um conceito mais abrangente, no qual ele definiu isósteros como sendo átomos, moléculas ou íons, os quais apresentam o mesmo número de elétrons na camada de valência. De maneira conceitual, atualmente podem-se definir como isósteros os grupamentos que apresentam semelhança nas camadas eletrônicas mais externas ou, mais amplamente, moléculas de tamanho e conformação semelhantes, que contenham grupos com regiões de densidade eletrônica análogas. Isósteros são classificados em clássicos: apresentam igualdade na camada de valência, abrangidos pela definição de Erlenmeyer e pela regra de hidreto de Grimm; e não-clássicos: átomos, grupo de átomos ou compostos com disposição estérica

e configuração eletrônica semelhantes àqueles dos quais se originam (LIMA; BARREIRO, 2005; BARREIRO; FRAGA, 2015; WERMUTH, 2015).

Exemplos de isósteros monovalentes clássicos são o fenol e a anilina (*Figura 29*), em que a simples substituição do grupamento fenólico por um grupamento amino confere expressiva alteração no pKa, sendo previstas, assim, reatividade e propriedades farmacocinéticas distintas para estes compostos isósteros (BARREIRO; FRAGA, 2015; CIAPETTI; GIETHLEN, 2015).

Silício pode ser um substituto isostérico de um carbono sp^3, pois ambos são átomos tetravalentes (*Figura 29*). Similaridades químicas são esperadas entre estes átomos, porém, existem diversos aspectos nos quais eles são substancialmente diferentes. As ligações químicas do silício apresentam comprimento maior do que as do carbono (1,87 e 1,54 Å, respectivamente). Tal característica pode interferir no tamanho e na forma dos compostos que contêm silício ao invés do carbono. Outra diferença é que o silício é um átomo mais eletropositivo, levando a diferenças consideráveis na polarização das ligações químicas dos átomos adjacentes. Ademais, pode influenciar diretamente em características como acidez e interferir em possíveis ligações de hidrogênio formadas (SHOWELL; MILLS, 2003).

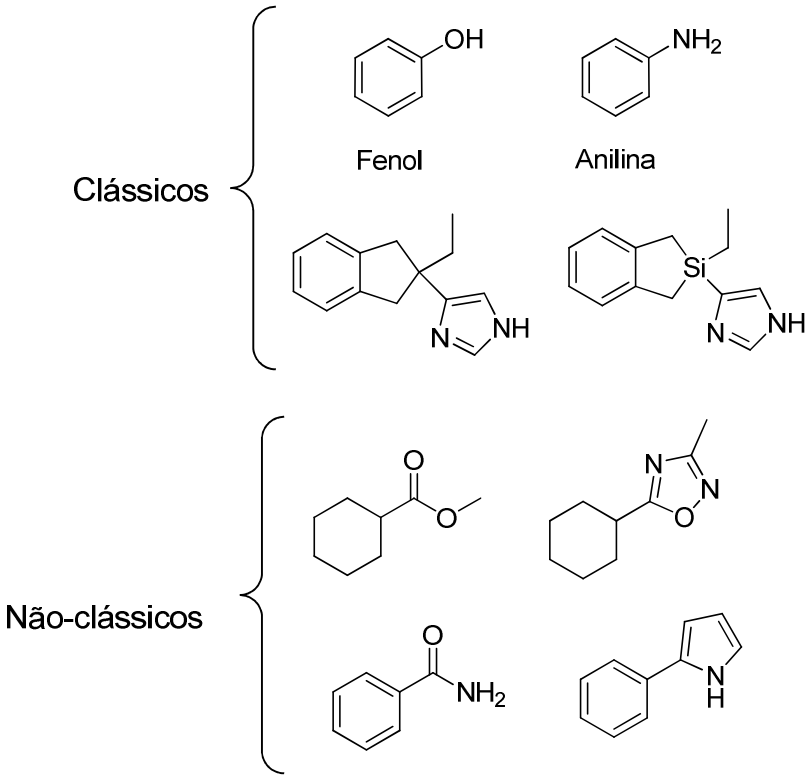


Figura 29: Estrutura de bioisósteros clássicos e não-clássicos.

O termo bioisóstero foi introduzido inicialmente por Friedman para denominar compostos que preenchem inteiramente o conceito de isosterismo e tenham o mesmo tipo de atividade biológica, sendo ela agonista ou antagônica em um mesmo sítio receptor. Atualmente, o termo bioisosterismo se tornou bem abrangente, podendo ser definido como compostos ou subunidades estruturais de derivados bioativos que apresentem volumes moleculares, formas, distribuições eletrônicas ou propriedades físico-químicas semelhantes, capazes de apresentar propriedades biológicas similares, agonistas ou antagônicas (LIMA; BARREIRO, 2005; CIAPETTI; GIETHLEN, 2015; BARREIRO; FRAGA, 2015).

A descoberta do dicloroisoproterenol (*Figura 30-M*) a partir do isoproterenol (*Figura 30-N*) foi de suma importância para o desenvolvimento do bioisosterismo na gênese de novos fármacos (LIMA; BARREIRO, 2005).

Figura 30: Compostos bioisostéricos: dicloroisoproterenol (M) e isoproterenol (N).

A substituição do grupo catecólico pelos átomos de cloro fez com que o bioisóstero dicloroisoproterenol, além de maior meia-vida, resultasse em propriedades antagônicas ao receptor β1-adrenérgico. Evidenciou-se, assim, a importância do grupamento catecólico para a ação biológica agonista do isoproterenol. Essa foi, também, a base para a síntese do antagonista adrenérgico inespecífico, o propranolol (*Figura 31-O*), considerado, à época, inovação na terapêutica na área de anti-hipertensivos (LIMA; BARREIRO, 2005). Rombouts e colaboradores (2015) sintetizaram uma série de bioisósteros do propranolol, substituindo o anel naftaleno por um anel benzazaborinina (*Figura 31-P*), melhorando a interação com o respectivo receptor adrenérgico (pIC_{50} = 7,3 e pIC_{50} = 6,3, respectivamente).

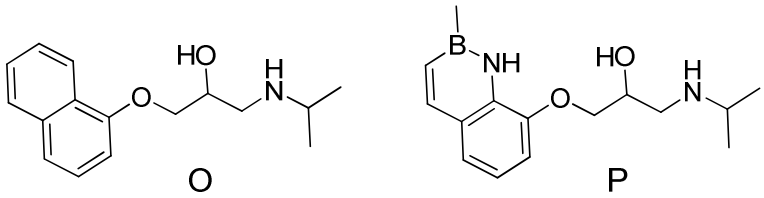


Figura 31: Estrutura química do propranolol e do seu bioisóstero contendo benzazaborinina.

Outro exemplo, este de bioisosterismo não-clássico, consiste no antagonista gonadotropínico. As moléculas a seguir (*Figura 32*) diferem apenas pela substituição do grupamento fenólico (*Figura 32-Q*) pelo grupo metilsulfonamida (*Figura 32-R*), tendo este último atividade quatro vezes superior em relação ao seu bioisóstero fenólico (BARREIRO; FRAGA, 2015).

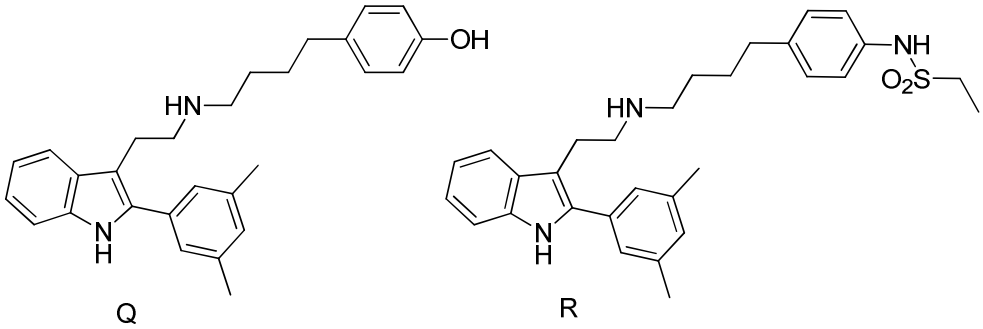


Figura 32: Bioisosterismo não-clássico entre o derivado fenólico e o derivado sulfonamídico.

Na segunda geração dos fármacos bloqueadores de receptores de angiotensina II, houve a substituição do ácido carboxílico pelo anel tetrazol (*Figura 33*). Dessa forma, a propriedade ácida foi mantida, o que é importante para a formação da carga negativa, a qual irá interagir através de ligação iônica com o receptor. Ademais, devido à maior estabilidade metabólica e lipofilicidade do grupo tetrazol, houve aumento significativo na meia-vida e na biodisponibilidade por via oral desses novos fármacos (LEMKE et al., 2013; PEGKLIDOU et al., 2010).

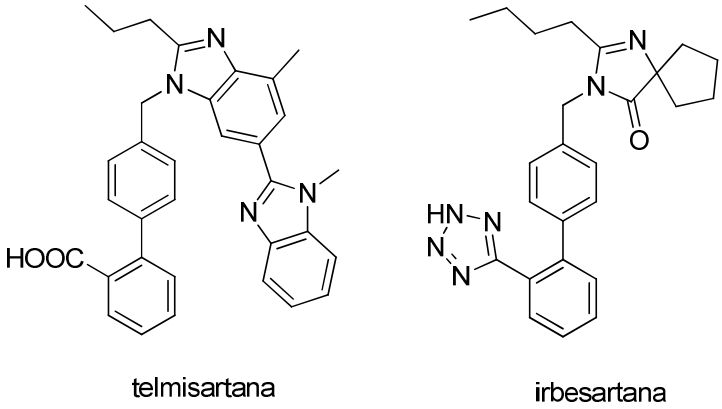


Figura 33: Bioisósteros bloqueadores de receptores de angiotensina II.

No planejamento de novos antibacterianos inibidores de β-lactamase, o bioisosterismo tem sido recentemente utilizado no grupo farmacofórico dos β-lactâmicos. A substituição desse anel por derivados contendo ácido borônico (*Figura 34*) gerou compostos com reatividade similar perante a enzima alvo, sendo, ainda, compostos sinteticamente mais vantajosos em comparação aos inibidores presentes atualmente na clínica (CASELI et al., 2015).

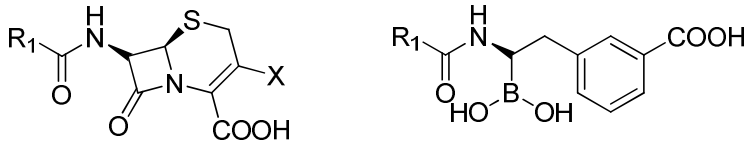


Figura 34: Esqueleto geral dos bioisósteros inibidores de β-lactamase.

Os princípios de bioisosterismo são amplamente utilizados na estratégia de modificação molecular de compostos com atividades biológicas previamente bem estudadas, com o intuito de obter moléculas com maior potência e menos efeitos colaterais. É um processo muito utilizado na concepção de antagonistas metabólicos de emprego geral em quimioterapia. Representa, deste modo, abordagem eficaz para o planejamento de novos fármacos (LIMA, BARREIRO, 2005; CIAPETTI, GIETHLEN, 2015; BARREIRO, FRAGA, 2015).

1.3.2. HIBRIDAÇÃO MOLECULAR

A técnica de hibridação molecular (HM) pode ser definida como a reunião de características estruturais, parciais, de dois compostos bioativos distintos, numa única nova estrutura, originando uma nova substância. Esta poderá apresentar a atividade de um dos padrões originais ou conjugar ambas as atividades em uma única molécula. Esta é uma das técnicas mais versáteis utilizadas na Química Medicinal (VIEGAS-JUNIOR et al. 2007; BARREIRO; FRAGA, 2015; FORTIN; BERUBE, 2013; BERUBE, 2016).

A versatilidade da HM pode ser visualizada através da tropisetrona (*Figura 35-S*), considerada um novo composto protótipo antagonista de receptores 5-HT_3, resultante da hibridação molecular entre a cocaína (*Figura 35-T*) e a serotonina (*Figura 35-U*), com elevada ação anti-emética (BARREIRO; FRAGA, 2015).

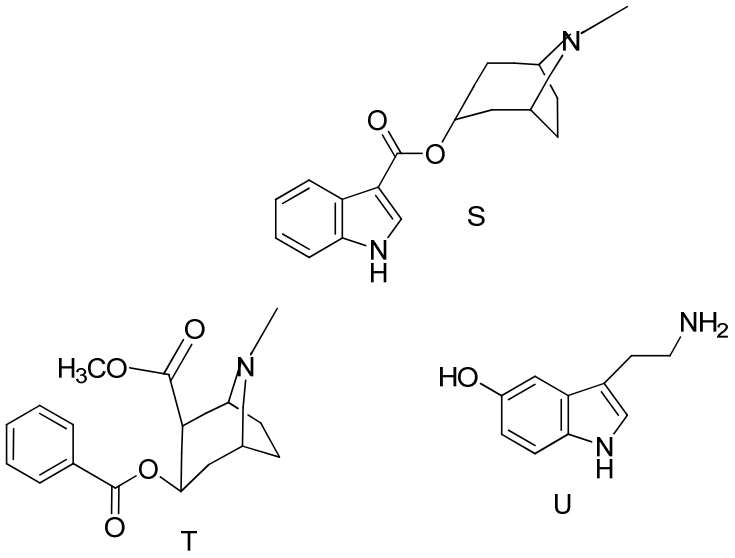


Figura 35: Tropisetrona (S), cocaína (T) e serotonina (U).

Em alguns casos, a HM é utilizada com o intuito de obter compostos com menos efeitos colaterais indesejáveis, podendo, também, originar fármacos que tenham ação dupla, sinérgica, em distintos sítios ativos. Constitui-se, assim, em estratégia promissora para patologias que envolvem diversos mecanismos fisiopatológicos (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

A HM, utilizada para obter compostos com ação mista, é exemplificada na *Figura 36,* em que a estrutura híbrida da prazosina com o anel furoxano contém propriedades vasodilatadoras aumentadas, devido à ação antagônica nos receptores α-adrenérgicos e por promover liberação de NO, obtendo, assim, atividade farmacológica potencializada (FRUTERRO et al., 1995).

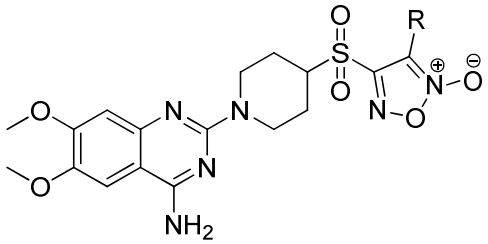


Figura 36: Composto híbrido contendo estrutura da prazosina e o anel furoxano.

Outro exemplo consiste no composto NCX4016 (*Figura 37*), que apresenta atividade anti-inflamatória. Ressalte-se que ocorre diminuição dos efeitos gástricos indesejáveis em relação aos anti-inflamatórios não esteroides

(AINES), que são usualmente utilizados na clínica. O NCX4016 é o resultado da hibridação molecular do ácido acetilsalicílico com o grupamento éster nitrato liberador de NO, o qual é responsável pela proteção da mucosa gástrica (TURNBULL et al., 2006).

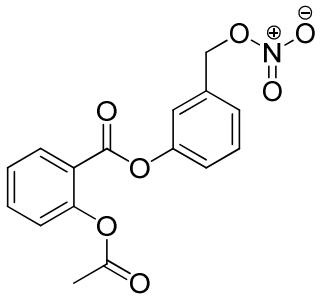


Figura 37: NCX4016, híbrido que apresenta menores efeitos colaterais em relação ao seu protótipo.

Benzofuroxano é um interessante grupo farmacofórico heterocíclico, por ser uma estrutura que apresenta vasta atividade biológica e propriedades liberadoras de NO, além de apresentar boa estabilidade. A hibridação desse grupo com naftalimidas *N*-substituídas (*Figura 38*), a qual apresenta potencial de inibição da enzima topoisomerase II, deu origem a compostos com interessante atividade bactericida (CHUGUNOVA et al., 2015).

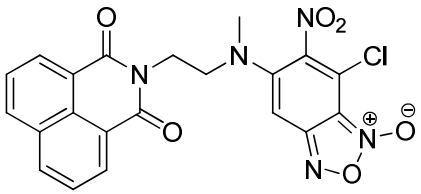


Figura 38: Híbrido do grupo benzofuroxano com naftalimidas *N*-substituídas.

Na revisão de Nepali e colaboradores (2014) diversos exemplos de abordagens e estratégias para a obtenção de compostos híbridos com atividade anticâncer podem ser observados, além da relação estrutura-atividade desses novos compostos.

Deste modo, observa-se a riqueza de variações estruturais nas moléculas protótipos que podem ser realizadas utilizando a técnica de HM, a qual, em diversas vezes, é empregada em associação com demais técnicas,

tais como, o bioisosterismo (VIEGAS-JUNIOR et al. 2007; BARREIRO; FRAGA, 2015; WERMUTH, 2015).

1.4. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS E A MODELAGEM MOLECULAR

O planejamento racional de novos fármacos é uma área interdisciplinar complexa, constituindo-se, atualmente, em um dos campos de maior desafio e evolução na ciência. As estratégias para a busca de moléculas com atividade biológica pode-se dividir, basicamente, em duas vertentes: baseada na estrutura do ligante bioativo (conhecido como LBDD, *Ligand Based Drug Design*) ou baseada na estrutura do receptor biológico (conhecido como SBDD, *Structure Based Drug Design*) (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

A modelagem molecular (MM) é a abordagem utilizada para a interpretação tridimensional "*in silico*" das moléculas e de suas propriedades físico-químicas, podendo ser aplicada em diferentes estágios no desenvolvimento de fármacos. Basicamente, compreende estágios precoces, com o intuito de diminuir a quantidade de possíveis ligantes e, no final, a etapa de otimização dos compostos-líderes, reduzindo tempo e gastos com ensaios experimentais (TAFT, DA SILVA, DA SILVA, 2008; PATRICK, 2013; BARREIRO; FRAGA, 2015; XIANG-QUN, 2008; LEMKE et al., 2013).

Através de estudos de *docking* (ou ancoragem molecular) podemos explorar o possível modo de interação entre os ligantes e seus alvos biomacromoleculares (Interação L-R). Pode-se, também, predizer a afinidade entre o L-R através de valores em kcal/mol ou função de *score*, dependendo do programa utilizado: Autodock ou Gold, por exemplo (LEACH, 2001; MORGON; COUTINHO, 2007).

Simulação de dinâmica molecular (DM) é uma das técnicas de modelagem molecular mais versátil e amplamente aplicada no planejamento de fármacos. DM é utilizada para a compreensão do comportamento dinâmico dos ligantes e das biomacromoléculas em diferentes escalas de tempo, sendo possível, também, estudar a influência de solvente explícito na estrutura proteica e parâmetros termodinâmicos como entalpia e entropia (ALONSO; BLIZNYUK; GREADY, 2006; MORGON; COUTINHO, 2007). Podem-se citar

alguns dos programas mais utilizados em DM: CHAMM, GROMACS, MOLSIM e NAMD (ALONSO; BLIZNYUK; GREADY, 2006).

2. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho é o planejamento, síntese, estudo do mecanismo de ação ao nível molecular e avaliação biológica de compostos com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, através das técnicas de bioisosterismo e hibridação molecular, originando compostos com mecanismos de ação distintos. Os objetivos específicos encontram-se nos Capítulos subsequentes.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREADY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev*., v. 26, p 531-568, 2006.

ALVES, R. M.; THOMAZ, R. P.; ALMEIDA, E. A.; WANDERLEY, J. S.; GUARIENTO, M. E. Chagas disease and ageing: the coexistence of other chronic diseases with Chagas disease in elderly patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*., v. 42, p. 622-628, 2009.

ANIS, R. J.; ANIS, R.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. *Lancet,* v. 375, p. 1388-1402, 2010.

ASCENZI, P; BOCEDI, A.; GENTILE, M.; VISCA, P.; GRADONI, L.; Inactivation of parasite cysteine proteinases by the NO-donor 4-(phenylsulfonyl)-3-((2-(dimethylamino)ethyl)thio)-furoxan oxalate. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1703, p. 69-77, 2004.

AVELAR, L. A. A.; CAMILO, C. D.; ALBUQUERQUE, S.; FERNANDES, W. B.; GONÇALEZ, C.; KENNY, P. W.; LEITÃO, A.; MCKERROW, J. H.; MONTANARI, C. A.; OROZCO, E. V. M.; RIBEIRO, J. F. R.; ROCHA, J. R.; ROSINI, F.; SAIDEL, M. E. Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. *Plos Negl. Trop. Dis*., v. 14, p. 1-24, 2015.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química medicinal:* as bases moleculares da ação dos fármacos, Porto Alegre: Artmed, 3 ed., 2015. p. 171-223, 347-401, 407-442, 231-252.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. A química medicinal de *N*-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e antitrombóticos. *Quím. Nova*, v. 25, p. 129-148, 2002.

BASTOS, T. M.; BARBOSA, M. I. F.; SILVA, M. M.; JUNIOR, J. W.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; ELLENA, J.; MOREIRA, D. R. M.; BATISTA, A. A.; SOARES, M. B. P. Nitro/nitrosyl-ruthenium complexes are potente and selective anti*Trypanosoma cruzi* agents causing autophagy and necrotic parasite death. *Antimicrob. Agents Chemother*., v. 58, p. 6044-6055, 2014.

BENITEZ, D.; CASANOVA, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M. Initial studies on mechanism of action and cell death of active N-oxide-containing heterocycles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *in vitro*. *Parasitol*., v. 141, p. 682-696, 2014.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop*., v. 156, p. 1-16, 2016.

BERUBE, G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov*., v. 12, p. 1-25, 2016.

BORCHHARDT, M. D.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA, L. D.; NUNES, R. J.; OLIVA, G.; YUNES, R. A.; ANDRICOPULO, A. D. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. *J. Braz. Chem. Soc*., v. 21, p. 142-150, 2010.

BRAK, K.; KERR, I. D.; BARRETT, K. T.; FUCHI, N.; DEBNATH, M.; ANG, K.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, DOYLE, P. S.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. *J. Med. Chem*., v. 53, p. 1763-1773, 2010.

BRESCHI, M. C.; CALDERONE, V.; DIGIACOMO, M.; MARTELLI, A.; MARTINOTTI, E.; MINUTOLO, F.; RAPPOSELLI, S.; BALSAMO, A. NO-sartans: A new class of pharmacodynamic hybrids as cardiovascular drugs. *J. Med. Chem*., v. 47, p. 5597-5600, 2004.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. *Int. Immunopharmacol*., v 1, p. 1457-1467, 2001.

BUCKNER, F.S.; BAHIA, M.T.; SURVADEVARA, P.K.; WHITE, K.L.; SHACKEFORD, D.M.; CHENNAMANEMI, N.K.; HULVERSON, M.A.; LAYDBAK, J.U.; CHATELAIN, E.; SCANDALE, I.; VERLINDE, C.L.; CHARMAN, S.A.; LEPESHEVA G.I.; GELB, M.H. Pharmacological characterization, structural studies, and in vivo activities of anti-Chagas disease lead compounds derived from tipifarnib. *Antimicrob. Agents Chemother*., v. 56,p. 4914-4921, 2012.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L. M. J.; FLAMME, A. C. L.; VOORHIS, W. C. V. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob. Agents Chemother*., v. 40, p. 2592-2597, 1996.

CALVET, C. M.; VIEIRA, D. F.; CHOI, J. Y.; KELLAR, D.; CAMERON, M. D.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; GUT, J.; JOHNSTON, J. B.; LIN, L.; KHAN, S.; MCKERROW, J. H.; ROUSH, W. R.; PODUST, L. M. 4-aminopyridyl-based CYP51 inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* drug leads with improved pharmacokinetic profile and *in vivo* potency. *J. Med. Chem*., v. 57, p. 6989-7005, 2014.

CASELI, E.; ROMAGNOLI, C.; VAHABI, R.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R. A.; PRATI, F. Click chemistry in lead optimization of boronic acids as β-lactamase inhibitors. *J. Med. Chem*., v. 58, p. 5445-5458, 2015.

CASTRO, L. F.; SILVA, A. T. A.; MAN-CHIN, C.; FERREIRA, A. G.; FERRAIRA, E. I. Bifosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. *Quim. Nova*, v. 27, p. 456-460, 2004.

CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Med. Chem. Rev.,* v. 2, p. 495-504, 2005.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J. Biomol. Screen*., v. 20, p. 22-35, 2015.

CHOI, J. Y.; PODUST, L. M.; ROUSH, W. R.; Drug strategies targeting CYP51 in neglected diseases. *Chem. Rev*., v. 114, p. 11242-11271, 2014.

CHOI, J. Y.; CALVET, C. M.; GUNATILLEKE, S. S.; RUIZ, C.; CAMERON, M. D.; MCKERROW, J. H.; PODUST, L. M.; ROUSH, W. R. Rational development of 4-aminopyridyl-based inhibitors targeting *Trypanosoma cruzi* CYP51 as anti-Chagas agents. *J. Med. Chem*., v. 56, p. 7651-7668, 2013.

CHUGUNOVA, E.; MUKHAMATDINOVA, R.; SAZYKINA, M.; DOBRYNIN A.; SAZYKIN I.; KARPENKO, MIRINA, E.; ZHURAVLEVA, M.; GAVRILOV, N.; KARCHAVA, S.; BURILOV, A. Synthesis of new `hybrid` compounds based on benzofuroxans and aminoalkylnaphthalimides. *Chem. Biol. Drug Des*., v. 17, p. 1-9, 2015.

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

CIAPETTI, P; GIELTHEN, B. Molecular variations based on isosteric replacements. In: WERMUTH, C. G. *The practice of medicinal chemistry*, London: Academic Press, ed. 4, 2015. p.290-342.

COLASANTI, M.; SALVATI, L.; VENTURINI, G.; ASCENZI, P.; GRADONI, L. Cysteine protease as a target for nitric oxide in parasitic organisms. *Trends Parasitol*., v. 17, p. 575, 2001.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – A comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 110, p. 277-282, 2015.

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

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

DOHERTY, D. *Molsim*: *software* de mecânica molecular e simulações de dinâmica – guia do usuário, versão 3.2. Lake Forest: The Chem21 Group Inc., 1997, CD-Rom.

DOMINGUES, C. S.; HARDOIM, D. J.; SOUZA, C. S. F.; CARDOSO, F. O.; MENDES, V. G.; PREVITALLI-SILVA, H.; ABREU-SILVA, A. L.; MACHADO, M. P.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S. Oral outbreak of Chagas disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental evaluation of a patient´s strain. *Plos One*, v. 15, 2015.

DURRANT, J. D.; KERANEN, H.; WILSON, B. A.; MCCAMMON, J. A. Computational identification of uncharacterized cruzain binding sites. *Plos Negl. Trop. Dis*., v. 11, p. e676, 2010.

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

FAURO, R.; LOPRESTI, S.; BAZAN, C.; BAEZ, A.; STRAUSS, M.; TRIQUELL, F.; CREMONEZZI, D.; NEGRETE, O.S.; WILLHUBER, G.C.; PAGLINI-OLIVA, P.; RIVAROLA, H.W. Use of clomipramine as chemotherapy of the chronic phase of Chagas disease. *Parasitology*, v. 140, p. 917-927, 2013.

FERREIRA, R. S.; DESSOY, M. A.; PAULI, I.; SOUZA, M. L.; KROGH, R.; SALES, A. I. L.; OLIVA, G.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of potent noncovalent and nonpeptidic cruzain inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *J. Med. Chem*., v. 57, p. 2380-2392, 2014.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. *Quim. Nova*, v. 34, p. 1770-1778, 2011.

FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. J. The anti-*Trypanosoma cruzi* activity of Posaconazole in a murine model of acute Chagas`disease is less dependent on gamma interferon than that of Benznidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, p. 1359-1364, 2007.

FORTIN, S.; BERUBE, G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin. Drug Discov*., v. 8, p. 1029-1047, 2013.

FREILE-DE-LIMA, L.; FONSECA, L. M.; OELTMANN, T.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J.O. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence fator: Three decades of studies. *Glycobiology*, v. 25, p. 1142-1149, 2015.

FRIGGERI, L.; HARGROVE, T. Y.; RACHAKONDA, G.; WILLIANS, A. D.; WAWRZAK, Z.; SANTO, R. D.; VITA, D. D.; WATERMAN, M. R.; TORTORELLA, S.; VILLALTA, F.; LEPESHEVA, G. Structural basis for rational design of inhibitors targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14α-demethylase: two regions of the enzyme molecule potentiate its inhibition. *J. Med. Chem*., v. 57, p. 6704-6717, 2014.

FRUTTERO, R.; BOSCHI, D.; STILO, A.; GASCO, A. The furoxan system as a useful tool for balancing “hybrids” with mixed α1-antagonist and NO-like vasodilator activities. *J. Med. Chem*., v. 38, p. 4944-4949, 1995.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*., v. 115, p. 22-27, 2010.

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

GOLÇALVES, J. E.; FERNANDES, M. B.; CHIANN, C.; GAI, M. N.; SOUZA, J.; STORPITIS, S. Effect of pH, mucin and bovine sérum on rifampicin permeability through Caco-2-cells. *Biopharm. Drug Dispos*., 33, p. 316-323, 2012.

GUEDES, P. M. M.; OLIVEIRA, F. S.; GUTIERREZ, F. R. S.; SILVA G. K.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M.; FRANCO, D. W.; MATTAS, M. A. V; ZAMBONI, D. S.; SILVA, R. S.; SILVA, J. S. Nitric oxide donor *trans*-$[RuCl([15]aneN_4)NO]_2$ as a possible therapeutic approach for Chagas` disease. *Br. J. Pharmacol*., v. 160, p. 258-269, 2010.

GUZEL-AKDEMIR, O.; AKDEMIR, A.; PAN, P.; VERMELHO, A. B.; PARKKILA, S.; SCOZZAFAVA, A.; CAPASSO, C.; SUPURAN, C. T. A class of sulfonamides with strong inhibitory action against the α-carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem*., v. 56, p. 5773-5781, 2013.

HOTEZ, P. J.; GURWITH, M. Europe`s neglected infections of poverty. *Int. J. Infect. Dis*., v. 15, p. e611-e619, 2011.

HUANG, L.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Crystal strutures of reversible ketone-based inhibitors of the cysteine protease cruzain. *Bioorg. Med. Chem*., v. 11, p. 21-29, 2003.

JORNADA, D. H.; FERNANDES, G. F. S.; CHIBA, D. F.; MELO, T. R. F.; SANTOS, J. L.; CHUNG, M .C. The prodrug approach: a successful tool for improving drug solubility. *Molecules*, v. 21, p. 1-31, 2016.

KIER, L. B.; HALL, L. H. Bioisosterism: quantitation of structure and properties effects. *Chem. Biod*., p. 138-151, 2004.

KERR, I. D.; LEE, J. H.; FARADY, C. J.; MARION, R.; RICKERT, M.; SAJID, M.; PANDEY, K. C.; CAFFREY, C. R.; LEGAC, J.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; ROSENTHAL, P. J.; BRINEN, L. S. Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J. Biol. Chem*., v. 284, p. 25697-25703, 2009.

KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*, New York: Wiley-Interscience, 1988.

KRAUS, J. M.; TATIPAKA, H. B.; MCGUFFIN, S. A.; CHENNAMANENI, N. K.; KARIMI, M; ARIF, J.; VERLINDE, C. L. M. J.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H. Second generation analogues of the cancer drug clinical candidate tipifarnib for anti-Chagas disease drug discovery. *J. Med. Chem*., v. 53, p. 3887-3898, 2010.

KROPF, S. P. Ciência, saúde e desenvolvimento: a doença de Chagas no Brasil (1943-1962). *Tempo*, n.19, p. 107-124, 2005.

LEACH, A. R. *Molecular modeling: principles and applications.* Dorchester: Pearson Education Limited, 2 ed., 2001, p. 661-668.

LEMKE, T. L.; WILLIANS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. *Foye´s principles of medicinal chemistry*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 7 ed., 2013, p. 761-764.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.*, v. 12, p. 23-49, 2005.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas heart disease: an update. *Am. J. Med*., v. 128, p. 1251e7-1251e9, 2015.

MARTINEZ-MAYORGA, K.; BYLER, K. G.; REMIREZ-HERNANDEZ, A. I.; TERRAZAS-ALVARES, D. E. Cruzain inhibitors: effort made, current leads and a structural outlook of new hits. *Drug Discov Today*, v. 20, p. 890-898, 2015.

MORAES, C. B.; GIARDINI, M. A.; KIM, H.; FRANCO, C. H.; ARAUJO-JUNIOR, A. M.; SCHENKMAN, S.; CHATELAIN, E.; FREITAS-JUNIOR, L.H. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci. Rep*., v. 4. p. 1-11, 2014.

MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Curr. Drugs Targets*, v. 10, p. 212-231, 2009.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. São Paulo: Livraria da física, 1 ed., 2007.

NDAO, M.; BEAULIEU, C.; BLACK, W. C.; ISABEL, E.; VASQUEZ-CAMARGO, F.; NATH-CHOWDHURY, M.; MASSE, F.; MELLON, C.; METHOT, N.; NICOLL-GRIFFITH, D. A. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. *Antimicrob. Agents Chemother*., v. 58, p. 1167-1178, 2014.

NEITZ, R. J.; BRYANT, C.; CHEN, S.; GUT, J.; CASELLI, E. H.; PONCE, S.; CHOWDHURY, S.; XU, H.; ARKIN, M. R.; ELLMAN, J. A.; RENSLO, A. R. Tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors with improved pharmacokinetic properties as therapeutic leads for Chagas disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett*., v. 25, 2015.

NEPALI, K.; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P. M. S.; DHAR, K. L. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur. J. Med. Chem*., v, 77, p. 422-487, 2014.

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana.* São Paulo: Atheneu, ed. 10, 2003, p. 73-96.

OLIVEIRA, R. D. DE; ZANI, C. L.; FERREIRA, R. S.; LEITE, R. S.; ALVES, T. M. A.; SILVA, T. H. A.; ROMANHA, A. J. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotiona redutase. *Quim. Nova*, v. 31, p. 261-267, 2008.

OLMO, F.; ROTGER, C.; RAMIREZ-MACIAS, I.; MARTINEZ, L.; MARTIN, C.; CARRERAS, L.; URBANOVA, K.; VEJA, M.; CHAVES-LEMAUR, G.; SAMPEDRO, A.; ROSALES, M. J.; SANCHEZ-MORENO, M.; COSTA, A. Synthesis and biological evaluation of *N,N`*-squaramides with high efficacy and low toxicity: toward a low-cost drug against Chagas disease. *J. Med. Chem*., v. 57, p. 987-999, 2014.

OSULLIVAN, M. O.; DURHAM, T. B.; VALDES, H. E.; DAUER, K. L.; KARNEY, N. J.; FORRESTEL, A. C.; BACCHI, C. J.; BAKER, J. F. *Bioorg. Med. Chem*., v. 23, p. 996-1010, 2015.

PARIONA-LLANOS, R.; PAVANI, R. S.; REIS, M.; NOEL, V.; SILBER, A. M.; ARMELIN, H. A.; CANO M. I. N.; ELIAS, M. C. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase telomere association correlates with redox status in *Trypanosoma cruzi*. *Plos One*, v. 16, p. 1-17, 2015.

PATRICK, G. L. Computers in medicinal chemistry. In: *An introduction to medicinal chemistry*, Oxford: University Press, ed. 5, 2013. p. 337-379.

PEGKLIDOU, K.; KOUKOULITSA, C.; NICOLAOU, I.; DEMOPOULOS, V. J. Design and synthesis of novel series of pyrrole based chemotypes and their evaluation as selective aldose reductase inhibitors. A case of bioisosterism between a carboxylic acid moiety and that of a tetrazole. *Bioorg. Med. Chem*., v. 18, p. 2107-2114, 2010.

PEREIRA, I. R.; VILAR-PEREIRA, G.; SILVA, A. A.; LANNES-VIEIRA, J. Severity of chronic experimental Chagas´ heart disease parallels tumor necrosis fator and nitric oxide levels in the sérum: models of mild and severe disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 109, p. 289-298, 2014.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas disease: Implications for global health. *Trends Parasitol*., 31, p 595-603, 2015.

PERSCH, E.; BRYSON, S.; TODOROFF, N. K.; EBERLE, C.; THELEMANN, J; DIRDJAJA, N.; KAISER, M.; WEBER, M.; DERBANI, H.; BRUN, R.; SCHNEIDER, G.; PAI, E. F.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; DIEDERICH, F. Binding to large enzyme pockets: small-molecule inhibitors of trypanothione reductase. *ChemMedChem*, v. 9, p. 1880-1891, 2014.

PONTES, V. M. O.; JÚNIOR, A. S. S.; CRUZ, F. M. T.; COELHO, H. L. L.; DIAS, A. T. N.; COÊLHO, I. C. B.; OLIVEIRA, M. F. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*., v. 43, p. 182-187, 2010.

PRESTI, M. S. L.; BAZAN, P. C.; STRAUSS, M.; BAEZ, A. L.; RIVAROLA, H. W.; PAGLINI-OLIVA, P. A. Trypanothione reductase inhibitors: overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. *Acta Trop*., v. 145, p. 79-87, 2015.

RAGAVENDRAN, J. V.; SRIRAM, D.; PATEL, S. K.; REDDY, I. V.; BHARATHWAJAN, N.; STABLES, J.; YOGEESWARI, P. Design and synthesis of anticonvulsants from a combined phthalimide-GABA-anilide and hydrazone pharmacophore. *Eur. J. Med. Chem*., v. 42, p. 146-151, 2007.

RANDO, D. G.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, E. I. Chalcones and *N*-acylhydrazones: direct analogues? Exploratory data analysis applied to potential novel antileishmania agents. *Braz. J. Pharm. Sci*., v. 46, p. 311-321, 2010.

REQUENA-MENDEZ, A.; ALDASORO, E.; LAZZARINI, E.; SICURI, E.; BROWN, M.; MOORE, D. J.; GASCON, J.; MUNOZ, J. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Plos Negl. Trop. Dis*., v. 13, 2015.

REY, L. *Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001 p. 161-176.

RODRIGUES, G. C.; FEIJO, D. F.; BOZZA, M. T.; PAN, P.; VULLO, D.; PARKKILA, S.; SUPURAN, C. T.; CAPASSO, C.; AGUIAR, A. P.; VERMELHO, A. B. Design, synthesis, and evaluation of hydroxamic acid derivatives as promising agentes for the management of Chagas disease. *J. Med. Chem*., v. 57, p. 298-308, 2014.

ROMBOUTS, F. J. R.; TOVAR, F.; AUSTIN, N.; TRESADERN, G.; TRABANCO, A. A. Benzazeborinines as novel bioisisteric replacements of naphthalene: propranolol as an example. *J. Med. Chem*., v. 58, p. 9287-9295, 2015.

ROMEIRO, N. C.; AGUIRRE, G.; HERNANDEZ, P.; GONZALEZ, M.; CERECETTO, H.; ALDANA, I.; PEREZ-SILANES, S.; MONGE, A.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinaxoline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. *Bioorg. Med. Chem*., v. 17, p. 641-652, 2009.

RITTER, O.; WILLIAMS, T.; ERTL, G.; ZOLLER, T.; STICH, A.; RITTER, O. Epidemiology of chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin. Res. Cardiol*., [*Epub ahead of print*], 2013.

SANTOS, M. F. C.; HARPER, P. M.; WILLIANS, D. E.; MESQUITA, J. T.; PINTO, E. G.; COSTA-SILVA, T. A.; HAJDU, E.; FERREIRA, A. G.; SANTOS, R. A.; MURPHY, P. J.; ANDERSON, R. J.; TEMPONE, A. G.; BERLINCK, R. G. S. Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora arbuscula*. *J. Nat. Prod*., v. 78, p. 1101-1112, 2015.

SERAFIM, R. A. M.; PRIMI, M. C.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I. Nitric oxide: state of the art in drug design. *Curr. Med. Chem*., v. 19, p. 385-405, 2012.

SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; SILVA, M. C.; SANTOS, M.; SILVA, G. K.; MILANEZI, C.; SILVA, R. S.; SILVA, J. Ruthenium complex with benznidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of Chagas disease. *Plos Negl. Trop. Dis*., v. 8, p. 1-7, 2014.

SHOWELL, G. A.; MILLS, S. Chemistry challeges in lead optimization: silicon isosteres in drug discovery. *Drug Discov. Today*, v. 8, p. 551-556, 2003.

SILVA, R. R.; MARIANTE, R. M.; SILVA, A. A.; SANTOS, A. L. B.; ROFFE, E.; SANTIAGO, H.; GAZZINELLI, R. T.; LANNES-VIEIRA, J. Interferon-gamma promotes infection of astrocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Plos One*, v. 19, p. 1-23, 2015.

SILVA, J. J. N.; GUEDES, P. M. M.; ZOTTIS, A.; BALLIANO, T. L.; SILVA, F. O. N.; LOPES, L. G. F.; ELLENA, J.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; FRANCO, D. W.; SILVA, J. S. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas`s disease: enzyme inhibition and *in vitro/in vivo* trypanocidal activity. *Br. J. Pharmacol*., v. 160, p. 260-269, 2010.

SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. *Br. J. Pharmacol.*, v. 152, p. 112-121, 2007.

SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GUIDO, R. V. C.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. Advances in prodrug design. *Mini-Rev. Med. Chem*., v. 5, p. 893-914, 2005.

SOARES, C.; DIAS, C. P.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. Nitric oxide affects trypomastigote to amastigote differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic. Biol. Med*., v. 75, p. S21, 2014.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 110, p. 289-298, 2015.

SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomastid drugs. *Interdiscip. Perspect Infect. Dis*., v. 2009, p. 1-19, 2009.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease estimates and challenges. *Global Heart*, v. 10, p. 139-144, 2015.

STRASEN, J.; WILLIANS, T.; ERTL, G.; ZOLLER, T.; STICH, A.; RITTER O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin. Res. Cardiol.*, v. 103, p. 1-10, 2014.

TAFT, C. A.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. Current topics in computer-aided drug design. *J. Pharm. Sci*., v. 97, p. 1089-1098, 2008.

TURNBULL, C. M.; CENA; FRUTTERO, R.; GASCO, A.; ROSSI, A. G.; MEGSON, I. L. Mechanism of action of novel NO-releasing furoxan derivates of aspirin in human platelets. *Br. J. Pharmacol*., v. 148, p. 517-526, 2006.

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

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*., v. 115, p. 55-68, 2010.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 311-318, 2009.

VENTURINI, G.; FIORAVANTI, E.; COLASANTI, M.; PERSICHINI, T.; ASCENZI, P. Cys25-nitrosylation inactives papain. Biochem. Mol. Biol. Int., v. 46, p. 425-428, 1998.

VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr. Med. Chem*., v. 14, p. 1829-1852, 2007.

VILLALTA, F.; DOBISH, M.C.; NDE, P.N.; KLESHCHENKO, Y.Y.; HARGROVE, T.Y.; JOHNSON, C.A.; WATERMAN, M.R.; JOHNSTON, J.N.; LEPESHEVA, G.I. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. *J. Infect. Dis*., v. 208, p. 504-511, 2013.

VOELKER, R. A. A century after Chagas disease discovery, hurdles to tackling the infection remain. *J. Am. Med. Ass*., v. 9, p. 1045-1047, 2009.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. *J. Cell. Mod. Med*., v. 13, p. 238-248, 2009.

WERMUTH, C. G.; ALDOUS, D.; RABOISSON, P.; ROGNAN, D. *The practice of medicinal chemistry.* San Diego: Elsevier Ltda. 4 ed., 2015, p.181-233.

WHO, World Health Organization. In: http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas/pdf/swg_chagas.pdf, 2007.

WHO, World Health Organization. In: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/, 2016.

WIGGERS, H.J.; ROCHA, J.R.; FERNANDES, W.R.; SESTI-COSTA R.; CARNEIRO, Z.A.; CHELESKI, J.; SILVA, A.B.; JULIANO, L.; CEZARI, M.H.; SILVA, J.S.; MCKERROW, J. H.; MONTANARI, C. A. Non-peptidic cruzain inhibitors with trypanocidal activity discovered by virtual screening and *in vitro* assay. *Plos Negl. Trop. Dis*., v. 7, p. e2370, 2013.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert. Rev. Mol. Med*., v. 11, p. 1-24, 2009.

CAPÍTULO 1

EM BUSCA DO COMPOSTO LÍDER...

1.1. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Como exposto anteriormente, a doença de Chagas é parasitose que acomete cerca de 6-7 milhões de pessoas e, ao menos, 75-90 milhões estão sob risco de adquirir a doença. Entretanto, mesmo com este cenário, apenas dois quimioterápicos (nifurtimox e benznidazol) estão disponíveis no mercado, sendo que, no Brasil, apenas o benznidazol é utilizado (ANIS; ANIS; MARIN-NETO, 2010; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2015; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015; STANAWAY; ROTH, 2015; WHO, 2016; MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015).

Este fato mostra a importância de se ampliar o número de fármacos disponíveis e propor quimioterapia mais eficaz para o tratamento da doença de Chagas. Assim, este projeto objetiva a síntese de compostos híbridos bioisostéricos *N*-acilidrazônicos (*Figura 1.1*), que apresentam potencial de interação com cisteíno-proteases parasitárias, tais como a cruzaína, contendo grupo liberador de óxido nítrico, o qual apresenta atividade inibitória perante essa classe enzimática (VENTURINI et al., 1998; COLASANTI et al., 2001; ROMEIRO et al., 2009). Nestes derivados, o liberador de óxido nítrico utilizado é o grupo furoxano, e, na porção acilidrazônica, aplicou-se o bioisosterismo, mediante variação de anéis aromáticos substituídos e não-substituídos, com intuito de avaliar a possível relação estrutura-atividade (REA) presente nesses análogos.

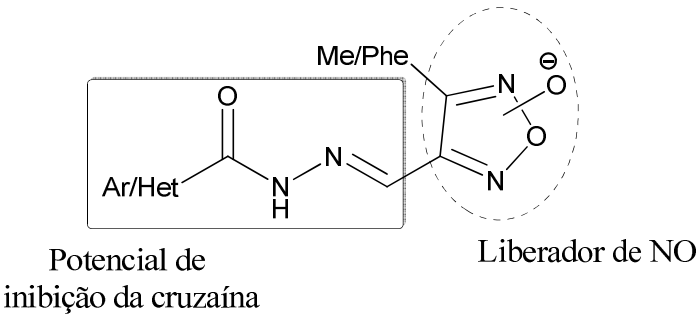


Figura 1.1: Esqueleto molecular geral dos derivados propostos

Esses compostos poderão atuar, dependendo do modo de ação, como análogos híbridos, devido à inclusão do liberador de óxido nítrico e hidrazona como grupos farmacofóricos. Por outro lado, nos compostos que contêm grupo nitro no anel aromático ou heteroaromático, estes poderão atuar, também,

como bioprecursores – formas latentes, não ligadas a transportadores, que são biotransformada à forma ativa (WERMUTH, 2015; SILVA et al., 2005; CHUNG et al., 2005) -, através da atuação de sistema redox.

1.2. METODOLOGIA

1.2.1. SÍNTESE

A síntese dos intermediários e dos compostos finais foi realizada durante o período de estágio sanduíche nacional (março a dezembro de 2012), no Laboratório de Química Orgânica Sintética (LQOS – IQ/UNICAMP) sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Carlos Dias.

As Figuras 1.2 e 1.3 mostram as rotas sintéticas utilizadas.

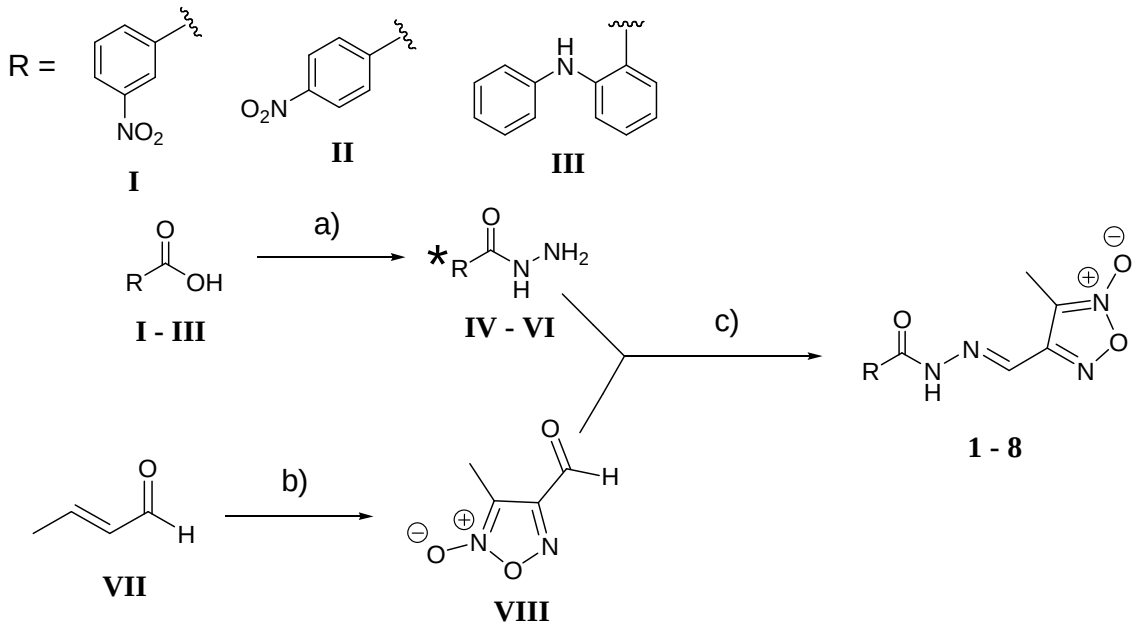


Figura 1.2: Rota sintética para obtenção dos derivados contendo metila como substituinte no anel furoxano. Condições reacionais: a) CH_3OH, H_2SO_4/refluxo; N_2H_4 80% aq/60 ºC; b) $NaNO_2$(aq), AcOH/14 ºC, 1 h; c) C_2H_5OH, H^+/refluxo. ***** Outras hidrazidas foram adquiridas comercialmente.

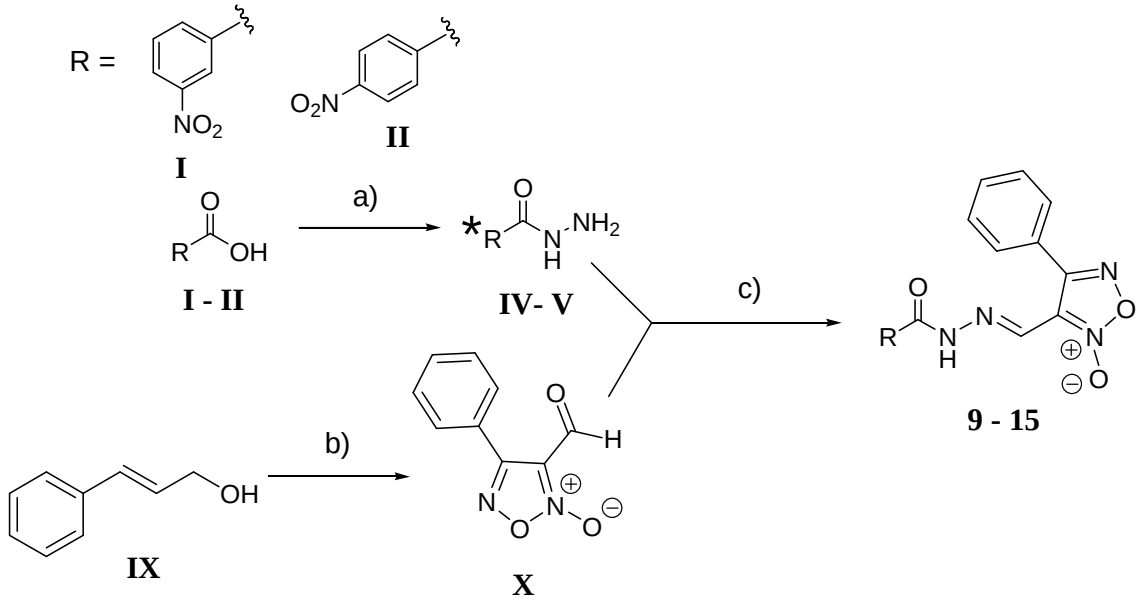
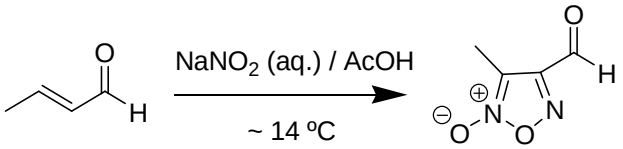


Figura 1.3: Rota sintética para obtenção dos derivados contendo fenila como substituinte no anel furoxano. Condições reacionais: a) CH_3OH, H_2SO_4/refluxo; N_2H_4 80% aq/60 ºC; b) $NaNO_2$(aq), AcOH/70 ºC, 1 h; CHCl2, MnO_2/t.a., 5 h; c) C_2H_5OH, H^+/refluxo. ***** Outras hidrazidas foram adquiridas comercialmente

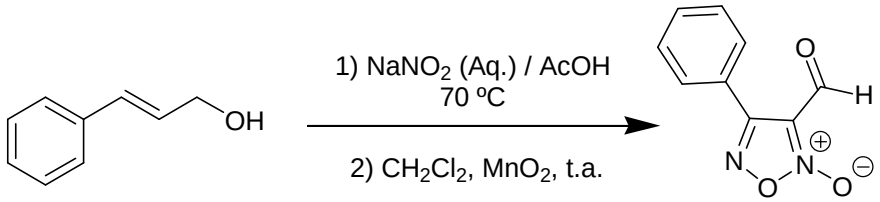
1.2.1.1. Síntese do intermediário 4-formil-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido



Esquema 1.I: Formação do furoxano contendo substituinte metílico.

Em solução de crotonaldeído (142 mmol), previamente destilado, em 20 mL de ácido acético glacial sob agitação a temperatura inferior a 14 °C, adicionou-se, lentamente, solução aquosa saturada de nitrito de sódio (497 mmol). A agitação foi mantida à temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida, adicionou-se água (200 mL) ao meio reacional e a extração foi realizada com diclorometano. A fase orgânica foi lavada com água e, na sequência, secada com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente sob pressão reduzida, o produto formado foi purificado por coluna cromatográfica, utilizando hexano/AcOEt (0-40%) como sistema eluente.

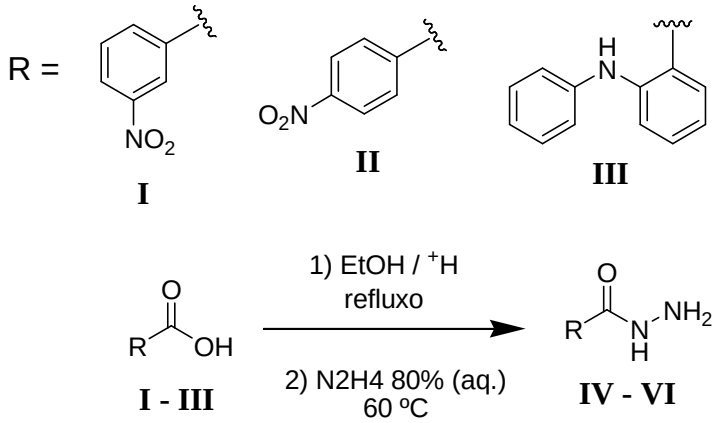
1.2.1.2. Síntese do intermediário 4-formil-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido



Esquema 1.II: Formação do furoxano contendo substituinte fenílico.

À solução de álcool cinâmico (40 mmol) em 8 mL de ácido acético, sob agitação em banho de gelo, adicionou-se, vagarosamente, durante aproximadamente 30 minutos, solução saturada de nitrito de sódio (120 mmol), sem deixar que a temperatura ultrapassasse os 70 °C. A agitação foi mantida por mais 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, o meio reacional foi diluído em 100 mL de água e realizada a extração com éter etílico. Lavou-se a fase orgânica com água, a qual foi, posteriormente, secada com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente sob pressão reduzida, o produto formado foi purificado por coluna cromatográfica, utilizando hexano/acetato de etila (0-40 %). Na sequência, o álcool obtido na etapa anterior (6,24 mmol) foi diluído em 65 mL de diclorometano. Adicionaram-se 7,48 g de MnO_2 e a mistura foi mantida sob agitação durante 5 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, o meio reacional foi filtrado com sílica-gel e, posteriormente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida.

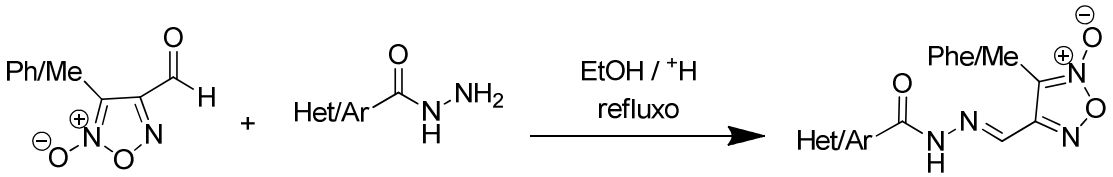
1.2.1.3. Procedimento geral para a síntese das hidrazidas intermediárias (IV – VI)



Esquema 1.III: Formação das hidrazidas intermediárias.

Primeiramente, os respectivos ácidos carboxílicos (10 mmol), em etanol anidro, foram refluxados, com catálise ácida (0,5 mL de H_2SO_4), até o total consumo do material de partida. Em seguida, o meio reacional foi resfriado até a temperatura ambiente e, na segunda parte da reação, *in situ*, adicionaram-se 10 mL da hidrazina hidratada (80%) e o sistema foi mantido sob vigorosa agitação, a 60 °C, por cerca de 4 horas. Após o consumo total do éster, o meio reacional foi resfriado e o precipitado formado foi filtrado e lavado com água e etanol a frio. A hidrazida IV (proveniente do reagente III) foi utilizada para a próxima etapa sem purificação prévia.

1.2.1.4. Procedimento geral para a síntese das *N*-acilidrazonas (1-15)



Esquema 2.IV: Formação das *N*-acilidrazonas

As hidrazidas utilizadas foram obtidas através de síntese (tópico 2.1.3.) ou comercialmente adquiridas. Manteve-se a reação de 1 mmol do aldeído (tópicos 2.1.1 / 2.1.2) com 1 mmol da respectiva hidrazida, com catálise ácida

(5 gotas de HCl), em etanol anidro (30 mL) como solvente, sob agitação e refluxo até o consumo total dos materiais de partida. Em seguida, após o resfriamento, o precipitado resultante foi filtrado e purificado através de lavagem com etanol e água a frio.

1.2.2. ANÁLISE

Os métodos de análise estão descritos no *ANEXO I*.

1.2.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA (ENSAIO *IN VITRO* CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*)

A avaliação dos compostos contra amastigotas foi realizada no Laboratório de Química Medicinal e Computacional (IFSC/USP-SC), sob a coordenação do Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo.

Mioblastos de músculo esquelético de rato foram cultivados em microplacas contendo 96 poços em 2000 (célula/placa)/100 mL, com o meio contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) e 2 mM de L-glutamina. Depois de 24 h, 5000 tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 contendo o gene da β-galactosidase (Lac-Z)) foram adicionados. Após 48 h, o meio foi removido dos poços e substituídos por 100 mL do meio fresco com ou sem a diluição do composto seriado. Sete diluições de três vezes foram usadas originando uma faixa de 0,123 para 90 mg/mL. As placas foram incubadas a 37 ºC em 5% de CO_2, durante 4 dias. Então, o substrato CPRG/Nonidet (50 µL foram adicionados em todos os poços). A cor da reação gerada durante as 2-6 horas seguintes foi lida fotometricamente em 540 nm. Através da curva sigmoide, os valores de IC50 foram calculados.

Segundo o mecanismo do ensaio, os parasitas viáveis presentes no meio reacional expressam a β-Gal, que, por sua vez, converte o substrato nos produtos D-galactose e vermelho de clorofenol. Desta forma, a atividade anti-*T. cruzi in vitro* foi determinada através de reação colorimétrica pela medida direta da absorbância do produto vermelho de clorofenol em 540 nm, que é linear com a concentração de parasitas no meio. Benznidazol foi o fármaco referência utilizado.

1.2.4. LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Os estudos de liberação de óxido nítrico foram realizados pelo Técnico Maurício dos Santos, no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – FBC/USP.

Os compostos foram diluídos em DMSO (1 mg em 200 µL) e analisados utilizando o aparelho Sievers® Nitrico Oxide Analyser (NOA 280). A análise foi realizada através do método indireto, ou seja, pela quantificação da formação do ânion nitrito (NO_2^-) gerado, o qual é um dos principais subprodutos de degradação do óxido nítrico (BRAMAN, HENDRIX, 1989).

1.2.5. ESTUDOS DE PERMEABILIDADE CELULAR

Os estudos de permeabilidade em células Caco-2 foram realizados pelo Dr. José Eduardo Gonçalves, de acordo com a metodologia descrita por Gonçalves e colaboradores (2012) e Souza (2009a), no Laboratório de Permeabilidade de Fármacos em Culturas Celulares (LPFCC) do Departamento de Farmácia da FCF/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Sílvia Storpirtis.

Consideram-se os resultados dos estudos de transporte transepitelial utilizando membranas formadas após 3 semanas de cultivo das células Caco-2. Previamente ao estudo de permeabilidade, as células foram lavadas com tampão Hank´s contendo 200 mM de sais de HEPES (tampão de permeabilidade), com pH ajustado para 7,4. As células foram mantidas com este tampão por 20 minutos a 37 ºC. Para avaliar a integridade da membrana efetuaram-se medidas da resistência elétrica transepitelial (TEER), bem como a quantificação de uma substância padrão de baixa (amoxicilina) e outra de alta permeabilidade (metoprolol). A resistência elétrica transepitelial (RET) foi medida em cada receptáculo. Consideraram-se aptas para o início do experimento as membranas que apresentaram valor de RET acima de 350 mΩ x cm^2.

Os experimentos foram iniciados com a adição de solução do composto em tampão de permeabilidade em concentração de 25 mM, a qual se mostrou eficaz por não causar danos nas células em estudo, em pH 7,4, nos

compartimentos apicais e basolaterais das placas Transwell®. As placas foram mantidas sob agitação em agitador orbital a 37 ºC (25 rpm). Realizaram-se as coletas de 200 µL das amostras a partir do compartimento basolateral e apical aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Após cada amostragem, repôs-se o volume de 200 µL de tampão, mantido a 37 ºC, com a finalidade de manutenção do volume do meio no compartimento.

As amostras foram quantificadas por método analítico validado, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência.

Os resultados do coeficiente de permeabilidade aparente (Papp, cm/s) foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$Papp = (VR \times \Delta Q/\Delta t) / (A \times C_0)$$

onde VR é o volume do compartimento receptor (basolateral ou apical), $\Delta Q/\Delta t$ é a taxa de aparecimento do composto na câmara do receptor (em $ng/cm^3/s$), A é a área de superfície da membrana (cm^2) e C_0 é a concentração inicial no compartimento doador (ng/cm^3).

Os resultados dos ensaios *in vitro* são apresentados como média ± desvio padrão referente a 3 determinações (n=3).

1.2.6. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo aluno de iniciação científica Felipe Pereira de Souza, no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, sob supervisão da Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro.

A cultura de linhagem HepG2, células de carcinoma hepatocelular humano, foi gentilmente fornecida pela Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli, FCF/USP, e mantida em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 10 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,2 mg/mL de bicarbonato de sódio. As células foram incubadas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO_2.

Todos os ensaios foram realizados com células plaqueadas na densidade de 5×10^4 células/mL e incubadas por 24 horas antes do início do tratamento. Após o período de adesão celular, o meio de cultura foi substituído por novos meios contendo as concentrações de 3, 12, 24, 48 ou 96 µM das

moléculas em estudo, dissolvidas em dimetilsulfóxido (concentração final de DMSO no meio de cultura de 0,4368%, v/v). Prepararam-se incubações controle, utilizando-se meio de cultura completo e a exposição celular ocorreu nas 24 horas subsequentes.

Para obtenção de dados sobre a citotoxicidade das moléculas em estudo analisou-se a atividade da cadeia respiratória mitocondrial, através dos ensaios de sal tetrazólio (XTT).

Para a realização desse ensaio utilizaram-se soluções do kit de citotoxicidade da empresa Xenometrix (2007). Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e lavaram-se, cuidadosamente, as células duas vezes com 200 µL de solução fosfato salina (PBS) e um novo meio de cultura com 5% de soro fetal bovino (SFB) (200 µL por poço) foi adicionado à placa. Adicionou-se, a cada poço da placa de cultura, 50 µL de uma solução pré-formulada do reagente XTT (Reagente XTT: tampão = 100 : 1). Em seguida, a placa de cultura foi incubada por uma hora em estufa com atmosfera de 5% de CO_2, a 37 °C. Aferiram-se os valores de absorbância (OD = OD450 nm – OD690 nm), fazendo a leitura no comprimento de onda de 450 nm, com a leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. SÍNTESE

A caracterização completa dos compostos sintetizados está disponível no *anexo I*. Quinze derivados híbridos bioisostéricos de *N*-acilidrazonas e grupos furoxano (*Tabela 1.I*) foram sintetizados em três etapas (*Figuras 1.2 e 1.3*): a) esterificação de dferentes ácidos carboxílicos ao correspondente metil éster e, na sequência, formação das hidrazidas (**IV-VI**); b) ciclização do crotonaldeído (**VII**) ou álcool cinâmico (**IX**), este último posteriormente oxidado ao respectivo aldeído (**X**), e c) formação dos compostos finais (*N*-acilidrazonas **1-15**). Os rendimentos das últimas etapas foram considerados razoáveis, variando de 6% a 91%. Todos os compostos finais foram caracterizados através de faixa de fusão, cromatografia em camada delgada (CCD),

infravermelho, RMN ^{1}H, ^{13}C, espectrometria de massas de alta resolução e análise elementar.

O composto **2** foi utilizado como referência para a análise diastereoisomérica através do experimento de NOE-diff. Devido ao aparecimento dos sinais em 8,49 e 7,92 ppm (espetro disponível no *ANEXO I*), pode-se concluir que o composto se apresenta em seu diastereoisômero *E*. Ou seja, os hidrogênios em destaque estão no mesmo lado da molécula (*Figura 1.4*).

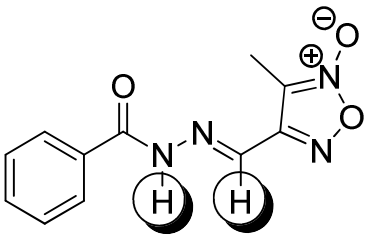
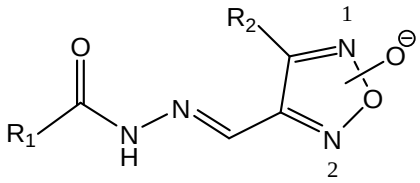
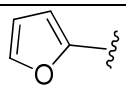
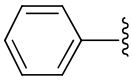
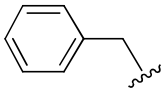
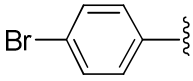
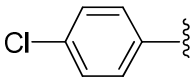
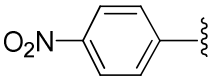
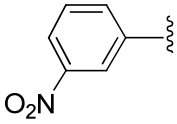
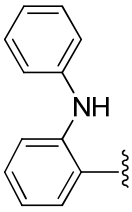
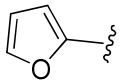
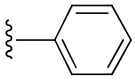
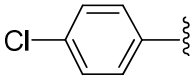
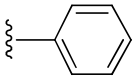
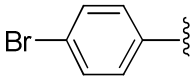
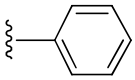
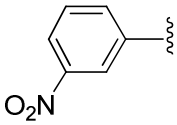
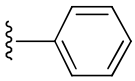
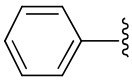
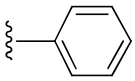
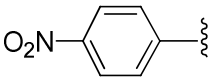
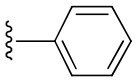
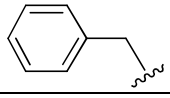
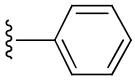


Figura 1.4: Configuração *E* do composto **2**.

Tabela 1.I: Estrutura dos compostos sintetizados



Compostos	R_1	R_2	Posição do *N*-óxido
1		CH_3	1
2		CH_3	1
3		CH_3	1
4		CH_3	1
5		CH_3	1
6		CH_3	1
7		CH_3	1
8		CH_3	1
9			2
10			2
11			2
12			2
13			2
14			2
15			2

1.3.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA (ENSAIO *IN VITRO* CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*) E LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Atividade tripanomicida está presente na *Tabela 1.II*. Os valores de IC_{50} variaram de 2,88 a >100 µM. Os compostos mais ativos (**6,14**) mostraram atividade tripanomicida similar (IC_{50} = 2,88 e 2,90 µM, respectivamente), embora menor do que o fármaco referência benznidazol (**Bzd**, IC_{50} = 1,50 µM). Esses compostos apresentam o grupo nitro, considerado um grupo parasitofórico, na posição *para* do anel aromático. A propriedade retirante de elétrons do grupo nitro, provavelmente, teve influência positiva na atividade biológica. Além disso, esse grupo é capaz de interferir com o sistema redox do parasita, tendo, assim, um efeito sinérgico na morte parasitária (WILKINSON et al., 2011). A orientação do grupo nitro também se mostrou importante, pois, quando ele está na posição *meta* (**7, 12**), ocorre diminuição considerável na atividade (IC_{50} = 9,94 e 15,30 µM, respectivamente). A única diferença estrutural dessas moléculas é o substituinte (metila ou fenila) no anel furoxano.

Tabela 1.II: Atividade tripanomicida (amastigota – *in vitro*) e potencial de liberação de óxido nítrico (geração de ânion nitrito)

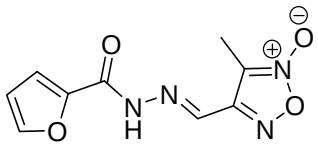
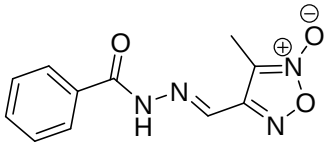
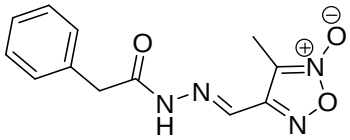
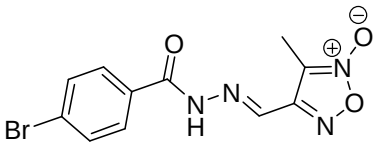
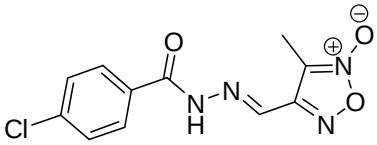
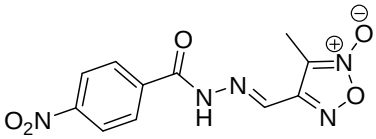
COMPOSTOS	ESTRUTURA MOLECULAR	ATIVIDADE TRIPANOMICIDA (IC_{50} - µM)	LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (concentração - µM)
Benznidazol		1,50 ± 0,35	ND
1		6,70 ± 0,95	1220,0
2		>100	210,2
3		>100	898,4
4		27,43 ± 4,97	101,8
5		14,3 ± 2,54	56,0
6		2,88 ± 0,38	242,0

Tabela 1.II: (Cont.) Atividade tripanomicida (amastigota – *in vitro*) e potencial de liberação de óxido nítrico (geração de ânion nitrito)

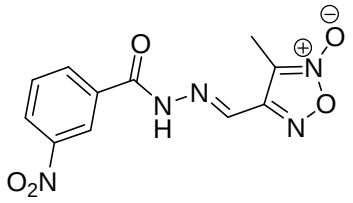
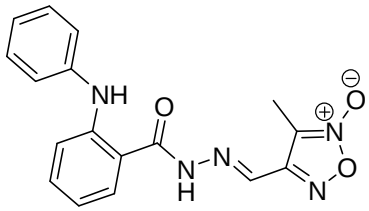
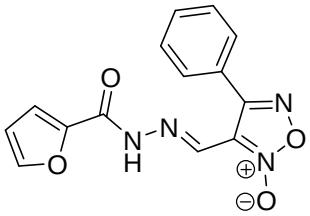
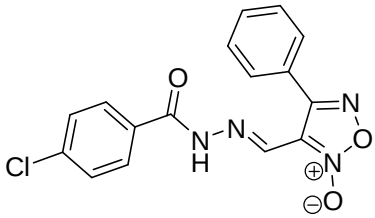
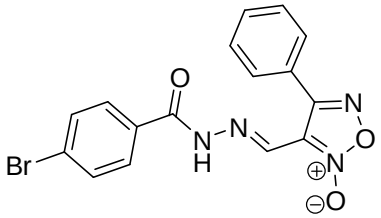
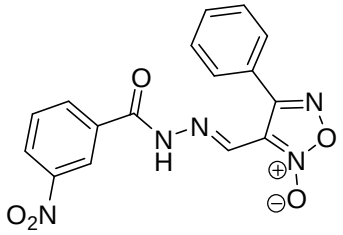
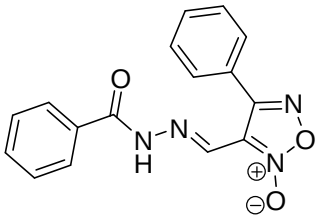
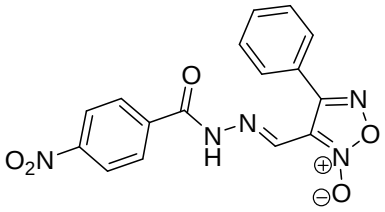
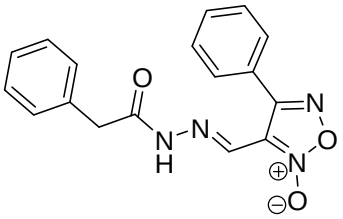
COMPOSTOS	ESTRUTURA MOLECULAR	ATIVIDADE TRIPANOMICIDA (IC_{50} - µM)	LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (concentração - µM)
7		9,94 ± 2,06	52,0
8		5,69 ± 0,89	124,0
9		8,12 ± 1,18	867,0
10		>100	4232,0

Tabela 1.II: (Cont.) Atividade tripanomicida (amastigota – *in vitro*) e potencial de liberação de óxido nítrico (geração de ânion nitrito)

COMPOSTOS	ESTRUTURA MOLECULAR	ATIVIDADE TRIPANOMICIDA (IC_{50} - µM)	LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (concentração - µM)
11		>100	601,0
12		15,30 ± 2,80	912,0
13		>100	132,0
14		2,90 ± 0,32	110,0
15		9,1 ± 2,11	33,4

ND – Não determinado

Nos compostos halogenados contendo metila como substituinte no anel furoxano, a atividade (**5**, IC_{50} = 14,3 µM e **4**, IC_{50} = 27, 43 µM) foi mais alta do que a observada nos compostos que continham a fenila como substituinte (**10** e **11**, ambos com IC_{50} > 100 µM). Considerando apenas a diferença no substituinte do anel furoxano (R_2 – *Tabela 1.II*), é possível deduzir que grupos volumosos, como a fenila, nesta posição, são desfavoráveis para a atividade biológica. Entretanto, para moléculas contendo benzila como substituinte em R_1 (**3** e **15** – *Tabela 1.II*) o oposto é observado: IC_{50} > 100 µM e 9,1 µM, respectivamente. Isso pode ser explicado pelo fato da lipofilicidade total da molécula dispor de um importante papel na atividade, uma vez que o LogP (calculado pelo programa MarvinView), para o composto **3** é 0,36, enquanto para o composto **15** é 2,27. Contudo, os valores de LogP calculado para os compostos mais ativos (**6** e **14**) são 0,2 e 2,11, respectivamente. Esses dados nos levam a deduzir que o comportamento diferente dos compostos com metila ou fenila está mais relacionado com a diferença na interação com a cruzaína, o possível alvo para os compostos planejados, do que com a própria lipofilicidade.

HERNÁNDEZ e colaboradores (2012) sintetizaram compostos *N*-acilidrazônicos contendo liberadores de óxido nítrico, apresentando atividade anti-inflamatória e analgésica. Em 2013, suas atividades antiparasitárias também foram demonstradas (HERNÁNDEZ et al., 2013), mostrando razoável atividade contra *T. cruzi*. Neste artigo, seis grupos (**A** até **G**) de compostos foram sintetizados variando a estrutura geral e os substituintes. Alguns compostos na família G, os quais a estrutura geral está presente na *Figura 1.5*, correspondem a derivados retroisostéricos dos derivados **1**, **4** e **6**, sintetizados neste trabalho.

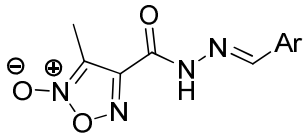


Figura 1.5: Compostos sintetizados por HERNÁNDEZ et al., 2013.

O derivado bromado **4**, mostrou-se ser mais ativo do que seus retroisósteros. Comparando o composto **6** (o composto mais ativo deste trabalho) com seu respectivo retroisóstero, o primeiro é cerca de 12 vezes mais ativo contra amastigota do que o segundo. Embora o artigo de Hernandez e colaboradores (2013) não envolva o retroisóstero do composto **14**, pode ser postulada a hipótese de que a mudança da posição dos grupos (*N*-acilidrazona e furoxano) deve interferir na interação com o alvo biológico, influenciando, portanto, a atividade desses derivados.

Com intuito de explorar um possível mecanismo de ação dos compostos planejados, relacionados ao potencial de liberação de óxido nítrico (NO), os quinze compostos foram submetidos ao teste de geração de nitrito (importante subproduto da degradação do NO). Os valores de liberação variaram de 33,0 a 4.232,0 µM (*Tabela 1.II*). Comparados com o padrão (espermina NONOato = 211.200,0 µM), todos os compostos apresentam baixo potencial de liberar NO. O composto com maior potencial de liberação de NO (**10**) mostrou-se inativo (IC_{50} ≥ 100 µM), e, o composto com menor potencial de liberação de NO (**15**) mostrou atividade tripanomicida intermediária (IC_{50}= 9,1 µM). Portanto, parece não existir correlação entre o potencial de liberação de NO e a atividade tripanomicida. Da mesma forma, não se encontrou relação direta entre a estrutura molecular e a habilidade de liberação de NO. Embora propriedades de liberação de NO podem propiciar sinergismo de ação, este pode não ser o principal mecanismo de ação destes referidos compostos.

No entanto, como se considera que este pode ser um segundo mecanismo de ação, a pesquisa a respeito prosseguirá em outro modelo. Vale mencionar que, no momento, só dispúnhamos de ensaios de liberação em modelo químico, cujo resultado fornece apenas uma previsão de estabilidade da molécula. Estudos mais aprofundados serão realizados, feito diretamente nos parasitas, para a avaliação da influência do NO na atividade dos compostos sintetizados, confirmando ou não a hipótese anterior.

1.3.3. ESTUDOS DE PERMEABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE

Para os compostos mais ativos (**6** e **14**), estudos adicionais foram realizados para avaliar a permeabilidade celular e a citotoxicidade em células humanas (*Tabela 1.III*).

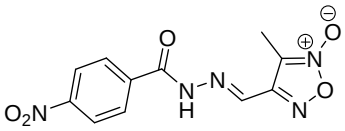
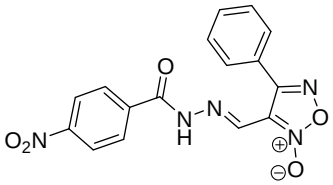
Absorção intestinal humana de novos candidatos a fármacos é frequentemente estimada pela medição de permeação do composto através da monocamada da membrana de células Caco-2, as quais são uma linhagem celular de carcinoma de cólon epitelial, que funcionam como um desejável modelo *in vitro* para a avaliação de absorção intestinal de fármacos (STORPIRTIS et al., 2009). Como a integridade e permeabilidade de monocamadas podem variar entre experimentos, compostos controles como metoprolol e amoxicilina, os quais são conhecidos por terem alta e baixa permeabilidade, respectivamente, e fluoresceína, um marcador paracelular, foram também utilizados no mesmo experimento. Estudos de permeabilidade foram conduzidos na direção do influxo (apical para basolateral A-B) para o efluxo (basolateral para apical B-A). Estudos de permeação em Caco-2 foram realizados através da comparação do coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) na direção de absorção e secreção originando uma indicação de um possível envolvimento de mecanismo de transporte ativo, ou absortivo ou secretório. O transporte por glicoproteína-P (Gp-P) pode ser responsável por secretar fármacos da corrente sanguínea para o lúmen e a direção B-A pode funcionar como uma barreira para a absorção oral.

O Papp para os compostos avaliados encontra-se na *Tabela 1.III*. Os valores mostraram que, embora o composto **6** seja menos lipofílico do que o composto **14**, ele apresenta alta permeabilidade de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (CHAVDA; PATEL; ANAND, 2010). Isso indica que o composto **6** não apresenta problemas relacionados com absorção pelo trato gastrointestinal, uma vez que ele pode ser adequadamente solubilizado nos fluidos fisiológicos deste sistema. Por outro lado, para o composto mais lipofílico **14**, o Papp indicou baixa permeabilidade.

A taxa de fluxo menor do que 2,0 obtida para ambos os compostos (**6** = 0,87 e **14** = 0,63) indicou que não há transporte significativo na direção de

efluxo, possivelmente mediado pela Gp-P (SOUZA et al., 2009; HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

Tabela 1.III: Permeabilidade cellular e citotoxicidade (*in vitro*) dos compostos mais ativos

COMPOSTOS	ESTRUTURA MOLECULAR	ESTUDO DE PERMEABILIDADE (x 10^{-6}, cm/s, A-B/B-A) *	CITOTOXICIDADE (IC_{50} - µM)	ÍNDICE DE SELETIVIDADE **
Benznidazol		ND	28.1	18.7
6		43,17 ± 7,60 / 37,63 ± 4,45	80.9	28.09
14		0,82 ± 0,09 / 0,52 ± 0,03	45.5	15.69

ND – Não determinado
* A-B/BA = apical – basolateral/basolateral – apical
**IS = IC_{50} de citotoxicidade/IC_{50} de atividade tripanomicida

Os estudos de citotoxicidade foram realizados usando células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Neste estudo, a atividade da cadeia respiratório mitocondrial foi avaliada através do ensaio de XTT (sal de tetrazólio).

Os resultados de citotoxicidade estão na *Tabela 1.III*. Ambas as moléculas foram menos citotóxicas em comparação ao benznidazol (**6**, IC_{50} = 80,9 µM; **14**, IC_{50} = 45.5 µM; **Bzd**, IC_50 = 28,1 µM). É interessante observar que o composto **6** é quase três vezes menos citotóxico do que o benznidazol. O índice de seletividade (IS) corresponde a taxa entre IC_{50} de citotoxicidade e IC_{50} da atividade tripanomicida. O IS do composto **14** (15,69) é levemente menor do que o benznidazol (18,7). Porém, o IS do composto **6** (28,09) foi mais alto do que o fármaco referência, levando à consideração de que este

composto é um interessante líder e poderá ser submetido a futuros estudos e otimizações.

1.4. CONCLUSÕES

Quinze compostos híbridos bioisostéricos contendo grupos *N*-acilidrazona e furoxano foram planejados, sintetizados e tiveram sua atividade tripanomicida e potencial de liberação de NO avaliados. Os compostos mais ativos (**6** e **14**) foram submetidos a estudos de permeabilidade celular e citotoxicidade. A relação entre estrutura química e atividade biológica (REA) indica que o modo de interação da estrutura geral com o possível alvo biológico tem a maior interferência pela substituinte R_2 (*Tabela 1.II*). Devido à natureza do esqueleto estrutural dos compostos, um duplo mecanismo de ação pode estar envolvido na atividade desses derivados. Compostos **6** e **14** apresentaram menor atividade tripanomicida comparado com o fármaco referência (**Bzd**). O potencial de liberação de NO parece não ter correlação direta com a atividade biológica, mas, pode estar presente como um efeito sinérgico. Estudos em modelo no parasita serão realizados para se avaliar diretamente a liberação do NO e estabelecer, se possível, a correlação com a atividade biológica, como a hipótese aventada anteriormente.

Esses mesmos compostos, **6** e **14**, mostraram-se menos citotóxicos em células humanas do que o **Bzd**, sendo o composto **6** o mais promissor, por apresentar boa permeabilidade in células Caco-2 e IS maior que o fármaco referência.

Portanto, o composto **6** pode ser considerado um líder neste planejamento. Estudos de inibição enzimática e de modelagem molecular (*docking* e análise quimiométrica) podem ser realizados com o objetivo de obter um melhor entendimento em relação ao seu mecanismo de ação ao nível molecular, dirigindo futuras otimizações principalmente para melhorar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANIS, R. J.; ANIS, R.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. *Lancet,* v. 375, p. 1388-1402, 2010.

BRAMAN, R. S.; HENDRIX, S. A. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium(III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal. Chem*., v. 61, p. 2715-2718, 1989.

CHAVDA, H. V.; PATEL, C. N.; ANAND, I. S. Biopharmaceutical classification system. *Syst. Ver. Pharm*., v. 1, p. 62-69, 2010.

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

COLASANTI, M.; SALVATI, L.; VENTURINI, G.; ASCENZI, P.; GRADONI, L. Cysteine protease as a target for nitric oxide in parasitic organisms. *Trends Parasitol*., v. 17, p. 575, 2001.

HERNANDEZ, P.; CABRERA, M.; LAVAGGI, M. L.; CELANO, L.; TISCORNIA, I.; COSTA, T. R.; THOMSON, L.; BOLLATI-FOGOLIN, M.; MIRANDA, A. L. P.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZALEZ, M.; CERECETTO, H. Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem*., v. 20, p. 2158-2171, 2012

HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of degleted diseases drug candidates. *Eur. J. Med. Chem*., v. 59, p. 64-74, 2013

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. *Quim. Nova*, v. 33, p. 2148-2154, 2010.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas heart disease: an update. *Am. J. Med*., v. 128, p. 1251e7-1251e9, 2015.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas disease: Implications for global health. *Trends Parasitol*., 31, p 595-603, 2015.

ROMEIRO, N. C.; AGUIRRE, G.; HERNANDEZ, P.; GONZALEZ, M.; CERECETTO, H.; ALDANA, I.; PEREZ-SILANES, S.; MONGE, A.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinaxoline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. *Bioorg. Med. Chem*., v. 17, p. 641-652, 2009.

SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GUIDO, R. V. C.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. Advances in prodrug design. *Mini-Rev. Med. Chem*., v. 5, p. 893-914, 2005.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 110, p. 289-298, 2015.

SOUZA, J.; BENET, L. Z.; HUANG, Y.; STORPITS, S. Comparision of bidirectional lamivudine and zidovidine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2-cell monolayers. *J. Pharm. Sci*., 98, p. 4413-4419, 2009.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease estimates and challenges. *Global Heart*, v. 10, p. 139-144, 2015.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N.; *Biofarmacotécnica - Série Ciências Farmacêuticas*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 204-211.

VENTURINI, G.; FIORAVANTI, E.; COLASANTI, M.; PERSICHINI, T.; ASCENZI, P. Cys25-nitrosylation inactives papain. Biochem. Mol. Biol. Int., v. 46, p. 425-428, 1998.

WILKINSON, S. B.; BOT, C.; KELLY, J. M.; HALL, B. S. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr. Med. Chem*., v. 11, p. 2072-2084, 2011.

XENOMETRIX, In: http://www.xenometrix.ch/uploads/tx_ttproducts/datasheet/XTT-TT_1.5.pdf, 2007.

WERMUTH, C. G.; ALDOUS, D.; RABOISSON, P.; ROGNAN, D. *The practice of medicinal chemistry.* San Diego: Elsevier Ltda. 4 ed., 2015, p.181-233.

WHO, World Health Organization. In: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/, 2016.

CAPÍTULO 2

ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO E DAS PROPRIEDADES MOLECULARES MAIS RELEVANTES...

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS E JUSTIFICATIVAS

No capítulo anterior, quinze derivados híbridos bioisostéricos de grupos *N*-acilidrazonas e furoxano foram planejados e sintetizados, os quais mostraram interessante perfil de atividade contra amastigota de *T. cruzi*. Com o objetivo de identificar as principais propriedades moleculares que mais se correlacionam com a atividade biológica, uma análise exploratória de dados foi realizada usando os quinze compostos listados na *Tabela 1.1*. Esta abordagem compreende dois métodos: análise hierárquica de grupos (HCA), a qual discrimina amostras através de índices de similaridade e análises de componentes principais (PCA), que utiliza combinações lineares de dados originais (FERREIRA et al., 1999).

A enzima cruzaína é a principal cisteíno-protease do *T. cruzi*, tendo papel fundamental na progressão do ciclo de vida parasitário, tais como, invasão celular e evasão do sistema imune (MCGRATH et al., 1995; JUDICE et al., 2001). Tendo em vista que as *N*-acilidrazonas são consideradas interessante esqueleto molecular de interação com esta enzima (MOREIRA et al., 2009; ROMEIRO et al., 2009), a série de quinze compostos foi avaliada através de ensaios de inibição enzimática. Adicionalmente, estudos de *docking* foram realizados para avaliar as possíveis interações essenciais entre o ligante e o receptor.

Além disso, para o composto com maior atividade tripanomicida (**6**) foram conduzidos estudos adicionais de citotoxicidade em linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2), seguido pela análise de efeitos tóxicos que podem alterar o ciclo celular *in vitro*.

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA

Cruzaína mutilada na porção C-terminal foi obtida de *Escherichia coli* (cepa M15 ou DH5α contendo a expressão do plasmídeo) (EAKIN et al., 1992). O substrato Z-Phe-Arg-AMC e todos os reagentes para preparação de tampões foram comprados da Sigma-Aldrich. Solução estoque do substrato de dos

candidatos a inibidores a 10 mM em DMSO foram armazenadas a -20 ºC e a -4 ºC, respectivamente.

A enzima altamente purificada (0,64 nM), em 50 mM de fosfato de sódio, 100 mM de cloreto de sódio, 5 MM de EDTA, pH 6,5, contendo 5 mM de DTT, foi incubada com os derivados em estudo por 5 minutos à temperatura ambiente, seguido pela adição do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC (LI et al., 1995; BORCHARDT et al., 2010). A fluorescência foi monitorada através do espectofotômetro Wallac 1420-042 da PerkinElmer e mensurada através do comprimento de onda excitatório de 355 nm e 460 nm como o comprimento de onda de emissão.

A atividade enzimática da cruzaína foi mensurada como um aumento da intensidade da fluorescência pela clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC e liberação da aminocumarina.

Os valores de IC_{50} foram calculados usando análise de regressão não-linear empregando o módulo Sigma-Plot de cinética enzimática, baseou-se na porcentagem de atividade enzimática na presença do inibidor, relativo à atividade enzimática na ausência do inibidor.

2.2.2. CONSTRUÇÃO DOS MODELOS MOLECULARES, CÁLCULOS DOS DESCRITORES E ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS (HCA E PCA)

A análise de HCA (Hierarquical Cluster Analysis) e PCA (Principal Component Analysis) foi efetuada com a colaboração da Dra Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, pesquisadora do Instituto Butantã, São Paulo.

Construíram-se os modelos moleculares tridimensionais (3D) dos quinze compostos (*Tabela 2.I*) na forma neutra, usando o programa HyperChem 7.0. As coordenadas cartesianas da nifuroxazida (ALLEN, 2002) foram empregadas como geometria de referência para todos os análogos. A geometria dos modelos moleculares investigados foi otimizada em campo de força MM+, o qual corresponde à extensão do campo de força MM2, sem quaisquer restrições. Calcularam-se as cargas atômicas parciais usando o método semi-empírico AM1 (STEWART, 2004). Realizou-se a minimização de energia empregando o método de declive máximo e gradientes conjugados do programa MOLSIM 3.2, considerando um critério de convergência de 0,01

kcal/mol. O esquema realizado da simulação de Dinâmica Molecular (DM) para todos os sistemas foi de 1 ns (1 fs o tamanho de cada etapa) a 310 K (programa MOLSIM 3.2). Os arquivos trajetória de saída foram salvos a cada 20 etapas de simulação. Constante dielétrica de 3,5 foi considerada nos cálculos para simular o ambiente de membranas biológicas. Depois de alcançar o estado de equilíbrio, selecionaram-se confôrmeros a cada 100 com o objetivo de encontrar aquele de menor energia mais frequente. As contribuições das energias de solvatação intramolecular e de ligações de hidrogênio foram computadas para cada confôrmero selecionado do esquema de DM. A energia de solvatação intramolecular considerou o modelo *shell* de hidratação proposto por Forsythe e Hopfinger (1973).

Propriedades termodinâmicas encontradas para as conformações de menor energia dos compostos investigados incluem as seguintes contribuições de energias intramoleculares: estiramento, ($E_{STRETCH}$), van der Walls (E_{VDW}), eletrostática (E_{CHARGE}), ligação de hidrogênio (E_{HB}) e solvatação (E_{SOLV}). A soma de todas as contribuições energéticas, as quais correspondem à energia potencial total (E_{TOT}), foi também considerada. No total, calcularam-se 63 propriedades moleculares ou descritores de diferentes naturezas relacionados a contribuições eletrônicas, hidrofóbicas ou estéricas empregando os seguintes softwares: Molsim 3.2, HyperChem 7.0, Gaussian 03W (método b3lyp/6-31G**) e Marvin 4.1.8. Informações detalhadas a respeito de todos os descritores, métodos e respectivos softwares utilizados nos cálculos estão listadas no *ANEXO II*.

Devido à distinta ordem de magnitude entre as variáveis calculadas, o procedimento de autoescalonamento foi aplicado como método de pré-processamento (FERREIRA, 1999). A análise exploratória, PCA (análise de componentes principais) e HCA (análise hierárquica de grupos), foi realizada usando o programa Pirouette 3.11. No PCA, que utilizou seis fatores, a matriz de dados X (*I x J*), correspondente a I compostos e J descritores, foi decomposta em duas matrizes, T e L, modo que $X = TL^T$. A matriz T, é conhecida como matriz *score*, representa as posições das amostras (classificação) no novo sistema de coordenadas em que as PCs, ou fatores, são os eixos. *Scores* são integrais para análises exploratórias, uma vez que eles mostram a correlação inter-amostras. L é a matriz de *loading* em que as

colunas descrevem como os novos eixos são construídos a partir dos eixos antigos e indicam as contribuições das variáveis de cada PC (FERREIRA, 1999). O diagnóstico de *outliers*, implementado no programa Pirouette 3.11, foi também realizado através da distância de *Mahalanobis*.

No HCA, consideram-se o método completo de ligação e distância euclidiana. Os valores de distância são transformados em matriz de similaridade, cujos elementos correspondem aos índices de similaridade. O índice de similaridade varia de 0 (amostras ou variáveis/descritores dissimilares) a 1 (amostras ou variáveis/descritores idênticos) e, quanto maior o índice de similaridade menor a distância entre qualquer par de amostras ou variáveis (descritores ou propriedades moleculares). Os resultados são expressos como um dendrograma, que corresponde a um mapa de três formas, construído através dos dados de distância.

2.2.3. ***DOCKING***

Estudos de *docking* foram realizados usando o programa Autodock 4.2. As estruturas dos ligantes utilizadas foram previamente preparadas (vide *tópico 2.2.2*) e a enzima foi a estrutura cristalográfica da cruzaína, cisteíno-protease de *T. cruz*i (código PDB 3I06; 1,10 Å de resolução) (MOTT et al., 2010). As cargas *Gasteiger* e átomos de hidrogênio foram adicionadas na molécula do ligante, enquanto que o Autogrid foi utilizado para calcular o mapa *grid* centrado no sítio de ligação do ligante da cruzaína (Cys25), cobrindo, desta forma, toda a extensão da molécula do ligante. O tamanho ideal encontrado para o *grid* foi: X = 16 Å, Y = 14 Å e Z = 18 Å, selecionado após efetuado o processo de *redocking*. As poses geradas foram avaliadas usando o programa Pymol através de inspeção visual e análise dos valores energéticos de interação ligante-receptor.

2.2.4. ANÁLISE DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR

Os estudos de fragmentação de DNA e ciclo celular foram realizados pelo aluno Tiago Franco de Oliveira, sob supervisão da Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FCF/USP.

Linhagem de hepatocarcinoma celular humano (HepG2) foi, gentilmente, cedida pela Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli (FCF/USP). A cultura da monocamada foi mantida em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,2 mg/mL de bicarbonato de sódio. Células foram incubadas a 37 ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2. Todos os ensaios foram realizados com células plaqueadas em uma densidade de 5 x 10^5 células/poço em placas de 24 poços 24 horas antes do início do tratamento. O meio de cultura foi, então, substituído por novo meio completo, contendo concentrações de 3, 12, 24, 48 ou 96 µM do composto **6** dissolvido em DMSO (concentração final de DMSO no meio de cultura foi de 0,44% v/v). Incubaram-se as células controle com meio de cultura completo. Depois de 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com 1.000 µL de tampão salino fosfatado (PBS) e suspendido em meio de cultura fresco (fenol *red-free*) contendo 10% de SFB (1.000 µL/poço). As células suspendidas foram centrifugadas (500 g, durante 10 minutos a 4 ºC) e suspendidas em 300 µL de tampão de lise celular (PBS, 2% SFB, 0,05% Triton X-100, 0,1% citrato sódico) contendo 20 µL/mL de iodeto de propídio (IP) e 100 µL de solução de RNase A (15 mg/mL). Depois de 30 minutos a temperatura ambiente, a intensidade de fluorescência do IP ligado ao DNA (10.000 eventos/amostra) foi monitorada com λ_{EXC} = 488 nm e λ_{EMI} = 667 nm através do equipamento FACs CANTO II (BD, Biosciences).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA CRUZAÍNA

Dados de inibição da cruzaína estão apresentados na *Tabela 2.I* juntamente com os dados de atividade tripanomicida, previamente relatados no *Capítulo 1*. Os valores de IC_{50} variaram de 2,2 até 25,2 µM. Levando em consideração o substituinte no anel furoxano, os compostos podem ser divididos em duas séries: uma com o grupo metil **A** e outra com o grupo fenila **B**. Compostos da série **A** são mais potentes do que aqueles da série **B**. O composto mais potente (**7**, IC_{50} = 2,2 µM) das séries apresenta um grupo fenila diretamente ligado no grupo *N*-acilidrazona. Comparando os compostos com

estruturas similares ao **7** (**4**,**5**,**6**) é importante a observação de que substituintes na posição *para* parecem não ter um papel determinado na inibição da cruzaína, por apresentarem perfis de inibição similares. Além disso, o composto não substituído **2** apresentou valor de IC_{50} similar ao dos compostos **4**, **5** e **6**. Entretanto, a atividade diminui com a presença do grupo nitro na posição *para*, em relação à posição *meta*, sendo o composto **7** mais potente do que o composto **6**. A influência eletrônica estimada através do parâmetro de Hammett, σ, não auxilia no entendimento da diferença na atividade inibitória. O parâmetro σ para os substituintes Cl, Br e NO_2 na posição *para* e *meta* é, respectivamente, 0,37; 0,39; 0,78 e 0,71, diminuindo, portanto, a densidade eletrônica do anel aromático, fato que pode estar envolvido na interação com a enzima. Vale ressaltar que o valor de IC_{50} para o composto **6** é menor do que para o composto **4** e **5**, segundo a magnitude de σ para o grupo nitro, que é aproximadamente duas vezes a do Br e Cl. Tal fato indica que o parâmetro eletrônico pode ser importante para a potência inibitória. Entretanto, a diferença entre o σ do grupo NO_2 nas posições *para* e *meta* não é suficiente para explicar a grande diferença observada na inibição da cruzaína (IC_{50} = 11,2 e 2,2 µM, respectivamente). Deste modo, se pode concluir que o fator eletrônico é importante, porém, fatores estéricos podem explicar melhor a maior atividade do composto **7**.

Na série **B**, composto **9** (IC_{50} = 2,6 µM), que apresenta o anel furano, mostrou maior atividade inibitória do que seu bioisóstero **13** (IC_{50} = 11,5 µM), que apresenta um anel fenila ligado ao grupo *N*-acilidrazona. É possível que o oxigênio esteja envolvido em uma ligação de hidrogênio com o alvo, refletindo, também, a importância do fator eletrônico na inibição. Por outro lado, compostos **10**, **11**, **12** e **14** mostraram-se menos potentes do que o **9** e seu bioisóstero. Isso reflete a interferência negativa do volume do grupo furoxano, quando ele apresenta uma fenila como substituinte ao invés da metila, de alguma forma, neutralizando o possível efeito eletrônico dos substituintes.

Tabela 2.I: Compostos e suas atividades tripanomicida e de inibição na cruzaína

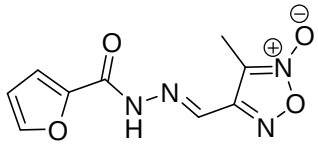
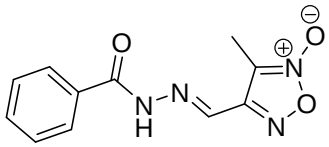
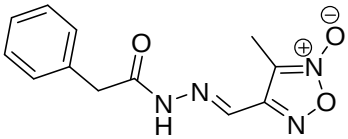
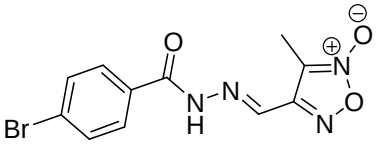
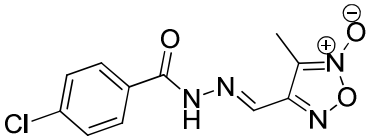
Compostos	Estruturas Moleculares	ATIVIDADE TRIPANOMICIDA IC_{50} (µM)	INIBIÇÃO CRUZAÍNA IC_{50} (µM)
Benznidazol		1,50 ± 0,35	ND
1		6,70 ± 0,95	4,4 ± 0,4
2		>100	6,2 ± 0,5
3		>100	8,5 ± 1,5
4		27,43 ± 4,97	6,4 ± 0,4
5		14,3 ± 2,54	7,2 ± 0,7

Tabela 2.I: (Cont.) Compostos e suas atividades tripanomicida e de inibição na cruzaína

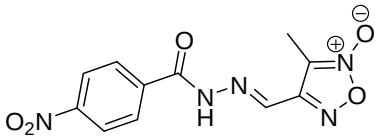
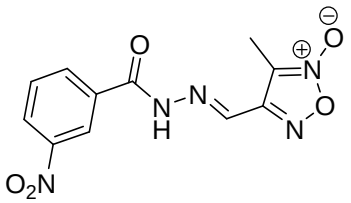
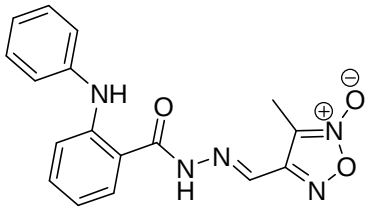
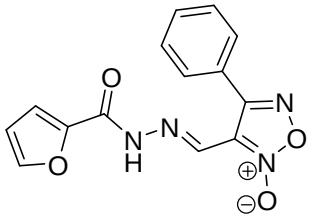
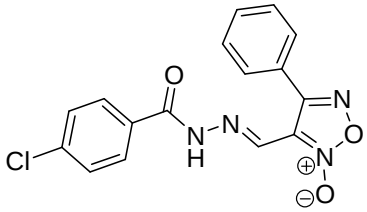
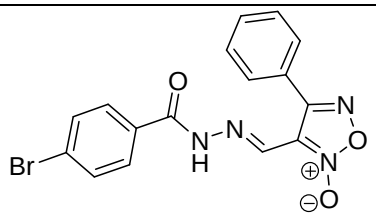
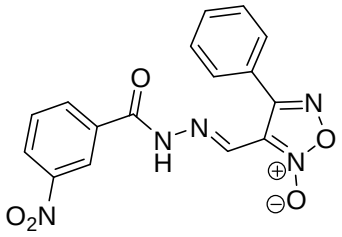
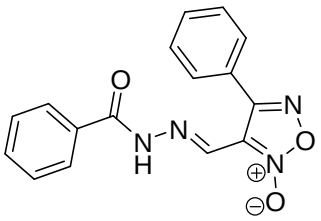
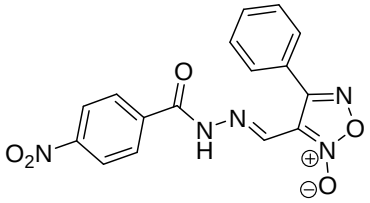
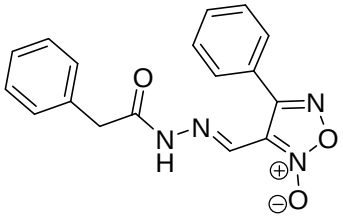
Compostos	Estruturas Moleculares	ATIVIDADE TRIPANOMICIDA IC_{50} (µM)	INIBIÇÃO CRUZAÍNA IC_{50} (µM)
6		2,88 ± 0,38	11,2 ± 0,2
7		9,94 ± 2,06	2,2 ± 0,7
8		5,69 ± 0,89	25,2 ± 1,4
9		8,12 ± 1,18	2,6 ± 0,8
10		>100	8,3 ± 0,2

Tabela 2.I: (Cont.) Compostos e suas atividades tripanomicida e de inibição na cruzaína

Compostos	Estruturas Moleculares	ATIVIDADE TRIPANOMICIDA IC_{50} (µM)	INIBIÇÃO CRUZAÍNA IC_{50} (µM)
11		>100	7,4 ± 0,8
12		15,30 ± 2,80	14,0 ± 2,0
13		>100	11,5 ± 1,4
14		2,90 ± 0,32	15,1 ± 1,6
15		9,1 ± 2,11	8,7 ± 0,2

ND-Não determinado

Comparando-se o composto mais ativo da série **A**, o composto **7**, com o mais ativo da série **B**, o composto **9**, pode-se aventar uma hipótese, considerando-se que eles apresentem apresentam valores semelhantes de IC_{50}. A polaridade do anel furano, que reflete um efeito eletrônico, pode contrabalancear a influência negativa do substituinte fenila no anel furoxano do composto **9**. Mesmo assim, é interessante, também, comparar o composto **1** (série **A**), com o composto **9** (série **B**). O valor de IC_{50} do primeiro é cerca de duas vezes o valor do segundo, significando que o volume do grupo no anel furoxano leva a posição mais adequada do composto no alvo. Isso, de certa forma, corrobora a hipótese anteriormente levantada.

O composto menos potente de ambas as séries, **8**, contém um anel fenilantranílico, indicando, também, que essa região é sensível a grupos volumosos, mas, neste caso, não é contrabalanceada com a presença da metila como substituinte no anel furoxano.

É importante salientar que, no planejamento fenotípico, o mais importante é identificar o composto mais ativo diretamente no parasita, ou seja, o ligante com maior poder tripanomicida. Este é o que apresenta maior potencial para a continuidade dos estudos pela busca de um candidato anti-*T.cruzi*. Baseado nessas considerações anteriores, os compostos **6** e **14** são os mais potentes contra formas amastigotas de *T. cruzi* em ambas as séries, apresentando valore de IC_{50} similares (2,88 e 2,90 µM, respectivamente). Por outro lado, o composto mais ativo na enzima, **7**, é menos potente no parasita em relação aos compostos **6** e **14**. Embora problemas de permeabilidade não sejam descartados no caso da atividade antiparasitária, não houve correlação da atividade tripanomicida com a inibição enzimática, indicando que outro alvo possa estar envolvido na ação ao nível molecular. Como relatado no *Capítulo 1*, também não houve correlação entre a atividade tripanomicida e liberação de NO. Como mencionado no *Capítulo 1*, estudos diretamente do parasita serão realizados para avaliar a correlação com a liberação de NO, estabelecendo ou não este como outro mecanismo de ação dos compostos planejados.

2.3.2. ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS

Dos quinze compostos em estudo, aqueles contendo metila como substituinte no anel furoxano (**1-8**) mostraram menores valores de E_{TOTAL} (somatória de todas as contribuições energéticas, as quais correspondem à energia potencial total) (entre 4,1852 kcal/mol e 19,3362 kcal/mol). O composto **8** foi o mais energeticamente favorável, apresentando atividade tripanomicida intermediária, e o pior inibidor da cruzaína. Por outro lado, o composto mais ativo contra o parasita, **6**, foi o mais energeticamente desfavorável na série com substituinte metila. Em contraste, compostos com fenila como substituinte no anel furoxano (**9-15**) mostraram maiores valores de E_{TOTAL} (entre 22,9062 kcal/mol e 35 kcal/mol) e o substituinte fenila foi, em geral, desfavorável para a atividade em amastigota (vide *Capítulo 1*). Curiosamente, composto **9**, o qual apresenta valor energético desfavorável (32,2435 kcal/mol), é o composto mais ativo perante a cruzaína. Esta falta de correlação está de acordo com a hipótese da existência de outro mecanismo de ação que pode estar envolvido na atividade antiparasitária.

Todas as propriedades moleculares ou descritores calculados estão apresentados no *Anexo II*.

Os resultados do PCA provenientes da análise exploratória de dados estão apresentados na *Figura 2.1*. De acordo com a seleção de fatores (*Figura 2.1-A*), os dois primeiros fatores ou PC (componentes principais) discriminaram 80,94% do total de variância dos dados originais (descritores ou propriedades moleculares), sendo que o PC1 ou fator 1 explicou 54,56% e o PC2 ou fator 2 descreveu 26,38%. Ambos PC podem ser considerados como representativos na análise da série de compostos por este estudo. PC3, PC4, PC5 e PC6 descreveram apenas 8,28%, 4,86%, 3,43% e 1,81%, respectivamente (*Figura 2.1-A*), do total de variância dos dados originais, significando que eles não têm influência significativa no processo de discriminação e, desta forma, eles não foram considerados na discussão.

De acordo com o *score plot* (*Figura 2.1-B*) dois PC (1 e 2) são capazes de classificar os compostos com base na similaridade das características estruturais. Compostos pertencentes às Séries I e II (Subgrupos A e B, respectivamente) são classificados da seguinte forma: A1/B1 = compostos com

anel furano (**1** e **9**); A2/B2 = compostos sem substituinte no anel ligado ao grupo acila. (**2**, **3**, **13** e **15**); A3/B3 = Compostos com halogênios (**4**, **5**, **10** e **11**); A4/B5 = compostos com grupo nitro (**6**, **7**, **12** e **14**); B4 = compostos com anel fenilantranílico.

PC1 classificou os compostos em duas séries I e II (substituintes metila e fenila no anel furoxano, respectivamente). A Série I contém os compostos com substituintes metila (**1-7**), e substituintes menos volumosos, com exceção do composto **8**. A Série II compreende os derivados contendo substituinte fenila (**9-15**), sendo mais volumosos em relação àqueles que apresentam o grupo metila. Como mencionado anteriormente, a única exceção é o composto **8**, que apresenta substituinte metila no anel furoxano, porém, no outro lado da molécula há um grupo fenila no anel antranílico. Tal fato mostra que os compostos são divididos em termos de volume da molécula como um todo, não apenas pelo tipo de substituinte no anel furoxano. Isto confirma, de certa forma, a discussão realizada anteriormente.

Os compostos dotados de maior atividade biológica (**6**, IC_{50} = 2,88 µM em amastigota e **7** IC_{50} = 2,2 µM na cruzaína) foram encontrados na parte superior central do PC1 (valores positivos). O gráfico de *loading* (*Figura 2.1-C*) contém informações sobre quais descritores ou propriedades moleculares apresentam maiores influências na discriminação dos compostos. No PC1, ou fator 1, (54,56%) propriedades topológicas (índice *randic* e índice *harary*) e estéricas/geométricas (MSA e ASA) e eletrônicas (átomo1 e GAP H-L) são as propriedades moleculares que mais influenciaram na classificação.

Fatores de seleção

	Variância	Porcentagem	Cumulativo
Fator 1	68.75	54.56	54.56
Fator 2	33.24	26.38	80.94
Fator 3	10.43	8.28	89.22
Fator 4	6.12	4.86	94.08
Fator 5	4.33	3.43	97.52
Fator 6	2.28	1.81	99.32

Valores de loading

	Fator 1	Fator 2
Randic index	0.43	-0.12
Harary index	0.44	-0.01
PSA	0.12	0.56
MSA	0.44	-0.02
ASA	0.41	0.09
GAP H-L	0.02	0.57
Atom 1	0.16	0.50
Atom 10	0.28	-0.20
LogP_Marv	0.3	-0.20

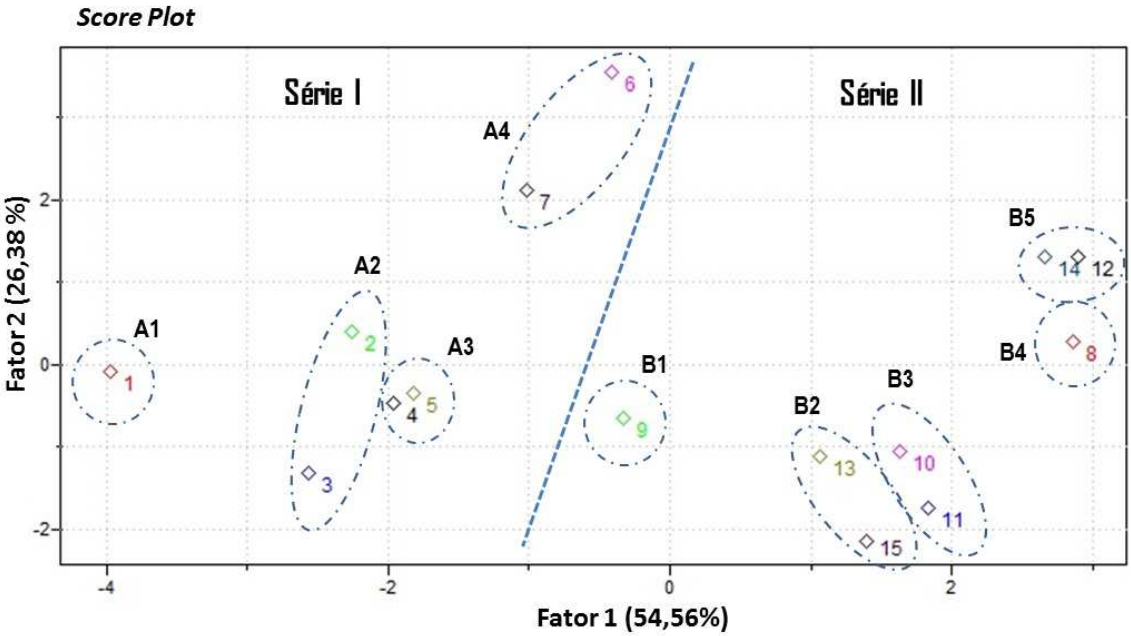


Figura 2.1: Resultados da PCA: **A** fatores de seleção, **B** *scores plot* e **C** valores de *loading*. O sistema molecular foi classificado em Séries I e II de acordo com as características estruturais similares. Série I e Série II (Subgrupo A e B, respectivamente) são classificadas da seguinte forma: A1/B1 = compostos com anel furano (**1** e **9**); A2/B2 = compostos sem substituinte ligado no grupo acil (**2**, **3**, **13** e **15**); A3/B3 = compostos com halogênio (**4**, **5**, **10** e **11**); A4/B5 = compostos com grupo nitro (**6**, **7**, **12** e **14**); B4 = compostos com anel fenilantranílico.

No HCA (*Figura 2.2*) as distâncias entre os pares de amostras ou variáveis foram calculadas e comparadas. Quando a distância entre as amostras é relativamente pequena, isto implica similaridade, e quando, pelo contrário, as amostras estão separadas por uma distância significativamente grande, isto implica dissimilaridade. Por essa abordagem, geraram-se quatro conjuntos: **A** com 61% de similaridade (os derivados mais volumosos – **9**, **10**, **11**, **13** e **15**); **B** com 56% de similaridade (os compostos mais volumosos **8**, **12** e **14**); **C** com 73% de similaridade (os derivados menos volumosos **6** e **7**, os quais se mostraram os mais ativos perante amastigota e cruzaína, respectivamente), **D** com 59% de similaridade (os derivados menos volumosos **1**, **2**, **3**, **4** e **5**). Considerando a atividade anti-*T. cruzi* também como uma variável independente, o dendrograma de variáveis (*Figura 2.3*) mostrou as propriedades estérica/geométrica (PSA) e eletrônica (átomo1 e GAP H-L) como as que apresentaram maior influência sobre a atividade tripanomicida. Além disso, o *plot* de amostras residuais versus distância de *Malahanobis* (*Figura 2.4*) foi também gerado, mostrando que não encontraram amostras atípicas. O limiar de amostra residual é baseado em 95%, significando que as propriedades calculadas foram suficientes para descrever as características estruturais do sistema como um todo.

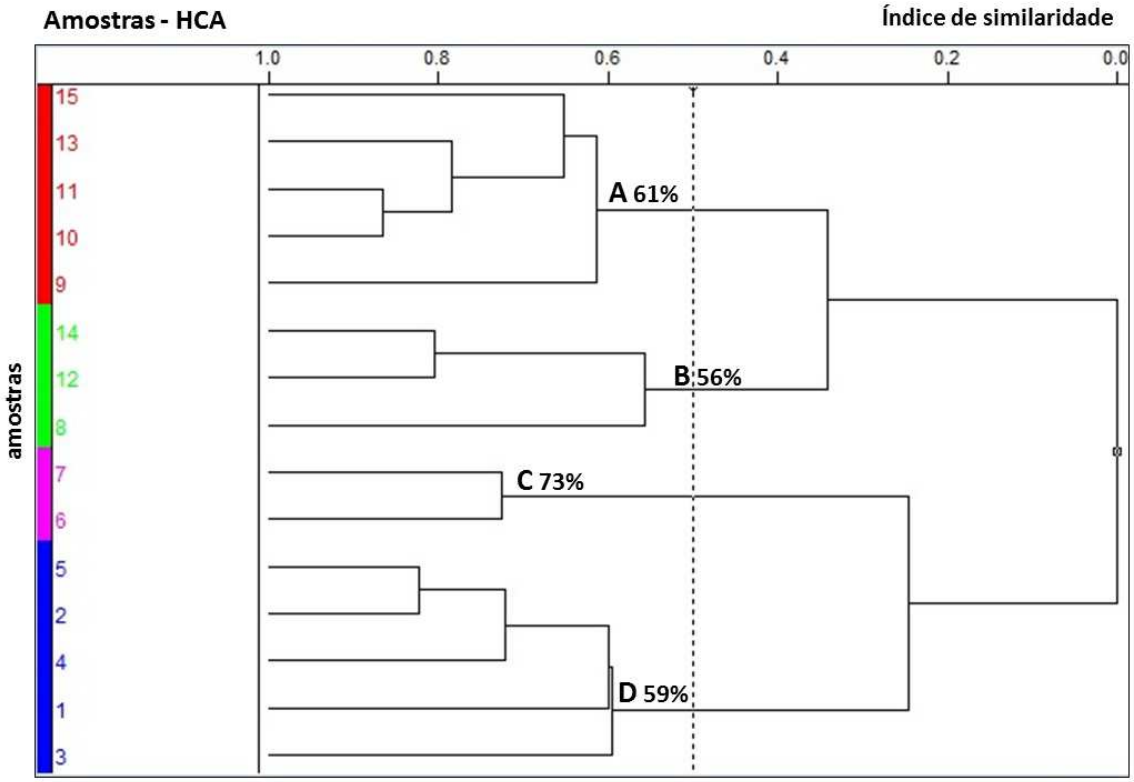


Figura 2.2: Dendrograma encontrado para amostras do HCA. Considerando um cursor de similaridade (linha tracejada).

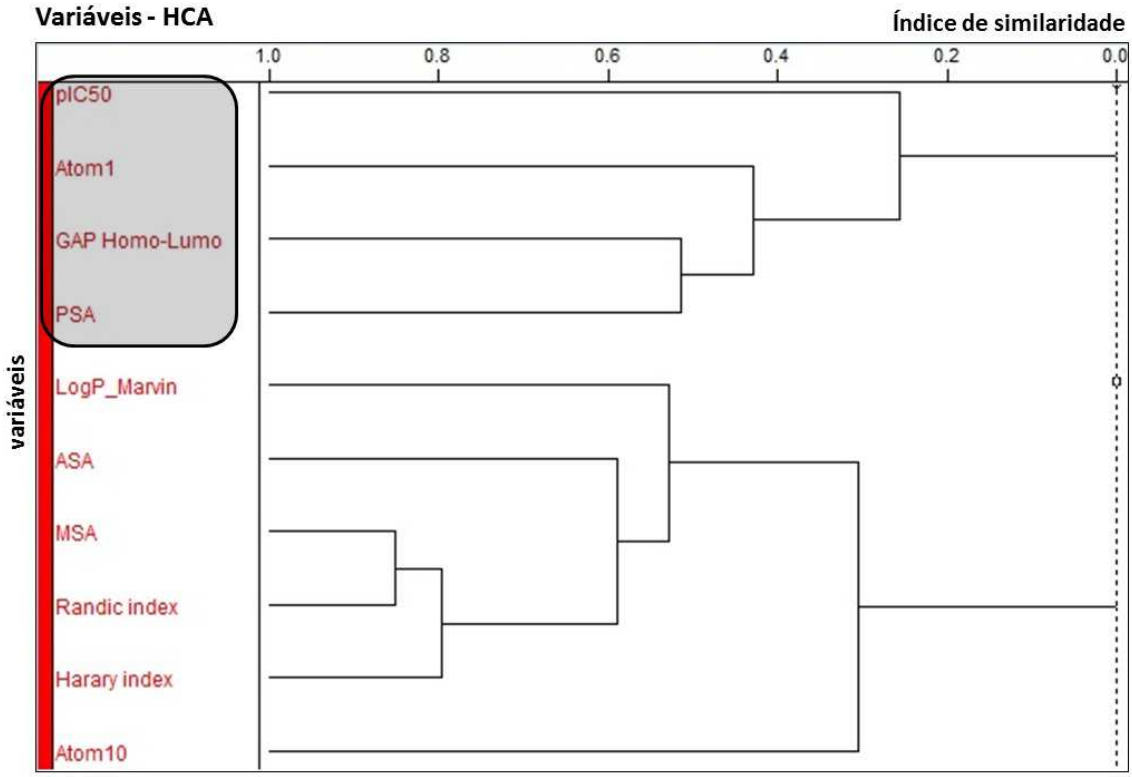


Figura 2.3: Dendrograma encontrado para propriedades moleculares do HCA considerando atividade tripanomicida (PIC_{50}) como uma variável independente.

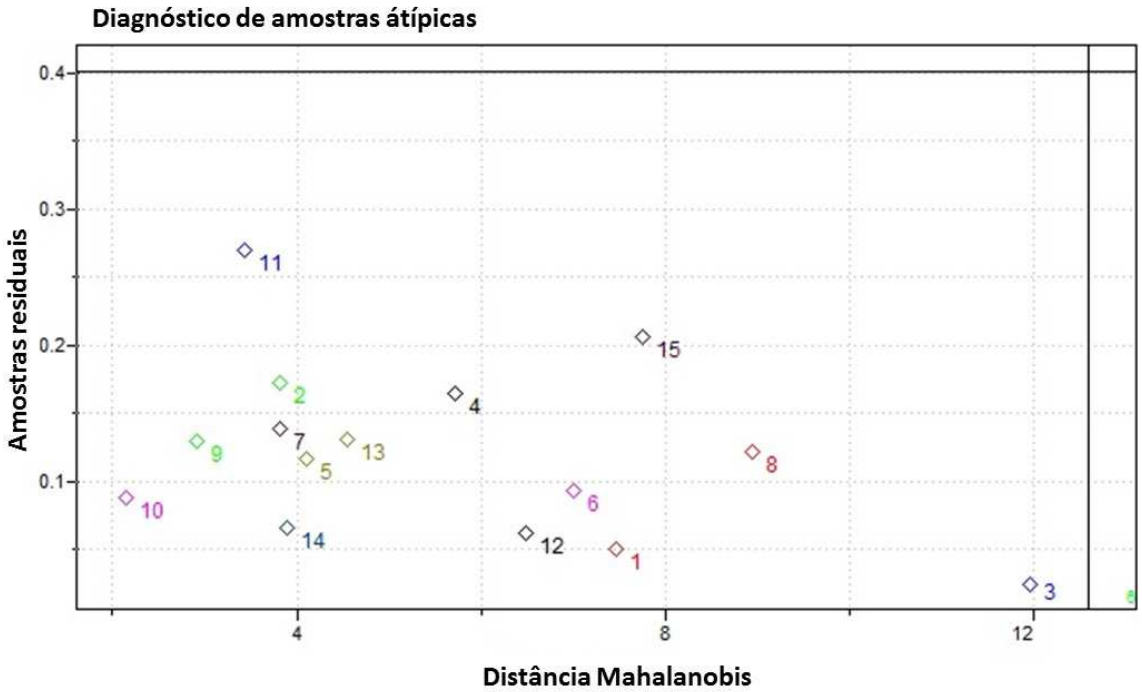


Figura 2.4: *Plot* do diagnóstico de amostras atípicas através de amostras residuais versus distância de Mahalanobis.

Por meio da inspeção visual do MEP (mapa de potencial eletrostático) (*Figuras 2.5 e 2.6*), que mostra as informações a respeito da distribuição da densidade eletrônica ao redor da molécula, é possível observar uma carga parcial negativa (cor vermelha) ao redor do grupo nitro do composto **6** (mais ativo em amastigota), ausente no composto não substituído **2** (menos ativo em amastigota). Na análise da distribuição dos orbitais de fronteira (HOMO/LUMO) é possível observar uma distribuição inversa para cada tipo de orbital nas regiões das moléculas (*Figuras 2.5 e 2.6*). Em **2** a distribuição de HOMO é maior próximo aos grupos fenila e acila e, para a distribuição de LUMO, a distribuição é maior próxima ao anel furoxano. Em contrapartida, para o composto **6**, a distribuição de HOMO é maior próxima ao anel furoxano e a distribuição de LUMO é maior próxima dos grupos *p*-nitro-fenila e acila. Além disso, a área de superfície polar (PSA) é substancialmente diferente entre essas moléculas. No composto **6** PSA é uma vez e meia maior do que no composto **2** (138,77 Å e 92,95 Å, respectivamente).

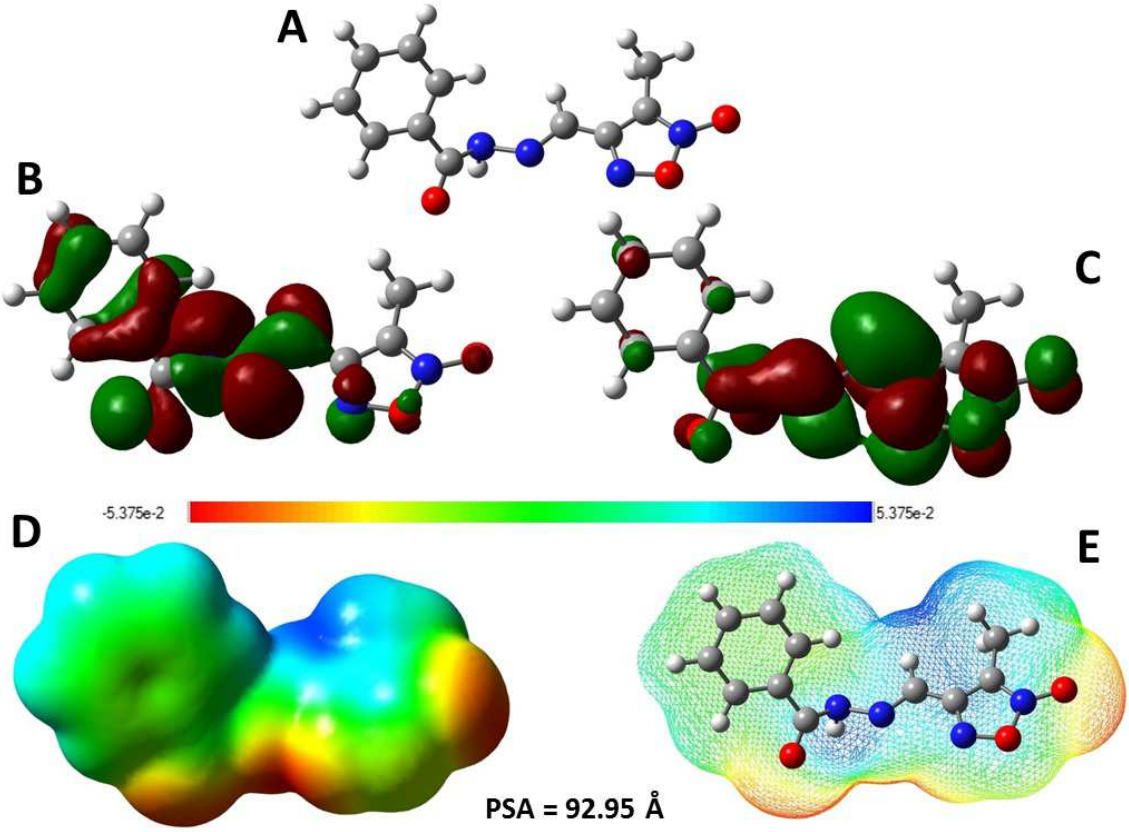


Figura 2.5: Visualização de propriedades topológicas e eletrônicas para o composto inativo em amastigota **2**. **A**: Os modelos 3D estão apresentados no modelo bola e palito (átomos de carbonos estão na cor cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco). Os orbitais moleculares de fronteira (**B**: HOMO e **C**: LUMO) e **D**/**E**: mapas de potencial eletrostático (MEP) foram calculados usando o programa Gaussian.

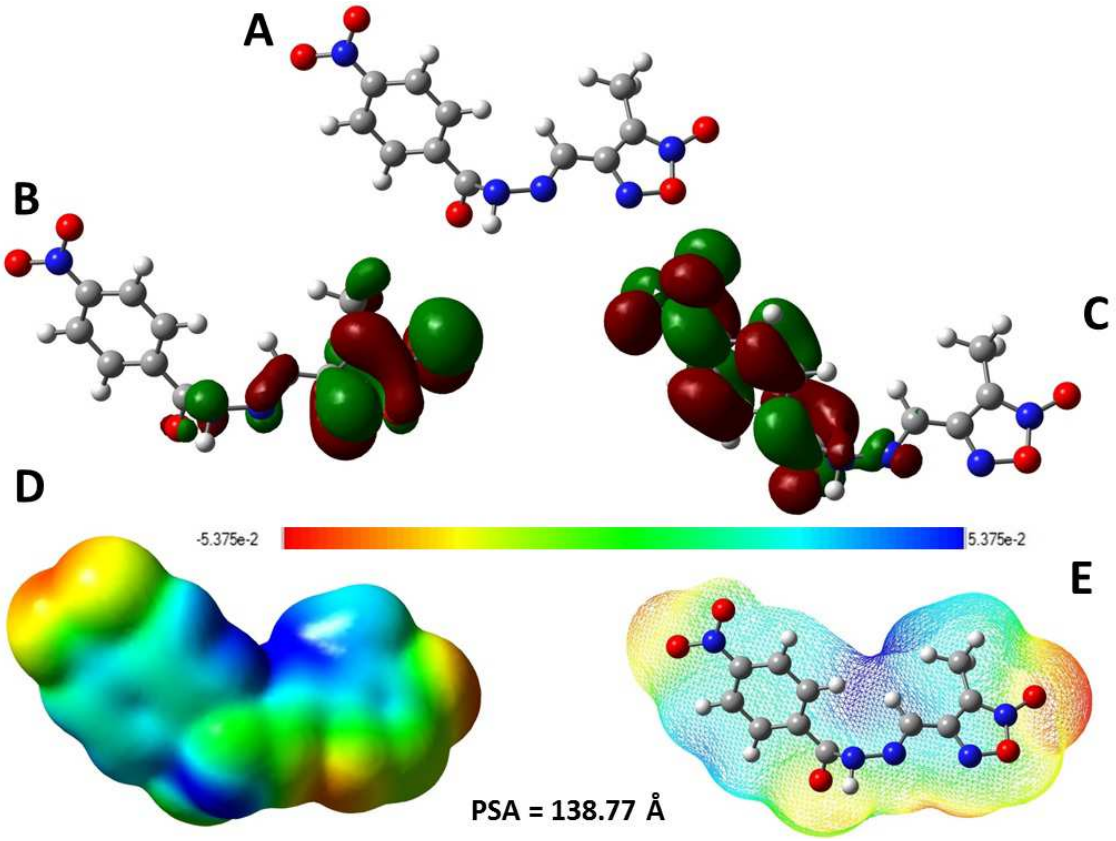


Figura 2.6: Visualização de propriedades topológicas e eletrônicas para o composto mais ativo em amastigota **6**. **A**: Os modelos 3D estão apresentados no modelo bola e palito (átomos de carbonos estão na cor cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco). Os orbitais moleculares de fronteira (**B**: HOMO e **C**: LUMO) e **D**/**E**: mapas de potencial eletrostático (MEP) foram calculados usando o programa Gaussian.

Esses resultados apresentados também confirmam o que foi discutido na análise dos dados de inibição da cruzaína.

3.3. ***DOCKING***

Com o intuito de obter o melhor entendimento possível a respeito da interação ligante-receptor das *N*-acilidrazonas com o alvo biomacronolecular considerado (cruzaína), estudos de *docking* foram realizados usando o inibidor enzimático mais potente, **7**, e o composto tripanomicida mais potente, **6**. A energia de afinidade entre ambos os ligantes com a molécula alvo foi basicamente a mesma (**7**, 6,0 kcal/mol e **6**, 5,8 kcal/mol). O grupo imina (centro eletrofílico) de ambas as moléculas está suficientemente próximo para sofrer um ataque nucleofílico do resíduo Cys25 (*Figura 2.7 e 2.8*; **7**, 3,7 Å e **6**, 3,8 Å)

(ROMEIRO et al., 2009), entretanto, a principal diferença entre ambas as moléculas é que no composto **7** o grupo nitro na posição *meta* estabelece uma ligação de hidrogênio com um resíduo de glutamina, Gln-19, no interior do sítio catalítico da cruzaína (*Figura 2.7*). Quando o grupo nitro está na posição *para*, não há possibilidade de estabelecer esta interação com o alvo, uma vez que o grupo *p*-nitro está posicionado no lado oposto comparado com o grupo na posição meta (*Figuras 2.8 e 2.9*). Os estudos de *docking* estão de acordo com os estudos de inibição enzimática. Como mencionado anteriormente, a posição do grupo nitro exerce mais influência na atividade enzimática do que o efeito eletrônico, como previamente analisado pelo efeito σ.

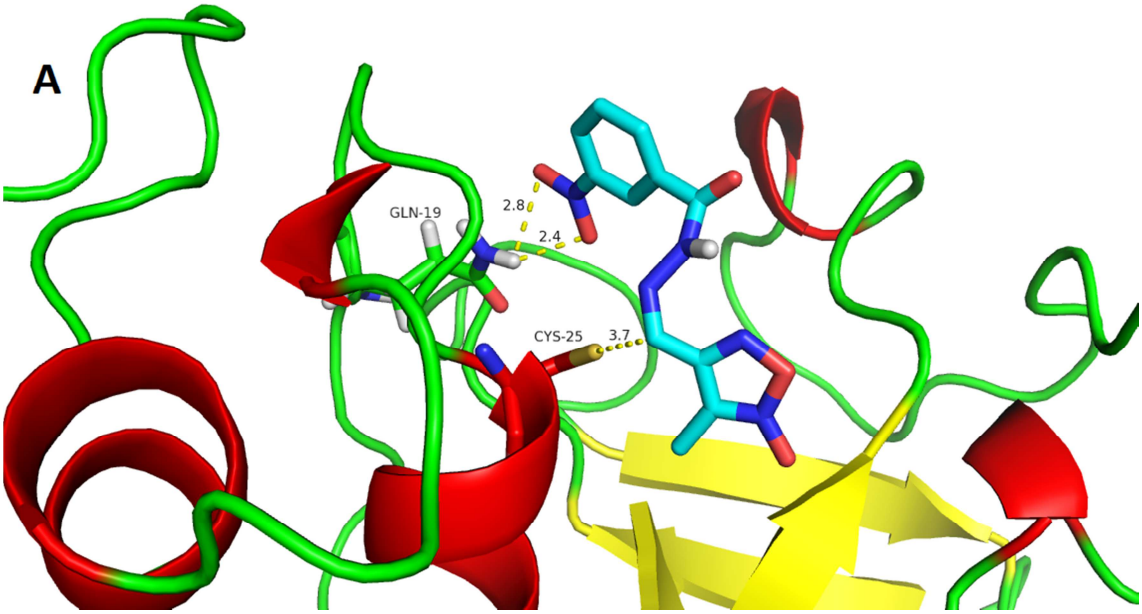


Figura 2.7: A melhor pose obtida pelo *docking* com o programa Autodock 4.2. para o composto **7** com a cruzaína (código PDB: 3I06). Ligações de hidrogênio e região sensível ao ataque nucleofílico estão representadas com linhas tracejadas em amarelo. A Figura foi preparada usando o programa Pymol.

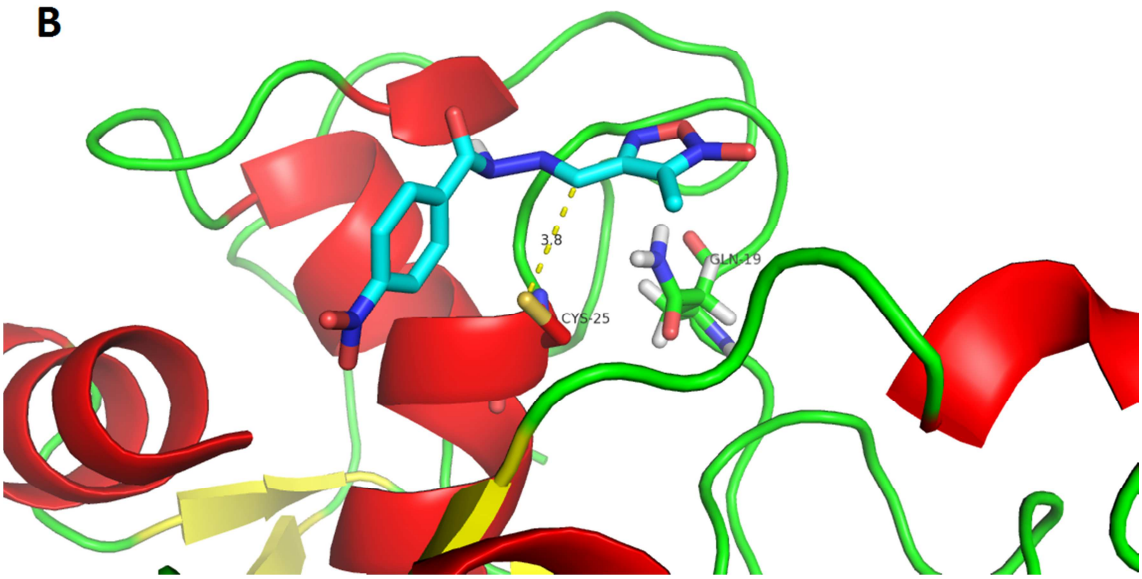


Figura 2.8: A melhor pose obtida pelo *docking* com o programa Autodock 4.2. para o composto **6** com a cruzaína (código PDB: 3I06). Região sensível ao ataque nucleofílico está representada com linha tracejada em amarelo. A Figura foi preparada usando o programa Pymol.

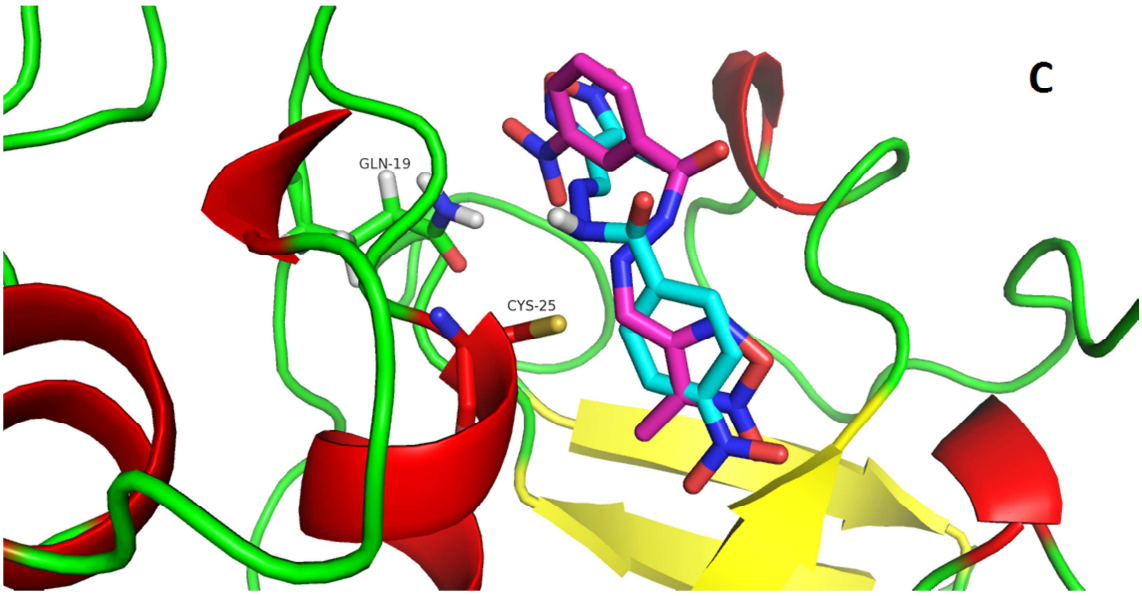


Figura 2.9: Superposição das melhores poses obtidas pelo *docking* com o programa Autodock 4.2. para os compostos **6** e **7** com a cruzaína (código PDB: 3I06). A Figura foi preparada usando o programa Pymol.

2.3.4. ANÁLISE DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR

Para o composto maior potência na atividade tripanomicida, **6**, realizou-se avaliação complementar do ciclo celular em células humanas HepG2 por citometria de fluxo. Células foram expostas ao composto **6** em concentrações que variaram entre 3 e 96 µM durante 24 h.

Dados estão apesentados na *Figura 2.10*, mostrando que não há efeito deste composto no ciclo celular em células HepG2, incluindo a fração de células com DNA fragmentado (sub-G1). Esses resultados reiteram o baixo potencial citotóxico deste composto para células HepG2, de acordo com os dados de citotoxicidade relatados no *Capítulo 1*.

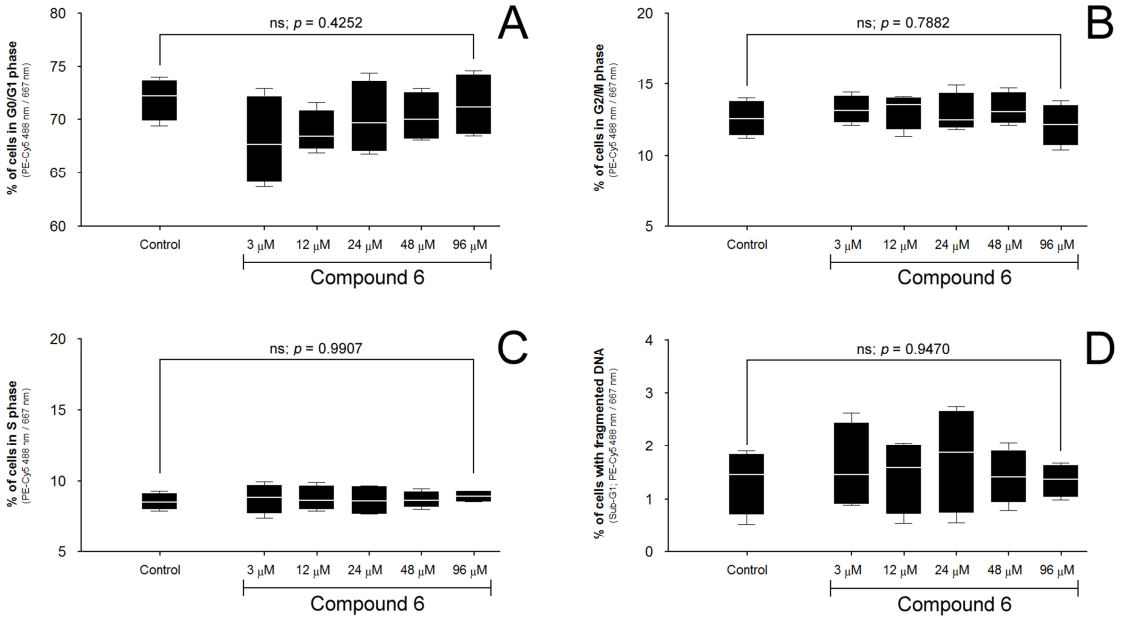


Figura 2.10: Análise do ciclo celular de células HepG2 expostas ao composto **6** em concentração que varia de 3 a 96 µM durante 24 horas. Dados são madianas e intervalo interquantil, com valores mínimos e máximos, de experimentos conduzidos em quadruplicata. *One Way* ANOVA, **A**: células em G0/G1; **B**: células em G2/M; **C**: células em S; **D**: células em Sub-G1, com DNA fragmentado.

2.4. CONCLUSÕES

Os quinze compostos estudados foram divididos em duas séries, **A** e **B**, dependendo do substituinte no anel furoxano. Estes foram analisados baseados na influência do parâmetro eletrônico σ de Hammet dos substituintes, comparando compostos de ambas as séries. Influências eletrônicas e estéricas foram identificadas, porém, com maior intensidade das últimas.

O composto **7** com o grupo nitro na posição *para* foi o mais potente inibidor da cruzaína, embora tenha apresentado moderada atividade tripanomicida. O oposto foi encontrado para o composto **6**, com o grupo nitro na posição *para*, o qual teve a mais alta atividade tripanomicida e moderada inibição da cruzaína. De forma geral, compostos com grupo metila ligado ao anel furoxano mostraram-se mais ativos do que aqueles com grupo fenila. Entretanto, a inibição da cruzaína não deve ser o único mecanismo de ação.

Os estudos quimiométricos (PCA e HCA) dos quinze compostos híbridos bioisostéricos contendo grupos *N*-acilidrazona e furoxano, previamente planejados e sintetizados, foram realizados para identificar quais são as propriedades moleculares que mais influenciam na atividade biológica. Propriedades estéricas/geométricas (PSA) e eletrônicas (átomo1 e GAP-H-L) foram encontradas como as de maior relevância. Esses resultados estão de acordo com os dados experimentais.

Estudos de *docking* mostraram que a posição do grupo nitro no ligante é importante para a interação com a cruzaína. Quando este grupo está na posição *meta*, composto **7**, há ligação de hidrogênio importante com o resíduo de Gln-19 no sítio catalítico. Embora, pelos estudos de *docking*, ocorra a interação dos ligantes com a cruzaína, outros mecanismos de ação podem estar envolvidos, como, por exemplo, a redução do grupo nitro, quando está na posição *para*, interferindo no sistema redox do parasita e, atuando de forma sinérgica. Futuros estudos são necessários para se obter dados mais robustos que confirmem esta hipótese.

Estudos adicionais de citotoxicidade do composto mais promissor, **6**, mostraram que ele não altera de forma significativa o ciclo celular em HepG2. Esses resultados, juntamente com os anteriores (*Capítulo 1*), mostram que o derivado **6** é um composto líder promissor para futuros estudos *in vivo*.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, F. H. The Cambridge structural database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallogr. B*, v. 58, p. 380-388, 2002.

BORCHARDT, D. M.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA, L. D.; NUNES, R. J.; OLIVA, G.; YUNES, R. A. ANDRICOPULO, A. D. Biochemical evaluation of a series of stnthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. *J. Braz. Chem. Soc*., v. 21, p. 142-150, 2010.

EAKIN, A. E.; MILLS, A. A.; HARTH, G.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem*., v. 267, p. 7411-7420, 1992.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Quim. Nova*, v. 22, p. 724-731, 1999.

FORSYTHE, K. H.; HOPFINGER, A. J. The influence of solvent on the secondary structures of poly(L-alanine) and poly(L_proline). *Macromolecules*, v. 6, p. 423-437, 1973.

JUDICE, W. A. S.; CEZARI, M. H. S.; LIMA, A. P. C. A.; SCHARFSTEIN, J.; CHAGAS, J. R.; TERSARIOL, I. L. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Comparison of the specificity, stability and individual rate constants with respective activation parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinant form, cruzain, from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem*., v. 268, p. 6578-6586, 2001.

LI, R.; KENYON, G. L.; COHEN, F. E.; CHEN, X.; GONG, B.; DOMINGUEZ, J. N.; DAVIDSON, E.; KURBAN, G.; MILLER, R. E.; NUZUM, E. O.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H. *In vitro* antimalarial activity of chalcones and their derivatives. *J. Med. Chem*., v. 38, p. 5031-5047, 1995.

MCGRATH, M. E.; EAKIN, A. E.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas´ disease. *J. Mol. Biol*., v. 247, p. 251-259, 1995.

MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Curr. Drugs Targets*, v. 10, p. 212-231, 2009.

MOTT, B. T.; FERREIRA, R. S.; SIMEONOV, A.; JADHAV, A.; ANG, K. K.; LEISTER, W.; SILVEIRA, M.; SILVEIRA, J. T.; DOYLE, P. S.; ARKIN, M. R.; MCKERROW, J. H.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; THOMAS, C. J.; SHOICHET, B. K.; MALONEY, D. J. Identification and optimization of inhibitors of trypanosomal cysteine protease: cruzain, rhodesain, and tBcATb. *J. Med. Chem*., v. 53, p. 52-60, 2010.

ROMEIRO, N. C.; AGUIRRE, G.; HERNANDEZ, P.; GONZALEZ, M.; CERECETTO, H.; ALDANA, I.; PEREZ-SILANES, S.; MONGE, A.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinaxoline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. *Bioorg. Med. Chem*., v. 17, p. 641-652, 2009.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. method. *J. Comput. Chem*., v. 10, p. 209-220, 2004.

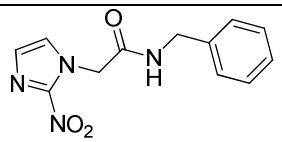
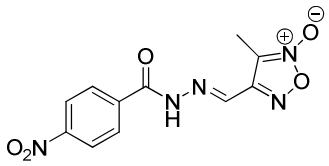
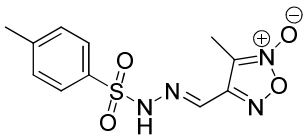
CAPÍTULO 3

ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO LÍDER...

3.1. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

No *Capítulo 1*, além dos quinze derivados de *N*-acilidrazona, foi, também, sintetizado um derivado sulfonilidrazônico (**17**). Na *Tabela 3.I*, está a comparação dos resultados entre os compostos **17**, **6** e o fármaco referência.

Tabela 3.I: Comparação entre a molécula **17**, **6** e o benznidazol.

ESTRUTURA MOLECULAR	*ATIVIDADE TRIPANOMICIDA (IC_{50} - µM) – FORMAS AMASTIGOTAS*	*CITOTOXICIDADE (IC50 - µM) EM CÉLULAS HUMANAS - HepG2*	ÌNDICE DE SELETIVIDADE
 **Benznidazol** **(fármaco referência)**	1,50 ± 0,35	28,1	18,7
 **6**	2,88 ± 0,38	80,9	28,09
 **17**	1,55 ± 0,31	>96	>61,9

O composto **17** apresentou atividade tripanomicida maior do que o composto **6** e muito similar ao do **Bzd**, e, além disso, seu índice de seletividade foi maior do que o **6** e três vezes superior do que ao fármaco de referência, mostrando, assim, um perfil de toxicidade bem inferior. A OMS (Organização Mundial de Saúde) preconiza que o índice de seletividade de um fármaco deva

ser superior a 50, o que ressalta mais ainda a relevância do valor obtido com o composto **17**.

Com esses resultados, o grupo sulfonilidrazona mostrou-se como alteração importante a ser realizada no composto **6**, portanto, com objetivo de otimizar a sua estrutura, além da substituição bioisostérica do grupo acilidrazona por sulfonilidrazona, variação do sistema anelar também será realizado (*Figura 3.1*).

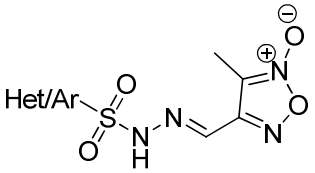


Figura 3.1: Esqueleto molecular geral dos derivados sulfonilidrazônicos.

Na tentativa de aumentar o número de moléculas em estudo explorando outro grupo liberador de NO e seu potencial tripanomicida, série contendo éster nitrato (conhecido grupo liberador de NO) foi também planejada (*Figura 3.2*).

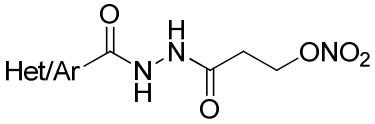


Figura 3.2: Esqueleto molecular geral dos derivados de éster nitrato.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. <u>SÍNTESE (SÉRIE SULFONILIDRAZONA)</u>

Os métodos de análise estão descritos no *ANEXO I*. A *Figura 3.3* mostra a rota sintética utilizada.

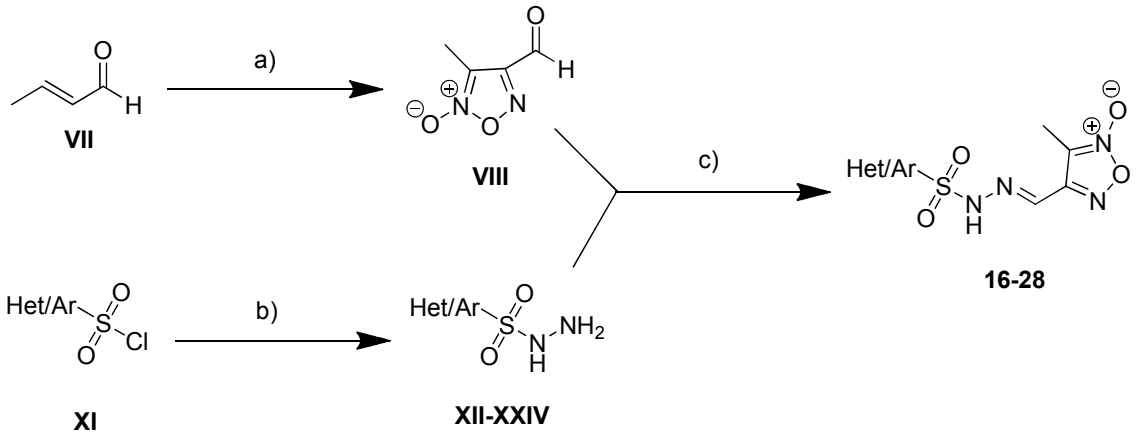
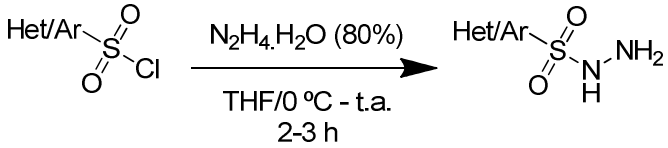


Figura 3.3: Rota sintética para obtenção dos derivados sulfonilidrazônicos. Condições reacionais: a) $NaNO_2$(aq), AcOH/14 ºC, 1 h; b) N_2H_4 80% (aq), THF/0 ºC, c) C_2H_5OH, H^+/refluxo.

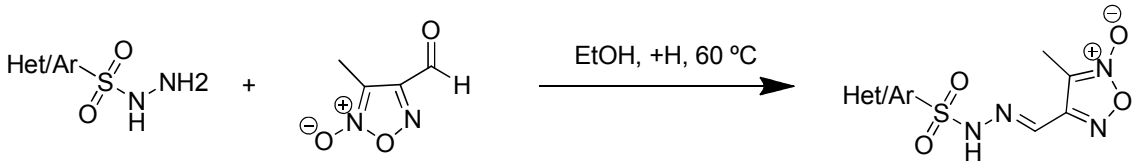
3.2.1.1. Procedimento geral para a síntese das sulfonilidrazidas intermediárias (XII-XXIV)



Esquema 3.I: Formação das sulfonilidrazidas intermediárias.

À solução de 25 mmol de hidrazina hidrata (80%) e tetraidofurano (4 mL), sob agitação a 0 ºC, adicionaram-se, bem lentamente, 10 mmol do respectivo cloreto de sulfonila. Após 2 a 3 horas do término da adição, a reação foi cessada e juntaram-se 4 mL de água ao meio reacional, mantendo-se sob refrigeração durante 24 horas. Em seguida, o sólido resultante foi filtrado e lavado com água gelada, resultando no produto puro final.

3.2.1.2. Procedimento geral para a síntese das sulfonilidrazonas (16-28)



Esquema 3.II: Formação das sulfonilidrazonas.

Para a síntese das sulfonilidrazonas utilizou-se o mesmo procedimento geral de síntese das *N*-acilidrazonas (item 1.2.1.4. do *Capítulo 1*).

3.2.2. <u>SÍNTESE (SÉRIE ÉSTER NITRATO)</u>

Os métodos de análise estão descritos no *ANEXO I*. A *Figura 3.4* mostra a rota sintética utilizada.

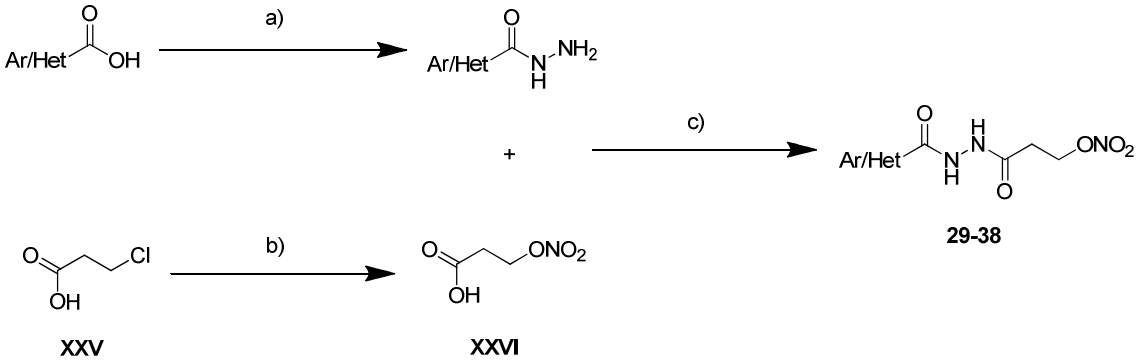
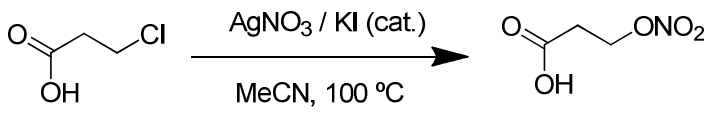


Figura 3.4: Rota sintética para obtenção dos derivados de éster nitrato. Condições reacionais: a) CH_3OH, H_2SO_4/refluxo; N_2H_4 80% aq/60 ºC; b) $AgNO_3$/KI(cat), MeCN/100 ºC; c) DCC/DMAP(cat), THF/t.a., 5 h.

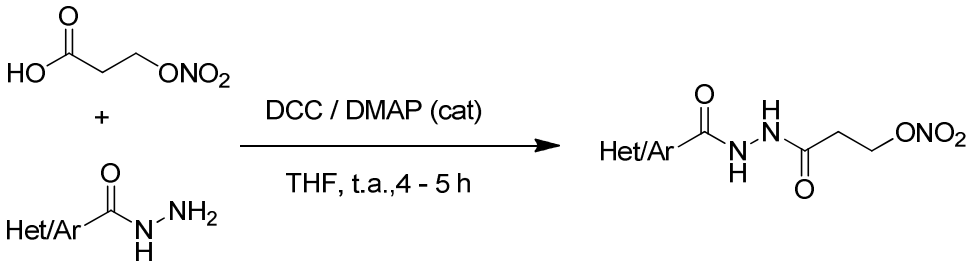
3.2.2.1. Síntese do intermediário ácido 3-(nitrooxi) propanoico



Esquema 3.III: Formação do ácido intermediário.

A mistura de ácido 3-cloro propanoico (18 mmol), nitrato de prata (73 mmol) e iodeto de potássio (50 mg, quantidade catalítica) foi mantida sob agitação, utilizando acetonitrila (80 mL) como sistema solvente, durante 72 horas, sob refluxo. Na sequência, o meio reacional foi filtrado, utilizando sílica gel, e o material resultante foi concentrado sob pressão reduzida para a formação de um óleo puro.

3.2.2.2. Procedimento geral para a síntese dos ésteres nitrato (29-38)



Esquema 3.IV: Formação dos ésteres nitrato.

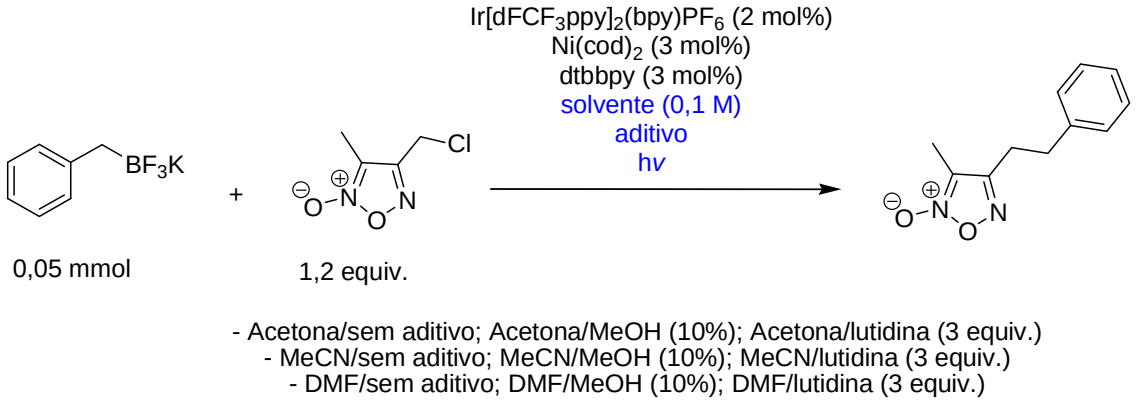
À mistura de hidrazida (2,5 mmol) e DMAP (25 mg, quantidade catalítica), tendo THF anidro (30 mL) como sistema solvente, sob agitação e temperatura ambiente, adicionou-se o ácido 3-nitrooxi propanoico (2,5 mmol) e, posteriormente, o agente condensante DCC (2,5 mmol). Após 5 horas de reação e o consumo total dos materiais de partida, realizou-se a extração do meio reacional, utilizando solução aquosa de cloreto de sódio (50 mL) e acetato de etila (50 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por coluna cromatográfica, utilizando hexano/acetato de etila (0-80 %) como sistema eluente.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. SÍNTESE (SÉRIE SULFONILIDRAZONA)

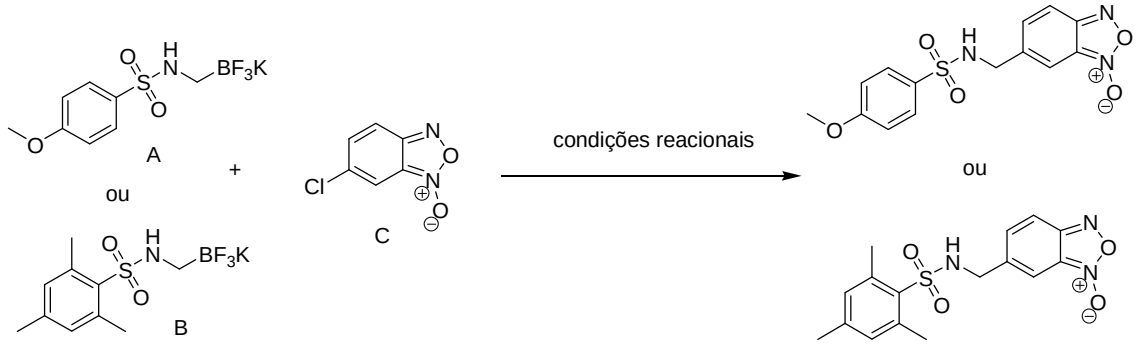
Durante o período de estágio sanduíche no exterior (*University of Pennsylvania* – UPENN, EUA, sob supervisão do Prof. Gary Molander, abril de 2014 a março de 2015) com intuito de otimizar o composto líder e aprender novos tipos de reações (química de boro), úteis em Química Medicinal, diversas tentativas sintéticas foram realizadas, porém, sem sucesso.

Inicialmente, o sistema furoxano foi submetido a reações fotorredox catalíticas (*Esquema 3.V*) sendo um modelo para avaliar o comportamento desse grupo nesse novo tipo de reação. Essa avaliação seria muito interessante pela possibilidade de realizar outras variações estruturais no núcleo furoxânico, porém, o sistema se mostrou de baixa reatividade.



Esquema 3.V: Tentativas de reações fotorredox com sistema furoxano.

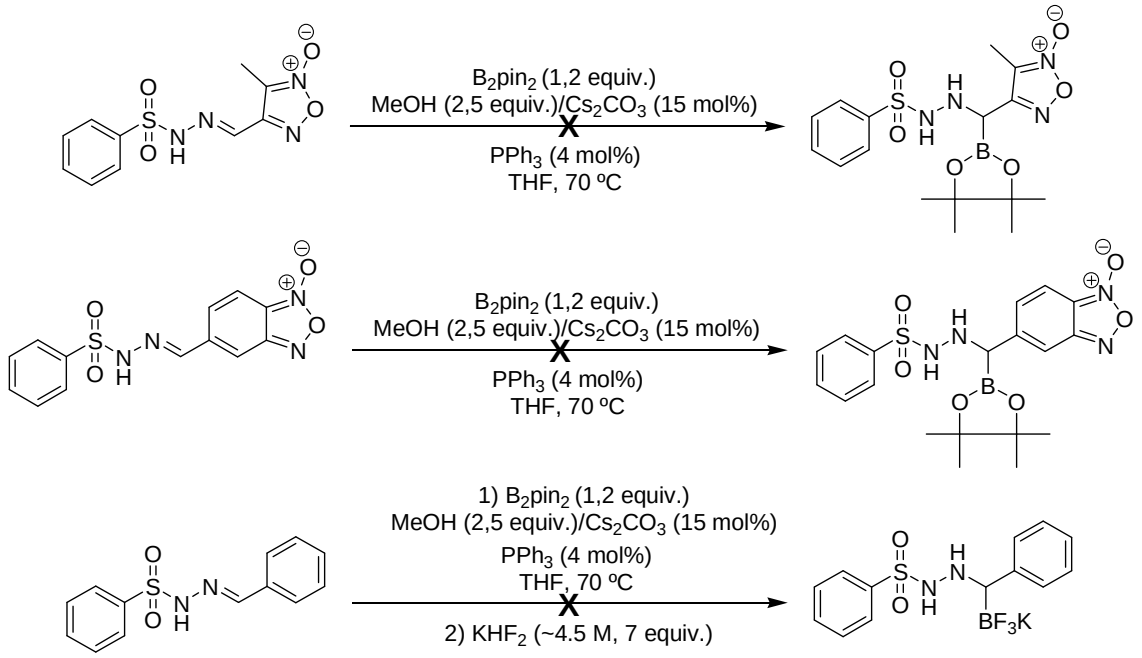
Na sequência, tentativas de reações de acoplamento convencional foram realizadas utilizando o sistema benzofuraxano, o qual poderia apresentar maior reatividade, pelo fato de o haleto estar ligado diretamente a um carbono sp^2, ao invés de sp^3, como no caso do furoxano, porém, novamente, não se obteve êxito (*Esquema 3.VI*).



Material de partida	Catalisador	Ligante	Base	Solv/Temp/Tempo	Comentários
A (1,2 equiv) + C	$Pd(MeCN)_2Cl_2$ 2 mol%	Ruphos 4 mol%	Cs_2CO_3 3 equiv	$tBuOH/H_2O$ 1:1 (0,275 M) 24 h - 100 ºC	Sem produto por gc/ms e RMN ^1H
A + C (1:1 equiv)	$Pd(dppf)Cl_2.CH_2Cl_2$ 2 mol%	----	$CsCO_3$ 3 equiv	Dioxano/H_2O 5:1 (0,275) 24 h - 100 °C	Sem produto por gc/ms e RMN ^1H
A + C (1:1 equiv)	$Pd(OAc)_2$ 2 mol%	PPh_3 3 mol%	$CsCO_3$ 3 equiv	THF/H_2O 9:1 (0,275 M) 24 h - 85 °C	Sem produto
B (1,2 equiv) + C	$Pd(MeCN)_2Cl_2$ 2 mol%	Ruphos 4 mol%	Cs_2CO_3 3 equiv	tBuOH/H2O 1:1(0,275 M) 24 h - 100ºC	Sem produto
B + C (1:1 equiv)	$Pd(dppf)Cl_2.CH_2Cl_2$ 2 mol%	----	Cs_2CO_3 3 equiv	Dioxano/H_2O 5:1 (0,275 M) 24 h - 60 °C	Sem produto por gc/ms, mas C foi encontrado.
B + C (1:1 equiv)	$Pd_2(dba)_3$ 2 mol%	RuPhos 4 mol%	Cs_2CO_3 3 equiv	Dioxane/H_2O 5:1 (0,275 M) 24 h - 60 °C	Sem produto por gc/ms e MALDI.
B + C (1:1 equiv)	$Pd(OAc)_2$ 3 mol%	XPhos 6 mol%	K_2CO_3 2 equiv	CPME/H_2O 19:1(0,275 M) 24 h - 60 °C	Sem produto por gc/ms e MALDI. C foi encontrado por gc/ms
B (1.2 equiv) + C	$Pd(MeCN)_2Cl_2$ 2 mol%	RuPhos 4 mol%	Cs_2CO_3 3 equiv	$tBuOH/H_2O$ 1:1 (0,275 M) 24 h - 60 ºC	Sem produto por gc/ms e MALDI

Esquema 3.VI: Tentativas de reações de acoplamento cruzado convencional com o sistema benzofuroxano.

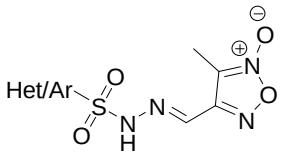
Posteriormente, com objetivo de introduzir grupamentos alquílicos e aromáticos na dupla ligação da imina, realizaram-se diversas tentativas de boração de grupos sulfonilidrazonas (*Esquema 3.VII*). Analogamente, nenhuma das tentativas obtiveram êxito.

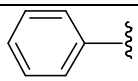
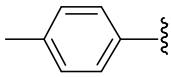
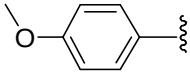
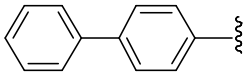
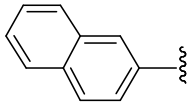
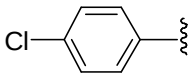
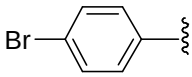
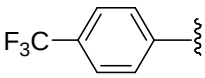
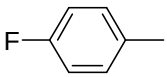
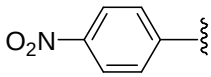
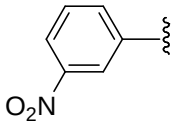
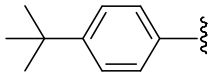
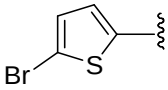


Esquema 3.VII: Tentativas de boração da dupla ligação de imina.

Os demais resultados de otimização do composto líder foram obtidos no Brasil (LAPEN – FCF/USP). A caracterização, até o momento, dos compostos sintetizados está disponível no *Anexo I*. Treze derivados híbridos bioisostéricos de sulfonilidrazonas e grupos furoxano (*Tabela 3.II*) foram sintetizados em três etapas (*Figuras 3.3*): a) formação das sulfonilidrazidas a partir de diferentes cloretos de sulfonila (**XI**); b) cilcização do crotonaldeído (**VII**); c) formação dos compostos finais (sulfonilidrazonas **16-28**). Os rendimentos das últimas etapas foram considerados ótimos, variando de 63% a 93%. Todos os compostos finais foram caracterizados, até o momento, através da determinação da faixa de fusão, cromatografia em camada delgada (CCD), RMN ^{1}H, ^{13}C e espectrometria de massas. Espectroscopia no infravermelho e análise elementar estão em andamento.

Tabela 3.II: Estrutura dos compostos sulfonilidrazônicos sintetizados

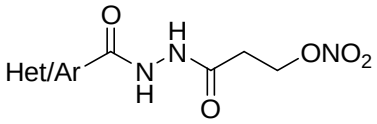


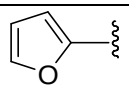
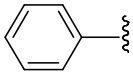
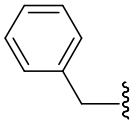
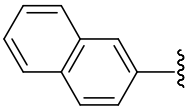
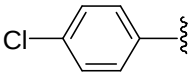
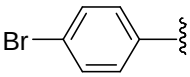
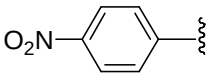
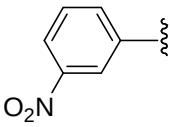
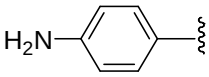
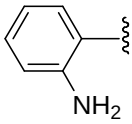
Compostos	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	

3.3.2. SÍNTESE (SÉRIE ÉSTER NITRATO)

A caracterização, até o momento, dos compostos sintetizados está disponível no *Anexo I*. Dez compostos contendo éster nitrato (*Tabela 3.III*) foram sintetizados em três etapas (*Figuras 3.4*): a) formação do ácido 3-(nitrooxi) propanoico (**XIV**) a partir do ácido 3-cloro propanoico; b) formação das hidrazidas; c) condensação para formação dos compostos finais (ésteres nitrato **29-38**). Os rendimentos da última etapa foram considerados razoáveis, variando de 27% a 55%. Todos os compostos finais foram caracterizados, até o momento, através de ponto de fusão, cromatografia de camada delgada (CCD), RMN ^{1}H, ^{13}C e espectrometria de massas. Infravermelho e análise elementar estão em andamento.

Tabela 3.III: Estrutura dos compostos contendo ésteres nitrato sintetizados



Compostos	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	

3.3.3. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA (SULFONILIDRAZONAS E ÉSTERES NITRATO)

Toda a parte de avaliação biológica desta etapa do trabalho está em andamento. A atividade tripanomicida (em amastigota), avaliação de citotoxicidade e estudos de liberação de NO estão sendo realizados no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), sob coordenação do Prof. Lúcio Holanda Godim de Freitas Júnior. Os estudos de permeabilidade celular em Caco-2 estão sendo efetuados pelo Dr. José Eduardo Gonçalves, no Laboratório de Permeabilidade de Fármacos em Culturas Celulares (LPFCC), Departamento de Farmácia da FCF/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Sílvia Storpirtis.

3.4. CONCLUSÕES

Os compostos otimizados planejados nos EUA não foram obtidos com sucesso, entretanto os derivados sulfonilidrazônicos (treze) e ésteres nitrato (dez), sintetizados aqui no Brasil, foram obtidos com êxito, num total de 23 novos compostos. Atividade tripanomicida, citotoxicidade, potencial de liberação de NO e estudos de permeabilidades estão sendo realizados pelos respectivos colaboradores.

ANEXO I

Métodos de análise e caracterização estrutural dos compostos sintetizados

1. MÉTODOS DE ANÁLISE

Todas as reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), realizadas em cromatoplacas de sílica-gel 60 GF (5-40 µM de espessura), em fases móveis adequadas. A visualização foi acompanhada através de câmera de luz ultravioleta e/ou permanganato de potássio. A faixa de fusão foi mensurada utilizando o aparelho da Büchi modelo M-565 em tubo de capilar aberto. Nos espectros no infravermelho os números de onda máximos (max) foram indicados em cm^{-1}, em aparelho de espectrometria de absorção no infravermelho MB100 Bomem. Espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C foram realizados em espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 250, 300, 400 e 500 MHz, da BRUKER, com solventes deuterados adequados, no IQ/UNICAMP e na FCF/USP. Análise elementar (C, H e N) foi determinada através do analisador da Perkin-Elmer modelo 2400, estando os valores dentro dos valores teóricos permitidos (± 0,4%). Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos através dos aparelhos da Varian modelo 2100D e da Bruker modelo MicroToF Daltonics, utilizando método de ionização por *eletrospray* (ESI).

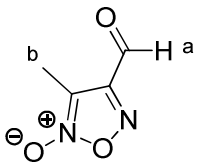
2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL – CAPÍTULO 1 (DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS)

Intermediário **VIII**

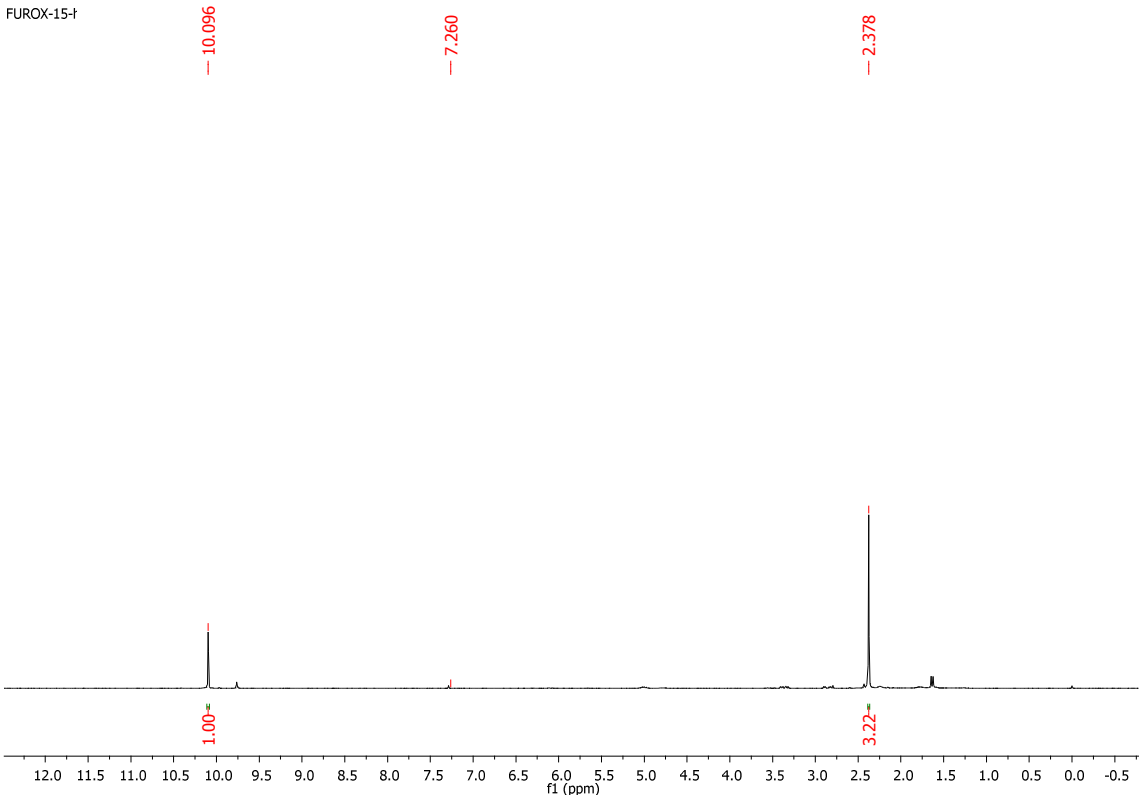
4-formil-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Óleo amarelo, que solidifica quando mantido a baixa temperatura.

40% de rendimento.



RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, δ = ppm): 10,09 (s, 1H-a); 2,37 (s, 3H-b).

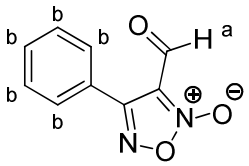


FRUTTERO, R.; FERRAROTTI, B.; SERAFINO, A.; STILO, A. D.; GASCO, A. Unsymetrically substituted furoxans: Part 11 [1]. Methylfuroxancarbaldehydes. *J. Heterocyclic Chem.*, v. 26, p. 1345-1347, 1989.

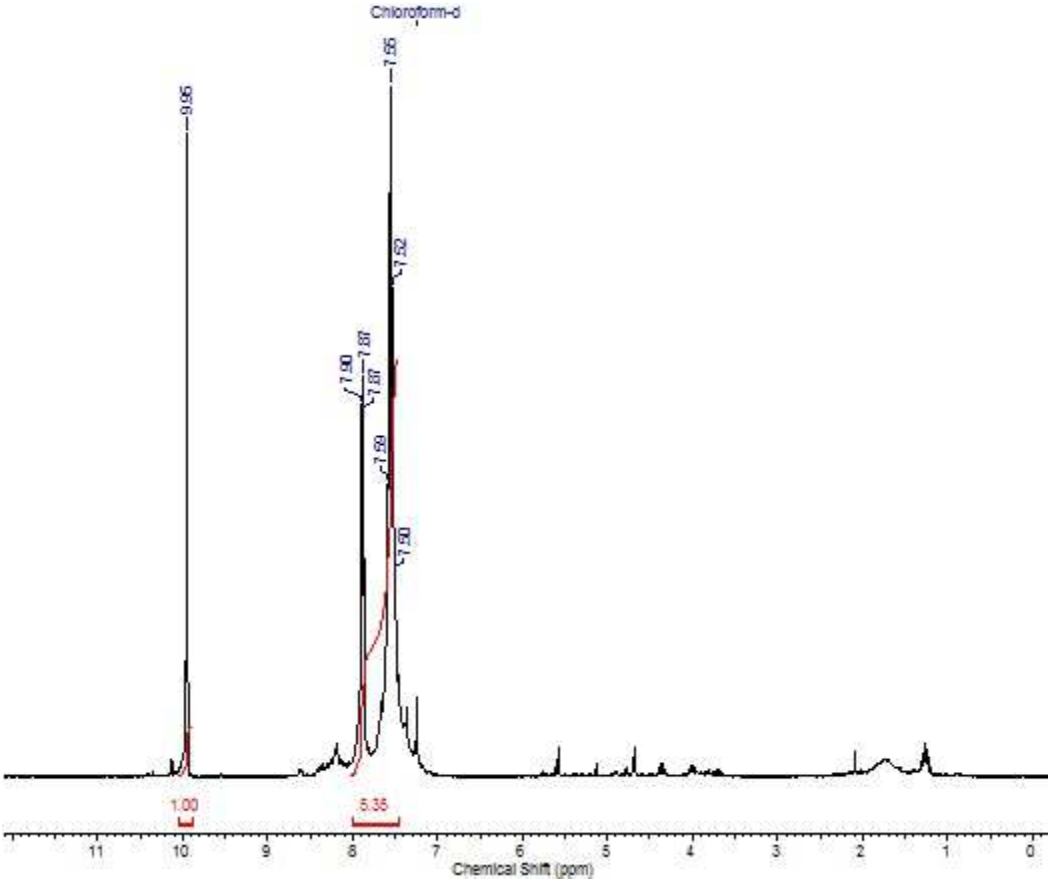
Intermediário **X**

3-formil-4-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração amarela. 77% de rendimento.



RMN ^{1}H (250 MHz, $CDCl_3$, δ = ppm): 9,96 (s, 1H-a); 7,90 – 7,50 (m, 5H-b).

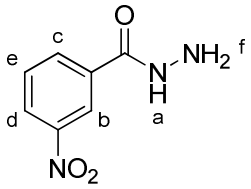


GASCO, A. M.; FRUTTERO, R.; SORBA, G.; GASCO, A. Unsymetrically substituted furoxans: XIII. Phenylfuroxancarbaldehydes and related compounds. *Liebigs Ann. Chem.*, p. 1211-1213, 1991.

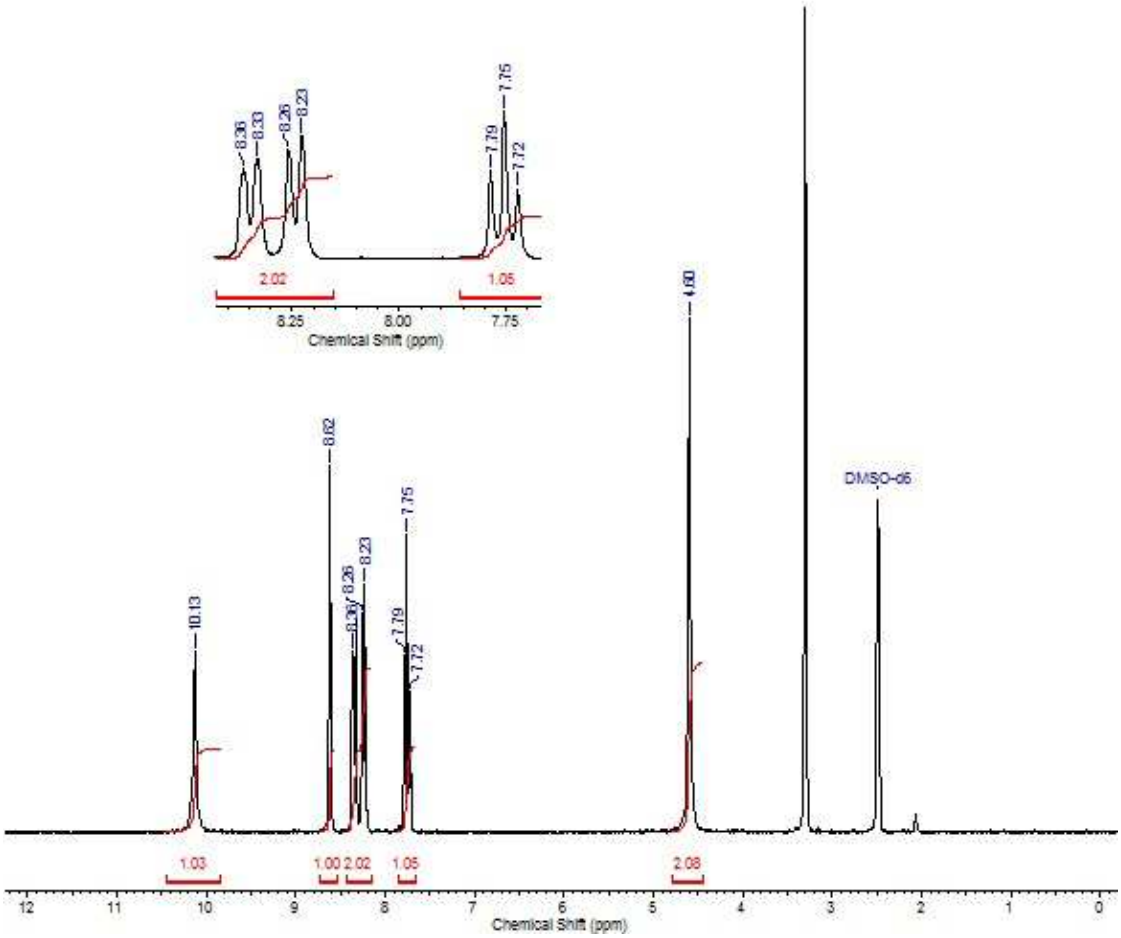
Intermediário **IV**

3-nitrobenzidrazida

Sólido de coloração branca. 74% de rendimento.



RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 10,13 (s, 1H-a); 8,62 (s, 1H-b); 8,34 (d, 1H-c, J=7,5 Hz); 8,24 (d, 1H-d, J=7,5 Hz); 7,75 (t, 1H-e, J=7,5 Hz); 4,60 (s, 2H-f).

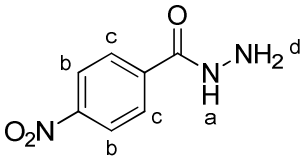


HE, H.; WANG, W.; ZHOU, Y.; XIA, Q.; REN, Y.; FENG, J.; PENG, H.; HE, H.; FENG, L. Rational design, synthesis and biological evaluation of 1,3,4-oxadiazole pyrimidine derivatives as novel pyruvate dehydrogenase complex E1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 24, p. 1879-1888, 2016.

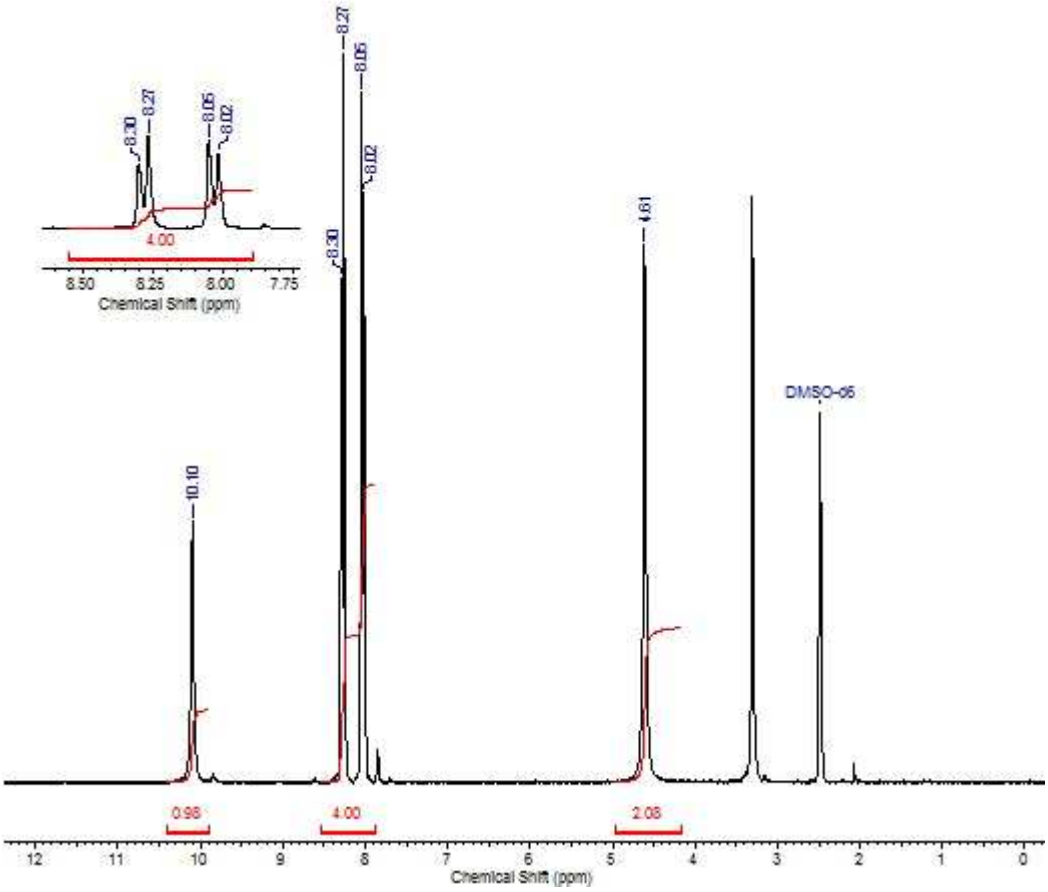
Intermediário **V**

4-nitrobenzidrazida

Sólido de coloração amarelo pálido. 86% de rendimento.



RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 10,10 (s, 1H-a); 8,28 (d, 2H-b, J=7,5 Hz); 8,04 (d, 2H-c, J=7,5 Hz); 4,61 (s, 2H-d).



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

Na análise de RMN ^{1}H dos compostos *N*-acilidrazônicos (**1-15**), os hidrogênios ligados ao nitrogênio (*N-H*) apresentaram deslocamento químico entre 12,66 e 11,73 ppm. Já os hidrogênios que fazem parte da imina (*N=C-H*) tiveram seus sinais entre 8,75 e 8,06 ppm. Na análise de RMN ^{13}C as carbonilas foram identificadas entre 154,0 e 172,7 ppm.

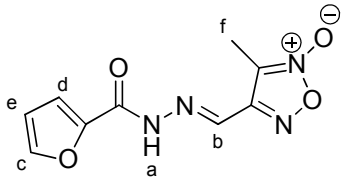
Composto **1**

3-metil-4-((2-(4-nitrobenzoil)hidrazona)metil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

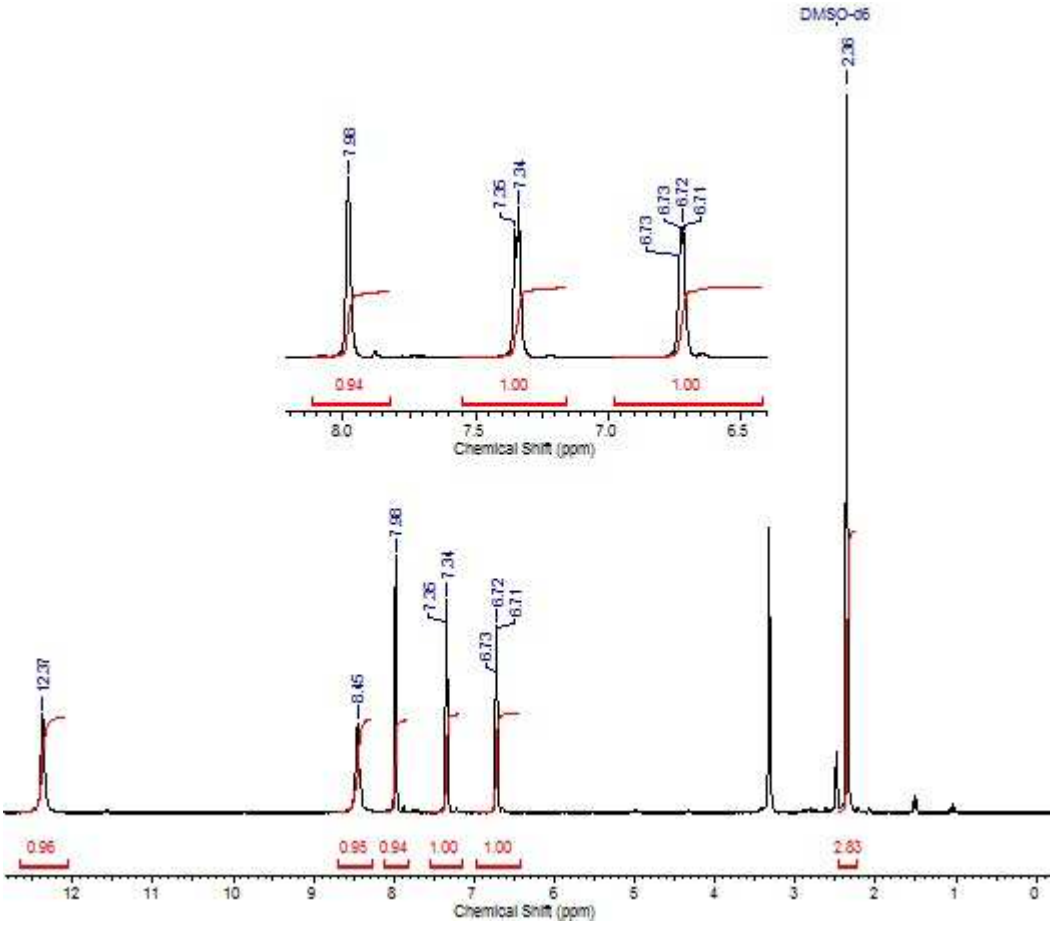
Sólido de coloração amarelo pálido (p.f.: 199-200 ºC). 77% de rendimento.

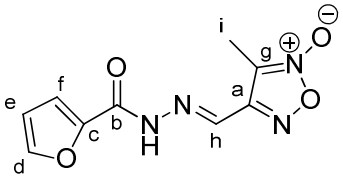
Anal. Elem. Calculado(%): C= 45,77; H= 3,41; N= 23,72.

Encontrado: C= 45,88; H= 3,42; N= 23,79.

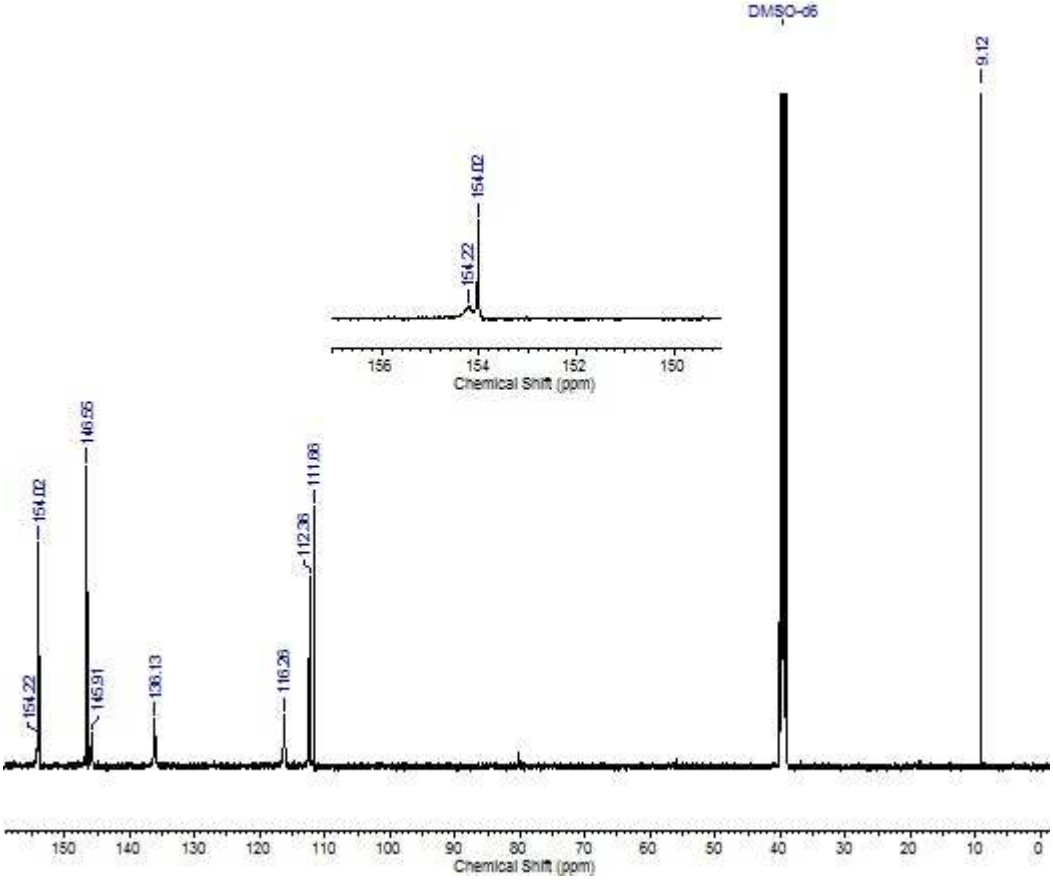


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,37 (s, 1H-a); 8,45 (s, 1H-b); 7,98 (sl, 1H-c); 7,35 (d, 2H-d, J=7,5 Hz); 6,72 (t, 1H-e, J=7,5 Hz); 2,36 (s, 3H-f).

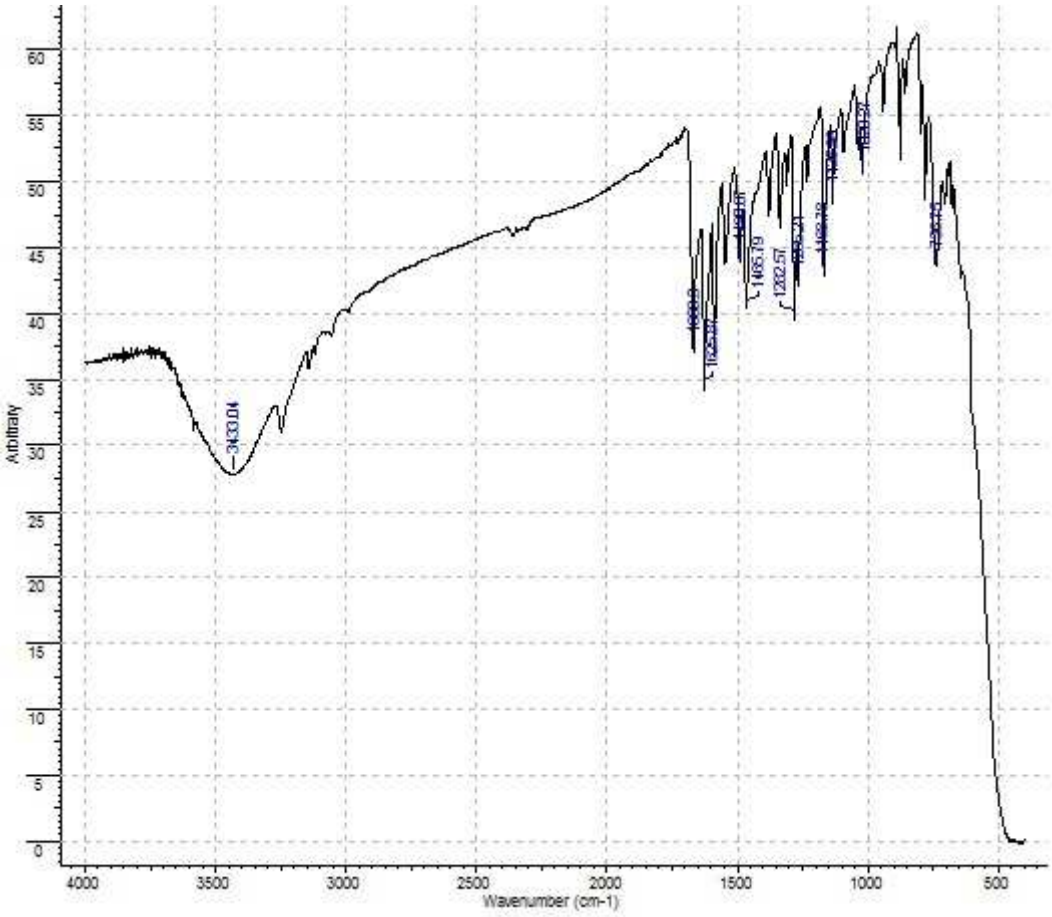




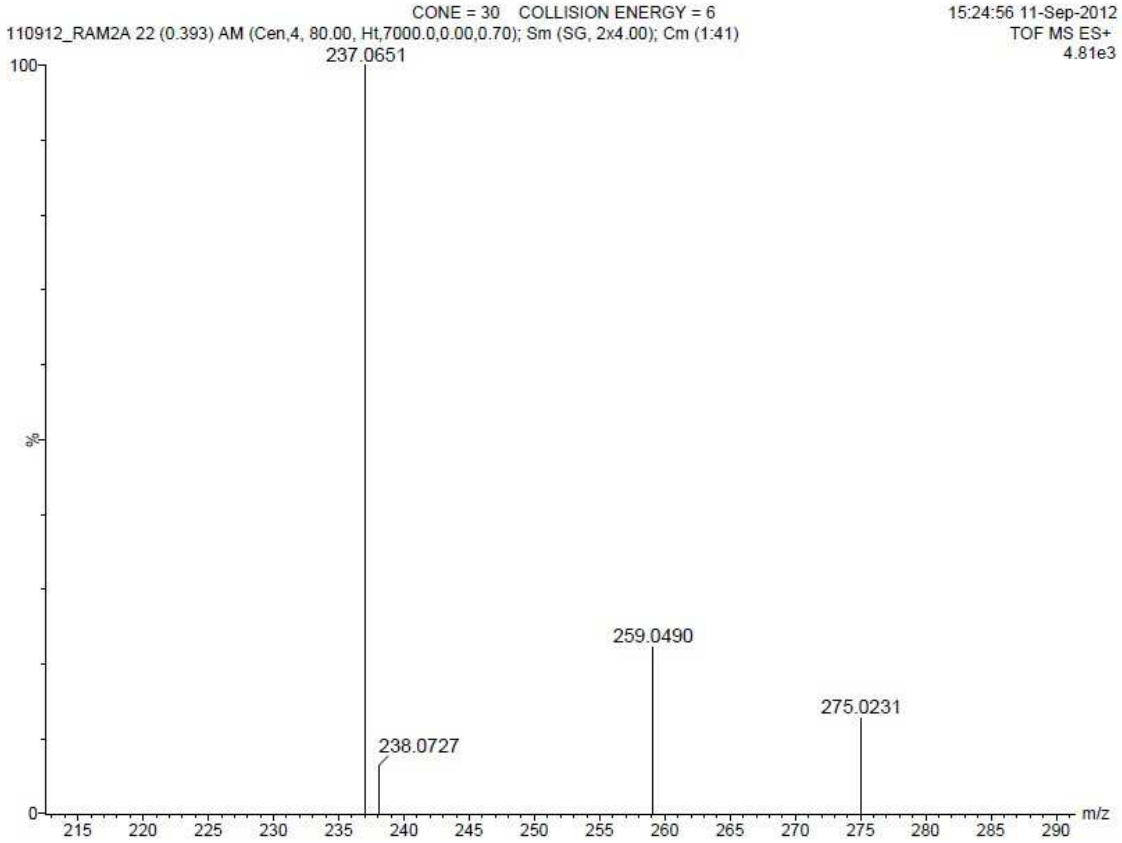
RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 154,2-a; 154,0-b; 146,5-c; 145,9-d; 136,1-e; 116,2-f; 112,3-g; 111,6-h; 9,12-i.



I.V. (método direto, cm^{-1}) 3433 (*v* N-H), 1668 (*v* C=O), 1589 (*v* C=N furoxano), 1465, 1282 (*v* N-O), 1265, 1168, 1135, 1020, 736.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C9H8N4O4 [M + H^+]: 237,0624. Encontrado: 237,0651.



Composto **2**

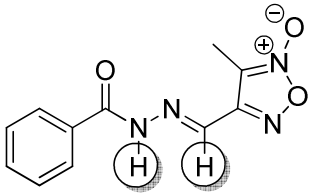
4-((2-benzoilidrazona)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 207-209 ºC). 86% de rendimento.

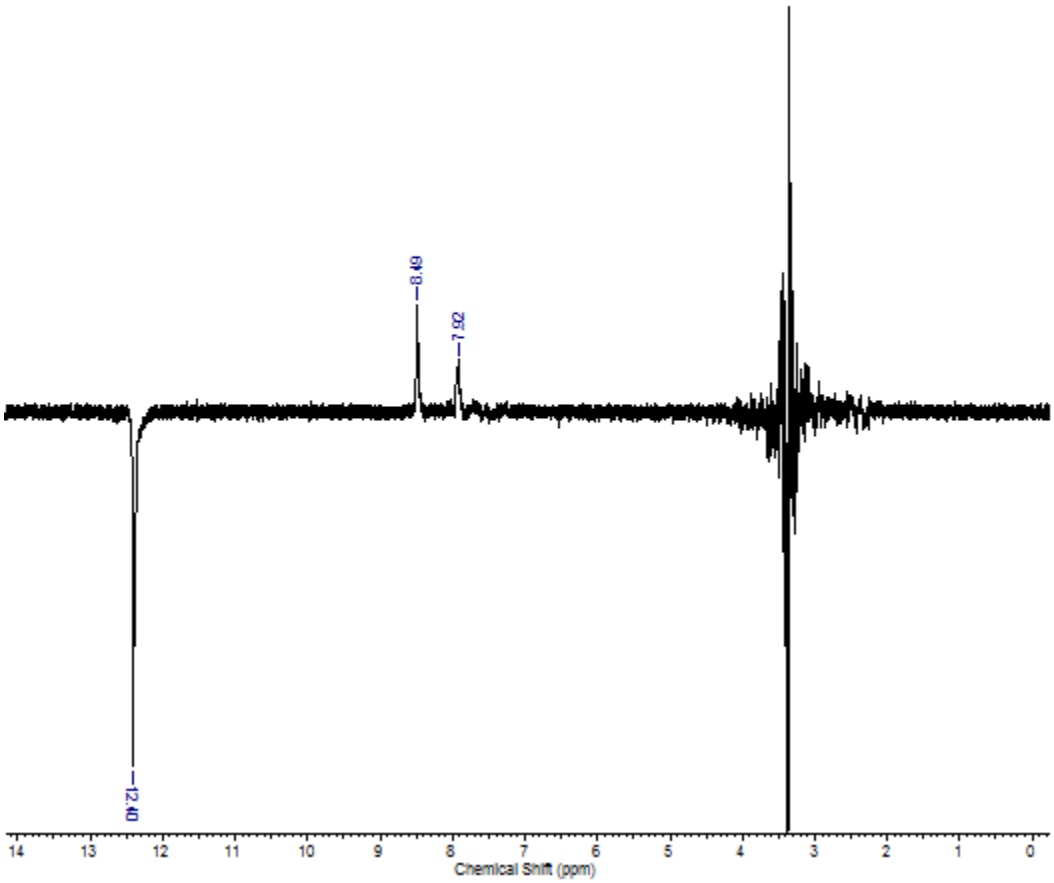
Anal. Elem. Calculado(%): C= 53,66; H= 4,09; N= 22,75.

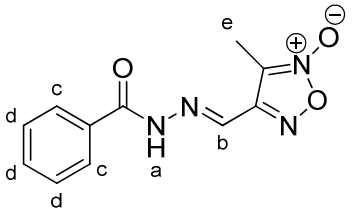
Encontrado: C= 53,83; H= 4,11; N= 22,78.

NOE-diff (Composto **2**) – 300 MHz, DMSO-D_6

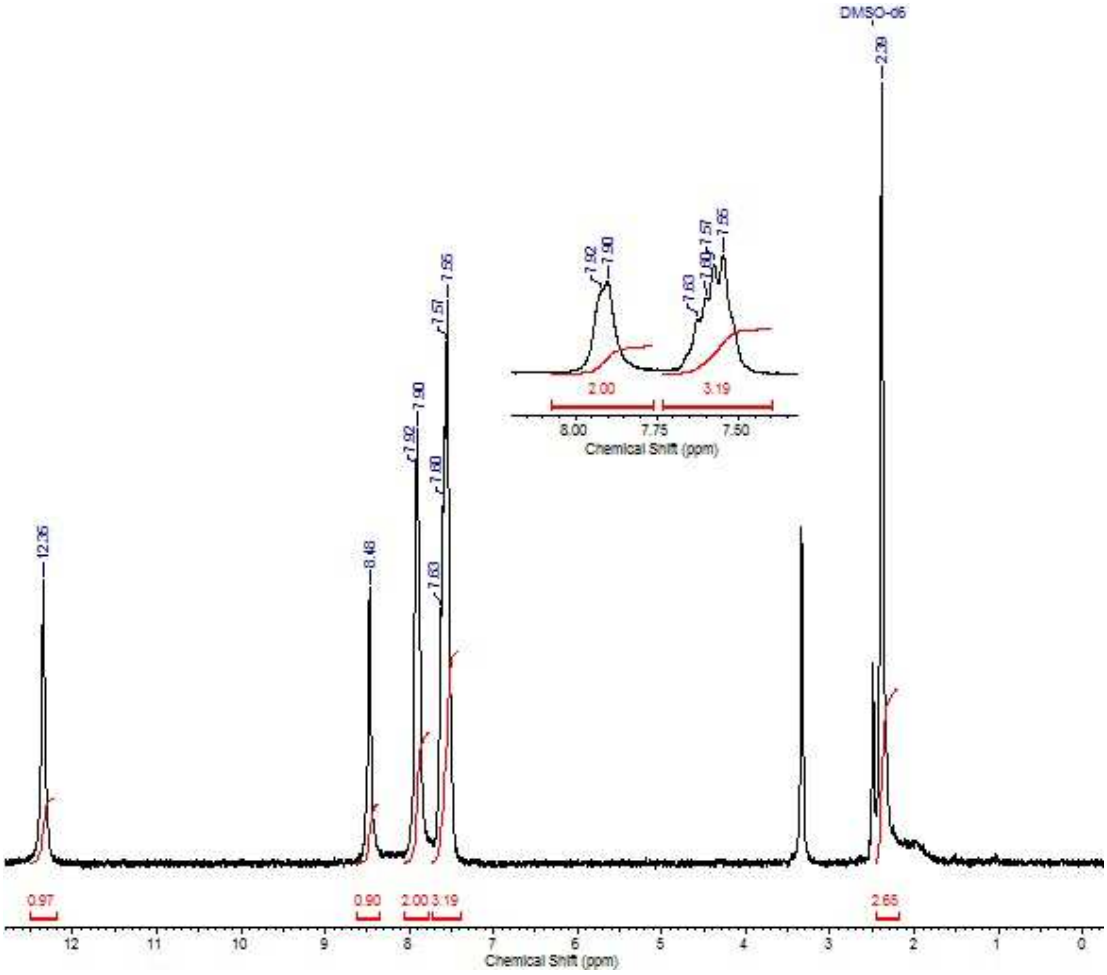


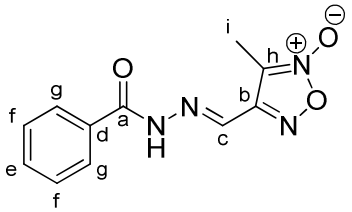
DIASTEREOISÔMERO *E*



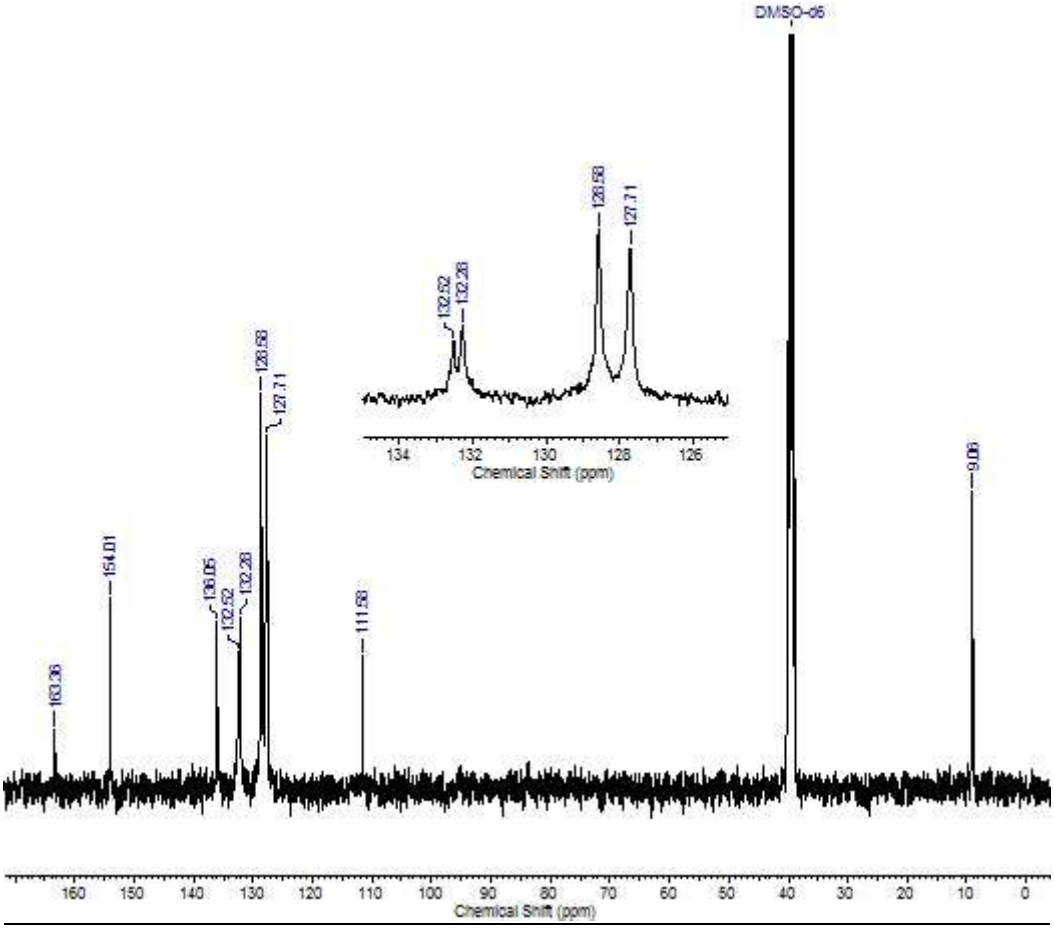


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,36 (s, 1H-a); 8,48 (s, 1H-b); 7,91 (d, 2H-c); 7,59 (m, 3H-d); 2,39 (s, 3H-e).

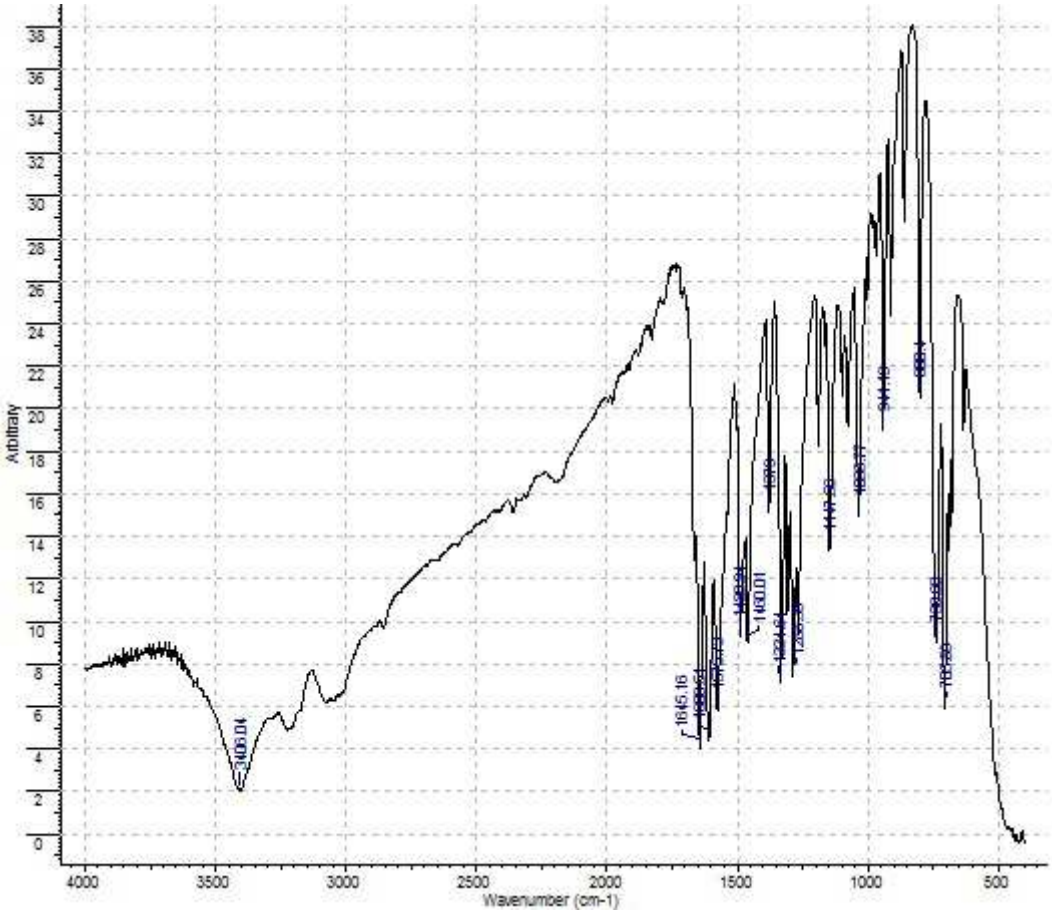




RMN ^{13}C (62,5 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 163,3-a; 154,0-b; 136,0-c; 132,5-d; 132,2-e; 128,5-f; 127,7-g; 111,5-h; 9,0-i.

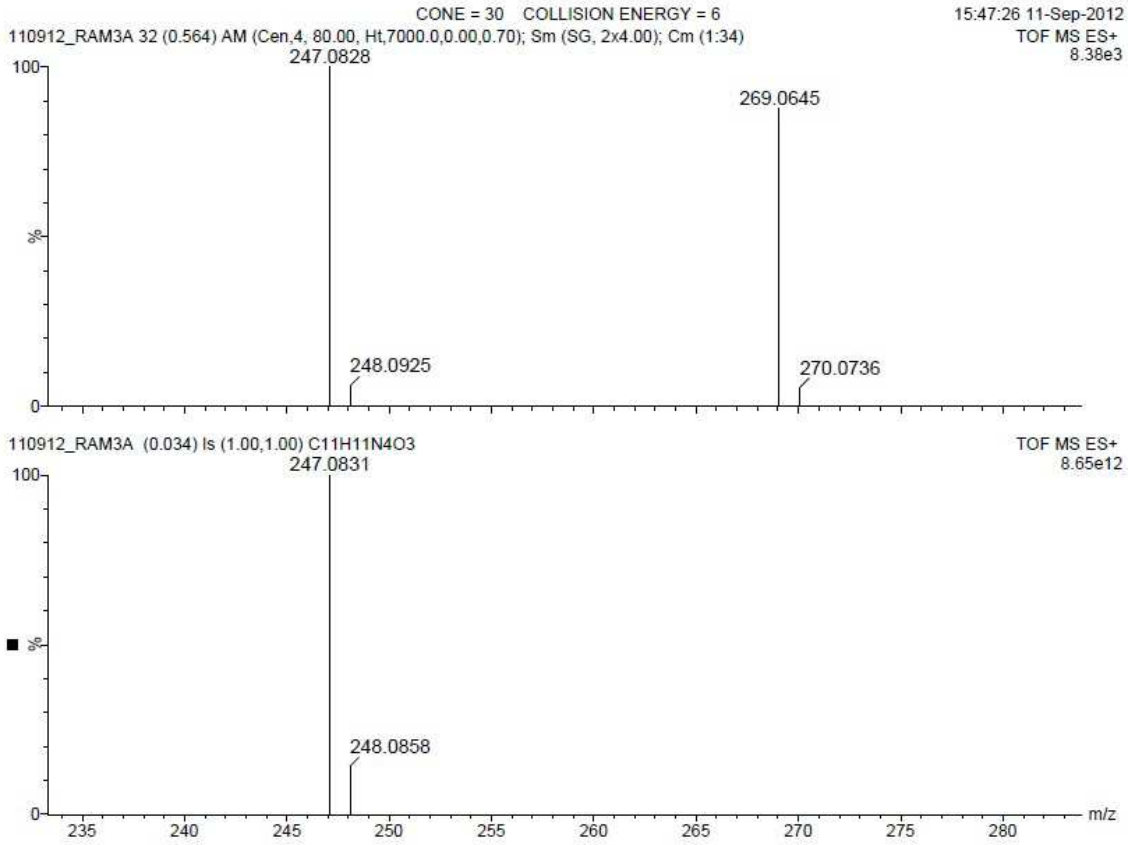


I.V. (método direto, cm^{-1}) 3406 (*v* N-H), 1645 (*v* C=O), 1488 (*v* C=N furoxano), 1460, 1379 (*v* N-O), 1334, 1288, 1147, 1033, 941, 800, 738, 705.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C11H10N4O3 [M + H^+]: 247,0831.

Encontrado: 247,0828.



Composto **3**

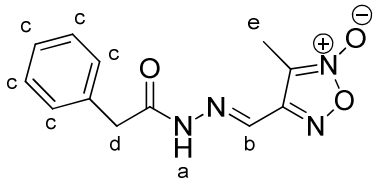
3-metil-4-((2-(2-fenilacetil)hidrazona)metil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 101-104 ºC). 82% de rendimento.

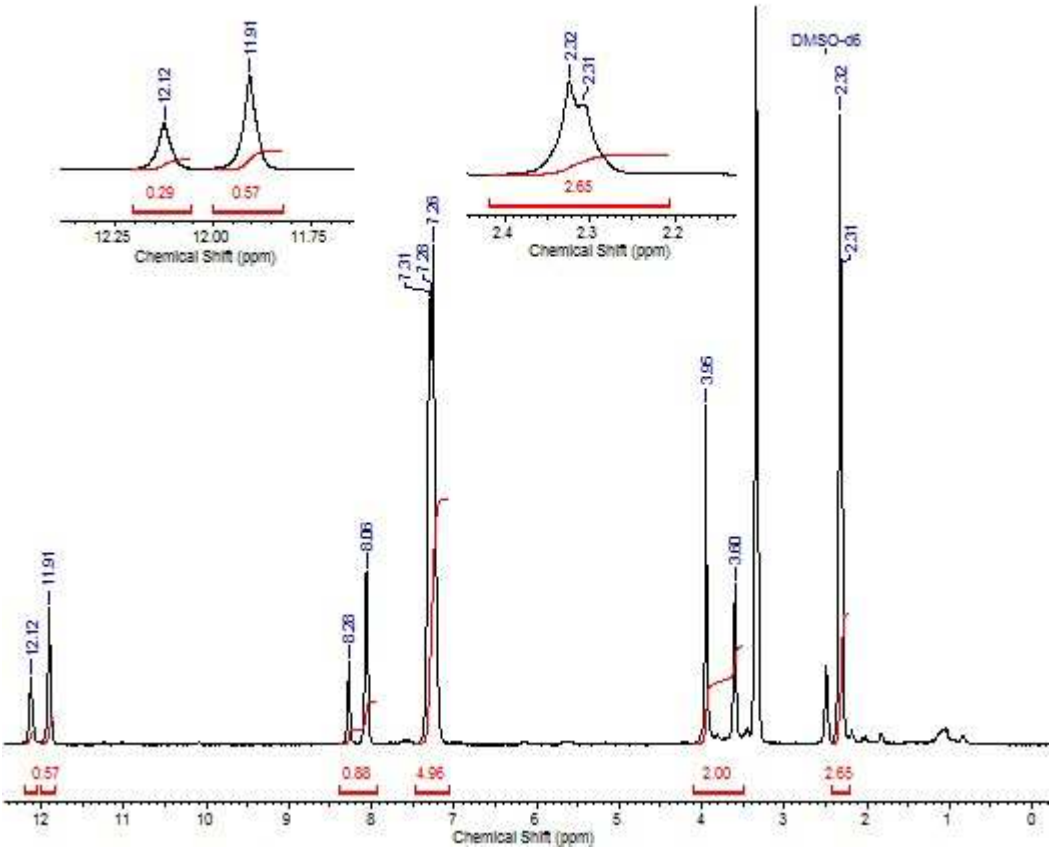
Proporção isômeros *E/Z*= 66:34.

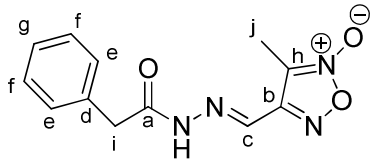
Anal. Elem. Calculado(%): C= 55,38; H= 4,65; N= 21,53.

Encontrado: C= 55,59; H= 4,66; N= 21,61.

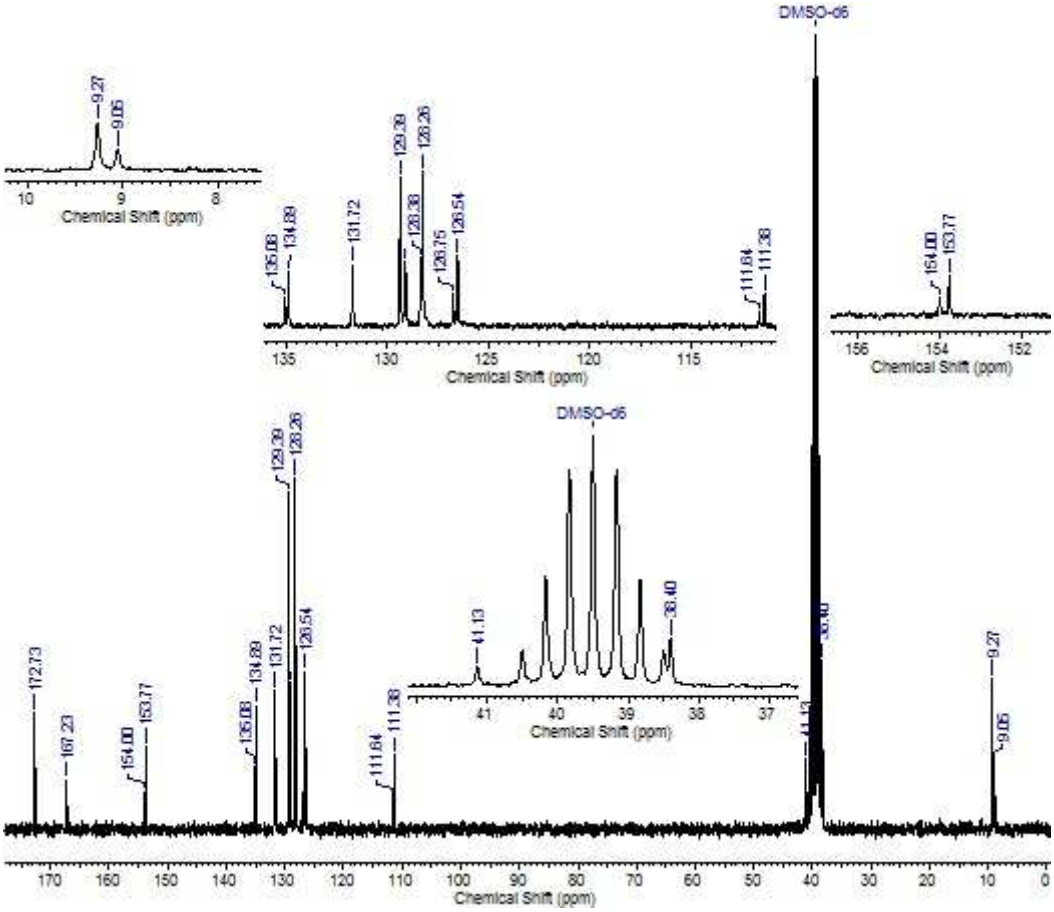


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,12 / 11,91 (s, 1H-a); 8,28 / 8,06 (s, 1H-b); 7,31-7,26 (m, 5H-c); 3,96 / 3,60 (s, 2H-d); 2,32 / 2,31 (s, 3H-e).

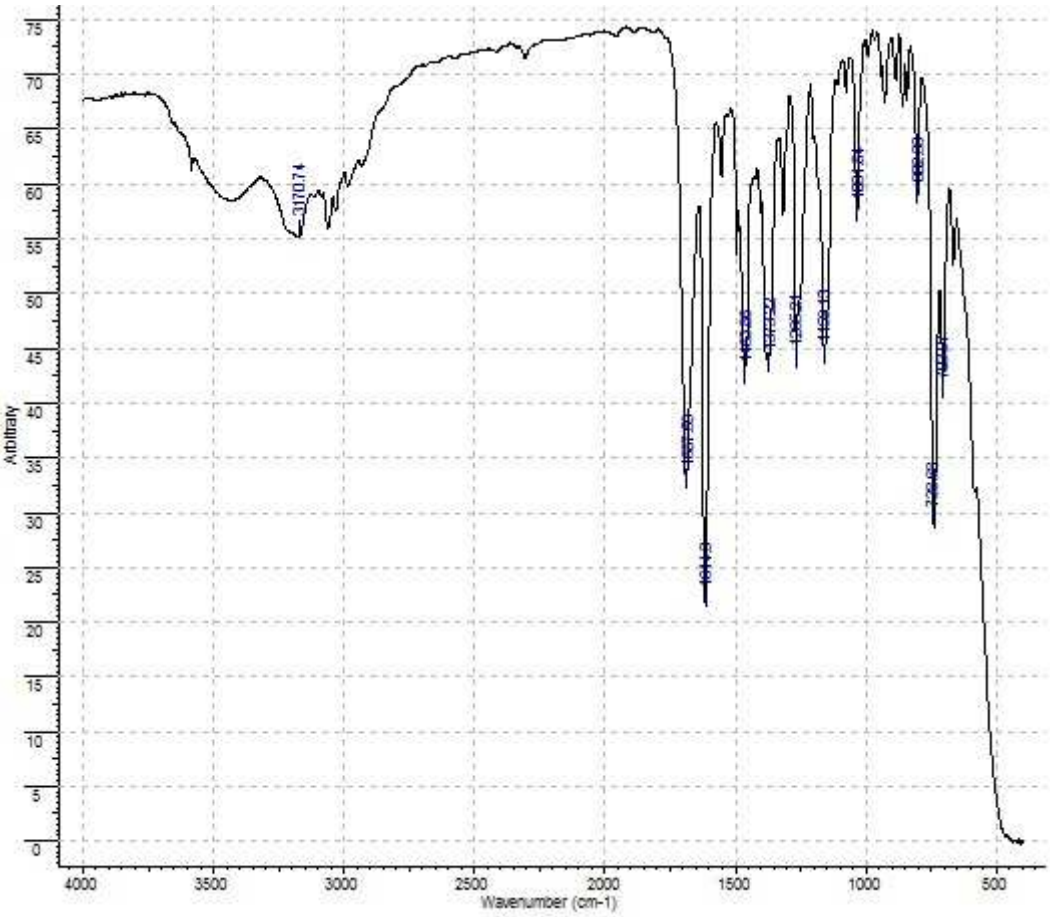




RMN ^{13}C (62,5 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 172,7-a; 167,2-a; 154,0-b; 153,7-b; 136,0-c; 134,8-c; 131,7-d; 129,3-e; 128,3-f; 128,2-f; 126,7-g; 126,5-g; 111,6-h; 111,3-h; 41,1-i; 38,4-i; 9,2-j; 9,0-j.

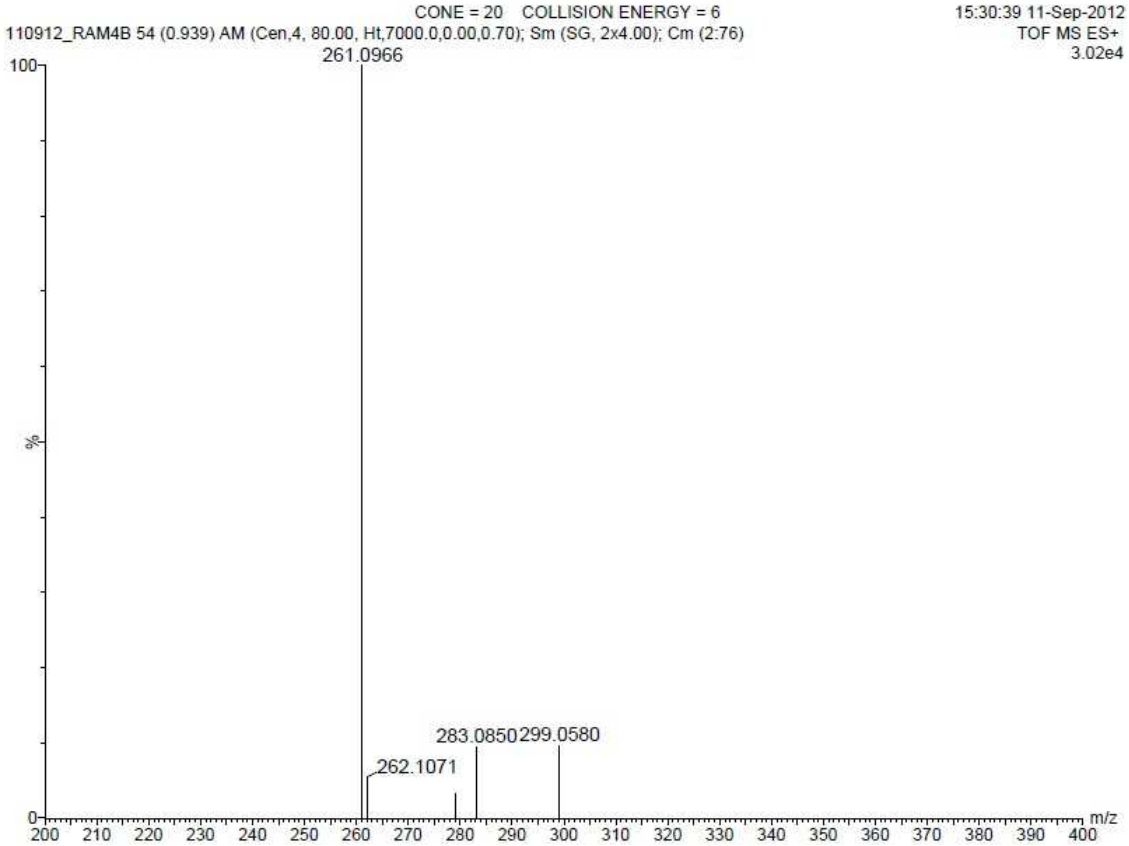


I.V. (método direto, cm^{-1}) 3170 (*v* N-H), 1687 (*v* C=O), 1614, 1463 (*v* C=N furoxano), 1373 (*v* N-O), 1265, 1159, 1031, 802, 738, 703.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C12H12N4O3 [M + H^+]: 261,0988.

Encontrado: 261,0966.



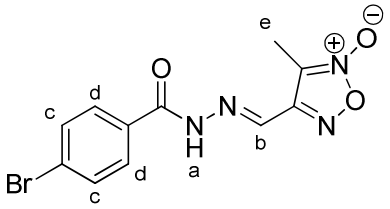
Composto **4**

4-((2-(4-bromobenzoil)hidrazona)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

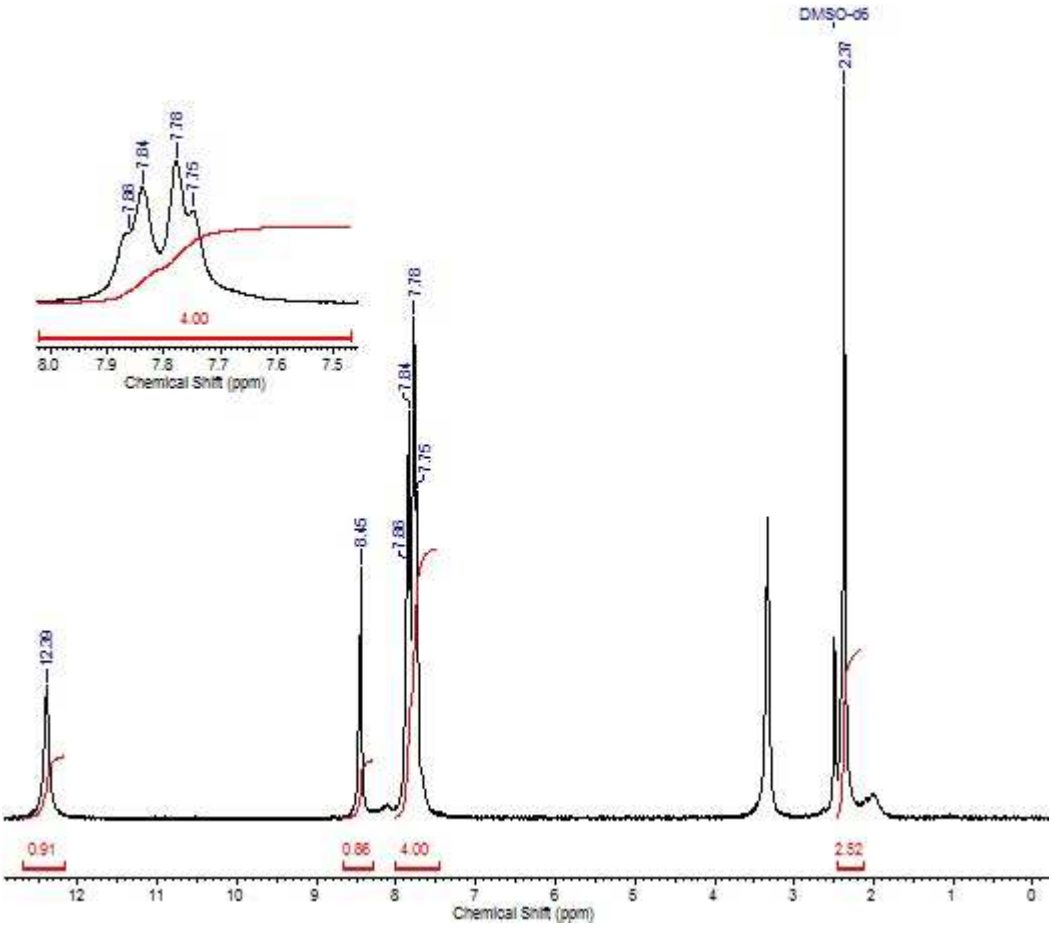
Sólido de coloração amarelo pálido (p.f.: 187-189 ºC). 90% de rendimento.

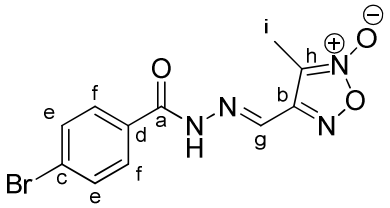
Anal. Elem. Calculado(%): C= 40,64; H= 2,79; N= 17,23.

Encontrado: C= 40,76; H= 2,80; N= 17,28.

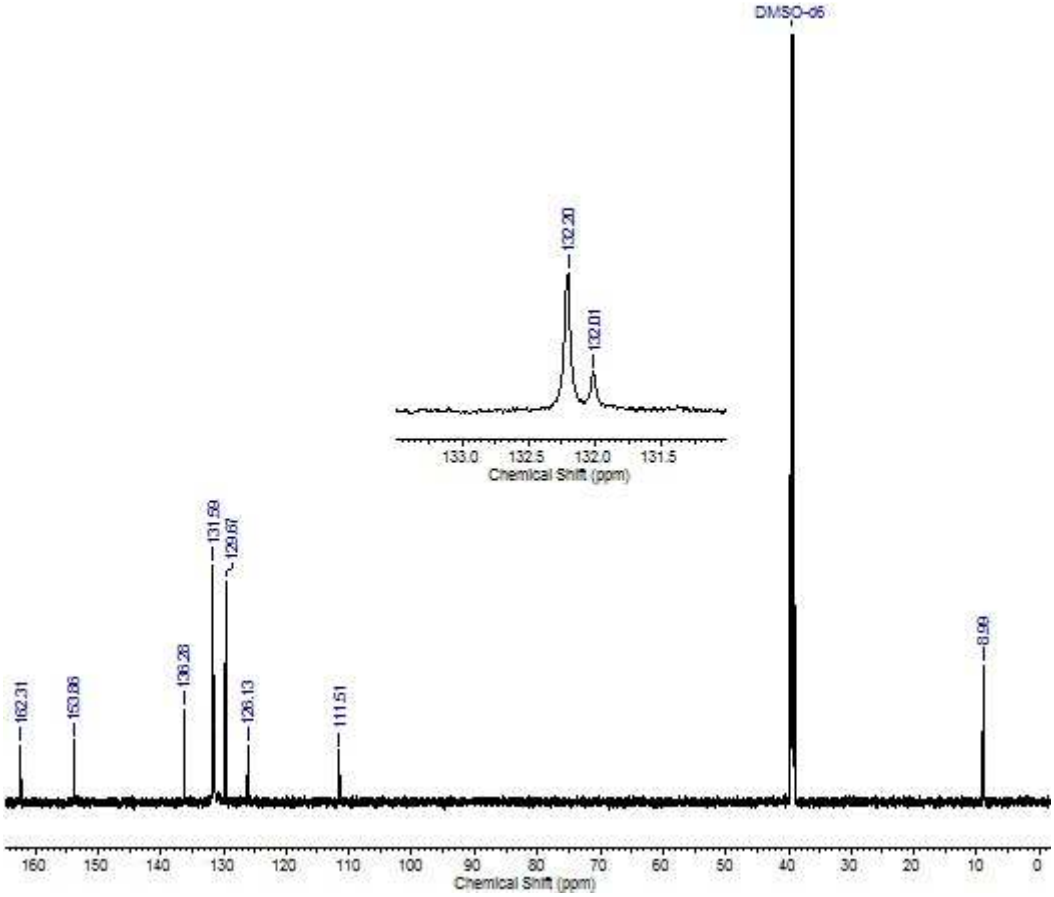


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 12,39 (s, 1H-a); 8,45 (s, 1H-b); 7,85 (d, 2H-c, J=5 Hz); 7,77 (d, 2H-d, J=5); 2,37 (s, 3H-e).





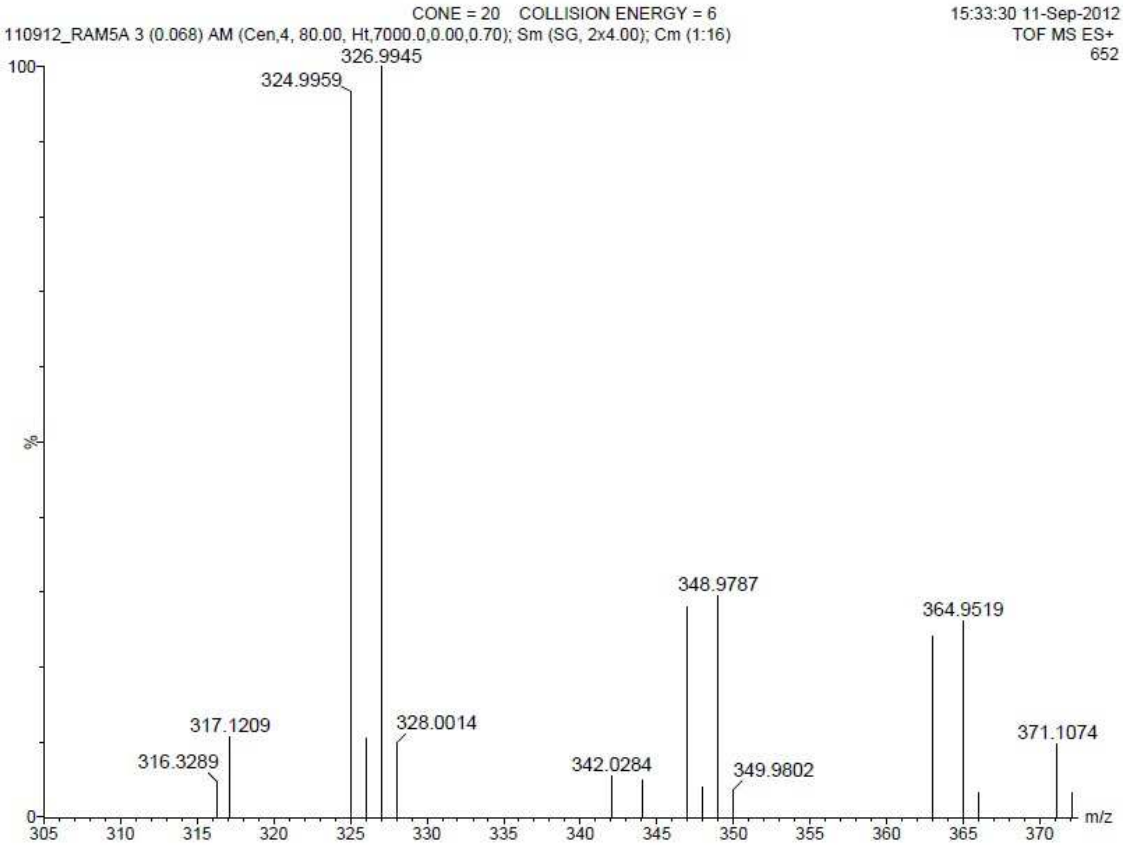
RMN ^{13}C (62,5 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 162,3-a; 153,8-b; 136,2-c; 132,2-d; 132,0-e; 129,6-f; 126,1-g; 111,5h; 8,9-i.



I.V. (método direto, cm^{-1}) 3433 (*v* N-H), 1685 (*v* C=O), 1606, 1456 (*v* C=N furoxano), 1263 (*v* N-O), 1145, 734.

Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C11H9N4O3Br [M + H^+]: 324,9936.

Encontrado: 324,9959.



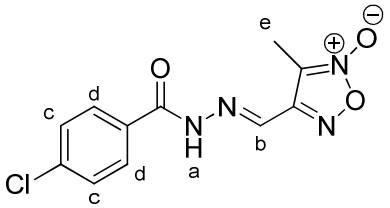
Composto **5**

4-((2-(4-clorobenzoil)hidrazona)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

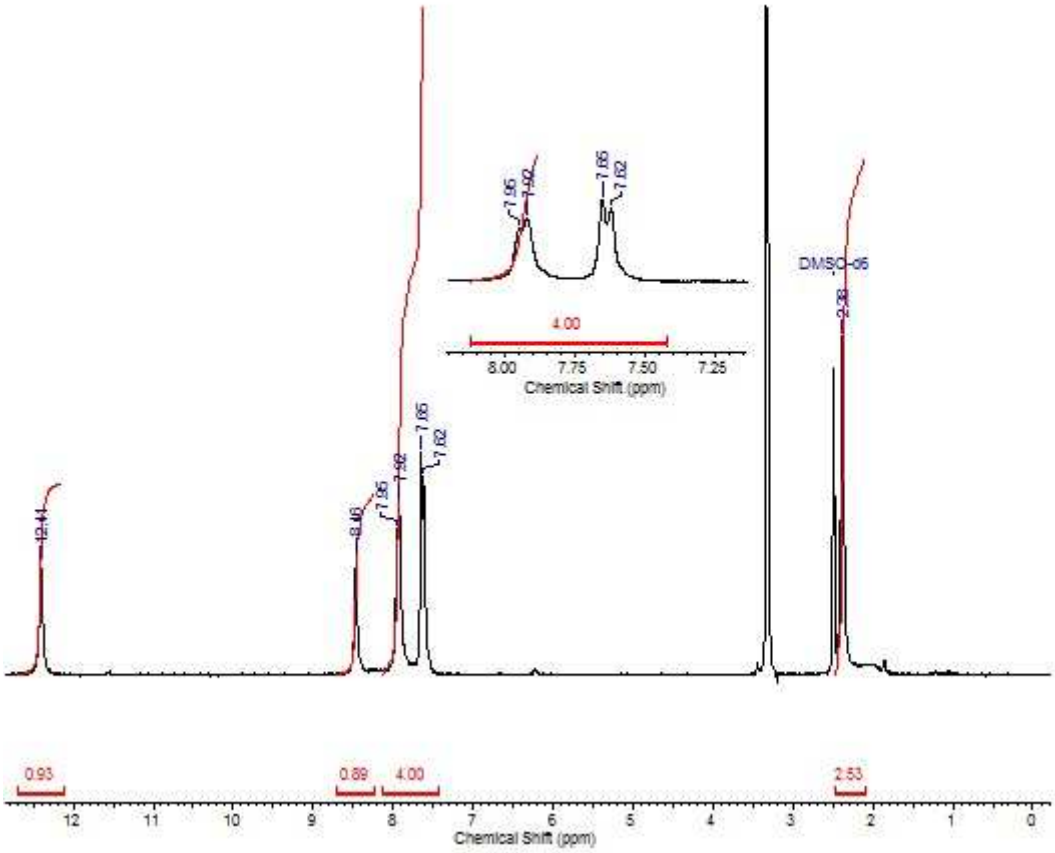
Sólido de coloração amarelo pálido (p.f.: 165-168 ºC). 91% de rendimento.

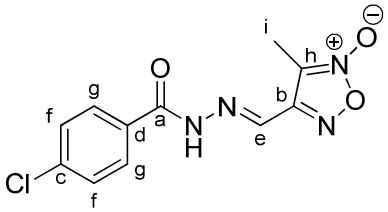
Anal. Elem. Calculado(%): C= 47,07; H= 3,23; N= 19,96.

Encontrado: C= 47,25; H= 3,24; N= 19,95.

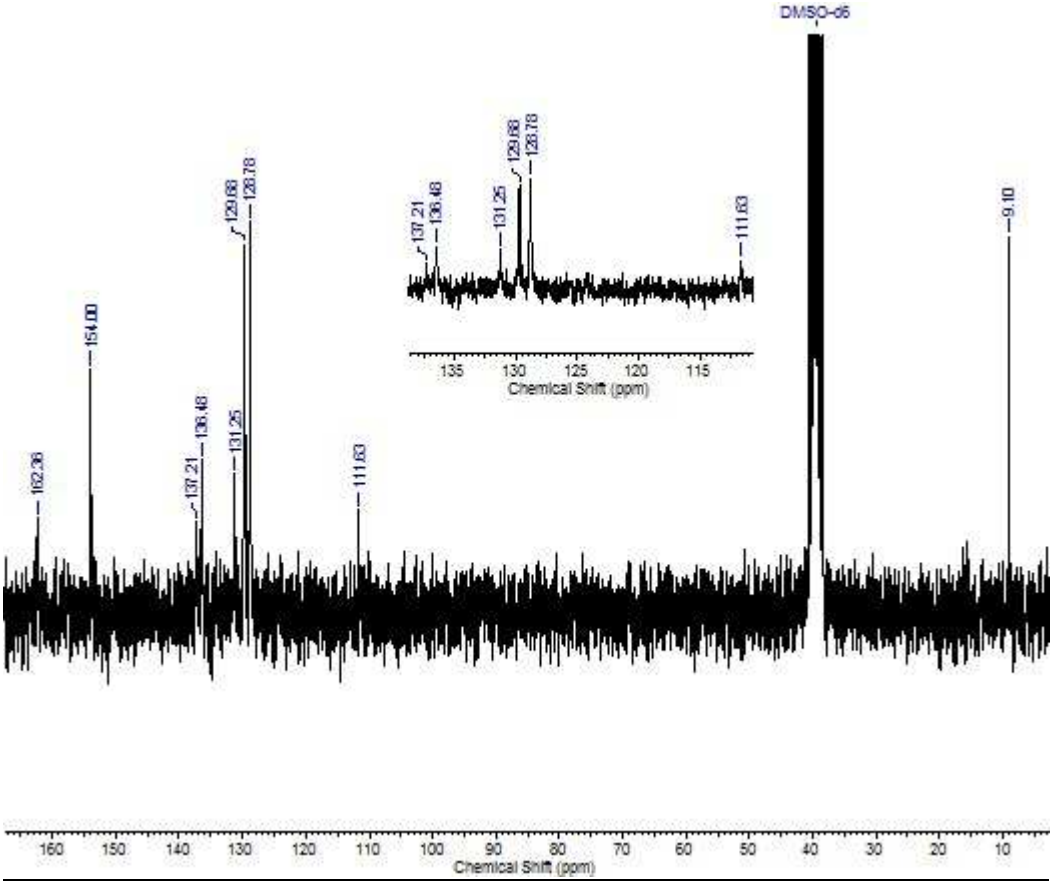


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,41 (s, 1H-a); 8,46 (s, 1H-b); 7,95 (d, 2H-c, J=7,5 Hz); 7,65 (d, 2H-d, J=7,5); 2,38 (s, 3H-e).

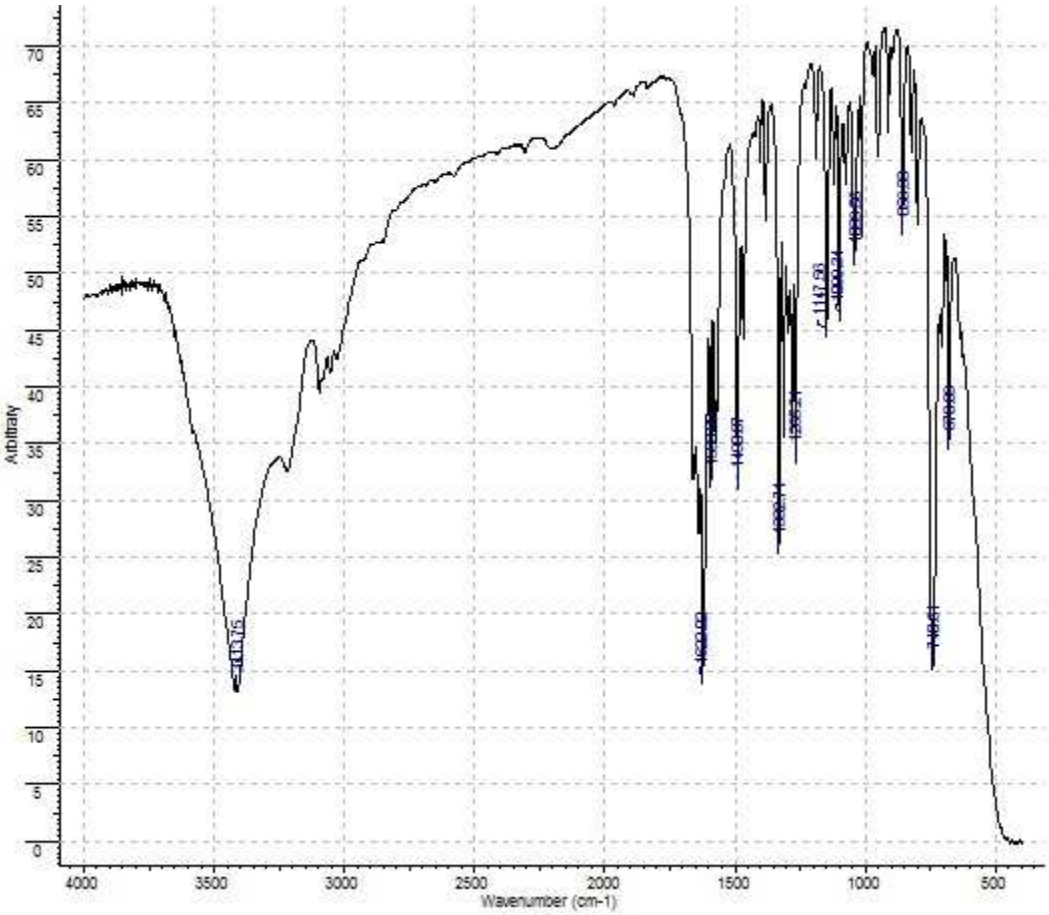




RMN ^{13}C (62,5 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 162,3-a; 154,0-b; 137,2-c; 136,4-d; 131,2-e; 129,6-f; 128,7-g; 111,6-h; 9,1-i.

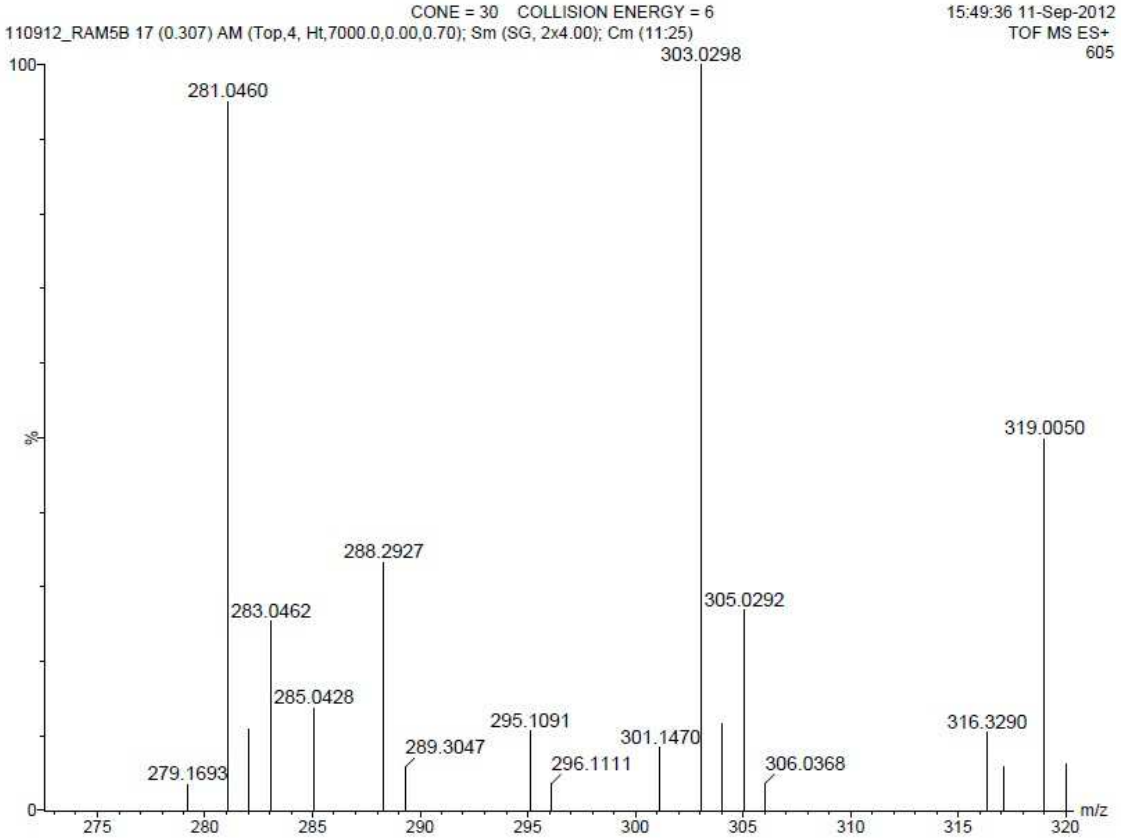


I.V. (método direto, cm^{-1}) 3413 (*v* N-H), 1622 (*v* C=O), 1593 (*v* C=N furoxano), 1490, 1332 (*v* N-O), 1265, 1147, 1099, 1039, 856, 740, 678.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C11H9N4O3Cl [M + H^+]: 281,0441.

Encontrado: 281,0460.



Composto **6**

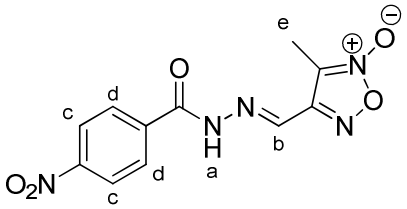
3-metil-4-((2-(4-nitrobenzoil)hidrazona)metil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

Sólido de coloração amarela (p.f.: 99-102 ºC). 72% de rendimento.

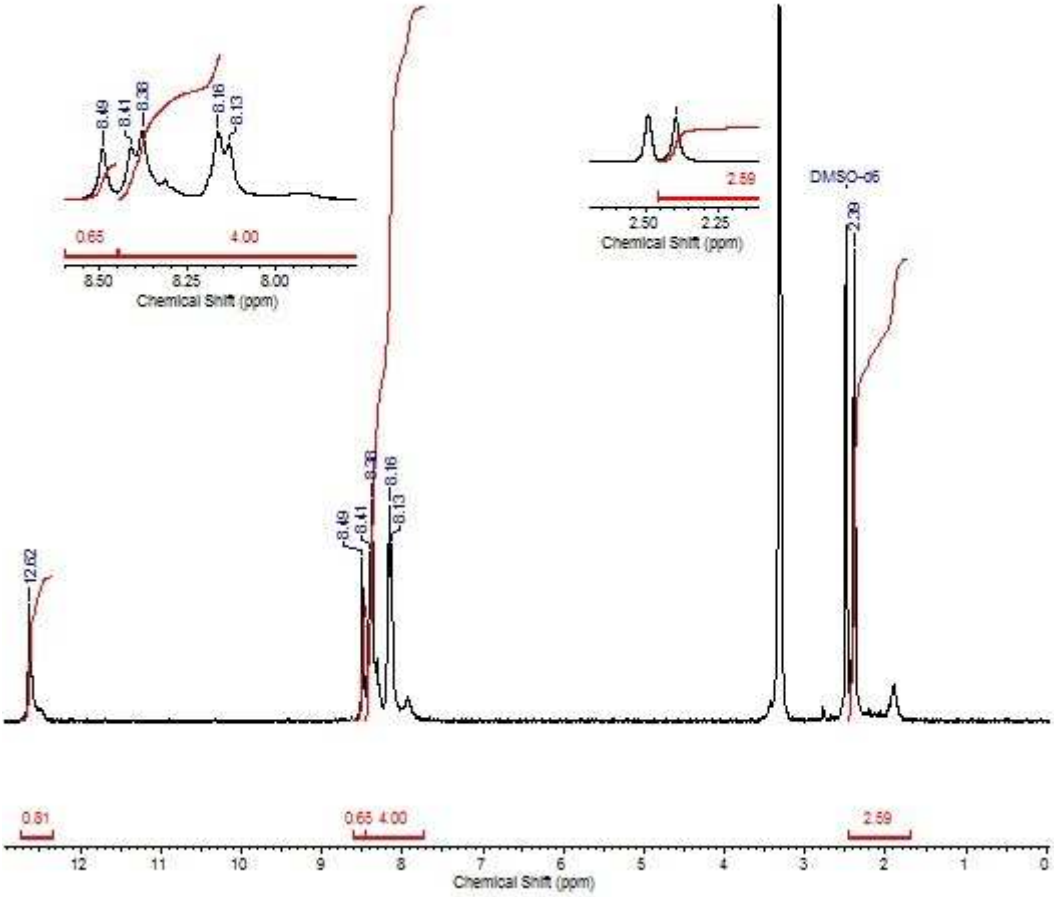
Proporção isômeros *E/Z*= 85:15.

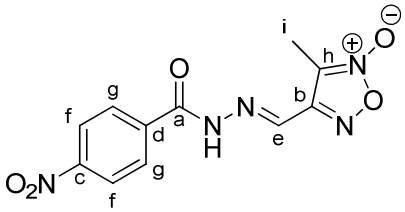
Anal. Elem. Calculado(%): C= 45,37; H= 3,11; N= 24,05.

Encontrado: C= 45,55; H= 3,51; N= 24,13.

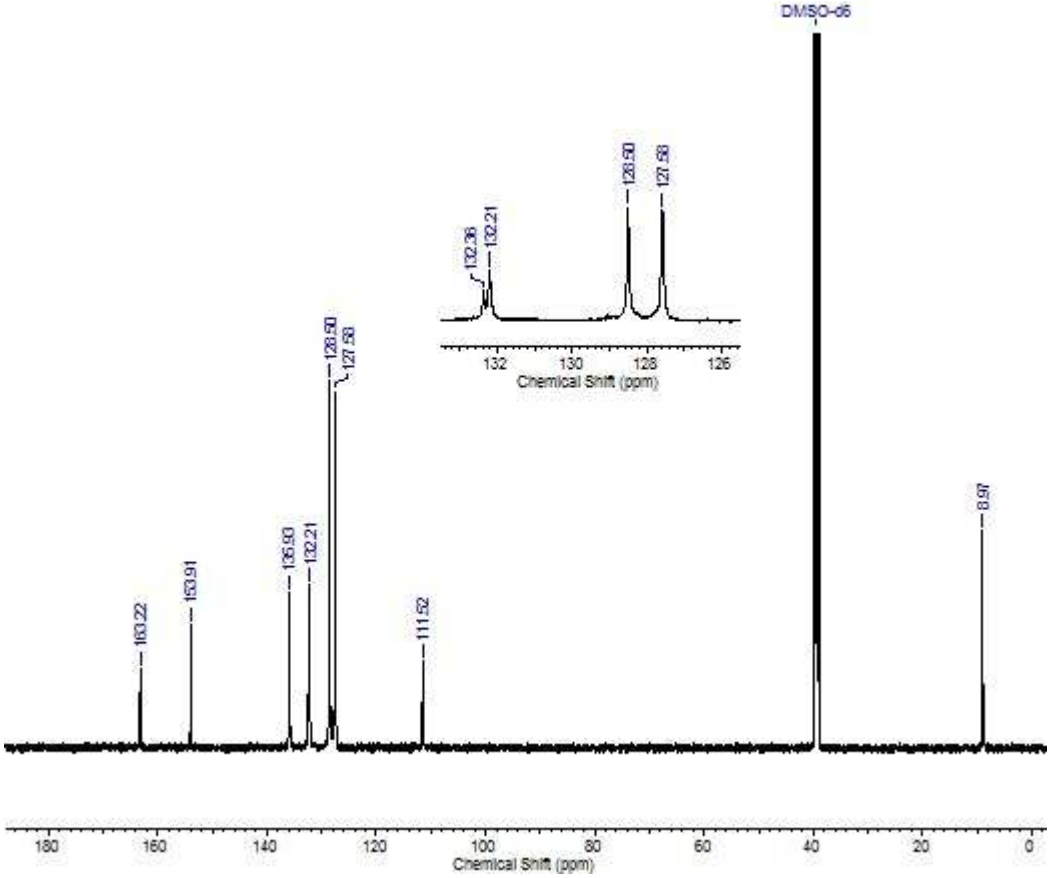


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,62 (s, 1H-a); 8,49 (s, 1H-b); 8,40 (d, 2H-c, J=7,5 Hz); 8,15 (d, 2H-d, J=7,5 Hz); 2,39 (s, 3H-e).





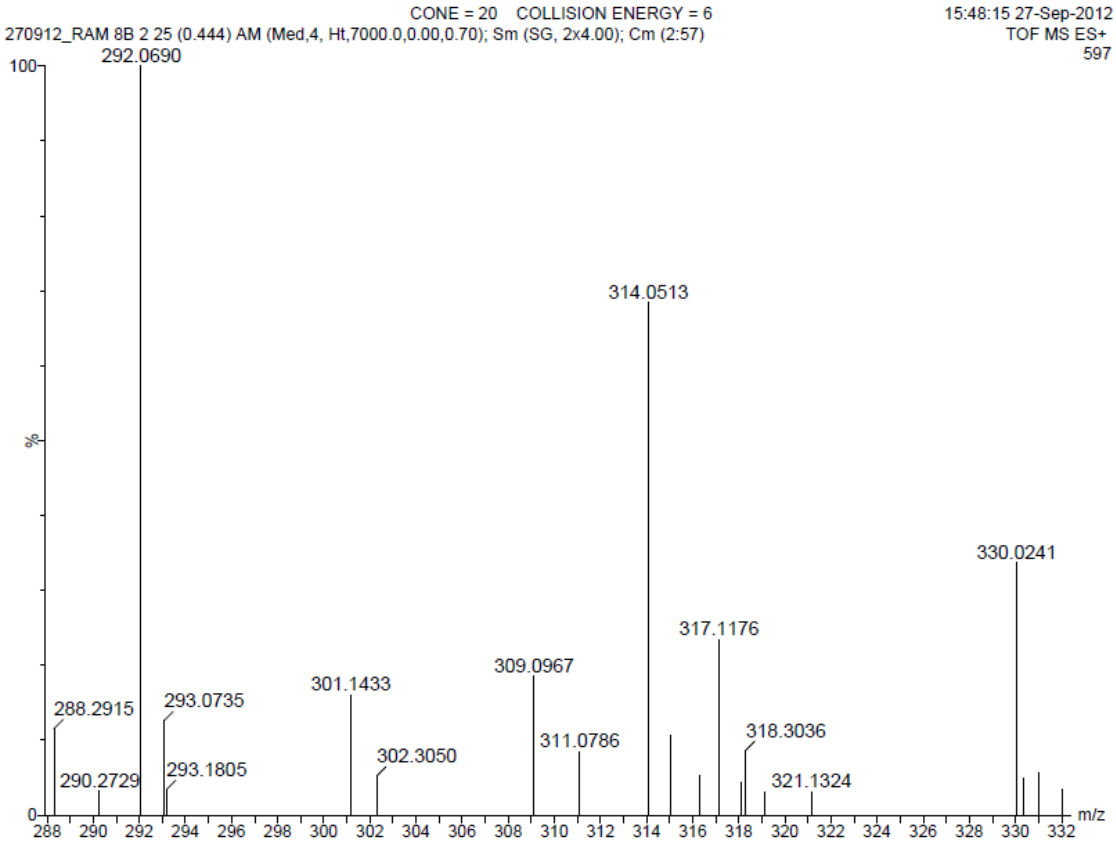
RMN ^{13}C (62,5 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 163,2-a; 153,9-b; 136,9-c; 132,3-d; 132,2-e; 128,5-f; 127,5-g; 111,5-h; 8,9-i.



I.V. (método direto, cm^{-1}) 3423 (*v* N-H), 1654 (*v* C=O), 1602, 1541 (*v* C=N furoxano), 1352 (*v* N-O), 1325, 1284, 1141, 1114, 1037, 709.

Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C11H9N5O5 [M + Na^+]: 314,0501.

Encontrado: 314,0513.



Composto 7

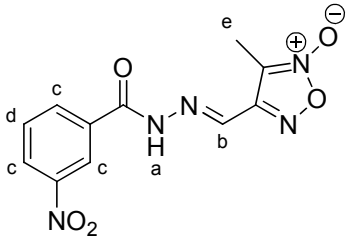
3-metil-4-((2-(3-nitrobenzoil)hidrazona)metil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 94-96 ºC). 67% de rendimento.

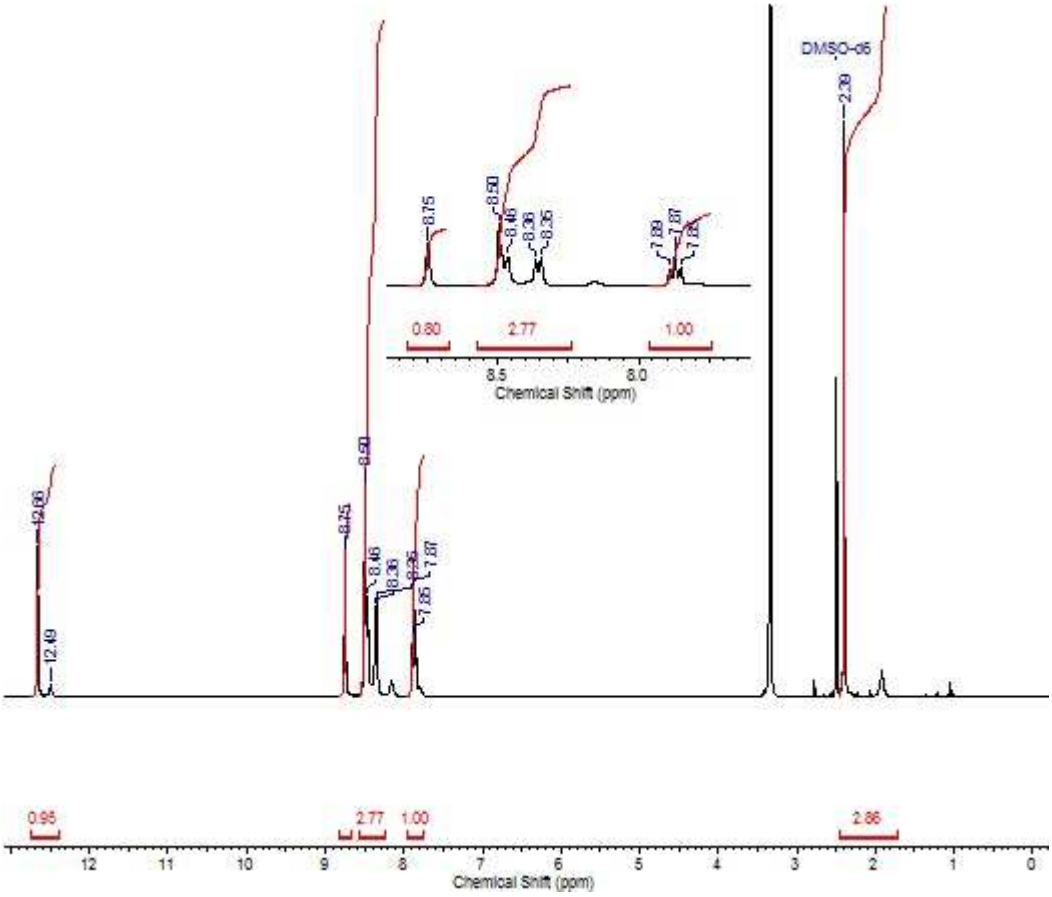
Proporção isômeros *E/Z*= 81:19.

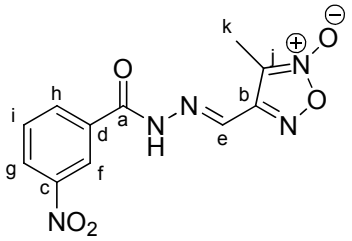
Anal. Elem. Calculado(%): C= 45,37; H= 3,11; N= 24,05.

Encontrado: C= 45,55; H= 3,12; N= 24,46.

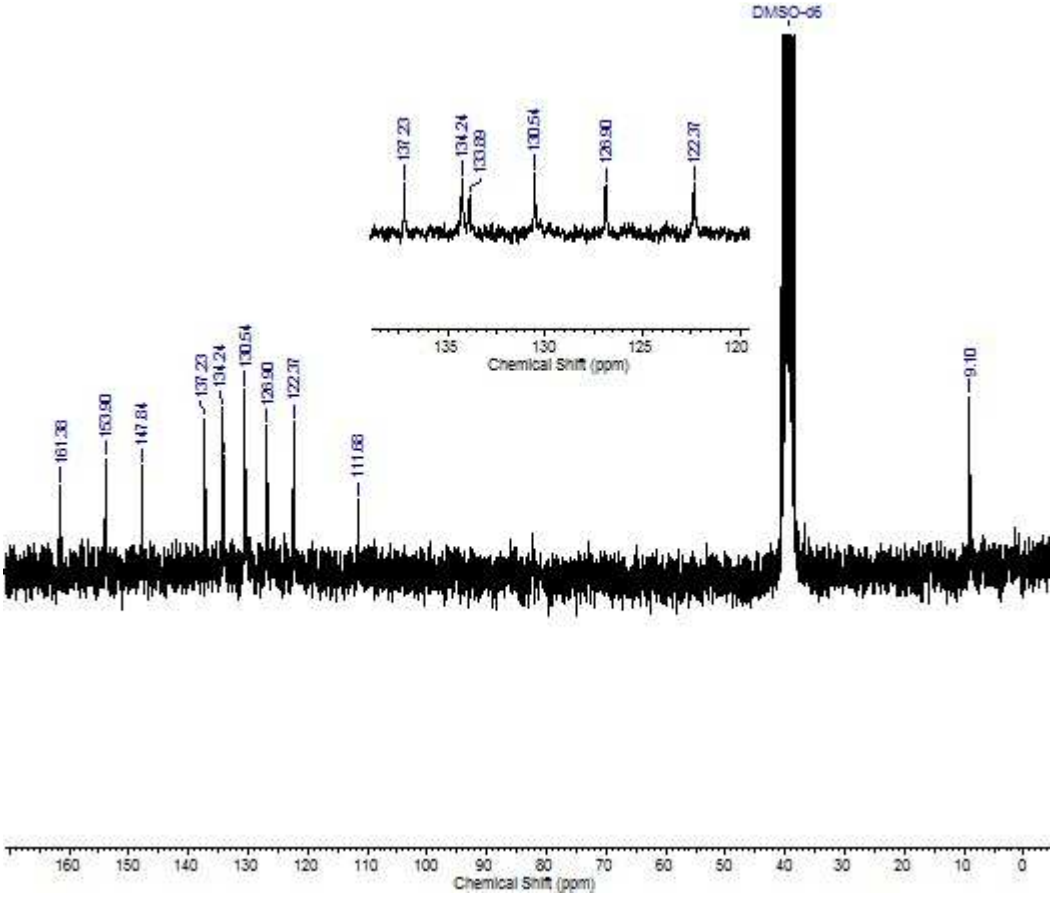


RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,66 / 12,49 (s, 1H-a); 8,75 (s, 1H-b); 8,50-8,35 (m, 3H-c); 7,87 (t, 1H-d, J=5 Hz); 2,39 (s, 3H-e).

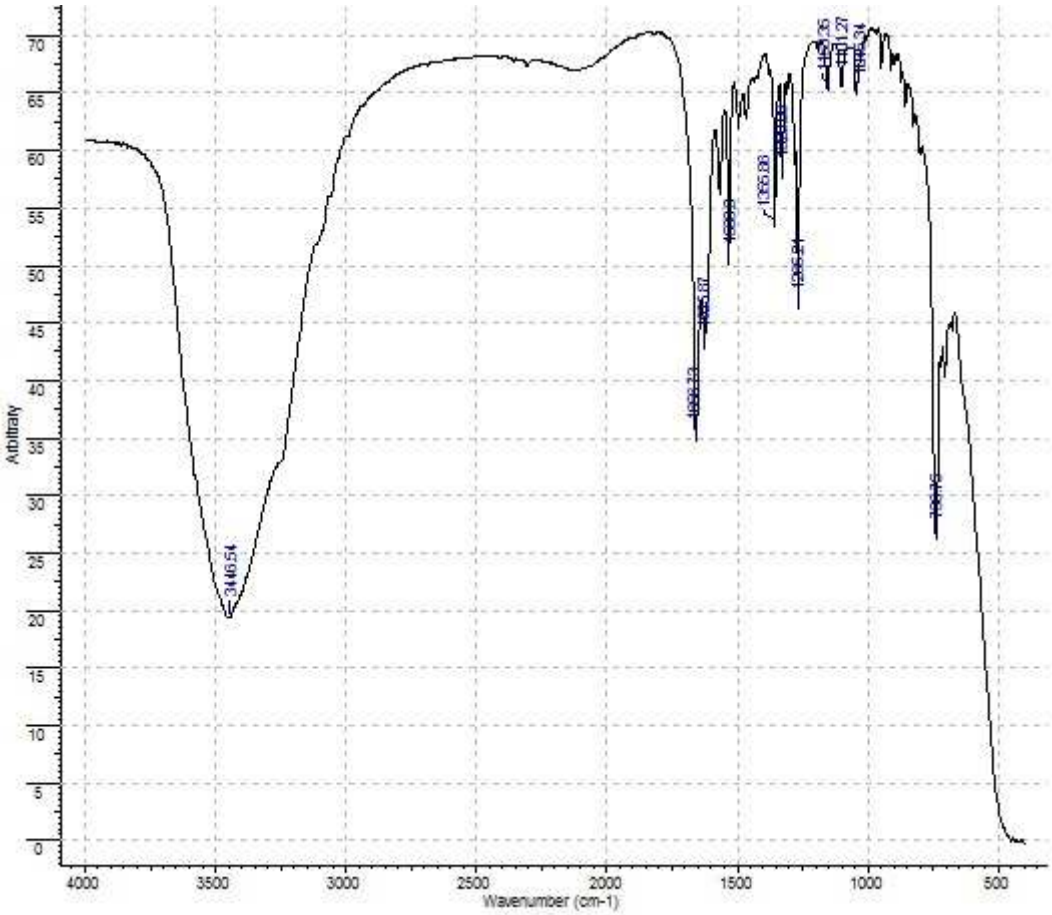




RMN ^{13}C (62,5 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 161,3-a; 153,9-b; 147,8-c; 137,2-d; 134,2-e; 133,8-f; 130,5-g; 126,9-h; 122,3-i; 111,6-j; 9,1-k.

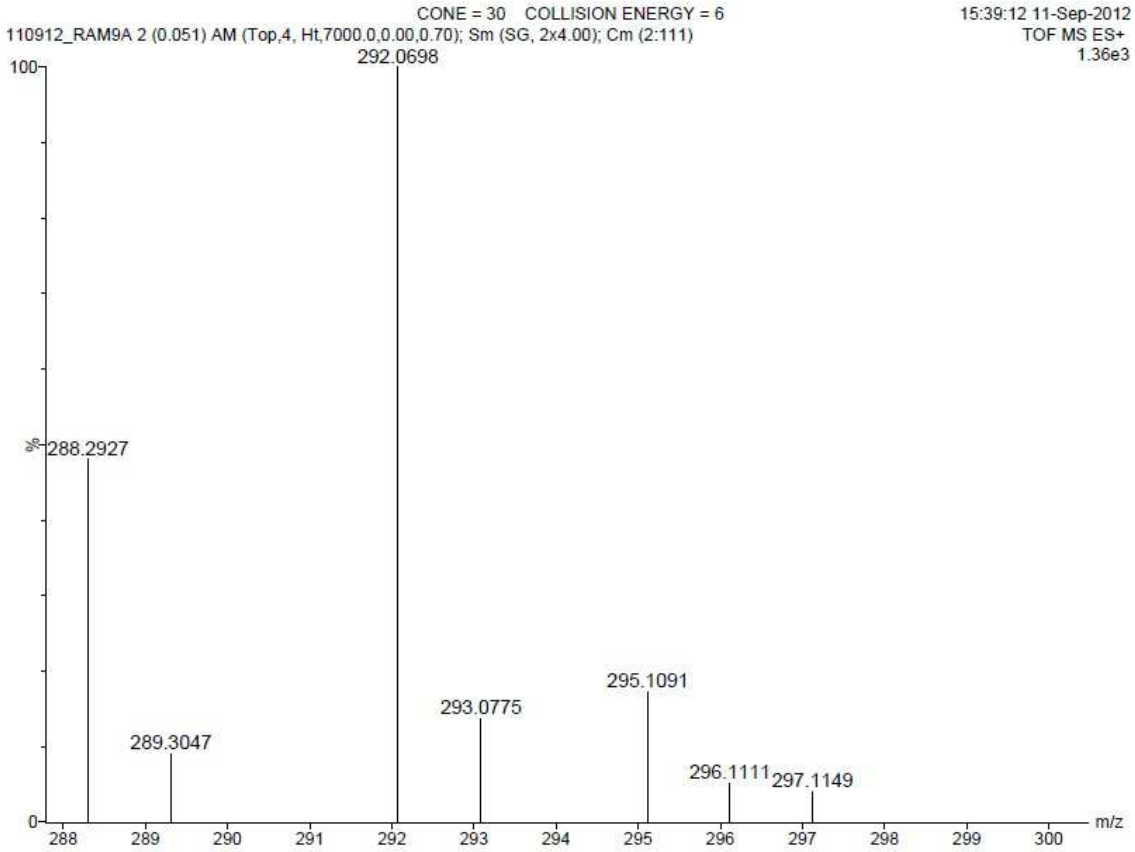


I.V. (método direto, cm^{-1}) 3446 (*v* N-H), 1656 (*v* C=O), 1533 (*v* C=N furoxano), 1355 (*v* N-O), 1328, 1265, 1153, 1101, 1045, 736.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C11H9N5O5 [M + H^+]: 292,0682.

Encontrado: 292,0698.



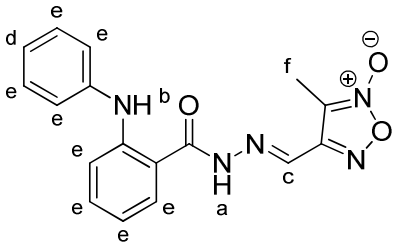
Composto **8**

3-metil-4-((2-(2-(fenilamino)benzoil)hidrazona)metil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

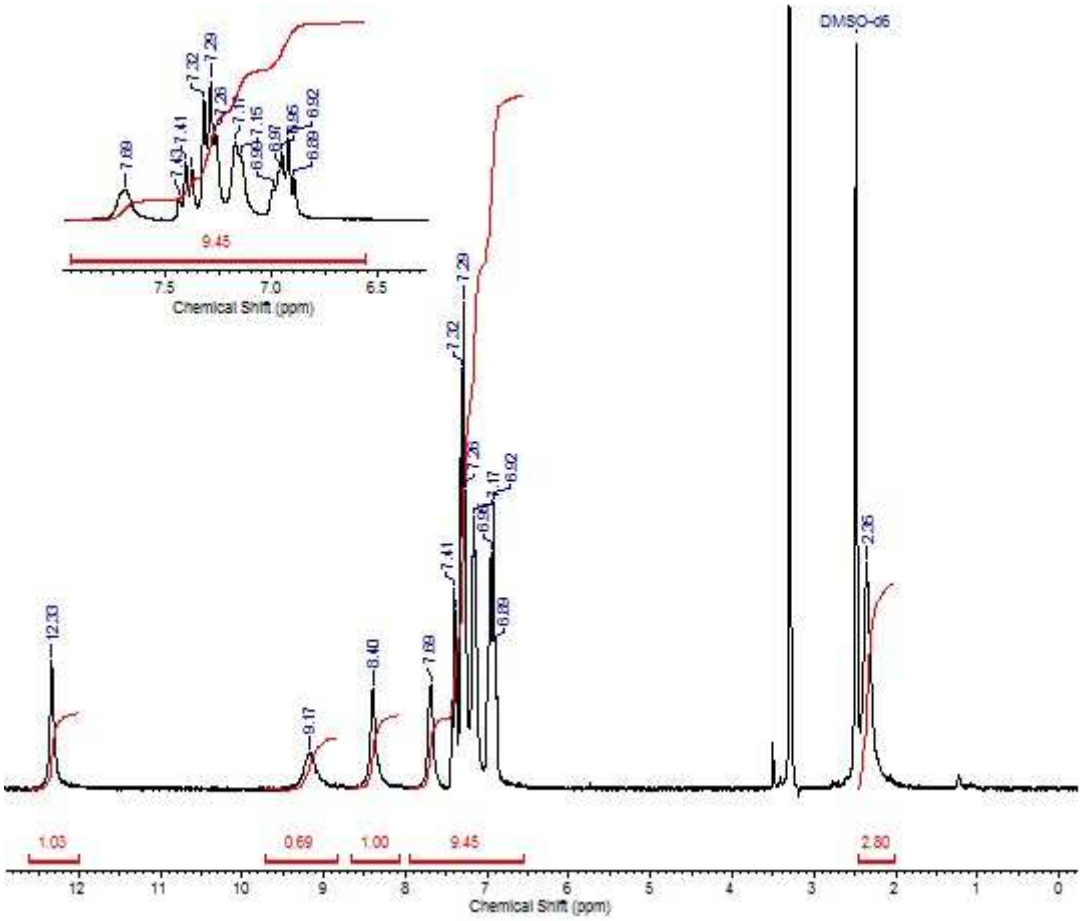
A última etapa da reação foi realizada *in situ* (sem purificação da hidrazida). O produto final foi purificado por meio de coluna cromatográfica tendo como sistema eluente diclorometano / metanol (0-5%), obtendo um sólido de coloração amarelada. (p.f.: 180-182 ºC). 6% de rendimento.

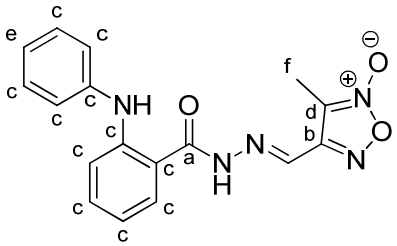
Anal. Elem. Calculado(%): C= 60,53; H= 4,48; N= 20,76

Encontrado: C= 60,76; H= 4,49; N= 20,82.

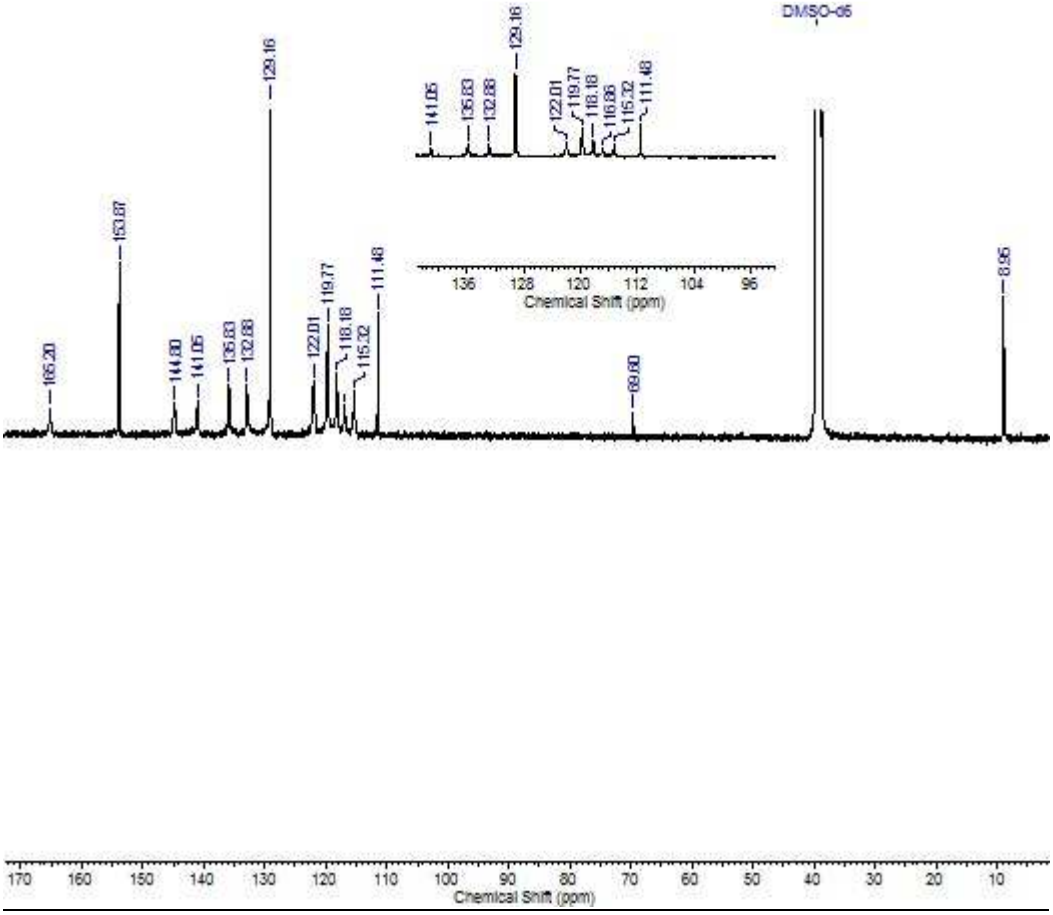


RMN ^{1}H (DMSO-D_6, 250 MHz) δ (ppm): 12,33 (s, 1H-a); 9,17 (s, 1H-b); 8,40 (s, 1H-c); 7,89 (sl, 1H-d); 7,41-6,89 (m, 8H-e); 2,36 (s, 3H-f).

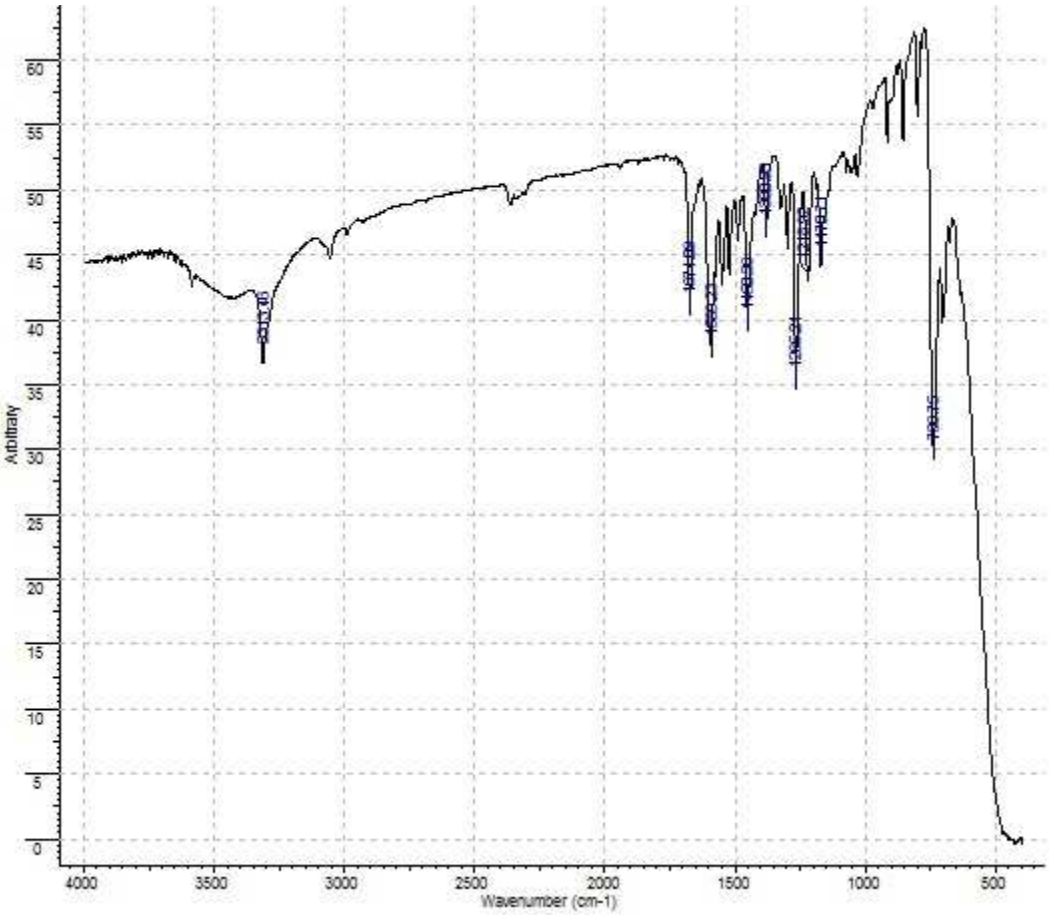




RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 165,2-a; 153,8-b; 144,8-c; 141,0-c; 135,8-c; 132,8-c; 129,1-c; 122,0-c; 119,7-c; 118,1-c; 116,8-c; 115,3-c; 111,4-d; 69,6-e; 8,9-f.

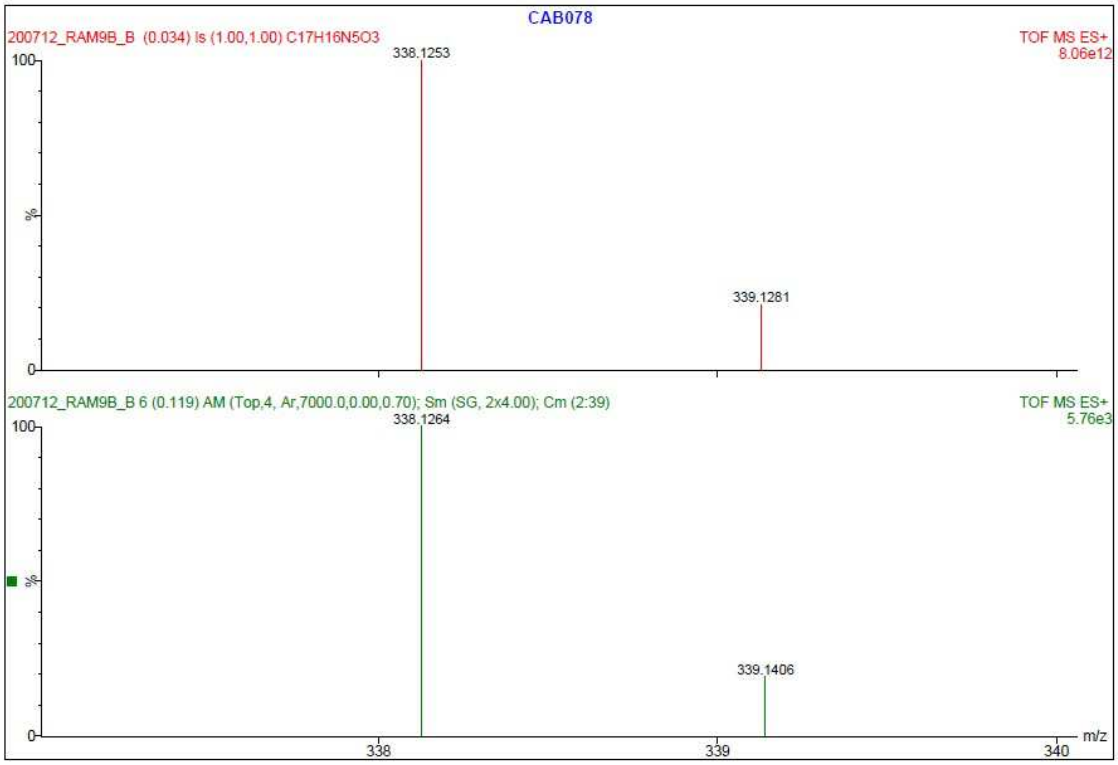


I.V. (método direto, cm^{-1}) 3313 (*v* N-H), 1674 (*v* C=O), 1589 (*v* C=N furoxano), 1450, 1380 (*v* N-O), 1265, 1218, 1170, 736.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C17H15N5O3 [M + H^+]: 338,1253.

Encontrado: 338,1264.



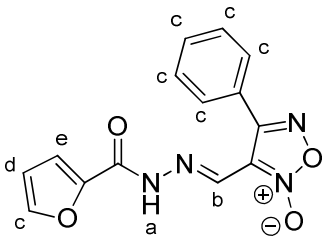
Composto **9**

3-((2-(furano-2-carbonil)hidrazona)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

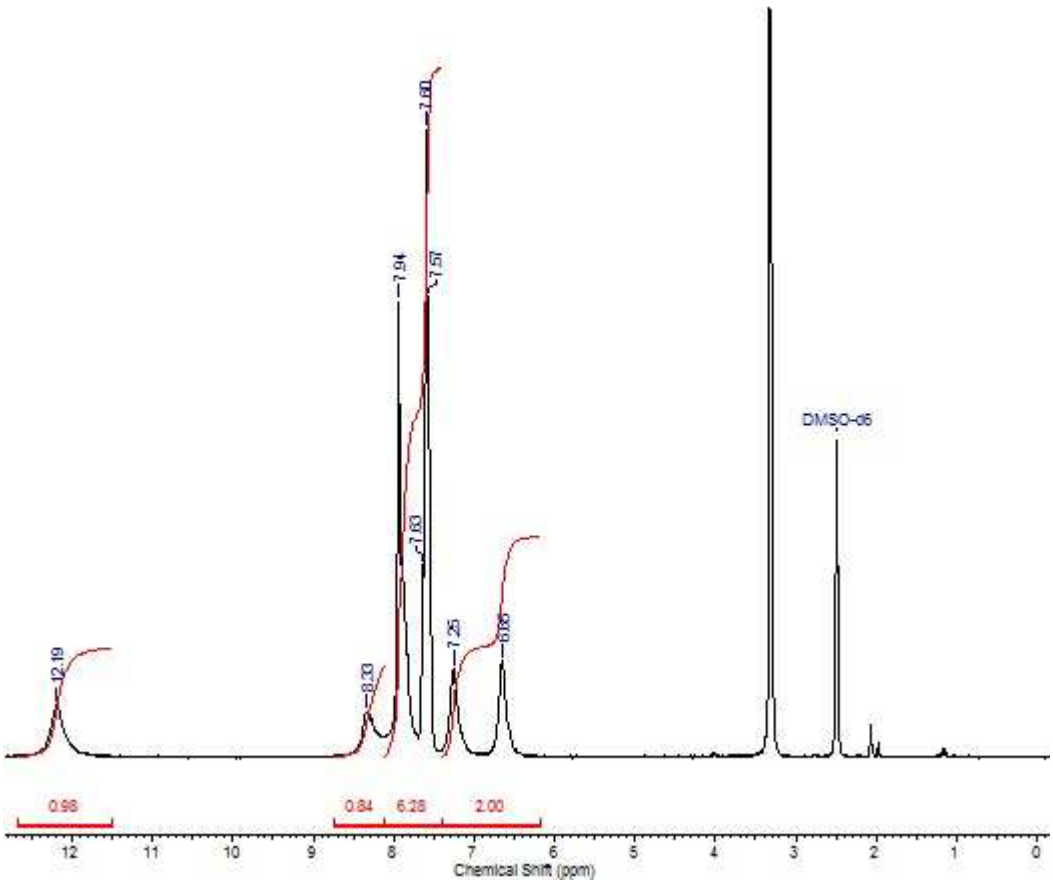
Sólido de coloração branca (p.f.: 199-201 ºC). 74% de rendimento.

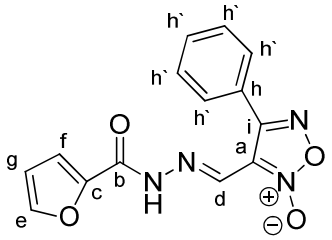
Anal. Elem. Calculado(%): C= 56,38; H= 3,38; N= 18,78.

Encontrado: C= 56,56; H= 3,39; N= 18,84.

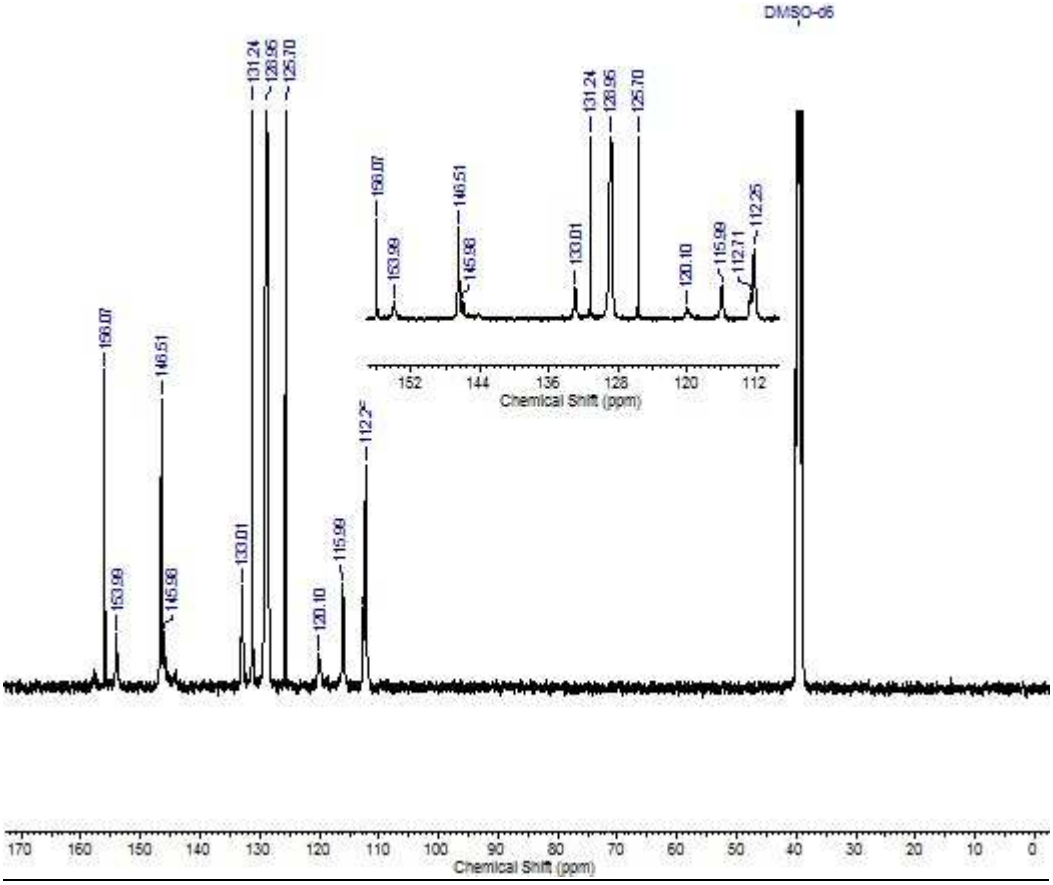


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 12,19 (s, 1H-a); 8,33 (s, 1H-b); 7,94-7,57 (m, 6H-c); 7,25 (sl, 1H-d); 6,65 (s, 1H-e).

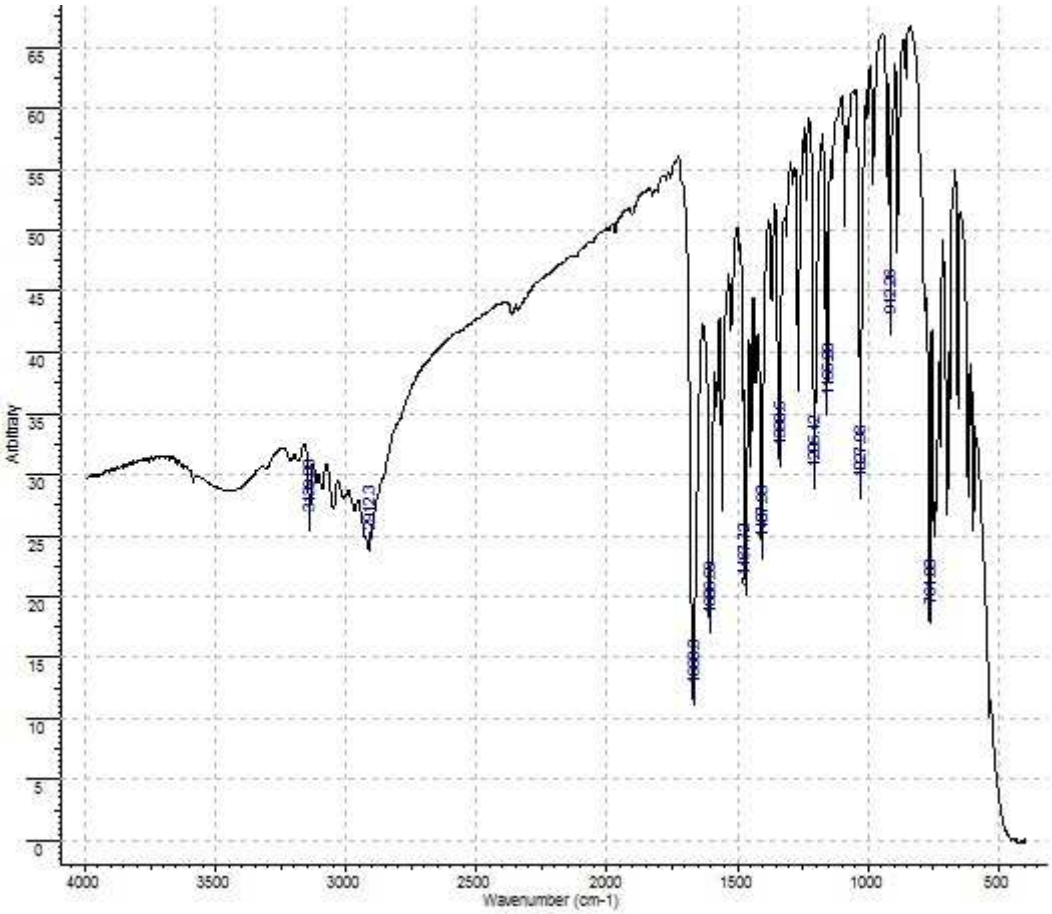




RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 156,0-a; 153,9-b; 146,5-c; 145,9-d; 133,0-e; 131,2-f; 128,9-g; 125,7-h; 120,1-h`; 115,9-h`; 112,7-h`; 112,2-i.

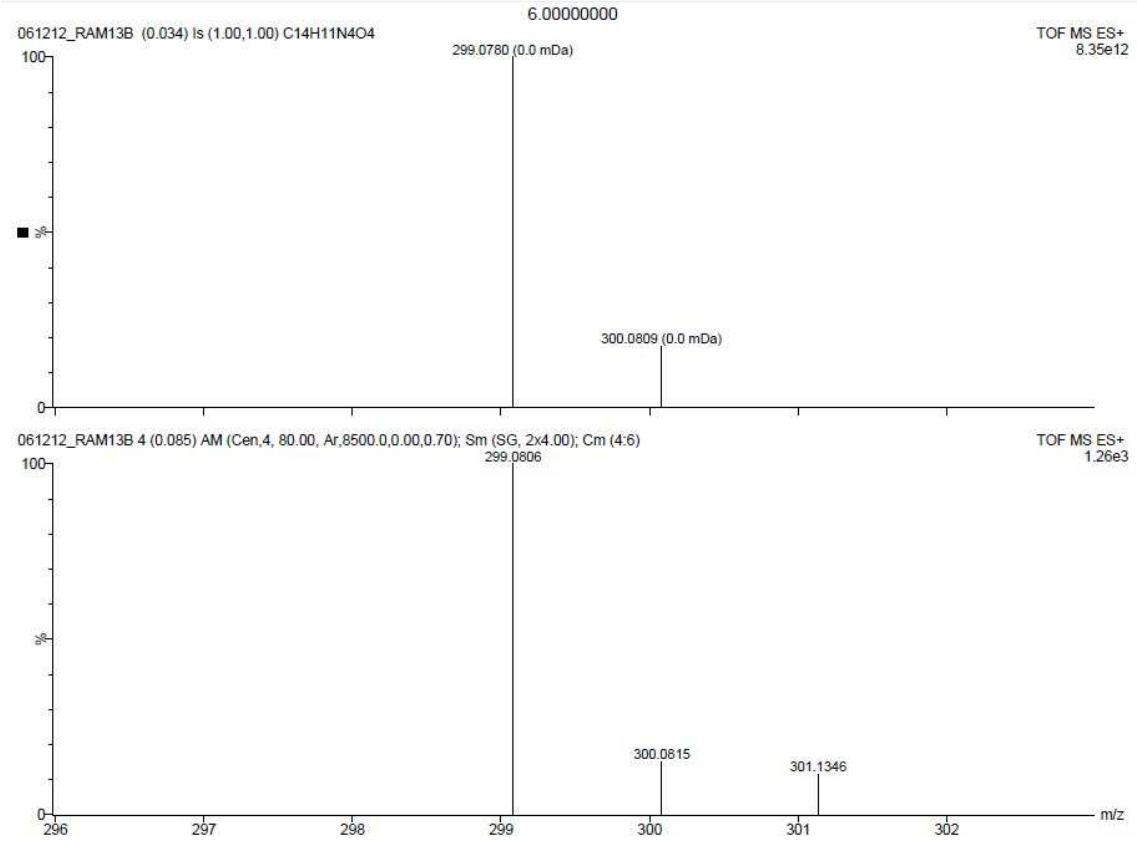


I.V. (método direto, cm^{-1}) 3139 (*v* N-H), 2912, 1668 (*v* C=O), 1606 (*v* C=N furoxano), 1467, 1407, 1338 (*v* N-O), 1205, 1155, 1027, 912, 761.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C14H10N4O4 [M + H^+]: 299,0780.

Encontrado: 299,0806.



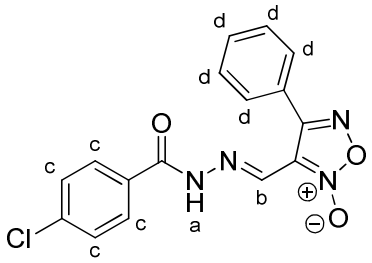
Composto **10**

3-((2-(4-clorobenzoil)hidrazona)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

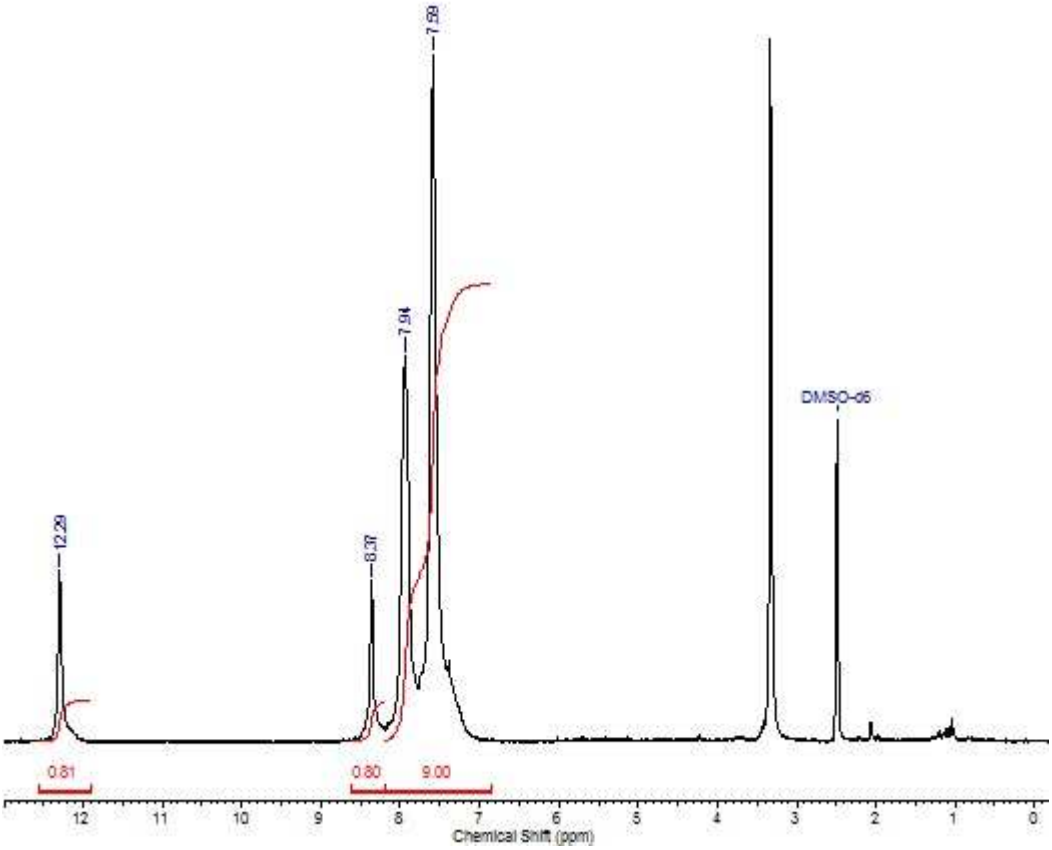
Sólido de coloração branca (p.f.: 205-207 ºC). 62% de rendimento.

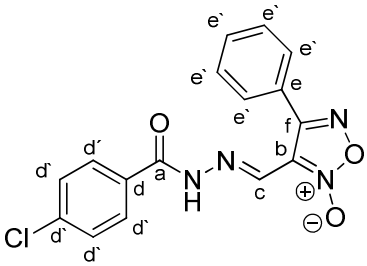
Anal. Elem. Calculado(%): C= 56,07; H= 3,23; N= 16,35.

Encontrado: C= 56,28; H= 3,24; N= 16,41.

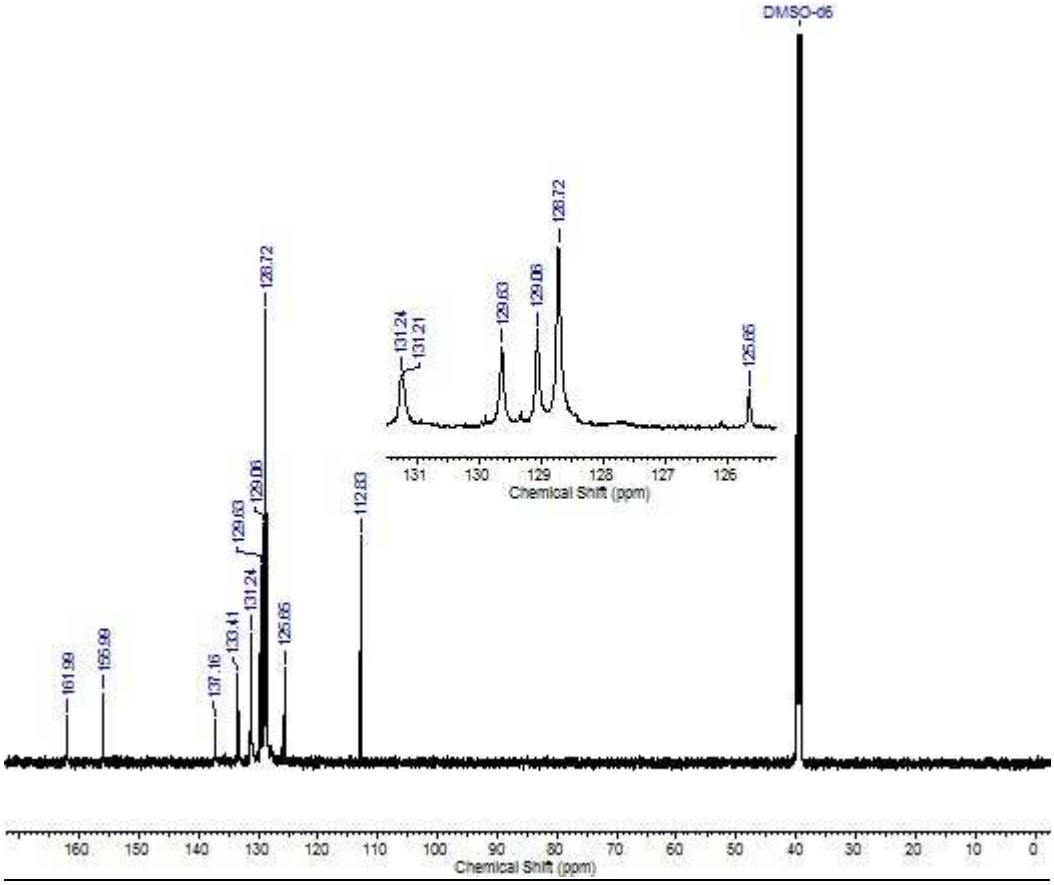


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,29 (s, 1H-a); 8,37 (s, 1H-b); 7,94-7,59 (m, 9H-c,d).

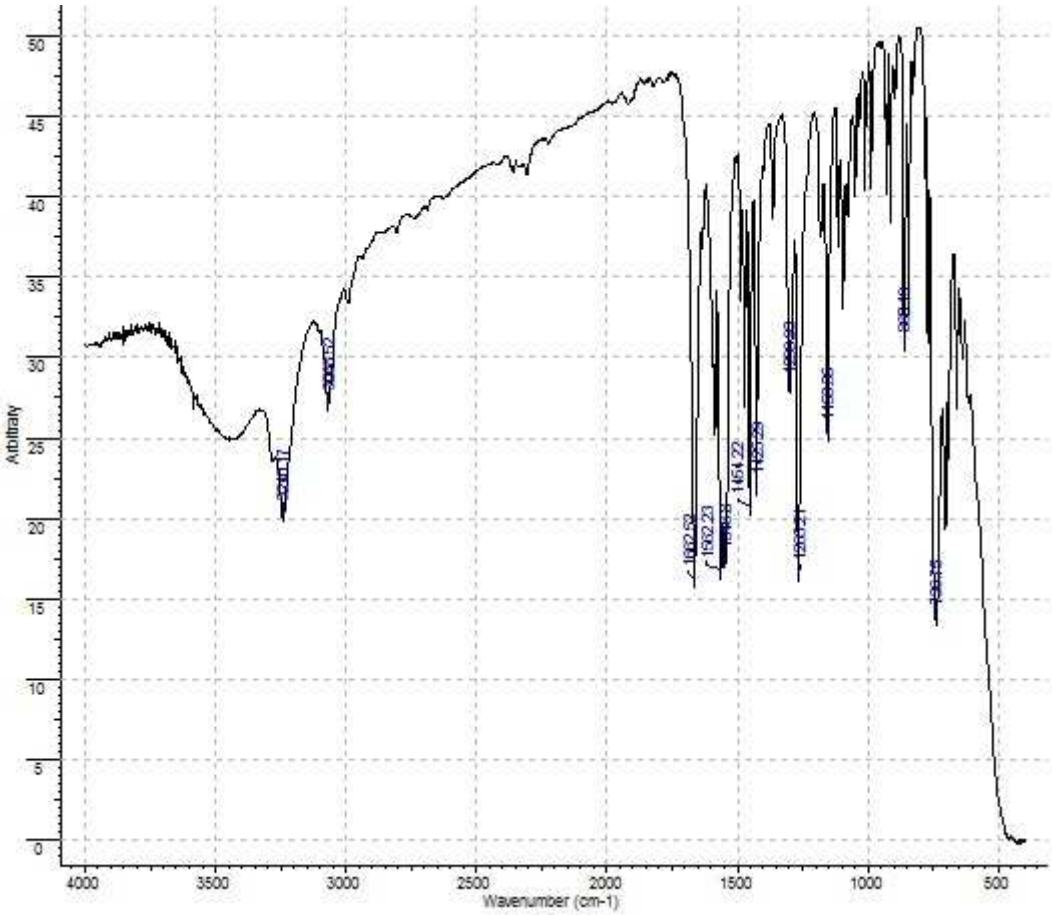




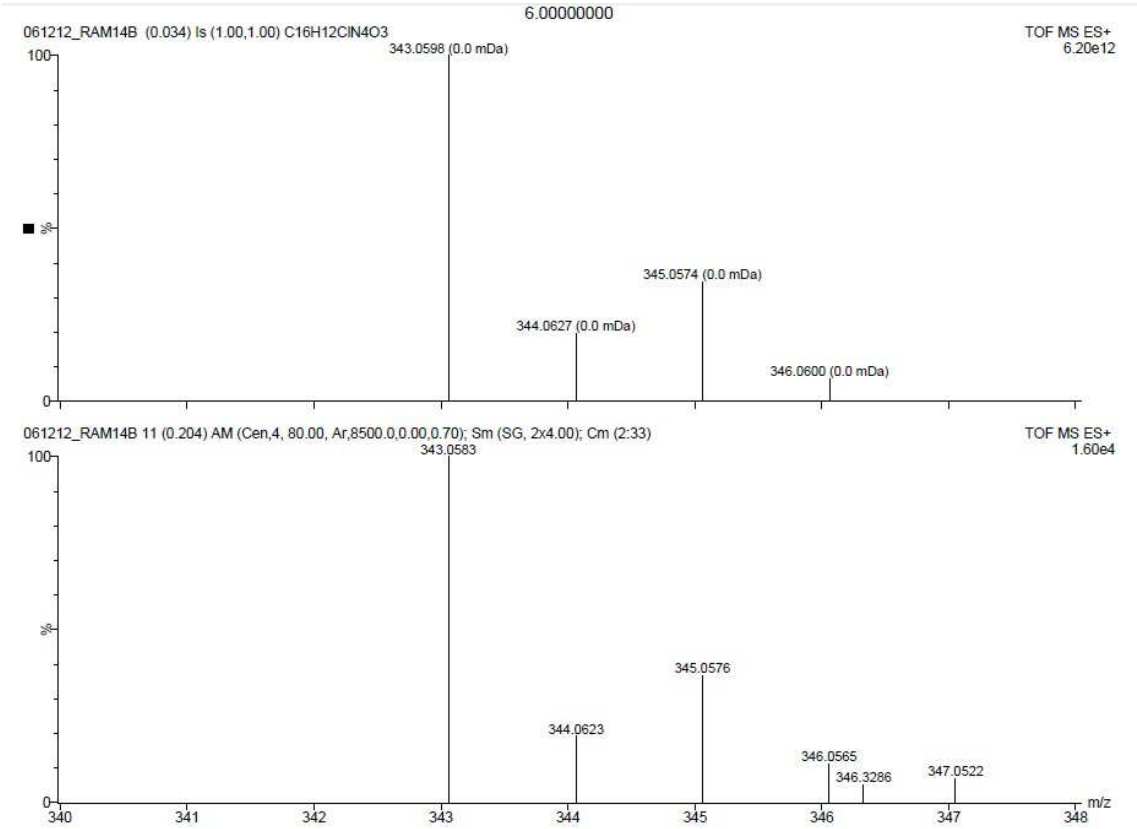
RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 161,9-a; 155,9-b; 137,1-c; 133,4-d; 131,2-d`; 131,2-d`; 129,6-d`; 129,0-e; 128,7-e`; 125,6-e`; 112,8-e`.



I.V. (método direto, cm^{-1}) 3240 (*v* N-H), 3068, 1662 (*v* C=O), 1562 (*v* C=N furoxano), 1546, 1454, 1425, 1299 (*v* N-O), 1265, 1153, 860, 736.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C16H11ClN4O3 [M + H^+]: 343,0598. Encontrado: 343,0583.



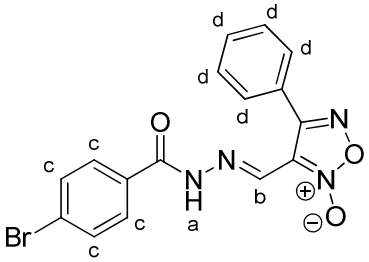
Composto **11**

3-((2-(4-bromobenzoil)hidrazona)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

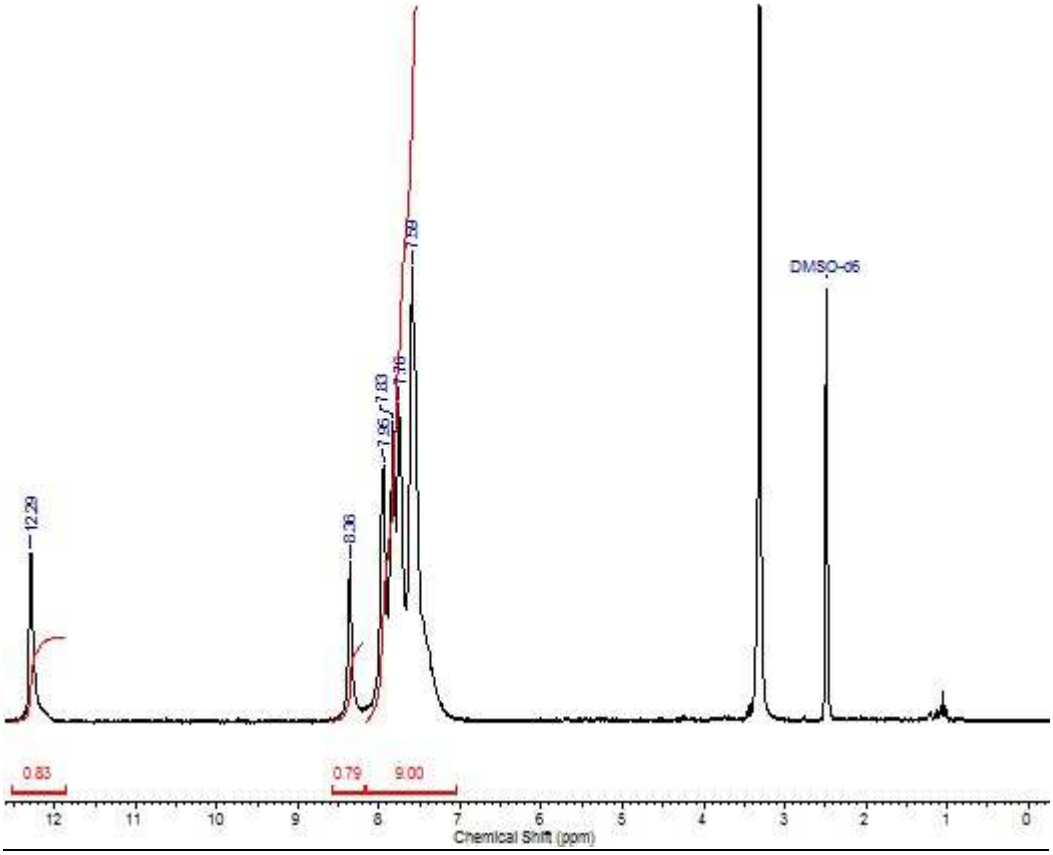
Sólido de coloração branca (p.f.: 206-208 ºC). 57% de rendimento.

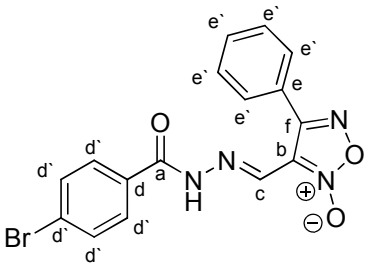
Anal. Elem. Calculado(%): C= 49,63; H= 2,86; N= 14,47.

Encontrado: C= 49,78; H= 2,87; N= 14,51.

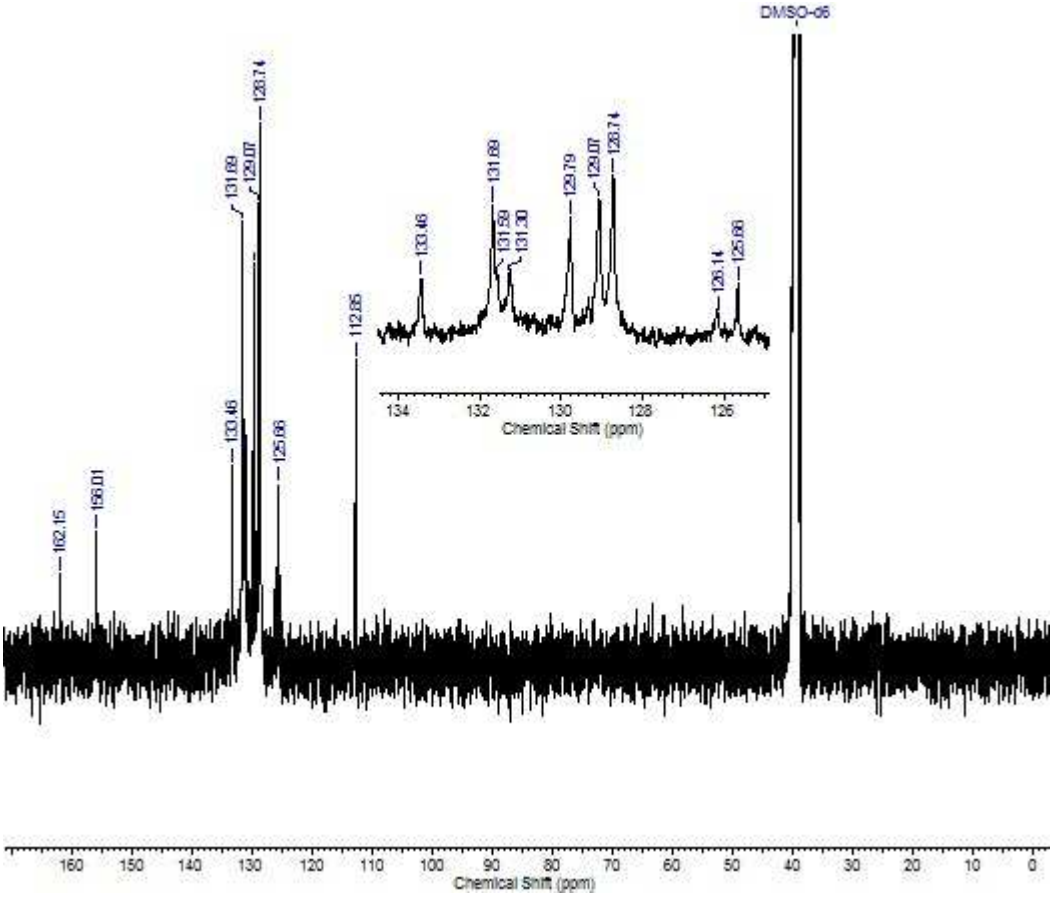


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,29 (s, 1H-a); 8,36 (s, 1H-b); 7,95-7,59 (m, 9H-c,d).

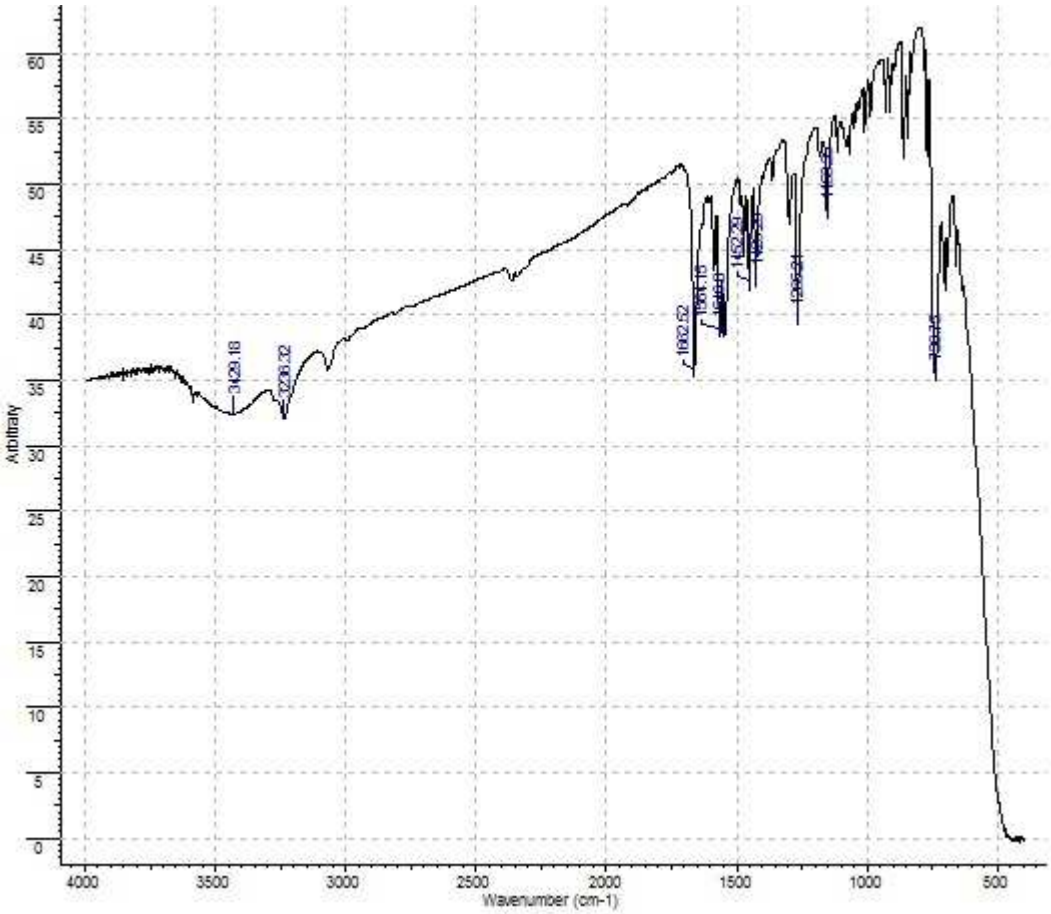




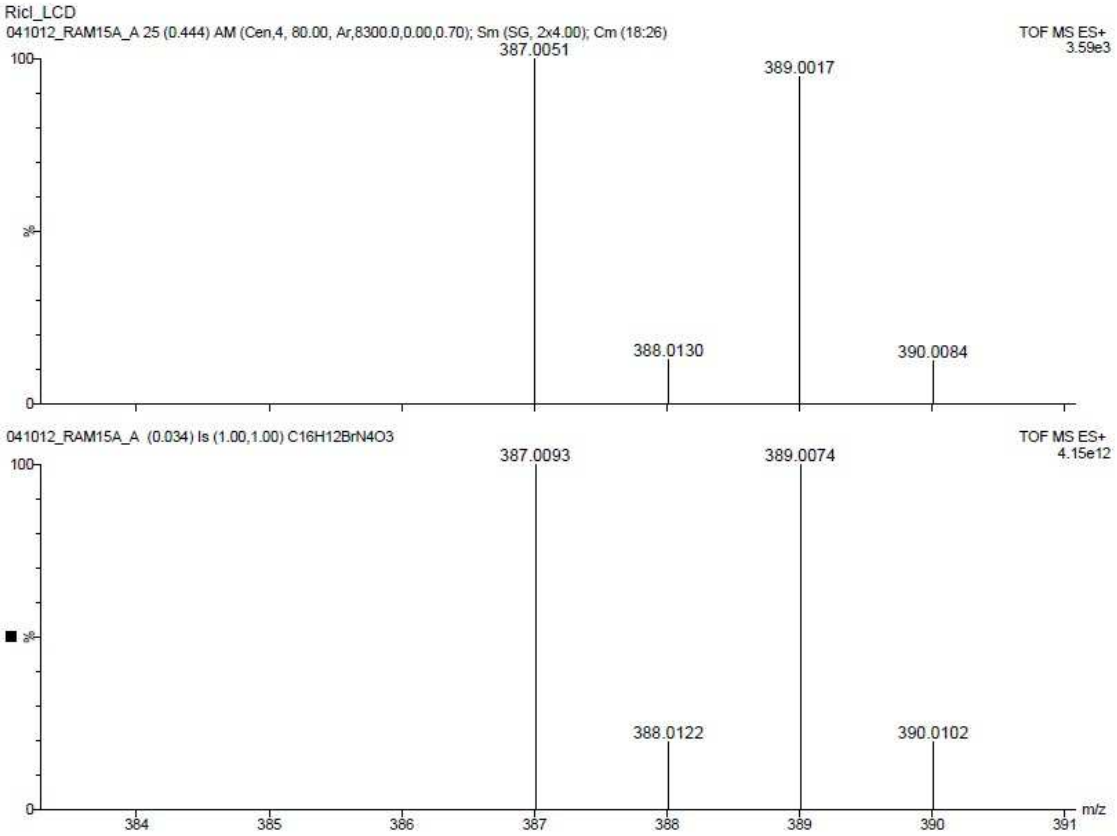
RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 162,1-a; 156,0-b; 133,4-c; 131,6-d; 131,5-d`; 131,3-d`; 129,7-d`; 129,0-e; 128,7-e`; 126,1-e`; 125,6-e`; 112,8-f.



I.V. (método direto, cm^{-1}) 3429 (*v* N-H), 3236, 1662 (*v* C=O), 1564 (*v* C=N furoxano), 1546, 1452, 1425, 1265 (*v* N-O), 1153, 736.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C16H11BrN4O3 [M + H^+]: 387,0093. Encontrado: 387,0051



Composto **12**

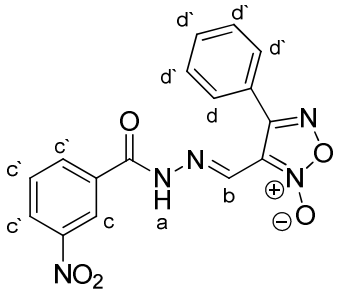
3-((2-(3-nitrobenzoil)hidrazona)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 187-189 ºC). 63% de rendimento.

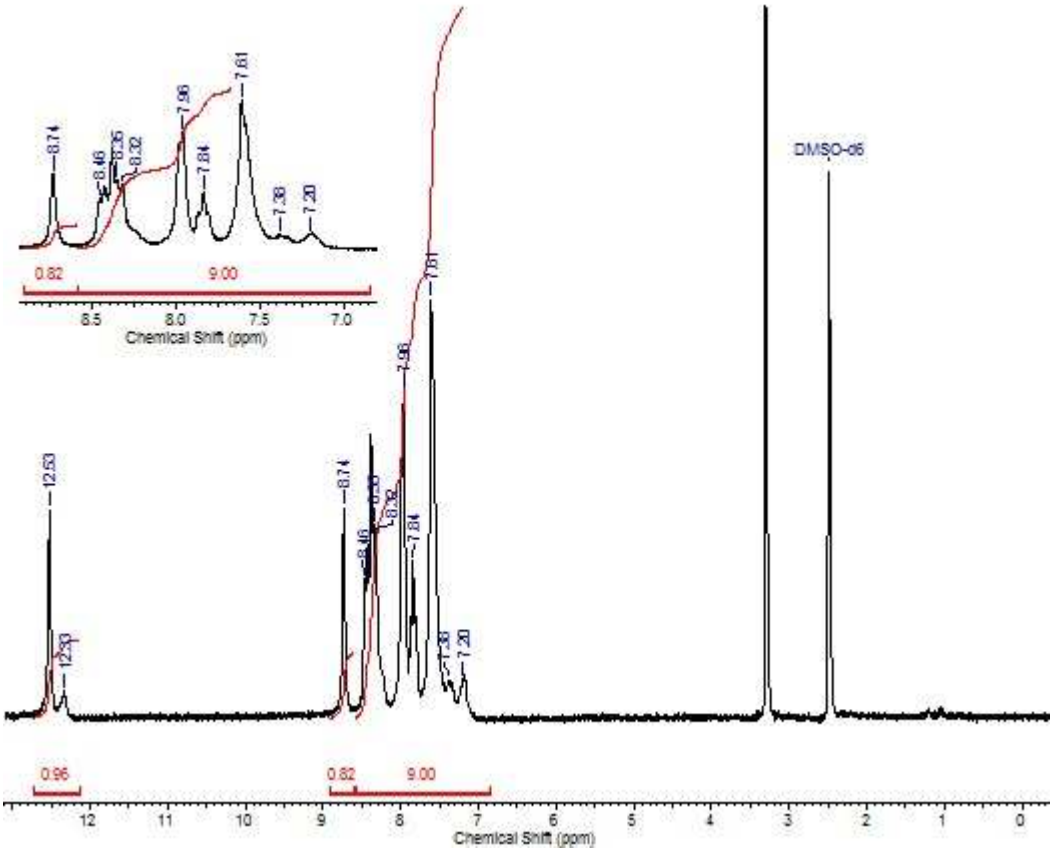
Proporção isômeros *E/Z*= 80:20.

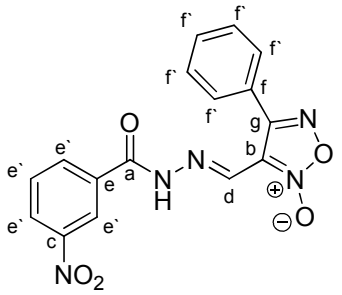
Anal. Elem. Calculado(%): C= 54,39; H= 3,14; N= 19,82.

Encontrado: C= 54,61; H= 3,15; N= 19,89.

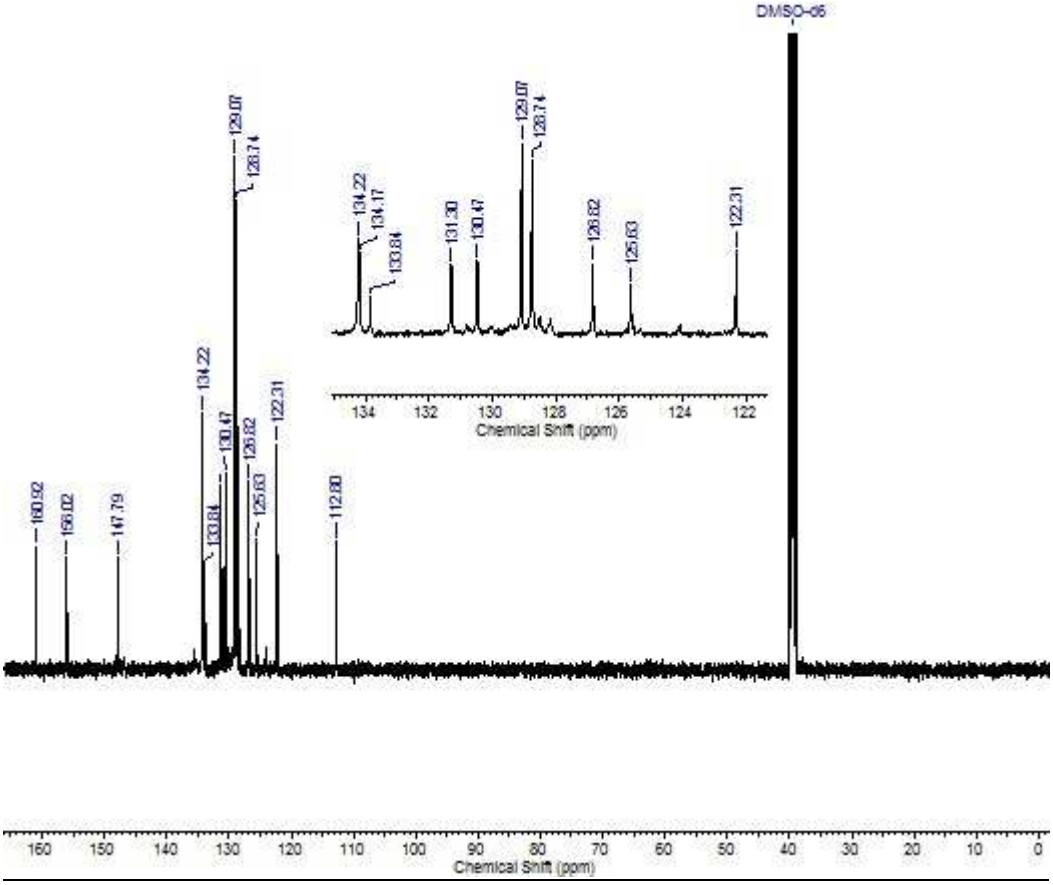


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,53 / 12,33 (s, 1H-a); 8,74 (s, 1H-b); 8,46-7,20 (m, 9H-c,c`,d,d`).

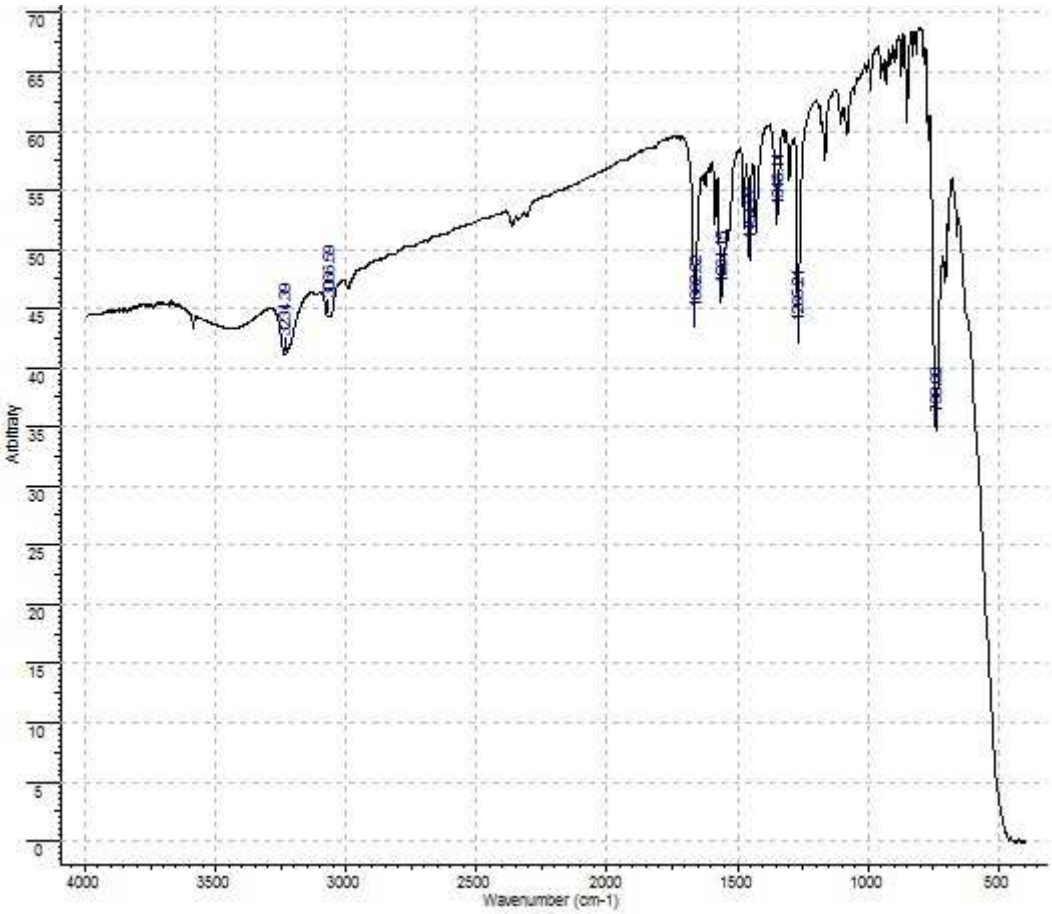




RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 160,9-a; 156,0-b; 147,7-c; 134,2-d; 134,1-e; 133,8-e`; 131,3-e`; 130,4-e`; 129,0-e`; 128,7-f; 126,8-f`; 125,6-f`; 122,3-f`; 112,8-g.

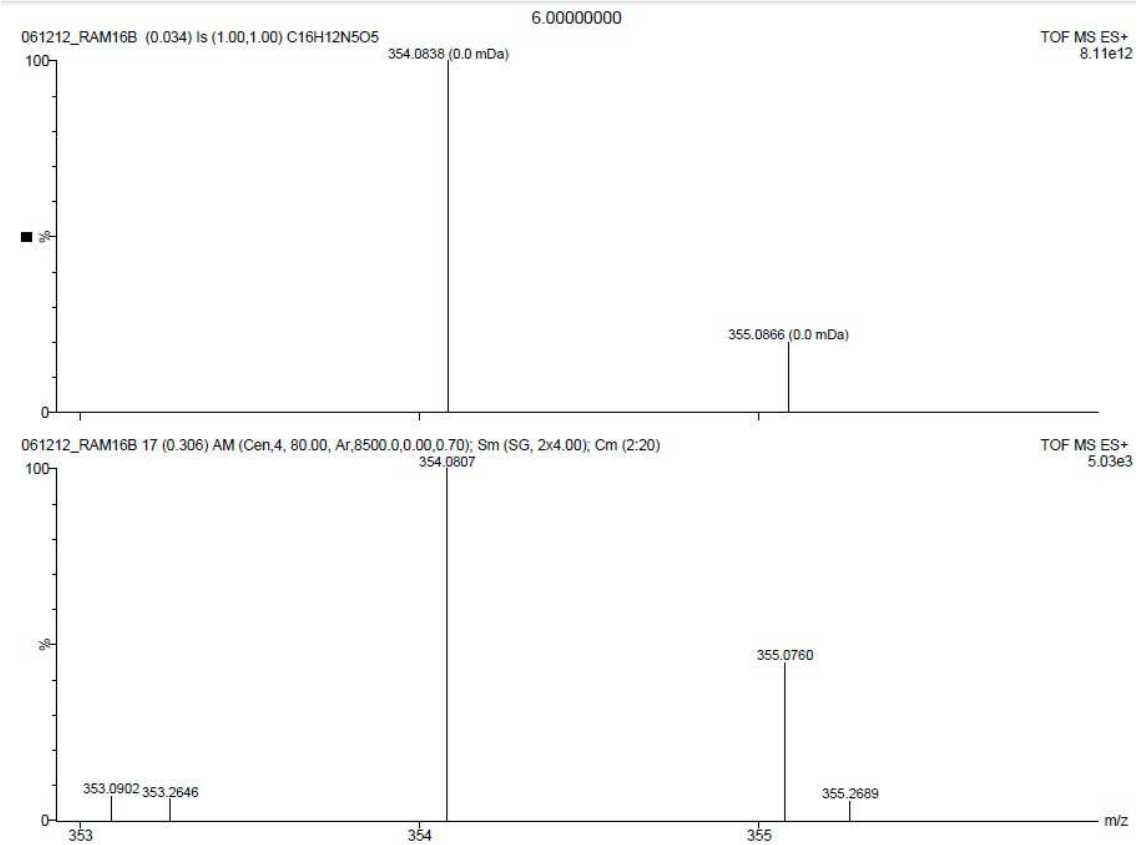


I.V. (método direto, cm^{-1}) 3234 (*ν* N-H), 3066, 1662 (*ν* C=O), 1564 (*ν* C=N furoxano), 1454, 1348 (*ν* N-O), 1265, 738.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C16H11N5O5 [M + H^+]: 354,0838.

Encontrado: 354,0807.



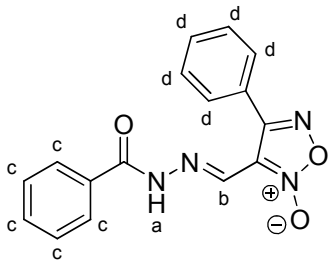
Composto **13**

3-((2-benzoilidrazona)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

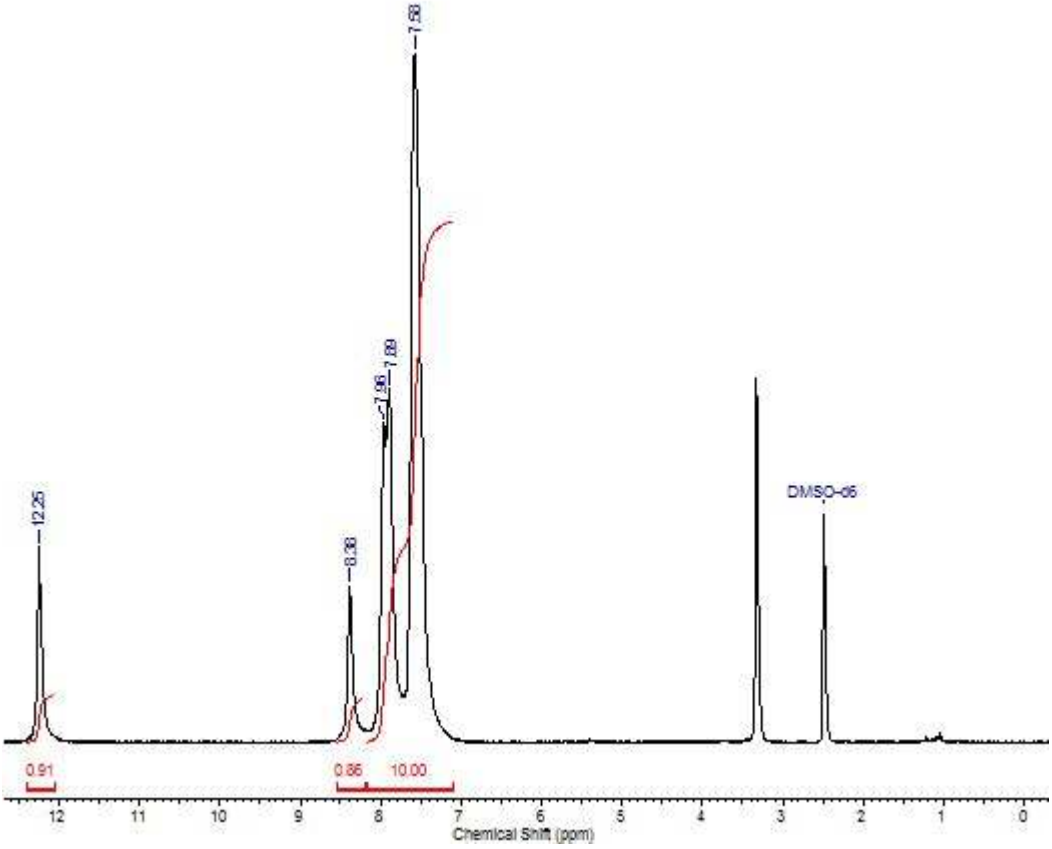
Sólido de coloração branca (p.f.: 206-208 ºC). 70% de rendimento.

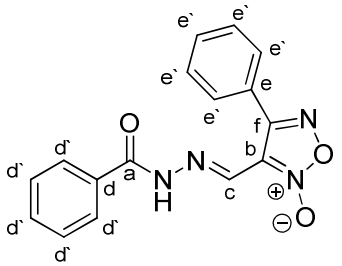
Anal. Elem. Calculado(%): C= 62,33; H= 3,92; N= 18,17.

Encontrado: C= 62,55; H= 3,93; N= 18,21.

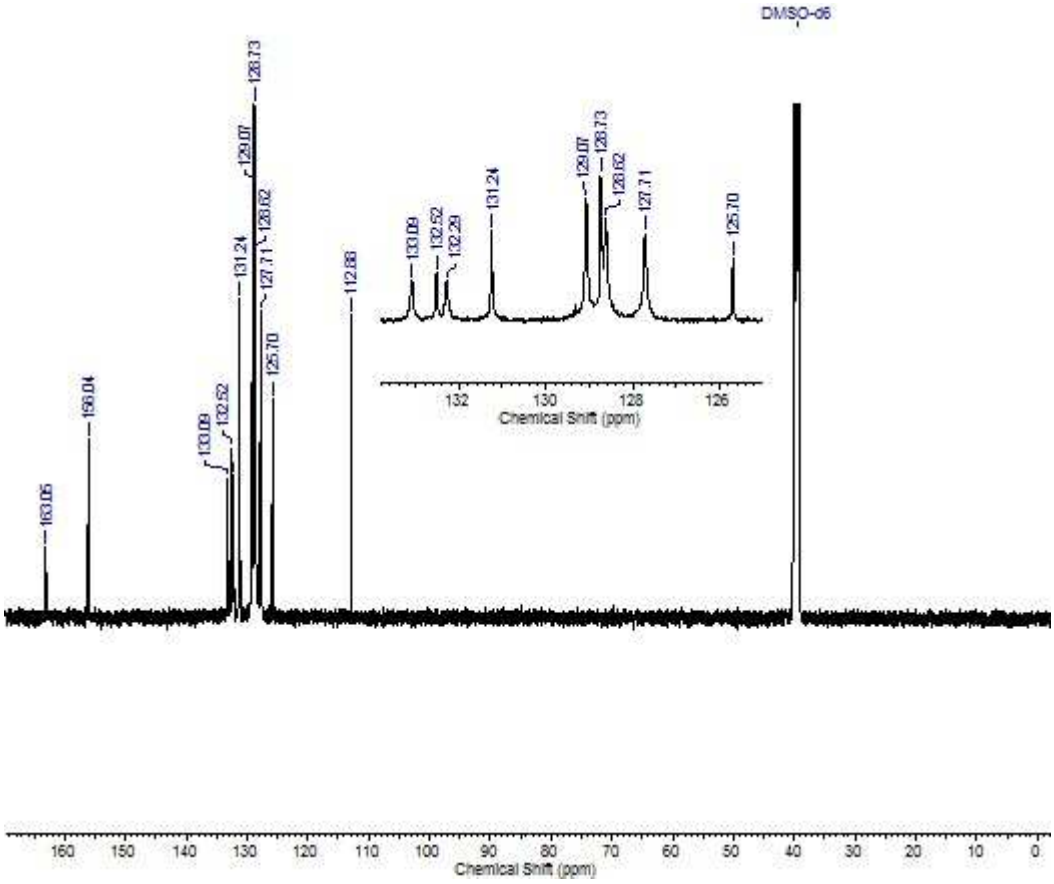


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,25 (s, 1H-a); 8,36 (s, 1H-b); 7,96-7,58 (m, 10H-c,d).





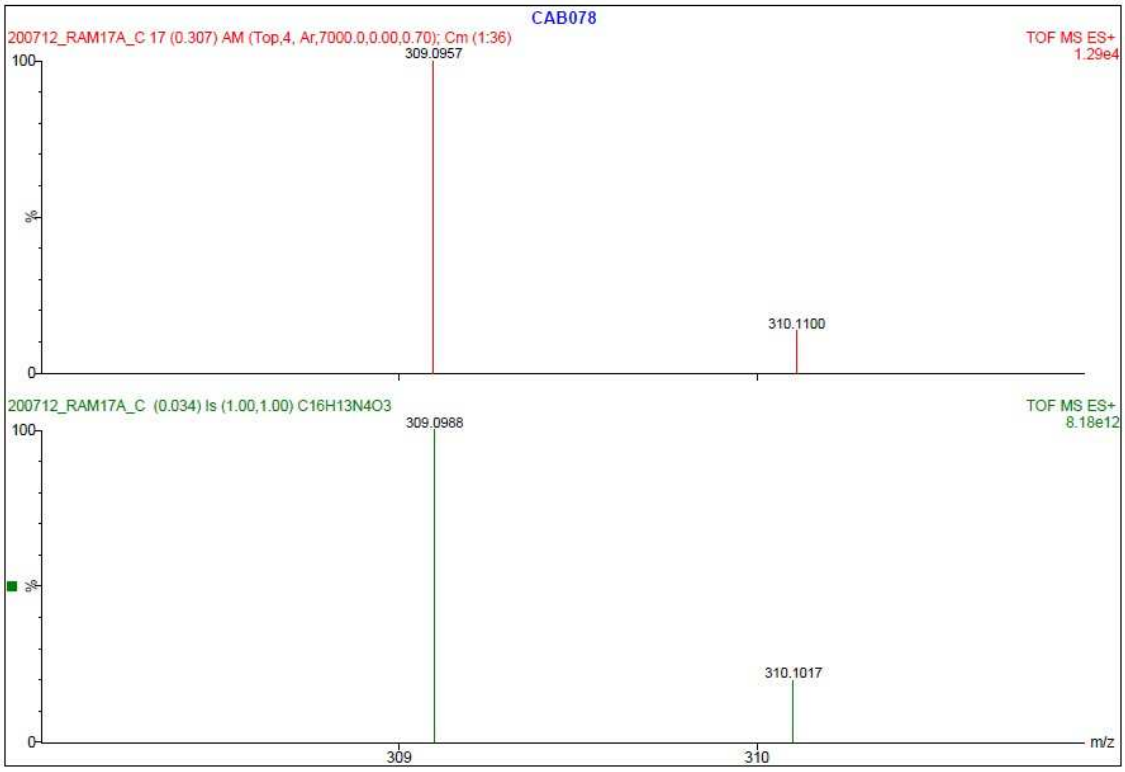
RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 163,0-a; 156,0-b; 133,0-c; 132,5-d; 132,2-d`; 131,2-d`; 129,0-d`; 128,7-e; 128,6-e`; 127,7-e`; 125,7-e`; 112,8-f.



I.V. (método direto, cm^{-1}) 3442 (*v* N-H), 1652 (*v* C=O), 1596, 1564 (*v* C=N furoxano), 1357 (*v* N-O), 1282, 1155, 979, 736.

Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C16H12N4O3 [M + H^+]: 309,0988.

Encontrado: 309,0957.



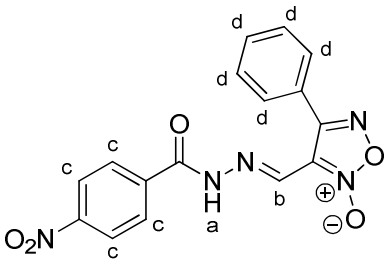
Composto **14**

3-((2-(4-nitrobenzoil)hidrazona)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

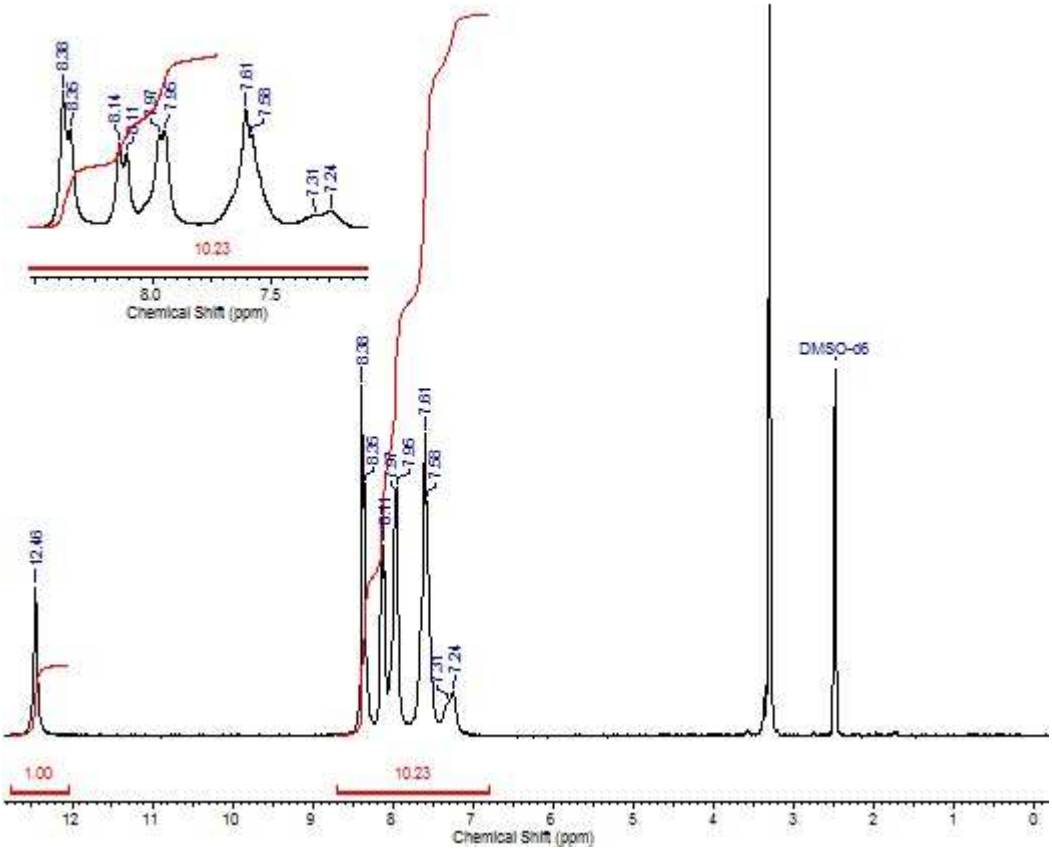
Sólido de coloração amarelada (p.f.: 194-196 ºC). 70% de rendimento.

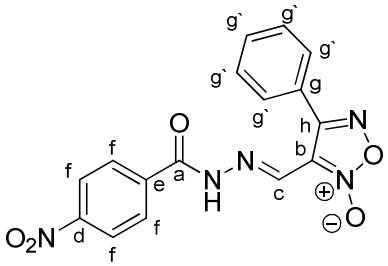
Anal. Elem. Calculado(%): C= 54,39; H= 3,14; N= 19,82.

Encontrado: C= 54,60; H= 3,15; N= 19,89.

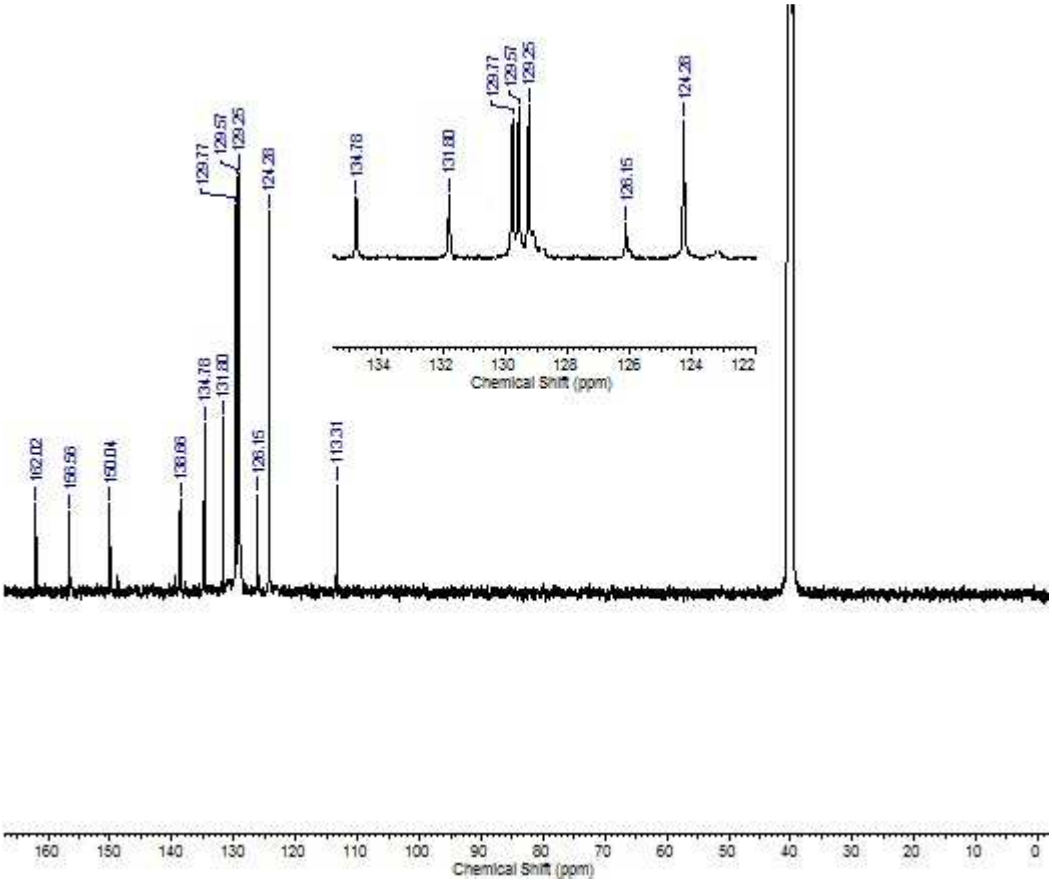


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,46 (s, 1H-a); 8,36-7,24 (m, 10H-b,c,d).

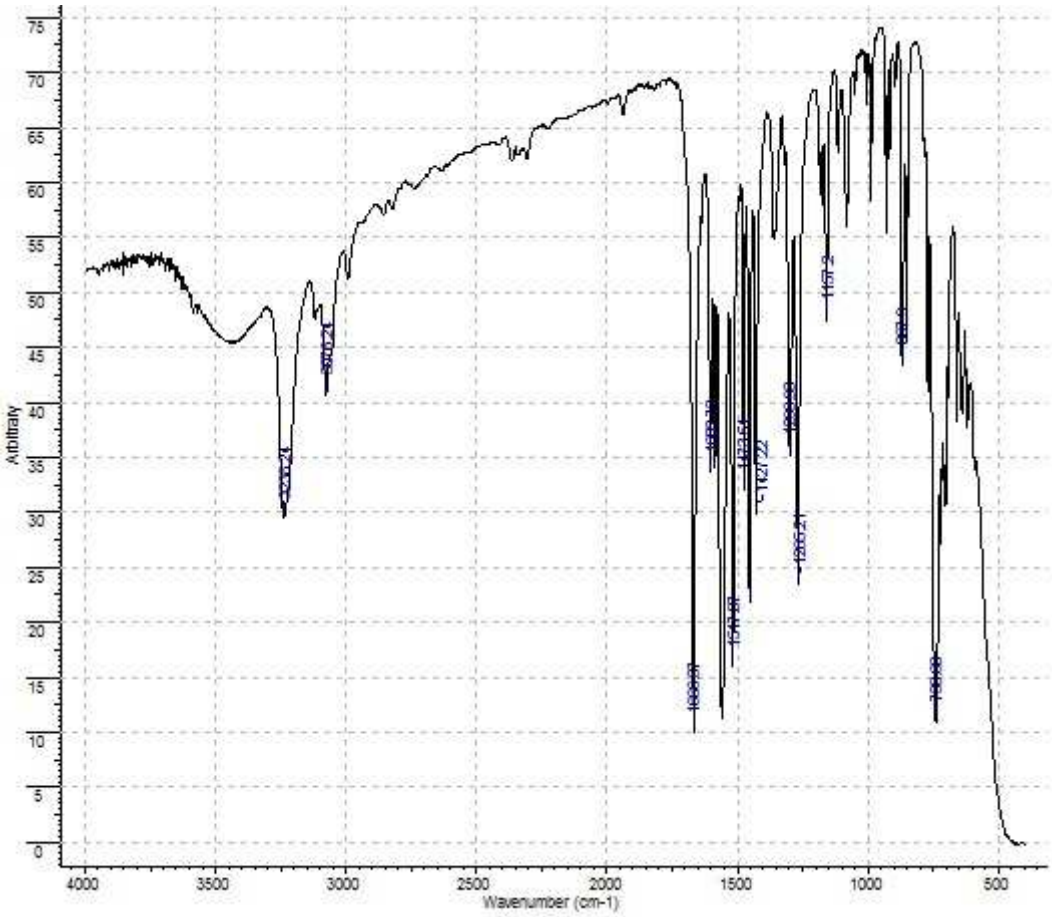




RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 162,0-a; 156,5-b; 150,0-c; 136,6-d; 134,7-e; 131,8-f; 129,7-f; 129,5-g; 129,2-g`; 126,1-g`; 124,2-g`; 113,3-h.

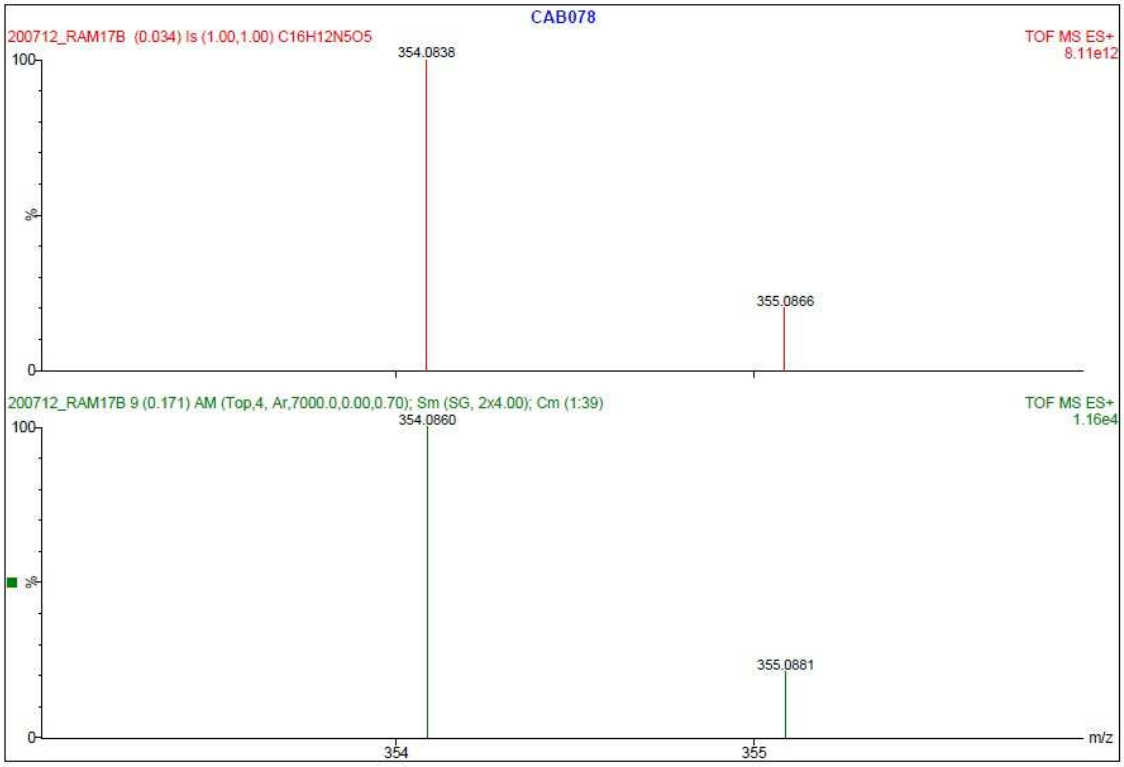


I.V. (método direto, cm^{-1}) 3238 (*v* N-H), 3076, 1666 (*v* C=O), 1602, 1556 (*v* C=N furoxano), 1517, 1473, 1454, 1427, 1299 (*v* N-O), 1265, 1157, 867, 738.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C16H11N5O5 [M + H^+]: 354,0838.

Encontrado: 354,0860.



Composto **15**

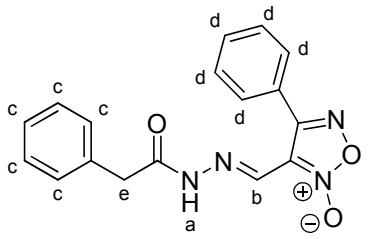
4-fenil-3-((2-(2-fenilacetil)hidrazona)metil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido

Sólido de coloração amarelada (p.f.: 178-181 ºC). 17% de rendimento.

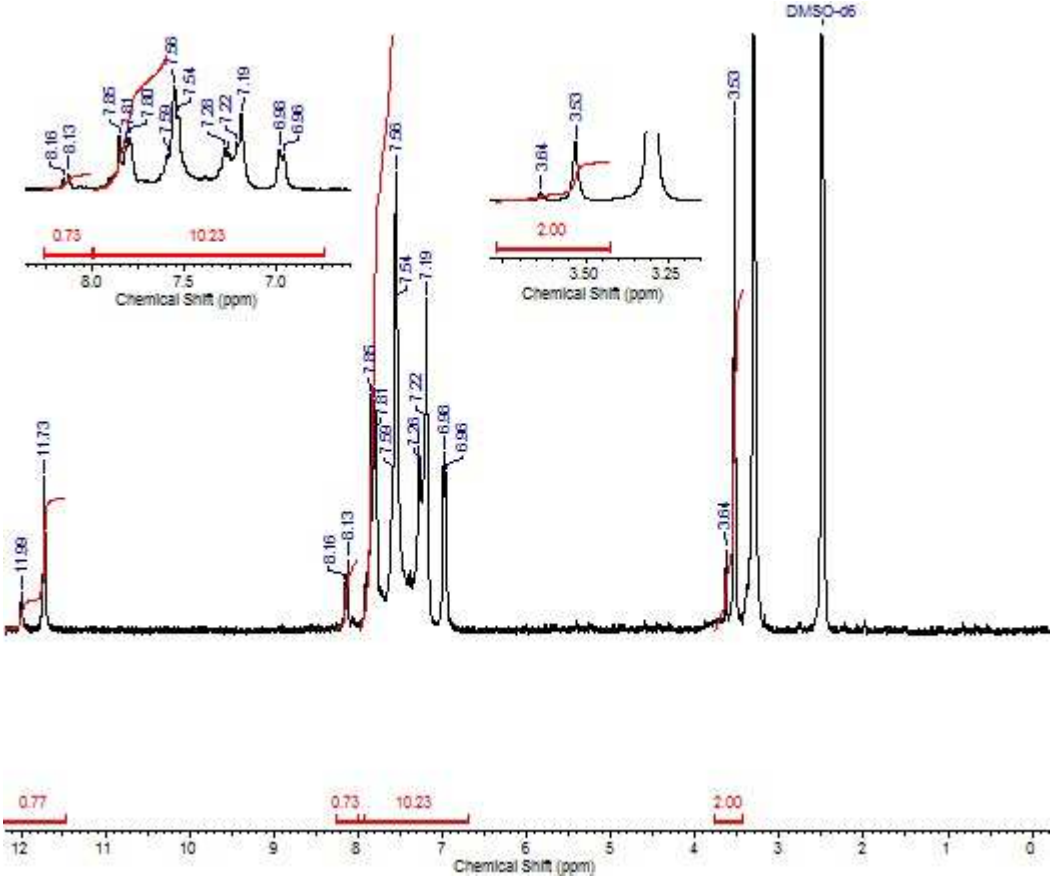
Proporção isômeros *E/Z*= 79:21.

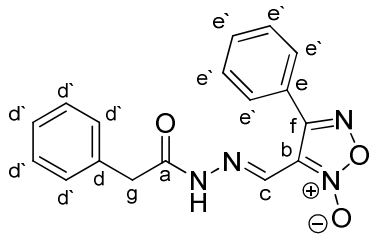
Anal. Elem. Calculado(%): C= 63,35; H= 4,38; N= 17,38.

Encontrado: C= 63,59; H= 4,39; N= 17,43.

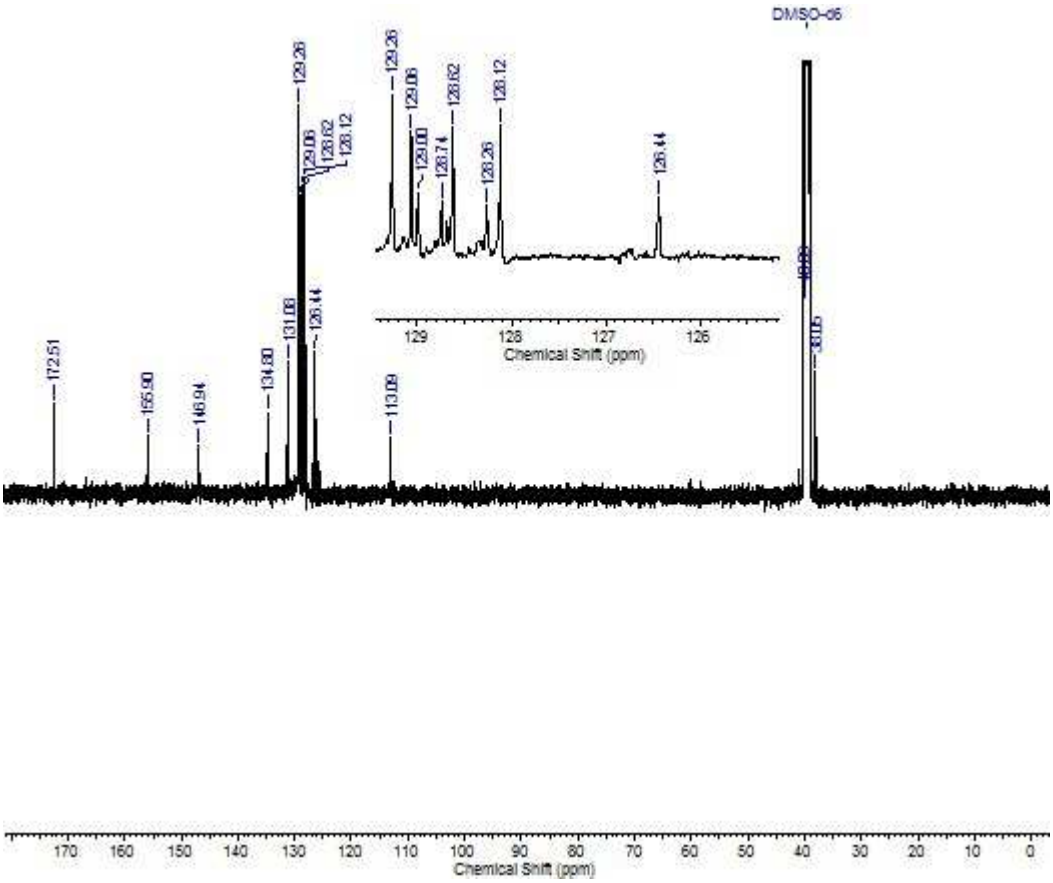


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D$_6$, δ = ppm): 11,99 / 11,73 (s, 1H-a); 8,16 / 8,13 (s, 1H-b); 7,85-6,96 (m, 10H-c,d); 3,64 / 3,53 (s, 2H-e).

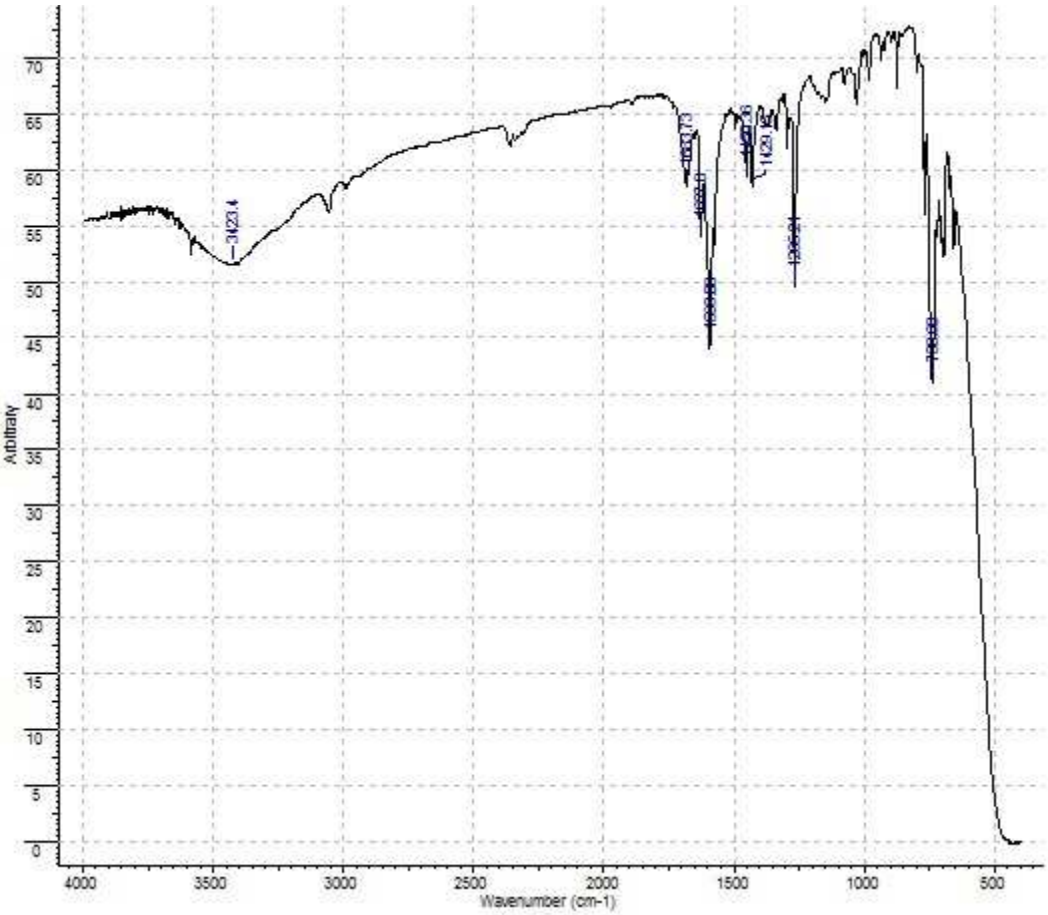




RMN ^{13}C (125 MHz) δ (ppm): 172,5-a; 155,9-b; 146,9-c; 134,8-c; 131,0-d; 129,2-d`; 129,0-d`; 129,0-d`; 128,7-e; 128,6-e`; 128,2-e`; 128,1-e`; 126,4-e`; 113,0-f; 40,0-g; 36,1-g.

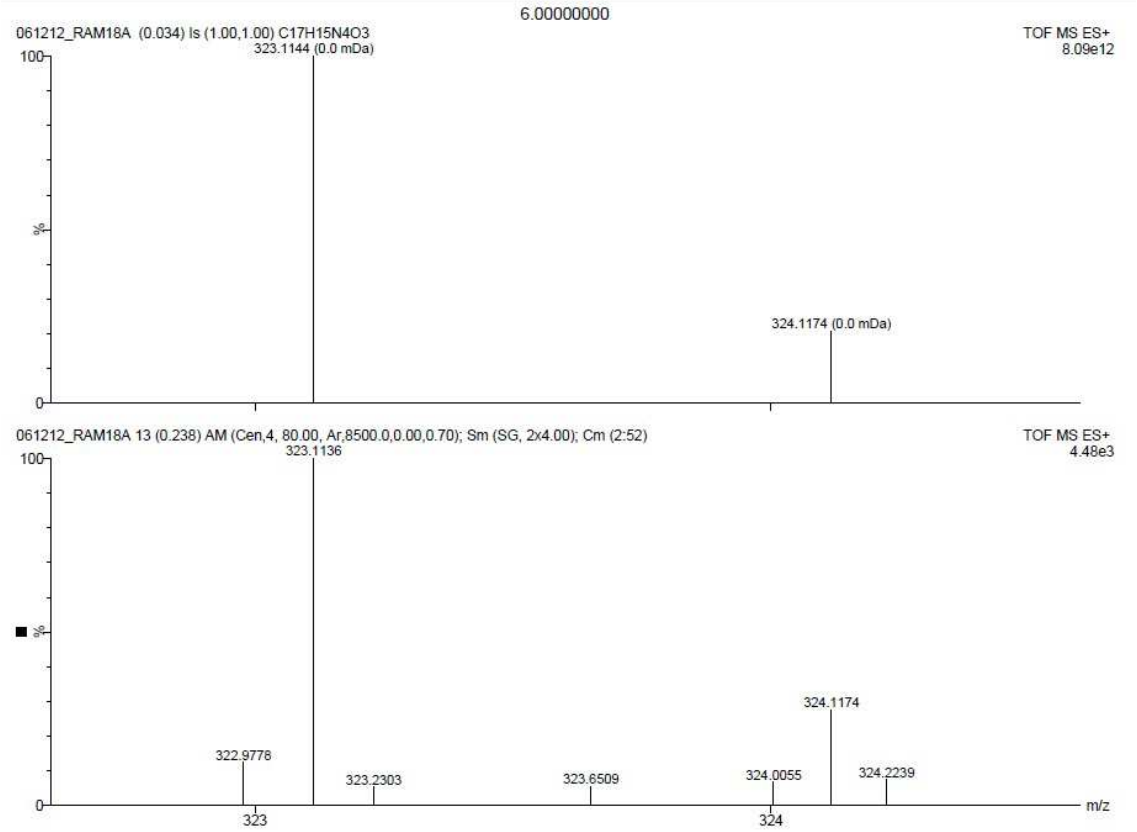


I.V. (método direto, cm^{-1}) 3423 (*v* N-H), 1683 (*v* C=O), 1627, 1593 (*v* C=N furoxano), 1450, 1429 (*v* N-O), 1265, 738.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C17H14N4O3 [M + H^+]: 323,1144.

Encontrado: 323,1136.



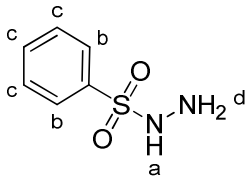
3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL – CAPÍTULO 3 (DERIVADOS SULFONILIDRAZÔNICOS)

Na análise de RMN ^{1}H dos intermediários sulfonilidrazídicos (**XII-XXIV**) o deslocamento químico dos hidrogênios ligados ao nitrogênio (*N-H*), (*N-H*$_2$) e ligados aos anéis aromáticos apresentaram valores entre 8,73-8,17 ppm, 4,36-3,99 ppm e 8,53-7,12 ppm, respectivamente.

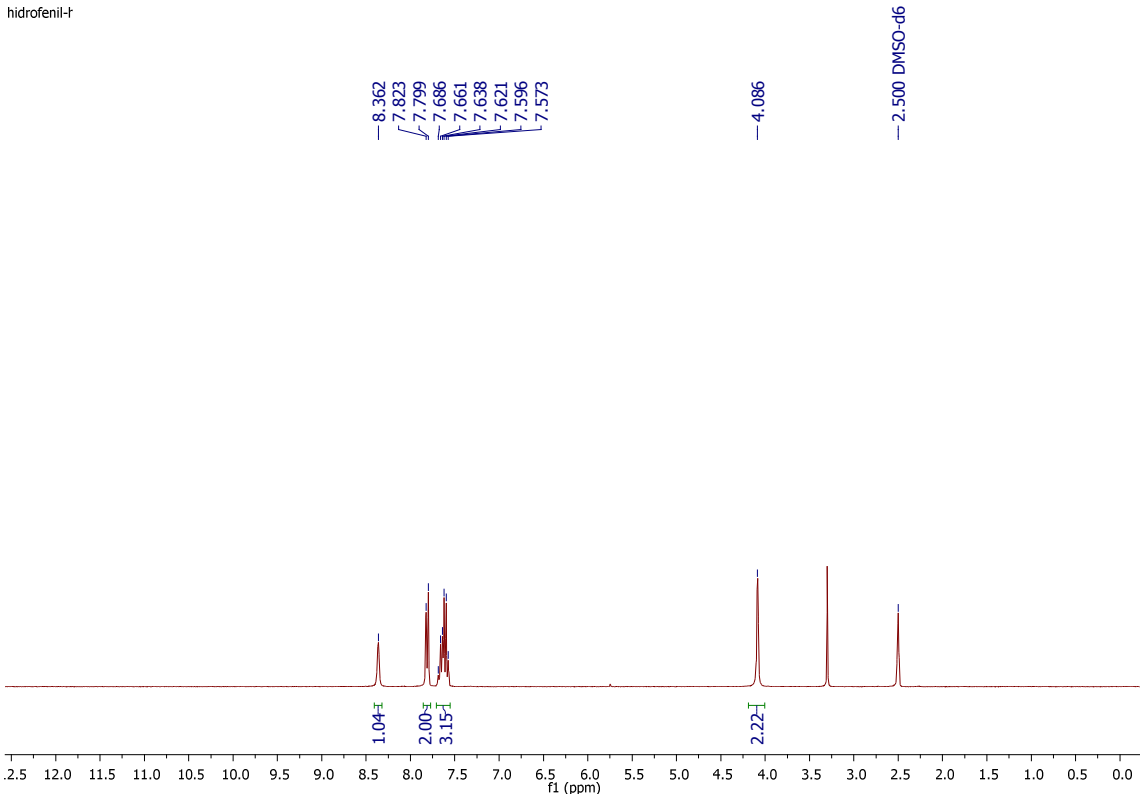
Intermediário **XII**

benzenossulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 60% de rendimento.



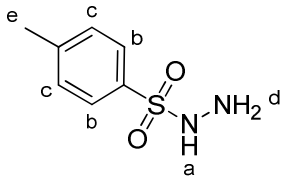
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 8,36 (s, 1H-a); 7,81 (d, 2H-b, J=7,2 Hz); 7,68-7,57 (m, 3H-c); 4,08 (s, 2H-d).



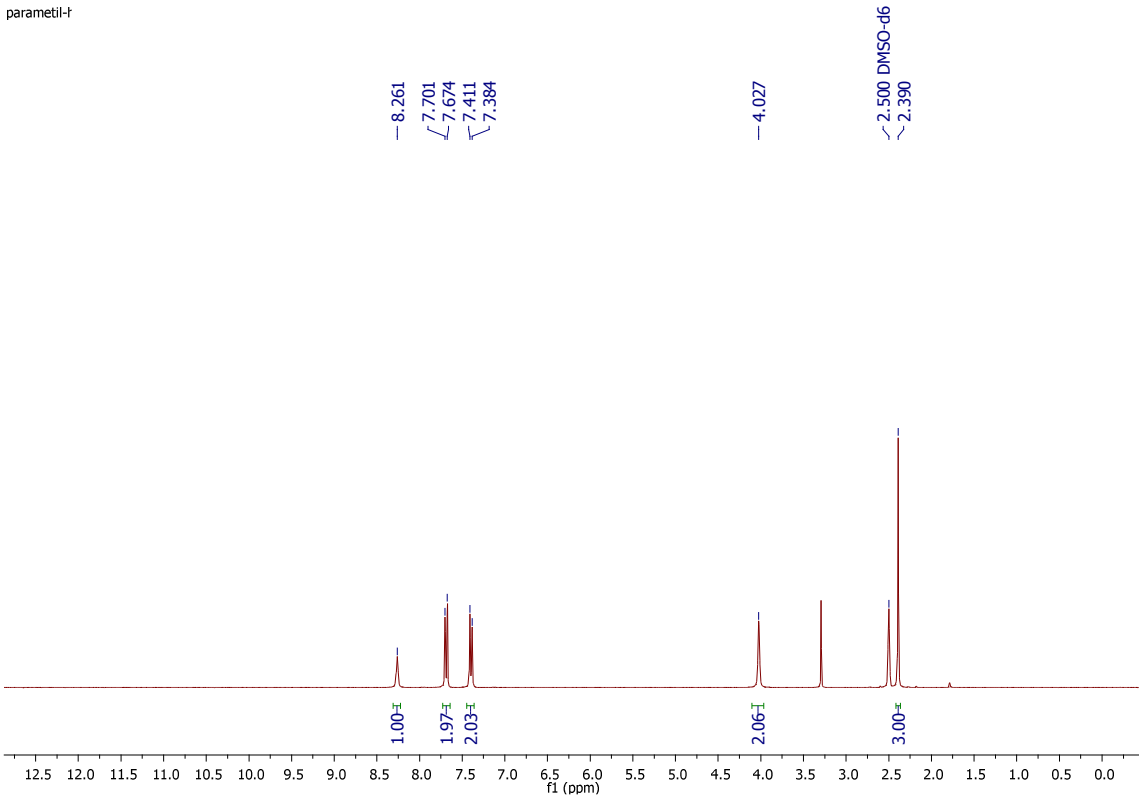
Intermediário **XIII**

4-metilbenzenossulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 89% de rendimento.



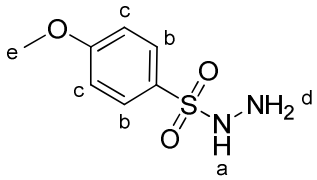
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 8,26 (s, 1H-a); 7,69 (d, 2H-b, J=8,1 Hz); 7,40 (d, 2H-c, J=8,1 Hz); 4,02 (s, 2H-d); 2,39 (s, 3H-e).



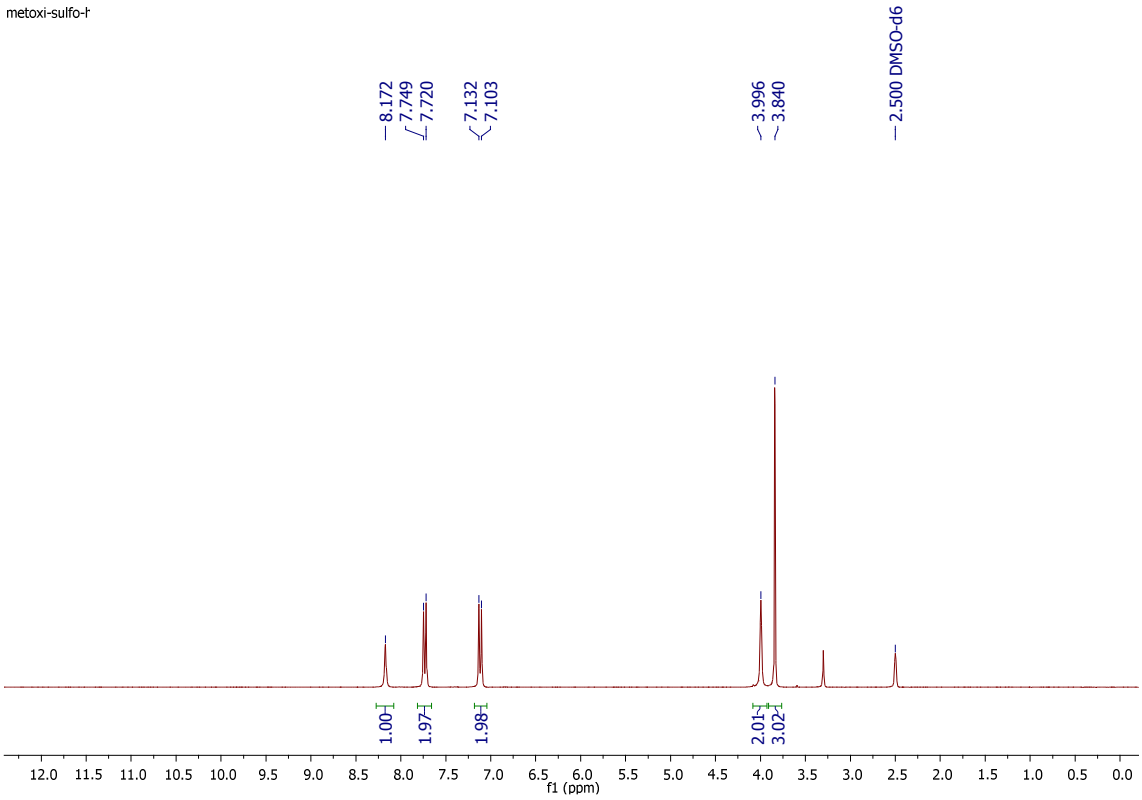
Intermediário **XIV**

4-metoxibenzenossulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 83% de rendimento.



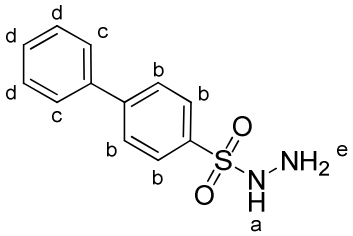
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 8,17 (s, 1H-a); 7,73 (d, 2H-b, J=8,7 Hz); 7,12 (d, 2H-c, J=8,7 Hz); 3,99 (s, 2H-d); 3,84 (s, 3H-e).



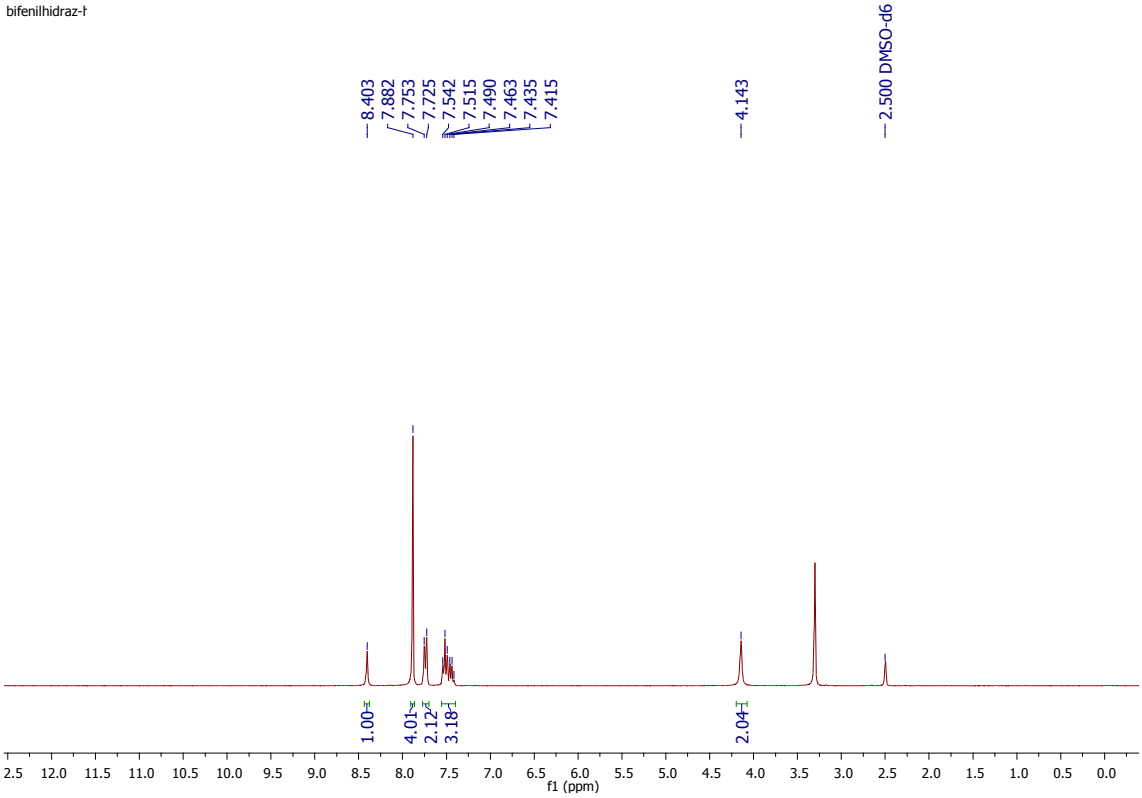
Intermediário **XV**

[1,1'-bifenil]-4-sulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 65% de rendimento.



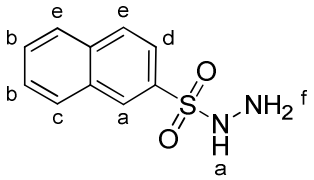
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 8,40 (s, 1H-a); 7,88 (s, 4H-b); 7,74 (d, 2H-c, J=8,4 Hz); 7,54-7,41 (m, 3H-d); 4,14 (s, 2H-e).



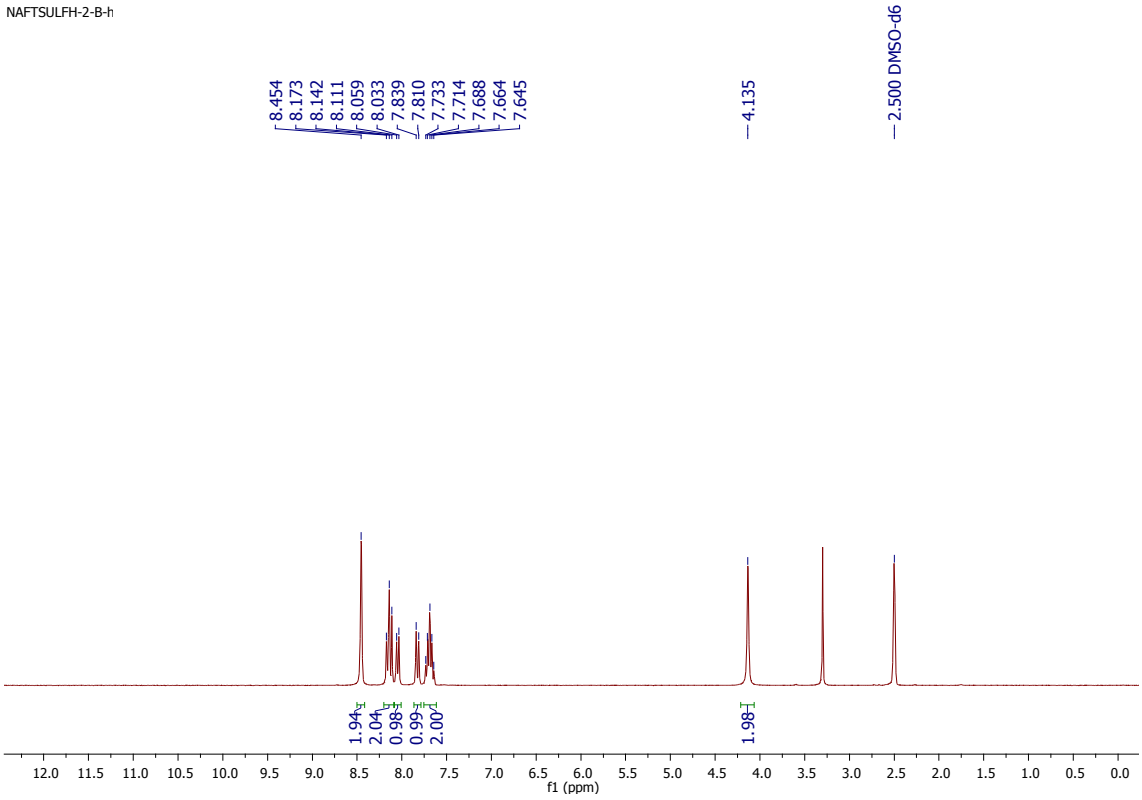
Intermediário **XVI**

naftaleno-2-sulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 87% de rendimento.



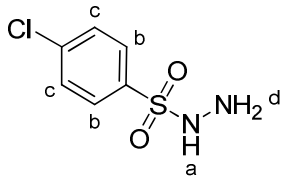
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 8,45 (s, 2H-a); 8,14 (t, 2H-b, J=9,3 Hz); 8,04 (d, 1H-c, J=7,8 Hz); 7,82 (d, 1H-d, J=8,7 Hz); 7,73-7,64 (m, 2H-e); 4,13 (s, 2H-f).



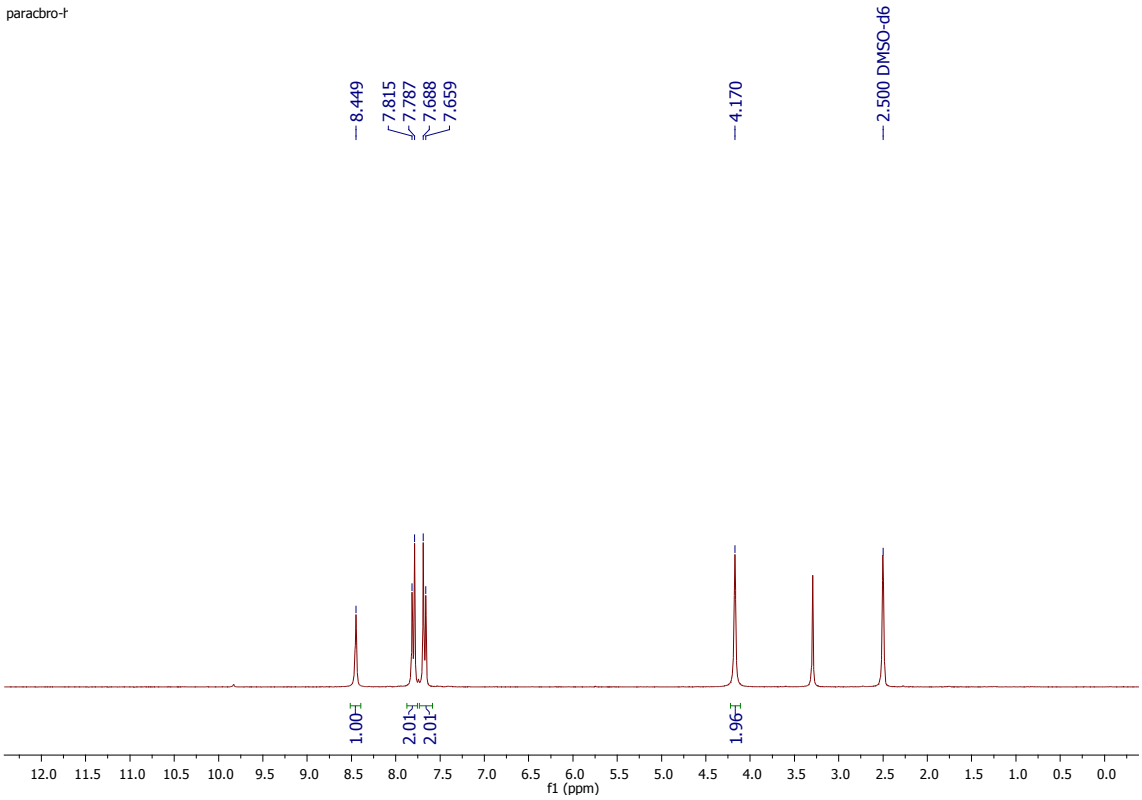
Intermediário **XVII**

4-clorobenzenossulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 90% de rendimento.



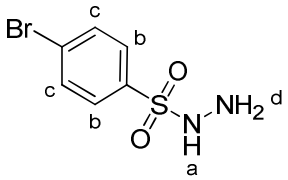
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 8,44 (s, 1H-a); 7,80 (d, 2H-b, J=8,4 Hz); 7,67 (d, 2H-c, J=8,4 Hz); 4,17 (s, 2H-d).



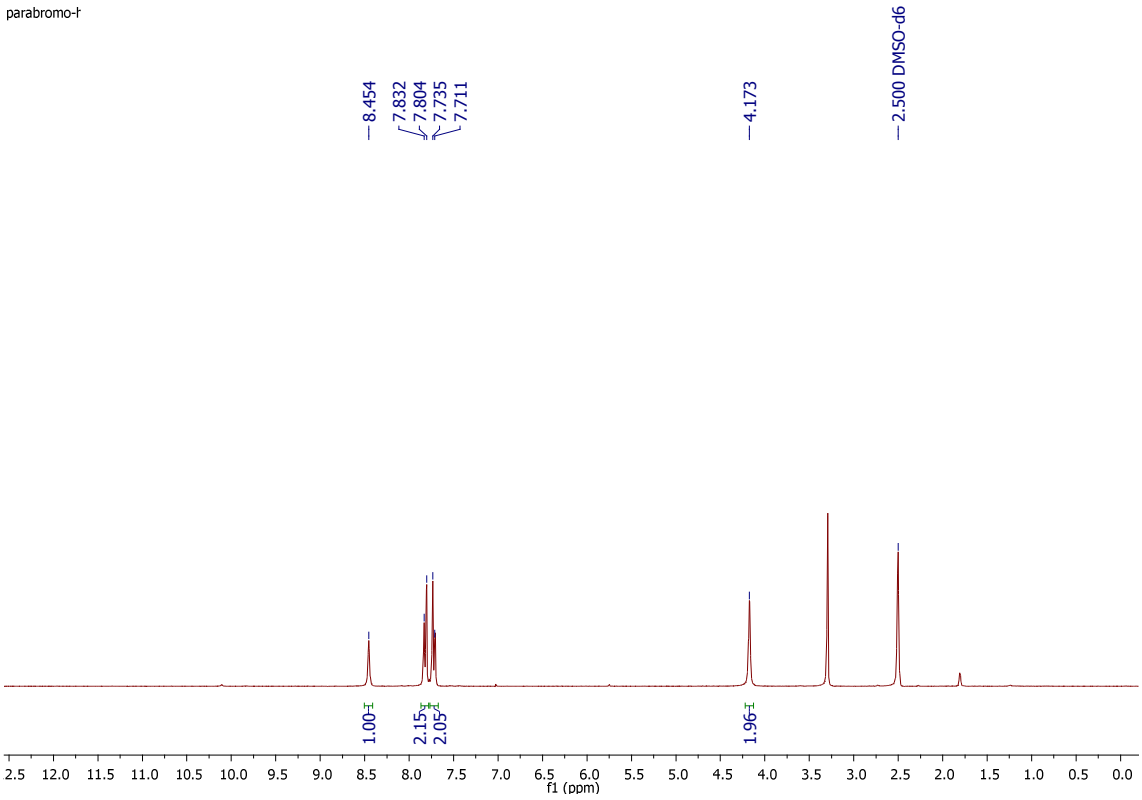
Intermediário **XVIII**

4-bromobenzenossulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 92% de rendimento.



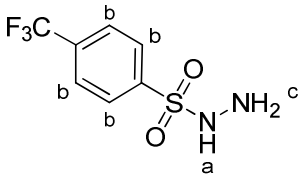
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 8,45 (s, 1H-a); 7,82 (d, 2H-b, J=8,4 Hz); 7,72 (d, 2H-c, J=8,4 Hz); 4,17 (s, 2H-d).



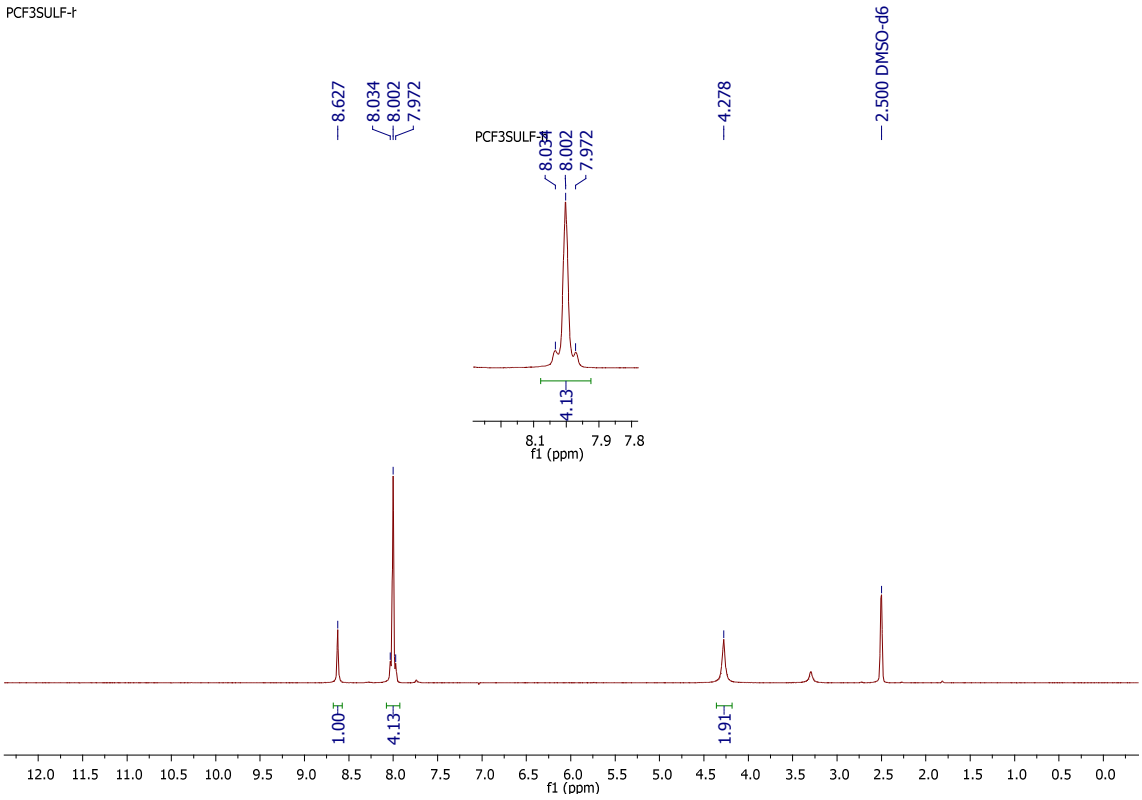
Intermediário **XIX**

4-(trifluorometil)benzenossulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 57% de rendimento.



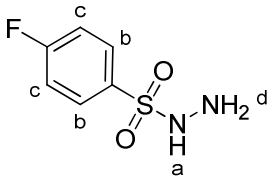
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 8,62 (s, 1H-a); 8,03-7,97 (m, 4H-b); 4,27 (s, 2H-c).



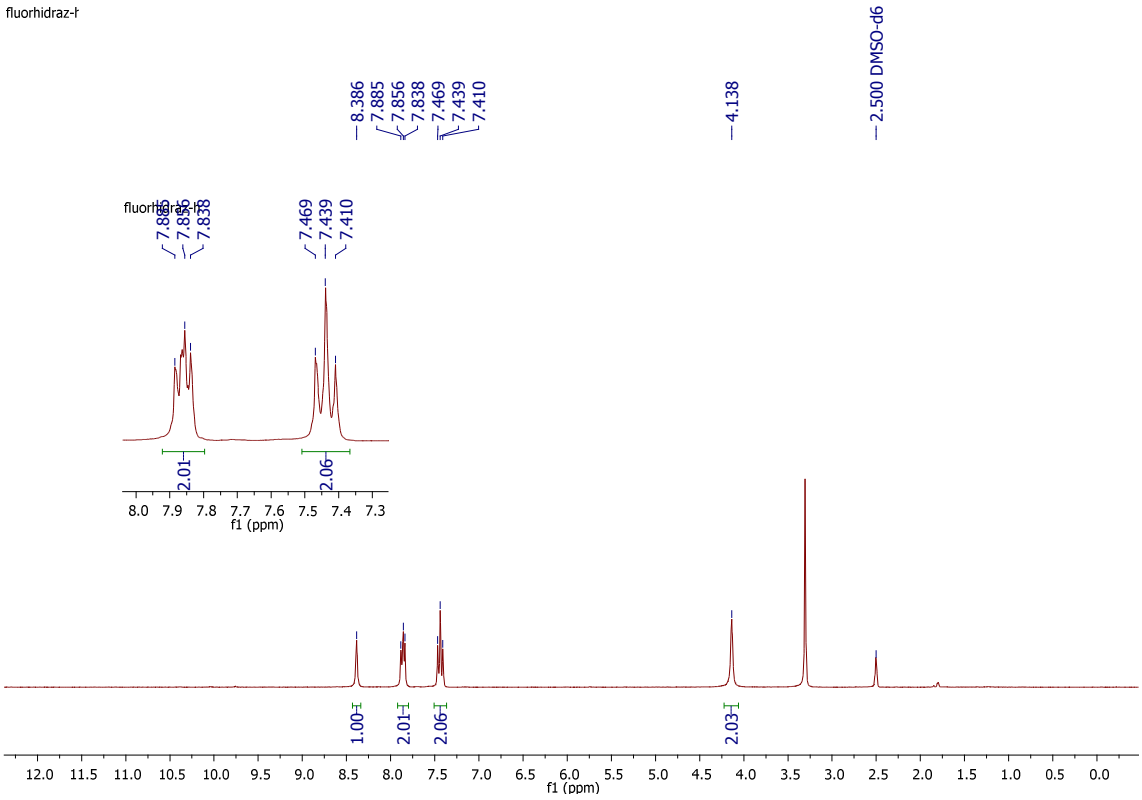
Intermediário **XX**

4-fluorobenzenossulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 85% de rendimento.



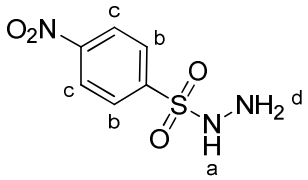
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 8,38 (s, 1H-a); 7,85 (t, 2H-b, J=8,7 Hz); 7,43 (t, 2H-c, J=8,7 Hz); 4,13 (s, 2H-d).



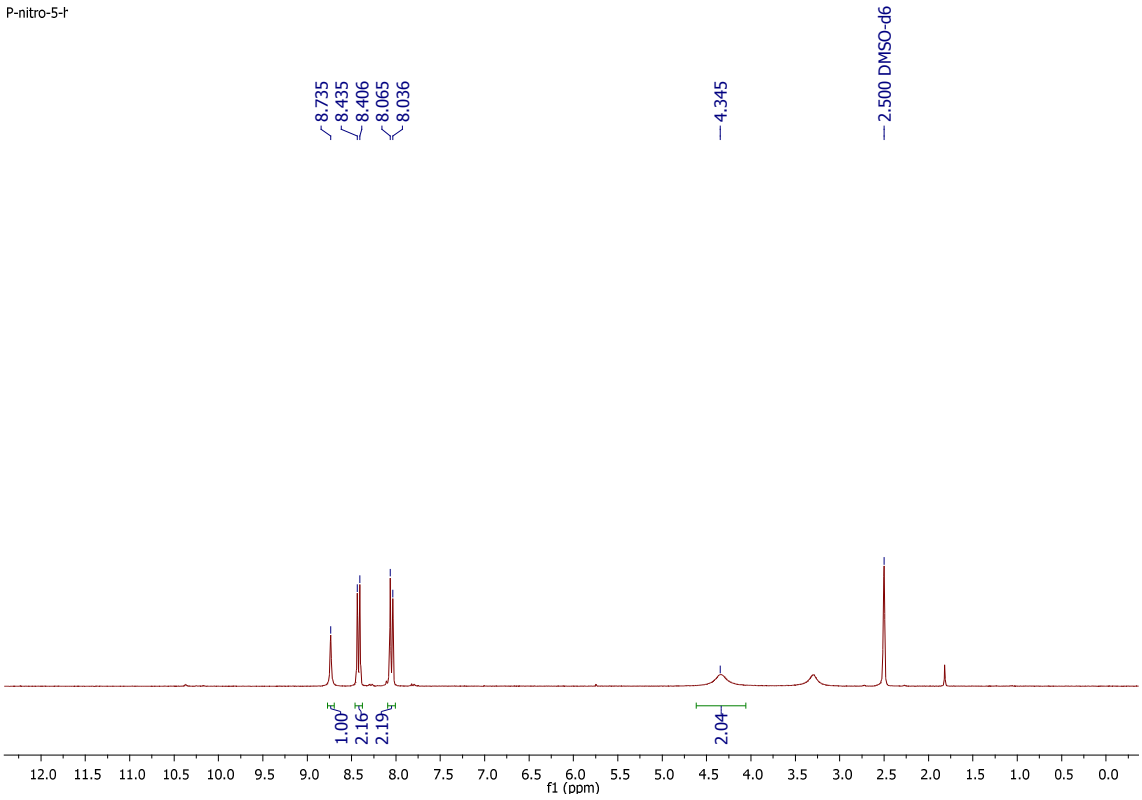
Intermediário **XXI**

4-nitrobenzenossulfonoidrazida

Sólido de coloração amarelo pálido. 85% de rendimento.



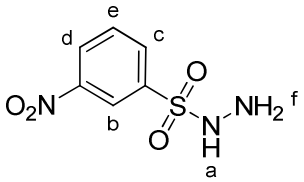
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 8,73 (s, 1H-a); 8,42 (d, 2H-b, J=8,7 Hz); 8,05 (d, 2H-c, J=8,7 Hz); 4,34 (s, 2H-d).



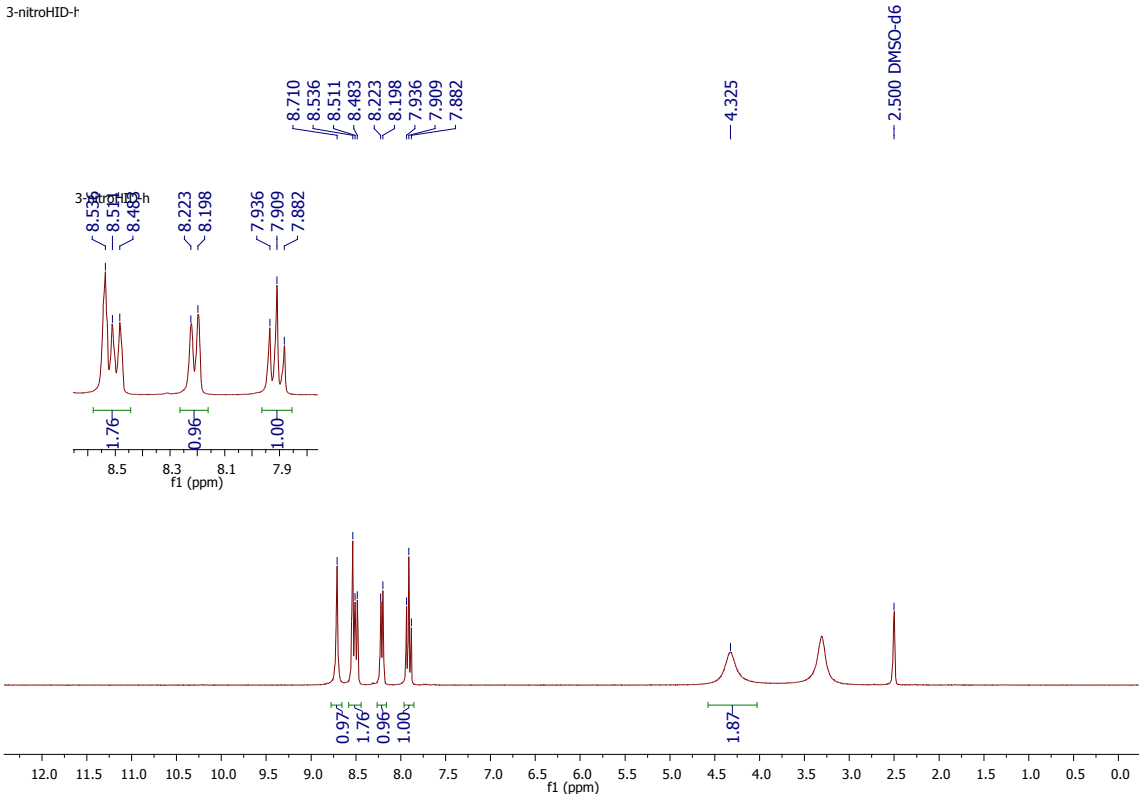
Intermediário **XXII**

3-nitrobenzenossulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 57% de rendimento.



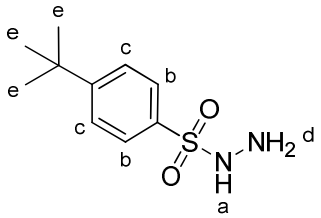
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 8,70 (s, 1H-a); 8,53 (s, 1H-b); 8,51 (d, 1H-c; J=8,4 Hz); 8,21 (d, 1H-d, J=7,5 Hz); 7,90 (t, 1H-e, J=8,4 Hz); 4,32 (s, 2H-f).



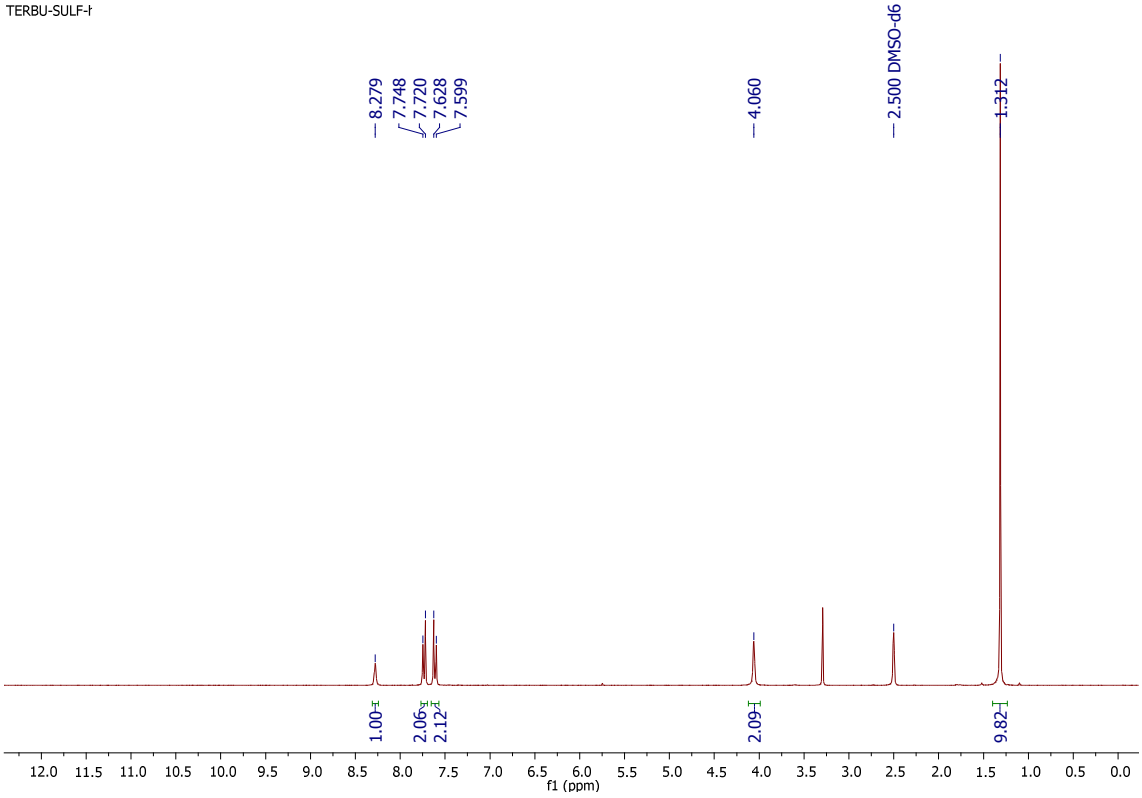
Intermediário **XXIII**

4-(*tert*-butil)benzenossulfonoidrazida

Sólido de coloração branca. 78% de rendimento.



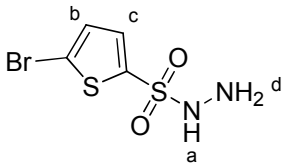
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 8,27 (s, 1H-a); 7,23 (d, 2H-b, J=8,4 Hz); 7,61 (d, 2H-c; J=8,4 Hz); 4,06 (s, 2H-d); 1,31 (s, 9H-e).



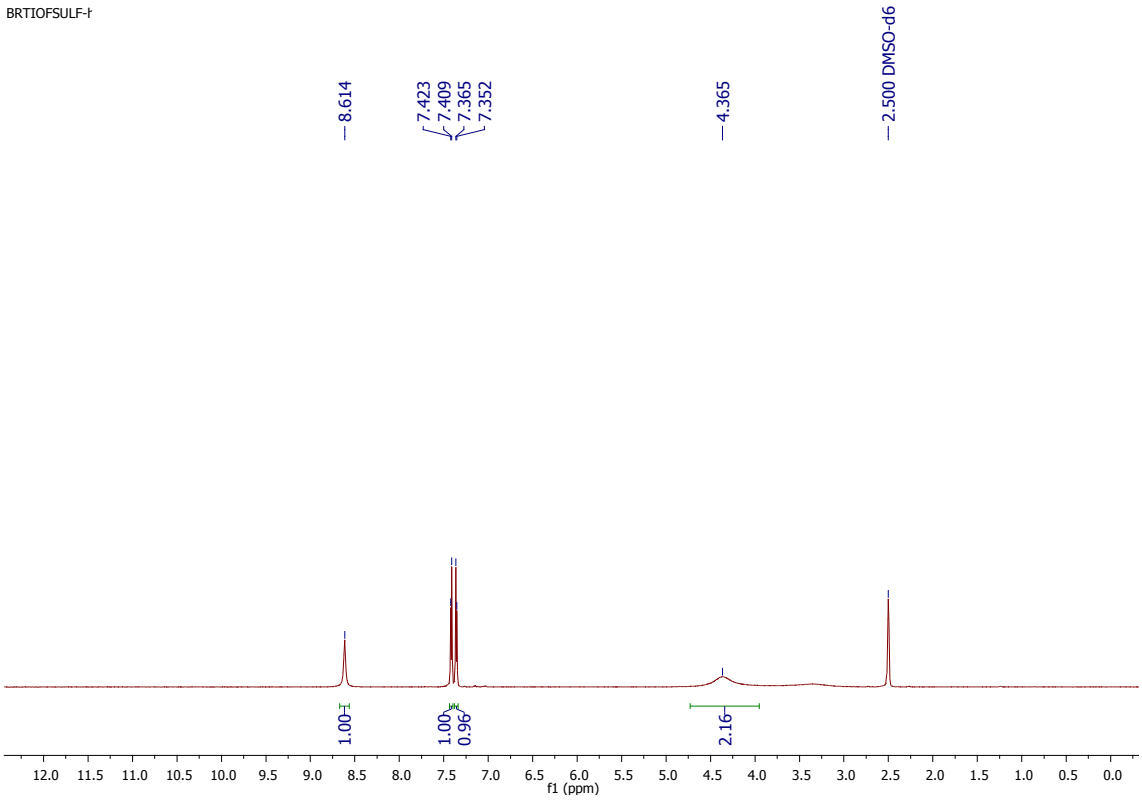
Intermediário **XXIV**

5-bromotiofeno-2-sulfonoidrazida

Sólido de coloração amarelo pálido. 31% de rendimento.



RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 8,56 (s, 1H-a); 7,41 (d, 1H-b, J=4,2 Hz); 7,36 (d, 1H-c, J=4,2 Hz); 4,36 (s, 2H-d).

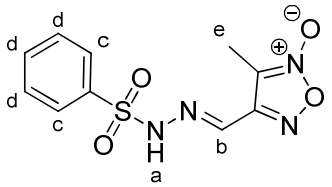


Na análise de RMN ^{1}H dos compostos sulfonilidrazônicos (**16-28**), o deslocamento químico dos hidrogênios das iminas (*C=N-H*) e das metilas (CH_3) apresentaram valores entre 8,80-7,92 ppm e 2,24-2,16 ppm, respectivamente. Já na análise de RMN ^{13}C o deslocamento químico das metilas foi observado entre 8,0 e 9,0 ppm.

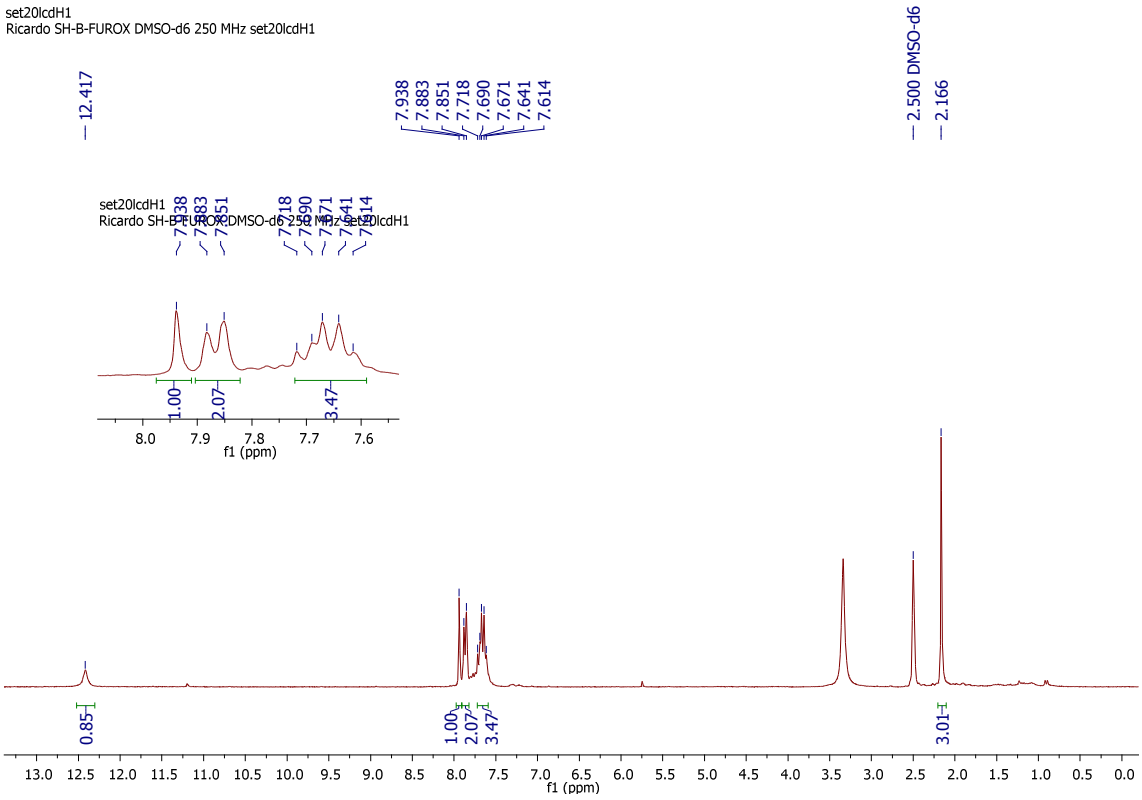
Composto **16**

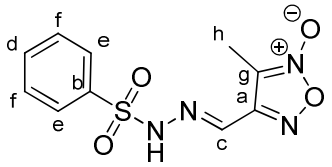
3-metil-4-((2-(fenilsulfonil)hidrazono)metil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 118-120 ºC). 72% de rendimento.

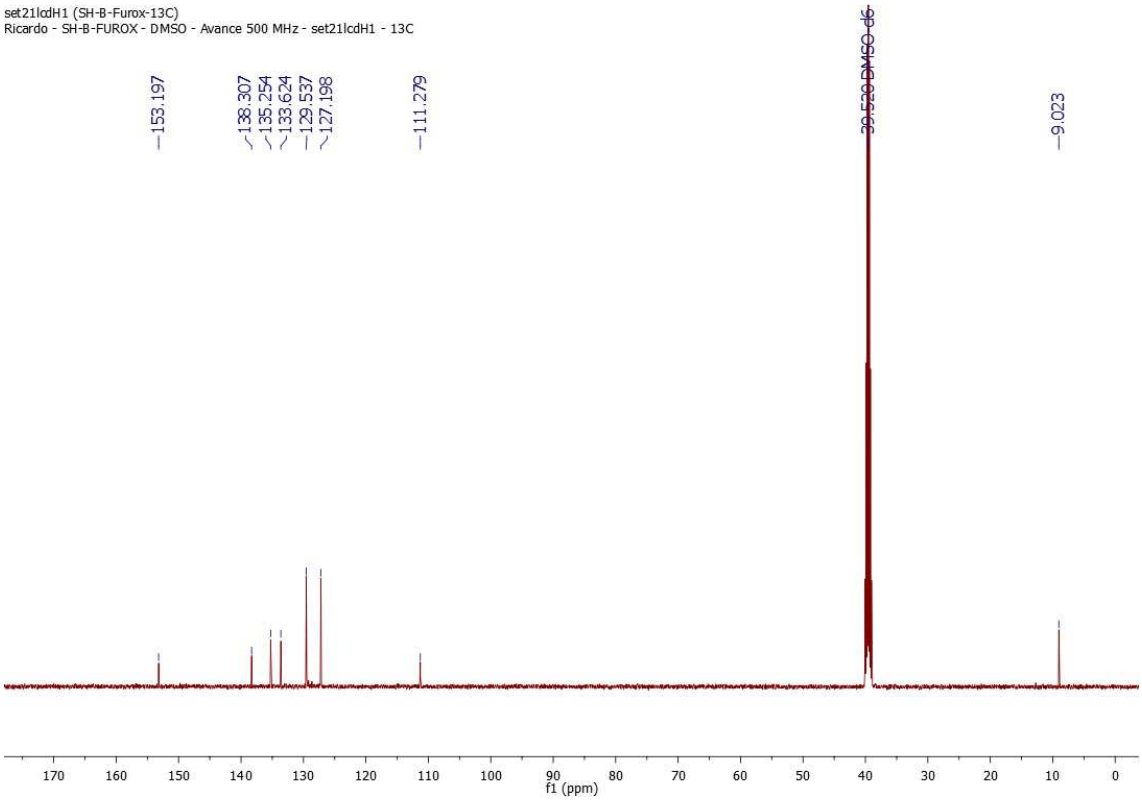


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,41 (s, 1H-a); 7,93 (s, 1H-b); 7,87 (d, 2H-c, J=9,6 Hz); 7,71-7,61 (m, 3H-d); 2,16 (s, 3H-e).



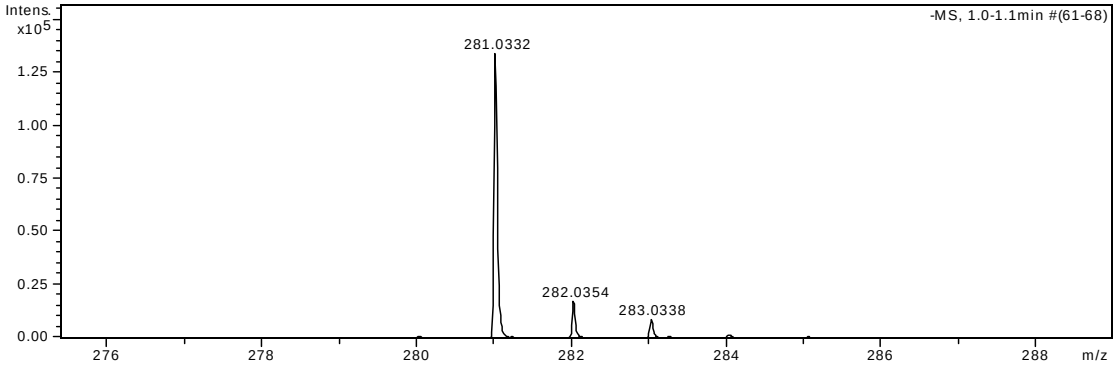


RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 153,0-a; 138,3-b; 135,3-c; 133,6-d; 129,5-e; 127,1-f; 111,27-g; 9,0-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI- TOF-MS) calculado para C10H10N4O4S [M - H^+]: 281,0423.

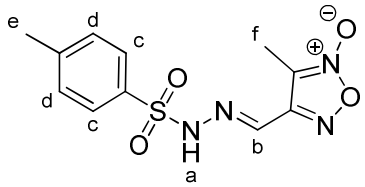
Encontrado: 281,0332.



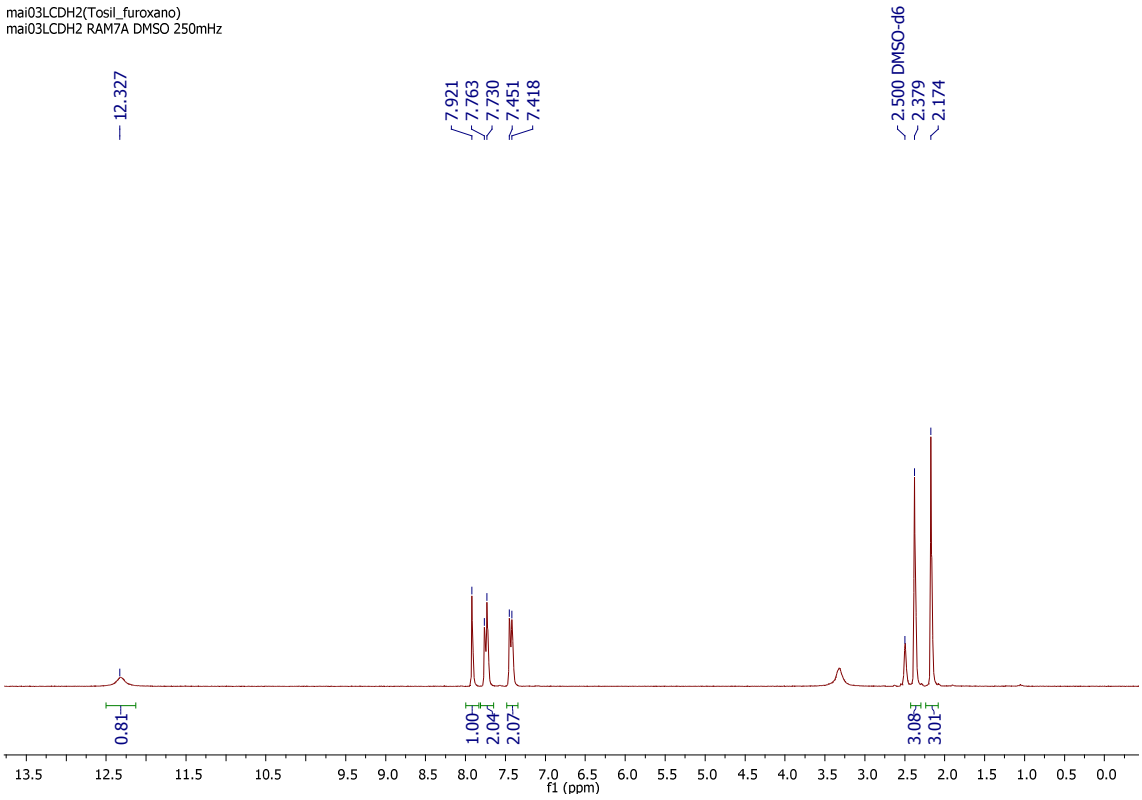
Composto **17**

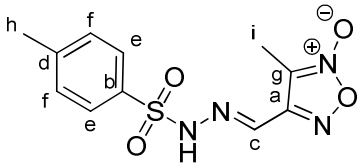
3-metil-4-((2-tosilidrazono)metil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 157-159 ºC). 83% de rendimento.

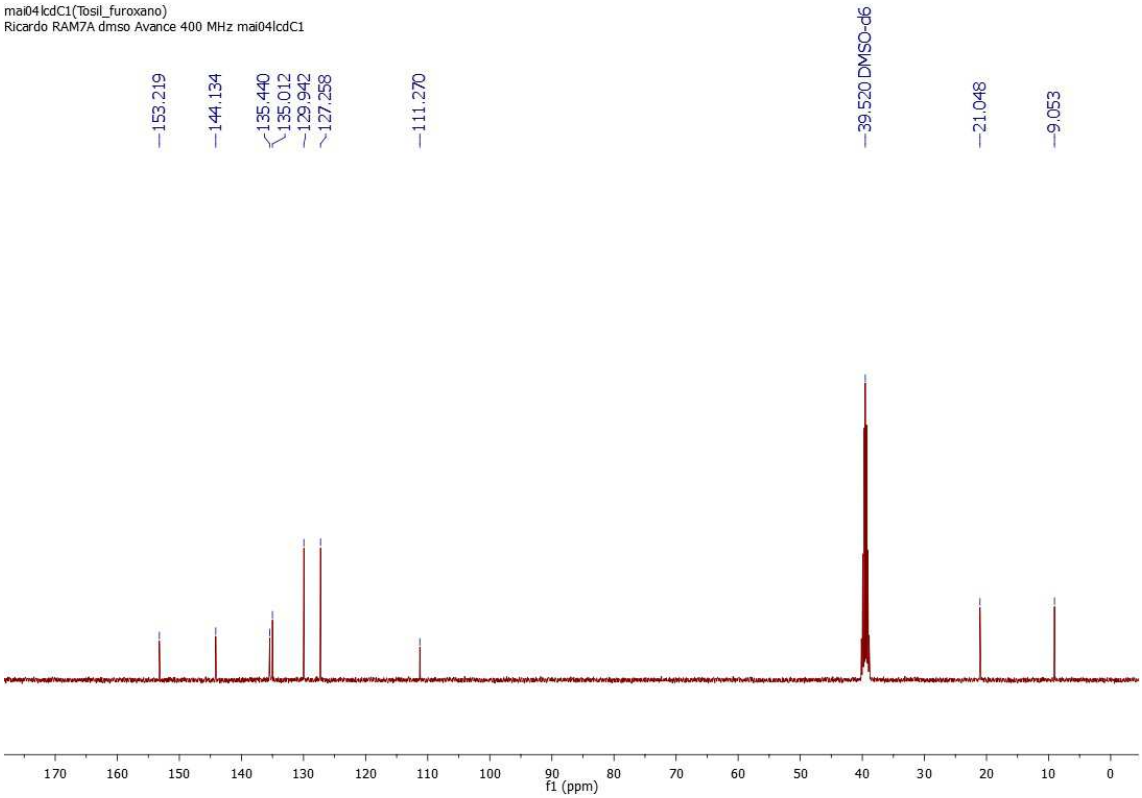


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,32 (s, 1H-a); 7,92 (s, 1H-b); 7,75 (d, 2H-c, J=9,9 Hz); 7,43 (d, 2H-d, J=9,9 Hz); 2,39 (s, 3H-e); 2,17 (s, 3H-f).



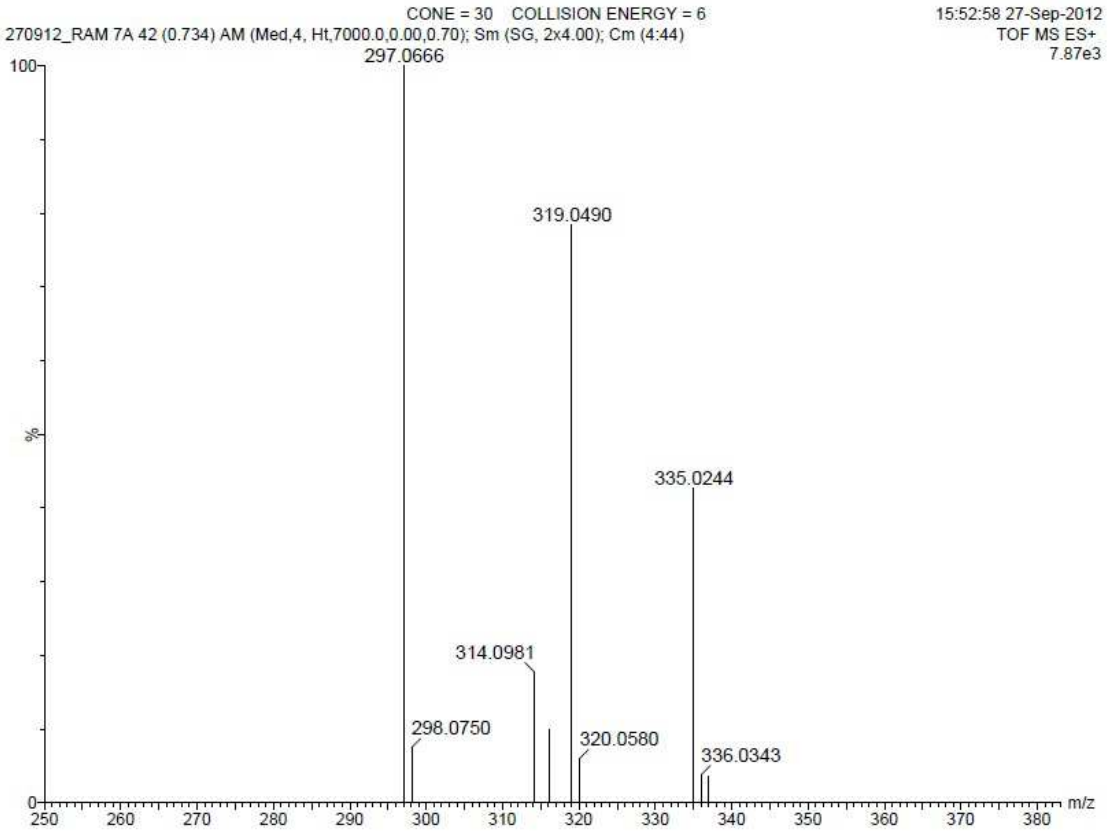


RMN ^{13}C (62,5 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 153,2-a; 144,1-b; 135,4-c; 135,0-d; 129,9-e; 127,2-f; 111,2-g; 21,04-h; 9,0-i.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C11H12N4O4S [M + Na^+]: 319,0477.

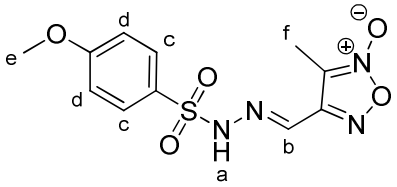
Encontrado: 319,0490.



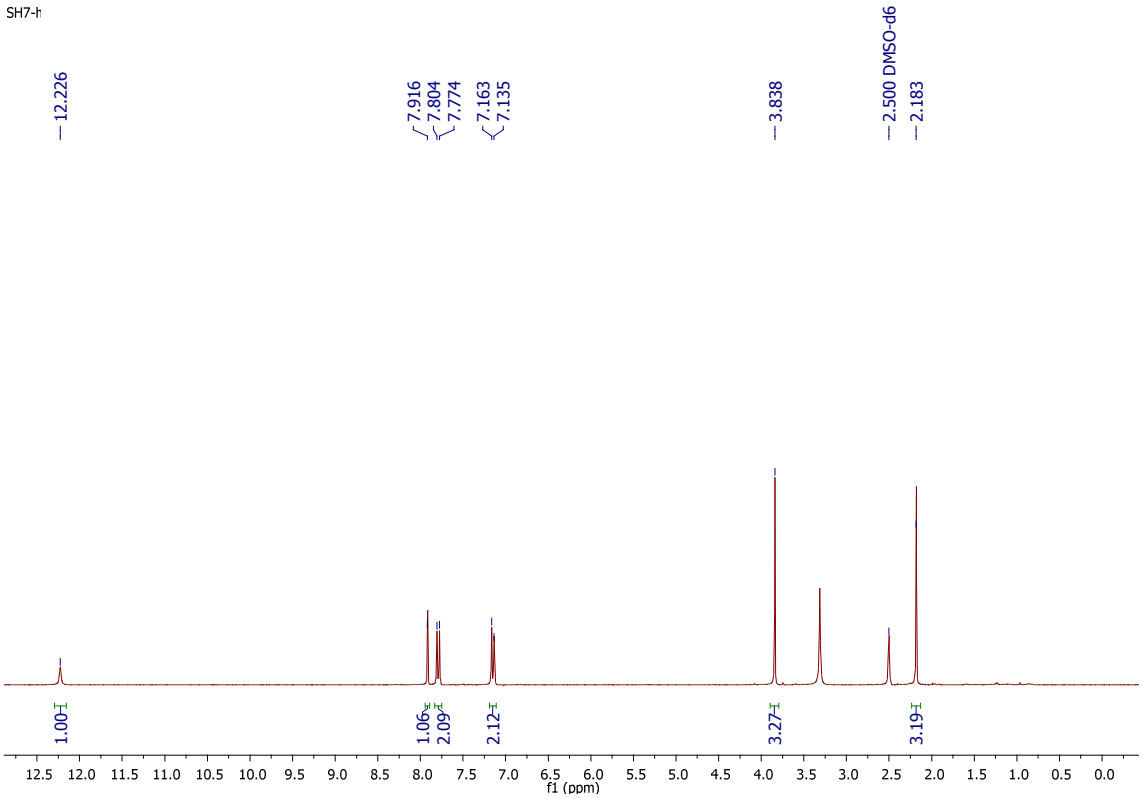
Composto **18**

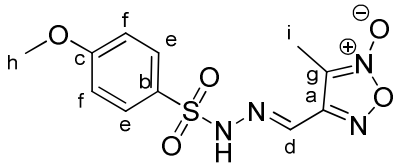
4-((2-((4-metoxifenil)sulfonil)hidrazono)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 148-150 ºC). 82% de rendimento.

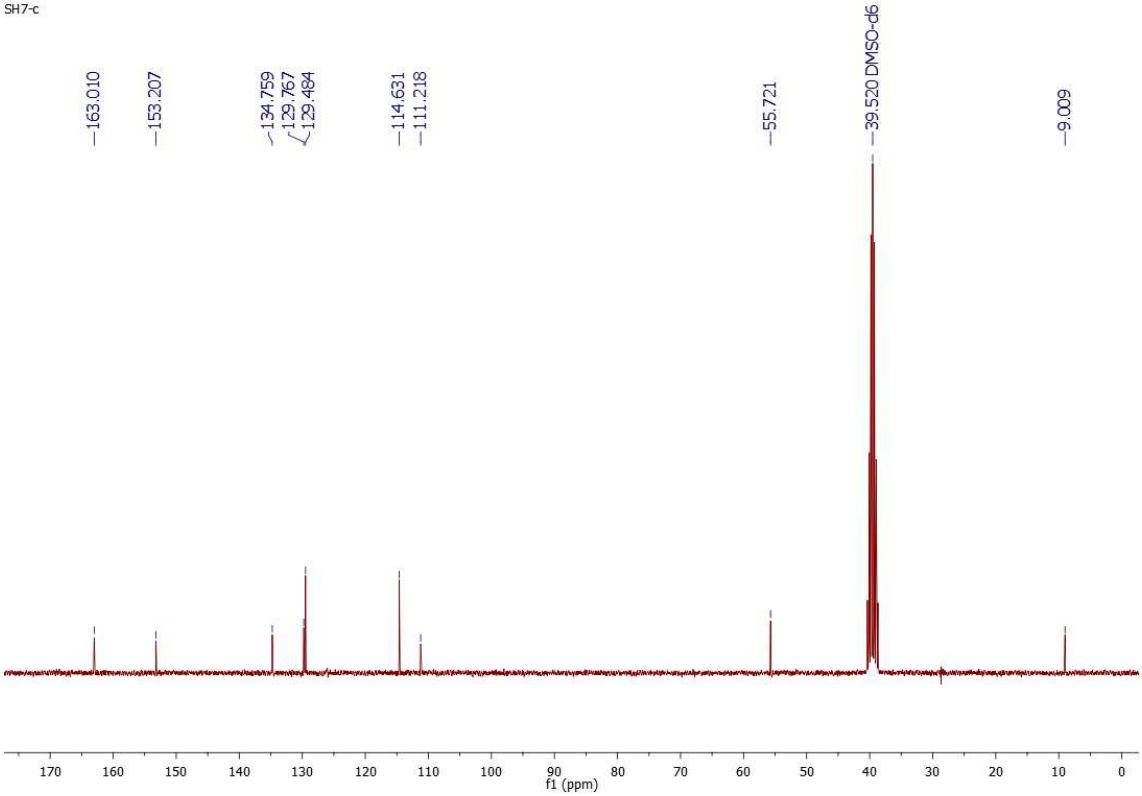


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 12,22 (s, 1H-a); 7,91 (s, 1H-b); 7,79 (d, 2H-c, J=9 Hz); 7,15 (d, 2H-d, J=9 Hz); 3,83 (s, 3H-e); 2,18 (s, 3H-f).



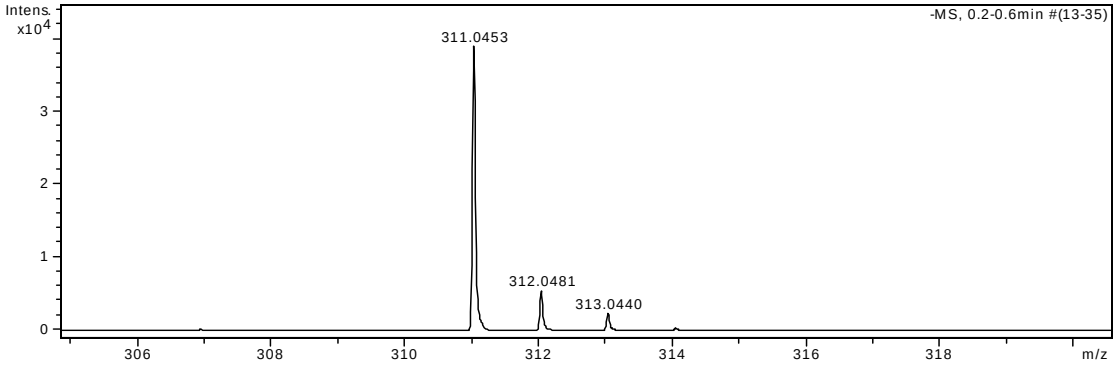


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 163,0-a; 153,2-b; 134,7-c; 129,7-d; 129,4-e; 114,6-f; 111,2-g; 55,7-h; 9,0-i.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI- TOF-MS) calculado para C11H12N4O5S [M - H^+]: 311,0528.

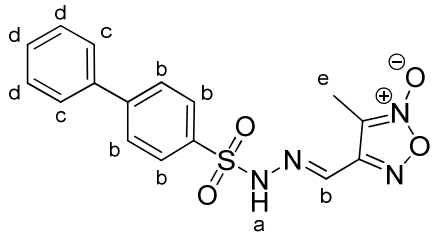
Encontrado: 311,0453.



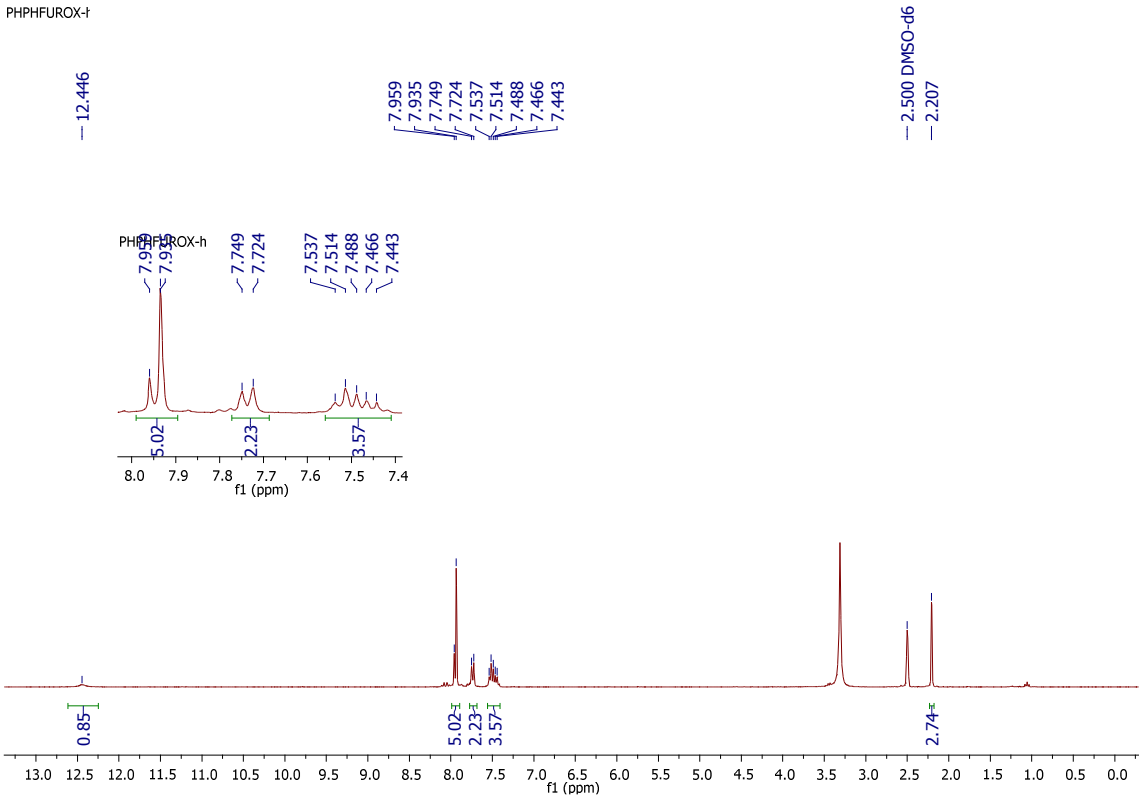
Composto **19**

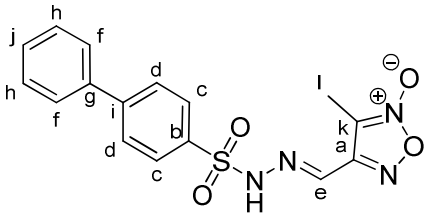
4-((2-([1,1'-bifenil]-4-ilsulfonil)hidrazono)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazole 2-óxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 151-153 ºC). 93% de rendimento.

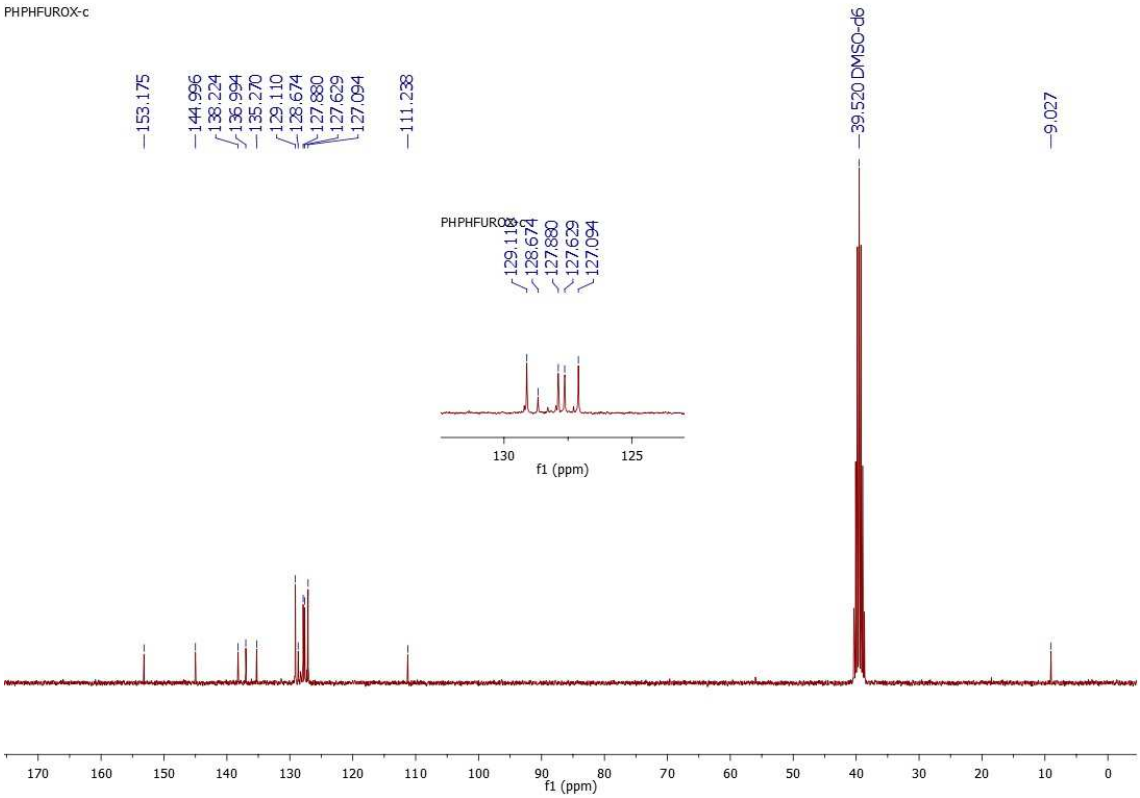


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 12,44 (s, 1H-a); 7,95 (d, 5H-b, J=7,5 Hz); 7,73 (d, 2H-c, J=7,5 Hz); 7,53-7,44 (m, 3H-d); 2,20 (s, 3H-e).



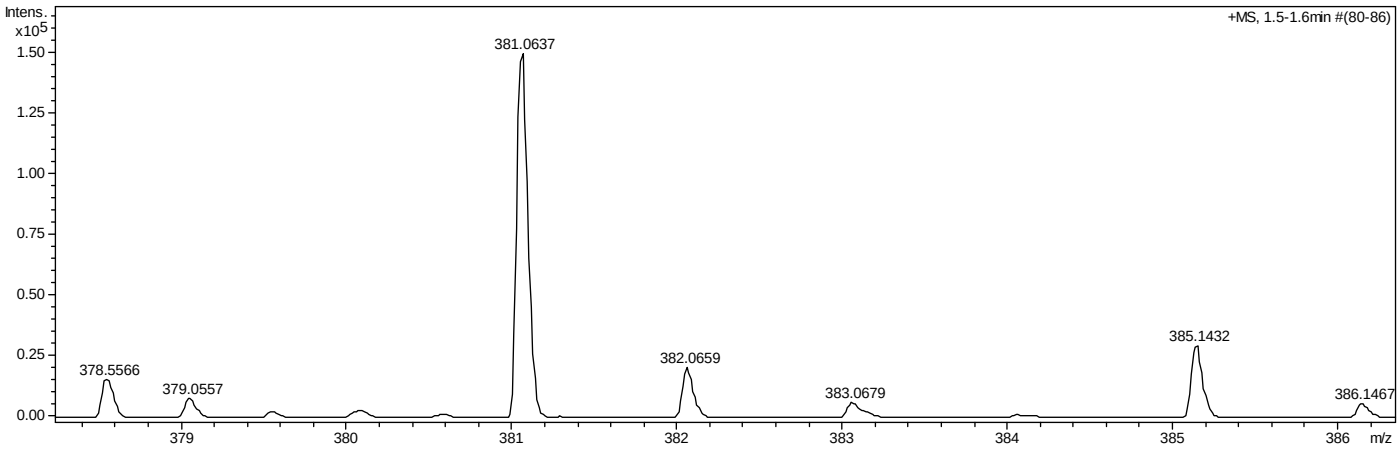


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 153,1-a; 144,9-b; 138,2-c; 136,9-d; 135,2-e; 129,1-f; 128,6-g; 127,8-h; 127,6-i; 127,0-j; 111,2-k; 9,0-l.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C16H14N4O4S [M + Na^+]: 381,0736.

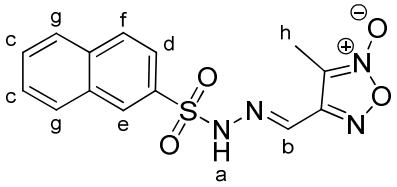
Encontrado: 381,0637.



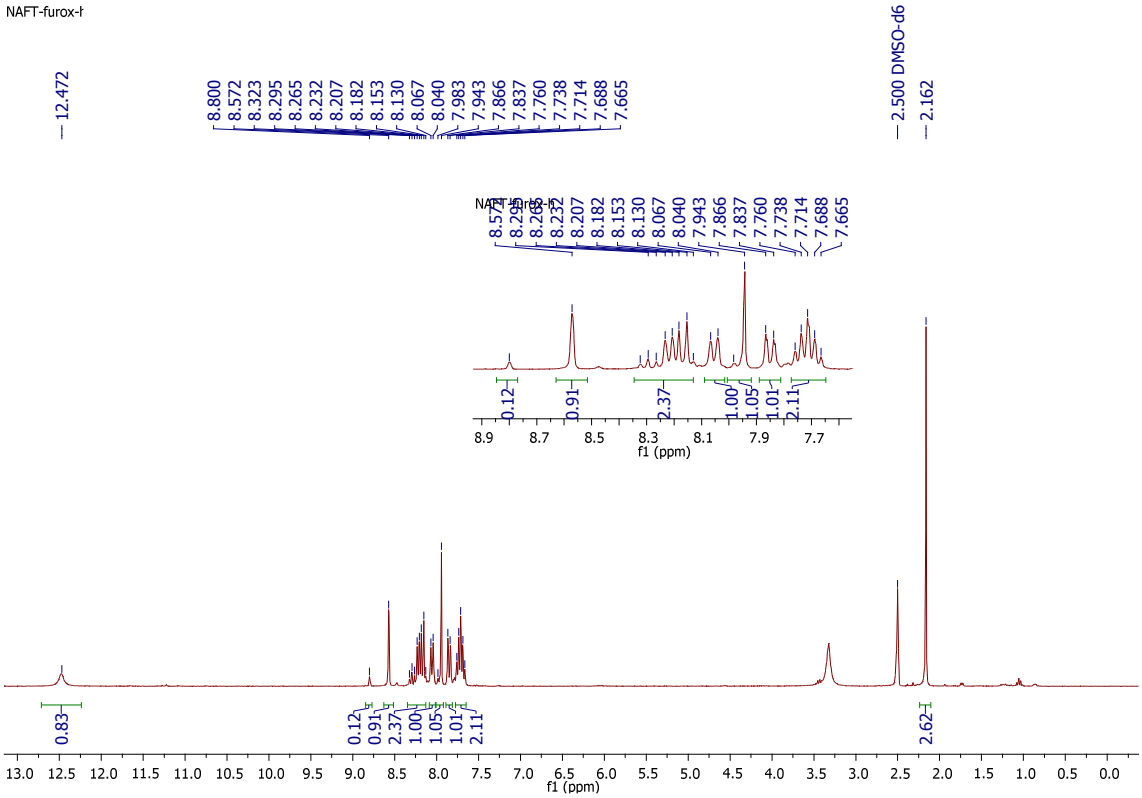
Composto **20**

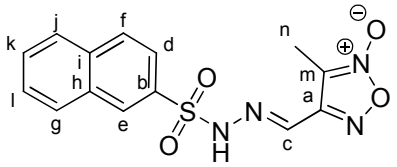
3-metil-4-((2-(naftaleno-2-ilsulfonil)hidrazono)metil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração amarelo pálido (p.f.: 174-176 ºC). 85% de rendimento.

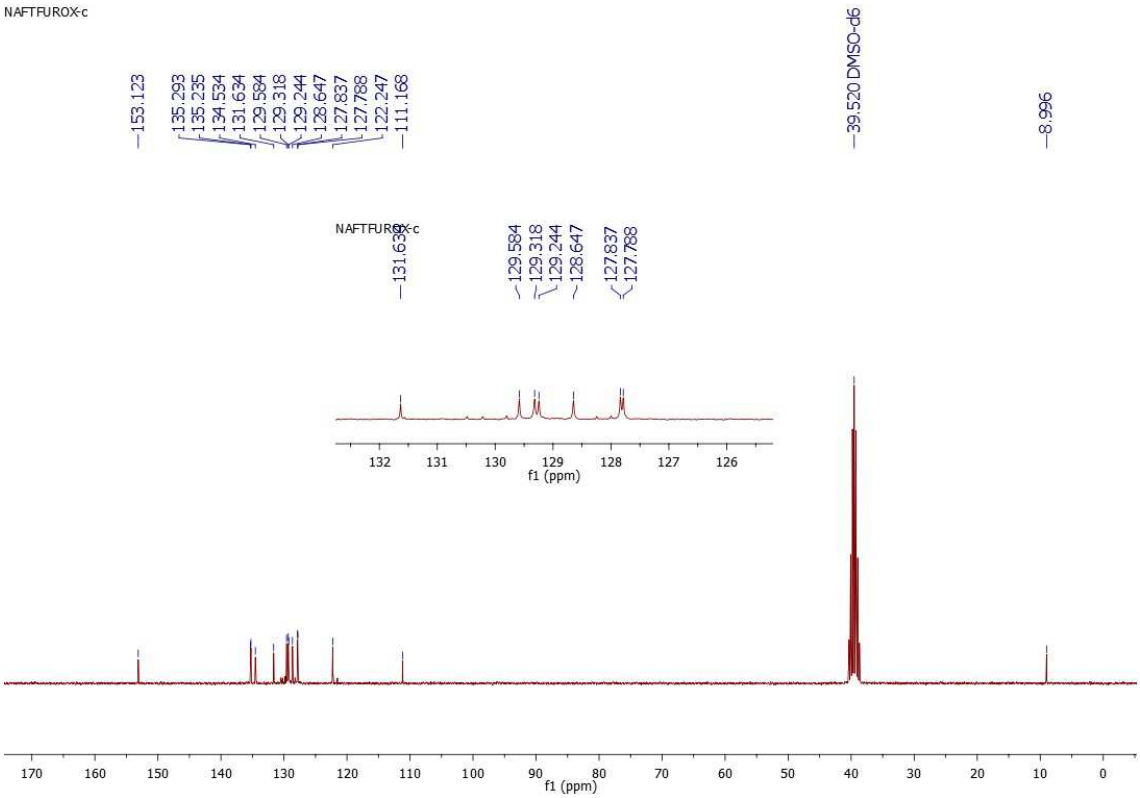


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,47 (s, 1H-a); 8,80/8,57 (s, 1H-b); 8,32-8,13 (m, 2H-c); 8,05 (d, 1H-d, J=8,1 Hz); 7,94 (s, 1H-e); 7,85 (d, 1H-f, J=8,1 Hz); 7,76-7,66 (m, 2H-g); 2,16 (s, 3H-h).



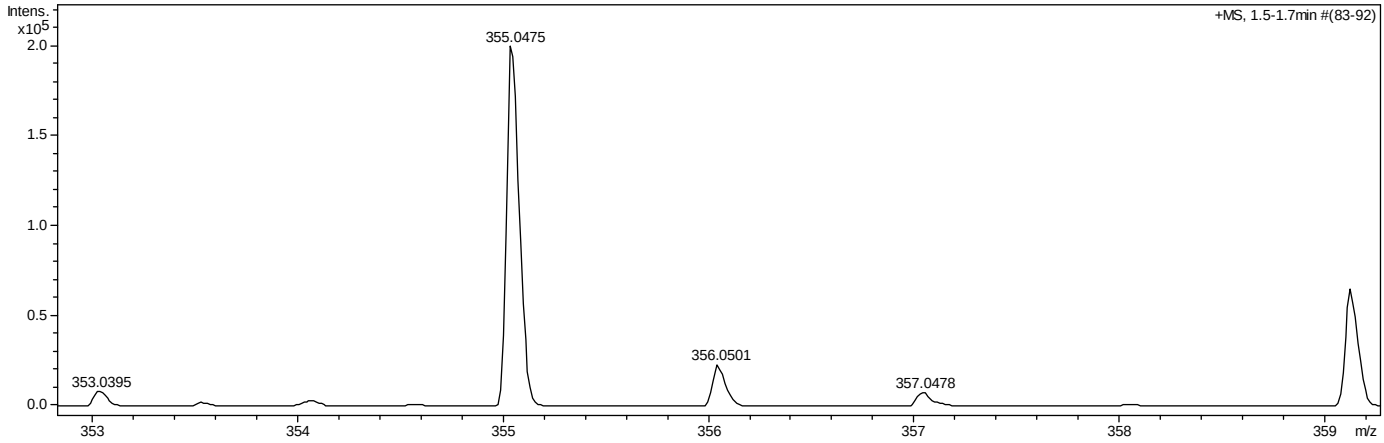


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 153,1-a; 135,2-b; 135,2-c; 134,5-d; 131,6-e;129,5-f; 129,3-g; 129,2-h; 128,6-i; 127,8-j; 127,7-k; 122,2-l; 111,1-m; 8,9-n.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C14H12N4O4S [M + Na^+]: 355,0579.

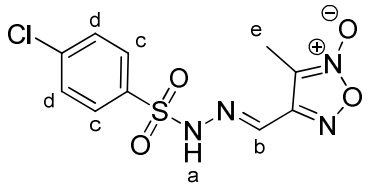
Encontrado: 355,0475.



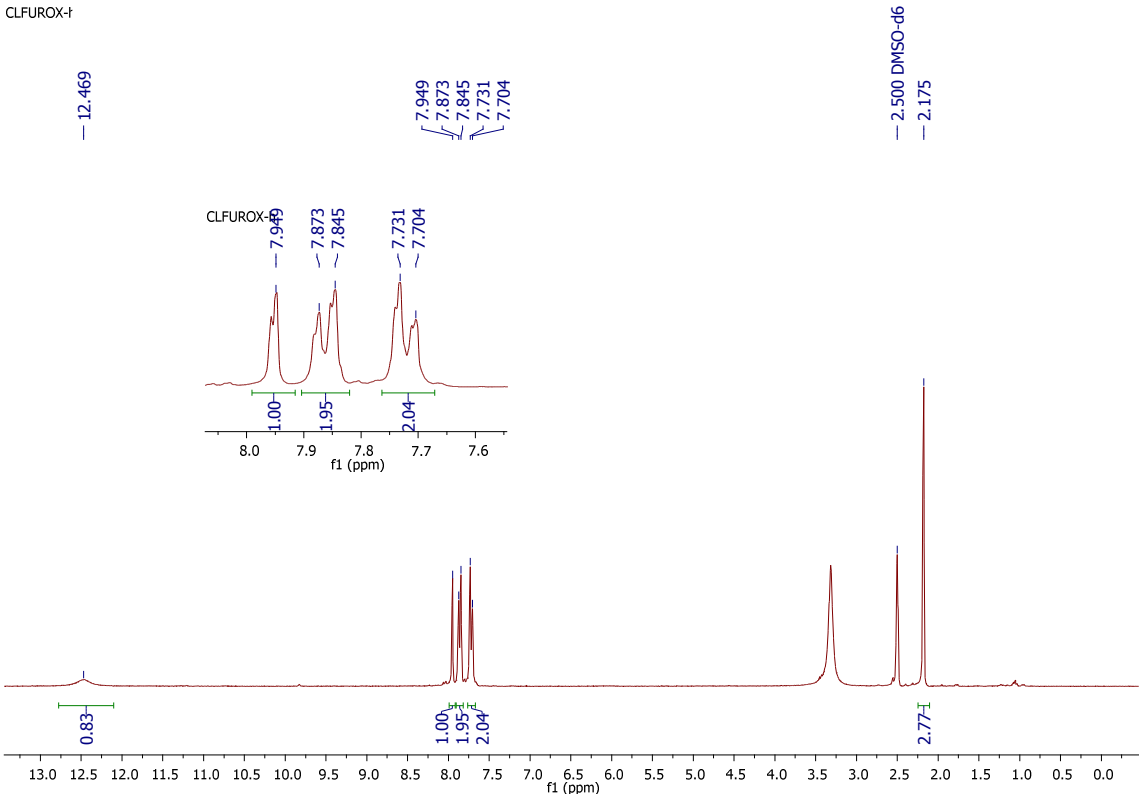
Composto **21**

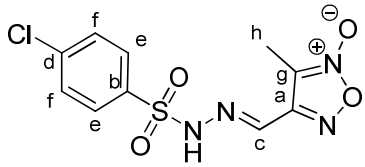
4-((2-((4-clorofenil)sulfonil)hidrazono)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração amarela (p.f.: 158-160 ºC). 82% de rendimento.

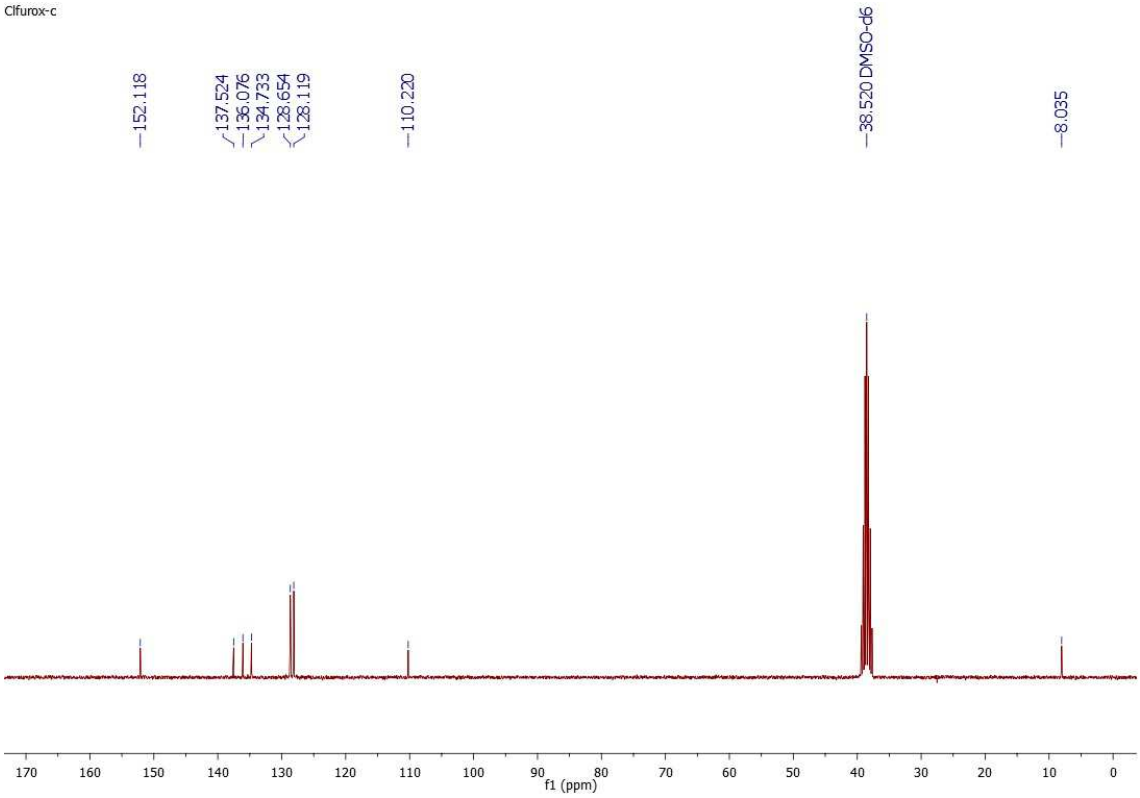


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 12,46 (s, 1H-a); 7,94 (s, 1H-b); 7,86 (d, 2H-c, J=8,4 Hz); 7,72 (d, 2H-d, J=8,4 Hz); 2,17 (s, 3H-e).



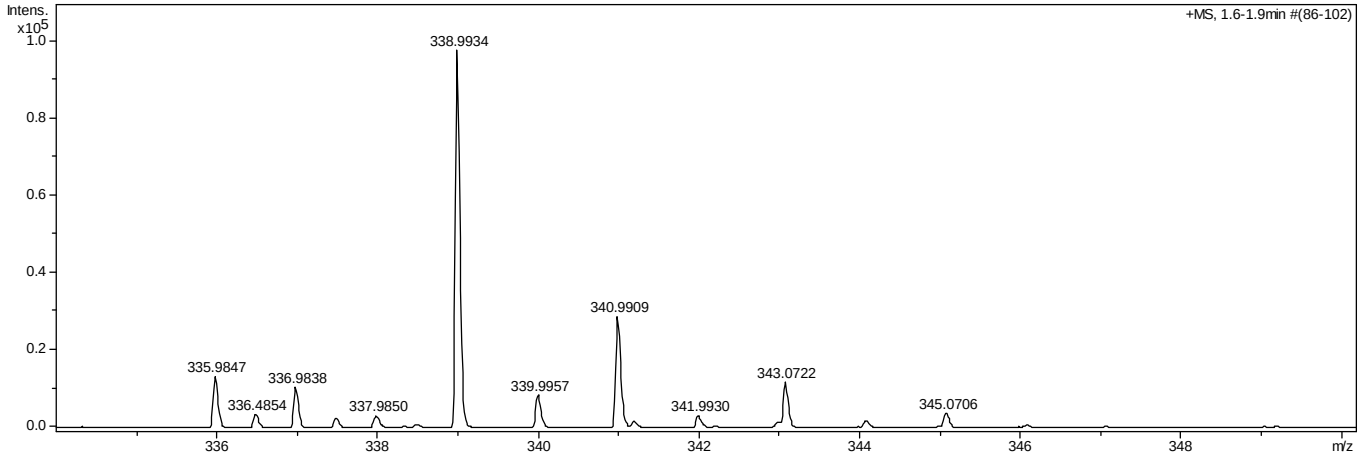


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 152,1-a; 137,5-b; 136,0-c; 134,7-d; 128,6-e; 128,1-f; 110,2-g; 8,0-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H9ClN4O4S [M + Na^+]: 339,0033.

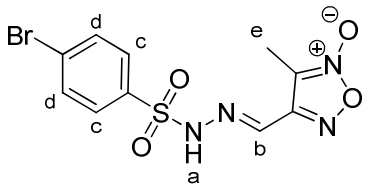
Encontrado: 338,9934.



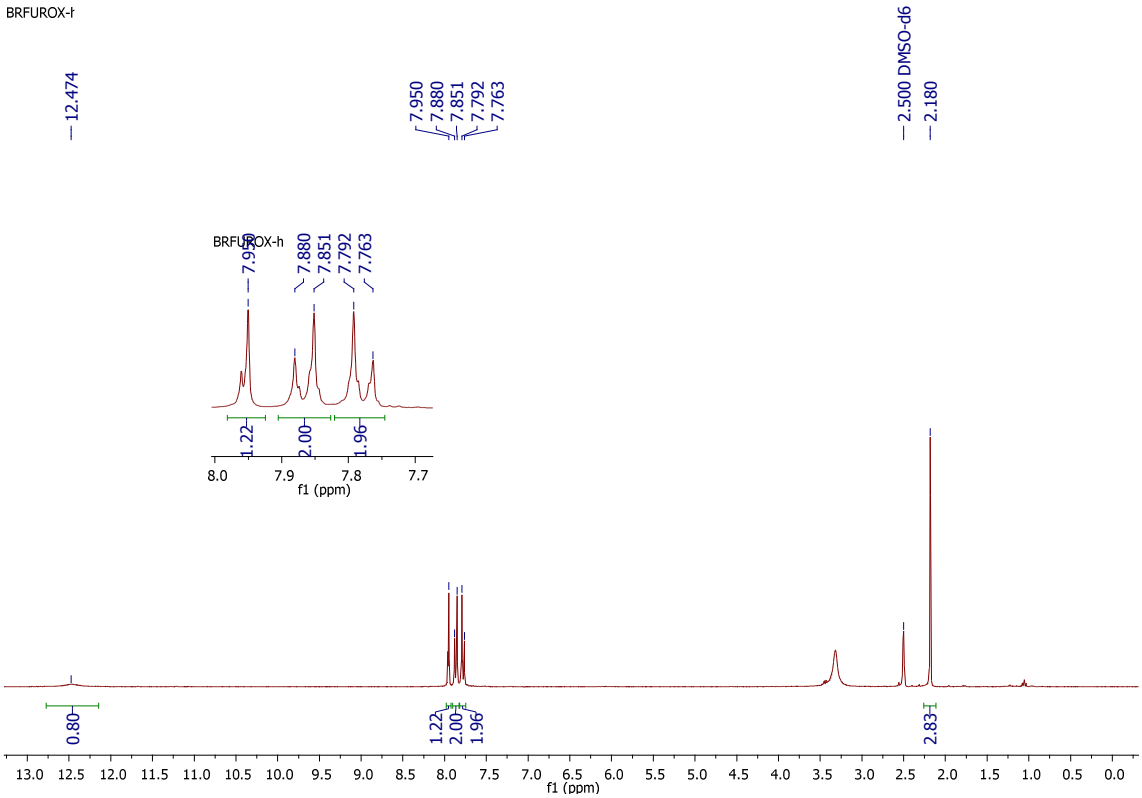
Composto **22**

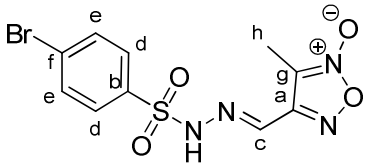
4-((2-((4-bromofenil)sulfonil)hidrazono)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração amarelo pálido (p.f.: 165-167 ºC). 87% de rendimento.

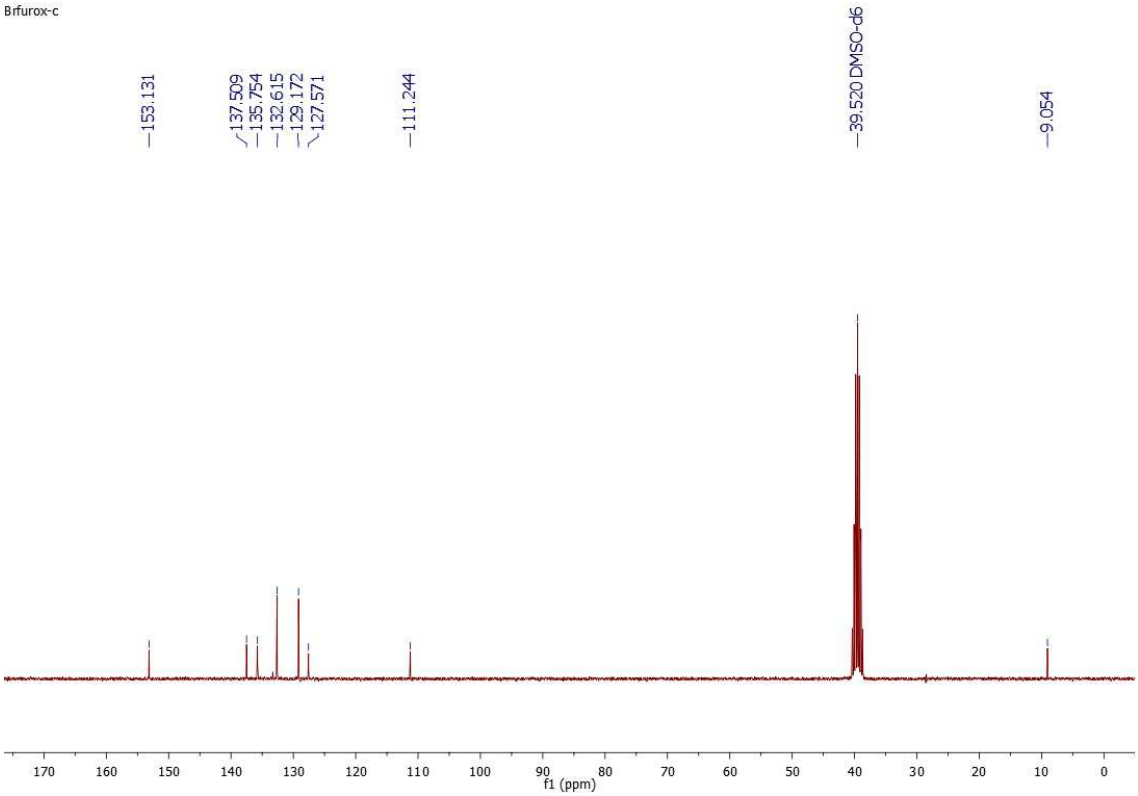


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 12,47 (s, 1H-a); 7,95 (s, 1H-b); 7,87 (d, 2H-c, J=8,7 Hz); 7,78 (d, 2H-d, J=8,7); 2,18 (s, 3H-e).



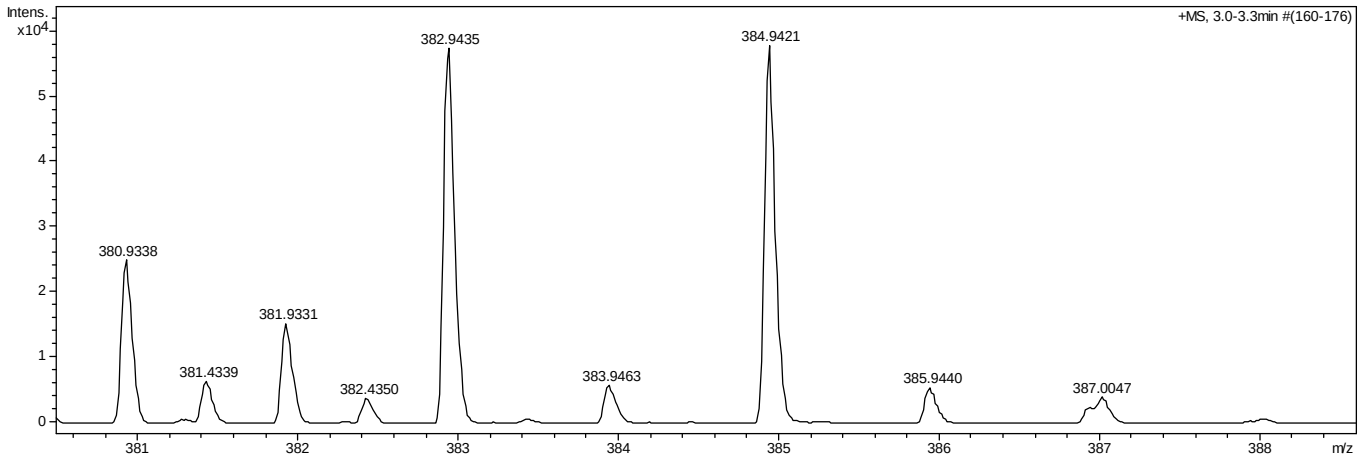


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 153,1-a; 137,5-b; 135,7-c; 132,6-d; 129,1-e; 127,5-f; 111,2-g; 9,0-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H9BrN4O4S [M + Na^+]: 382,9528.

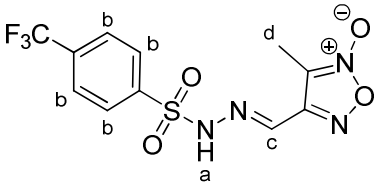
Encontrado: 382,9435.



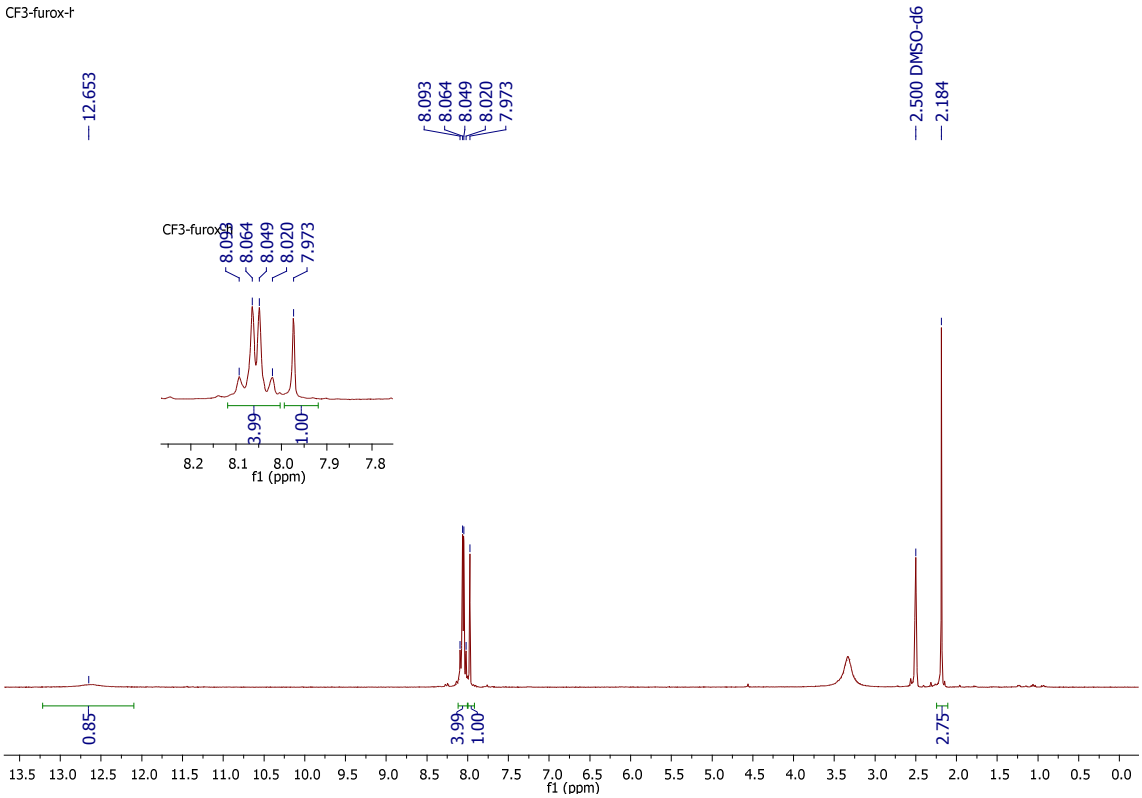
Composto **23**

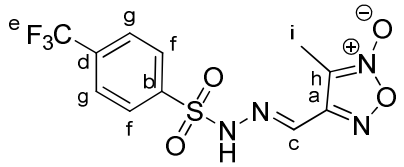
3-metil-4-((2-((4-(trifluorometil)fenil)sulfonil)hidrazono)metil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração branca (p.f.: 161-163 ºC). 88% de rendimento.

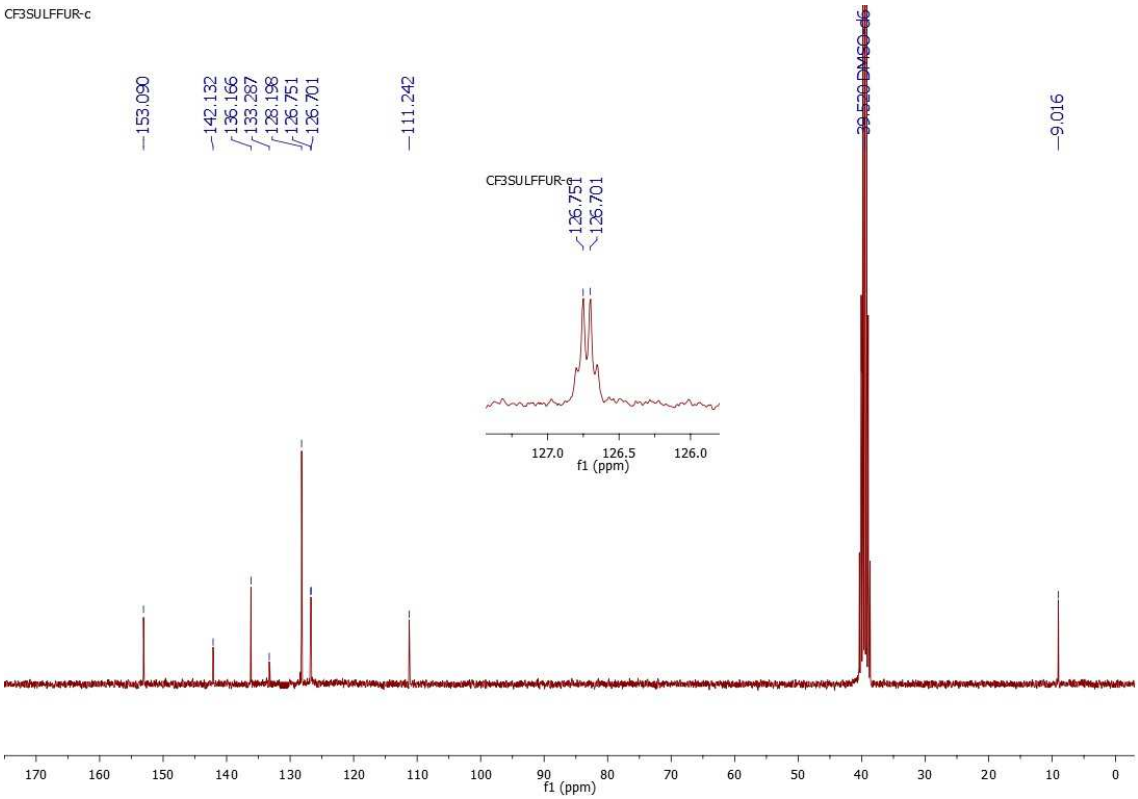


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 12,65 (s, 1H-a); 8,05 (dd, 4H-b, J=4,5 Hz); 7,97 (s, 1H-c); 2,18 (s, 3H-d).





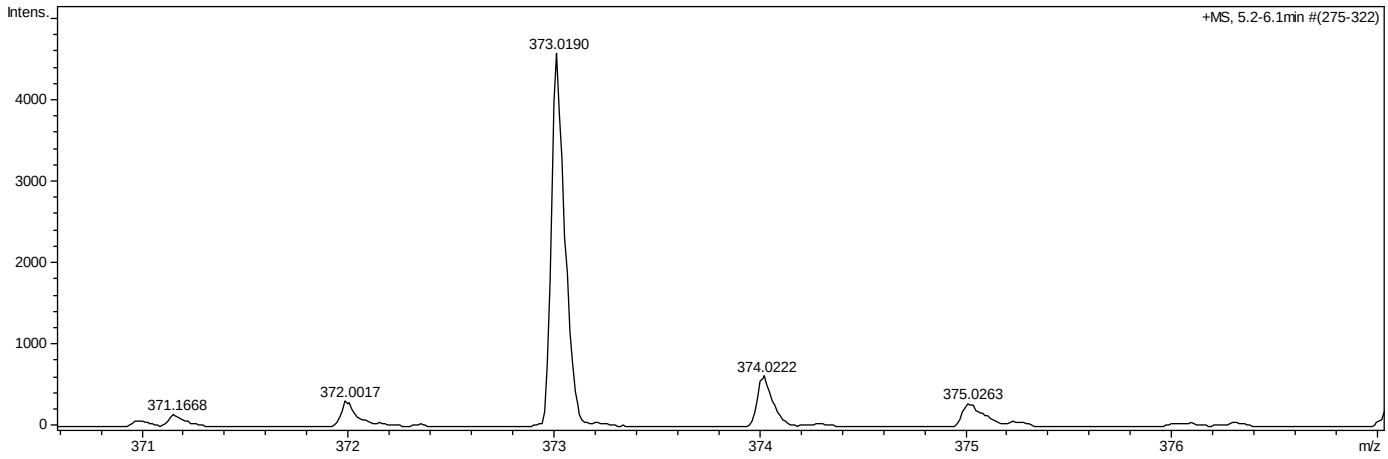
RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 153,0-a; 142,1-b; 136,1-c; 133,2-d; 128,1-e; 126,7-f; 126,7-g; 111,2-h; 9,0-i.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para

C11H9F3N4O4S [M + Na^+]: 373,0297

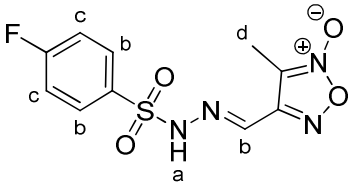
Encontrado: 373,0190.



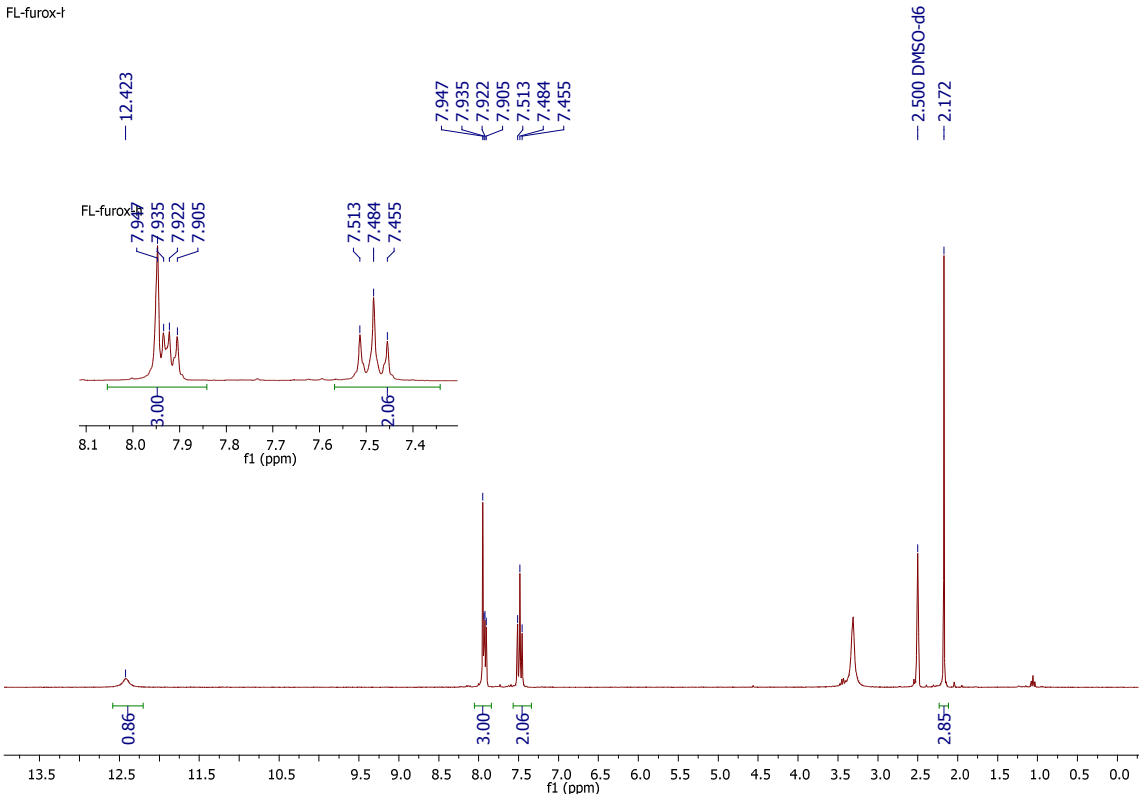
Composto **24**

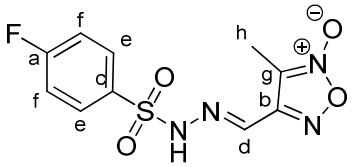
4-((2-((4-fluorofenil)sulfonil)hidrazono)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração laranja pálido (p.f.: 170-172 ºC). 86% de rendimento.

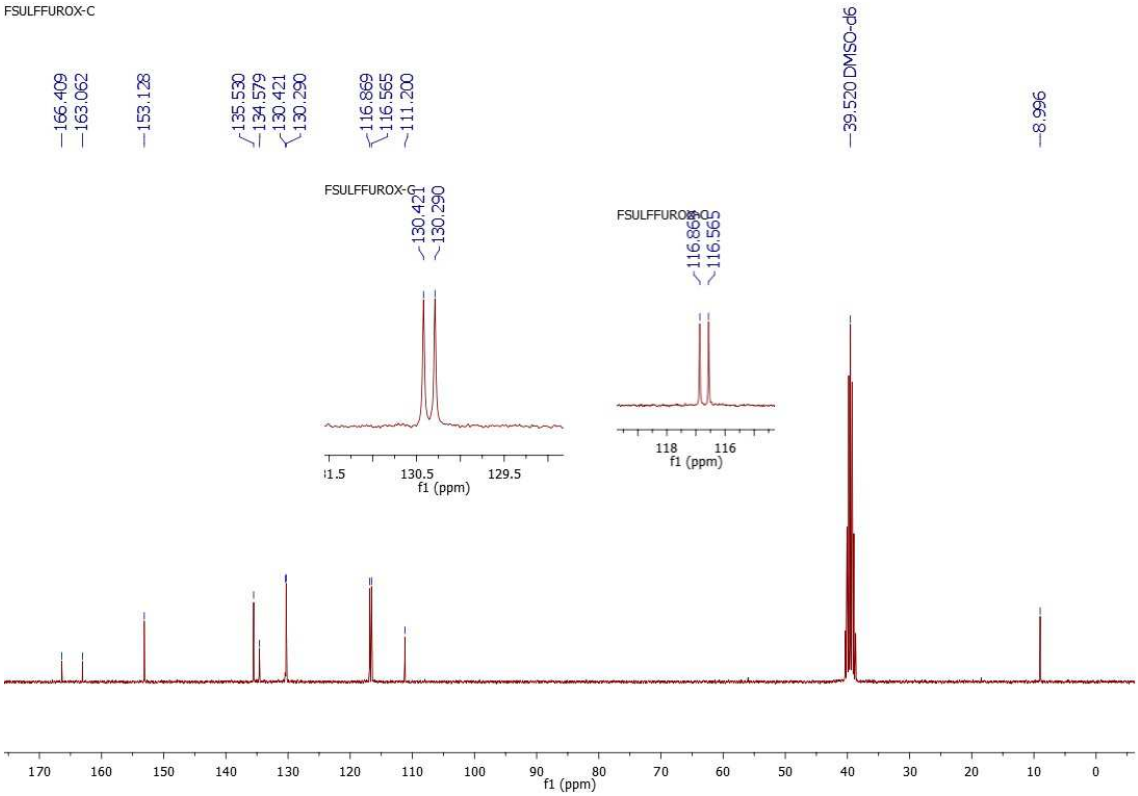


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 12,42 (s, 1H-a); 7,94-7,90 (m, 3H-b); 7,48 (t, 2H-c, J=8,7 Hz); 2,17 (s, 3H-d).



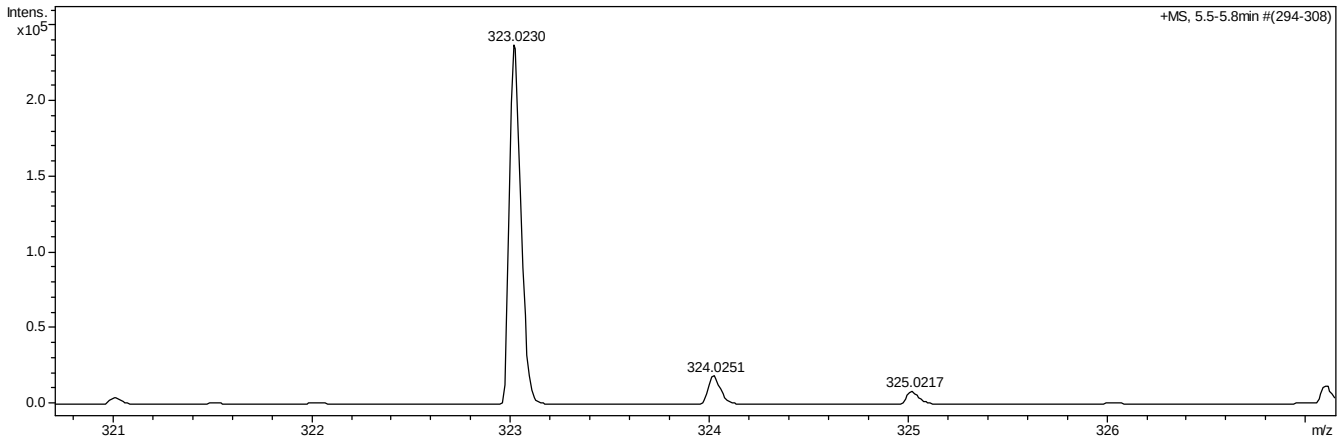


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 166,4/163,0-a; 153,1-b; 135,5-c; 134,5-d; 130,2/130,2-e; 116,8/116,5-f; 111,2-g; 8,9-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H9FN4O4S [M + Na^+]: 323,0329.

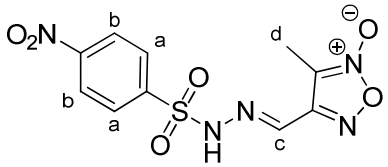
Encontrado: 323,0230.



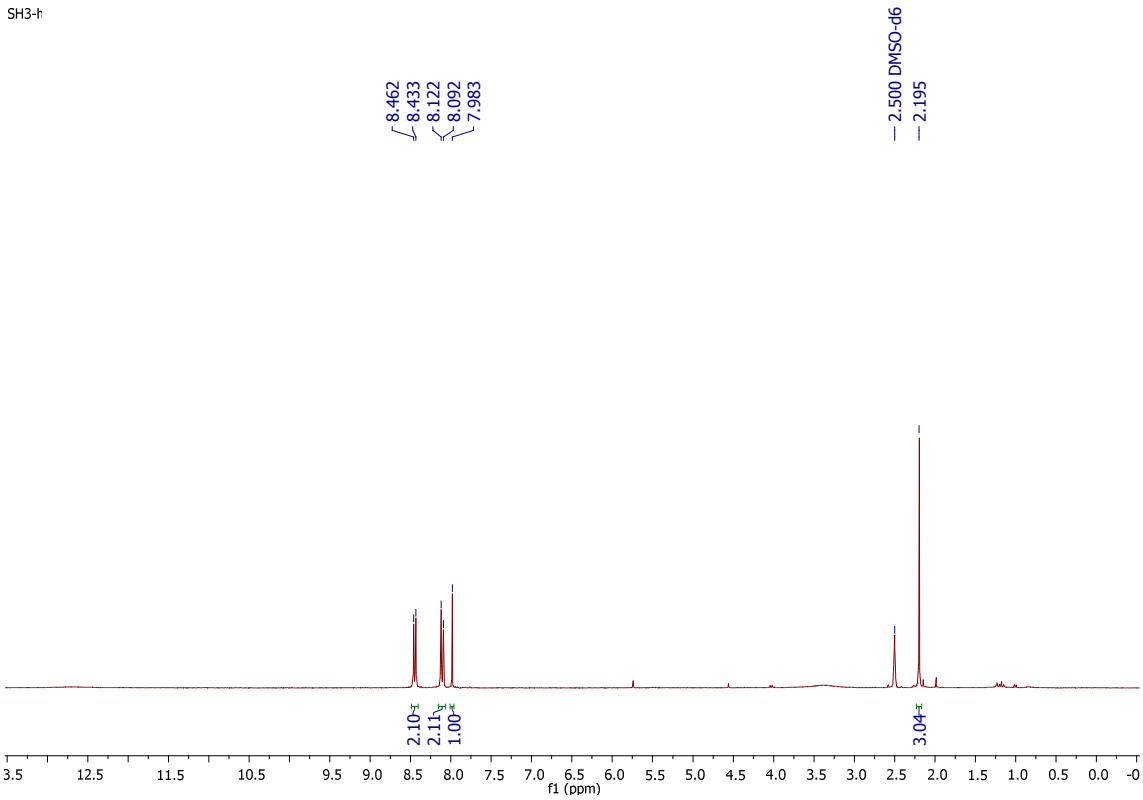
Composto **25**

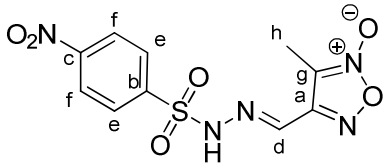
3-metil-4-((2-((4-nitrofenil)sulfonil)hidrazono)metil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração amarelo pálido (p.f.: 160-162 ºC). 87% de rendimento.

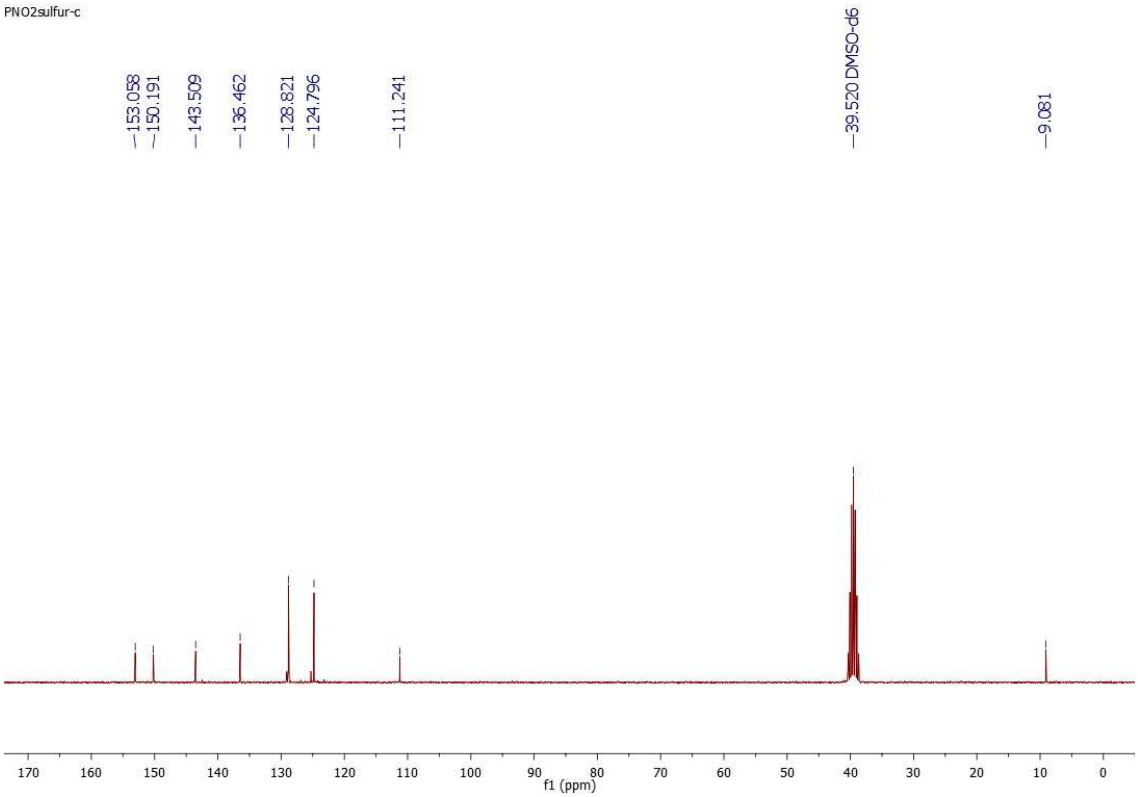


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 8,45 (d, 2H-a, J=8,7 Hz); 8,11 (d, 2H-b, J=8,7 Hz); 7,98 (s, 1H-c); 2,19 (s, 3H-d).



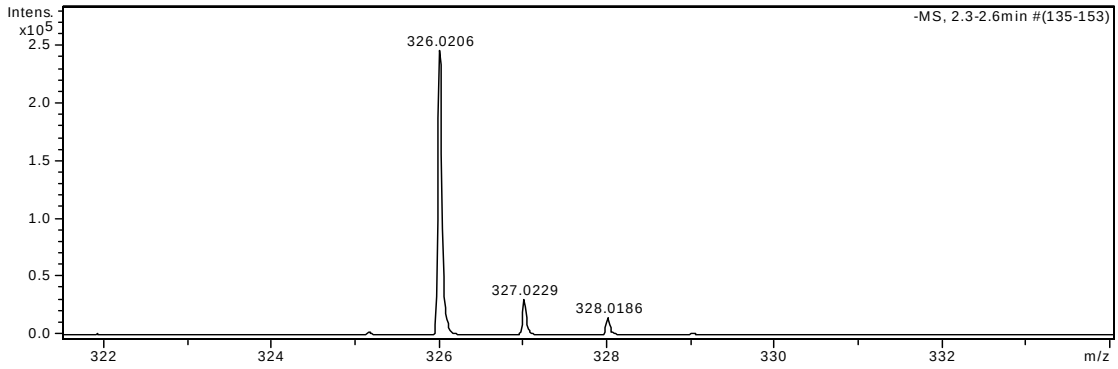


RMN ^{13}C (75 MHz) δ (ppm): 153,0-a; 150,1-b; 143,5-c; 136,4-d; 128,8-e; 124,7-f; 111,2-g; 9,0-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI- TOF-MS) calculado para C10H9N5O6S [M - H^+]: 326,0274.

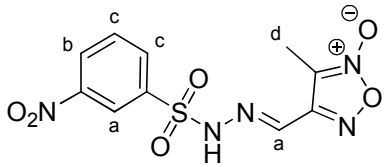
Encontrado: 326,0206.



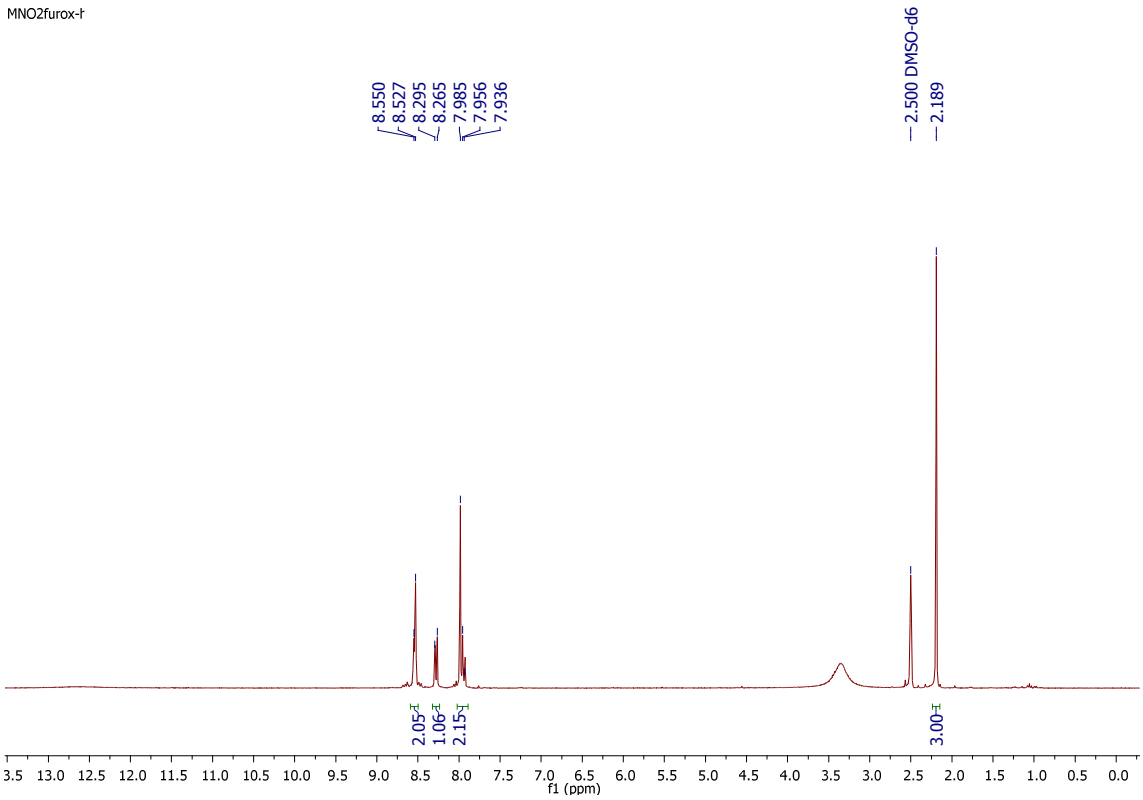
Composto **26**

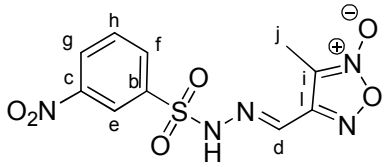
3-metil-4-((2-((3-nitrofenil)sulfonil)hidrazono)metil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração amarelo pálido (p.f.: 167-169 ºC). 91% de rendimento.

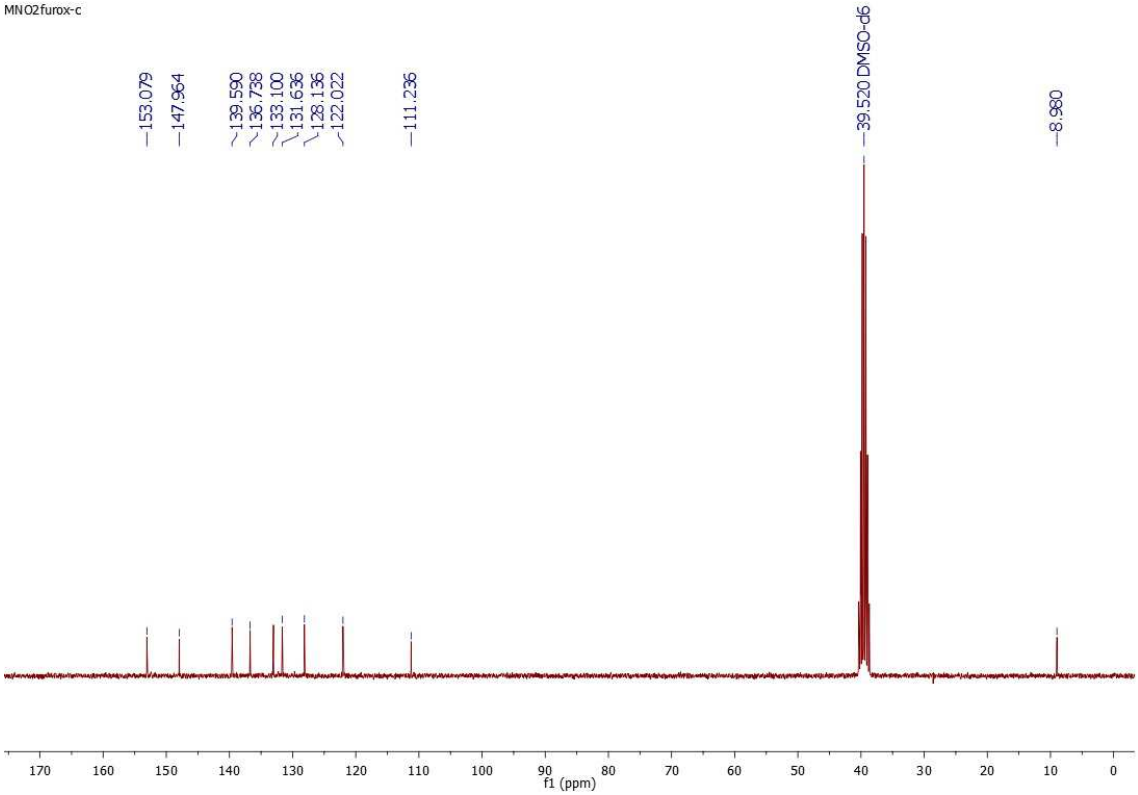


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 8,54 (d, 2H-a); 8,28 (d, 1H-b, J=8,7 Hz); 7,95 (t, 2H-c, J=8,7 Hz); 2,18 (s, 3H-d).



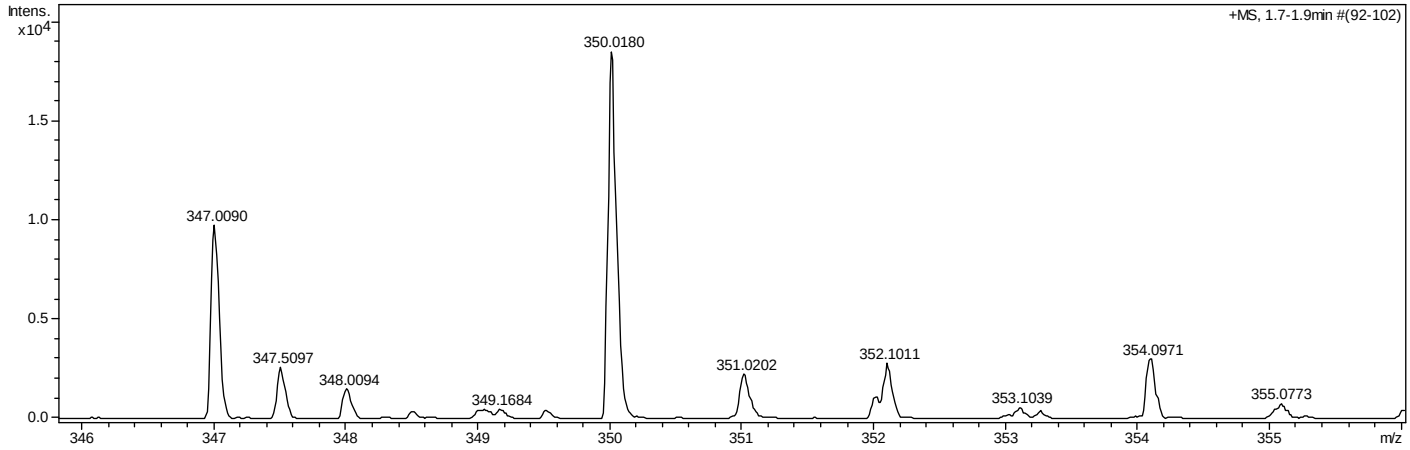


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 153,0-a; 147,9-b; 139,5-c; 136,7-d; 133,1-e; 131,6-f; 128,1-g; 122,0-h; 111,2-i; 8,9-j.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H9N5O6S [M + Na+]: 350,0274.

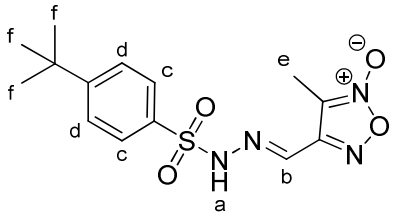
Encontrado: 350,0180.



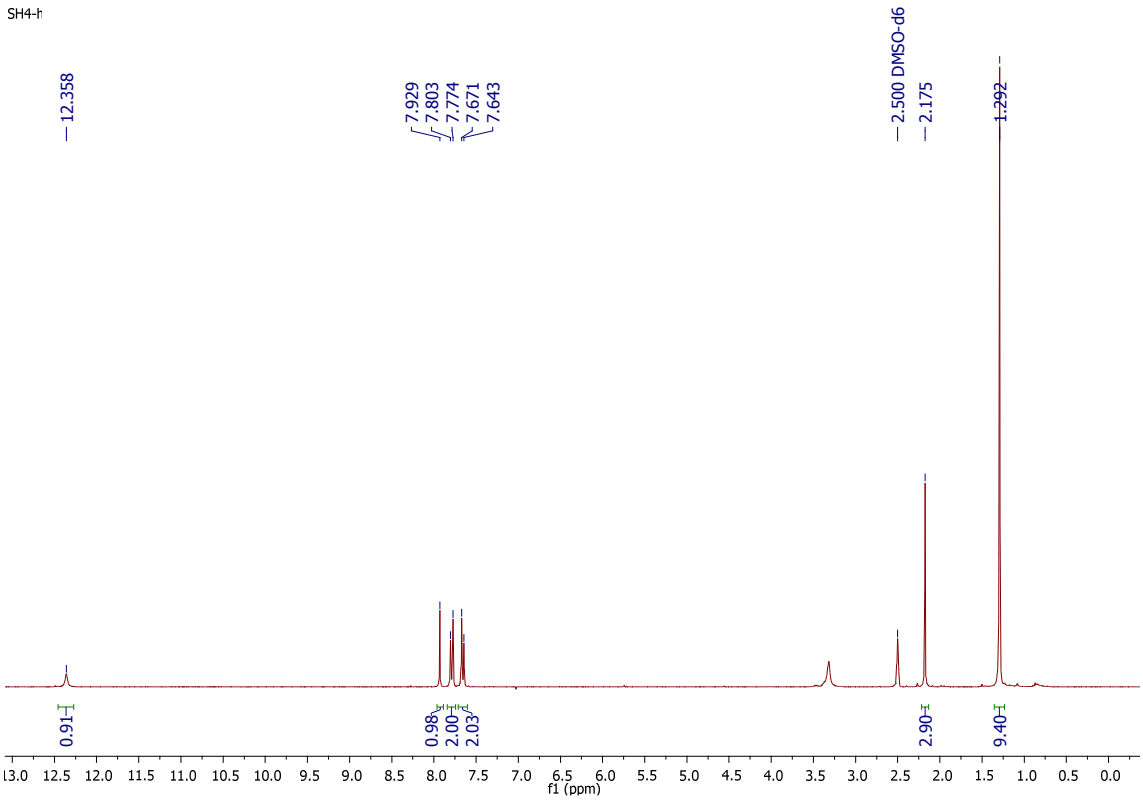
Composto **27**

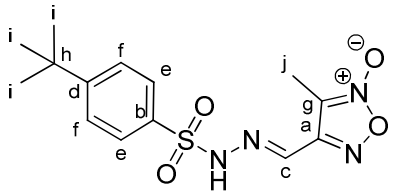
4-((2-((4-(*tert*-butil)fenil)sulfonil)hidrazono)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração amarelo pálido (p.f.: 171-173 ºC). 85% de rendimento.

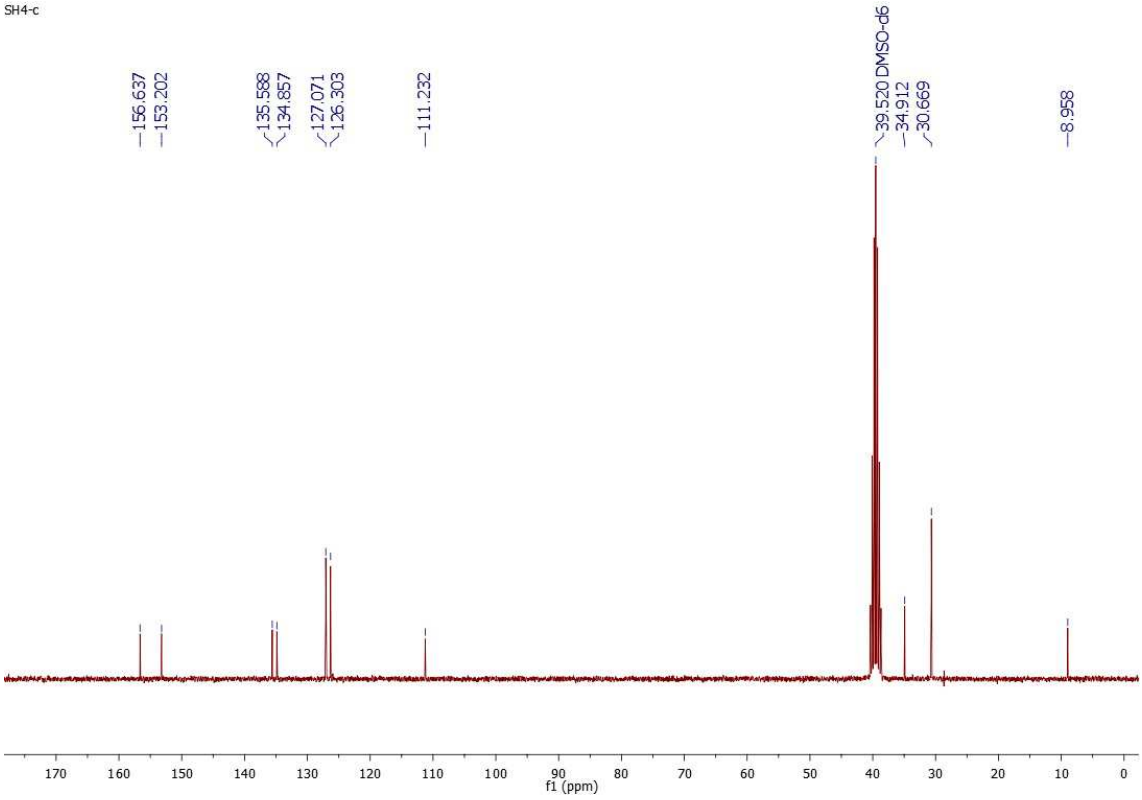


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 12,35 (s, 1H-a); 7,92 (s, 1H-b); 7,79 (d, 2H-c, J=8,7 Hz); 7,66 (d, 2H-d, J=8,7 Hz); 2,17 (s, 3H-e); 1,29 (s, 9H-f).



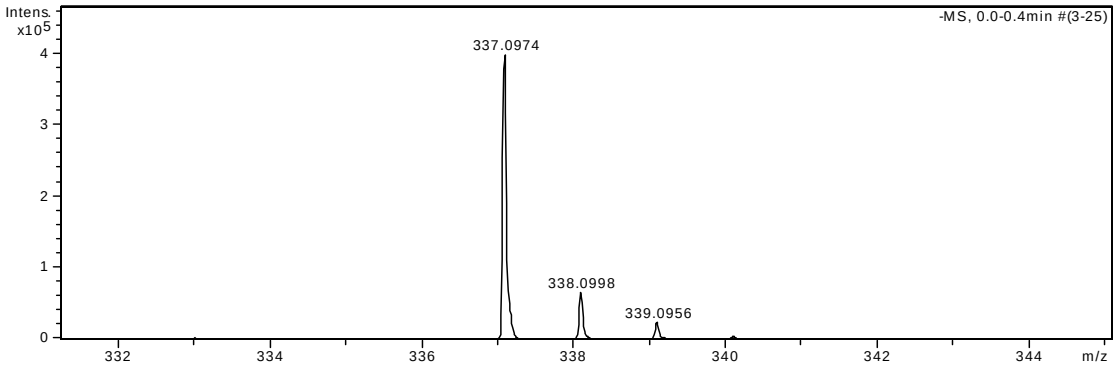


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 156,6-a; 153,2-b; 135,5-c; 134,8-d; 127,0-e; 126,3-f; 111,2-g; 34,9-h; 30,6-i; 8,9-j.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI- TOF-MS) calculado para C14H18N4O4S [M - H+]: 337,1049.

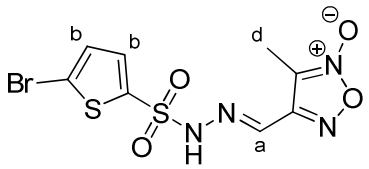
Encontrado: 337,0974.



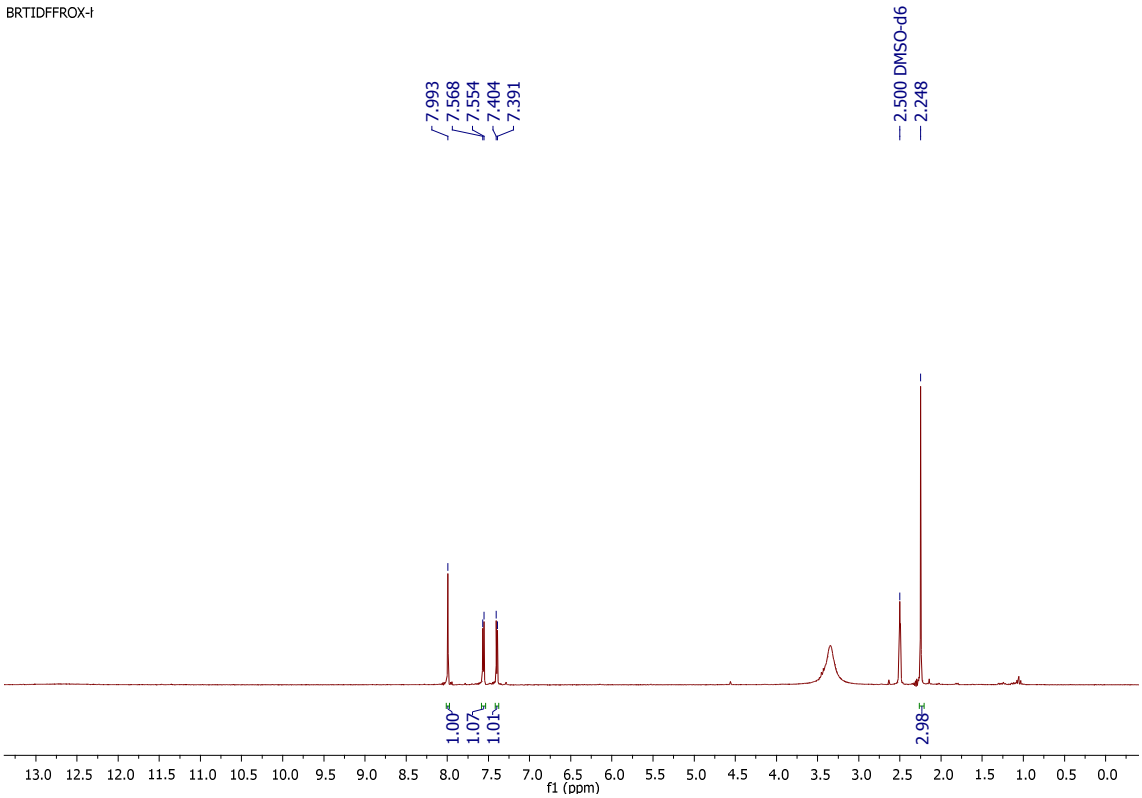
Composto **28**

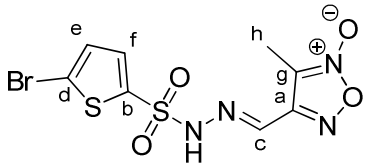
4-((2-((5-bromotiofeno-2-il)sulfonil)hidrazono)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Sólido de coloração laranja pálido (p.f.: 159-161 ºC). 63% de rendimento.

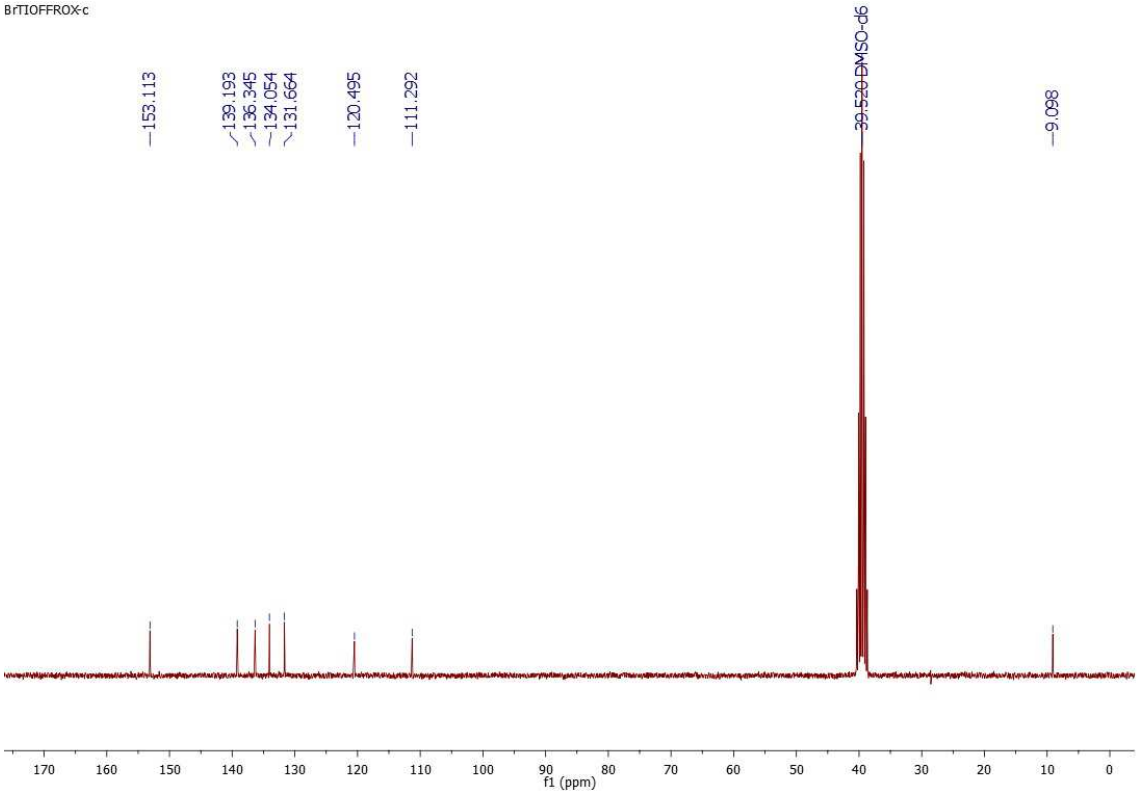


RMN ^{1}H (250 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 7,99 (s, 1H-a); 7,56 (d, 1H-b, J=4,2 Hz); 7,40 (d, 1H-c, J=4,2 Hz); 2,24 (s, 3H-d).



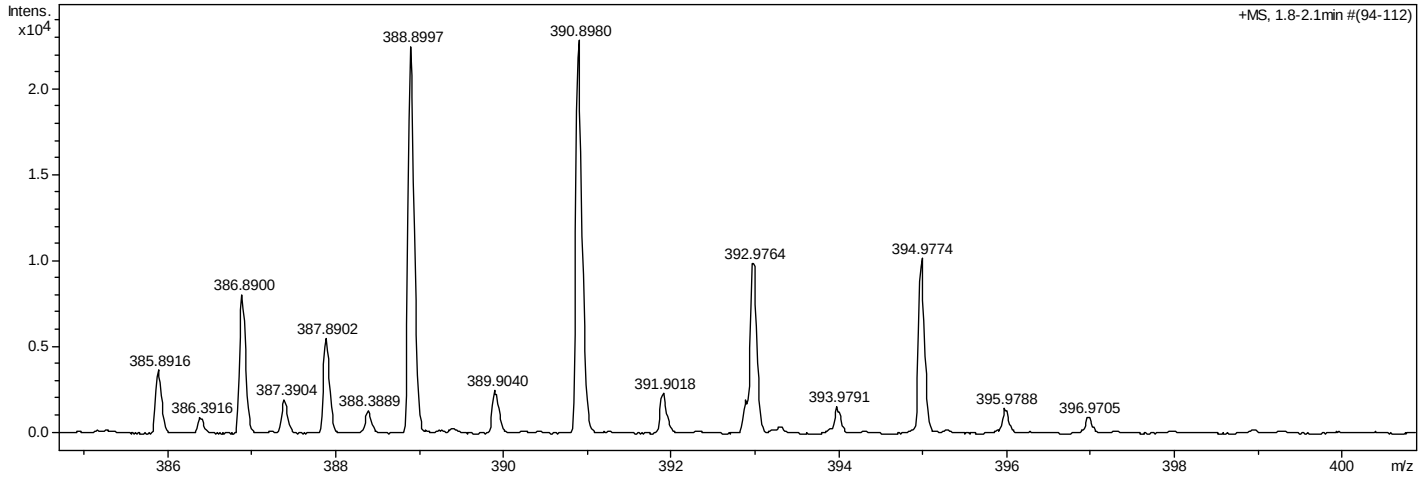


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 153,1-a; 139,1-b; 136,3-c; 134,0-d; 131,6-e; 120,4-f; 111,2-g; 9.0-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C8H7BrN4O4S2 [M + Na^+]: 388,9092.

Encontrado: 388,8997

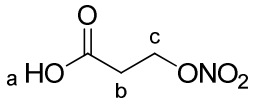


4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL – CAPÍTULO 3 (DERIVADOS ÉSTERES NITRATO)

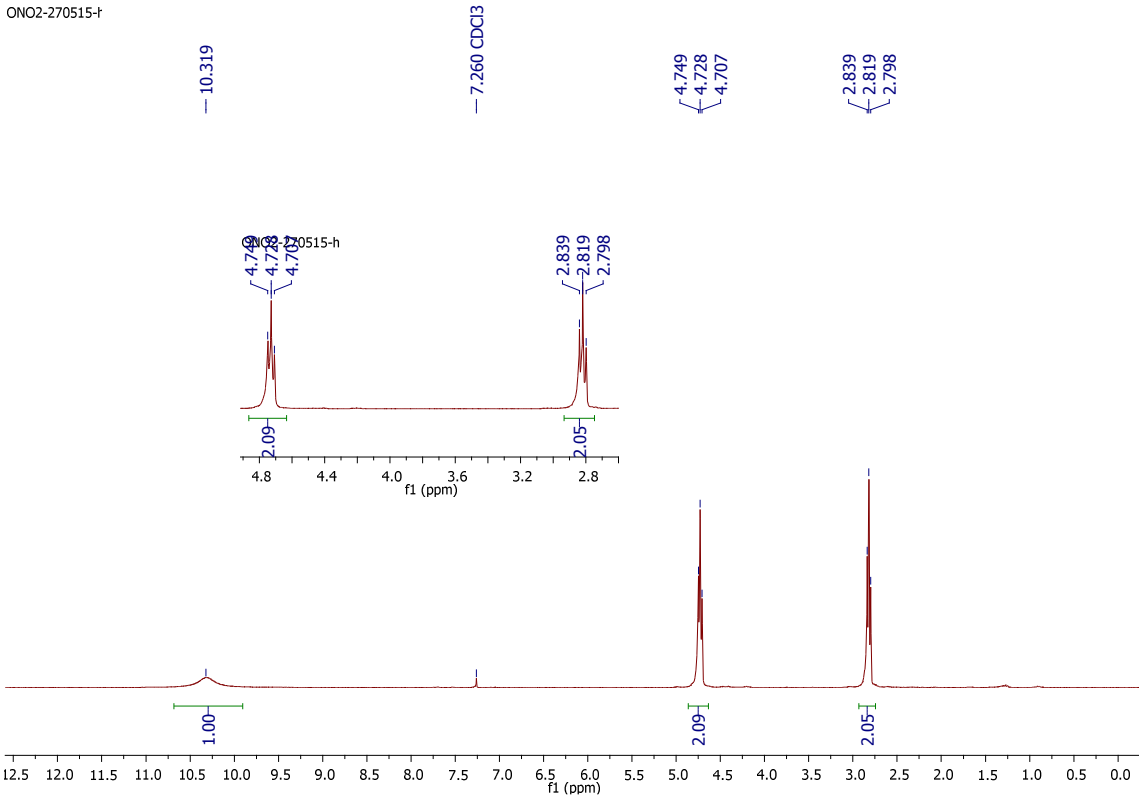
Intermediário **XXVI**

Ácido 3-(nitrooxi)propanoico

Óleo de coloração amarela. 86% de rendimento.



RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, δ = ppm): 10,31 (s, 1H-a); 4,72 (t, 2H-b, J=6,3 Hz); 2,81 (t, 2H-c, J=6,3 Hz).



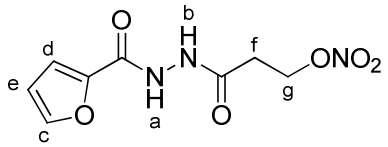
KUTTY, S. K.; BARRAUD, N.; PHARM, A.; ISKANDER, G.; RICE, S. A.; BLACK, D. S.; KUMAR, N. Design, synthesis, and evaluation of fimbrolide-nitric oxide donor hybrids as antimicrobial agents. *J. Med. Chem.*, v. 56, p. 9517-9529, 2013.

Na análise de RMN ^{1}H dos compostos derivados de ésteres nitrato (**29-38**), o deslocamento químico dos hidrogênios ligados aos nitrogênios (*N-H*) e da ponte etilênica (C_2H_4) apresentaram valores entre 10,83-9,87 ppm e 4,79-2,62 ppm, respectivamente. Já na análise de RMN ^{13}C os deslocamentos químicos das carbonilas e das pontes etilênicas foram identificados entre 168,0-156,9 ppm e 69,5-30,6 ppm, respectivamente.

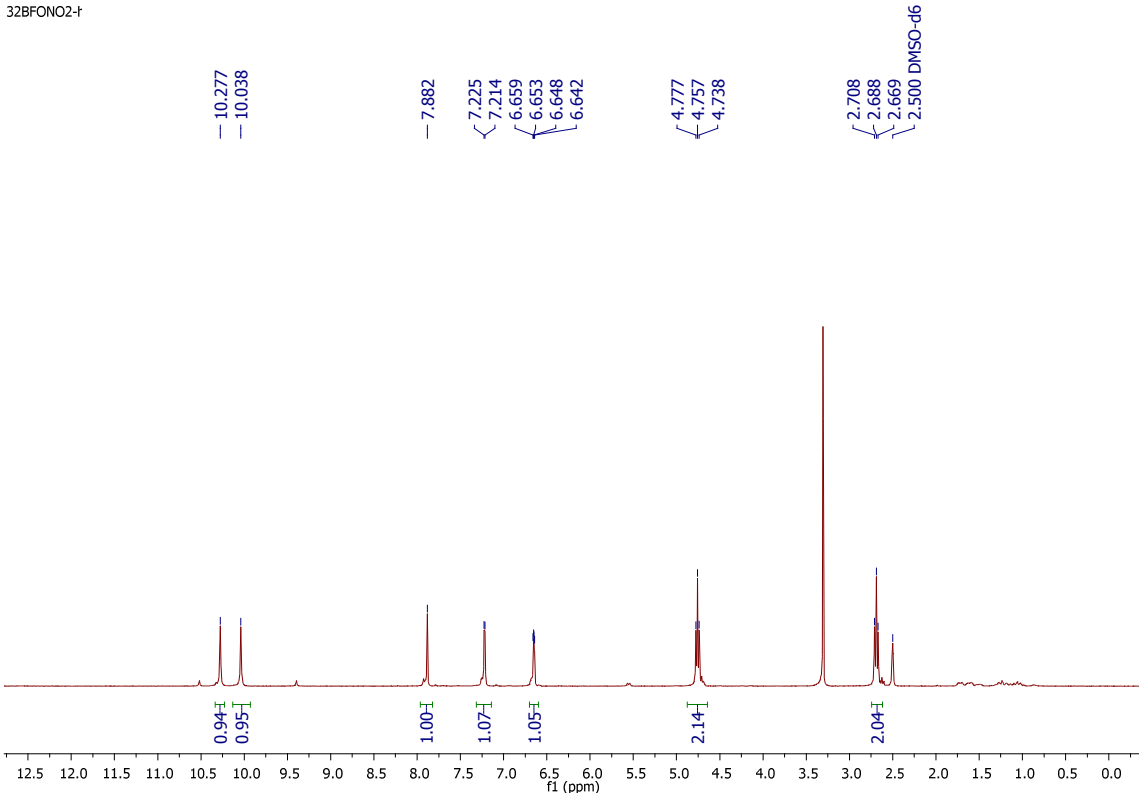
Composto **29**

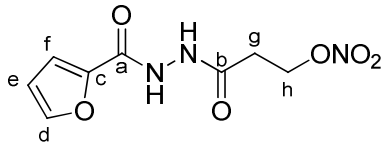
3-(2-(furano-2-carbonil)hidrazinil)-3-oxopropil nitrato

Sólido de coloração amarelo pálido (p.f.: 106-108 ºC). 52% de rendimento.

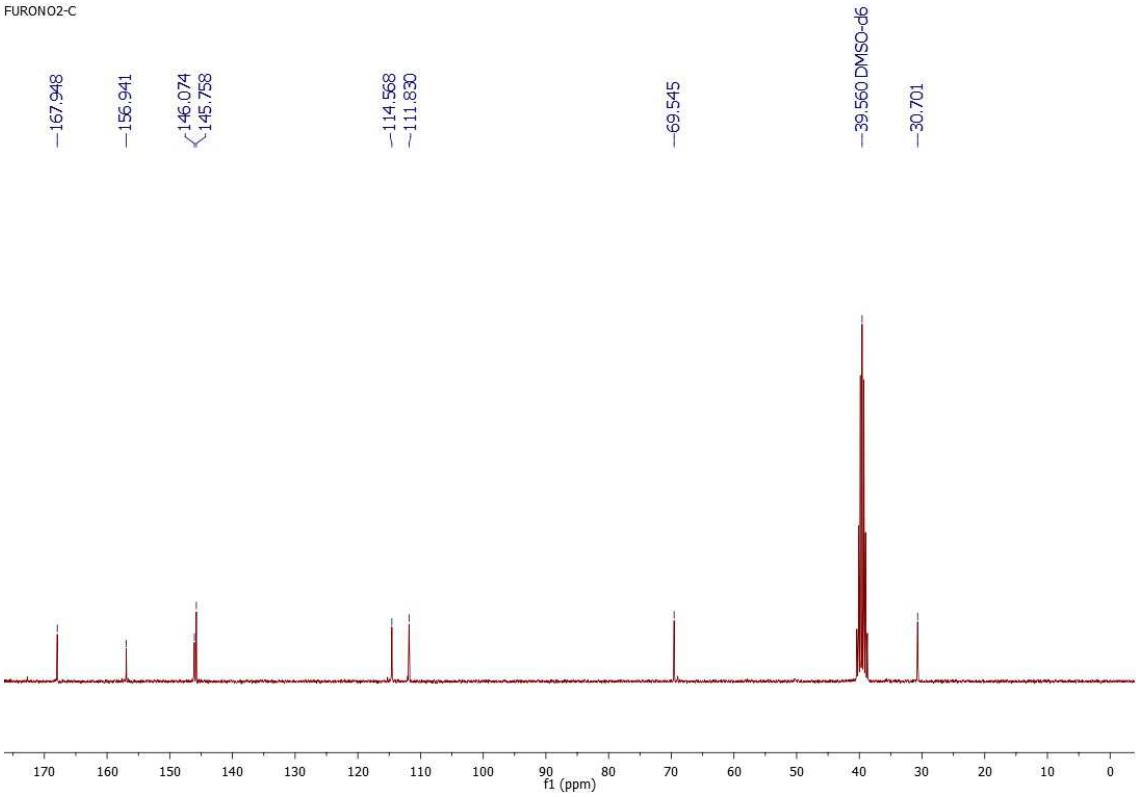


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 10,27 (s, 1H-a); 10,03 (s, 1H-b); 7,88 (s, 1H-c); 7,22 (d, 1H-d, J=3,3 Hz); 6,65-6,64 (m, 1H-e); 4,75 (t, 2H-f, J=6 Hz); 2,68 (t, 2H-g, J=6 Hz).



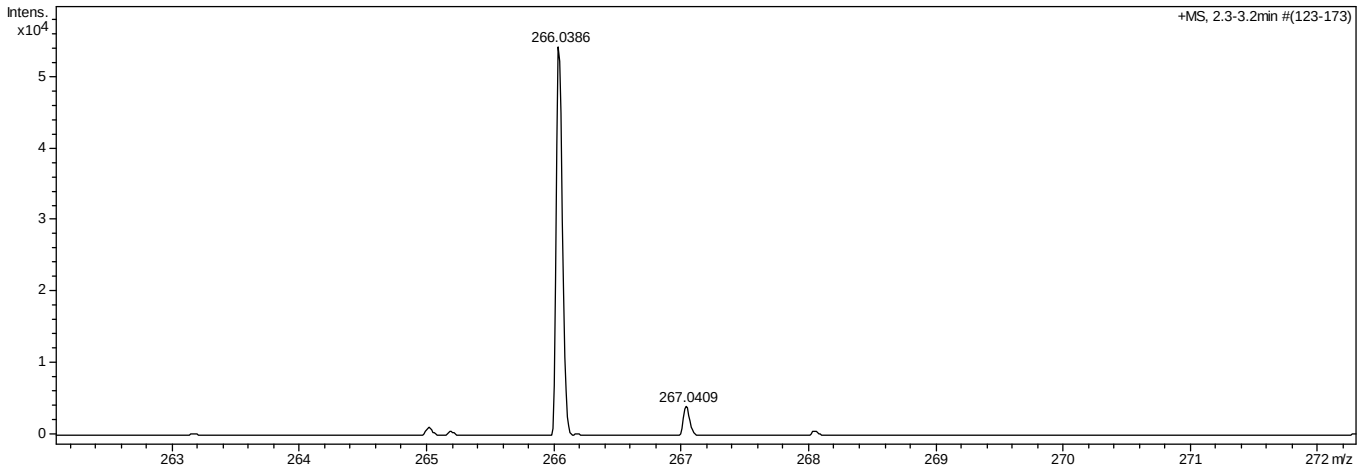


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 167,9-a; 156,9-b; 146,0-c; 145,7-d; 114,5-e; 111,8-f; 69,5-g; 30,7-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C8H9N3O6 [M + Na^+]: 266,0491.

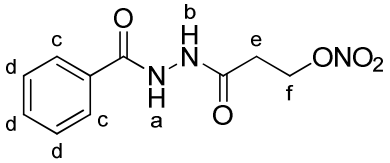
Encontrado: 266,0386.



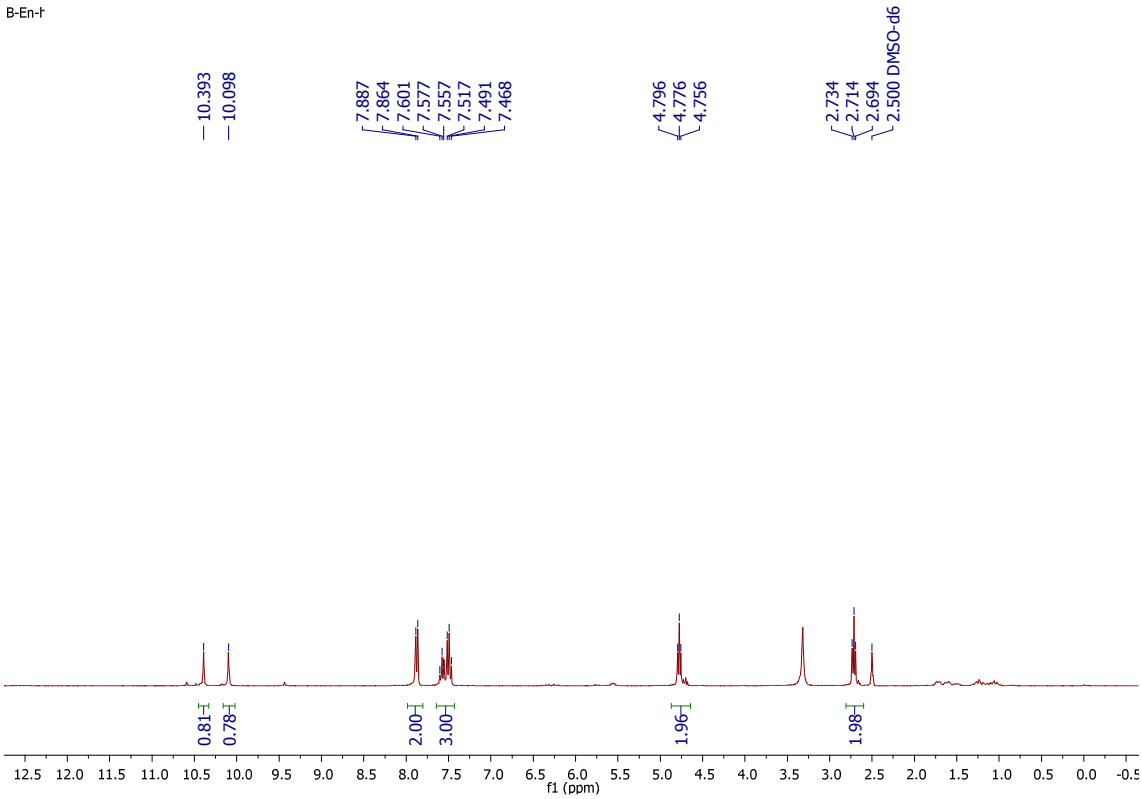
Composto **30**

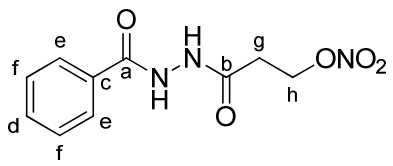
3-(2-benzoilidrazinil)-3-oxopropil nitrato

Sólido de coloração branca (p.f.: 119-121 ºC). 48% de rendimento.

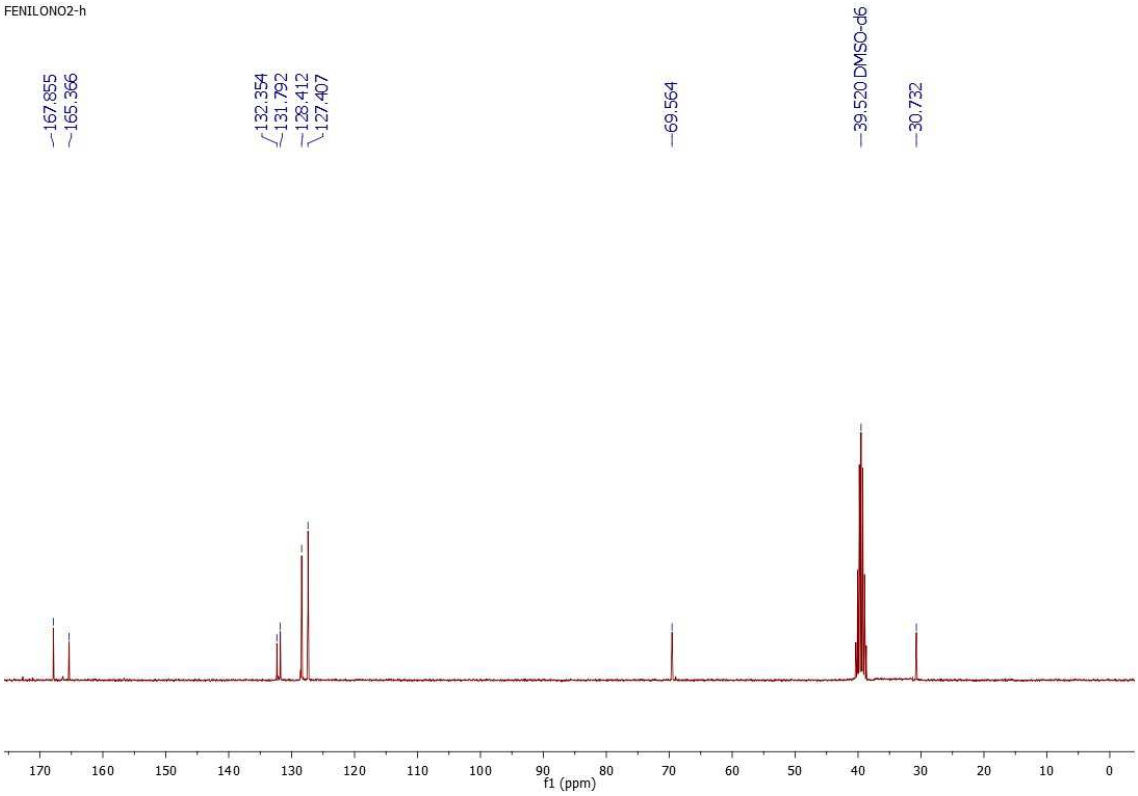


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 10,39 (s, 1H-a); 10,09 (s, 1H-b); 7,87 (d, 2H-c, J=6,9 Hz); 7,60-7,46 (m, 3H-d); 4,77 (t, 2H-e, J=6 Hz); 2,71 (t, 2H-f, J=6 Hz).



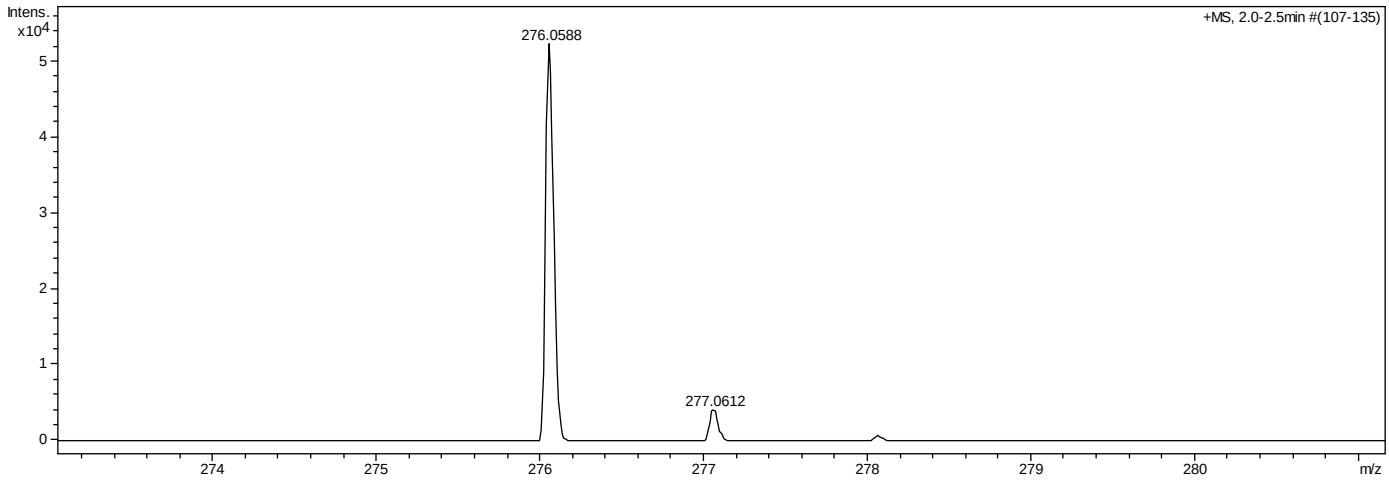


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 167,8-a; 165,3-b; 132,3-c; 131,7-d; 128,4-e; 127,4-f; 69,5-g; 30,7-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H11N3O5 [M + Na+]: 276,0699.

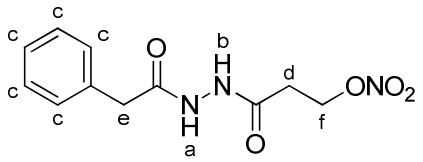
Encontrado: 276,0588.



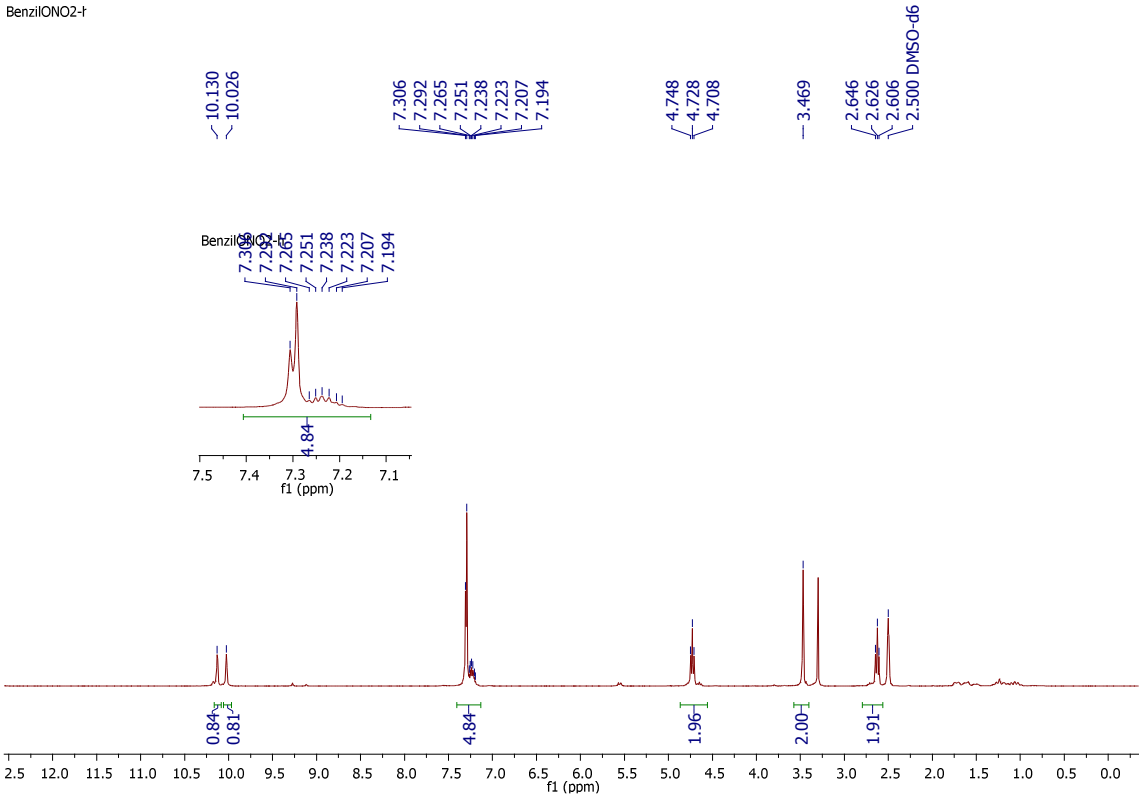
Composto **31**

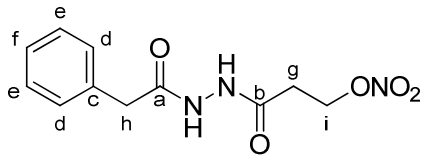
3-oxo-3-(2-(2-fenilacetil)hidrazinil)propil nitrato

Sólido de coloração branca (p.f.: 150-152 ºC). 42% de rendimento.

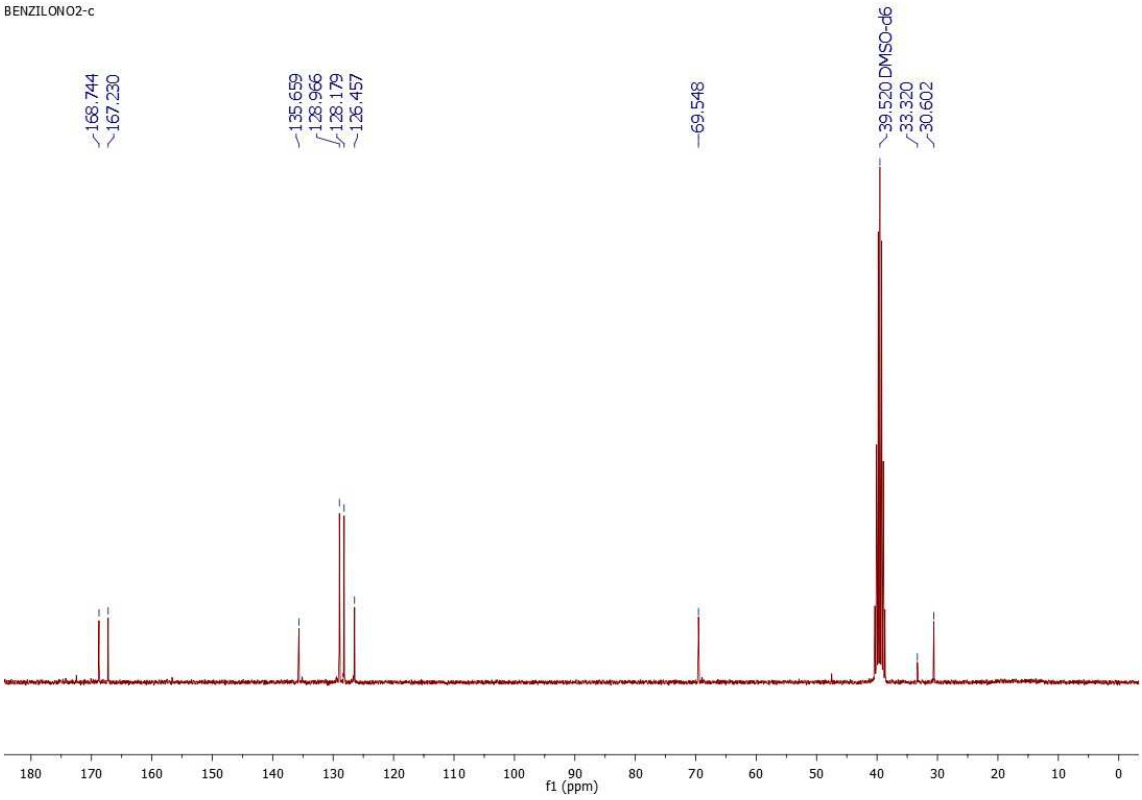


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 10,13 (s, 1H-a); 10,02 (s, 1H-b); 7,30-7,19 (m, 5H-c); 4,72 (t, 2H-d, J=6 Hz); 3,46 (s, 2H-e); 2,62 (t, 2H-f, J=6 Hz).



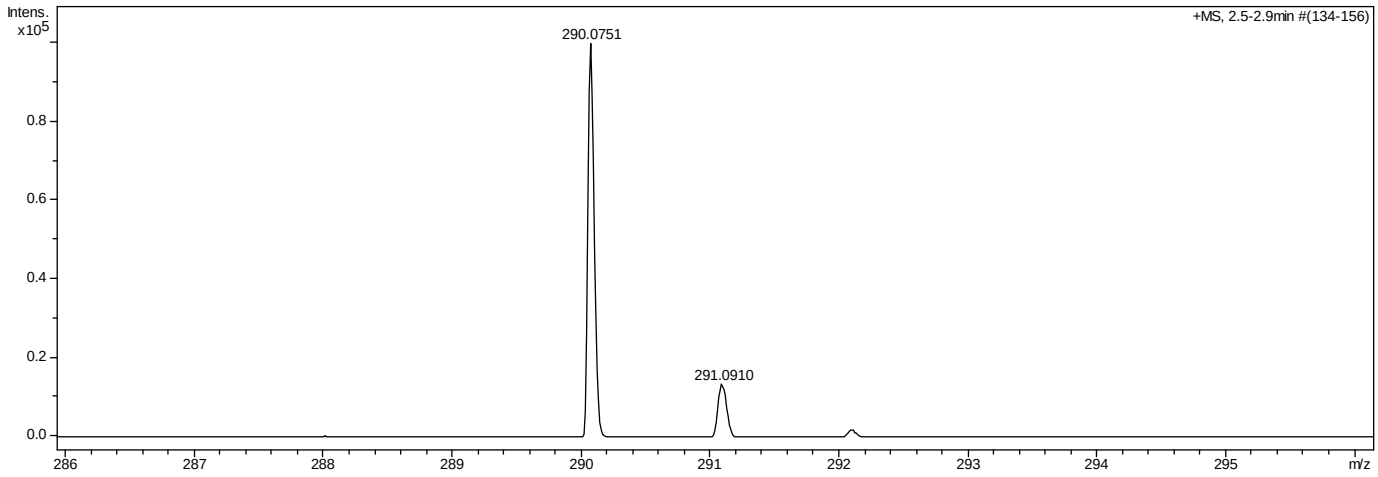


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 168,7-a; 167,2-b; 135,6-c; 128,9-d; 128,1-e; 126,4-f; 69,5-g; 33,3-h; 30,6-i.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C11H13N3O5 [M + Na^+]: 290,0855.

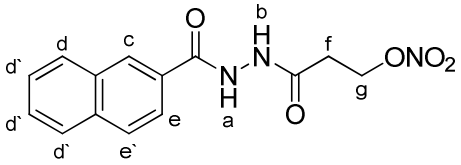
Encontrado: 290,0751.



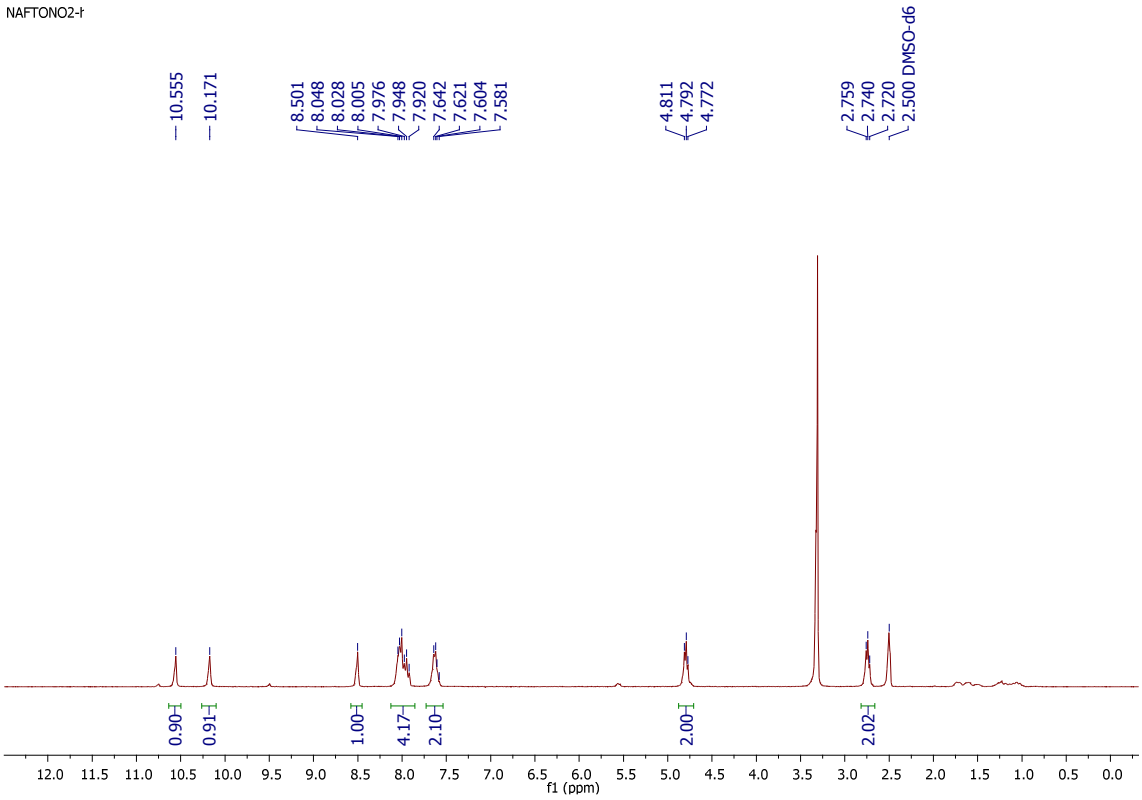
Composto **32**

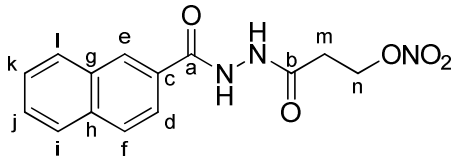
3-(2-(2-naftoil)hidrazinil)-3-oxopropil nitrato

Sólido de coloração branca (p.f.: 158-160 ºC). 39% de rendimento.

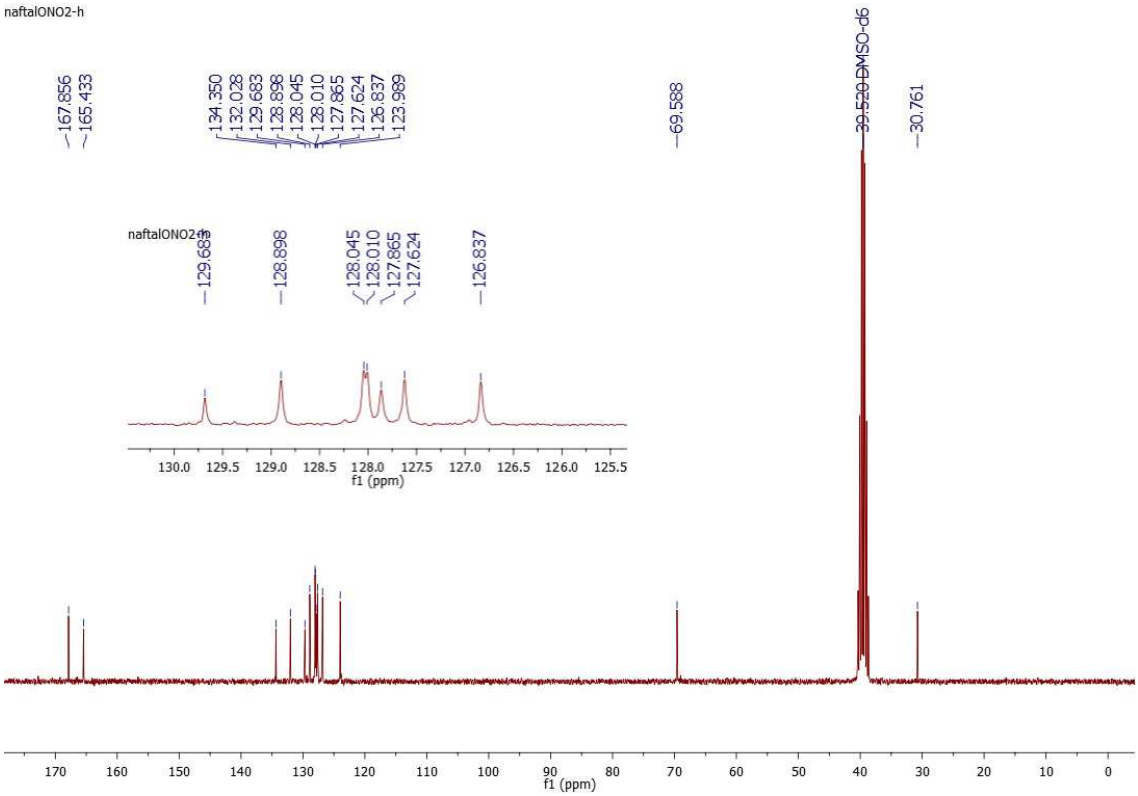


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 10,55 (s, 1H-a); 10,17 (s, 1H-b); 8,50 (s, 1H-c); 8,04-7,92 (m, 4H-d,d`); 7,64-7,58 (m, 2H-e,e`); 4,79 (t, 2H-f, J=5,7 Hz); 2,74 (t, 2H-g, J=5,7 Hz).



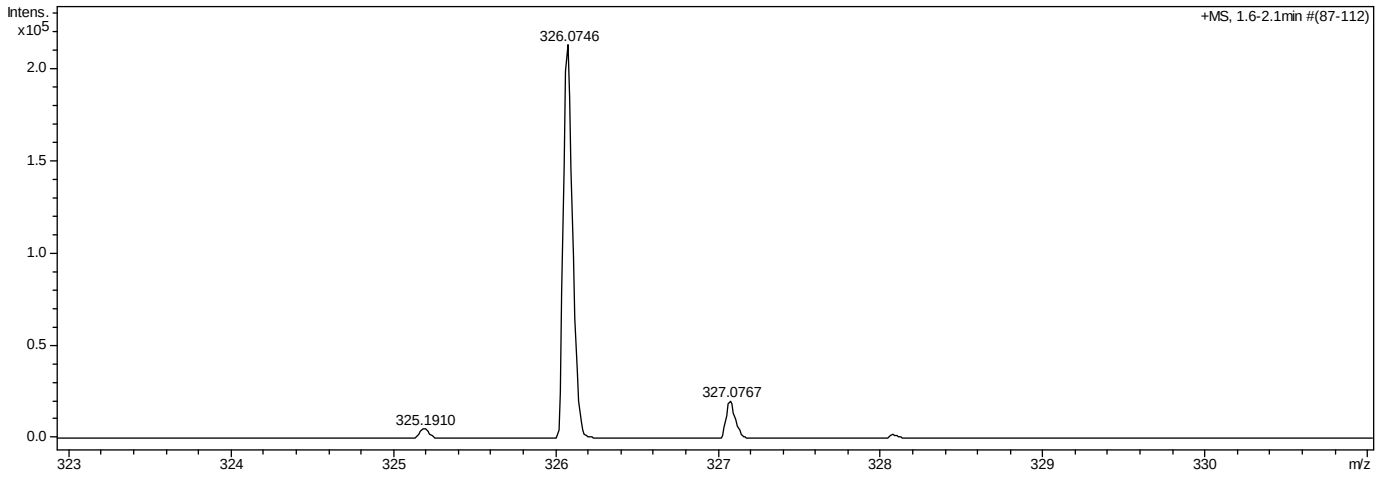


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 167,8-a; 165,4-b; 134,3-c; 132,0-d; 129,6-e; 128,8-f; 128,0-g; 128,0-h; 127,8-i; 127,6-j; 126,8-k; 123,9-l; 69,5-m; 30,7-n.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C14H13N3O5 [M + Na^+]: 326,0855.

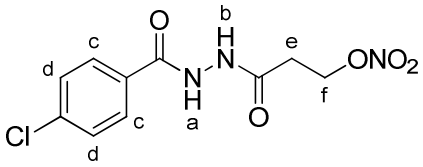
Encontrado: 326,0746.



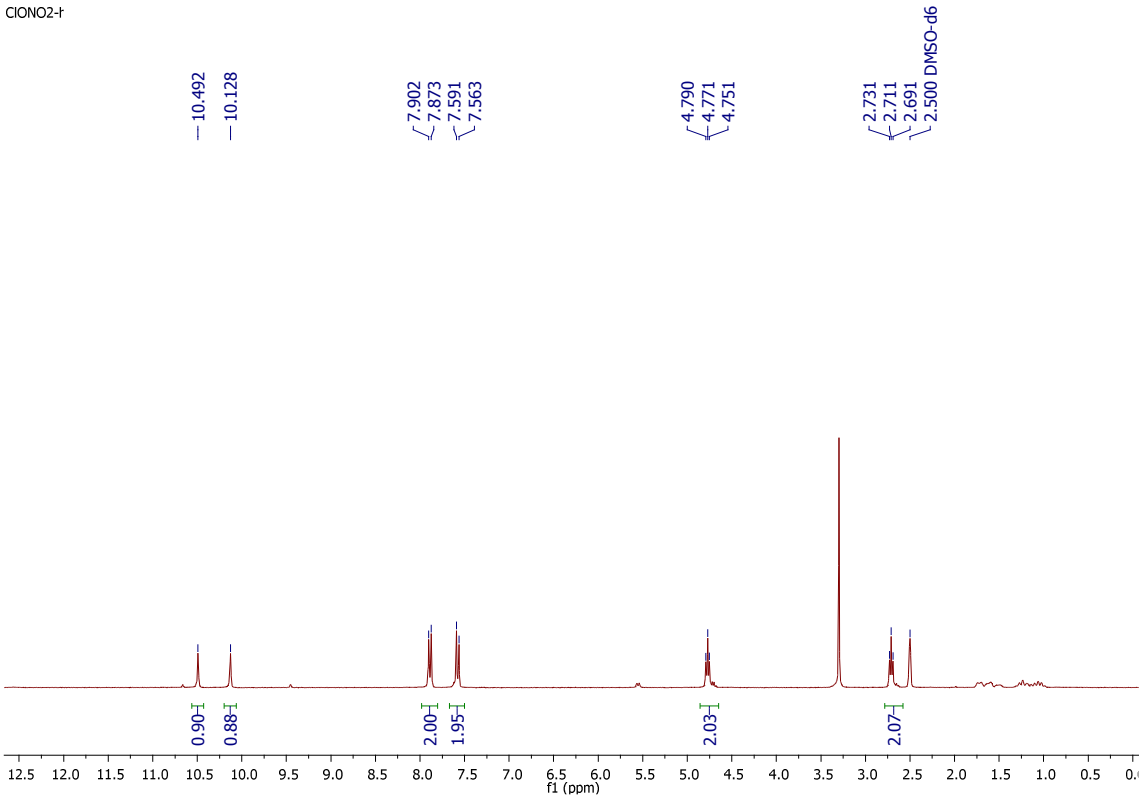
Composto **33**

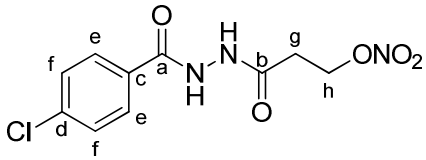
3-(2-(4-clorobenzoil)hidrazinil)-3-oxopropil nitrato

Sólido de coloração laranja pálido (p.f.: 152-154 ºC). 37% de rendimento.

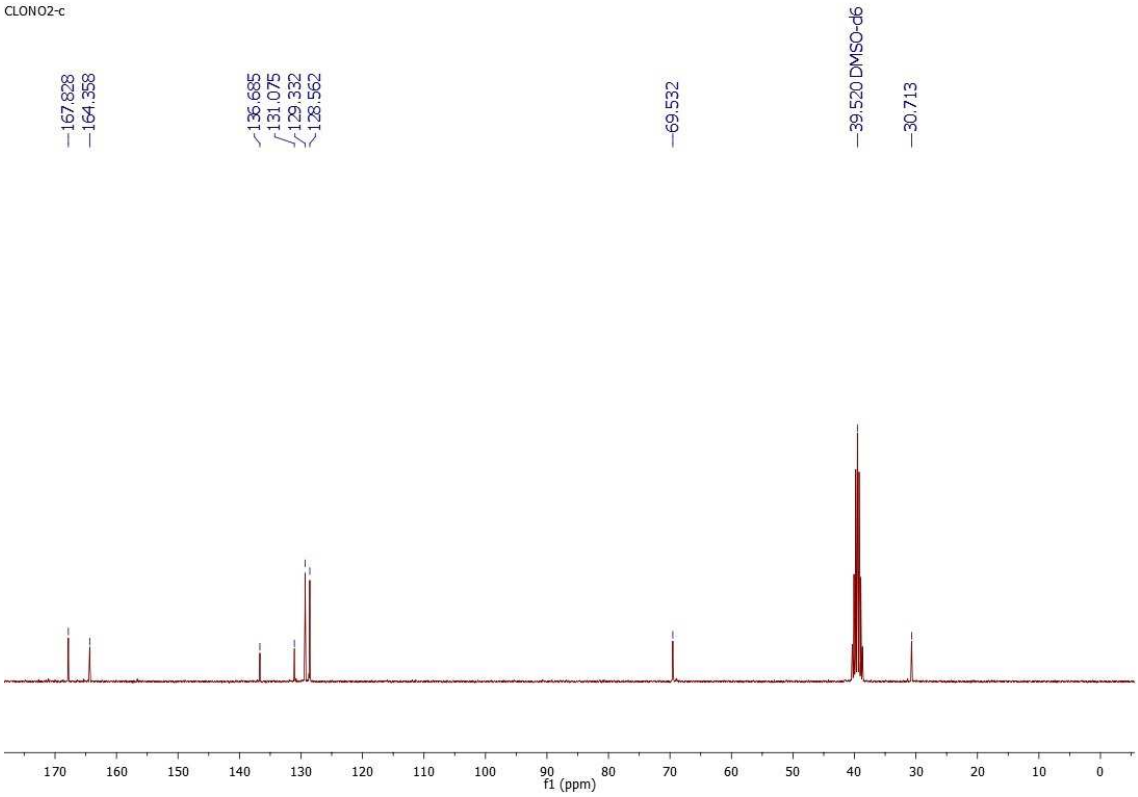


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 10,49 (s, 1H-a); 10,12 (s, 1H-b); 7,89 (d, 2H-c, J=8,7 Hz); 7,58 (d, 2H-d, J=8,7 Hz); 4,77 (t, 2H-e, J=5,7 Hz); 2,71 (t, 2H-f, J=5,7 Hz).



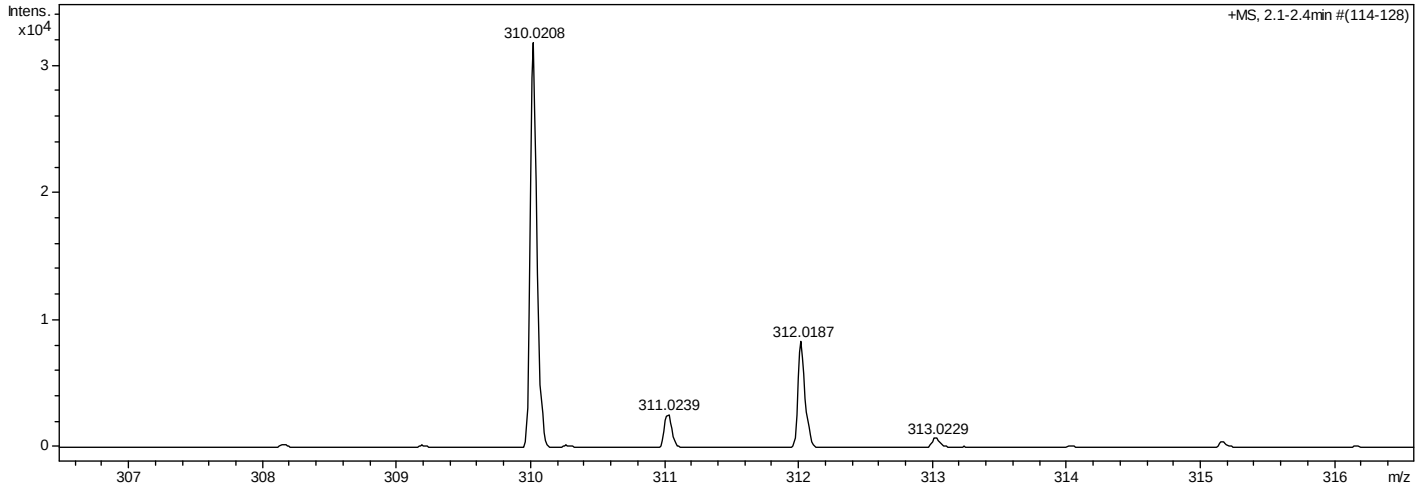


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 167,8-a; 164,3-b; 136,6-c; 131,0-d; 129,3-e; 128,5-f; 69,5-g; 30,7-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H10ClN3O5 [M + Na^+]: 310,0309.

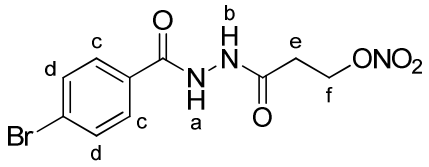
Encontrado: 310,0208.



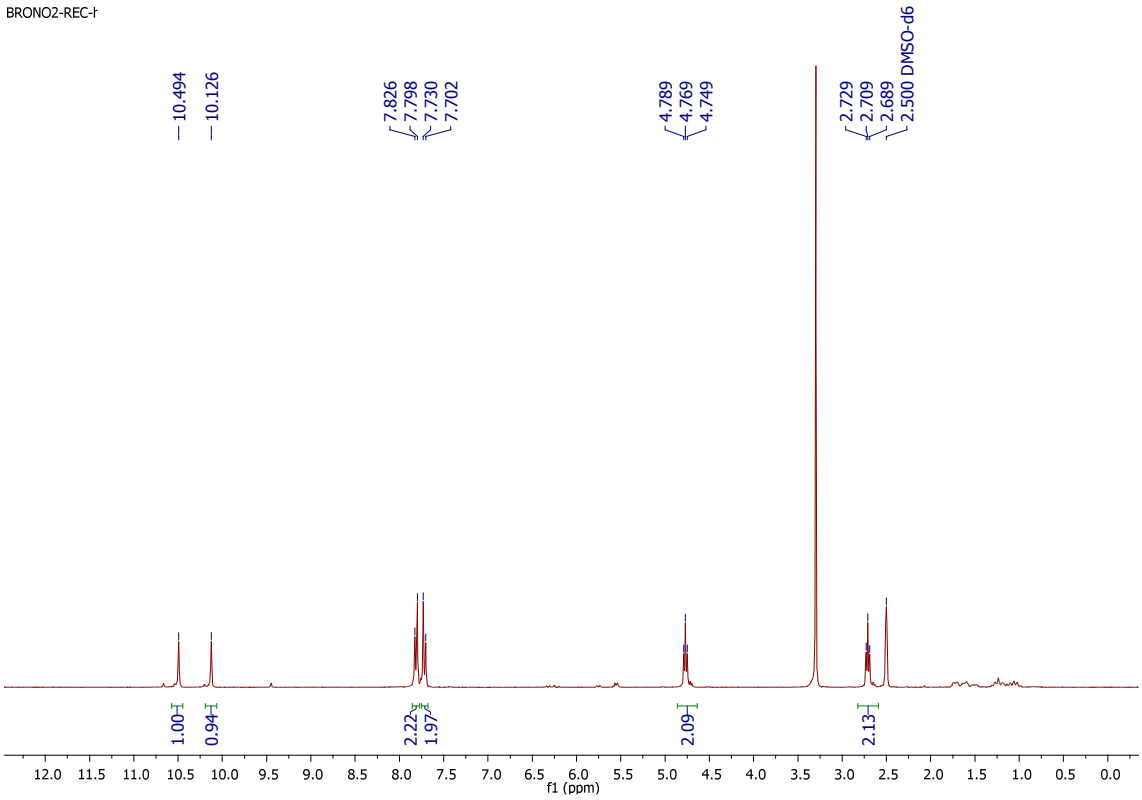
Composto **34**

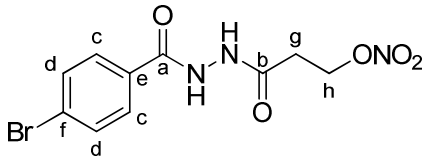
3-(2-(4-bromobenzoil)hidrazinil)-3-oxopropil nitrato

Sólido de coloração branca (p.f.: 161-163 ºC). 43% de rendimento.

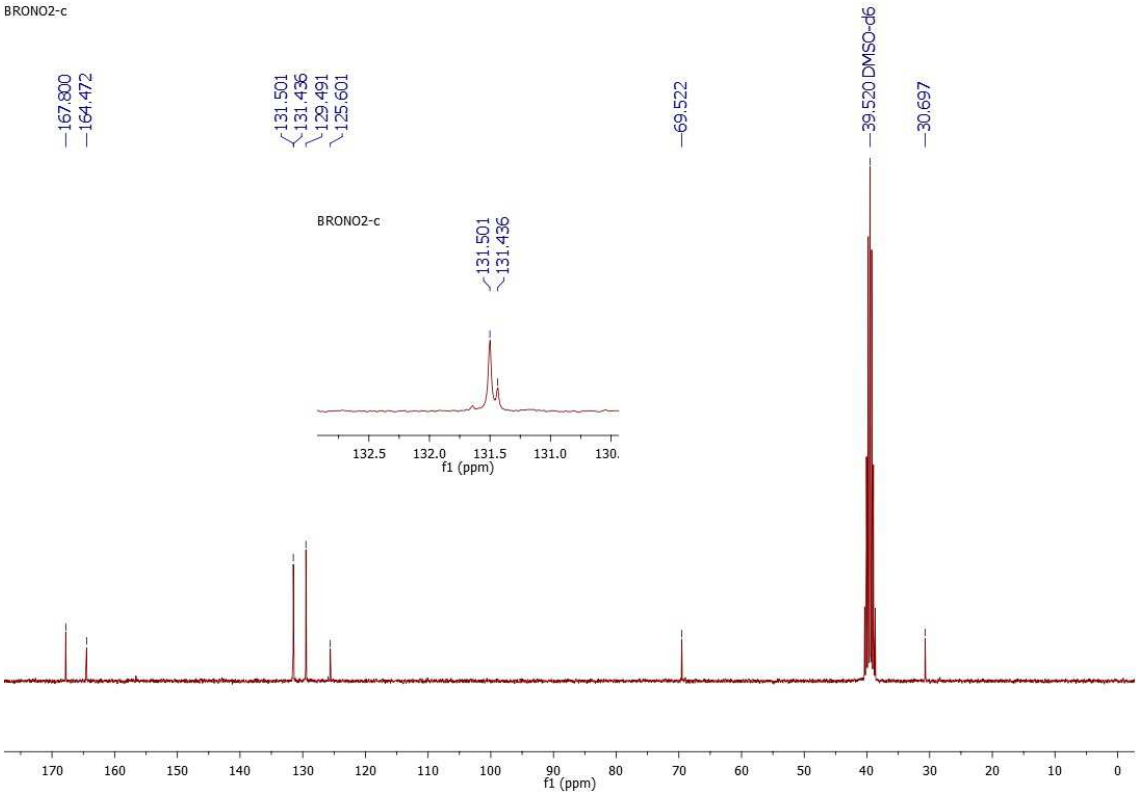


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 10,49 (s, 1H-a); 10,12 (s, 1H-b); 7,81 (d, 2H-c, J=8,4); 7,72 (d, 2H-d, J=8,4 Hz); 4,76 (t, 2H-e, J=6 Hz); 2,70 (t, 2H-f, J=6 Hz).



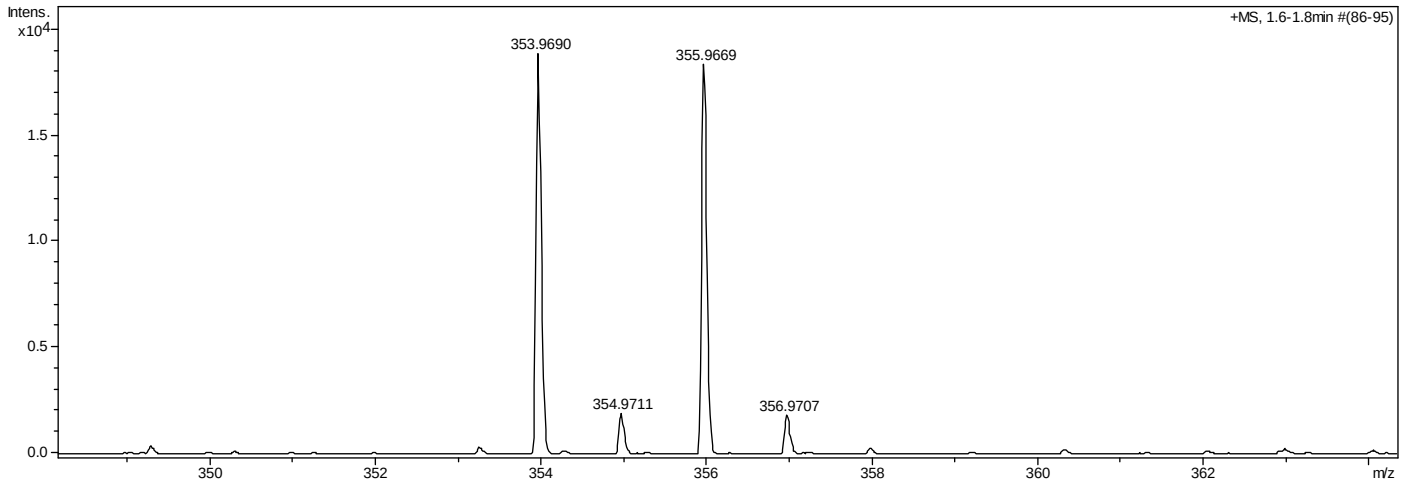


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 167,8-a; 164,4-b; 131,5-c; 131,4-d; 129,4-e; 125,6-f; 69,5-g; 30,6-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H10BrN3O5 [M + Na^+]: 353,9804.

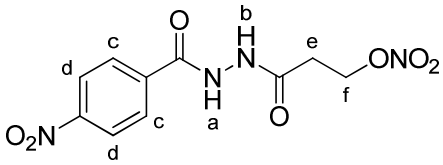
Encontrado: 353,9690.



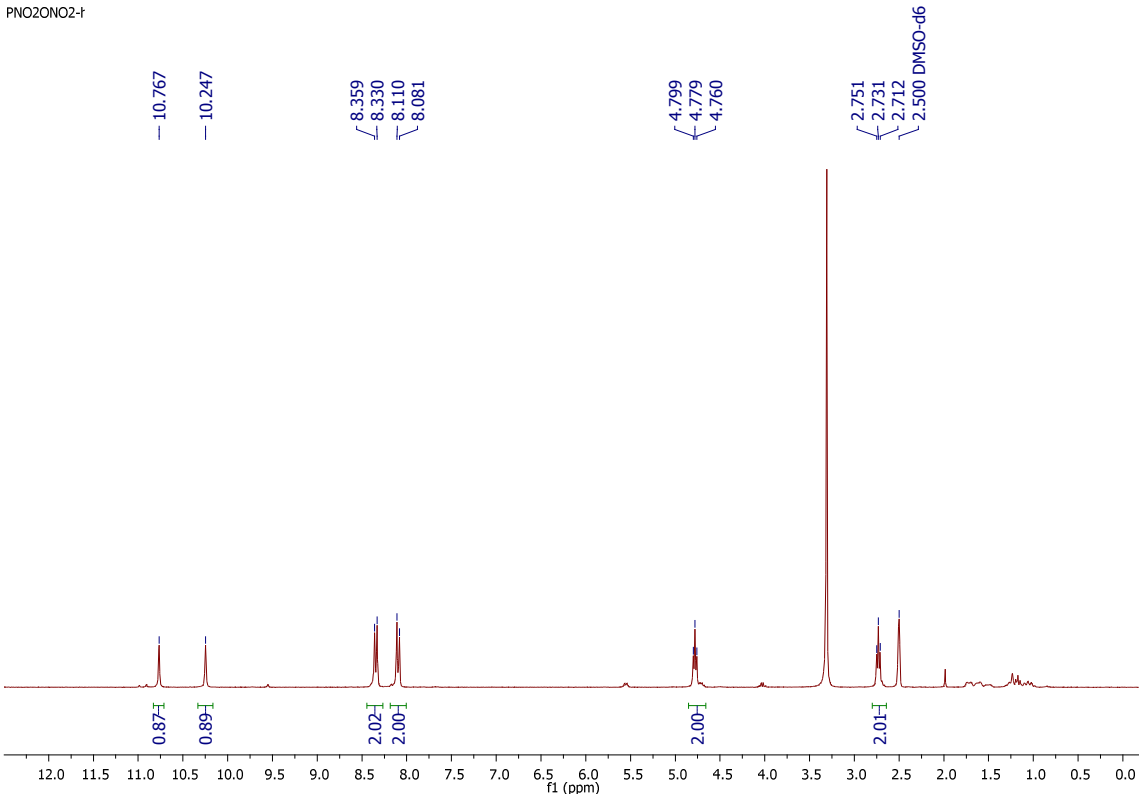
Composto **35**

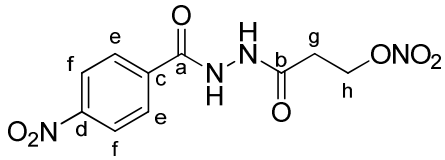
3-(2-(4-nitrobenzoil)hidrazinil)-3-oxopropil nitrato

Sólido de coloração branca (p.f.: 151-153 ºC). 54% de rendimento.

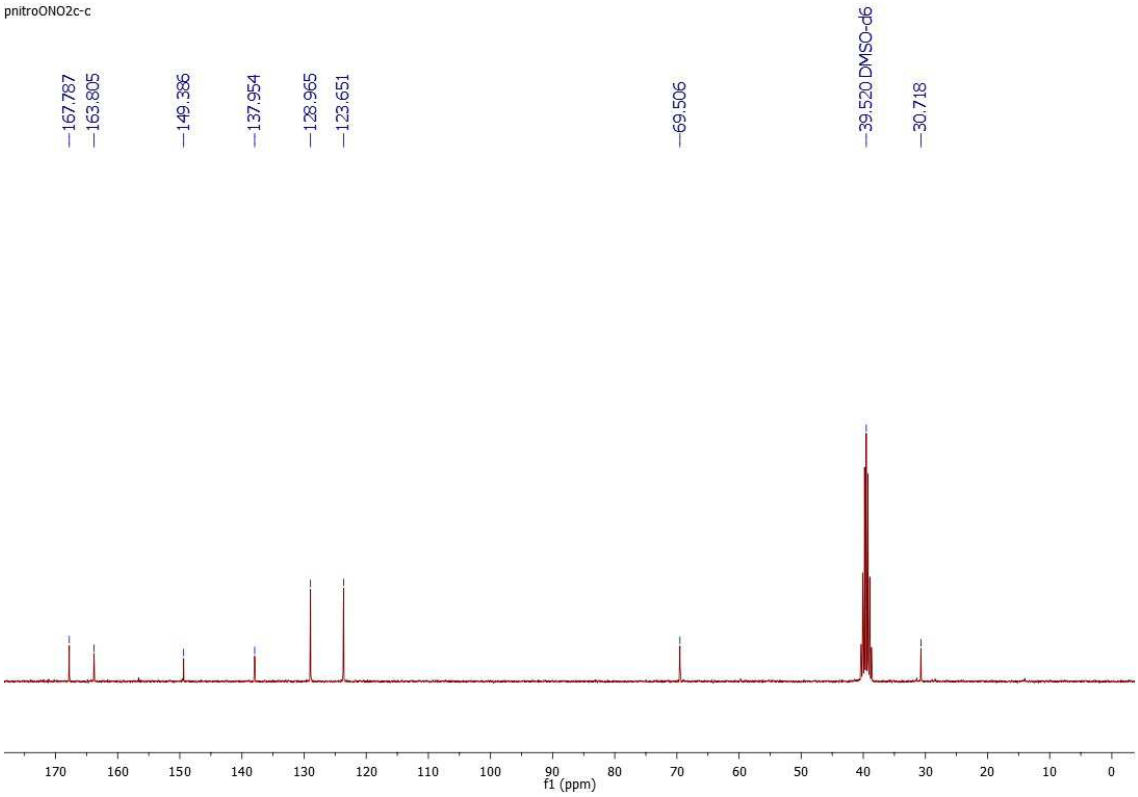


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 10,76 (s, 1H-a); 10,24 (s, 1H-b); 8,34 (d, 2H-c, J=8,7 Hz); 8,10 (d, 2H-d, J=8,7 Hz); 4,77 (t, 2H-e, J=5,7 Hz); 2,73 (t, 2H-f, J=5,7 Hz).



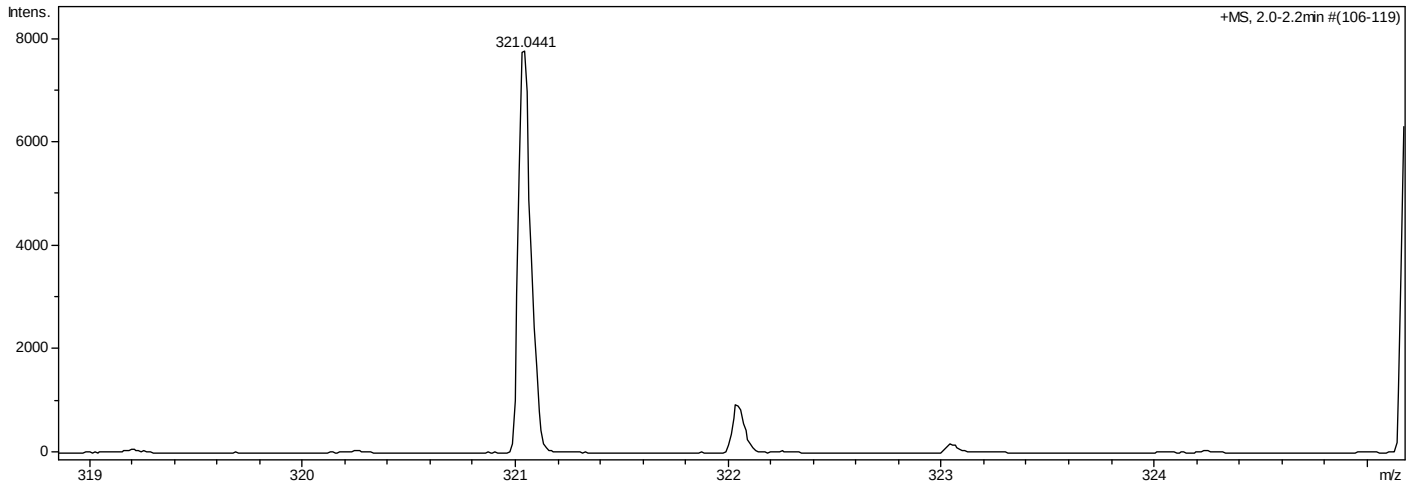


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 167,7-a; 163,8-b; 149,3-c; 137,9-d; 128,9-e; 123,6-f; 69,5-g; 30,7-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H10N4O7 [M + Na^+]: 321,0549.

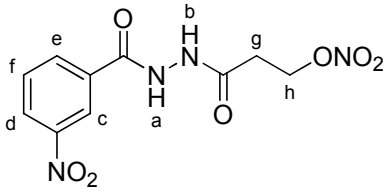
Encontrado: 321,0441.



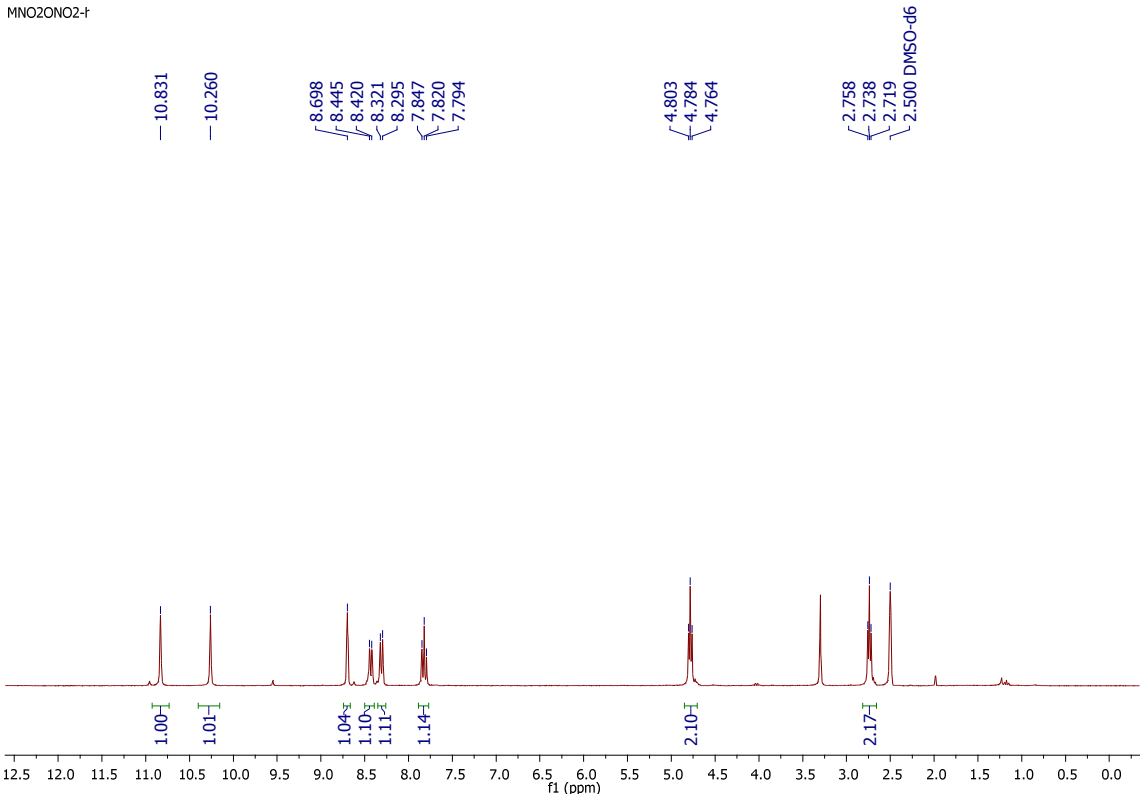
Composto **36**

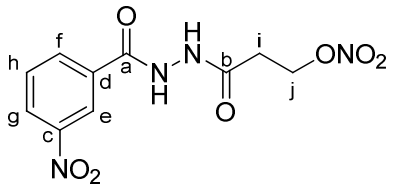
3-(2-(3-nitrobenzoil)hidrazinil)-3-oxopropil nitrato

Sólido de coloração amarelo pálido (p.f.: 134-136 ºC). 33% de rendimento.

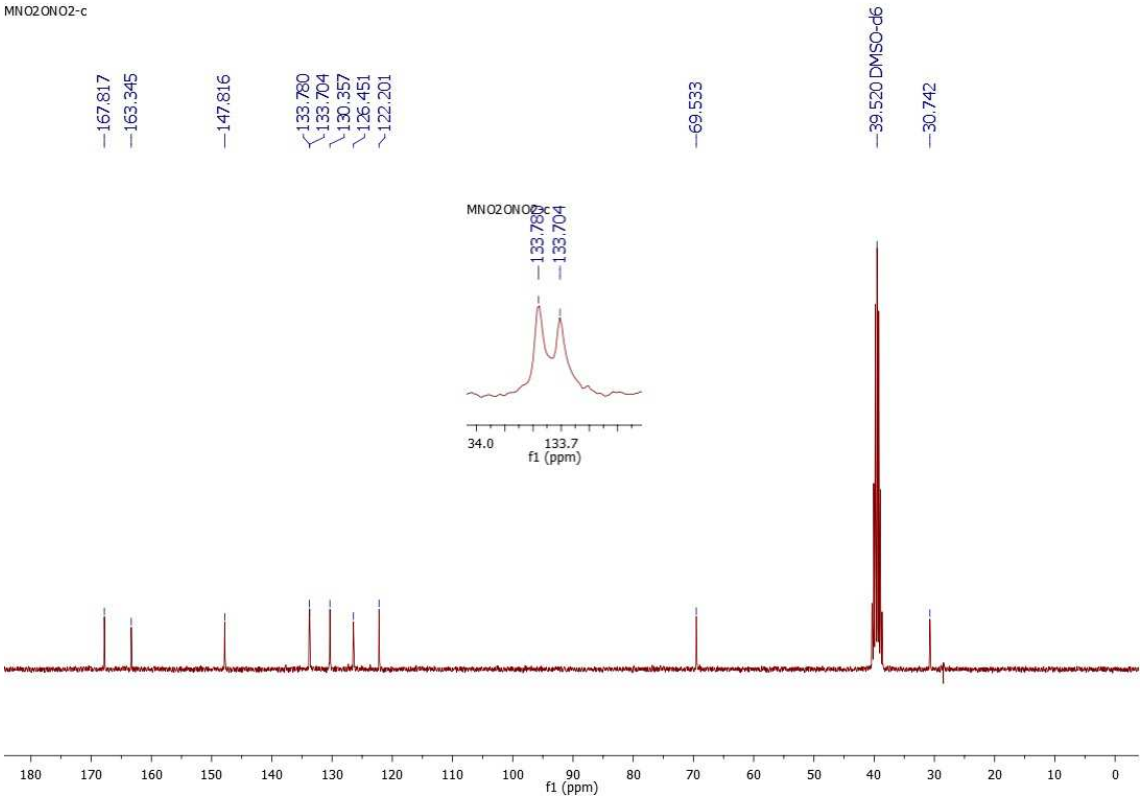


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-$D_{6,}$ δ = ppm): 10,83 (s, 1H-a); 10,26 (s, 1H-b); 8,69 (s, 1H-c); 8,43 (d, 1H-d, J=7,5); 8,31 (d, 1H-e, J=7,5 Hz); 7,82 (t, 1H-f, 7,5 Hz); 4,78 (t, 2H-g, J=6 Hz); 2,73 (t, 2H-h, J=6 Hz).



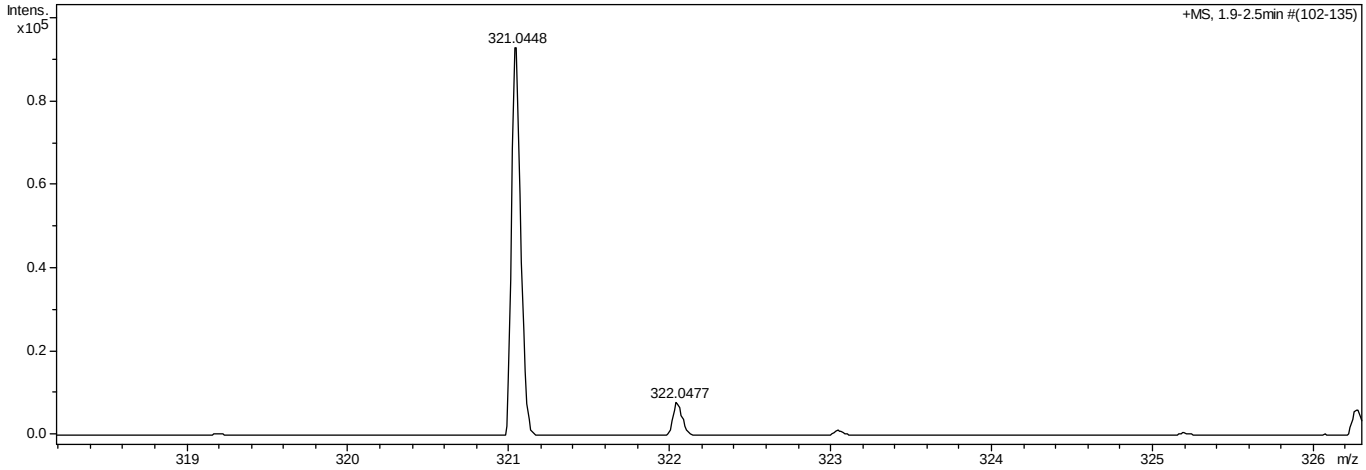


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 167,8-a; 163,3-b; 147,8-c; 133,7-d; 133,7-e; 130,3-f; 126,4-g; 122,2-h; 69,5-i; 30,7-j.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H10N4O7 [M + Na^+]: 321,0549.

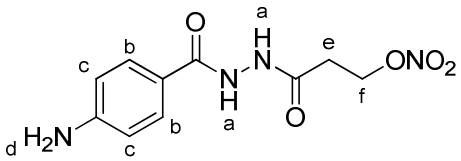
Encontrado: 321,0448.



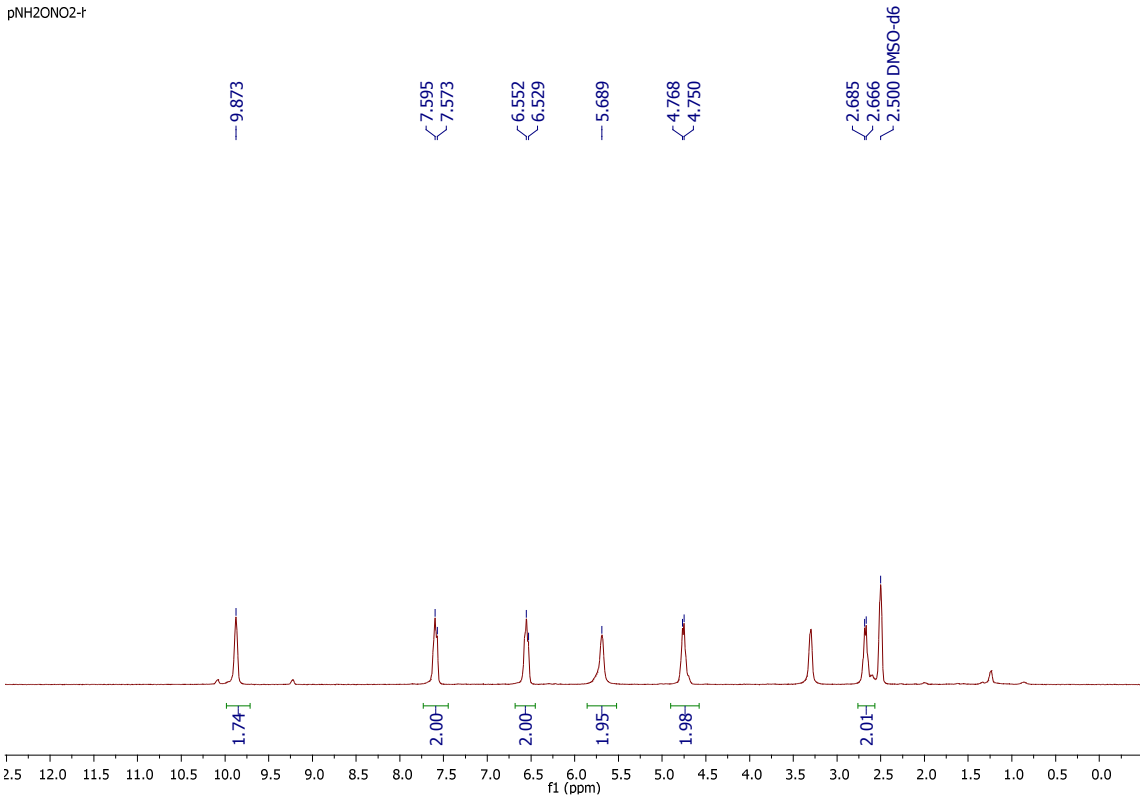
Composto **37**

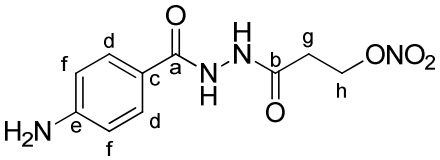
3-(2-(4-aminobenzoil)hidrazinil)-3-oxopropil nitrato

Sólido de coloração laranja (p.f.: 125-127 ºC). 27% de rendimento.

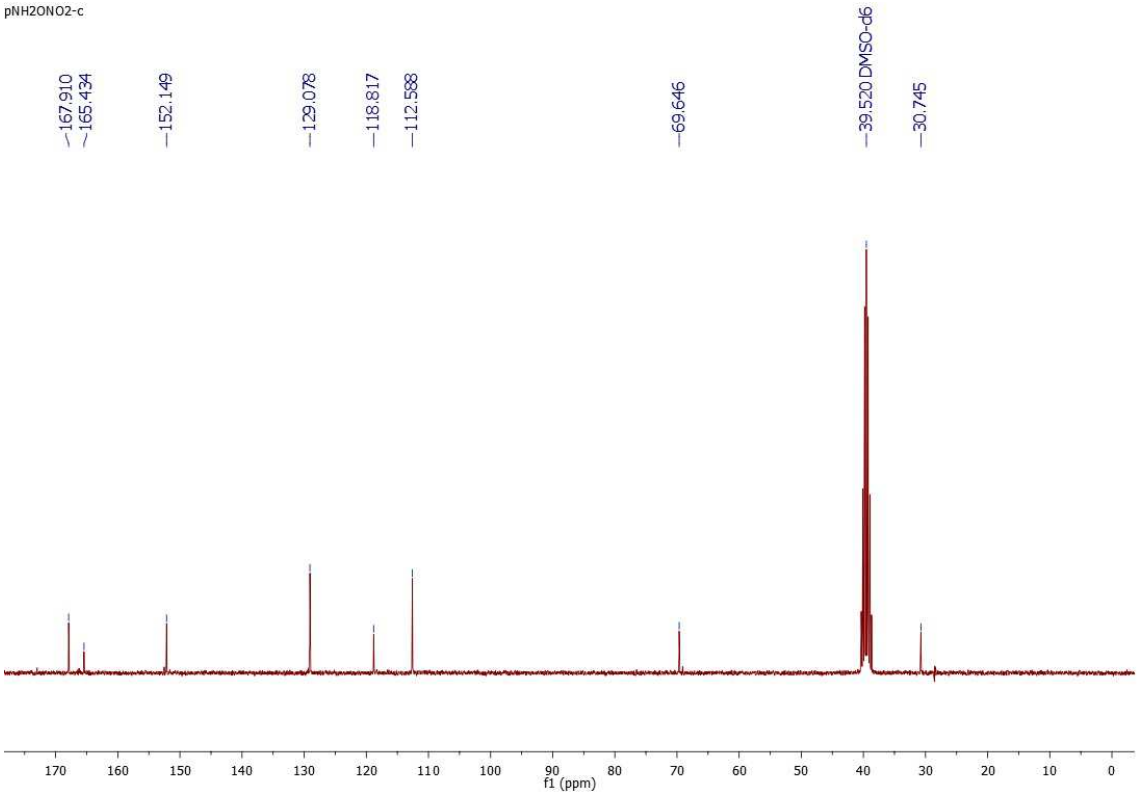


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 9,87 (s, 2H-a); 7,58 (d, 2H-b, J=6,6 Hz); 6,56 (d, 2H-c, J=6,6 Hz); 5,68 (s, 2H-d); 4,76 (d, 2H-e, J=5,4 Hz); 2,67 (d, 2H-f, 5,4 Hz).



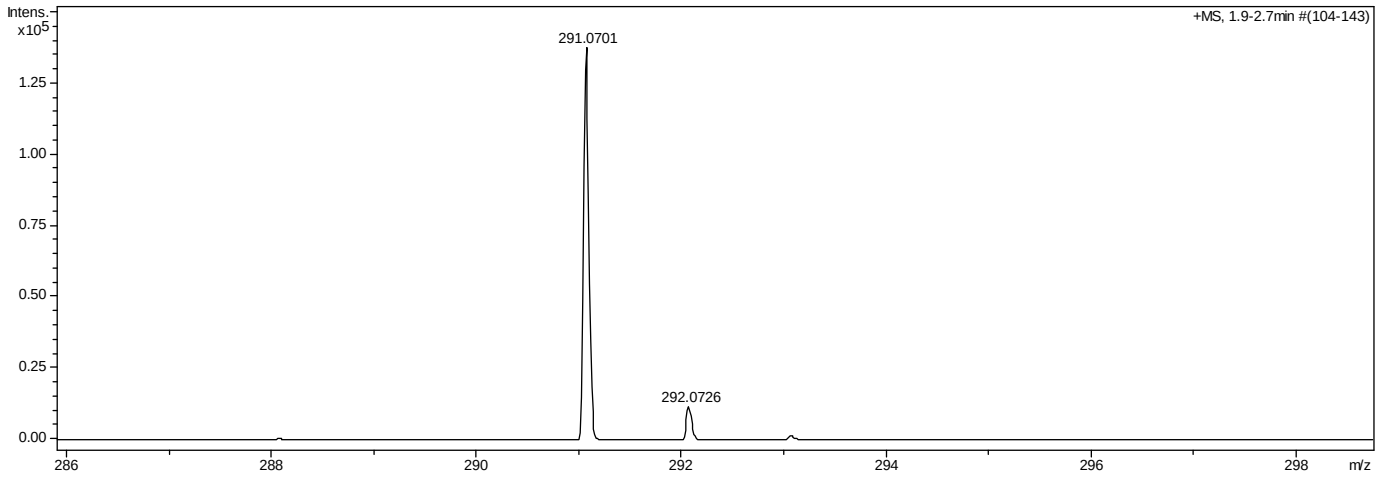


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 167,9-a; 165,4-b; 152,1-c; 129,0-d; 118,8-e; 112,5-f; 69,6-g; 30,7-h.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H10N4O7 [M + Na^+]: 291,0808.

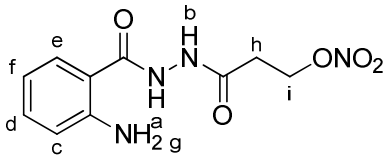
Encontrado: 291,0701.



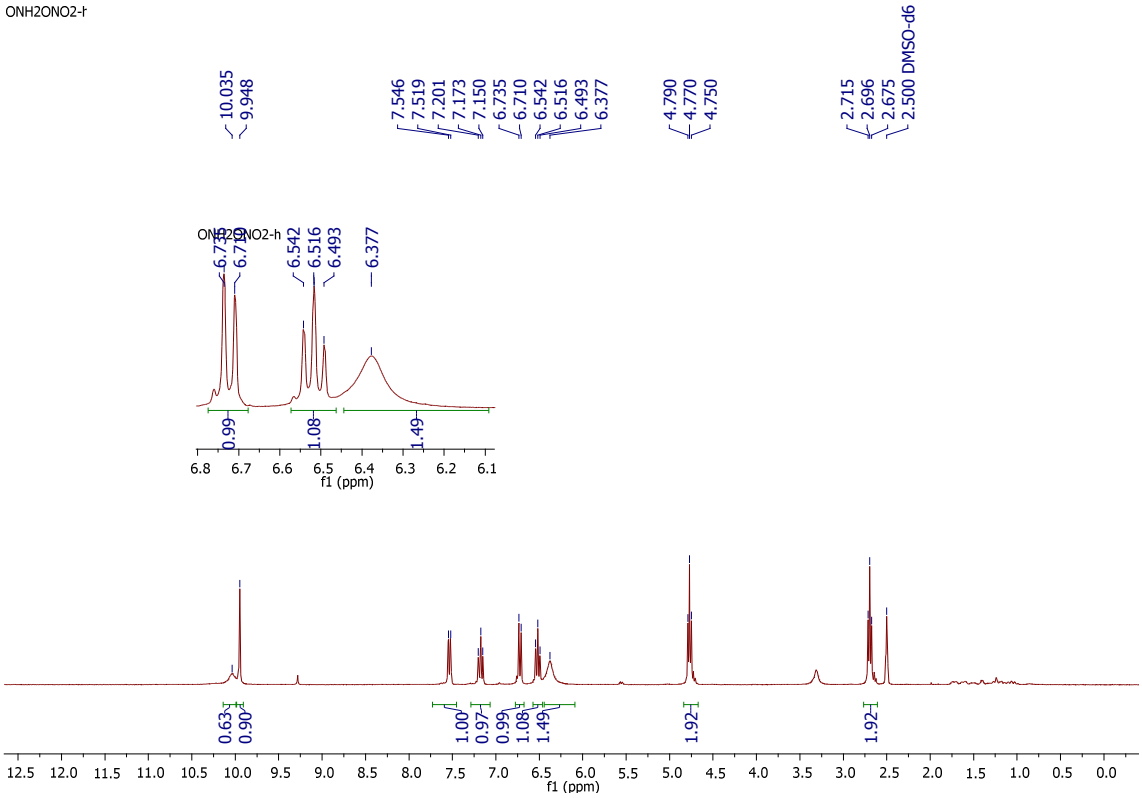
Composto **38**

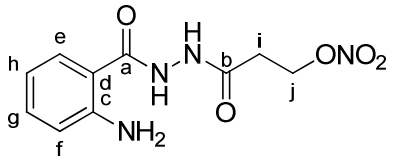
3-(2-(2-aminobenzoil)hidrazinil)-3-oxopropil nitrato

Sólido de coloração laranja pálido (p.f.: 120-122 ºC). 55% de rendimento.

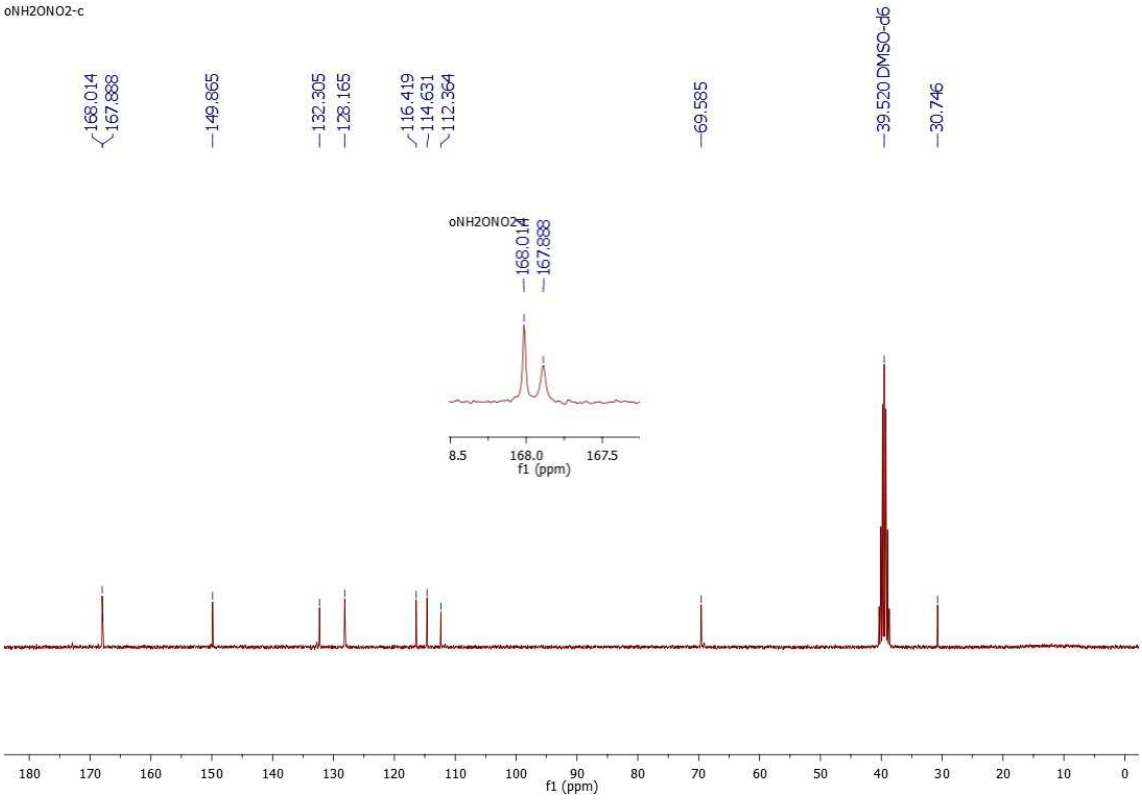


RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 10,03 (s, 1H-a); 9,94 (s, 1H-b); 7,53 (d, 1H-c, J=8,1 Hz); 7,17 (t, 1H-d, J=8,1 Hz); 6,72 (d, 1H-e, J=7,5); 6,51 (t, 1H-f, J=7,5); 6,37 (s, 2H-g); 4,77 (t, 2H-h, J=6 Hz); 2,69 (t, 2H-i, J= 6 Hz).



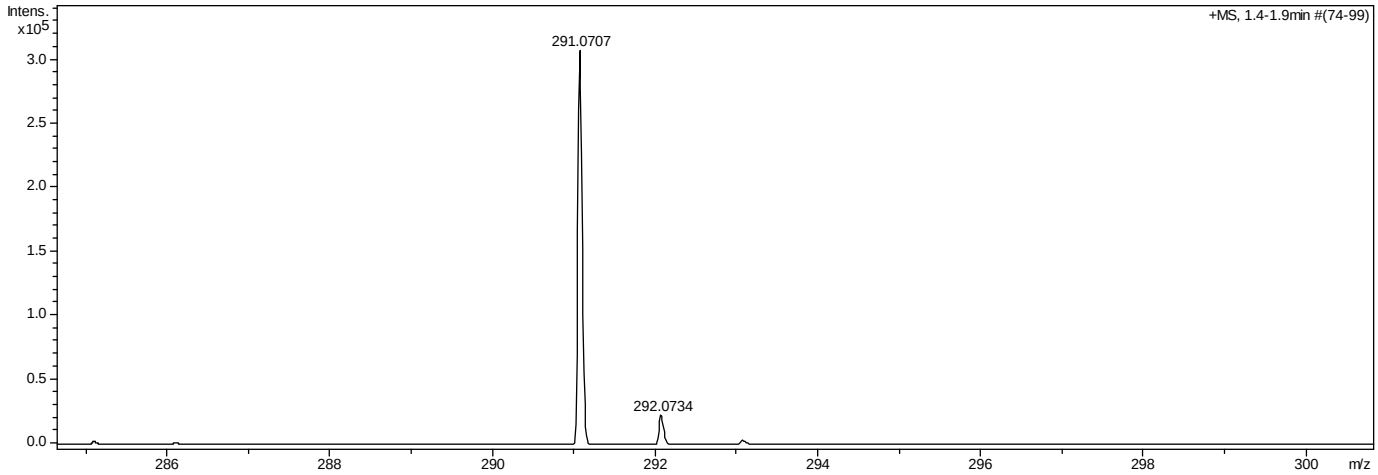


RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6, δ = ppm): 168,0-a; 167,8-b; 149,8-c; 132,3-d; 128,1-e; 116,4-f; 114,6-g; 112,3-h; 69,5-i; 30,7-j.



Espectro de massas de alta resolução: (ESI+ TOF-MS) calculado para C10H10N4O7 [M + Na^+]: 291,0808.

Encontrado: 291,0707.



ANEXO II

Propriedades moleculares e/ou descritores calculados (Capítulo 2)

Tabela AII.1: Propriedades moleculares e/ou descritores calculados da série dos derivados de grupos *N*-acilidrazona e furoxano

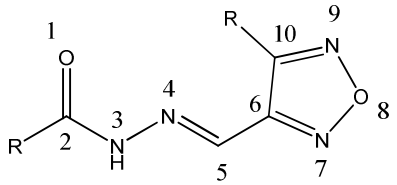
Descritores	Natureza do descritor	Método/Programa
Contribuição da energia de estiramento intramolecular ($E_{STRETCH}$)	Termodinâmico	
Contribuição da energia de flexão intramolecular (E_{BEND})	Termodinâmico	
Contribuição da energia torsional intramolecular (E_{TORS})	Termodinâmico	Simulação de dinâmica molecular
Contribuição da energia de Lennard-Jones ($E_{1,4}$)	Termodinâmico	
Contribuição da energia de van der Waals intramolecular (E_{vdW})	Termodinâmico	MOLSIM 3.2
Contribuição de energia eletrostática intramolecular (E_{CHARGE})	Termodinâmico	
Contribuição da energia de ligação de hidrogênio intramolecular (E_{Hb})	Termodinâmico	
Contribuição de energia de solvatação intramolecular (E_{SOLV})	Termodinâmico	
Energia potencial total (Soma de todas as contribuições de E) (E_{TOT})	Termodinâmico	
Área da superfície de van der Waals - aprox. (S.A.1)	Estérico/Geométrico	
Superfície de acessibilidade ao solvente - aprox. – 1.4 Å para molécula de água – (S.A.2)	Estérico/Geométrico	
Área da superfície de Van der Waals – *grid* - 50 pontos no cubo (S.A.3)	Estérico/Geométrico	
Superfície de acessibilidade ao solvente – 1.4 Å para molécula de água e 50 pontos no cubo (S.A.4)	Estérico/Geométrico	
Volume – 50 pontos no cubo (Volume 1)	Estérico/Intrínseco	Método semiempírico
Volume – 1.4 Å para molécula de água e 50 pontos no cubo (Volume 2)	Estérico/Intrínseco	AM1 HyperChem 7.0
Energia de hidratação – 1.4 Å para molécula de água	Estérico/Intrínseco	para Windows
Coeficiente de partição - água/*n*-octanol (LogP1)	Hidrofóbico	
Refratividade molar (Refractivity)	Estérico/Hidrofóbico	
Polarizabilidade	Estérico/Eletrônico	
Ângulo diedro (Dihedral 1)	Geométrico	
Ângulo diedro (Dihedral 2)	Geométrico	
Ângulo diedro (Dihedral 3)	Geométrico	
Distância interatômica	Geométrico	

Tabela AII.1: (Cont.) Propriedades moleculares e/ou descritores calculados da série dos derivados de grupos *N*-acilidrazona e furoxano

Descritores	Natureza do descritor	Método/Programa
Constante de dissociação ácida (pKa)	Intrínseco	
Coeficiente de partição-água/*n*-octanol – pH 7.2 (LogD1)	Hidrofóbico	
Coeficiente de partição-água/*n*-octanol – pH 1.5 (LogD2)	Hidrofóbico	
Coeficiente de partição - água/*n*-octanol – pH 5 (LogD3)	Hidrofóbico	
Coeficiente de partição-água/*n*-octanol – pH 6.5 (LogD4)	Hidrofóbico	
Soma dos graus de arestas do gráfico molecular(Platt idex)	Topológico	
Soma harmônica das médias geométricas dos graus de nó de cada aresta (Randic index)	Topológico	
Soma realizada de todas as ligações na ausência de H (Balaban index)	Topológico	
Soma das médias dos elementos fora da diagonal da recíproca molecular da matriz da molécula (Harary index)	Topológico	
Cálculos da índice de hyper wiener da molécula (Hyper Wiener index)	Topológico	
Cálculos do índice de Szeged da molécula (Szeged index)	Topológico	Marvin 4.1.8
Média da distância topológica dos átomos – metade da soma de todas as distâncias dos átomos na molécula (Wiener index)	Topológico	
Cálculo do número do comprimento da distância entre 3 ligações na molécula (Wiener polarity)	Topológico	
Área de superfície polar (PSA)	Estérico/Geométrico	
Superfície molecular de van der Waals calculada (MSA)	Estérico/Geométrico	
Área de acessibilidade ao solvente calculada – usando o raio do solvent de 1.4 Å ara molécula de água (ASA)	Estérico/Geométrico	
Área de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial positiva (ASA+)	Estérico/Geométrico	
Área de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa (ASA-)	Estérico/Geométrico	
Área de acessibilidade ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos (ASA_H)	Estérico/Geométrico	
Área de acessibilidade ao solvente de todos os átomos polares (ASA_P)	Estérico/Geométrico	
Coeficiente de partição - água/*n*-octanol (LogP2)	Hidrofóbico	

Tabela AII.1: (Cont.) Propriedades moleculares e/ou descritores calculados da série dos derivados de grupos *N*-acilidrazona e furoxano

Descritores	Natureza do descritor	Método/Programa
Energia do orbital molecular preenchido de maior energia (HOMO)	Eletrônico	
Energia do orbital molecular não-preenchido de menor energia (LUMO)	Eletrônico	
EnergiaHOMO-EnergiaLUMO (GAP H-L)	Eletrônico	
Carga potencial eletrostática total calculada (CHELPG TOT)	Eletrônico	
Momento dipolar do eixo x (DMX)	Eletrônico	Gaussian 03W
Momento dipolar do eixo y (DMY)	Eletrônico	(Método B3LYP/6-
Dipole moment axis z (DMZ)	Eletrônico	31G**)
Momento dipolar total (DMT)	Eletrônico	
Carga potencial calculada para o átomo 1 (Atom 1)	Eletrônico	
Carga potencial calculada para o átomo 2 (Atom 2)	Eletrônico	
Carga potencial calculada para o átomo 3 (Atom 3)	Eletrônico	
Carga potencial calculada para o átomo 4 (Atom 4)	Eletrônico	
Carga potencial calculada para o átomo 5 (Atom 5)	Eletrônico	
Carga potencial calculada para o átomo 6 (Atom 6)	Eletrônico	
Carga potencial calculada para o átomo 7 (Atom 7)	Eletrônico	
Carga potencial calculada para o átomo 8 (Atom 8)	Eletrônico	
Carga potencial calculada para o átomo 9 (Atom 9)	Eletrônico	
Carga potencial calculada para o átomo 10 (Atom 10)	Eletrônico	
Potencial de liberação de óxido nítrico (NO-releasing)	Intrínseco	



ANEXO III

Ficha da Pós-Graduação

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 6725591/2 - Ricardo Augusto Massarico Serafim

Email:	ricardoserafim@usp.br
Data de Nascimento:	04/02/1987
Cédula de Identidade:	RG - 44.665.229-5 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Católica de Santos - São Paulo - Brasil - 2009
Mestrado:	Mestre em Ciências - Área: Insumos Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2011

Curso:	Doutorado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula:	16/02/2012
Início da Contagem de Prazo:	16/02/2012
Data Limite para o Depósito:	16/02/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 16/02/2012 até o presente. Email: hajudan@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 16/02/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 18/11/2013
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 16/02/2012

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 04/02/2016

Impresso em: 12/02/2016 14:47:50

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 6725591/2 - Ricardo Augusto Massarico Serafim

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5808-1/2	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos (Planejamento de Fármacos: As Bases para o Desenvolvimento de Candidatos a Anti-neoplásicos)	02/07/2012	08/07/2012	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5102-3/4	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2013	23/04/2013	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
QFL5933-8/1	Fundamentos da Química Orgânica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	18/03/2013	01/07/2013	150	10	100	B	N	Concluída
ENC5883-3/4	Prática Pedagógica no Ensino Superior (Escola de Enfermagem - Universidade de São Paulo)	12/08/2013	11/11/2013	90	6	80	A	N	Concluída
FBF5794-2/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	11/09/2013	19/11/2013	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	20
Estágios:			
Total:	0	20	20

Créditos Atribuidos à Tese: 167

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 04/02/2016

Impresso em: 12/02/2016 14:47:50

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 6725591/2 - Ricardo Augusto Massarico Serafim

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
43287	Elizabeth Igne Ferreira	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2016
Impresso em: 12/02/2016 14:47:50

ANEXO IV

Currículo Lattes

Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Inovação Eventos Orientações Bancas +

Ricardo Augusto Massarico Serafim

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/3759511385945393

Última atualização do currículo em 01/02/2016

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Católica de Santos - UNISANTOS (2008) e mestrado em Fármaco e Medicamentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - FCF/USP (2011). Atualmente é Professor das disciplinas de Planejamento de Fármacos e Química Farmacêutica no curso de Farmácia da Faculdades Oswaldo Cruz (desde 2011) e doutorando em Fármaco e Medicamentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - FCF/USP (a partir de 2012). Realizou estágio sanduíche (abril 2014 - março 2015) na University of Pennsylvania (UPENN - EUA). Atua nos seguintes temas: Química Medicinal, Planejamento de Fármacos, Síntese Orgânica, Antichagásicos Potenciais, Liberadores de Óxido Nítrico, Modificações Moleculares e Modelagem Molecular. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Ricardo Augusto Massarico Serafim

Nome em citações bibliográficas

SERAFIM, R. A. M.;SERAFIM, RICARDO AUGUSTO MASSARICO

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia - Bloco 13 (Superior).
Prof. Lineu Prestes
Butantã
05315-970 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913687
URL da Homepage: www.fcf.usp.br

Formação acadêmica/titulação

2012

Doutorado em andamento em Fármaco e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
com **período sanduíche** em University of Pennsylvania (Orientador: GARY MOLANDER).
Título: ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: SÍNTESE E MODELAGEM MOLECULAR DE HÍBRIDOS DE HIDRAZONAS E LIBERADORES DE ÓXIDO NÍTRICO,
Orientador: ELIZABETH IGNE FERREIRA.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: Planejamento de Fármacos; Síntese Orgânica; Antichagásicos Potenciais; Hibridação Molecular; Liberadores de Óxido Nítrico; Modelagem Molecular.
Grande área: Ciências da Saúde

2009 - 2011

Mestrado em Fármaco e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: ESTUDOS SOBRE A SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS RECÍPROCOS DE BIOISÓSTEROS DO HIDROXIMETILNITROFURAL E DE LIBERADOR DE ÓXIDO NÍTRICO,Ano de Obtenção: 2011.
Orientador: ELIZABETH IGNE FERREIRA.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Palavras-chave: Antichagásicos Potenciais; Latenciação; Óxido Nítrico.
Grande área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Química Farmacêutica / Especialidade: Síntese Orgânica.

2005 - 2008

Graduação em Farmácia.
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Brasil.
Título: PROPOSTA DE DESENVOLVIMENTO DE UM SIMBIÓTICO COM AÇÃO VASODILATADORA.
Orientador: ANTÔNIO JOSÉ CALIXTO DE SOUZA.

Formação Complementar

2010 - 2010

Dinâmica Molecular Básica. (Carga horária: 6h).
Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Brasil.

2010 - 2010

Introd. to In-Process Particle Characterization. (Carga horária: 3h).
Mettler Toledo, METTLER TOLEDO, Brasil.

2010 - 2010

Planejamento de Candidatos a Novos Fármacos.
Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil.

2010 - 2010

New Approaches in Drug Discovery. (Carga horária: 16h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2010 - 2010

Cálculos Quânticos de Estrutura Eletrônica. (Carga horária: 6h).
Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Brasil.

2010 - 2010

V Escola de Modelagem Molecular em Sist. Biológ..
Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Brasil.

2010 - 2010

Interfaces-Química e Biologia nas áreas de PN e QM.
Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil.

2009 - 2009

Extensão universitária em I Curso de Verão de Farmacologia do ICB / USP-SP. (Carga horária: 77h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2009 - 2009

Aplicação da Met. QSAR-4D usando o prog. LQTA-QSAR. (Carga horária: 20h).
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

2008 - 2008

Biotecnologia. (Carga horária: 8h).
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Brasil.

2007 - 2007

Interações Medicamentosas.
Conselho Regional de Farmácia do Estado de São paulo, CRF-SP, Brasil.

2006 - 2006

Espectrometria por absorção atômica. (Carga horária: 6h).
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Brasil.

2006 - 2006

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). (Carga horária: 6h).
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Brasil.

2005 - 2005

Extensão universitária em Inflamação.Fisiopatologia-Terapia Multidisciplinar. (Carga horária: 32h).
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Brasil.

2005 - 2005

Curso de Fitoterapia Herbarium.
Herbarium Fitoterápicos, HERBARIUM, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - 2012

Vínculo: Estágio - Doutorado Sanduíche, Enquadramento Funcional: Aluno Especial, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

Realizou estágio sanduíche (nacional) no Laboratório de Química Orgânica Sintética (LQOS) do Instituto de Química - IQ/UNICAMP sob supervisão do Prof. Dr. Luiz Carlos Dias. Suas atividades estão vinculadas com síntese de moléculas potencialmente ativas contra T. cruzi.

Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - Atual

Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 7

Atividades

02/2013 - Atual

Ensino, Farmácia, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas
Planejamento de Fármacos

04/2011 - Atual

Ensino, Farmácia, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas
Química Farmacêutica (teoria e prática)

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - Atual

Vínculo: Pós-Graduação (DOUTORADO), Enquadramento Funcional: Aluno / Pesquisador, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

Realiza suas atividades no Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos contra Endemias Tropicais (LAPEN) - Departamento de Farmácia - FCF / USP

Vínculo institucional

2015 - 2015

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Monitor de Química Farmacêutica, Carga horária: 6

Outras informações

Monitor de Química Farmacêutica (disciplina Integrado I) no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF/USP.

Vínculo institucional

2009 - 2011

Vínculo: Pós-Graduando (MESTRADO), Enquadramento Funcional: Aluno / Pesquisador, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

Realiza suas atividades no Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos contra Endemias Tropicais (LAPEN) - Departamento de Farmácia - FCF / USP

Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Brasil.

Vínculo institucional

2007 - 2008

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Monitor da Disciplina de Química Farmacêutica, Carga horária: 6

Instituto de Pesquisas Científicas - UNISANTOS, IPECI, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2008

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário / Pesquisador, Carga horária: 20

Outras informações

Iniciação Científica

University of Pennsylvania, UPENN, Estados Unidos.

Vínculo institucional

2014 - 2015

Vínculo: Doutorado Sanduíche, Enquadramento Funcional: Estágio, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

Realizou estágio sanduíche (exterior) onde trabalhou no desenvolvimento e síntese de aminometiltrifluorboratos derivados de aminoácidos e condições para a sua utilização em reações de acoplamento cruzado utilizando uma variedade de haletos de arila e heteroarila, sob orientação do Prof. Gary Molander

Projetos de pesquisa

2012 - Atual

Antichagásicos potenciais: síntese e modelagem molecular de híbridos de N-acilidrazonas e liberadores de óxido nítrico

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Doutorado: (1) .

Integrantes: Ricardo Augusto Massarico Serafim - Coordenador / Elizabeth Igne Ferreira - Integrante.

2011 - Atual

Design and Synthesis of chemotherapeutic agents potentially active in Chagas' disease

Projeto certificado pelo(a) coordenador(a) Elizabeth Igne Ferreira em 13/09/2012.

Descrição: Tese de doutorado inserida neste projeto: O projeto faz parte do Programa Trust in Science, da GlaxoSmithKline, e dedica-se à identificação de candidatos a fármacos antichagásicos, partindo-se de derivados de síntese e selecionados por triagem virtual. Compreende ensaios in vitro em tripomastigotas e amastigotas de T. cruzi; ensaios de inibição na cruzaína; determinação da cinética de inibição enzimática dos compostos ensaiados, com vistas à compreensão do respectivo mecanismo de ação; triagem virtual de novas coleções de compostos; ensaios de permeabilidade e de biotransformação. Ademais, compreende o scale up da produção da enzima recombinante e dos compostos mais promissores..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Ricardo Augusto Massarico Serafim - Integrante / Elizabeth Igne Ferreira - Coordenador / Leoberto Costa Tavares - Integrante / Carlota O. Rangel-Yagui - Integrante / Adriano D. Andricopulo - Integrante / Gustavo Henrique Goulart Trossini - Integrante / Antônia Tavares do Amaral - Integrante / Silvia Storpitis - Integrante / Ana Paula de Melo Loureiro - Integrante.
Financiador(es): GLAXOSMITHKLINE - Auxílio financeiro.

2009 - 2011

Antichagásicos Potenciais: Estudos Sobre a Síntese de Pró-Fármacos Recíprocos de Bioisósteros do Hidroximetilnitrofural e de Liberador de Óxido Nítrico

Descrição: Projeto vinculado com o temático FAPESP - Antichagásicos potenciais derivados de compostos nitro-heterocíclicos (Processo: 01/01192-3; Coordenadora: Elizabeth Igne Ferreira)..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Ricardo Augusto Massarico Serafim - Integrante / Elizabeth Igne Ferreira - Coordenador.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa.

2007 - 2008

Avaliação do Teor de Urânio em Amostras de Sedimentos da Região Estuarina de Santos e São Vicente - SP

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Ricardo Augusto Massarico Serafim - Integrante / Luiz Paulo Geraldo - Coordenador.
Financiador(es): Universidade Católica de Santos - Bolsa.
Número de produções C, T & A: 2

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Química Farmacêutica.

2.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Meio Ambiente.

Idiomas

Inglês

Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

2016

Highlighted paper (category - Metal-mediated synthesis): Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 254-258, SYNFACTS - Highlights in Current Synthetic Organic Chemistry.

2009

Orador da XVII Turma de Formandos de Farmácia (matutino) da Universidade Católica de Santos - UNISANTOS, em 06 de Janeiro de 2009., UNISANTOS.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1.

EL'KHATIB, MIRNA ; **SERAFIM, RICARDO AUGUSTO MASSARICO** ; MOLANDER, GARY A. . α-Arylation/Heteroarylation of Chiral α-Aminomethyltrifluoroborates by Synergistic Iridium Photoredox/Nickel Cross-Coupling Catalysis. Angewandte Chemie (International ed. Print) JCR, v. 55, p. 254-258, 2016.

2.

SERAFIM, R. A. M.; GONCALVES, J. E. ; SOUZA, F. P. ; LOUREIRO, A. P. M. ; STORPIRTIS, S. ; KROGH, R. ; ANDRICOPULO, A. D. ; DIAS, L. C. ; FERREIRA, E. I. . Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of N-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-Trypanosoma cruzi activity. European Journal of Medicinal Chemistry JCR, v. 82, p. 418-425, 2014.

3.

SERAFIM, R. A. M.; PRIMI, M. C. ; TROSSINI, G. H. G. ; FERREIRA, E. I. . Nitric Oxide: State of the Art in Drug Design. Current Medicinal Chemistry JCR, v. 19, p. 386-405, 2012.

4.

GERALDO, L. P. ; **SERAFIM, R. A. M.** ; CORREA, B. A. M. ; YAMAZAKI, Y. M. ; PRIMI, M. C. . Uranium content and dose assessment for sediment and soil samples from the estuarine system of Santos and Sao Vicente, SP, Brazil. Radiation Protection Dosimetry JCR, v. 140, p. 96-100, 2010.

Textos em jornais de notícias/revistas

1.

SERAFIM, R. A. M.; PRIMI, M. C. . Se for natural, não faz mal?. Jornal O Debate, p. 4A - 4A, 29 jan. 2010.

2.

SERAFIM, R. A. M.; VIEIRA, M. R. S. . Uso Indiscriminado de Antibióticos. Jornal O Debate, p. 5A - 5A, 28 ago. 2009.

3.

SERAFIM, R. A. M.; PRIMI, M. C. ; VIEIRA, M. R. S. . Interação entre Medicamentos e Nutrientes. Jornal O Tempo, p. 4 - 4, 01 maio 2009.

4.

SERAFIM, R. A. M.. Os perigos inerentes à automedicação. Jornal O Debate, p. 5 - 5, 26 maio 2006.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1.

SERAFIM, R. A. M.; CORREA, B. A. M. ; YAMAZAKI, Y. M. ; PRIMI, M. C. ; GERALDO, L. P. . Investigation of the uranium content in sediment and soil samples from the Santos and São Vicente estuary region, SP. In: International Nuclear Atlantic Conference (INAC), 2009, Rio de Janeiro. Book of Abstracts, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

1.

SEGRETTI, N. D. ; **SERAFIM, R. A. M.** ; MIYATA, M. ; FRANZBLAU, S. G. ; FERREIRA, E. I. . Design, synthesis and biological assay of bioisoster derivatives of sulfonylhydrazone and furoxan as potential FabH inhibitors. In: IV Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases, 2015, São Paulo. Book of abstracts IV Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases, 2015.

2.

SERAFIM, R. A. M.; PASQUALOTO, K. F. M. ; FERREIRA, E. I. . Molecular dynamics simulations of a set of 1,2-dihydro-4-quinazolinamine derivatives as potential i-NOS inhibitors. In: II International Symposium on Drug Discovery, 2011, Araraquara. Book of abstracts, 2011.

3.

SERAFIM, R. A. M.; TROSSINI, G. H. G. ; FERREIRA, E. I. . Avaliação teórica de inibição da cruzaína de T. cruzi por pró-fármacos do NFOH e seus bioisósteros contendo liberadores de óxido nítrico. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - RASBQ, 2010, Águas de Lindóia - SP. Livro de Resumos da 33ª RASBQ, 2010.

4.

SERAFIM, R. A. M.; TROSSINI, G. H. G. ; FERREIRA, E. I. . Avaliação teórica de pró-fármacos recíprocos do NFOH e seus bioisósteros contendo liberadores de óxido nítrico com potencial atividade antichagásica. In: V Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, 2010, Petrópolis. V EMMSB, 2010.

5.

SERAFIM, R. A. M.; MACHADO, F. C. ; FERREIRA, F. A. S. ; SOUZA, A. J. C. . Design and synthesis of mutual prodrug of valsartan and nitric oxide donor with potential vasodilator activity. In: XVI Congresso Paulista de Farmacêuticos, 2010, São Paulo. Livro de Resumos, 2010.

6.

SERAFIM, R. A. M.; TROSSINI, G. H. G. ; FERREIRA, E. I. . Theoretical evaluation of Trypanosoma cruzi cruzain inhibition of NFOH prodrugs and their bioisosters containing nitric oxide releasing groups. In: XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - FCF/USP, 2010, São Paulo. Livro de Resumos, 2010.

7.

SERAFIM, R. A. M.; BIGATAO, H. M. ; TROSSINI, G. H. G. ; FERREIRA, E. I. . Comparision between traditional and solvent-free synthesis of nitrofurazone and its bioisosters with antichagasic activity. In: 5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry - BrazMedChem, 2010, Ouro Preto -MG. Book of Abstracts, 2010.

8.

SERAFIM, R. A. M.; CORREA, B. A. M. ; PRIMI, M. C. ; GERALDO, L. P. . Investigação do Teor de Urânio em Amostras de Sedimentos e Solos da Região do Estuário de Santos de São Vicente - SP. In: IV Simpósio Internacional de Meio Ambiente, 2009, Rio de Janeiro. Livro de Resumos do IV Simpósio Internacional de Meio Ambiente, 2009. p. 261-261.

9.

SERAFIM, R. A. M.; TROSSINI, G. H. G. ; FERREIRA, E. I. . Design and molecular modeling study of the mutual prodrugs of NFOH and its bioisoster and nitric oxide releasing whit potencial antichagasic activity. In: XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - FCF/USP, 2009, São Paulo. Livro de Resumos, 2009.

10.

SERAFIM, R. A. M.; GERALDO, L. P. . Investigação do Teor de Urânio em Sedimentos da Região do Estuário de Santos e São Vicente - SP. In: III Jornada de Iniciação Científica da UNISANTOS, 2008, Santos. Livro de Resumos da III Jornada de Iniciação Científica da UNISANTOS, 2008.

11.

SERAFIM, R. A. M.; GERALDO, L. P. . Avaliação do Teor de Urânio em Amostras de Sedimentos da Região Estuarina de Santos e São Vicente - SP. In: II Jornada de Iniciação Científica da UNISANTOS, 2007, Santos. Anais da II Jornada de Iniciação Científica da UNISANTOS, 2007.

Apresentações de Trabalho

1.

SERAFIM, R. A. M.; GERALDO, L. P. . Avaliação do Teor de Urânio em Amostras de Sedimentos e Solos da Região Estuarina de Santos e São Vicente -SP. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).

2.

SOUZA, A. J. C. ; FERREIRA, F. A. S. ; MACHADO, F. C. ; **SERAFIM, R. A. M.** . Proposta de Desenvolvimento de um Simbiótico com Ação Vasodilatadora. 2008. (Apresentação de Trabalho/Outra).

3.

SERAFIM, R. A. M.; GERALDO, L. P. . Investigação do Teor de Urânio em Sedimentos da Região do Estuário de Santos e São Vicente - SP. 2008. (Apresentação de Trabalho/Outra).

4.

SERAFIM, R. A. M.; GERALDO, L. P. . Avaliação do Teor de Urânio em Amostras de Sedimentos da Região Estuarina de Santos e São Vicente - SP. 2007. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Demais tipos de produção técnica

1.

SERAFIM, R. A. M.. Modelagem Molecular Aplicada ao Desenvolvimento e Planejamento de Fármacos e Medicamentos. 2015. (Aula ministrada (c.h.: 9h) - Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" do ICTQ em Campinas).

2.

SERAFIM, R. A. M.. Modelagem Molecular no Planejamento Racional de Novos Fármacos. 2015. (Palestra ministrada (XVIII JOFARMA - Universidade São Judas Tadeu).

3.

SERAFIM, R. A. M.. O Fantástico Mundo da Química Medicinal. 2015. (Seminário do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas - IPECI/UNISANTOS).

4.

SERAFIM, R. A. M.. Modelagem Molecular Aplicada ao Planejamento de Fármacos e Medicamentos. 2013. (Aula ministrada (c.h.: 9h) - Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" do ICTQ em São Paulo).

5.

SERAFIM, R. A. M.. Modelagem Molecular Aplicada ao Planejamento de Fármacos e Medicamentos. 2013. (Aula ministrada (c.h.: 9h) - Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" do ICTQ em Campinas).

6.

SERAFIM, R. A. M.. Planejamento de Fármacos para Doença de Chagas. 2013. (Palestra Ministrada (II Simpósio de Ciências Farmacêuticas do Centro Universitário São Camilo)).

7.

SERAFIM, R. A. M.; PRIMI, M. C. . Profissional Farmacêutico - Perspectivas da Profissão. 2012. (Palestra ministrada: Curso de Farmácia - UNISANTOS).

8.

SERAFIM, R. A. M.. Modelagem Molecular no Planejamento Racional de Fármacos. 2010. (Palestra ministrada - IV Jornada Científica da Saúde (UNISANTOS)).

Demais trabalhos

1.

SERAFIM, R. A. M.. Projeto Verão UNISANTOS 2006. 2006 (Projeto comunitário) .

2.

SERAFIM, R. A. M.. Dia da Cidadania - NECOM / UNISANTOS. 2006 (Projeto comunitário) .

3.

SERAFIM, R. A. M.. Dia da Criança - NECOM / UNISANTOS. 2005 (Projeto comunitário) .

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1.

GIAROLLA, J.; SEGRETTI, N. D.; PARISE FILHO, R.; **SERAFIM, R. A. M.**. Participação em banca de Eugen Mendes Nesadal de Souza.Candidatos a novos agentes antitumorais: síntese de análogos capsaicinóides. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade de São Paulo.

2.

JACOBO, R. P.; **SERAFIM, R. A. M.**. Participação em banca de M. L. A. C. Bordon; P. Gasparetto; A. M. Kim; L. N. Batista.Efeito dos inibidores de fosfolipase A2 citosólica, secretória e cálcio independentes sobre o desenvolvimento da infecção causada por Leishmania (Leishmania) amazonensis (IN VITRO). 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Faculdades Oswaldo Cruz.

3.

SOUZA, A. J. C.; CIRINO, F. S.; **SERAFIM, R. A. M.**. Participação em banca de Gabriel P. Garcia; Larissa S. Nardes; Natanael D. Segretti.Proposta de desenvolvimento de um pró-fármaco com ação anti-hipertensiva e antilipêmica. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Católica de Santos.

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1.

SERAFIM, R. A. M.. "Espaço Científico" - Semana Farmacêutica. 2012. Faculdades Oswaldo Cruz.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

IV Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases e. 2015. (Simpósio).

2.

XIII National Meeting of Medicinal Chemistry Professors.Design, synthesis and biological assay of bioisoster derivatives of sulfonylhydrazone and furoxan as potential FabH inhibitors. 2015. (Encontro).

3.

III International Symposium on Drug Discovery. 2013. (Simpósio).

4.

Simpósio de Dendrímeros: importância no contexto da nanotecnologia. 2012. (Simpósio).

5.

III Brazil-Spain Workshop on Organic Chemistry. 2012. (Outra).

6.

II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas. 2011. (Simpósio).

7.

II International Symposium on Drug Discovery.Molecular dynamics simulations of a set of 1,2-dihydro-4-quinazolinamine derivatives as potential i-NOS inhibitors. 2011. (Simpósio).

8.

3° Simpósio "Molecular Simulation" - IQ/USP. 2011. (Simpósio).

9.

Programa de Seminários da Comissão de Pesquisa (FCF/USP) - Palestra: Irradiação de micro-ondas em sínteses orgânicas. 2011. (Outra).

10.

Programa de Seminários da Comissão de Pesquisa (FCF/USP) - Palestra: Produtos Naturais como Protótipos para Agonistas Nicotínicos. 2011. (Outra).

11.

Programa de Seminários da Comissão de Pesquisa (FCF/USP) - Palestra: New Methods for Organic Synthesis Using Zinc and Palladium. 2011. (Outra).

12.

XVI Congresso Paulista de Farmacêuticos. Design and synthesis of mutual prodrug of valsartan and nitric oxide donor with potential vasodilator activity. 2010. (Congresso).

13.

XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB) - FCF/USP.Theoretical evaluation of Trypanosoma cruzi cruzain inhibition of NFOH prodrugs and their bioisosters containing nitric oxide releasing groups. 2010. (Simpósio).

14.

5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry - BrazMedChem.Comparision between traditional and solvent-free synthesis of nitrofurazone and its bioisosters with antichagasic activity. 2010. (Simpósio).

15.

33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - RASBQ.Avaliação teórica de inibição da cruzaína de T. cruzi por pró-fármacos do NFOH e seus bioisósteros contendo liberadores de óxido nítrico. 2010. (Outra).

16.

Simpósio Internacional Comemorativo do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas. 2009. (Simpósio).

17.

I Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas - USP e as Redes Temáticas. 2009. (Simpósio).

18.

V Encontro de Trabalhos Científicos - UNISANTOS.Proposta de Desenvolvimento de um Simbiótico com Ação Vasodilatadora. 2008. (Encontro).

19.

III Jornada de Iniciação Científica - UNISANTOS.Investigação do Teor de Urânio em Sedimentos da Região do Estuário de Santos e São Vicente - SP. 2008. (Outra).

20.

II Jornada Científica da Saúde - UNISANTOS. 2008. (Outra).

21.

XV Congresso Paulista de Farmacêuticos. 2007. (Congresso).

22.

VII Seminário Internacional de Farmacêuticos. 2007. (Seminário).

23.

II Encontro de Estudos Ambientais da UNISANTOS.Avaliação do Teor de Urânio em Sedimentos da Região Estuarina de Santos e São Vicente - SP. 2007. (Encontro).

24.

I Jornada Científica da Saúde - UNISANTOS. 2007. (Outra).

25.

II Jornada de Iniciação Científica da UNISANTOS.Avaliação do teor de Urânio em amostras de sedimentos da região estuarina de Santos e São Vicente - SP. 2007. (Outra).

26.

Fitohormônios e suas aplicações terapêuticas. 2007. (Outra).

27.

I Congresso Brasileiro de Engenharia de Tecidos e Estudos das Células-Tronco e Terapia Celular. 2006. (Congresso).

28.

International Symposium on Drug Discovery and IX National Meeting of Medical Chemistry Professors. 2006. (Simpósio).

29.

XII Jornada Farmacêutica da Universidade Católica de Santos. 2006. (Outra).

30.

XIV Congresso Paulista de Farmacêuticos. 2005. (Congresso).

31.

VI Seminário Internacional de Farmácia. 2005. (Seminário).

32.

Palestra de Primeiros Socorros. 2005. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1.

SERAFIM, R. A. M.. IV Symposium on Drug Design and Development for Neglected Disease. 2015. (Outro).

2.

SERAFIM, R. A. M.. XIII National Meeting of Medicinal Chemistry Professors. 2015. (Outro).

3.

SERAFIM, R. A. M.. III Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas. 2013. (Outro).

4.

FERREIRA, E. I. ; ANDRICOPULO, A. D. ; TROSSINI, G. H. G. ; POLIDORO, A. ; VAZ, B. A. ; BRITO, C. L. ; SILVA, F. T. ; GIAROLLA, J. ; PRIMI, M. C. ; SEGRETTI, N. D. ; **SERAFIM, R. A. M.** ; SANTOS, S. S. ; OTELO, V. ; RANGEL-YAGUI, C. O. . II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas. 2011. (Outro).

5.

FERREIRA, E. I. ; TAVARES, L. C. ; RANGEL-YAGUI, C. O. ; ANDRICOPULO, A. D. ; TROSSINI, G. H. G. ; RANDO, D. G. ; PASQUALOTO, K. F. M. ; **SERAFIM, R. A. M.** ; ANDRADE, C. H. ; BRITO, C. L. ; BIGATAO, H. M. ; GIAROLLA, J. ; BOTELHO, K. C. A. ; TURRA, K. M. ; SCOTTI, L. ; GUIDO, R. V. C. ; OTELO, V. . I Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas - USP e as Redes Temáticas. 2009. (Outro).

6.

SERAFIM, R. A. M.. II Jornada Científica da Saúde - UNISANTOS. 2008. (Outro).

7.

SERAFIM, R. A. M.. I Jornada Científica da Saúde - UNISANTOS. 2007. (Outro).

8.

SERAFIM, R. A. M.. XII Jornada Farmacêutica da Universidade Católica de Santos. 2006. (Outro).

9.

SERAFIM, R. A. M.. I Encontro de Trabalhos Científicos da Universidade Católica de Santos. 2005. (Outro).

10.

SERAFIM, R. A. M.. Palestra de Primeiros Socorros. 2005. (Outro).

Orientações

Orientações e supervisões em andamento

Iniciação científica

1.

Filipe Gomes Pernichelle. Antichagásicos potenciais: planejamento e síntese de compostos liberadores de óxido nítrico contendo ésteres nitrato. Início: 2015. Iniciação científica (Graduando em Farmácia e Bioquímica) - Universidade de São Paulo. (Orientador).

Orientações e supervisões concluídas

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1.

Martins, P.; Maeda, C.; Paz, J.; Parizoto, J.; Almeida S.. Avanços e aplicações da nanotecnologia no tratamento do câncer. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Faculdades Oswaldo Cruz. Orientador: Ricardo Augusto Massarico Serafim.

Inovação

Projetos de pesquisa

Outras informações relevantes

- Sócio da SBQ (Sociedade Brasileira de Química) na Divisão de Química Medicinal, desde 2010.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 12/02/2016 às 15:02:05

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br