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

**Antichagásicos potenciais: Planejamento e síntese de
bioisósteros 1,2,4-triazólicos do hidroximetilnitrofural e
análogos**

Fredson Torres Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2014

Fredson Torres Silva

Antichagásicos potenciais: Planejamento e síntese de
bioisósteros 1,2,4-triazólicos do hidroximetilnitrofural e
análogos

Versão original

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ____ de ____ de ____.

“Skill to do comes of doing; knowledge comes by eyes always open and working hands; and there is no knowledge that is not power.”

Ralph Waldo Emerson

“A verdadeira educação não desconhece o valor dos conhecimentos científicos ou aquisições literárias; mas acima da instrução aprecia a capacidade, acima da capacidade a bondade, e acima das aquisições intelectuais o caráter. O mundo não necessita tanto de homens de grande intelecto, como de nobre caráter. Precisa de homens cuja habilidade seja dirigida por princípios firmes.”

Ellen Gould White

Dedico...

...ao Deus indecifrável, meu melhor amigo, Criador da vida, do assombro e do sorriso, por ter me acompanhado até aqui e arquitetado a beleza complexa e sutil das moléculas. Sem o Seu senso de humor peculiar, tudo seria um tédio.

...à Francisco e Valentina, meus pais, heróis e amigos, pelo amor e apoio sem limites, pela compreensão nos momentos de introspecção e sacrifício, e por me ajudarem a juntar os cacos quando eu acho que não restou mais nada dos sonhos. Vocês me ensinaram a duvidar das limitações e a valorizar a retidão. É uma honra ser fruto da existência de duas pessoas tão espetaculares.

...às Famílias Gomes e Torres Silva, os que já partiram e os que permanecem, por tanto batalhar pela sobrevivência e para que seus filhos atinjam maiores alturas. Aprendi com vocês o valor do umbu, do biju, das vaquejadas, das cacimbas, o aconchego das casas humildes e a poesia que há na flor de mandacaru e no monte do Marruá. O sertão não sai dos corações e continua provando que é possível unir leveza e força. “Tudo estava fora de lugar... vivemos pra consertar (que o serviço é mais maneiro)”.

...aos meus amados irmãos Diego Decleva, Evanildo Lacerda e Paula Garcia, por sempre terem me mostrado rumos mais excelentes para as minhas aspirações pessoais, científicas e espirituais, acompanhando mais de perto que ninguém a minha jornada. Não sei se teria conseguido sem a acolhida sempre presente, os reidas, os pontapés e as ousadias. Juntos, ressonamos. E seguimos melhores.

...à minha querida orientadora, Professora Titular Elizabeth Igne Ferreira, por me apresentar a Química Farmacêutica, uma paixão que eu já tinha, mas ainda não sabia nomear, desde a primeira vez que li um nome químico em uma bula de medicamento. Não poderia estar aqui hoje se não fosse adotado como seu aprendiz dessa mistura de ciência e arte. Sua dedicação incondicional e busca pela excelência na pesquisa, na didática e nos propósitos são um horizonte no qual eu, menino, um dia pretendo chegar.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por ter estimulado o espírito científico e crítico desde o começo da graduação e durante a iniciação científica. É uma honra e uma alegria fazer parte desta casa.

Ao Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela oportunidade de realizar esse projeto.

Aos amigos da formação atual do LAPEN: Charles, Guilherme, Jeanine, Marco, Marina, Natan, Rodrigo, Ricardo e Soraya pela amizade e conversas de todo dia, sempre enriquecedoras. Aprendi com vocês que, se “o céu é o limite”, com união, criatividade, dedicação e rigor técnico, chegar perto dele se torna cada vez mais possível.

Um obrigado especial à Lorena, pelo auxílio com as técnicas analíticas. Seu comprometimento com o trabalho e seu amor à Química são inspiradores.

Aos colegas da “velha guarda”: Andressa, Caroline, Fabrício, Tacila, Vanessa e Zaim e aos alunos de iniciação científica Ana, Giulia, Helô, Léo e Renan pelos bons momentos compartilhados no laboratório e discussões científicas (algumas, nem tanto).

Ao Hamilton, por me guiar no início da minha caminhada científica. E por me ensinar como funciona o inversor de spin.

Aos queridos vizinhos de todas as horas Drielli, Elys, Fernando, Gustavo (Thales), Ju Magalhães, Ju Pachione, Luciana, Mariana, Maurício, Matheus, Rosania, Thais, Vinícius e aos alunos de iniciação científica do lado de lá Diego, Dragunas e Silvestre pelo carinho e prestatividade.

Um agradecimento especial à equipe do Prof. Lucio Holanda Gondim de Freitas Junior, da Dra. Carolina Borsoi Moraes e ao doutorando Caio Haddad Franco (CNPEM-LNBio) pelo auxílio nos ensaios de atividade biológica. A contribuição de vocês foi inestimável.

À técnica Dra. Maria Ines de Almeida Gonçalves, pelos experimentos de ressonância magnética nuclear e pelas (longas) discussões de atribuições de espectros. Sua persistência e amor pela espectroscopia me fizeram crescer muito.

À Dra. Denize Cristina Favaro, da Central Analítica (IQ-USP), pela colaboração nos estudos de RMN.

Ao Professor Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini, por me apresentar o belo mundo da modelagem molecular, pelo companheirismo e pelo auxílio nos estudos de docking e campos de interação molecular. Minha sincera gratidão.

À Professora Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pelo carinho, apoio, pelas conversas e por sempre acreditar em mim. Suas aulas de Química Farmacêutica me ajudaram a confirmar o amor por essa área.

Ao Professor Dr. Roberto Parise Filho pela amizade, pelo suporte no estágio PAE e por sempre buscar mostrar novos horizontes no ensino. Sua dedicação na docência é um exemplo que deveria ser seguido por muitos.

À Professora Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, pelo apoio sempre presente e auxílio nas discussões sobre modelagem molecular. Você me motivou a aguçar o raciocínio crítico de forma especial.

Aos sempre prestativos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, David, Elizabete, Alexandre, Kelma, Irineu e Miriam por removerem várias “sequoias” do meu caminho, sempre com alegria e respeito.

Ao meu querido irmão André Defendi Arelaro, que admiro muito pelo esforço, disciplina, caráter e personalidade, e sempre me lembra em conversas que existe mais na vida do que trabalho e preocupação com o amanhã. Sua leveza e personalidade são um referencial para mim, especialmente nos momentos em que o ritmo de trabalho insiste em desviar nosso foco do que realmente importa. Muito obrigado!

À minha querida irmã Simone Sanchez, que sempre me apoiou na caminhada, me ajudou muitas vezes a tomar a escolha certa mesmo quando nenhum de nós entendia sequer a própria escolha e sempre me inspirou a Acreditar, incondicionalmente. Você não sabe, mas é cientista de coração.

Ao meu querido irmão Thiago Viegas Luz, pela amizade sempre presente, pelas preciosas trocas de experiências, nerdices e por tornar mais alegres e especiais muitas vezes os momentos mais escuros da jornada.

Aos amigos do Instituto de Química Luiza Grecco e Daniel Nopper pelos auxílios técnicos durante o meu trabalho e pelas conversas esclarecedoras e sempre divertidas. Vocês são muito especiais!

Aos queridos amigos da Comunidade Adventista de Jovens Universitários (CAJU) e do Grupo de Estudantes Adventistas (GEA), que se dispuseram a enxergar a Universidade além do comum e crescer juntos espiritualmente de maneira autêntica. Recebem minha sincera gratidão, em especial, Divany Santos, Haiko Fischer, Mari Rocha, Mari Yamamoto e Tiago Laurindo, que tornaram meus dias mais felizes, leves, lúcidos e esperançosos nesses dois anos. Muito obrigado.

À minha família, que nunca deixou de apostar em mim e ser meu porto seguro, sempre, sempre. Amo vocês!

Um obrigado muito especial ao colega Marcio Jun Toyoda, que me auxiliou na tradução dos protocolos de síntese originalmente em japonês. Quem diria que precisaríamos chegar a tanto!

E aos demais que compartilharam a estrada em algum momento comigo e desejaram em seus corações que este trabalho fosse bem sucedido.

*Num mundo que incentiva o contrário, todos esses se importaram.
A vocês, minha eterna gratidão.*

*“We are atoms studying atoms,
cells studying cells,
We are the mystery of the universe
trying to unravel ourselves.”*

Autor desconhecido

*“A realidade, com efeito, é algo que
ninguém poderia adivinhar.”*

Clive Staples Lewis

SILVA, F. T. **ANTICHAGÁSICOS POTENCIAIS: PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE BIOISÓTEROS 1,2,4-TRIAZÓLICOS DO HIDROXIMETILNITROFURAL E ANÁLOGOS**. 2014. 228p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

RESUMO

A doença de Chagas, parasitose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é doença prevalente na América Latina. Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção e, em 2008, registraram-se mais de 10 mil óbitos devido à doença. Os únicos dois fármacos disponíveis na terapêutica, nifurtimox e benznidazol, são mais eficazes no tratamento da doença no início da fase aguda. Entretanto, a fase crônica da doença não possui tratamento. O nitrofural (NF), fármaco antimicrobiano, destaca-se por possuir atividade contra o *T. cruzi*, porém, apresenta toxicidade. Seu derivado hidroximetilado, o hidroximetilnitrofural (NFOH), por sua vez, mostrou maior atividade antichagásica e menor toxicidade. Ante a necessidade de novos fármacos antichagásicos, a existência de alvos terapêuticos promissores como a 14 α -esterol desmetilase (CYP51) e a cruzaina e mediante utilização do bioisosterismo como ferramenta de modificação molecular, realizou-se a triagem virtual de 144 ligantes análogos do NFOH pelo método de *docking* com o programa GOLD para a CYP51 de *T. cruzi*. Adicionalmente, realizou-se estudo qualitativo dos campos de interação moleculares (MIFs) com o programa GRID para a enzima humana e do parasita, homólogas entre si, estudo que revelou 9 resíduos de aminoácidos no sítio ativo da enzima parasitária que podem ser explorados no planejamento de inibidores seletivos. Neste trabalho, obtiveram-se 5 compostos inéditos, caracterizados por determinação da faixa de fusão, análise elementar, técnicas de espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, HETCOR e NOESY, e a atribuição dos sinais foi realizada com o auxílio de técnicas de modelagem molecular. Testaram-se 4 compostos contra a forma amastigota de *T. cruzi* em células da linhagem U2OS. Todos os compostos apresentaram atividade da ordem de micromolar e índices de seletividade satisfatórios. O composto LAPEN-2901 teve sua estrutura elucidada por cristalografia de raios X, apresentou toxicidade duas vezes menor que o NFOH e potência semelhante à do composto de referência benznidazol, porém menor eficácia. Os resultados obtidos ressaltam a importância de grupos nitro, 1,2,4-triazólicos e tiossemicarbazônicos para o planejamento de derivados eficazes no tratamento da fase crônica da doença de Chagas.

Palavras-Chave: inibidores potenciais de CYP51, inibidores potenciais da cruzaina, hidroximetilnitrofural, triazol, bioisosterismo, *Trypanosoma cruzi*.

SILVA, F. T. **POTENTIAL ANTICHAGASIC AGENTS: DESIGN AND SYNTHESIS OF 1,2,4-TRIAZOLIC HYDROXYMETHYLNITROFURAZONE BIOISOSTERES AND ANALOGUES.** 2014. 228p. Major's Thesis – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2014.

ABSTRACT

Chagas disease, parasitosis caused by *Trypanosoma cruzi*, is a disease that predominates in Latin America. It is estimated that 10 million people are under the risk of infection and, in 2008, more than 10 thousand deaths were registered. The only two drugs available in the therapeutics, nifurtimox and benznidazole, showed to be more effective in the acute phase of the disease. However, there is no choice for the chronic phase. Nitrofurazone (NF), an antimicrobial drug, has activity against *T. cruzi*, although being toxic. Its hydroxymethyl derivative, the hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), showed to be more active and less toxic than the prototype. Considering the need for new antichagasic drugs, the existence of promising new therapeutic targets, as 14 α -sterol demethylase and cruzain, and by employing the bioisosterism approach, a virtual screening using *T. cruzi* CYP51 was performed for 144 NFOH analogues. Additionally, a qualitative molecular interaction field study was performed, revealing 9 aminoacids in the parasitic enzyme relevant for selectivity. Five novel compounds were synthesized, characterized by melting range, elemental analysis, IR spectroscopy, ^1H and ^{13}C NMR as well as HSQC, HMBC, HETCOR and NOESY experiments, in which the signal assigning were aided using molecular modeling techniques. Four compounds were tested against *T. cruzi* amastigotes in infected U2OS cells. All compounds were sufficiently selective towards *T. cruzi* and showed trypanomicidal activity in low micromolar range. The compound LAPEN-2901 had its structure determined using X-ray crystallography and showed lower toxicity than NFOH and potency similar to benznidazole, but lower efficacy. These results highlight the importance of the 1,2,4-triazolic, thiosemicarbazonic and nitro group moieties for designing new efficient compounds for the chronic phase of Chagas disease.

Keywords: CYP51 potential inhibitors, cruzain potential inhibitors, hydroxymethylnitrofurazone, triazole, bioisosteres, *Trypanosoma cruzi*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Doença de Chagas	5
2.1.1. Definições	5
2.1.2. Histórico.....	8
2.1.3. Epidemiologia	11
2.1.4. Ciclo biológico e transmissão.....	14
2.1.5. Prevenção.....	20
2.1.6. Sintomatologia e diagnóstico.....	21
2.1.7. Fisiopatologia.....	23
2.2. Quimioterapia antichagásica	25
2.2.1. Alvos moleculares em estudo.....	25
2.2.1.1. Biossíntese de esteróis	25
2.2.1.2. Cisteína proteases	33
2.2.1.3. Metabolismo de espécies reativas de oxigênio.....	37
2.2.1.4. Outros alvos e compostos em estudo	41
2.2.2. Fármacos atualmente utilizados na terapêutica	42
2.3. Planejamento de novos fármacos	43
2.3.1. Planejamento Racional	43
2.3.2. Bioisosterismo.....	45
2.3.5. Modelagem molecular.....	48
2.3.5.1. Docking e triagem virtual	48
2.3.5.1. Campos de interação molecular	51
3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	53
3.1. Objetivos gerais.....	54
3.2. Objetivos específicos.....	54
4. PLANEJAMENTO DAS SÉRIES PROPOSTAS.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1. Docking	66
5.2. Estudo qualitativo de campos de interação molecular.....	75
5.3. Planejamento sintético.....	80

5.4. Preparação dos 1,2,4-triazóis de partida	81
5.5. Tentativas de preparação dos acil-triazóis	86
5.6. Preparação das triazolil-acetofenonas	92
5.7. Preparação e elucidação estrutural das hidrazonas	97
5.8. Tentativas de preparação dos derivados hidroximetilados	115
5.9. Ensaios de atividade tripanomicida e citotoxicidade	118
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	124
7. PARTE EXPERIMENTAL	128
7.1. Material	129
7.1.1. Programas computacionais para modelagem molecular	129
7.1.2. Reagentes e solventes para síntese	129
7.1.3. Faixa de fusão	130
7.1.4. Cromatografia em camada delgada	130
7.1.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	130
7.1.6. Cromatografia líquida de alta eficiência	130
7.1.7. Espectroscopia no infravermelho	131
7.1.8. Separação por cromatografia em coluna	131
7.1.9. Materiais para ensaios de atividade biológica	131
7.2. Métodos	133
7.2.1. Modelagem molecular	133
7.2.1.1. Estudos de <i>docking</i>	133
7.2.1.2. Estudo qualitativo de campos de interação molecular	134
7.2.1.3. Cálculo dos calores de formação	136
7.2.1.4. Otimização de geometria por método quântico	136
7.2.2. Síntese dos compostos	137
7.2.2.1. Preparação do 3-nitro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol	137
7.2.2.2. Preparação do sal sódico do 3-nitro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol	137
7.2.2.3. Procedimento geral para a síntese das triazolil-acetofenonas	138
7.2.3. Ensaios de atividade tripanomicida e citotoxicidade	141
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144
ANEXO 1 – RESULTADOS DO ESTUDO DE DOCKING	165
ANEXO 2 – ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	179
ANEXO 3 – ANÁLISE ELEMENTAR	191

ANEXO 4 – ESPECTROS NO INFRAVERMELHO	195
ANEXO 5 – INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DA BANCA JULGADORA	200
ANEXO 5.1.....	202
Ficha do aluno	202
ANEXO 5.2.....	205
Currículo Lattes do aluno	205
ANEXO 5.3.....	210
Atividades acadêmicas desenvolvidas.....	210

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana é uma protozoose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado da ordem dos cinetoplastídeos. A doença é assim chamada em homenagem a Carlos Chagas, um dos maiores pesquisadores do século XX (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002). Estima-se que no ano de 2008 ocorreram mais de 10 mil óbitos devido a essa doença e cerca de 10 milhões de pessoas encontram-se sob o risco de infecção, principalmente na América Latina. O número de pessoas que estão sob esse risco reduziu de 40 milhões, em 2000, para 28 milhões de pessoas, em 2006 (WHO, 2007). Entretanto, esse último número difere do relatado no trabalho que Coura e Dias apresentaram em 2009, no qual 90 milhões de pessoas ainda estão ameaçadas de infecção. Apesar das divergências, tais números justificam a atenção que deve ser dada ao diagnóstico e a novas formas de tratamento dessa parasitose.

Essa doença possui duas fases, aguda e crônica, sendo que a primeira é de difícil diagnóstico por ser praticamente assintomática, a depender do sistema imune do hospedeiro. O sinal de Romaña, inchaço que aparece na região do olho, nem sempre é visualizado e pode ser confundido com uma conjuntivite (DIAS, 1997). Os dois fármacos existentes para a quimioterapia da doença de Chagas, nifurtimox e benznidazol, são ineficazes na fase crônica e podem causar graves efeitos colaterais, que dificultam a adesão ao tratamento. Há décadas não há a introdução de um novo medicamento, panorama que coloca essa doença entre as tropicais negligenciadas (URBINA, 2010). No Brasil, somente o benznidazol é disponível (COURA; CASTRO, 2002).

Fármacos com diferentes mecanismos de ação vêm sendo estudados para o tratamento da doença de Chagas. Compostos contendo anéis imidazólicos e triazólicos são de grande importância na interação com o grupo heme da enzima 14 α -esterol desmetilase (CYP51), presente no complexo enzimático citocromo P450 (LEPESHEVA et al., 2006; SUN et al., 2007; XIAO et al., 2004). Fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol são fármacos utilizados na terapia antifúngica que atuam por esse

mecanismo (DE BEULE, 1996; LEPESHEVA et al., 2010).

A cruzipaina, ou cruzaina, é a principal cisteína protease presente no *T. cruzi*, sendo, assim, mais um alvo viável na terapêutica (CAZZULO; STOKA; TURK, 2001; NDAO et al., 2014; URBINA; DOCAMPO, 2003). Sua atividade está relacionada ao desenvolvimento do parasita, na diferenciação de vários estágios de seu ciclo biológico, na invasão e na alteração da resposta imune do hospedeiro (DEL NERY et al., 1997; SAJID; MCKERROW, 2002). Compostos com grupo semicarbazona ou tiosemicarbazona mostram considerável inibição frente a essa enzima (AGUIRRE et al., 2004; DU et al., 2002).

A tripanotiona redutase é outro alvo importante para ação de antichagásicos potenciais, notadamente, dos nitroderivados (FAIRLAMB; CERAMI, 1992). Tal enzima é responsável pela destoxificação de radicais livres do parasita pela redução da tripanotiona.

Com relação à introdução de novos fármacos na terapêutica, a modificação molecular é, ainda, considerada a técnica mais promissora (WERMUTH, 2008). Tal processo envolve a alteração de ligações, elementos ou grupos químicos a fim de anular efeitos indesejáveis dos fármacos utilizados ou introduzir outros que potencializem ou intensifiquem a atividade biológica, uma vez conhecido o mecanismo de ação do fármaco. Podem, também, aumentar a afinidade por um receptor ou alterar a lipofilicidade da molécula, interferindo, respectivamente, com a farmacodinâmica e com a farmacocinética do fármaco ou composto potencialmente ativo. Diversos processos de modificação molecular podem ser utilizados, entre eles, o bioisosterismo.

A palavra isosterismo vem de uma junção de termos oriundos do grego (*isos* = igual; *steros* = volume). Compostos isósteros são aqueles que possuem grupos com configurações estéricas e eletrônicas semelhantes. O termo bioisosterismo veio a partir dessa definição, sendo conceituado como substituição de elementos ou grupos, a fim de se obter melhores propriedades biológicas do fármaco protótipo, caracterizando-se,

assim, como forma de modificação molecular. Compostos bioisostéros entre si podem agir no mesmo sistema bioquímico, produzindo efeitos biológicos semelhantes, ainda que antagônicos (BURGER, 1991; LIMA; BARREIRO, 2005; MEANWELL, 2011).

O nitrofural (NF), composto antibacteriano usado por décadas para tratamento de queimaduras, foi destacado por possuir grande atividade na produção de peróxido de hidrogênio, que é espécie reativa de oxigênio (ERO), dificilmente neutralizado pelo parasita (BOVERIS et al., 1980; OLIN-SANDOVAL et al., 2012). Testes biológicos realizados em camundongos mostraram 94,5% de cura parasitológica. No entanto, esse fármaco possui alta toxicidade quando administrado em humanos e demonstrou-se que a terapia não elimina totalmente a forma amastigota do parasita no coração de animais tratados (COURA; CASTRO, 2002). Também, devido a suas características, espera-se ação na tripanotiona redutase (FAIRLAMB; CERAMI, 1992).

O pró-fármaco hidroximetilado do NF, o hidroximetilnitrofural (NFOH), foi obtido como intermediário da síntese de pró-fármacos recíprocos do NF e da primaquina, sob a forma de bases de Mannich (CHUNG, 1996). Esse intermediário mostrou-se muito promissor, sendo mais ativo e possuindo toxicidade relativamente menor que o nitrofural, do qual deriva (CHUNG et al., 2003). Ademais, possui atividade em cruzafina de *T. cruzi* (TROSSINI et al., 2010). Estudos recentes em modelo murino demonstraram que o NFOH é tão eficaz quanto o benznidazol em manter a parasitemia direta indetectável, apresentando, no entanto, menor taxa de mortalidade (DAVIES et al., 2010).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doença de Chagas

2.1.1. Definições

A doença de Chagas, também denominada tripanossomíase americana, é uma complexa antroponose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (filo *Euglenozoa*, ordem *Kinetoplastida*, supergrupo *Excavates*, família *Trypanosomatidae*), um parasita unicelular flagelado (Figura 1) (ALVES, 2010; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011).

Figura 1 – Fotomicrografia da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.

(Fonte:http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/T_cruzi/basic%20information.htm, acesso em 18/06/13)

Organismos da ordem *Kinetoplastida* são caracterizados pela presença de organela intracelular denominada cinetoplasto, uma estrutura constituída de DNA extranuclear (kDNA) localizada na matriz mitocondrial. Esta corresponde a 30% do DNA celular total, sendo que a morfologia do cinetoplasto pode variar dependendo do protozoário e do estágio de desenvolvimento. Na maioria dos tripanosomatídeos, incluindo epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, *Leishmania sp.* e *T. brucei*, o cinetoplasto é uma estrutura em forma de barra, perpendicular ao eixo do flagelo. Por outro lado, tripomastigotas de *T. cruzi* apresentam um cinetoplasto de formato arredondado na porção distal ao flagelo. O cinetoplasto cumpre o papel de codificar RNAr, subunidades de complexos respiratórios e de inserção ou deleção de uridilato na edição de RNA, além de ter relação com processos de resistência a fármacos, como

observado em cepas de *Leishmania*. (BASSELIN; BADET-DENISOT; ROBERT-GERO, 1998; DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009).

Diversos microrganismos patogênicos para seres humanos constituem parte da família *Trypanosomatidae*, composta exclusivamente por organismos parasitários com um único flagelo e um cinetoplasto. Tais espécies são pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* e podem causar não somente a doença de Chagas, mas tripanossomíase africana (doença do sono) e leishmaniose em suas diversas formas por seus respectivos patógenos. Tripanossomatídeos parasitam não somente humanos, mas diversas espécies de vertebrados e invertebrados, em sua maioria insetos das ordens *Diptera* e *Hemiptera*. Esse parasitismo pode ocorrer, também, em plantas, como o gênero *Phytomonas*, que pode infectar coco, tomate e milho (SANTOS et al., 2008).

O gênero *Trypanosoma* compreende cerca de 600 espécies e a espécie *T. cruzi* é capaz de infectar mais de 70 espécies de mamíferos como hospedeiros, sendo transmitida por diversas espécies de hematófagos triatomíneos. (PODLIPAEV, 2001; ZINGALES et al., 2012) A diversidade genômica e fenotípica do parasita estão associadas ao desfecho clínico das fases aguda e crônica da doença de Chagas, cujas manifestações incluem desde infecção subclínica às síndromes cardíaca, digestiva e morte súbita. Estas dependem de fatores como a genética do parasita e do hospedeiro, infecções múltiplas concomitantes e fatores culturais e geográficos (ZINGALES et al., 2012).

A classificação de grupos epidemiologicamente e ecologicamente relevantes de *T. cruzi* tem sido amplamente discutida. Atualmente designam-se seis DTUs (do inglês *Discrete Typing Unit*), definidos como um conjunto de isolados microbiológicos, geneticamente semelhante e que pode ser identificado por marcadores moleculares e imunológicos comuns (ZINGALES, 2011). Os DTUs atualmente estabelecidos são nomeados de TcI-TcVI e possuem relação e diferenciação entre os diferentes desfechos clínicos da doença (Tabela I).

Tabela I. Resumo do ecotopo, hospedeiros, vetores e associações das DTUs de *T. cruzi*. (Adaptado de ZINGALES et al., 2012)

Genótipo	Nicho	Hospedeiros silvestres	Vetores silvestres	Localização Geográfica	Doença de Chagas
TcI	Primário: arbóreo; palmas (p. ex. <i>Attalea</i>), coqueiros. Secundário: árido, rochoso; terrestre na Amazônia.	Primários: arbóreos, semi-arbóreos; especialmente <i>Didelphis</i> , outros didelfídeos	Primário: espécies de <i>Rhodnius</i> Secundário: <i>Panstrongylus</i> , <i>Triatoma</i> , <i>Eratyrus</i>	América do Sul, Central e do Norte	Norte do Amazonas, esporádico nos países do Cone Sul Cardiomiopatia
TcII	Pouco conhecido; raro em ciclos silvestres.	Pouco conhecido: Primatas da Mata Atlântica, didelfídeos, <i>Euphractus</i> (Paraguai)	Pouco conhecido: (<i>Triatominidae</i>)	Cone Sul, ocorrência esporádica ao Norte	Mata Atlântica e região central do Brasil. Cardiomiopatia Síndromes dos megas.
TcIII	Terrestre, fossorial.	Tatus, especialmente <i>Dasytus</i> , <i>Chaetopractus</i> , <i>Euphractus</i> ; marsupiais <i>Didelphidae</i> , <i>Monodelphis</i>	<i>P. geniculatus</i>	América do Sul	Raro em humanos, pode estar presente em cachorros domésticos. Casos agudos na Amazônia, pouco é conhecido sobre as manifestações clínicas.
TcIV	Arbóreo, e alguns hospedeiros terrestres na América do Norte.	Primatas, <i>Nasua nasua</i>	<i>Rhodnius</i> , <i>Panstrongylus</i> , <i>Triatoma</i>	América do Sul e do Norte	Causa secundária da doença de Chagas na Venezuela, esporádico em algumas regiões da América do Sul.
TcV	Raro em ciclos silvestres.	Pouco conhecido: Tatus <i>Dasytus</i> , <i>Euphractus</i> , e roedores <i>Octodon</i>	Pouco conhecido	Cone Sul, Gran Chaco, extremo sul do Brasil	Cone Sul Cardiomiopatia, síndromes dos mega, transmitida por insetos.
TcVI	Raro em ciclos silvestres.	Pouco conhecido	Pouco conhecido	Cone Sul, Gran Chaco	Cone sul Cardiomiopatia, síndromes dos mega.

2.1.2. Histórico

A doença de Chagas é assim chamada em homenagem ao seu descobridor, o médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, que durante 11 anos consecutivos descreveu sua etiologia, vetor, reservatórios, características morfológicas, estágios agudo e crônico, aspectos clínicos da doença, além de considerar os mecanismos de autoimunidade associados à fisiopatologia. A descoberta ocorreu em 1909, ano em que Chagas (Figura 2) era um jovem pesquisador no Instituto Oswaldo Cruz, e o parasita foi denominado *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu amigo Oswaldo Cruz (CHAGAS, 1909; BESTETTI; CARDINALLI-NETO, 2013).

Figura 2 - Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934) (KANNE; ROHRMANN; LICHTENSTEIN, 2006)

A descoberta se deu no início do século 20, quando o governo e instituições privadas brasileiras buscavam tomar medidas para erradicar doenças epidêmicas no interior do País, como febre amarela e varíola, que causavam a morte de trabalhadores envolvidos na construção de instalações públicas, rodovias e ferrovias. Nesse contexto, Carlos Chagas foi designado para desenvolver uma campanha antimalária no município de Lassance, em Minas Gerais. Tendo estabelecido seu laboratório em um vagão de trem, tomou ciência da interrupção daquele trecho da construção da ferrovia Central do Brasil por uma epidemia da “doença misteriosa”, sendo por isso chamada “ferrovia do

diabo”. Cantarino Motta, engenheiro-chefe da obra, mostrou a Chagas um inseto hematófago hemíptero da espécie *Triatoma infestans*, que infestava as casas e atacava à noite os habitantes locais. Chagas pôde, então, estabelecer uma relação entre a doença e o inseto que descobriria ser o vetor (LEWINSOHN, 1981; COUTINHO; CARLOS; DIAS, 1999; GURGEL; MAGDALENA; PRIOLI, 2009;).

Seguindo a evidência, Chagas desenhou série de experimentos, nos quais determinou a presença de tripanossomatídeos pela dissecação dos triatomíneos. Comprovou a patogenicidade desses protozoários, inoculando-os em diversas espécies de animais, incluindo símios, observando o desenvolvimento dos mesmos sintomas e a morte de alguns após poucas semanas. Sabendo do ciclo reprodutivo de organismos semelhantes, inferiu que o hospedeiro final seria o homem e buscou o parasita no sangue de alguns pacientes, tendo encontrado isolados de *Trypanosoma cruzi*, cuja morfologia já havia sido caracterizada por seu grupo de pesquisa em uma criança de 2 anos, Berenice (Figura 3), que apresentava febre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e inchaço facial. Ao inocular o sangue do paciente em animais, observou os mesmos flagelados presentes no sangue periférico, manifestação dos sinais clínicos e morte em alguns casos, comprovando sua hipótese inicial (CHAGAS, 1909; KOWALSKA; KOWALSKI; TORRES, 2011).

Figura 3 - Berenice, com 53 anos em 1960 (LEWINSOHN, 1981).

Os achados renderam ao Doutor Carlos Chagas a nomeação ao prêmio Nobel em dezembro de 1920. Contudo, a premiação não se concretizou, supostamente pela influência de inimigos do meio científico, que contestavam seu mérito na descoberta do parasita, sua habilidade de caracterizar clinicamente a doença e questionavam sua importância social e epidemiológica (BESTETTI; CARDINALLI-NETO, 2013).

Tais contestações se baseavam na dificuldade de diagnóstico com as ferramentas disponíveis na época, a natureza teleológica da sua hipótese inicial, e mesmo o caso de Berenice, que sobreviveu aos 70 anos num estado de “bem estar”. Ademais, sua imagem pública estava comprometida pelas medidas que tomou no papel de Diretor Nacional do Departamento de Saúde Pública, que resultaram na obrigatoriedade da vacina contra varíola, proibição de estábulos domésticos e outras diversas leis sanitárias, que desagradaram à população. A denegação do prêmio é motivo de controvérsia até os dias de hoje (BESTETTI; CARDINALLI-NETO, 2013).

Estudos posteriores por diversos grupos de pesquisa forneceram evidências favoráveis à hipótese inicial de Chagas, incluindo-se a confirmação pelos postulados de Koch, que estabelecem relação causal entre um dado microrganismo e uma doença; e novos métodos de diagnóstico, possibilitados por avanços na imunologia e biologia molecular. Hoje, a tripanossomíase americana é objeto de estudo pela comunidade científica mundial, principalmente com respeito à compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e na busca por novos e potentes compostos ativos contra o parasita (LEWINSOHN, 1981; KANNE; ROHRMANN; LICHTENSTEIN, 2006; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; PARKER; SETHI, 2011).

2.1.3. *Epidemiologia*

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que a doença afeta oito milhões de pessoas em 21 países diferentes, sendo que 20-30% sofrerão danos cardiovasculares, gastrintestinais ou neurológicos irreversíveis e cerca de 12.500 indivíduos morrem a cada ano por estar infectados. Apesar dos indicadores alarmantes, relatórios recentes evidenciam que o problema está diminuindo nos últimos anos. O número de pessoas infectadas era de 24 milhões entre 1980-1985, tendo diminuído para 9,8 milhões em 2001; o número de novos casos por ano diminuiu substancialmente de 700 mil novos casos por ano em 1990 para 41.200 novos casos por ano em 2006; e o número de pessoas com a capacidade de trabalhar comprometida diminuiu de 2,7 milhões em 1990 para 586 mil em 2001. Tais números podem ser ainda maiores devido à subnotificação de casos (CRUZ-PACHECO; ESTEVA; VARGAS, 2012; WHO, 2012).

A maior parte dos países afetados é da América Latina e Central, devido à presença de habitações de baixa qualidade que permitem a infestação dos triatomíneos, mas casos de infecção são observados mesmo em grandes cidades em decorrência dos movimentos migratórios das áreas rurais para as metropolitanas. Em alguns desses países, os mesmos fatores relacionados à pobreza que contribuem para a disseminação da doença resultam em pobreza ainda maior, dado que o custo da assistência médica necessária somada à perda estimada de produtividade varia entre 40 milhões e 800 milhões por país ao ano (PARKER; SETHI, 2011).

Tal fragilidade econômica de alguns países da América Latina, acompanhada de instabilidade política entre as décadas de 1960 e 1980, incentivou a imigração de indivíduos desses países para os Estados Unidos, Austrália e Canadá a partir desse período. A partir da década de 1990 houve imigração para a Europa, devido ao recesso econômico e as oportunidades decorrentes do processo de formação da União Europeia (Figura 4). Estima-se mais de dois milhões de imigrantes da América Latina na Europa, em 2005. Esses processos justificam a disseminação da doença de Chagas para esses países. Atualmente, existe regulação quanto à doação de sangue na União

Europeia e Estados Unidos para pacientes com histórico de doença de Chagas, entretanto, a maior parte dos pacientes é assintomática e manifesta os sinais clínicos por imunossupressão (GASCON; BERN; PINAZO, 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010).

Figura 4 – Fluxo migratório de casos de doença de Chagas da América Latina para regiões não endêmicas (adaptado de WHO, 2007).

Assim, os países afetados pela doença de Chagas podem ser classificados em cinco grupos, de acordo com as características epidemiológicas que apresentam (Tabela II).

Tabela II – Cinco grupos de países afetados pela doença de Chagas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010)

Grupo	Países	Características
I	Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Equador, Honduras, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela.	Ciclos domésticos e peridomésticos; Zonas de alta prevalência de infecção humana; predominância de cardiopatias; ausência ou raridade da forma digestiva ao norte, próximo à linha do Equador; importantes ciclos silvestres em vários ambientes naturais, incluindo <i>T. infestans</i> em áreas restritas na Bolívia; programas de controle de vetores e transfusão na maior parte dos países, com perspectivas de eliminação do <i>T. infestans</i> (já conseguiram: Uruguai em 1997, Chile em 1999 e Brasil em 2006) e <i>Rhodnius prolixus</i> .
II	Colômbia, Costa Rica e México.	Ciclos domésticos e peridomésticos; presença de casos de cardiopatia; ocorrência de doadores infectados; detecção de casos silvestres; falta de programas de controle ou programas incipientes.
III	El Salvador, Guatemala, Nicarágua e Panamá.	ciclos domésticos, peridomésticos e silvestres; pouca informação sobre casos humanos; ações incipientes de controle na Guatemala e Nicarágua.
IV	Antilhas, Bahamas, Belize, Cuba, Estados Unidos, Guianas, Guianas Francesas, Haiti, Jamaica e Suriname.	Ciclos silvestres, com raros casos humanos autóctones com poucas informações clínicas; numerosos imigrantes infectados nos Estados Unidos; ausência de programas de controle, com exceção dos Estados Unidos, que realiza o controle dos bancos de sangue devido a casos de transmissão por transfusão.
V	Estados Unidos, Canadá, Espanha, França, Suíça, Japão, países asiáticos emergentes, Austrália e demais países da América do Norte, Europa, Ásia e Oceania	Resultado da internacionalização da doença, devido a movimentos migratórios legais e ilegais; principais meios de transmissão: transfusional e congênita; pacientes com necessidade de atendimento médico especializado; necessidade de controle adicional dos bancos de sangue; geração de problemas políticos relacionados à imigração.

Nesse cenário, é de interesse da OMS e da Organização Panamericana da Saúde (PAHO) manter e expandir os programas que garantem a oferta de medicamentos e atendimento necessários. Promovem, assim, avanços no desenvolvimento de novos programas junto aos sistemas de saúde de diversos países por meio do estabelecimento de parcerias entre organizações de saúde, doadores, políticos e líderes de companhias farmacêuticas. São prioridades a eliminação dos vetores, a

providência de recursos e articulação para o desenvolvimento de novos fármacos, considerando, inclusive, os atuais problemas de resistência (PAHO, 2009; WHO, 2013).

2.1.4. *Ciclo biológico e transmissão*

Durante seu ciclo de vida (Figura 5), o *Trypanosoma cruzi* se diferencia em diversas formas com diferentes funções, morfologias, mecanismos de invasão celular e adaptação, sendo as principais descritas: epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneos. Existem outros estágios intermediários que são alvo de debates na comunidade científica (ANDREWS et al., 1987; EPTING; COATES; ENGMAN, 2010).

Em todas as formas de transmissão, formas infectantes e não proliferativas de tripomastigotas metacíclicos invadem a corrente sanguínea, evadindo do sistema imune do hospedeiro pela invasão de diversos tipos celulares, como células do trato gastrointestinal, musculatura cardíaca e sistema reticulo-endotelial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; URBINA, 2009).

Figura 5 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. 1) O inseto vetor (macho ou fêmea) pica um hospedeiro mamífero e ingere os tripomastigotas presentes no sangue; 2) Tripomastigotas metacíclicos; 3) Tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e alguns esferomastigotas; 4) Epimastigotas se multiplicam no trato gastrintestinal do inseto; 5) Epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos; 6) O vetor transmite os tripomastigotas metacíclicos pelas fezes próximas ao local da picada por onde se alimentou; 7) Tripomastigotas metacíclicos; 8) Infecção dos macrófagos; 9) Diferenciação em amastigotas; 10) Amastigotas são liberados do vacúolo parasitóforo; 11) Multiplicação de amastigotas no citoplasma; 12) Diferenciação em tripomastigotas; 13) Tripomastigotas lisam a célula; 14) Formas tripomastigota (acima) e amastigota (abaixo); 15) Tripomastigotas (a) e amastigotas (b) infectando macrófagos. Ao centro da figura, os principais portadores animais envolvidos nos ambientes domésticos e peridomésticos (TEIXEIRA et al., 2012).

Transmissão vetorial: É a principal forma de transmissão da doença de Chagas (80 a 90 % dos casos diagnosticados), causada, principalmente, por insetos hematófagos da subfamília *Triatominae*, infectados com o *Trypanosoma cruzi* por se alimentar do sangue de diversos possíveis hospedeiros (Tabela I). Tais insetos domiciliam e colonizam frestas de casas construídas com barro e são popularmente chamados de “barbeiros” ou “chupões”, uma vez que as picadas ocorrem durante o sono do indivíduo na parte exposta do rosto. O parasita é transmitido quando a matéria fecal do inseto contendo formas infectantes de tripomastigotas metacíclicos é inoculada em superfícies mucosas ou pequenas lesões na pele. Os principais vetores são as espécies *Triatoma infestans* (Figura 6), *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*, que entram em contato com o homem devido a desequilíbrios ambientais e invasão humana de seus ecótopos (COURA; CASTRO, 2002; PARKER; SETHI, 2011; WHO, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; RAMÍREZ et al., 2013).

Figura 6 – *Triatoma infestans* adulto, visão dorsal.

(Fonte: <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/triatoma.htm>)

Transmissão transfusional: É a segunda via mais importante de transmissão nos centros urbanos da América Latina e a principal forma de transmissão em países não endêmicos (5 a 20% dos casos diagnosticados). Nestes, a incidência de casos tem diminuído devido à efetividade dos programas de controle e ao aumento da confiabilidade dos testes em função dos avanços das técnicas imunodiagnósticas, apesar dos testes ainda possuírem sensibilidade menor que os de triagem para vírus.

Na década de 1980, o Brasil apresentava prevalência média de 7,03% em candidatos à doação de sangue e, em 2005, esse valor diminuiu para 0,6% na hemorrede pública, resultado de ações mais efetivas da vigilância sanitária. Em países não endêmicos, o risco de transmissão para uma unidade de 500 mL de sangue total é de 12-20%. A probabilidade de infecção por essa forma depende de diversos fatores, como quantidade de sangue transfundido, cepa do parasita, presença de parasitemia na hora da doação, situação do sistema imune do recebedor e a triagem a que o sangue foi submetido (COURA; CASTRO, 2002; DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002; WENDEL, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; ARAÚJO; BERNE, 2013).

Transmissão congênita: A possibilidade de transmissão congênita, também denominada vertical ou transplacentária, foi considerada por Carlos Chagas, em 1909, e foi comprovada a partir de 1940. Sabe-se hoje que a transmissão pode ocorrer em qualquer fase da doença materna e em qualquer época da gestação, com maior probabilidade de infecção nos últimos três meses de gestação e durante o parto pelo contato das mucosas do feto com o sangue infectado. Por muito tempo, essa forma de transmissão foi considerada como marginal em relação à vetorial, mas, atualmente, é vista como um problema de saúde pública, inclusive nos países não endêmicos. Atualmente, diagnosticaram-se casos de transmissão congênita na Suíça, Suécia, Espanha e Estados Unidos e estima-se que na Espanha de 24 a 92 casos permanecem não diagnosticados a cada ano. Esse número varia entre 63 e 635 casos não diagnosticados, anualmente, nos Estados Unidos. Estima-se que 0,5 a 8% dos casos de infecção ocorram por essa forma (BRUTUS et al., 2008; SCHMUNIS; YADON, 2010; SALAS CLAVIJO et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013;).

Transmissão por transplante de órgãos: O aumento do número de transplantes nas últimas duas décadas tem tornado essa via de transmissão mais relevante. Comumente, o órgão doado é de um portador de *T. cruzi* em fase crônica e a imunossupressão induzida farmacologicamente ou por infecção de HIV no paciente receptor do órgão resulta em reativação dos sintomas da fase aguda, induzindo sintomas como febre, nódulos cutâneos eritematosos, hepatoesplenomegalia,

linfadenomegalia, mialgias e cefaleia. Estima-se que a reativação ocorre em 40% dos casos de transplante com doador infectado. (COURA; CASTRO, 2002; CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013)

Documentaram-se casos de transmissão por transplante de medula e sangue de cordão umbilical na Espanha e cinco casos nos Estados Unidos, entre 2002 e 2006. A triagem para doação de órgãos sólidos é um desafio, pois não há uma técnica que realize diagnóstico em tempo hábil em cadáveres para realização do transplante. A prática comum na Espanha é realizar a detecção por PCR (reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em pacientes recém-transplantados e imunossuprimidos para evitar reativação, por ser uma técnica com alta especificidade (100%) (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; GASCON; BERN; PINAZO, 2010).

Transmissão por via oral: A ingestão de alimentos e bebidas contaminados pelo parasita é forma de transmissão relativamente comum, recorrente nas proximidades de fazendas e plantações de açaí e cana-de-açúcar. Nestes casos, a contaminação ocorre pelo contato das fezes de triatomíneos com o alimento; pela inoculação direta na planta pelo vetor e pela anexação dos insetos na casca do fruto, que podem ser macerados e ingeridos (sopas, caldos e sucos de açaí e cana). Nessa forma de infecção, alta carga parasitária chega ao trato gastrointestinal e atravessa a barreira epitelial por penetração ativa ou por microlesões. Outras formas possíveis incluem ingestão de carne mal cozida, alimentos contaminados por urina ou secreções anais de marsupiais infectados. A ausência de hábitos adequados de higiene no manuseio de alimentos em regiões silvestres aumenta o risco de infecção por essa via. A infecção por via oral tem período de incubação de cinco dias e pode levar à miocardite aguda, apresentando alta mortalidade e maior gravidade clínica em crianças (BENCHIMOL BARBOSA, 2006; PIERIMARCHI et al., 2013; RAMÍREZ et al., 2013).

Transmissão por acidentes laboratoriais: Mais raramente, contaminação pode ocorrer por contato com culturas de tripomastigotas e manuseio de animais infectados. (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; MARTINS et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013)

Transmissão por leite materno: São relatadas ocorrências da presença de *T. cruzi* no colostro de pacientes na fase aguda e crônica da doença e casos de infecção pela ingestão de leite materno. Tentativas de reproduzir essa forma de transmissão em camundongos não são bem sucedidas devido à dificuldade da contagem de parasitas no colostro e leite, assumindo-se, então, que o número de formas infectantes é muito inferior ao do sangue periférico. Entretanto, não se recomenda a amamentação por mães portadoras do parasita, devido ao risco por ingestão de leite ou fissura mamilar (MARTINS et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

2.1.5. Prevenção

Considerando-se que ainda não há vacina para a doença de Chagas, sua incidência está relacionada às condições habitacionais, precárias nas regiões de maior incidência (Figura 7), e aplicação das estratégias de prevenção. A prevenção primária depende da diminuição da frequência de contato entre o triatomíneo e os indivíduos suscetíveis. A prevenção secundária, de cardiopatias e lesões do trato gastrointestinal e neurológicas, depende da realização de diagnóstico adequado e tratamento específico.

Figura 7 – Casa coberta com folhas de palmeiras, habitat comum dos triatomíneos (COURA, 2007).

Mesmo que a incidência de casos esteja diminuindo nos últimos anos, ainda ocorrem dificuldades na prevenção pela falta de consenso internacional sobre quem deve ser tratado, falta de acesso ao tratamento em várias regiões, falta de manutenção das campanhas em algumas áreas, desenvolvimento de resistência de alguns triatomíneos aos inseticidas e dificuldades no prognóstico dos pacientes para evitar as consequências da fase crônica (ABAD-FRANCH; SANTOS; SCHOFIELD, 2010).

Deve-se cuidar da conservação das casas e utilizar telas em portas e janelas. As

estratégias recomendadas pela Organização Pan-Americana da Saúde incluem a eliminação de vetores nas moradias pelo uso sistemático de inseticidas; aplicação de programas de gestão ambiental e implementação de um programa de Informação, Educação e Comunicação (IEC) nas Secretarias de Saúde. Além disso, incluem-se triagem das amostras de sangue em hemocentros e de grávidas com tratamento para evitar transmissão transfusional e congênita; melhoria de práticas no preparo de alimentos, além de atenção especial ao tratamento de crianças e acompanhamento dos adultos (PAHO, 2009; FIOCRUZ, 2013).

2.1.6. *Sintomatologia e diagnóstico*

A doença apresenta uma fase inicial ou aguda com parasitemia evidente na observação do sangue a fresco. Em grande parte dos casos essa fase é assintomática, mas nos casos sintomáticos os indivíduos podem apresentar complexo oftalmoganglionar (Sinal de Romaña), febre, hepatosplenomegalia, adenopatia generalizada, edema, miocardite e, em casos mais graves, meningoencefalite. Se não for tratada adequadamente, a infecção evolui para a fase crônica, mais comum em sua forma indeterminada, em que o paciente não apresenta sintomas, e resultados de eletrocardiograma, radiografia do coração, cólon e esôfago não possuem alterações. A evolução da doença pode levar, em 20 a 40% dos casos, às formas mais graves cardíaca ou digestiva, com megaesôfago e megacólon, que podem ocorrer concomitantemente, e se constituem nos principais fatores relacionados à mortalidade (COURA, 2007; GONÇALVES et al., 2010; PARKER; SETHI, 2011; PIERIMARCHI et al., 2013).

A forma transplacentária pode levar ao aborto, nascimento prematuro e lesões do feto. Em casos de reativação por imunossupressão, manifestam-se sintomas da fase aguda, como miocardite difusa, lesões do sistema nervoso central e meningoencefalite (COURA, 2007).

Figura 8 – Sinal de Romaña em paciente na fase aguda da doença de Chagas (FRANCOLINO et al., 2003).

Realiza-se o diagnóstico diferencial da doença de Chagas aguda (DCA) pela detecção do sinal de Romaña (Figura 8) e busca pelos sintomas já descritos. Coinfecções como leishmaniose visceral, malária, dengue, febre tifoide, toxoplasmose, mononucleose infecciosa, esquistossomose aguda e herpangina agravam esses sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004, 2013).

As técnicas de diagnóstico laboratorial são complexas, com sensibilidade e especificidade variáveis. Para a fase aguda são considerados critérios parasitológicos (por pesquisa a fresco de tripanossomatídeos, métodos de concentração e lâmina corada de gota espessa ou esfregaço) e sorológicos (hemoaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e o método imunoenzimático) (ARAÚJO; BERNE, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

2.1.7. Fisiopatologia

Os determinantes para a manifestação da doença são a quantidade de parasitas na infecção inicial, a proporção de tripomastigotas inoculados, a cepa inoculada, reinfeção, fatores histotrópicos específicos do hospedeiro e resposta imune inicial e tardia do hospedeiro. A replicação do parasita determinada pela ação de macrófagos, interferona- γ (IFN- γ), linfócitos TCD4+ e TCD8+, configura-se como resposta do tipo Th1 (DEVERA; ILLARRAMENDI; MONTOYA-ARAÚJO, 2002; COURA, 2007; WHO, 2012).

Atualmente, são reconhecidos dois grupos de mecanismos para a doença de Chagas. O primeiro é relacionado à reação inflamatória com necrose, destruição tecidual associada à redução do número de neurônios intramurais cardíacos e fibrose. Considerando-se a maior parte dos gânglios intramurais cardíacos é parassimpática, se estabeleceu a *hipótese neurogênica*, em que os sintomas cardíacos, incluindo arritmias, alterações inotrópicas e morfológicas associadas à morte súbita, seriam decorrentes do desequilíbrio do sistema nervoso autônomo nos órgãos-alvo na fase aguda e crônica, consequência da destruição dos gânglios. Contudo, tem-se demonstrado que há falta de correlação entre desnervação parassimpática e cardiopatias, não há sensibilidade das estruturas cardíacas desnervadas à ação de agentes colinérgicos e não há evidência de estimulação simpática exacerbada em pacientes com cardiomiopatia de Chagas (COURA, 2007; BIOLO; RIBEIRO; CLAUSELL, 2010; CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; URBINA, 2009).

Em estudos mais recentes se observou a presença de processos inflamatórios sustentados e difusos associados à ausência aparente de parasitas nos tecidos afetados, detecção de anticorpos *anti-self*, decorrentes de reação cruzada com antígenos do parasita. Tais evidências levaram à formulação da segunda hipótese, na qual a exposição ao parasita leva a uma resposta autoimune. Tal hipótese fez com que o tratamento antiparasitário fosse considerado irrelevante por um determinado período de tempo. Por outro lado, tem-se observado que a presença e a carga parasitária de *T. cruzi* nos tecidos inflamados, detectada por métodos mais sensíveis, é relacionada

diretamente à intensidade dos processos inflamatórios e à gravidade clínica. Ademais, não há correlação entre os níveis de anticorpos *anti-self* e a gravidade da doença; e que a quimioterapia antiparasitária leva a desfecho clínico mais favorável, demonstrando a importância do desenvolvimento de novos e mais eficazes quimioterápicos (COURA, 2007; URBINA, 2009).

2.2. Quimioterapia antichagásica

2.2.1. Alvos moleculares em estudo

2.2.1.1. Biossíntese de esteróis

Esteroides são compostos com estrutura ciclopentano[a]peridrofenantênica, com uma ou mais cisões, expansões ou contrações de anéis, sendo comum a presença do grupo metila em C-10 ou C-13 e cadeia alquílica em C-17. Esteróis são esteroides com um grupo hidroxílico em C-3 e são essenciais à vida eucariótica por serem constituintes da membrana plasmática. Eles modulam indiretamente a atividade de proteínas de membrana como enzimas, canais iônicos e componentes de vias de transdução celular pela modulação direta da fluidez e permeabilidade da membrana celular. Tais compostos também são precursores de moléculas bioativas, como hormônios esteroides humanos, hormônios brassinosteroides de plantas e ecdisteroides de plantas e insetos (MOSS, 1989; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011).

Figura 9 – Estrutura geral de esteróis, com nomenclatura dos anéis e respectivos átomos de carbono.

A estrutura dos esteróis é variável de acordo com o filo do organismo correspondente. Em mamíferos, predomina o colesterol (ZEELEN, 1997). Em fungos e protozoários tem-se o ergosterol (ALCAZAR-FUOLI et al., 2008), ao passo que as plantas possuem sitosterol (DESAI et al., 2009). A biossíntese de tais compostos pode ocorrer por duas vias: diferente de mevalonato (vias do 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulose ou do 4-fosfato de 2C-metil-D-eritritol) (ROHMER, 1999; HUNTER, 2007; SANTOS et al., 2012), presente em plantas e insetos, e a via do mevalonato, presente em mamíferos, fungos, plantas e tripanossomatídeos. (URBINA, 2009; LEPESHEVA, WATERMAN, 2011;).

A via do mevalonato está representada à Figura 10:

Figura 10 – Biossíntese de esteróis pela via do mevalonato (adaptado de BERG et al., 2002; BUHAESCU; IZZEDINE, 2007; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011).

Algumas enzimas da via do mevalonato são alvos moleculares em humanos, como a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), que pode ser inibida por estatinas, utilizadas no tratamento de hipercolesterolemias (CORCOS; LE JOSSIC-CORCOS, 2013); a farnesil pirofosfato sintetase, alvo de bisfosfonatos no tratamento da osteoporose (RÄIKKÖNEN et al., 2011), e a esqualeno sintetase, inibida por derivados quinuclidínicos (KOUROUNAKIS; MATRALIS; NIKITAKIS, 2010).

Os derivados do 2,3-epóxido-esqualeno: lanosterol, 24,25-diidrolanosterol, 24-metilenodiidrolanosterol, norlanosterol, cicloartenol e obtusifoliol podem ser submetidos reações de desmetilação oxidativa para originarem o produto final da via por uma monooxigenase do citocromo P450, a esterol 14 α -desmetilase (gene da família *CYP51*). O mecanismo dessa envolve três passos (Figura 11) e pode gerar colesterol, ergosterol, sitosterol ou demais esteróis funcionais (Figura 12).

Figura 11 – Mecanismo da reação de desmetilação pela enzima esterol 14 α -desmetilase; R1 = H ou CH₃; R2 = CH₂ ou CH₃ (adaptado de LEPESHEVA; WATERMAN, 2011).

Figura 12 – Produtos da 14 α -esterol desmetilase (LEPESHEVA; WATERMAN, 2011).

A inibição da 14 α -esterol desmetilase (CYP51) tem se mostrado como estratégia interessante no desenvolvimento de novos agentes tripanomicidas por ser um alvo validado pela existência de antifúngicos imidazólicos e triazólicos, amplamente utilizados na terapêutica (Figura 13). A ação desses fármacos acarreta o acúmulo de esteróis metilados tóxicos para o parasita, que leva a alterações na parede celular e prejuízos à sua capacidade de replicação celular, levando-o à morte (URBINA et al., 2003).

A proteína (Figura 14) possui 481 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 55 kDa. Diferentemente de outros citocromos P450, tem o sítio ativo bastante rígido, com deslocamento máximo de 1,5 Å da hélice I (região da Ala²⁹¹), quando inibida de forma competitiva por um anel azólico. Tal rigidez facilita o planejamento de inibidores com base na estrutura da enzima (Seção 2.3) (LEPESHEVA et al., 2006).

Figura 13 – Estrutura dos antifúngicos azólicos atualmente disponíveis na terapêutica.

Figura 14 – Estrutura da 14 α -esterol desmetilase de *T. cruzi* (3KHM, 2,85 Å), inibida pelo fluconazol. O grupo heme está representado em vermelho e o fluconazol em azul.

A catálise se dá pelos seguintes passos: 1) posicionamento do grupo 14 α -metílico a cerca de 5 Å acima do plano do grupo heme; 2) acepção de um elétron da enzima citocromo P450 redutase (CPR) e redução do átomo de ferro do estado inativo (Fe^{3+} , férrico) para o estado ativo (Fe^{2+} , ferroso); 3) Esse estado permite a ligação de molécula de oxigênio ao Fe^{2+} ; 4) transferência de um segundo elétron, reduzindo o oxigênio ligado; 5) ataque, em etapa concertada, de um par de elétrons da superfície da proteína ao oxigênio molecular reduzido, cindindo-o e, simultaneamente, formando molécula de água e hidroxilando o grupo metílico do substrato; 6) ocorrência de novos ciclos catalíticos pela transferência de elétrons da CPR, convertendo o grupo 14 α -alcoólico a 14 α -aldeído, levando, por último, à formação de ácido fórmico e dupla ligação entre os carbonos 14 e 15 do anel D do esterol substrato. O mecanismo exato dessas transformações ainda não é conhecido, sendo propostas duas hipóteses: radicalar e iônica (oxidação de Baeyer-Villiger) (LEPESHEVA; WATERMAN, 2007, 2011).

Derivados de compostos nitro-heterocíclicos (piridinas, pirimidinas, imidazóis e triazóis) se coordenam fortemente ao ferro, afetando a ligação do substrato e sua catálise. Quando a enzima não está ligada a um substrato ou a um ligante, uma molécula de água se coordena em seu lugar (PORTAL et al., 2008; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011; BUCKNER; URBINA, 2012) .

A CYP51 de *T. cruzi* (CYP51_{TC}), apesar de se assemelhar mais à enzima ortóloga humana (CYP51_H) do que às bacterianas, apresenta baixa similaridade de estrutura primária em relação à CYP51_H (25-26%) e baixa identidade em relação a outros filos (22-30%). Dessa maneira, compostos antifúngicos azólicos podem não demonstrar atividade semelhante frente à CYP51_{TC} e vice-versa. Analogamente, podem-se explorar essas diferenças no desenvolvimento de novos fármacos seletivos para a enzima parasitária, dotados, portanto, de poucos efeitos adversos (CHEN et al., 2010; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011).

Dentre os antifúngicos azólicos, se destaca o posaconazol, que mostrou considerável atividade tripanomicida. Até 2013, encontrava-se em estudos clínicos de

fase 2 para a fase crônica na Espanha, comparando-se com o placebo (Merck, ClinicalTrials.gov ID NCT01377480) e com benznidazol (*Hospital Universitari Vall d'Hebron Research Institute*, ClinicalTrials.gov ID NCT01162967). Os estudos evidenciaram que a eficácia do posaconazol é variável entre as cepas de *T. cruzi*, não sendo eficaz em vários casos (MORAES et al., 2014).

Existem muitos outros compostos promissores em estudo, destacando-se o E-1224 (Eisai, Japão), pró-fármaco do ravuconazol, cujos estudos clínicos de fase 2 iniciaram-se na Bolívia; e o TAK-187 (Takeda, Japão), que finalizou recentemente os estudos de fase 1. Também se demonstrou recentemente que o VNI, (R)-N-(1-(2,4-diclorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)-etil)-4-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-benzamida é capaz de curar a fase crônica em modelo murino (CLAYTON, 2010; VILLALTA et al., 2013).

Figura 15 – Inibidores da 14DM_{TC} atualmente em estudo.

Mesmo sendo a CYP51_{TC} um alvo interessante, outros compostos promissores para a cura da doença de Chagas atuam na via de síntese do ergosterol. Por exemplo, os bisfosfonatos como risedronato, pamidronato e ibandronato (Figura 16) são inibidores da farnesil pirofosfato sintetase e, também, atuam nos acidocalcissomas, organelas exclusivas do parasita que regulam o armazenamento de cátions e modulam

a atividade de ATPases e pirofosfatases (COURA; CASTRO, 2002; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011; RÄIKKÖNEN et al., 2011; URBINA, 2009; WHO, 2012).

Figura 16 – Estrutura dos compostos bisfosfonatos.

O tipifarnibe (Figura 17) tem sido estudado por ser inibidor da farnesil transferase, apresentando atividade tripanomicida muito superior à esperada por ser um inibidor reversível em ensaios feitos na enzima *in vitro*. Novos análogos estão sendo sintetizados buscando menor toxicidade (CHEN et al., 2010; ANDRIANI et al., 2013; BUCKNER; URBINA, 2012; UPADHAYAYA et al., 2013).

Figura 17 – Estrutura do tipifarnibe e exemplo de análogo em estudo, inibidores da farnesil transferase.

Observou-se, também que a amiodarona (Figura 18), fármaco utilizado no tratamento de arritmias cardíacas, e seu análogo dronedarona (Figura 18) também possuem efeitos inibitórios sobre a biossíntese do ergosterol, diminuindo a parasitemia

em pacientes crônicos. O mecanismo exato ainda não é determinado (URBINA, 2009; CLAYTON, 2010; VEIGA-SANTOS et al., 2012).

Figura 18 – Estrutura da amiodarona e dronedarona.

2.2.1.2. Cisteína proteases

As cisteína proteases são enzimas que clivam ligações peptídicas por um mecanismo envolvendo um tiol em seu sítio ativo e são essenciais no metabolismo de diversos organismos. Em parasitas, tais enzimas são relacionadas aos processos de invasão celular, evasões do sistema imune do hospedeiro e desenvolvimento celular, sendo, dessa maneira, fatores de virulência e alvos relevantes no desenvolvimento de novos agentes antiparasitários. A cisteína protease do *T. cruzi* de maior destaque é a cruzipaina (*gp57/51*), a mais abundante e imunogênica enzima dessa classe (COURA; CASTRO, 2002; DEL NERY et al., 1997; OSORIO et al., 2012; SAJID; MCKERROW, 2002).

A cruzipaina possui massa molecular de aproximadamente 60 kDa, sendo homóloga às catepsinas presentes em humanos. São expressas em organelas lisossômicas e algumas isoformas, de acordo com o estágio de desenvolvimento e condições de estresse, são ligadas à membrana plasmática por uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI), em todas as formas do parasita. Algumas isoformas de cruzipaina são secretadas ao meio extracelular por tripomastigotas (DEL NERY et al., 1997; HUANG; BRINEN; ELLMAN, 2003; OSORIO et al., 2012).

Dois mecanismos para a invasão celular mediada por cruzipaína são estabelecidos, o primeiro, relacionado à sua capacidade de gerar bradicinina, aumentando a expressão de receptores de bradicinina do tipo 2 (B₂R) e mobilizando o influxo de Ca²⁺ na célula do hospedeiro; o segundo, decorrente de seu potencial imunogênico, que induz resposta imune inicial do tipo Th1, envolvendo a ativação de macrófagos, produção de IFN- γ , e à sensibilização que leva à produção de anticorpos e interleucina 4. Tais eventos podem acarretar reações cruzadas de autoimunidade (MCKERROW et al., 2006; OSORIO et al., 2012).

A forma recombinante da cruzipaína, amplamente utilizada para fins de isolamento, ensaios enzimáticos e cristalografia, é denominada cruzaína. A cruzaína possui 212 resíduos e preserva o sítio catalítico (Figura 19) (CAZZULO; STOKA; TURK, 2001; DU et al., 2002; HUANG; BRINEN; ELLMAN, 2003).

Figura 19 – Estrutura da cruzaína de *T. cruzi* (1ME3, 1,2 Å) ligada ao inibidor P10.

A catálise ocorre com o auxílio de uma tríade de aminoácidos recorrente nas enzimas da família da papaína, Cys²⁵, His¹⁵⁹ e Asn¹⁷⁵, na qual o tiol desprotonado da cisteína e o anel imidazólico da histidina mediam a catálise, enquanto a asparagina direciona a histidina por meio de ligação de hidrogênio para a posição ótima de catálise. As regiões S₂, S₁ e S₁' se ligam à cadeia principal do peptídeo e a algumas cadeias laterais, enquanto as regiões S₃ e S₂' se ligam à cadeia lateral, e essas interações permitem a regiosseletividade da proteólise (Figura 20) (GRZONKA et al., 2001; OTTO; SCHIRMEISTER, 1997).

Figura 20 – Representação do posicionamento da protease (acima) em relação ao substrato (abaixo).

Dentre os inibidores da cruzaína, se destacam as tiossemicarbazonas lineares e cíclicas, fragmentos moleculares amplamente utilizados na busca por compostos tripanomicidas, cujo mecanismo de inibição é proposto por Du e colaboradores (2002) (Figura 21). Os análogos de diazometano e fluoro-metil-cetona são inibidores que podem apresentar potência de inibição da ordem de nanomolar (ENGEL et al., 1998; HUANG; BRINEN; ELLMAN, 2003). Ademais, o composto K-777 (*N*-metil-piperazina-uréia-Phe-homo-Phe-vinil-fenil-sulfona) é inibidor que se encontra em preparação para estudos clínicos de fase 1 (CLAYTON, 2010; URBINA, 2009; WHO, 2007). As estruturas estão representadas na Figura 22.

Figura 21 – Mecanismo de inibição da cruzaina por tiossemicarbazonas (adaptado de DU et al., 2002).

Figura 22 – Exemplos de estruturas de inibidores da cruzaina.

2.2.1.3. Metabolismo de espécies reativas de oxigênio

Os tripanossomatídeos são organismos aeróbios e estão expostos a espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\bullet$) e radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) gerados em seu citoplasma e mitocôndrias, pela atuação de cofatores, sistema imune do hospedeiro e metabolismo de compostos bioativos.

O metabolismo de destoxificação redox do *Trypanosoma cruzi* difere daquele dos mamíferos pela ausência de catalase e glutatona, sendo substituídos pela tripanotiona (N^1 - N^8 -bis(glutationil)-espermidina, Figura 23), que juntamente com triparedoxinas (TXN), triparedoxina peroxidases (TcCPX e TcMPX, citoplasmática e mitocondrial, respectivamente) glutatona peroxidases (TcGPXI a TcGPXIV) e peroxiredoxinas, constituem o arsenal para o reequilíbrio do balanço oxidativo no parasita, como representado à Figura 24 (FAIRLAMB; CERAMI, 1992; OSORIO et al., 2012).

Figura 23 – Redução da tripanotiona à sua forma reduzida pela tripanotiona redutase.

Figura 24 – Sistema da tripanotiona peroxidase (adaptado de FAIRLAMB; CERAMI, 1992).

Contudo, o parasita apresenta acentuada sensibilidade a nitrocompostos, dependendo, também, da atuação de quatro tipos de superóxido dismutases (SOD) para a biotransformação desses compostos (Figura 25).

Figura 25 – Biotransformação de nitrocompostos em *T. cruzi* (adaptado de FAIRLAMB; CERAMI, 1992; OSORIO et al., 2012).

Dessa maneira, a tripanotiona redutase (TR) (Figura 26) é um alvo molecular promissor e tanto sua inibição quanto a utilização de nitrocompostos são abordagens válidas para a quimioterapia da tripanossomíase. Os dois únicos fármacos utilizados na terapia antichagásica são nitrocompostos, o que corrobora esse argumento (Seção 2.2.2) (OLIN-SANDOVAL et al., 2012; URBINA; DOCAMPO, 2003; URBINA, 2009).

Figura 26 – Estrutura da tripanotiona redutase de *T. cruzi* (1AOG, 2,3 Å) com o cofator FAD ligado (flavina-adenina dinucleotídeo, em magenta). (ZHANG et al., 1996).

Apesar do desenvolvimento de inúmeros inibidores da TR nos últimos 15 anos, ainda não se obteve cura parasitológica satisfatória e os compostos possuem pouca seletividade. Entretanto, derivados da fenotiazina e outras substâncias psicoativas (Figura 27) têm se mostrado capazes de diminuir a parasitemia, a mortalidade e o dano cardíaco em modelo murino pela inibição da TR (BUCKNER; URBINA, 2012; JONES et al., 2010; RIVAROLA; PAGLINI-OLIVA, 2002).

Figura 27 – Compostos psicoativos com atividade inibidora da TR.

Fármaco interessante que atua por diversos mecanismos, dentre eles, a formação de um nitroânion tóxico ao parasita, é o nitrofural (NF) (Figura 29), um antimicrobiano ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Este apresenta, em adição a essas ações, atividade tripanomicida e cura parasitológica em modelo murino, embora com problemas de resistência em amastigotas e graves efeitos colaterais em humanos. Entre as décadas de 1960 e 1970, sabendo-se da atividade promissora de derivados de nitro-heterocíclicos, desenvolveram-se os fármacos nifurtimox (NFX) e benznidazol (BZN) (Figura 31), utilizados até hoje na terapêutica. Estudando-se a síntese de pró-fármacos recíprocos do nitrofural e da primaquina, com espaçantes dipeptídicos diversos, obteve-se o derivado hidroximetilnitrofural (NFOH) em nosso laboratório

(LAPEN-FCF-USP) (CHUNG, 1996). Esse pró-fármaco mostrou-se quatro vezes menos mutagênico do que o predecessor NF e mais ativo do que o NFX e o BZN. Sabe-se, atualmente, que, por possuir o grupo semicarbazona, o NFOH também atua na inibição da cruzaina (CHUNG et al., 2003; COURA; CASTRO, 2002; DAVIES et al., 2010; TROSSINI et al., 2010; URBINA, 2009).

Figura 28 – Estruturas do NF e NFOH.

Demonstrou-se, também, que compostos liberadores de óxido nítrico, como complexos de rutênio (Figura 29), têm atividade tripanomicida em modelo murino pela nitrosilação da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GADPH) do parasita, enzima essencial na via glicolítica (SERAFIM et al., 2012).

Figura 29 – Complexos de rutênio liberadores de óxido nítrico.

2.2.1.4. Outros alvos e compostos em estudo

Outros compostos em estudo atuam por outras vias, como o alopurinol, fármaco utilizado no tratamento da gota. Trata-se de análogo de bases purínicas do DNA, que é incorporado ao DNA parasitário pela ação da hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT), prejudicando a síntese de RNA e causando morte celular. O alopurinol se mostrou ativo em modelos animais, mas com grande variabilidade de atividade entre diferentes cepas de *T. cruzi* e diferenças entre indivíduos. Hoje a HGPRT é um alvo validado e se pesquisam novos inibidores (BIOLO; RIBEIRO; CLAUSELL, 2010; CAZZULO; STOKA; TURK, 2001; URBINA, 2009).

Alguns compostos naturais como flavonoides e ácidos anacárdicos também têm recebido atenção por serem inibidores da GADPH de *T. cruzi*, se destacando o ácido (8*E*, 11*E*, 14*E*)-anacárdico, detectado por triagem bioquímica de vários compostos (FREITAS et al., 2009; ROMERO; MORILLA, 2010).

Um alvo recentemente explorado, a flavoenzima diidroorotato desidrogenase (TcDHODH), que catalisa uma reação redox em que o diidroorotato é oxidado a orotato e fumarato é reduzido a succinato, se mostrou essencial para a síntese *de novo* de nucleosídeos pirimidínicos e para a vida do parasita, que não é capaz de obtê-los do meio. Dessa maneira, análogos do diidroorotato podem ser inibidores da TcDHODH e potenciais tripanomicidas (CHELESKI et al., 2010).

Figura 30 – Estrutura de compostos atualmente em estudo para o desenvolvimento de novos fármacos com ação tripanomicida.

2.2.2. Fármacos atualmente utilizados na terapêutica

Os únicos fármacos atualmente disponíveis para o tratamento específico da tripanossomíase americana no mundo são o nifurtimox (Bayer, 1,1-dióxido de 5-nitrofurano-(3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamina)tetraidro-4*H*-1,4-tiazina)) e o benznidazol (*N*-benzil-2-nitroimidazol acetamida) (Figura 31). No Brasil, apenas o benznidazol é utilizado. Tais fármacos apresentam cura parasitológica de até 80% dos pacientes na fase aguda e o benznidazol pode promover cura parasitológica em mais de 95% de casos congênitos, entre 60 e 70% de crianças até os 14 anos de idade no início da fase crônica e entre 50 e 60% de casos crônicos recentes em adultos, não sendo recomendado durante a gestação. Os objetivos do tratamento são curar a infecção, prevenir a transmissão e lesões orgânicas causadas pelo parasita (BUCKNER; URBINA, 2012; COURA; CASTRO, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; OLIN-SANDOVAL et al., 2012; URBINA, 2009; WHO, 2012).

Figura 31 – Estruturas do nifurtimox e do benznidazol.

O benznidazol é apresentado em comprimidos de 100 mg e em formulação pediátrica de 12,5 mg. A dose máxima diária não deve ultrapassar 300 mg. Atualmente, é produzido por um laboratório público (Lafepe), o único no mundo a fabricar o medicamento. Entre abril e outubro de 2011 houve problemas pela interrupção na fabricação do medicamento, o que evidencia a necessidade de melhorias na fabricação e da atenção das indústrias farmacêuticas para o problema (DNDI, 2012; MIGUEL, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; SASSINE, 2012).

Os graves efeitos adversos e a ineficácia na cura da fase crônica são ainda grandes problemas desses fármacos. Apesar da similaridade estrutural, ainda não se

conhece a razão da diferença de eficácia dos dois fármacos na fase aguda e crônica na doença e seus mecanismos de toxicidade diferem. O nifurtimox atua na geração de EROs, enquanto o benznidazol atua na nitrorredução de macromoléculas (ABAD-FRANCH; SANTOS; SCHOFIELD, 2010; URBINA, 2010).

Nesse contexto, o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos para a doença de Chagas se torna imprescindível.

2.3. Planejamento de novos fármacos

2.3.1. Planejamento Racional

Define-se planejamento racional de fármacos como o planejamento de fármacos “sob medida”, em oposição à descoberta puramente empírica dessas substâncias, ou seja, utilizando-se base lógica e teórica. O processo é complexo, demorado e custoso, e demanda a intersecção de diversas áreas como bioquímica, síntese orgânica, biofísica, química computacional, biologia molecular e biotecnologia (BARREIRO, 2002; KOROLKOVAS; FERREIRA, 1988).

Métodos diversos são utilizados atualmente para o planejamento racional de fármacos, que, de maneira geral, seguem uma das seguintes estratégias: (i) planejamento baseado na estrutura do receptor (*structure-based drug design*, SBDD): desenvolvimento de pequenas moléculas com características determinadas em função da interação com biomacromoléculas alvo (usualmente proteínas e ácidos nucleicos), cuja função nos processos celulares e informações estruturais tridimensionais já são conhecidas, e (ii) planejamento baseado na estrutura do ligante (*ligand-based drug design*, LBDD): desenvolvimento de pequenas moléculas com características determinadas em função de uma determinada atividade biológica e, nesse caso, o alvo pode não ser conhecido ou carecer de informações estruturais (KOROLKOVAS; FERREIRA, 1988; MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009).

Nesse panorama, a modificação molecular, que consiste na obtenção de estruturas análogas, homólogas ou congêneres em relação a um dado fármaco ou composto

bioativo para a otimização de suas propriedades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas, é um conjunto eficiente de métodos para a obtenção de novos compostos (BARREIRO; FRAGA, 2008; MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009; MONTANARI; BOLZANI, 2001; SELICK; BERESFORD; TARBIT, 2002). Entre os processos de modificação molecular, destaca-se o bioisosterismo (CIAPETTI; GIETHLEN, 2003; LIMA; BARREIRO, 2005)

2.3.2. Bioisosterismo

Originalmente o termo isótero foi cunhado por Langmuir para denominar grupos de substâncias que possuem o mesmo número de elétrons de valência (isoeletrônicas). Em 1925, Grimm formulou a lei do deslocamento do hidreto, na qual a adição de um hidreto a um átomo gera um pseudoátomo com propriedades semelhantes ao átomo correspondente da família seguinte na tabela periódica (Figura 32). Posteriormente, Erlenmeyer expandiu o conceito para definir átomos, íons e elementos isoeletrônicos. A primeira utilização do termo bioisótero foi feita por Friedman na década de 1950 para designar compostos estruturalmente semelhantes com ações biológicas similares ou antagonistas e Thornber propôs que se considerasse a similaridade de propriedades físico-químicas.

Burger, em 1991, definiu bioisósteros como “compostos ou grupos que possuem formas e volumes moleculares aproximadamente similares, aproximadamente a mesma distribuição de elétrons e exibem propriedades físico-químicas similares” (CIAPETTI; GIETHLEN, 2003; LIMA; BARREIRO, 2005).

Na definição mais recente da IUPAC, bioisosterismo é um método de modificação molecular que consiste na criação de um novo composto com propriedades biológicas similares ao composto original por meio da troca de um átomo ou grupo de átomos por outro átomo ou grupo de átomos, amplamente similares. Os compostos resultantes desse processo são denominados bioisósteros (WERMUTH et al., 1998).

	Grupo 4A	Grupo 5A	Grupo 6A	Grupo 7A	Grupo 8A	
Número de elétrons na camada de valência	6	7	8	9	10	11
	C	N	O	F	Ne	Na ⁺
	+H ⁻ ↘	CH	NH	OH	FH	
		+H ⁻ ↘	CH ₂	NH ₂	OH ₂	FH ₂ ⁺
			+H ⁻ ↘	CH ₃	NH ₃	OH ₃ ⁺
				+H ⁻ ↘	CH ₄	NH ₄ ⁺

Figura 32 – A lei de Grimm do deslocamento de hidreto.

Presentemente, bioisósteros podem ser classificados em clássicos (monovalentes, divalentes, trivalentes, átomos tetrassubstituídos e equivalentes anelares) e não-clássicos (troca entre anéis e estruturas acíclicas; grupos funcionais intercambiáveis) (LEMKE; WILLIAMS, 2007).

Um exemplo de bioisosterismo clássico monovalente é a substituição de um átomo de hidrogênio por um átomo de flúor para o aumento da estabilidade metabólica (Figura 33). O fármaco antineoplásico fluoruracila mimetiza o substrato natural da timidilato sintetase, e o produto final é menos reativo, inviabilizando a síntese de DNA da célula tumoral (PATANI; LAVOIE, 1996).

Figura 33 – Bioisosterismo clássico monovalente, troca de H por F.

A sildenafil e a vardenafil (Figura 34), inibidores da fosfodiesterase 5 humana, ambos fármacos utilizados no tratamento da disfunção erétil masculina, são bioisósteros clássicos de equivalência anelar (LIMA; BARREIRO, 2005):

Figura 34 – Caso de bioisosterismo clássico de equivalência anelar.

A metiamida é um antagonista de receptor histamínico H_2 , cuja utilização promove dano renal e agranulocitose pela presença do grupo tiouréia. A substituição bioisostérica não-clássica do grupo funcional tiouréia por cianoguanidina elimina esses efeitos, viabilizando a sua utilização na terapia antiúlcera (DURANT et al., 1977):

Figura 35 – Caso de bioisosterismo não clássico de troca de grupo funcional.

O bioisosterismo, numa definição mais ampla, também pode ocorrer entre compostos cíclicos e não-cíclicos, como se observa no exemplo do estradiol e do dietilestilbestrol (Figura 36), que possuem estruturas bem diferentes, mas atividades biológicas similares (BLANCHARD; STUART; TALLMAN, 1943).

Figura 36 – Bioisosterismo não-clássico entre composto cíclico e não-cíclico.

Outro tipo de bioisosterismo é denominado retroisosterismo, no qual ocorre a inversão de um determinado grupo funcional com os mesmos propósitos de otimização de propriedades. A Figura 37 mostra a aplicação de retroisosterismo em derivados lábeis do ácido hidroxicinâmico, inibidores da síntese de leucotrienos. O composto obtido (A 36162), mais estável, mostrou concentrações plasmáticas e tempo de meia-vida maiores (LIMA; BARREIRO, 2005):

Figura 37 – Aplicação de retroisosterismo na busca de um composto mais estável.

Assim, a aplicação do bioisosterismo é uma poderosa ferramenta no planejamento de novos fármacos, permitindo contornar problemas relacionados à reatividade da estrutura do composto, melhorar a potência e modificar sua absorção, distribuição, biotransformação, eliminação e toxicidade (ADMET), determinantes no sucesso desenvolvimento de um composto líder (MANHOLD; KUBINYI; FOLKERS, 2012).

2.3.5. Modelagem molecular

Define-se modelagem molecular como a investigação das estruturas e das propriedades moleculares usando a química computacional e as técnicas de visualização gráfica visando a fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT'ANNA, 2002). Tais investigações são de extrema importância na compreensão dos processos de reconhecimento molecular, pois podem auxiliar na busca por novos candidatos a fármacos, cuja interação com seus receptores é regida por propriedades espaciais e energéticas (COHEN, 1996). Técnicas de modelagem molecular incluem os métodos de ancoragem molecular (*docking*), simulações de dinâmica molecular, cálculos de campos de interação molecular e construção de modelos por homologia e têm contribuído, amplamente, para a descoberta de novos fármacos (HUANG et al., 2010)

2.3.5.1. Docking e triagem virtual

O *docking* ou ancoragem molecular é a tentativa de se prever as estruturas do complexo intermolecular formado entre duas ou mais moléculas, usualmente uma proteína (biomacromolécula alvo) e um inibidor (ligante) (LEACH, 2001). A predição do modo de ligação de uma molécula ligante na região de ligação de um alvo molecular é

denominada de “problema de *docking* receptor-ligante” e é de extrema importância para o SBDD por possibilitar a predição da afinidade entre ligantes e receptores antes mesmo que os ligantes sejam sintetizados. Essa abordagem tem se popularizado em razão do aumento do número de estruturas disponíveis determinadas por cristalografia de raio X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (BLANEY; DIXON, 1993; JONES; WILLETT, 1995; KUNTZ, 1992).

A conformação do ligante em seu sítio de ligação pode ser determinada manualmente ou por algoritmos automatizados, denominados algoritmos de busca. Tais algoritmos são menos enviesados e costumam considerar um espaço amostral maior de possibilidades conformacionais. Os algoritmos utilizados consideram os graus de liberdade rotacionais dos diedros do ligante e os resíduos do sítio de interação são usualmente considerados rígidos. As diversas abordagens que são utilizadas para gerar um conjunto de possíveis conformações do ligante no sítio ativo incluem o alinhamento por mínimos quadrados parciais, construção incremental do ligante no sítio ativo, dinâmica molecular do complexo, método de Monte Carlo e algoritmos genéticos (KITCHEN et al., 2004; LEACH, 2001).

Os algoritmos de busca podem gerar um grande número de soluções possíveis, algumas delas impossíveis pela sobreposição com a biomacromolécula. As demais soluções devem ser, então, selecionadas a fim de se obter a solução mais fidedigna possível à interação real. Tal seleção pode ser feita classificando-se as conformações em função da energia de interação. As interações alvo-ligante são regidas por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos, que podem ser estimados conhecendo-se a energia livre de ligação de Gibbs (ΔG_{lig}), relacionada diretamente à constante de inibição K_i , medida experimentalmente. O cálculo de ΔG_{lig} , entretanto, é muitas vezes computacionalmente proibitivo, sendo necessário utilizar métodos complexos para sua estimativa. Em virtude disso, diversos algoritmos de avaliação de energia de interação (função de *score*) receptor-ligante têm sido desenvolvidos (LEACH, 2001; MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2007).

Pelo método de *docking*, grandes bibliotecas virtuais de ligantes podem ser triadas virtualmente em um planejamento baseado na estrutura do receptor. De fato, há na literatura diversos exemplos de compostos promissores obtidos por essa abordagem. Tais métodos são úteis por reduzir o número de compostos com que se trabalha, principalmente por eliminar os que não são cumprem os critérios de complementaridade estrutural, diminuindo tempo e custos com síntese, caracterização e ensaios biológicos (KITCHEN et al., 2004). A Figura 38 mostra exemplo de *docking* entre a 14 α -esterol desmetilase e ligante triazólico.

Figura 38 – Exemplo de docking de ligante 1,2,3-triazólico em 14 α -esterol desmetilase de *T. cruzi* (ZOU et al., 2012). O ligante está na cor amarela.

2.3.5.1. Campos de interação molecular

. Campos de interação moleculares (*Molecular Interaction Fields*, MIFs) são matrizes formadas pelos valores de energia de interação entre uma molécula alvo (macromolécula ou ligante) e uma sonda (pseudoátomo representante de um grupo químico pequeno) realizado para todos os pontos de uma grade tridimensional pré-determinada. Essa matriz pode ser convertida para uma representação visual, possibilitando a identificação de regiões mais favoráveis de interação de um ligante ou regiões seletivas para uma dada sonda em um sítio ativo enzimático. (BRAIUCA et al., 2004; PASTOR; CRUCIANI; WATSON, 1997; PASTOR; CRUCIANI, 1995). Os métodos de cálculo de energia podem utilizar uma função empírica de energia com termos independentes, que levam em consideração a energia associada às ligações de hidrogênio, potencial de Lennard-Jones e potencial eletrostático. (CAROSATI; SCIABOLA; CRUCIANI, 2004; GOODFORD, 1985; WADE; CLARK; GOODFORD, 1993; WADE; GOODFORD, 1993).

O método GRID é amplamente utilizado para cálculos de MIFs, consagrado por ter sido essencial no planejamento do fármaco zanamivir. O protótipo avaliado no estudo, análogo do ácido siálico, não era eficaz em modelos animais de infecção. Ao se realizar o estudo de MIFs do sítio ativo da sialidase, observou-se que havia um bolsão favorável à interação com grupos guanidínicos (Figura 39). A adição de um grupo guanidínico ao protótipo aumentou a potência e a seletividade do composto, resultando no fármaco supracitado, primeiro antiviral seletivo para o vírus da *influenza* (ITZENSTEIN et al., 1993) .

Figura 39 – Sítio ativo da sialidase do vírus *influenza* cristalografada com o fármaco zanamivir e campo de interação molecular para a sonda de guanidina.

Métodos quimiométricos, como análise de componente principal (PCA), podem ser combinados ao estudo de MIFs, e têm sido utilizados para identificar regiões em enzimas alvo que podem ser exploradas na obtenção de interações seletivas (KASTENHOLZ et al., 2000; RIDDERSTRÖM et al., 2001; ROCHA; FREITAS; MONTANARI, 2010).

3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

3.1. Objetivos gerais

Face à atual situação da doença de Chagas e à urgente necessidade de novos fármacos que apresentem ação eficaz contra essa parasitose e considerando-se a atividade promissora do NFOH, o bioisosterismo como processo de modificação molecular de grande importância e a ação inibitória de derivados 1,2,4-triazólicos frente à esterase 14α -desmetilase, os objetivos desse trabalho são o planejamento, a síntese e a avaliação da atividade tripanomicida e citotoxicidade *in vitro* de análogos 1,2,4-triazólicos do NFOH e seus análogos, visando à sua otimização.

3.2. Objetivos específicos

- Planejamento de análogos inéditos do NFOH, utilizando-se as estratégias de modificação molecular por bioisosterismo;
- Triagem virtual das séries planejadas pelo método de *docking*;
- Exploração das características estruturais do sítio ativo da CYP51 humana e de *T. cruzi* que favoreceriam maior seletividade para a enzima parasitária utilizando o método de GRID/PCA;
- Síntese e caracterização estrutural dos análogos selecionados pela triagem virtual;
- Determinação da atividade tripanomicida dos compostos sintetizados contra amastigotas de *T. cruzi*;
- Determinação da citotoxicidade dos compostos sintetizados em células U2OS (células de osteosarcoma humano).

4. PLANEJAMENTO DAS SÉRIES PROPOSTAS

4. PLANEJAMENTO DAS SÉRIES PROPOSTAS

Para o presente trabalho, propuseram-se duas séries de análogos de NF e NFOH:

Figura 40 – Séries planejadas.

Nas séries propostas, pela estratégia de bioisosterismo, substituiu-se o anel furânico dos protótipos pelo grupo 1,2,4-triazólico, a fim de se direcionar a ação dos compostos para a inibição da CYP51 parasitária (LEPESHEVA et al., 2010). Tais anéis podem ou não conter o grupo nitro na posição 3, responsável pela geração de EROs tóxicas ao parasita (FAIRLAMB; CERAMI, 1992). Sabe-se que o mecanismo de inibição pelos antifúngicos azólicos envolve a coordenação do nitrogênio 4 do anel triazólico com o átomo de ferro do grupo heme. Dessa maneira, pretende-se avaliar na triagem virtual de que maneira a presença do grupo nitro interfere na complementaridade estrutural dos análogos propostos com o sítio ativo da CYP51

parasitária e, por ensaios biológicos, se a presença do grupo nitro interfere na atividade tripanomicida e citotoxicidade.

A série 1 apresenta o espaçamento de um carbono entre o grupamento triazólico e a cadeia hidrazônica, de maneira semelhante aos protótipos. Nela se propõe a substituição do átomo de hidrogênio do carbono imínico dos protótipos por grupos R_2 , que podem ser: hidrogênio, semelhantes às moléculas protótipo, aromáticos ou alifáticos, para a avaliação da influência da substituição nessa posição na afinidade pela CYP51 parasitária. Grupos hidrofóbicos ligados a sistemas triazólicos tendem a ocupar o canal de acesso ao sítio ativo da enzima, internalizado, à semelhança do posaconazol, e promovem melhor interação (LEPESHEVA et al., 2010).

A série 2 envolve o espaçamento de dois carbonos entre o grupamento triazólico e um anel 2,4-difluorofenílico, de maneira semelhante a outros fármacos inibidores da CYP51, como o posaconazol e fluconazol (BUCKNER; URBINA, 2012). Tal substituição é feita para se avaliar a influência da presença desse arcabouço estrutural na afinidade pela CYP51 parasitária.

Ambas as séries possuem cadeia hidrazônica lateral, variando-se o substituinte X com o intuito de se avaliar a influência da substituição do átomo de oxigênio dos protótipos por seus bioisósteros clássicos na atividade biológica, considerando-se a inibição da cruzaina por grupamentos tiossemicarbazônicos (DU et al., 2002). Hidrazonas podem se apresentar na configuração E ou Z e ambas as configurações foram consideradas no planejamento das séries. Os análogos das séries 1 e 2 também podem ser ou não hidroximetilados na posição R_1 . Por essa substituição se pretendeu avaliar se os análogos hidroximetilados ($R_1 = CH_2OH$) são mais ativos e menos tóxicos que os não hidroximetilados ($R_1 = H$), à semelhança do NFOH em comparação ao seu protótipo, NF.

Tais modificações moleculares permitem, também, avaliar a influência dos diferentes substituintes em seus descritores físico-químicos, relacionadas ao perfil farmacocinético e farmacodinâmico dos ligantes.

Os ligantes propostos para a série 1 estão listados na Tabela III.

Tabela III. Ligantes propostos para a série A

Código do ligante E	Código do ligante Z	Y	R2	X	R1
1	73	-NO ₂	-H	O	H
2	74	-NO ₂	-CH ₃	O	H
3	75	-NO ₂	-CH ₂ CH ₃	O	H
4	76	-NO ₂		O	H
5	77	-NO ₂		O	H
6	78	-NO ₂	-H	O	-CH ₂ OH
7	79	-NO ₂	-CH ₃	O	-CH ₂ OH
8	80	-NO ₂	-CH ₂ CH ₃	O	-CH ₂ OH
9	81	-NO ₂		O	-CH ₂ OH
10	82	-NO ₂		O	-CH ₂ OH

Tabela III. Ligantes propostos para a série A (continuação)

Código do ligante E	Código do ligante Z	Y	R2	X	R1
11	83	-NO ₂	-H	S	H
12	84	-NO ₂	-CH ₃	S	H
13	85	-NO ₂	-CH ₂ CH ₃	S	H
14	86	-NO ₂		S	H
15	87	-NO ₂		S	H
16	88	-NO ₂	-H	S	-CH ₂ OH
17	89	-NO ₂	-CH ₃	S	-CH ₂ OH
18	90	-NO ₂	-CH ₂ CH ₃	S	-CH ₂ OH
19	91	-NO ₂		S	-CH ₂ OH
20	92	-NO ₂		S	-CH ₂ OH
21	93	-NO ₂	-H	NH	H
22	94	-NO ₂	-CH ₃	NH	H
23	95	-NO ₂	-CH ₂ CH ₃	NH	H
24	96	-NO ₂		NH	H
25	97	-NO ₂		NH	H

Tabela III. Ligantes propostos para a série A (continuação)

Código do ligante E	Código do ligante Z	Y	R2	X	R1
26	98	-NO ₂	-H	NH	-CH ₂ OH
27	99	-NO ₂	-CH ₃	NH	-CH ₂ OH
28	100	-NO ₂	-CH ₂ CH ₃	NH	-CH ₂ OH
29	101	-NO ₂		NH	-CH ₂ OH
30	102	-NO ₂		NH	-CH ₂ OH
31	103	H	-H	O	H
32	104	H	-CH ₃	O	H
33	105	H	-CH ₂ CH ₃	O	H
34	106	H		O	H
35	107	H		O	H
36	108	H	-H	O	-CH ₂ OH
37	109	H	-CH ₃	O	-CH ₂ OH
38	110	H	-CH ₂ CH ₃	O	-CH ₂ OH
39	111	H		O	-CH ₂ OH
40	112	H		O	-CH ₂ OH

Tabela III. Ligantes propostos para a série A (continuação)

Código do ligante E	Código do ligante Z	Y	R2	X	R1
41	113	H	-H	S	H
42	114	H	-CH ₃	S	H
43	115	H	-CH ₂ CH ₃	S	H
44	116	H		S	H
45	117	H		S	H
46	118	H	-H	S	-CH ₂ OH
47	119	H	-CH ₃	S	-CH ₂ OH
48	120	H	-CH ₂ CH ₃	S	-CH ₂ OH
49	121	H		S	-CH ₂ OH
50	122	H		S	-CH ₂ OH
51	123	H	-H	NH	H
52	124	H	-CH ₃	NH	H
53	125	H	-CH ₂ CH ₃	NH	H
54	126	H		NH	H
55	127	H		NH	H

Tabela III. Ligantes propostos para a série A (continuação)

Código do ligante E	Código do ligante Z	Y	R2	X	R1
56	128	H	-H	NH	-CH ₂ OH
57	129	H	-CH ₃	NH	-CH ₂ OH
58	130	H	-CH ₂ CH ₃	NH	-CH ₂ OH
59	131	H		NH	-CH ₂ OH
60	132	H		NH	-CH ₂ OH

Os ligantes propostos para a série 2 estão listados na Tabela IV.

Tabela IV. Ligantes propostos para a série B

Código do ligante E	Código do ligante Z	Y	X	R1
61	133	-NO ₂	O	H
62	134	-NO ₂	O	-CH ₂ OH
63	135	-NO ₂	S	H
64	136	-NO ₂	S	-CH ₂ OH
65	137	-NO ₂	NH	H

Tabela IV. Ligantes propostos para a série B (continuação)

Código do ligante E	Código do ligante Z	Y	X	R1
66	138	-NO ₂	NH	-CH ₂ OH
67	139	H	O	H
68	140	H	O	-CH ₂ OH
69	141	H	S	H
70	142	H	S	-CH ₂ OH
71	143	H	NH	H
72	144	H	NH	-CH ₂ OH

Dessa forma, o conjunto de ligantes propostos nesse trabalho totalizou 144 diferentes ligantes que foram triados por *docking* e os mais promissores, selecionados para síntese.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Docking

Realizou-se a simulação de *docking* considerando-se a proteína rígida e o ligante flexível, sem restrições. Entretanto, essa simulação não corrige imprecisões relacionadas a distâncias interatômicas e torções energeticamente desfavoráveis resultantes da construção dos modelos tridimensionais. Assim, efetuaram-se diversos testes para determinar o melhor algoritmo de minimização e se preparar, adequadamente, os ligantes. Para isso, desenhou-se a estrutura do ligante **66** e comparou-se com a estrutura cristalografada da (2,4-difluorofenil)-2-(3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-etanona (Figura 41), sintetizada durante este trabalho. Este composto teve a estrutura elucidada por cristalografia de raios X, em colaboração com o Prof. Dr. Antonio Carlos Doriguetto, da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Figura 41 – Estrutura cristalografada da (2,4-difluorofenil)-2-(3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-etanona (átomos de carbono estão representados em cinza, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e flúor em amarelo).

Ao todo, testaram-se sete algoritmos de minimização, sendo o melhor deles a combinação do método de declive máximo (SD) com o de gradientes conjugados (OtherCG), que resultou num RMSD de 0,340, conforme mostra a Tabela V.

Tabela V. Valores de RMSD obtidos por diferentes algoritmos de minimização

Método	RMSD
Powell	0,490
BFGS	0,625
ConjGrad	0,450
OtherCG	0,457
SD	0,839
SD + ConjGrad	0,362
SD + OtherCG	0,340

Para se determinar as melhores condições para o estudo de *docking*, realizaram-se estudos de *redocking*, utilizando a estrutura cristalografada da CYP51 de *T. cruzi* e o inibidor UDO ((S)-2-(4-clorofenil)-2-(piridina-3-il)-1-(4-(4-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-il)etanona) como ligante, co-cristalizado previamente. A estrutura desse complexo foi retirada do PDB (código 3GZ2) (LOKAREDDY et al., 2010). A estrutura foi escolhida por apresentar boa resolução em comparação com as demais estruturas depositadas no PDB (2,80 Å) e por apresentar conformação no sítio ativo favorável a um ligante com alta atividade ($EC_{50} = 7,5$ nM para amastigotas de *T. cruzi*, cepa Tulahuen). O ligante apresenta um grupamento piridínico, cujo nitrogênio está coordenado com o átomo de ferro do grupo heme, apresentando, portanto, interação semelhante aos inibidores 1,2,4-triazólicos conhecidos. Constitui-se, assim, em interação semelhante à desejada.

Após redesenhado, parametrizado e minimizado, o ligante UDO foi submetido à simulação de *redocking* e selecionaram-se as condições de simulação que resultaram no menor RMSD entre a pose do UDO resultante do *redocking* e a estrutura do cristal retirado do PDB. Para essa determinação, ao todo, realizaram-se 36 experimentos (Anexo 1). As melhores 5 condições de simulação estão apresentadas na Tabela VI.

Tabela VI. Melhores condições de *redocking*

Condição	Diâmetro da caixa (Å)	Função de score	Eficiência		Desvio padrão	Reprodutibilidade das poses
			do algoritmo genético (%)	RMSD médio (n = 3)		
23	12	ASP	100	0,575	0,033	Não
27	15	ASP	200	0,605	0,043	Não
26	15	ASP	100	0,617	0,032	Não
2	10	Goldscore	100	0,645	0,032	Sim
22	12	ASP	30	0,645	0,163	Não

A condição de *redocking* 23, que apresentou o melhor RMSD, utilizou a função ASP como função de *score*, 12 Å de diâmetro da caixa no sítio ativo e 100% de eficiência do algoritmo genético. Entretanto, ao se testar esse método com os ligantes previamente planejados, não houve reprodutibilidade das poses obtidas, mesmo considerando diferentes parametrizações para os átomos de nitrogênio do anel triazólico, como N.2 (nitrogênio sp²) ou N.ar (nitrogênio aromático). A condição 2, que apresentou melhor reprodutibilidade e menor RMSD utilizou a função Goldscore como função de *score*, 10 Å de diâmetro da caixa e 100% de eficiência do algoritmo genético.

Procedeu-se à simulação de *docking* dos ligantes previamente planejados em triplicata nessa condição e se escolheram os 10 com a maior pontuação média de *Fitness*, com desvio padrão não maior do que 1. A pontuação de *Fitness* é diretamente proporcional à complementaridade estrutural e eletrônica do ligante com o sítio ativo (Tabela VII).

O valor de *Fitness* é calculado da seguinte forma:

$$\text{Fitness} = S(\text{hb_ext}) + 1.3750 \cdot S(\text{vdw_ext}) + S(\text{hb_int}) + 1.0000 \cdot S(\text{vdw_int})$$

Sendo:

$S(\text{hb_ext})$: pontuação das ligações de hidrogênio proteína-ligante

$S(\text{vdw_ext})$: pontuação das interações de Van der Waals proteína-ligante

$S(\text{hb_int})$: pontuação das ligações de hidrogênio intramoleculares do ligante

$S(\text{vdw_int})$: pontuação referente à tensão intramolecular do ligante

Os valores de *Fitness* e das pontuações *S* não podem ser convertidos a grandezas físicas, porém o cálculo é feito de forma a preencher a condição de que, quanto maior a pontuação, maior a energia de interação para cada um dos termos. Os valores dos termos obtidos para todos os ligantes encontram-se no Anexo 1.

Tabela VII. Ligantes com as 10 melhores pontuações médias nas três simulações realizadas

Classificação	Ligante	<i>Fitness</i> médio (n = 3)	Desvio padrão	Reproduz geometria do inibidor?
1	70	62,77	0,34	Sim
2	112	62,68	0,73	Sim

Tabela VII. Ligantes com as 10 melhores pontuações médias nas três simulações realizadas (continuação)

Classificação	Ligante	<i>Fitness</i> médio (n = 3)	Desvio padrão	Reproduz geometria do inibidor?
3	64	62,23	0,89	Sim
4	63	61,94	0,40	Sim
5	92	60,47	0,71	Sim
6	136	60,44	0,12	Sim

Tabela VII. Ligantes com as 10 melhores pontuações médias nas três simulações realizadas (continuação)

Classificação	Ligante	<i>Fitness</i> médio (n = 3)	Desvio padrão	Reproduz geometria do inibidor?
7	87	59,99	0,15	Sim
8	142	58,87	0,32	Sim
9	141	58,83	0,39	Sim
10	69	58,80	0,24	Sim

O inibidor UDO, cristalizado com a enzima, apresenta coordenação do nitrogênio piridínico com o átomo de ferro do grupo heme, à distância de 2,3 Å, e grupo aromático trifluormetil-substituído, orientado para os resíduos Tyr103 e Tyr116, como ilustrado no diagrama de LigPlot da Figura 42.

Figura 42 – Diagrama de LigPlot do inibidor UDO à CYP51 de *T. cruzi*.

Sabe-se que os antifúngicos azólicos, inibidores de CYP51, apresentam em comum interações hidrofóbicas com resíduos Tyr103 e Tyr116, essenciais para a atividade catalítica da enzima, e coordenação do nitrogênio do anel heterocíclico com o átomo de ferro do grupo heme, impedindo a ligação ao substrato (LEPESHEVA; WATERMAN, 2011; LEPESHEVA et al., 2010). Portanto, essas são características desejáveis para futuros inibidores.

Ao se avaliar as interações dos ligantes triados com maior pontuação, observa-se que todos se coordenam com o átomo de ferro do grupo heme pelo nitrogênio 4 do anel triazólico, ou pelo oxigênio do grupo nitrotriazólico, bem como possuem grupos 2,4-difluorfenílicos em sua estrutura, orientados aos resíduos Tyr103 e Tyr116, o que evidencia a importância desse grupo na interação com o alvo.

Os ligantes de configuração E realizam ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio da Tyr116 pela porção hidrazônica da molécula, com exceção do ligante 112, cuja hidroxila realiza ligação de hidrogênio com os resíduos Phe290, Ala291 e Thr295. Todos os ligantes possuem grupo 2,4-difluorfenílico orientado aos resíduos Tyr103 e Tyr116, realizando interações hidrofóbicas.

A distância média de coordenação com o ferro do grupo heme e a forma de interação com a Tyr116 da enzima dos ligantes selecionados estão apresentados à Tabela VIII.

Tabela VIII. Interação dos ligantes selecionados com os elementos do sítio ativo

Ligante	Distância média de coordenação com o átomo de ferro (Å)	Cadeia hidrazônica realiza ligação de hidrogênio com Tyr116?
70	2,24	Sim
112	1,94	Não
64	1,93	Sim
63	2,01	Sim
92	2,04	Sim
136	2,01	Sim
87	2,00	Sim
142	2,02	Sim
141	2,19	Sim
69	2,17	Sim

A Figura 43 mostra a interação do ligante original UDO no sítio ativo da CYP51 de *T. cruzi*. Comparando-se com a Figura 44, que apresenta a interação com a CYP51 do ligante com a melhor pontuação, 70, é possível observar que a distância de coordenação ao grupo heme é semelhante à do ligante UDO, e ocorre a ligação de hidrogênio entre o hidrogênio hidrazônico e o átomo de oxigênio da Tyr116, bem como a orientação do grupo 2,4-difluorfenílico aos resíduos aromáticos Tyr103 e Tyr116. Esses resultados foram importantes para, posteriormente, dirigir a síntese daqueles melhores, do ponto de vista da interação com a enzima.

Figura 43 – Inibidor UDO (azul) ligado ao sítio ativo da CYP51 de *T. cruzi*. Em amarelo se destaca a coordenação ao átomo de ferro.

Figura 44 – Ligante 70 (roxo) ligado ao sítio ativo da CYP51 de *T. cruzi*. (A): coordenação com o átomo de ferro; (B): ligação de hidrogênio com Tyr116.

5.2. Estudo qualitativo de campos de interação molecular

Para esse estudo, alinharam-se as estruturas da CYP51 humana (CYP51_H) e de *T. cruzi* (CYP51_{TC}) escolhidas (entradas PDB: 3JUS e 3KHM, respectivamente) por apresentarem ligantes semelhantes em seu sítio ativo (fluconazol e econazol) (LEPESHEVA et al., 2010). Realizou-se o alinhamento das estruturas pelo carbono alfa da estrutura protéica e, em seguida, considerando-se a estrutura primária (RMSD: 1,44)

Após a análise visual do sítio ativo das enzimas humana e parasitária alinhadas, observaram-se as mutações mostradas nas Tabelas IX e X, classificadas de acordo com a similaridade da polaridade do aminoácido correspondente na proteína homóloga.

Encontraram-se 13 aminoácidos mutados no sítio ativo da enzima, dentre eles, 7 com a polaridade similar e 6 com a polaridade diferente.

Tabela IX. Aminoácidos mutados no sítio ativo com polaridade similar

CYP51 _H (3JUS)	CYP51 _{TC} (3KHM)
Ile377	Leu356
Ala127	Pro99
Thr135	Met106
Leu308	Ala288
Leu134	Ile105
Arg448	Lys421
Pro441	Gly414

Tabela X. Aminoácidos mutados no sítio ativo com polaridade diferente.

CYP51_H (3JUS)	Polaridade	CYP51_{TC} (3KHM)	Polaridade
Leu310	Apolar	Phe290	Aromático
Met380	Polar	Val359	Apolar
Phe234	Aromático	Leu208	Apolar
Phe152	Aromático	Met123	Polar
Trp239	Aromático	Leu219	Apolar
Lys156	Polar	Leu127	Apolar

Para o planejamento de análogos seletivos, há que se considerar atributos estéricos e eletrônicos dos aminoácidos mutados, bem como suas vizinhanças, uma vez que cada mutação proporciona um ambiente químico diferente em suas proximidades.

Para se identificar diferenças estruturais entre as duas enzimas que permitam a inibição seletiva, realizou-se o cálculo dos campos de interação molecular (MIFs). A coincidência entre aminoácidos mutados e MIFs seletivos, ou seja, não coincidentes espacialmente, permite explorar características estéricas e as relacionadas à energia de interação com determinados grupos químicos, que podem direcionar a busca por novos compostos.

O cálculo foi realizado para 4 sondas representativas (DRY, sonda hidrofóbica; OH2, sonda de água, interações hidrofílicas; C1=, carbono aromático ou vinílico; N:, nitrogênio sp³ com par de elétrons livre, representados nas Figuras de 45 a 48.

Figura 45 – Sítio ativo com os MIFs calculados e regiões de seletividade para a CYP51 humana (azul) e de *T. cruzi* (amarelo), utilizando-se a sonda C1=. Encontraram-se 3 campos significativos, próximos à Tyr116, Phe290 e Leu356.

Figura 46 - Sítio ativo com os MIFs calculados e regiões de seletividade para a CYP51 humana (azul) e de *T. cruzi* (amarelo), utilizando-se a sonda DRY. Encontraram-se 3 campos significativos, próximos à Tyr116, Met106 e Tyr103.

Figura 47 - Sítio ativo com os MIFs calculados e regiões de seletividade para a CYP51 humana (azul) e de *T. cruzi* (amarelo), utilizando-se a sonda N:. Encontraram-se 4 campos significativos, próximos à Tyr103, Phe110, Gly 292 e Leu 357.

Figura 48 - Sítio ativo com os MIFs calculados e regiões de seletividade para a CYP51 humana (azul) e de *T. cruzi* (amarelo), utilizando-se a sonda OH2. Encontraram-se 5 campos significativos, próximos à Tyr116, Phe110, Phe290, Gln293 e Leu357

Relacionando-se a lista de aminoácidos mutados com as regiões distintivas para as interações com a CYP51_{TC}, encontram-se interações específicas para a enzima parasitária, como mostra a Tabela XI:

Tabela XI. Aminoácidos mutados próximos a MIFs, seletivos para *T.cruzi*

Aminoácido	Sondas
Tyr116	C1, DRY, OH2
Phe290	C1, OH2
Leu356	C1
Met106	DRY
Tyr103	DRY, N:
Phe110	N:, OH2
Gly292	N:
Leu357	N:, OH2
Gln293	OH2

Dessa maneira, encontraram-se no sítio ativo 9 resíduos de aminoácidos próximos a 15 campos de interação moleculares seletivos para a CYP51_{TC}. Os demais resíduos mutados, apesar de estruturalmente diferentes, não apresentam diferenças relacionadas à energia de interação com as sondas testadas, em razão de não haver proximidade de MIFs seletivos.

Tais achados permitem outra avaliação sobre a classificação obtida previamente no estudo de *docking*, podendo-se inferir que os compostos triados apresentem seletividade para a enzima parasitária, pois possuem grupos 2,4-difluorfenílicos (aromáticos) na região dos aminoácidos Tyr103 e Tyr116, do alvo, regiões favoráveis para interações hidrofóbicas (DRY) seletivas. Evidencia-se, também, que as ligações de hidrogênio observadas entre a cadeia lateral hidrazônica da maior parte dos ligantes e o átomo de oxigênio da Tyr116 são um elemento que favorece a seletividade, pois encontram-se próximas à região favorável para interações hidrofílicas (OH2) seletivas. Por sua vez, para o ligante 112, que não realiza ligação de hidrogênio com a Tyr116,

observa-se uma ligação de hidrogênio entre o hidrogênio da hidroxila hidroximetílica e a carbonila peptídica do aminoácido Phe290, região próxima a um MIF seletivo para interações hidrofílicas.

Evidentemente, corroborando as interações já conhecidas para a CYP51, observa-se uma região não seletiva favorável para carbonos vinílicos acima da região central do grupo heme (Figura 45), região onde ocorre a catálise de substratos contendo carbonos vinílicos, mediada por essa enzima.

Com base nos dados obtidos com a triagem virtual apresentada, selecionaram-se as estruturas que seguem para a síntese racionalmente dirigida.

5.3. Planejamento sintético

Por meio de uma análise retrossintética (Figura 49) da estrutura geral dos produtos finais da série A, a hidrazona hidroximetilada **6**, pode-se inferir que o grupo hidroximetílico poderia ser introduzido na molécula por uma adição nucleofílica do formaldeído pela hidrazona **5** como nucleófilo. A hidrazona **5** poderia ser formada, em mistura de diastereoisômeros, utilizando-se a hidrazida apropriada **4** e o acil-triazol **3**, obtido pela reação do triazol **2** com o ácido carboxílico ou o cloreto de ácido adequado. No caso do substituinte $Y = \text{NO}_2$, o 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol poderia ser obtido pela oxidação do 3-amino-1*H*-1,2,4-triazol **1**, acessível comercialmente. Para a obtenção dos produtos finais da série B, de estrutura geral representada pela hidrazona hidroximetilada **9**, a hidroximetilação aconteceria de forma análoga à obtenção do produto **6**, porém, pela adição nucleofílica do formaldeído pela hidrazona **8** como nucleófilo. Essa, por sua vez, é obtida em mistura de diastereoisômeros pela reação de formação de imina da hidrazida **4** com a da cetona **7**. O material de partida para a obtenção dessa última seria a 2-cloro-2',4'-difluoroacetofenona, disponível comercialmente, que sofreria a substituição nucleofílica pelo triazol **2**, levando à cetona **7**.

Figura 49 – Planejamento retrossintético das séries propostas.

5.4. Preparação dos 1,2,4-triazóis de partida

Iniciou-se a preparação dos ligantes desejados com a síntese do triazol **2b**, conforme mostrado na Figura 50, pela nitração do 3-amino-1*H*-1,2,4-triazol em solução de ácido nitroso formado *in situ* pela solução de nitrito de sódio em ácido sulfúrico concentrado.

Figura 50 – Oxidação do 3-amino-1*H*-1,2,4-triazol a 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol.

O 1,2,4-triazol não sofre nitração facilmente (CURTIS; JENNINGS, 2008). Assim, o 3-amino-1*H*-1,2,4-triazol foi escolhido como material de partida por ser comercialmente acessível e ser passível de oxidação a 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol por meio de uma reação de diazotação, seguida do ataque nucleofílico do íon nitrito ao carbocátion formado (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012). A reação forneceu o triazol nitrado em 50% de rendimento, com pureza cromatográfica de 99,4%, e as análises de ponto de fusão e RMN de hidrogênio e carbono foram coerentes com os valores descritos na literatura (RAO et al., 1991).

A reação se inicia com formação do ácido nitroso, instável, pela dissolução do nitrito de sódio ao ácido sulfúrico em solução aquosa, em reação exotérmica. O par de elétrons do oxigênio ligado ao hidrogênio do ácido nitroso abstrai um próton do meio, formando a espécie instável nitrosoxônio, que libera uma molécula de água para formar o íon nitrosônio. O par de elétrons da amina primária do triazol de partida pode atacar o íon nitrosônio, formando um intermediário que sofre rearranjos para a formação do cátion de diazônio. O cátion formado é instável e promove a evolução de gás nitrogênio no meio, concomitante à formação de um carbocátion triazólico, que pode sofrer ataque nucleofílico pelo ânion nitrito, resultando no nitrotriazol de interesse. O mecanismo da reação é ilustrado na Figura 51.

Figura 51 – Mecanismo de oxidação do 3-amino-1*H*-1,2,4-triazol.

Com a finalidade de se facilitar o ataque nucleofílico do nitrogênio 1 triazólico nas reações subsequentes, preparou-se, também, o sal sódico do nitrotriazol, utilizando-se método descrito por Kazhemekaite e colaboradores, em 1998, conforme ilustrado na Figura 52. A reação ocorre em solução aquosa de hidróxido de sódio, que promove a abstração do próton ligado ao nitrogênio 1 do anel heterocíclico.

Figura 52 – Reação de formação do sal sódico do nitrotriazol 2b.

Obteve-se o sal sódico em 57% de rendimento e as análises de ponto de fusão e RMN de hidrogênio foram coerentes com os valores descritos na literatura.

Subsequentemente, realizaram-se análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para se determinar a pureza do triazol **2b**.

Para se determinar o melhor comprimento de onda do detector, avaliou-se, inicialmente, o espectro de absorção do triazol **2b** e do triazol **1**, seu material de partida (Figuras 53 e 54).

Figura 53 – Espectro de absorção UV do 3-nitro-1,2,4-triazol (**2b**). Solução 5 µg/mL, em ácido fosfórico 0,05% m/m e metanol (7:3).

Figura 54 - Espectro de absorção UV do 3-amino-1,2,4-triazol (1).
Solução 50 µg/mL em ácido fosfórico 0,05% m/m e metanol (95:5).

O composto **2b** apresentou bandas de absorção em 219 e 254 nm e o material de partida **1** apresentou inflexão em 220 nm, mas não apresentou banda específica e satisfatória de absorbância.

Figura 55– Cromatograma com picos referentes às soluções padrão de 1, 2a e branco.

Analizado por CLAE (Figura 55), o composto apresentou a integração do pico referente ao triazol **2b** indicando 99,4% de pureza cromatográfica, evidenciando a eficácia no método de purificação por recristalização em metanol.

5.5. Tentativas de preparação dos acil-triazóis

Dentre os compostos selecionados pela triagem virtual, quatro são pertencentes à série A. De acordo com a Figura 49, para a síntese dos intermediários da série A, é necessária a formação dos acil-triazóis de estrutura geral **3**. Como reação de teste, priorizou-se a formação do produto com $R_2 = \text{CH}_3$, por ser amplamente descrita na literatura. Também, se utilizaram alguns ácidos carboxílicos aromáticos para teste de síntese dos acil-triazóis aromáticos, a fim de se reproduzir as condições descritas na literatura para depois se utilizar os ácidos 2,4-difluor-substituídos, disponíveis em pequena quantidade. Utilizaram-se diversas condições reacionais. Entretanto, apesar de se observar por cromatografia de camada delgada a formação de produto em alguns métodos, não foi possível isolá-lo. As condições utilizadas estão descritas na Tabela XII.

Tabela XII. Métodos utilizados para a obtenção dos acil-triazóis de estrutura geral **3**

Método	Y	R2 pretendido	Condições reacionais	Tempo de reação	Formação de produto
1	-NO ₂	-CH ₃	Cloreto de acetila, THF, NaH, 0 °C → 25 °C, atmosfera inerte. (SHIMIZU; SODEOKA, 2008)	12 horas	Não
2	-NO ₂	-CH ₃	Cloreto de acetila, sal sódico do triazol em tolueno, t _{amb} (REUTER et al., 2009)	24 horas	Não
3	-NO ₂	-CH ₃	Cloreto de acetila, diclorometano, trietilamina, atmosfera inerte. (SHIMIZU; SODEOKA, 2008)	5 horas	Sim
4	-NO ₂		Ácido benzoico, clorofórmio, N-metil-morfolina, cloroformato de etila, atmosfera inerte. (LÜTDKE, 2005)	12 horas	Sim

Tabela XII. Métodos utilizados para a obtenção dos acil-triazóis de estrutura geral 3 (continuação)

Método	Y	R2 pretendido	Condições reacionais	Tempo de reação	Formou produto?
5	-NO ₂		Ácido 2,4-diclorofenilacético, clorofórmio, <i>N</i> -metil-morfolina, cloroformato de etila, atmosfera inerte. (LÜTDKE, 2005)	12 horas	Não
6	-NO ₂		Ácido 2,4-diclorofenilacético, acetato de etila, <i>N</i> -metil-morfolina, cloroformato de etila, atmosfera inerte. (LÜTDKE, 2005)	12 horas	Não
7	-NO ₂		Ácido 2,4-diclorofenilacético, diclorometano, <i>N</i> -metil-morfolina, cloroformato de etila, atmosfera inerte. (LÜTDKE, 2005)	12 horas	Não
8	H	-CH ₃	Anidrido acético, refluxo. Destilação a 140 °C (ATKINSON; POLYA, 1954)	1 hora	Não
9	H	-CH ₃	Anidrido acético, refluxo. Destilação a 160 °C (ATKINSON; POLYA, 1954)	1 hora	Não
10	H	-CH ₃	Anidrido acético, refluxo Extração líquido-líquido com acetato de etila (ATKINSON; POLYA, 1954)	1 hora	Não
11	H	-CH ₃	Cloreto de acetila, tolueno (REUTER et al., 2009)	24 horas	Não

Método 1

Sabe-se é que possível acetilar o triazol **2b** pela abstração do próton do nitrogênio 1 com hidreto de sódio, seguida do ataque nucleofílico ao cloreto de acetila. Observou-se que na adição da solução do triazol **2b** em THF à solução de hidreto de sódio em THF houve vigorosa liberação de bolhas em reação exotérmica e a solução tornou-se alaranjada, instantaneamente, por provável desprotonação do triazol **2b**. Durante o tempo de reação o meio reacional tornou-se amarelado, com formação de precipitado, porém, não se evidenciou formação de produto.

Método 2

Para essa reação, adaptou-se um método para a acetilação do triazol **2a**, porém, utilizando-se o sal sódico do triazol **2b**. Ao se adicionar o cloreto de acetila e o triazol **2b** ao tolueno, formou-se uma suspensão, o que seria de se esperar, uma vez que esse solvente apresenta constante dielétrica baixa, de 2,38, e promove a associação dos sais. Apesar do problema de solubilidade, esperava-se que a reação acontecesse na interface dos sólidos em agitação, porém não se evidenciou a formação de produto.

Método 3

Neste método, utilizou-se diclorometano, que dissolve adequadamente o triazol **2b**, e trietilamina como aceptor de prótons. Nessas condições, o cloreto de acetila poderia sofrer ataque do nucleófilo triazólico formado para fornecer o produto desejado. Observou-se, na terceira hora de reação, a formação de produto com $R_f = 0,65$ (hexano/acetato de etila, 1:1). Entretanto, houve degradação desse produto nas horas subsequentes, não sendo possível isolar o produto em outras tentativas do mesmo método. Existe a possibilidade de que o produto estivesse impurificado com o ácido não neutralizado pela trietilamina, ocorrendo degradação.

Métodos 4 a 7

Na tentativa de se acilar o triazol com ácidos carboxílicos aromáticos, empregou-se o método do anidrido misto, comumente utilizado na acilação de aminas, com a utilização de *N*-metil-morfolina e cloroformato de etila. A *N*-metil-morfolina é uma base fraca, que pode labilizar o hidrogênio do grupamento hidroxílico do ácido carboxílico que contém o grupo R_2 de interesse. O par de elétrons do oxigênio hidroxílico pode, então, atacar o carbono carbonílico do cloroformato de etila e o átomo de cloro do intermediário formado, bom grupo de saída, é liberado para originar o anidrido misto. O anidrido misto é bom agente de transferência de grupos acila, podendo sofrer ataque do triazol **2b**, liberando o éster etílico do ácido carbônico para formar o acil-triazol desejado (Figura 56).

Figura 56 – Mecanismo proposto de formação de acil-triazóis pelo método do anidrido misto.

Para as reações teste escolheram-se os ácidos benzoico e 2,4-diclorobenzoico como materiais de partida carboxílicos para a formação dos anidridos mistos correspondentes.

No método 4, que utilizou o ácido benzoico, os materiais de partida apresentaram boa solubilidade em clorofórmio. Após 12 horas de reação não se observou o consumo completo dos reagentes, porém houve a formação de dois produtos, com $R_{f1} = 0,24$ e $R_{f2} = 0,67$ (hexano/acetato de etila, 4:1). O produto mais apolar foi purificado em coluna cromatográfica, porém a análise de RMN de hidrogênio não evidenciou a formação do produto desejado. O produto mais polar foi degradado no processo de purificação, possivelmente pelo caráter ácido da sílica utilizada na purificação.

Para o método 5, não foi possível dissolver o ácido 2,4-diclorobenzoico na quantidade estipulada inicialmente de clorofórmio, sendo necessário realizar a reação em volume de solvente cinco vezes maior do que o requerido. Nessas condições, não houve formação de produto. Nas adaptações subsequentes do método, métodos 6 e 7, nas quais se utilizou acetato de etila e diclorometano como solvente, respectivamente, também não houve formação de produto, mesmo com maior solubilidade dos materiais de partida. De fato, espera-se que a reação com o ácido 2,4-diclorobenzoico seja mais difícil que aquela com o ácido benzoico, uma vez que a base conjugada do primeiro é relativamente mais estável que a base conjugada desse último, possivelmente desfavorecendo a formação do intermediário anidrido misto ou favorecendo a clivagem do acil-triazol formado.

Métodos 8 a 10

Nestes métodos utilizou-se anidrido acético como solvente e como agente de transferência de grupos acetila. Nessas condições, o triazol **2a** pode realizar um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do anidrido, formando intermediário que libera ácido acético como grupo de saída para fornecer o acetil-triazol desejado. A reação ocorre em condições de refluxo a 140 °C (ponto de ebulição do anidrido acético: 49 °C, ponto de ebulição do ácido acético: 118 °C) para a obtenção do acetil-triazol de interesse. Para purificação, o método original emprega destilação por aquecimento em manta. Entretanto, no aquecimento gradual da destilação houve decomposição dos produtos. No método 9 efetuou-se o aquecimento da destilação em banho de óleo, com aquecimento mais controlado, e os sólidos resultantes evidenciaram decomposição da mesma maneira.

Sabendo-se da instabilidade térmica do produto possivelmente formado, no método 10, para o seu isolamento, se utilizou extração líquido-líquido em éter e hexano em vez da destilação. Após a evaporação da fase orgânica, o sólido resultante correspondeu ao material de partida, indicando que a reação não ocorreu ou houve degradação do produto formado.

Método 11

O método 11, descrito por Reuter e colaboradores, consiste na adição de cloreto de acetila a uma suspensão do triazol **2a** em tolueno. Nessas condições, o nitrogênio 1 do triazol pode realizar um ataque nucleofílico ao cloreto de acetila, liberando o ânion cloreto para formar o acetil-triazol de interesse. Após 24 horas, tempo requerido para a reação, não se observou a formação do produto desejado, possivelmente pela degradação do cloreto de acetila no meio reacional ou pela degradação do acetil-triazol formado.

Portanto, os métodos utilizados não foram promissores para a obtenção dos acil-triazóis, de maneira que os produtos formados se mostraram lábeis, em concordância com o trabalho publicado por Shimizu e Sodeoka, em 2008, no qual propuseram a utilização de acil-nitrotriazóis como agentes de transferência de grupos acila. Dessa maneira, o grupamento carbonílico dos acil-triazóis apresentou reatividade mais semelhante à função amida que à função cetona, inviabilizando o seguimento da rota sintética com a reação de formação de hidrazona proposta inicialmente.

Para a síntese dos triazóis de estrutura geral **3** com $R_2 = H$, a formilação do nitrogênio 1 do anel triazólico se mostrou ser inviável em trabalhos anteriores do nosso grupo (BIGATÃO, 2011). Também, não há relatos na literatura sobre a obtenção de acil-triazóis pela formação do anel triazólico a partir de compostos lineares mais simples, reações comuns de obtenção de 1,2,4-triazóis *C*-substituídos e *N*-substituídos, por exemplo, pelos métodos de Pellizari e de Einhorn-Brunner (CURTIS; JENNINGS, 2008), ilustrados na Figura 57.

Síntese de Pellizari **Síntese de Einhorn-Brunner**

Figura 57 – Métodos mais comuns para a síntese de 1,2,4-triazóis substituídos. R₁ e R₂ são grupos alquílicos.

Assim, a síntese dos compostos da série A não se mostrou viável. Em termos de triagem, tal fato representa uma diminuição de 40% da série de compostos selecionados.

5.6. Preparação das triazolil-acetofenonas

Dentre os compostos selecionados pela triagem virtual, seis são pertencentes à série B. Para a síntese desses compostos, é necessária a formação das triazolil-acetofenonas de estrutura geral **7** (Figura 58).

Figura 58 – Reação de formação das triazolil-acetofenonas.

Nas condições descritas (PAPADOPOULOU et al., 2012), o hidróxido de potássio abstrai o próton do nitrogênio 1 triazólico. O ânion formado pode atuar como

nucleófilo numa reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), atacando o carbono ligado ao átomo de cloro da 2-cloro-2',4'-difluoroacetofenona para formar a triazolil-acetofenona de interesse.

Figura 59 – Mecanismo de formação das triazolil-acetofenonas.

O método se mostrou eficiente para a obtenção das triazolil-acetofenonas pretendidas, com rendimentos baixos. A cetona **7a** apresentou ponto de fusão e espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio em concordância com o da literatura (TAO et al., 2007). O composto foi analisado, também, no infravermelho. A cetona **7b** é um composto inédito (LAPEN-2901) e teve sua estrutura confirmada por análise de espectroscopia no infravermelho, análise elementar e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13. Os dados das análises encontram-se listados nas Tabelas XIII e XIX. Essa é uma reação que gerou subprodutos, possivelmente pela substituição do átomo de cloro da acetofenona pela hidroxila da base utilizada, pelo ataque do nucleófilo triazólico à carbonila da acetofenona. A acidez do carbono alfa à carbonila da acetofenona possibilita a formação do íon enolato do composto carbonílico e a acetofenona de partida pode participar de reações de condensação (Figura 60). Entretanto, o produto majoritário foi o desejado.

Figura 60 – Possíveis sítios de ataque nucleofílico do triazol à acetofenona.

Tabela XIII. Atribuição de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos **7a** e **7b**

Composto	Estrutura	RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ (ppm)	RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 300 MHz, δ (ppm)
7a		δ = 8,49 (s, 1H, H7); 8,00-8,08 (m, 1H, H4); 8,02 (s, 1H, H1); 7,49-7,57 (m, 1H, H6); 7,28-7,32 (m, 1H, H5); 8,52 (s, 2H, H2, H3).	-
7b		δ = 8,81 (s, 1H, H1); 8,03-8,11 (m, 1H, H4); 7,51-7,59 (m, 1H, H6); 7,30-7,36 (m, 1H, H5); 6,03 (s, 2H, H2, H3).	δ = 187,96 (C4); 167,51 (C8); 164,37 (C1); 160,77 (C6); 148,31 (C2); 132,60 (C10); 119,23 (C5); 112,71 (C9); 105,40 (C7); 59,27 (C3).

Tabela XIV. Dados de rendimento, infravermelho e análise elementar dos compostos **7a** e **7b**.

Composto	Estrutura	Rendimento (%)	IV (KBr), ν (cm ⁻¹)	Análise elementar (%)	Faixa de fusão (°C)
7a		22	-	-	109-111
7b		46	1697 (C=O), 1609 (C=C Ar), 1508 (Ar-NO ₂).	Experimental: C: 45,01; H: 2,30; N: 20,39. Calculado: C: 44,96; H: 2,32; 20,51.	113-114

Para se otimizar a reação de obtenção de **7a**, adaptou-se a metodologia para refluxo em micro-ondas (200 W, 120 °C) e a utilização do sal sódico do triazol, sem a adição de hidróxido de potássio. Nessas condições, a reação ocorreu em apenas uma hora e com menor formação de subprodutos. Obteve-se rendimento de 18%, ou seja, melhorou-se o tempo de reação, mas não o rendimento. Para o composto **7b**, utilizaram-se as mesmas condições de refluxo em acetonitrila, porém utilizando-se o sal sódico do triazol, sem a adição de hidróxido de potássio. Nessas condições, houve menor formação de subprodutos e obteve-se um rendimento de 74%. Tais rendimentos podem ser explicados pelo fato de a ligação entre o ânion 1-*H*-1,2,4-triazolato e o cátion sódio ser mais forte do que a ligação entre o ânion 3-nitro-1-*H*-1,2,4-triazolato e o cátion sódio, de maneira que, para o primeiro, o ânion está mais disponível no meio reacional para atuar como nucleófilo do que o segundo.

5.7. Preparação e elucidação estrutural das hidrazonas

Realizou-se a síntese das hidrazonas de estrutura geral **8** pela reação de formação de imina, uma hidrazono-de-oxo-bissubstituição (SMITH; MARCH, 2007), a partir das cetonas de estrutura geral **7** e das hidrazidas **4a** (semicarbazida) e **4b** (tiossemicarbazida), utilizando-se etanol como solvente e ácido clorídrico em quantidade catalítica (Figura 61).

Figura 61 – Reação para formação das hidrazonas de estrutura geral **8**.

Nessas condições, a reação ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, de adição, o par de elétrons da hidrazida ataca o carbono carbonílico da cetona de partida, de carga parcial positiva, formando um intermediário hemiaminal. A segunda etapa consiste na eliminação de água mediada por ácido, que cumpre função catalítica, para a formação da hidrazona **8** desejada. Nessa etapa de eliminação ocorre a formação da ligação imínica e o nitrogênio, que passa a apresentar hibridização sp^2 , de geometria trigonal plana, pode fornecer duas configurações possíveis. Na configuração E, a cadeia hidrazônica está orientada ao sistema 2,4-difluorofenílico, e na configuração Z, a cadeia hidrazônica está orientada ao anel triazólico (Figura 62).

Figura 62 – Mecanismo da reação de formação das hidrazonas planejadas.

Priorizou-se a síntese da hidrazona **8d**, por ter sido selecionada pelo estudo de *docking*, e também se realizou a síntese das hidrazonas **8a-8c**, por serem intermediários na síntese das hidrazonas hidroximetiladas, de estrutura geral **9** selecionadas pelo estudo de *docking*. Submeteram-se, quando obtidos em quantidades apreciáveis, os compostos às análises de ponto de fusão, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 e análise elementar para confirmação estrutural. Os dados e os valores de rendimento encontram-se na Tabela XV e XVI.

Para confirmação das atribuições e determinação da proporção diastereomérica, realizou-se o experimento de RMN ^{13}C APT e utilizaram-se técnicas de RMN bidimensionais (HSQC, HMBC, HETCOR e NOESY) em aparelho de 500 MHz para o composto **8d**. Para os demais compostos, considerando-se que são análogos à hidrazona **8d**, realizou-se o cálculo da proporção dos isômeros pela proporção entre os sinais referentes ao grupamento CH_2 sendo, de maneira geral, o sinal mais blindado referente ao isômero Z e o sinal mais desblindado referente ao isômero E.

Tabela XV. Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos 8a-8d

Composto	Estrutura	RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ (ppm), J (Hz)	RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 300 MHz, δ (ppm), J (Hz)
8a		(E) δ = 10,20 (s, 1H, H3); 8,55 (s, 1H, H1); 7,91 (s, 1H, H9); 7,65-7,73 (m, 1H, H4); 7,08-7,34 (m, 2H, H5, H6); 6,57 (s, 2H, H7, H8); 5,51 (s, 2H, H2, H10). (Z) δ = 9,21 (s, 1H, H3); 8,44 (s, 1H, H1); 7,94 (s, 1H, H9); 7,65-7,73 (m, 1H, H4); 7,08-7,34 (m, 2H, H5, H6); 6,41 (s, 2H, H7, H8); 5,28 (s, 2H, H2, H10).	-
8b		(E) δ = 10,24 (s, 1H, H3); 8,49 (s, 1H, H1); 8,48 (s, 1H, H8); 7,96 (s, 1H, H9); 7,92 (s, 1H, H7); 7,78-7,86 (m, 1H, H4); 7,08-7,39 (m, 2H, H5, H6); 5,36 (s, 2H, H2, H10). (Z) δ = 11,15 (s, 1H, H3); 8,59 (s, 1H, H1); 8,56 (s, 1H, H8); 8,37 (s, 1H, H9); 8,01 (s, 1H, H7); 7,78-7,86 (m, 1H, H4); 7,08-7,39 (m, 2H, H5, H6); 5,63 (s, 2H, H2, H10).	-
8c		(E) δ = 9,32 (s, 1H, H3); 8,82 (s, 1H, H1); 7,74-7,82 (m, 1H, H4); 7,30-7,38 (m, 1H, H5); 7,02-7,19 (m, 1H, H6); 6,61 (s, 2H, H7, H8); 5,40 (s, 2H, H2, H10). (Z) δ = 10,27 (s, 1H, H3); 8,88 (s, 1H, H1); 7,74-7,82 (m, 1H, H4); 7,30-7,38 (m, 1H, H5); 7,02-7,19 (m, 1H, H6); 6,61 (s, 2H, H7, H8); 5,62 (s, 2H, H2, H10).	-

Tabela XV. Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos 8a-8d (continuação)

Composto	Estrutura	RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ (ppm), J (Hz)	RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 300 MHz, δ (ppm), J (Hz)
8d		<p>(E) δ = 10,31 (s, 1H, H3); 8,85 (s, 1H, H1); 8,43 (s, 1H, H7); 7,83 (s, 1H, H9); 7,06-7,45 (m, 3H, H4,H5, H6); 5,47 (s, 2H, H2,H10). (Z) δ = 11,17 (s, 1H, H3); 8,91 (s, 1H, H1); 8,56 (s, 1H, H7); 8,06 (s, 1H, H9); 7,06-7,45 (m, 3H, H4, H5, H6); 5,75 (s, 2H, H2, H10).</p>	<p>(E) δ = 179,48 (C5); 165,31 (C9); 162,00 (C1); 157,99 (C7); 147,63 (C2); 138,17 (C4); 131,32 (C8); 114,94 (C6); 112,60 (C10); 109,94 (C11); 55,47 (C3). (Z) δ = 179,48 (C5); 165,31 (C9); 162,00 (C1); 157,99 (C7); 147,63 (C2); 138,17 (C4); 132,44 (C8); 119,88 (C6); 112,60 (C10); 109,94 (C11); 48,08 (C3).</p>

Tabela XVI. Dados de rendimento, análise elementar e faixa de fusão dos compostos 8a-8d

Composto	Estrutura	Rendimento (%)	IV (KBr), ν (cm^{-1})	Análise elementar (%)	Faixa de fusão ($^{\circ}\text{C}$)
8a		19	-	Experimental: C: 45,99; H: 3,88; N: 28,65. Calculado: C: 46,24; H: 3,81; N: 28,72.	Composto higroscópico, não determinada
8b		69	1616 (C=N), 1504 (C=C Ar)	Experimental: C: 47,62; H: 4,45; N: 22,72 Calculado: C: 47,13; H: 4,33; N: 23,13.	130 (decomposição)
8c		10	1670 (C=O), 1617 (C=N), 1504 (C=C Ar) , 1379 (Ar-NO ₂).	Experimental: C: 40,12; H: 3,07; N: 28,91. Calculado: C: 40,18; H: 3,00; N: 29,00.	140 (decomposição)
8d		60	1605 (C=N), 1508 (C=C Ar), 1391 (Ar-NO ₂), 1365 (Ar-NO ₂).	Experimental: C: 38,63; H: 2,64; N: 28,95. Calculado: C: 38,72; H: 2,56; N: 28,81.	211 (decomposição)

A ocorrência da formação de diastereoisômeros durante a formação de hidrazonas é bem descrita na literatura (KÜMMERLE et al., 2012; RÔSE et al., 1997; SANT'ANNA et al., 1996). A separação de isômeros costuma ser possível por coluna cromatográfica e, nesses casos, a análise estrutural é realizada com cada isômero separadamente. Entretanto, algumas hidrazonas apresentam comportamento de interconversão quando em meio líquido, com os dois isômeros entrando em equilíbrio. Tais compostos, portanto, mesmo que isolados para análise, tenderiam a entrar em equilíbrio com a outra configuração em fluidos biológicos. Esse mecanismo é de particular interesse da nanotecnologia, que os denomina “interruptores moleculares”, um tipo de máquina molecular, que guarda semelhança com os motores moleculares encontrados na natureza, como as ATPases (LANDGE et al., 2011).

O mecanismo dessa isomerização específica ainda não é bem conhecido, uma vez que o mecanismo de formação de hidrazonas é bem menos estudado que o mecanismo de formação de iminas. Dessa maneira, ainda não se sabe a contribuição da entalpia e entropia para a energia de ativação dessa isomerização, dificultando o desenvolvimento de métodos de síntese estereoespecíficos (LANDGE et al., 2011).

Por três vezes os isômeros E e Z da hidrazona **8d** foram isolados em coluna cromatográfica, utilizando-se como eluente mistura de hexano/acetato de etila (1:1, corrida isocrática). Entretanto, os isômeros isolados em solução se interconverteram em sua outra configuração, entrando em equilíbrio após cerca de 20 minutos. Por essas razões, decidiu-se trabalhar com a mistura de diastereoisômeros nas análises e ensaios de atividade biológica posteriores.

Isso posto, se discutirá, a seguir, a elucidação estrutural para a hidrazona **8d**. Somente partir dessas atribuições foi possível atribuir corretamente os espectros de ^1H RMN das hidrazonas **8a-8c**.

No espectro de RMN ^1H (Figura 63), observam-se em 11,17 e 10,31 ppm os singletos referentes ao hidrogênio ligado ao nitrogênio hidrazônico H-3 dos dois isômeros. Os sinais em 8,91 e 8,85 ppm correspondem ao hidrogênio H-1 triazólico de cada isômero. Os dois átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio terminal da porção hidrazônica da molécula não aparentam ser quimicamente equivalentes, possivelmente pela possibilidade de tautomerismo com a tiocarbonila adjacente, apresentando sinais largos em 8,53 e 8,43 ppm para um hidrogênio e em 8,02 e 7,83 ppm para o outro. Na região compreendida entre 7,06 e 7,45 ppm e em sobreposição do sinal em 7,83 ppm encontram-se hidrogênios do sistema 2,4-difluorofenílico, desdobrados na forma de multipletos devido ao acoplamento heteronuclear com os átomos de flúor vizinhos. Mais blindados, por sua vez, os sinais referentes aos hidrogênios H-2 e H-10 ocorrem em 5,75 e 5,47 ppm. Com essa atribuição, entretanto, ainda não foi possível atribuir a qual isômero cada sinal pertence.

Figura 63 – Espectro de ^1H RMN da hidrazona 8d (DMSO, 300 MHz).

No espectro de carbono-13 do composto **8d**, por sua vez, observaram-se 14 sinais, um número maior de carbonos que o observado na estrutura da molécula, e diferentemente do espectro de hidrogênio, não se observa uma duplicação de todos os sinais, cada um referente a um isômero. Assim, torna-se necessário esclarecer quais são os carbonos com o sinal duplicado e a que isômero pertencem. Para se resolver esse problema, realizou-se, inicialmente, um experimento de RMN ^{13}C APT, representado na Figura 64. No espectro de APT (do inglês *Attached Proton Test*), carbonos primários e terciários possuem sinais positivos e carbonos secundários e quaternários apresentam sinais negativos.

Figura 64 – Espectro de ^{13}C RMN APT da hidrazona **8d**.

Nesse espectro, o carbono C-5 é representado pelo sinal em 179,48 ppm, por ter baixa densidade eletrônica devido à proximidade de quatro átomos eletronegativos e por ser um carbono carbonílico, sendo, possivelmente, o carbono mais desblindado da molécula. Os sinais em 147,63 e 138,17 ppm, 132,44 e 131,32

ppm, 119,88 e 114.94 ppm e 55,47 e 48,08 ppm aparentam certa proporcionalidade entre si, tendo chances de serem correspondentes nos diferentes isômeros. Entretanto, com essa atribuição, a soma dos sinais não totaliza o número correto de átomos de carbono na molécula.

Adicionalmente, realizaram-se experimentos de RMN-2D heteronucleares para se confirmar as atribuições e se observar os acoplamentos carbono-hidrogênio referentes a cada isômero presente na amostra.

Obteve-se um espectro de RMN-2D HSQC da hidrazona **8d**, representada na Figura 65. No espectro de HSQC (do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence*), observam-se os acoplamentos entre carbono e hidrogênio a uma ligação de distância (acoplamentos $^1J_{CH}$), ou seja, é possível identificar qual carbono está ligado a qual hidrogênio. O acoplamento se observa num plano ortogonal ($^1H \times ^{13}C$), no qual a correlação entre os sinais representa o acoplamento, e a intensidade dessa correlação é representada topologicamente.

Figura 65 – Espectro de 2D-RMN HSQC da hidrazona **8d** (DMSO-d₆, 500 MHz).

Observa-se que o carbono com sinal em 147,63 ppm apresenta correlação ortogonal com os hidrogênios em 8,85 e 8,91 ppm, evidenciando que se trata do carbono C-2 do anel triazólico, não apresentando duplicação de sinal no espectro de carbono. Entretanto, evento atípico ocorre, pois, apesar de ser um carbono terciário, seu sinal é negativo no espectro de ^{13}C RMN APT. Isso ocorre porque no experimento de APT o tempo de intervalo entre os pulsos é planejado para corresponder ao inverso da constante de acoplamento $^1J_{\text{CH}}$. Se o $^1J_{\text{CH}}$ em questão for muito maior do que o padrão do experimento, normalmente ajustado para 140 Hz, $^1J_{\text{CH}}$ médio para a maior parte dos carbonos sp^2 e sp^3 , os sinais podem desaparecer ou aparecer na fase errada.

Para averiguar essa hipótese, realizou-se um experimento de HETCOR, no qual se aferiu que o $^1J_{\text{CH}}$ entre o carbono C-2 e o hidrogênio H-1 era de 220 Hz, muito maior do que a média. Realizaram-se experimentos ajustando-se o intervalo entre os pulsos para 1/220 segundo, porém, não houve inversão de sinal do carbono C-2. A atribuição das demais correlações, entretanto, reforça a hipótese de que esse sinal representa de fato o carbono C-2.

O carbono com sinal em 132,44 ppm correlaciona-se com o hidrogênio em multiplete na região compreendida entre 7,83-7,90 ppm e o carbono com sinal em 131,32 ppm apresenta correlação com o hidrogênio em multiplete na região entre 7,40-7,45 ppm. Tais sinais, portanto, correspondem ao acoplamento entre o carbono C-8 e o hidrogênio H-4 de cada isômero, notadamente mais desblindado do que os demais carbonos do sistema 2,4-difluorfenílico, pela proximidade dos dois átomos de flúor.

Por sua vez, os carbonos com sinais em 112,60 e 109,94 ppm apresentam, cada um deles, duas correlações ortogonais com os hidrogênios 7,06-7,10 e 7,38-7,45 ppm, respectivamente. Assim, pode-se afirmar que o sinal em 112,60 ppm corresponde ao carbono C-11, e o sinal em 109,94 corresponde ao carbono C-10, ambos ligados a átomos de hidrogênio que correspondem a isômeros diferentes.

Adicionalmente, os carbonos com sinais em 55,47 e 48,08 ppm correlacionam-se com os sinais em 5,47 e 5,75 ppm, respectivamente, evidenciando que se trata dos acoplamentos entre o carbono C-3 e os hidrogênios H-2 e H-10 de dois isômeros diferentes.

É interessante notar que os hidrogênios em 11,17 e 10,31 ppm, em 8,56 e 8,43 ppm, e em 8,03 e 7,83 ppm não apresentam correlação com carbono algum, corroborando a hipótese de que se tratam, respectivamente, do hidrogênio hidrazônico H-3, e dos hidrogênios amínicos H-8 e H-7.

No experimento de RMN-2D HMBC (do inglês *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) observam-se os acoplamentos entre carbono e hidrogênio a duas e três ligações de distância, e em certas exceções, pode-se chegar a quatro ligações (acoplamentos $^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ e $^4J_{CH}$). Obteve-se, então, o espectro de HMBC da hidrazona **8d** (Figura 66).

Figura 66 - Espectro de 2D-RMN HMBC da hidrazona **8d** (DMSO-d₆, 500 MHz).

A correlação entre o sinal do carbono em 179,48 ppm com o hidrogênio hidrazônico em 11,17 e 10,31 ppm, para cada isômero, corrobora a hipótese de se tratar do carbono C-5 da tiocarbonila, quaternário, pois este se encontra a duas ligações de distância do hidrogênio mencionado.

Os carbonos em 165,31 e 157,99 ppm se correlacionam com os hidrogênios da região aromática, entre 7,06 e 7,45 ppm e são quaternários, se tratando, portanto, dos carbonos flúor-substituídos, C-9 e C-7, respectivamente.

A correlação observada entre o carbono com sinal em 162,00 ppm e o hidrogênio com sinais em 8,91 e 8,85 ppm evidencia que se trata do acoplamento a três ligações de distância entre o carbono C-1 e o hidrogênio H-1 dos dois isômeros.

Em 138,17 ppm observa-se um sinal de carbono que se correlaciona com o hidrogênio hidrazônico H-3, com o hidrogênio H-8 e mais intensamente com os hidrogênios H-2 e H-10. O único carbono que apresenta tais possibilidades de acoplamento à distância é o carbono C-4 imínico, quaternário, que está a três ligações de distância de H-3, a quatro ligações de H-8 e a duas ligações de H-2 e H-10.

Por fim, os carbonos com sinais em 119,88 e 114,94 ppm apresentam correlação ortogonal com os hidrogênios em 5,75 e 5,47 ppm (H-2 e H-10), respectivamente, e com hidrogênios da região aromática entre 7,06 e 7,45 ppm (H-8), indicando que esses sinais de carbono referem-se a isômeros diferentes. O carbono restante na atribuição, C-6, é o único que pode possuir tais características por ser quaternário, estar a três ligações de distância de H-8 e a três ligações de distância de H-2 e H-10.

Dessa maneira, portanto, é possível se distinguir quais carbonos são quimicamente equivalentes nos dois isômeros (C-1, C-2, C-4, C-5, C-7, C-9, C-10, C-11) e quais não são, sendo representados por dois sinais no espectro de carbono (C-3, C-6 e C-8).

Para se determinar a proporção diastereomérica, realizou-se um experimento de RMN-2D NOESY, no qual se observa, bidimensionalmente, o efeito nuclear Overhauser (*Nuclear Overhauser Effect*, NOE), que consiste na interação de dipolos magnéticos de dois prótons à distância, um efeito diferente do efeito de acoplamento, que é mediado pela polarização das ligações da molécula (KAISER, 1963). No espectro de NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), observam-se as correlações entre os átomos de hidrogênio da molécula, similar ao espectro de RMN-2D COSY (*Correlation Spectroscopy*), e também as interações (NOE) entre átomos de hidrogênio com distância interatômica entre 2,5 e 5 Å (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Entretanto, a estrutura da hidrazona **8d** apresenta diversos graus de liberdade de rotação e, a princípio, não se poderia atribuir a correlação ortogonal de NOE a algum hidrogênio específico. Por essa razão, um experimento de NOE 1D não seria prático, pois neste deve-se escolher, *a priori*, qual par de átomos de hidrogênio se deseja observar. Tal fato requereria número grande de experimentos até se encontrar alguma interação distintiva para um isômero.

Para auxiliar na interpretação do espectro de NOESY, realizaram-se estudos de modelagem molecular do cálculo do calor de formação, para se inferir qual seria o isômero possivelmente mais predominante e de busca do confômero de menor energia (mínimo local) para avaliar uma possível conformação mais frequente de ambos os isômeros.

O cálculo de calor de formação pode ser realizado computacionalmente por método quântico e os valores calculados da variação de entalpia de interconversão entre os isômeros E e Z para as hidrazonas de estrutura geral **8** encontram-se na Tabela XVII. Calcularam-se, para duas delas, a entalpia padrão de formação pelo procedimento termodinâmico T1 (Seção 7.2.1.3) (OHLINGER et al., 2009).

Tabela XVII. Calores de formação para as hidrazonas de estrutura geral 8

Composto	ΔH_f (isômero E $\rightarrow$ isômero Z) (kJ/mol), método quântico	ΔH_f (isômero E $\rightarrow$ isômero Z) (kJ/mol), procedimento T1
8a	-53,99	-
8b	+63,82	+46,41
8c	+53,59	-
8d	+84,36	+59,74

O cálculo utilizando método quântico semi-empírico mostrou-se computacionalmente acessível (tempo de cálculo: 5 minutos). A partir dos calores de interconversão para as hidrazonas **8b-c**, observou-se que a conversão ao isômero Z é entalpicamente desfavorecida por ser endotérmica. Os valores calculados pelo procedimento T1 se mostraram coerentes com os obtidos pelo método quântico e seu cálculo é computacionalmente mais exigente (tempo de cálculo: 12 horas). Espera-se, portanto, que o isômero E seja o predominante. Já para a hidrazona **8a**, a forma Z mostrou ser entalpicamente favorecida. Dessa maneira, infere-se que, para a hidrazona **8a**, predomine a forma Z.

No cálculo de minimização de energia, por sua vez, utilizam-se algoritmos computacionais para se buscar uma conformação de mínima energia. Para os propósitos deste estudo, buscam-se hidrogênios com as menores distâncias interatômicas possíveis que sejam específicas para uma determinada configuração. As configurações de mínimo local obtidas indicam que as menores distâncias interatômicas encontradas, específicas para cada isômero, são de 2,7 Å entre H-2 e H-3 e de 4,1 Å entre H-1 e H-3 do isômero Z, como ilustrado na Figura 67. Para o isômero E, essas distâncias são maiores.

Figura 67 – Confôrmeros de mínimo local para os isômeros E e Z da hidrazona 8d.

Para avaliar se os derivados hidroximetilados apresentam o mesmo comportamento conformacional, realizaram-se estudos de minimização conformacional por método *ab initio*, mais preciso e computacionalmente mais exigente (tempo de cálculo: 12 horas) resultando nas conformações apresentadas à Figura 68

Figura 68 – Confôrmeros de mínimo local para os isômeros E e Z do derivado hidroximetilado do ligante 8d.

Assim, espera-se observar o efeito nuclear Overhauser com maior intensidade entre os hidrogênios H-1 e H-3 e entre H-2 e H-3 do isômero Z, mas não do E.

De posse das informações obtidas, torna-se possível interpretar corretamente o espectro de RMN-2D NOESY (Figura 69).

Figura 69 - Espectro de 2D-RMN NOESY do composto 8d (DMSO- d_6 , 500 MHz).

No espectro de NOESY, os acoplamentos 1J_H são apresentados em azul (correlação positiva) e o efeito NOE é representado em vermelho (correlação negativa). Observa-se, como esperado, que há correlação ortogonal entre os sinais em 11,17 e 5,75 ppm, e entre os sinais em 11,17 e 8,91 ppm, correspondendo ao isômero Z.

Os dados com as proporções diastereoisoméricas encontram-se na Tabela XVIII:

Tabela XVIII. Proporções diastereoisoméricas das hidrazonas sintetizadas

Composto	Estrutura	Proporção E:Z (%)
8a		18:82
8b		58:42
8c		87:13
8d		79:31

O composto **8a** apresentou alta higroscopicidade, e mostrou-ser de difícil manipulação, mesmo quando submetido à bomba de vácuo e realizando-se destilações azeotrópicas. Entretanto, mostrou estabilidade quando armazenado por longos períodos.

Os demais compostos se apresentaram estáveis à temperatura ambiente, podem ser manuseados com facilidade e armazenados por longos períodos.

5.8. Tentativas de preparação dos derivados hidroximetilados

Como reação de teste, realizaram-se tentativas de preparação dos derivados hidroximetilados com o método descrito por Trossini e colaboradores, em 2010, pela agitação da hidrazona **8c**, obtida em maior quantidade numa etapa anterior, em solução aquosa de formaldeído a 37% e carbonato de potássio. Nessas condições, o carbonato pode abstrair um próton da hidrazona, e espera-se que ocorra uma adição nucleofílica do nitrogênio terminal da hidrazona à carbonila do formaldeído (Figura 70) (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 70 – Mecanismo de formação dos derivados hidroximetilados de estrutura geral 9.

Nas condições originais do procedimento, utilizadas para a hidroximetilação do NF, o produto NFOH precipita no meio reacional e pode ser isolado a partir de filtração e lavagem com metanol. Porém, para os compostos desse estudo, apesar de se observar o consumo completo do material de partida e formação de produto em CCD, não se observou a sua precipitação no meio reacional, sendo necessários outros métodos de purificação.

Tentou-se evaporar o etanol e o formaldeído do meio reacional sob pressão reduzida e 40 °C. Esse procedimento, entretanto, favoreceu a polimerização do formaldeído residual à paraformaldeído, fornecendo massa de sólidos final cerca de 500% maior do que a massa de material de partida sólido. Lavou-se o sólido resultante com diversos solventes orgânicos e evaporou-se o filtrado, esperando-se que algum

solvente solubilizasse preferencialmente o produto desejado, porém a massa obtida se apresentava superior à esperada.

Sabendo-se que essas condições de evaporação favorecem a formação do paraformaldeído, de difícil separação por se tratar de um polímero, tentou-se extrair o produto com clorofórmio e acetato de etila. O clorofórmio não solubilizou o produto, ao passo que o acetato de etila (2 x 25 mL) se mostrou eficaz na extração. Ao se secar a fase orgânica com MgSO_4 e evaporar o solvente, ainda se observou a presença do paraformaldeído. Sabe-se que o formaldeído é solúvel em acetato de etila, e pode ter passado à fase orgânica durante a extração e, portanto, polimerizado durante a evaporação.

Dessa forma, optou-se por purificar a fase orgânica em coluna, a fim de se remover o formaldeído e paraformaldeído residuais. Utilizou-se como eluente mistura de clorofórmio/metanol (9:1), aumentando-se a concentração de metanol em gradiente calculado pelo colunador automático. Após o isolamento dos picos referentes aos produtos e análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, observaram-se indícios de formação do produto desejado, porém, com sinais indicando a presença de paraformaldeído (Figura 71).

Figura 71 – Espectro de ^1H do produto de hidroximetilação da hidrazona 8c.

Não foi possível realizar as atribuições nesse espectro pois, apesar de o valor das integrais relativas dos sinais corresponder ao número de átomos de hidrogênio presentes no derivado hidroximetilado, observou-se na região 4,13 e 4,28 ppm sinais característicos de paraformaldeído na amostra.

Para se confirmar a presença de paraformaldeído na amostra, realizou-se a análise elementar do sólido obtido, e o desvio obtido em relação ao calculado foi menor que 0,4%. Tentou-se obter os derivados hidroximetilados das hidrazonas **8b** e **8c**, cuja formação também se evidenciou em CCD, com consumo completo do material de partida e dificuldades de interpretação do espectro de RMN de hidrogênio. Portanto, se fazem necessários novos métodos de purificação e caracterização para esses compostos antes de serem enviados para ensaio de atividade biológica, uma vez que o paraformaldeído presente na amostra interfere no teste, conforme descrito na seção de Métodos.

5.9. Ensaios de atividade tripanomicida e citotoxicidade

Os ensaios foram realizados no Laboratório Nacional de Biociências - LNBio (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM), com a colaboração do Dr. Lucio Holanda Gondim de Freitas Junior, a Dra. Carolina Borsoi Moraes e o doutorando Caio Haddad Franco.

Por meio de análise de alto conteúdo (*High Content Analysis*, HCA), obtiveram-se as curvas de dose-resposta, representadas na Figura 72.

Os compostos testados LAPEN-2902 e LAPEN-2904 apresentaram potência intermediária contra os amastigotas, com valores de EC_{50} de aproximadamente 22 e 15 μ M, respectivamente. Os dois compostos também foram suficientemente seletivos contra *T. cruzi*, com valores de IS de, pelo menos, 10. O composto LAPEN-2901 também mostrou potência similar à do benznidazol, contudo, apresentou atividade máxima de aproximadamente 87%. Apesar de, num ensaio preliminar, a atividade máxima desse composto ser inferior à do benznidazol, os resultados sugerem que exposições mais prolongadas ao composto devem ser testadas para determinar se o composto LAPEN-2901 pode atingir 100% de atividade máxima.

O composto LAPEN-2903 apresentou potência bastante inferior à dos demais compostos, com um valor de EC_{50} de aproximadamente 100 μ M. Embora esse composto tenha apresentado alta eficácia, atingindo mais de 95% de atividade máxima, LAPEN-2903 se mostrou inferior ao benznidazol tanto em potência quanto em eficácia. Os valores de EC_{50} , CC_{50} e atividade máxima encontram-se na Tabela XIX.

Na Figura 73, por sua vez, encontram-se as fotos representativas das células em cada condição de ensaio.

Figura 72 – Curvas de dose-resposta para os compostos testados.

Tabela XIX. Valores de EC₅₀, CC₅₀, e I.S. para os análogos do hidroximetilnitrofurais e composto referência contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, cepa Y

Composto	Estrutura	EC ₅₀	CC ₅₀	I.S.	Atividade máxima (%)
Benznidazol		3,96	N.D.	>101	103,50
NFOH		3,03	52,06	17,18	100,80
LAPEN-2901		5,53	N.D.	>36	86,99
LAPEN-2902		21,57	N.D.	>9,27	92,75
LAPEN-2903		101,30	N.D.	>2	95,23
LAPEN-2904		15,37	N.D.	>13,01	95,22

EC₅₀: concentração de composto correspondente a 50% da atividade normalizada após 96 horas de incubação;

CC₅₀: concentração de composto correspondente à redução de 50% das células hospedeiras em comparação com o controle negativo para atividade;

I.S.: Índice de seletividade (CC₅₀/EC₅₀).

Figura 73 – Fotos representativas do ensaio de atividade obtidas por HCA. (A) controle negativo para atividade (células hospedeiras + *T. cruzi* + DMSO 1%); (B) controle positivo para atividade (células hospedeiras + DMSO 1%); (C) após 96 horas de exposição a LAPEN-2901; (D) após 96 horas de exposição a LAPEN-2902; (E) após 96 horas de exposição a LAPEN-2904.

De maneira geral, observa-se que os compostos planejados não apresentaram potência ou atividade máxima superiores às do protótipo NF ou às do composto de referência benznidazol. Entretanto, o intermediário LAPEN-2901 apresentou seletividade duas vezes maior que o NFOH, ainda que a potência tenha sido inferior.

Comparando-se os dados referentes aos compostos LAPEN-2902 e LAPEN-2904, observa-se que a remoção do grupo nitro favoreceu em pequena escala o aumento da atividade, mesmo que o isômero majoritário do primeiro tenha apresentado *score* superior ao isômero majoritário do segundo na triagem virtual realizada (ligante 63, 5ª posição e ligante 69, 12ª posição, respectivamente). Considerando o suposto mecanismo de ação triplo dessas substâncias, esse fato evidencia que a remoção do grupo nitro não faz com que o composto perca sua atividade. Poderia atuar, preferencialmente, por outros mecanismos, como a inibição da CYP51 parasitária mediada pelo anel triazólico e a inibição de cruzaina pelo grupamento tiossemicarbazônico, com ganho de 3% na eficácia.

Os compostos LAPEN-2902 e LAPEN-2903 são bioisósteros clássicos entre si pela troca de um átomo de enxofre por um átomo de oxigênio e nota-se que a presença do átomo de enxofre é essencial para a atividade dos compostos planejados. Pode-se observar que a troca de enxofre pelo oxigênio acarretou uma diminuição de potência de aproximadamente 5 vezes, porém, manteve a atividade máxima. Estes fatos sugerem que apesar de LAPEN-2902 possuir baixa potência, pode também atuar por outras vias. Para que se mantenha o valor de EC_{50} dos compostos na ordem de 10 μ M, a presença do átomo de enxofre na cadeia hidrazônica se mostrou essencial.

Por outro lado, o composto LAPEN-2901, intermediário na rota de síntese de compostos da série B, apresentou potência similar à do benznidazol e do NFOH, apesar de não conter a cadeia lateral hidrazônica em sua estrutura química. De fato, nota-se que LAPEN-2901 é estruturalmente similar ao benznidazol, e é possível que ambos atuem pelo mesmo mecanismo, com predominante geração de espécies reativas de oxigênio.

São necessários, portanto, ensaios de inibição enzimática para averiguar as constantes de inibição desses compostos e assim determinar precisamente seus mecanismos de ação, a fim de que novas modificações moleculares sejam realizadas para otimização da potência, eficácia e seletividade desses compostos. Vale mencionar que esses compostos foram enviados para ensaio na 14 α -esterol desmetilase, no Laboratório da Profa. Galina Lepesheva, na Vanderbilt University, School of Medicine, em Nashville, Tennessee, US. Espera-se que os resultados esclareçam se a hipótese sobre reação nessa enzima se confirma.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Realizou-se a triagem virtual de 144 ligantes planejados a partir do NFOH, pelo método de *docking* em 14 α -esterol desmetilase de *T. cruzi*, dentre os quais selecionaram-se os 10 com melhor pontuação. Desses, dois foram sintetizados com sucesso, a saber, o ligante 63 (LAPEN-2902) e 69 (LAPEN-2903).

A partir de estudos qualitativos de campos de interação molecular, foi possível comparar o sítio ativo da CYP51 de *T. cruzi*, alvo molecular escolhido no planejamento, com o sítio ativo da enzima homóloga humana. O estudo revelou a existência de 9 resíduos de aminoácidos específicos da enzima parasitária relevantes para a seletividade, cuja existência possibilita a interpretação dos resultados de *docking* em função da seletividade para a enzima parasitária, bem como o planejamento direcionado de novas séries de ligantes. Os valores de energia dos campos podem ser utilizados no futuro para estudos de quimiometria a fim de se determinar as regiões e sondas mais relevantes para a seletividade.

Obtiveram-se, ao final deste estudo, 5 compostos inéditos, pertencentes à série B dos compostos planejados. Elucidou-se a estrutura desses compostos pela utilização de técnicas de análise espectroscópica no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C , HSQC, HMBC, HETCOR, NOESY, análise de ponto de fusão e análise elementar.

Para o composto sintetizado LAPEN-2901 foi possível obter a estrutura tridimensional por cristalografia de raios X, que auxiliaram os estudos de modelagem molecular.

Os métodos de síntese para a obtenção das hidrazonas da série A mostraram-se inadequados, uma vez que os intermediários acil-triazólicos se apresentaram instáveis. Se faz necessário, portanto, o desenvolvimento de novas metodologias de síntese para a obtenção desses compostos.

Os métodos de síntese para a obtenção das hidrazonas da série B mostraram-se adequados e de rendimentos baixos a apreciáveis (10-69%), sendo necessária a otimização das condições reacionais. Dentre os compostos obtidos, a hidrazona LAPEN-2905 mostrou-se higroscópica e de difícil manuseio, inviabilizando a avaliação de sua atividade biológica, sendo necessário otimizar seu método de purificação.

Os métodos para o isolamento dos derivados hidroximetilados das hidrazonas obtidas não foram eficazes, e as amostras obtidas apresentaram problemas de degradação e dificuldade de remoção do paraformaldeído residual. Para que a obtenção desses compostos seja possível, deve-se recorrer a outros métodos de síntese e purificação.

Avaliou-se a potência, eficácia e citotoxicidade de 4 compostos sintetizados frente a amastigotas de *T. cruzi*, cepa Y em células da linhagem U2OS, utilizando-se benznidazol como composto de referência. A maior parte dos compostos reduziu as taxas de infecção em níveis estatisticamente indistinguíveis do controle positivo para atividade (células não-infectadas) após 96 horas de exposição atividade tripanomicida alta. Todos os compostos testados apresentaram modesta seletividade para *T. cruzi*.

Observou-se que a presença do grupo tiossemicarbazônico é importante para a atividade das hidrazonas sintetizadas, possivelmente pela inibição da cruzafina parasitária. A remoção do grupo nitro não acarretou perda de atividade, evidenciando que esse grupo de compostos atua por outras vias além da produção de espécies reativas de oxigênio, possivelmente a inibição da CYP51 parasitária devido à presença do grupo 1,2,4-triazólico.

O composto LAPEN-2901 possui potência similar à do benznidazol e do NFOH, sendo aproximadamente 2 vezes mais seletivo que esse último, entretanto, com eficácia inferior. Sugere-se que em ensaios futuros se aumente o tempo de exposição do parasita ao composto para avaliar se ocorre aumento no valor de atividade máxima. Tal composto apresenta similaridade estrutural em relação ao benznidazol,

possivelmente atuando predominantemente pelo mesmo mecanismo de ação, ou seja, pela produção de espécies reativas de oxigênio.

Portanto, a triagem virtual realizada, em conjunto com as estratégias de modificação molecular do NFOH, se mostrou eficaz para selecionar positivamente dois compostos com ação tripanomicida para a forma amastigota, ainda que a seletividade tenha sido modesta. Espera-se, outrossim, que os resultados da inibição enzimática na 14 α -esterol desmetilase confirmem a hipótese estabelecida para o planejamento.

Há, ademais, a perspectiva de se realizar os ensaios em cruzafina, para esclarecer se esse mecanismo encontra-se envolvido na ação dos compostos planejados.

Com base nesses dados, novas séries serão planejadas para se obter compostos potencialmente mais ativos e seguros contra a forma crônica da doença de Chagas.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Material

7.1.1. Programas computacionais para modelagem molecular

- GOLD – *Protein-Ligand Dockin*) 3.0 (Cambridge Crystallographic Data Center)
- SYBYL-X 1.2 (Tripos International)
- PyMol Molecular Graphics System 1.3 (Schrödinger)
- Swiss PDB Viewer 4.1 (SIB Swiss Institute of Bioinformatics)
- GRID v.22.0.3c (Molecular Discovery)
- Spartan'14 for Windows (Wavefunction)
- GaussView 3.0 (Gaussian Inc.)

7.1.2. Reagentes e solventes para síntese

- 1,2,4-1*H*-1,2,4-triazol
- 2-cloro-2',4'-difluoroacetofenona
- 3-amino-1*H*-1,2,4-triazol
- Ácido sulfúrico
- Ácido clorídrico
- Carbonato de potássio
- Formaldeído
- Hidróxido de potássio
- Hidróxido de sódio
- Nitrito de sódio
- Semicarbazida
- Solventes comuns em síntese
- Tiosemicarbazida

7.1.3. Faixa de fusão

A determinação da faixa de fusão foi realizada em Aparelho Büchi capilar, de fusão automática, não aferido.

7.1.4. Cromatografia em camada delgada

Efetuiu-se o acompanhamento das reações em microplacas Merck para CCD, com fases móveis adequadas aos produtos analisados, e realizaram-se as revelações em lâmpada de UV e em cuba com iodo.

7.1.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Obtiveram-se os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C RMN em espectrômetro Bruker ADVANCE 300, que opera na frequência de 300 MHz (Departamento de Farmácia, FCF-USP), com os solventes deuterados adequados. Obtiveram-se os espectros de RMN 2D-HSQC, RMN 2D-HMBC e RMN 2D-NOESY em espectrômetro Bruker AIII, que opera na frequência de 500 MHz (Central Analítica, IQ-USP).

Os deslocamentos químicos estão expressos em partes por milhão (ppm), utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Nas atribuições, as multiplicidades estão em parênteses (s = singleto, m = multipeto) e calculou-se o número de hidrogênios referentes a cada sinal pela sua integral relativa.

7.1.6. Cromatografia líquida de alta eficiência

Determinou-se o comprimento de onda ideal de detecção por espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. Estimou-se o pKa do analito com o programa MarvinSketch, e ajustaram-se as condições de fase móvel de maneira que o analito fosse solúvel durante todo o gradiente de corrida e permanecesse em sua forma molecular. A corrida cromatográfica foi realizada empregando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), modelo Merck Hitachi LaChrom, equipado com detector UV (Central Analítica do Departamento de Farmácia, FCF-USP).

As condições ótimas encontradas para a análise de pureza do 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol foram:

- Fase móvel: 95% H₃PO₄ (0,05% m/m)/5% MeOH
- Coluna C18 (3,9x300 mm), Waters;
- Detecção em 254 nm;
- Fluxo: 1,000 mL/min;
- Temperatura: 35 °C, Volume de injeção: 10 mL.

7.1.7. Espectroscopia no infravermelho

Obtiveram-se os espectros no infravermelho com um espectrômetro Shimadzu FTIR. Para a leitura, utilizaram-se alíquotas de 5 mg dos analitos misturadas a quantidades adequadas de brometo de potássio em pó para confecção da pastilha.

7.1.8. Separação por cromatografia em coluna

Para os produtos purificados com cromatografia em coluna, utilizou-se o sistema de purificação Biotage Isolera Prime equipado com leitor UV, misturador de fase móvel e colunas de sílica SNAP de 25 g e 100 g. Para a eluição, o aparelho utiliza dados de CCD para elaborar um gradiente ótimo de força do solvente.

7.1.9. Materiais para ensaios de atividade biológica

7.1.9.1. Compostos

Sintetizaram-se os compostos LAPEN-2901, LAPEN-2902, LAPEN-2903, LAPEN-2904 e hidroximetilnitrofural (NFOH) em nosso laboratório. O benzimidazol foi obtido da Nortec Química.

7.1.9.2. Células

LLC-MK2: obteve-se a linhagem celular LLC-MK2 por suspensão preparada de rins removidos de macacos Rhesus. As células formam uma monocamada contígua que pode ser mantida por várias semanas. Manteve-se essa linhagem celular em meio DMEM de alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina a 100 U/mL, e 100 µg/mL de estreptomicina.

U2OS: obteve-se a linhagem celular U2OS do tecido ósseo de uma paciente humana de 15 anos com osteossarcoma. As células U2OS apresentam morfologia epitelial aderente. Essa linhagem celular foi mantida em meio DMEM de alta glicose.

Trypanosoma cruzi, cepa Y: Obtiveram-se as formas tripomastigotas a partir do sobrenadante da cultura células teciduais LLC-MK2 infectadas por *T. cruzi* Y. Mantiveram-se as culturas infectadas em meio DMEM de baixa glicose suplementado com 2% de FBS, penicilina a 100 U/mL, e estreptomicina a 100 µg/mL.

7.2. Métodos

7.2.1. Modelagem molecular

7.2.1.1. Estudos de *docking*

Para a construção, parametrização, cálculo de cargas parciais, otimização estrutural e avaliação do alinhamento dos ligantes utilizou-se o programa Sybyl-X 1.1, escolhendo-se .mol2 como formato de arquivo para os ligantes, por manter as informações adequadas de parametrização.

Parametrizaram-se os ligantes utilizando o campo de força Tripos (CLARK; CRAMER III; VAN OPDENHOSCH, 1989), pela compatibilidade com o programa de *docking*. As cargas parciais de cada átomo são calculadas durante o algoritmo de minimização pelo método empírico de Gasteiger-Marsili (GASTEIGER; MARSILI, 1978).

Os algoritmos de otimização estrutural são fechados, e testaram-se todos a fim de se obter o melhor alinhamento em relação ao ligante cristalografado, em constante dielétrica igual a 1,0 (vácuo), com número máximo de 1000 iterações, suficientes para que houvesse convergência para todos os ligantes (critério de convergência: 0,05 kcal/mol, padrão do programa). Combinaram-se os algoritmos de declive máximo e de gradientes conjugados para obter melhores resultados.

A estrutura cristalográfica da CYP51 de *T. cruzi* foi obtida a partir do *Protein Data Bank* (PDB) (BERNSTEIN et al., 1978).

Para as simulações de *docking* e análise dos resultados, utilizou-se o programa GOLD 4.1.2, um programa do pacote Gold Suite (Cambridge Crystallographic Data Centre) (HARTSHORN, 2007), que utiliza algoritmo genético como algoritmo de busca, e disponibiliza quatro funções de *score* (Goldscore, Chemscore, ASP e CHEMPLP). Para se determinar as melhores condições de simulação, realizou-se o *redocking* do ligante co-cristalizado, testando-se todas as funções em triplicata, variando-se o tamanho da caixa do *docking* (10, 12, e 14 Å, restrita à superfície acessível por solvente do sítio ativo, centralizada no átomo de ferro do grupo heme) e a eficiência do algoritmo

genético, referente ao número de operações de algoritmo genético realizadas por unidade de tempo, de maneira que quanto maior a eficiência, mais exaustiva a busca.

Após determinar as melhores condições, realizaram-se as simulações de *docking* para os ligantes selecionados. Realizou-se a operação de algoritmo genético 10 vezes para cada ligante, gerando uma população máxima de 10 poses e escolhendo-se a de maior pontuação.

A tabela completa com os valores de RMSD encontrados no estudo de *redocking* e com os valores de *Fitness* encontrados para os 144 ligantes, em triplicata, encontra-se no Anexo 1.

Utilizou-se o programa PyMol 1.3 para gerar as imagens dos resultados.

7.2.1.2. Estudo qualitativo de campos de interação molecular

Obtiveram-se as estruturas cristalográficas da CYP51 humana (3JUS, 2,9 Å) e parasitária (3KHM, 2,85 Å) a partir do *Protein Data Bank* (PDB, www.pdb.org), e efetuou-se o alinhamento com o programa *Swiss PDB Viewer* (GUEx; PEITSCH, 1997) primeiramente pelo alinhamento pelos carbonos alfa, e este foi refinado pela geração de alinhamento estrutural baseado na estrutura primária.

Removeram-se os ligantes e moléculas de água, mantendo-se o grupo heme, e calcularam-se os campos de interação molecular (MIFs, do inglês *molecular interaction fields*) do sítio ativo pelo programa GRID v.22.0.3c (GOODFORD, 1985), determinando-se interativamente uma caixa de 16x16x16 Å (com *grid space* de 1Å), de forma a incluir todos os resíduos do sítio ativo, utilizando-se as sondas H₂O, C1= (sp², vinílico ou aromático), N: (sp³ com par de elétrons livre) e DRY (sonda hidrofóbica).

Realizou-se a análise visual comparativa dos resíduos do sítio ativo das enzimas humana e parasitária alinhadas utilizando-se o programa PyMol 1.3, importando-se os campos gerados no formato .grd e compararam-se os MIFs obtidos e as diferenças

entre os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas, buscando a seletividade por meio das diferenças encontradas.

7.2.1.3. Cálculo dos calores de formação

Realizaram-se os cálculos de calor de formação por dois métodos:

- **Método quântico semi empírico**

Tomaram-se as estruturas construídas para o estudo de *docking* e obteve-se o valor da soma das entalpias eletrônicas e térmicas pelo método semi empírico de Hartree Fock não restrito, utilizando-se base de dados 3-21G com o programa GaussView 3.0. Calcularam-se os calores de interconversão entre os isômeros subtraindo-se o calor de formação para o isômero Z do calor de formação para o isômero E.

- **Procedimento termodinâmico T1**

Utilizou-se o programa Spartan'14 para a realização desse procedimento, que consiste na realização de três passos: (i) otimização geométrica pelo método de Hartree Fock com base de cálculo 6-31G*; (ii) cálculo de cargas pontuais pelo método RI/MP2 com base de cálculo 6-311G**; (iii) correlação das cargas calculadas com o calor de formação obtido de um conjunto de dados de mais de 1800 compostos orgânicos (OHLINGER et al., 2009).

7.2.1.4. Otimização de geometria por método quântico

Realizou-se a otimização estrutural por teoria do funcional de densidade (DFT), método quântico *ab initio*, pelo programa GaussView 3.0, com base de cálculo 6-311G**.

7.2.2. Síntese dos compostos

7.2.2.1. Preparação do 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol (2b)

Sintetizado de acordo com a reação apresentada à Figura 50.

Em balão de 500 mL de uma boca, com agitação magnética, adicionaram-se, lentamente, 10 g (0,12 mol) de 3-amino-1,2,4-triazol à solução de nitrito de sódio (9,5 g) em H₂SO₄ concentrado (41,5 mL) a 0-5 °C. Água destilada (300 mL) foi adicionada após 20 minutos, tomando-se o cuidado para que a temperatura não excedesse 5 °C, efetuando-se o resfriamento em banho de etanol e gelo seco. A mistura foi lentamente adicionada à solução aquosa de nitrito de sódio 40% (120 g) a 35-40 °C em balão de fundo redondo de 500 mL. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por 12 h, sob agitação. A suspensão obtida foi submetida à extração com acetato de etila (3 x 20 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio e após filtração removeu-se o solvente com evaporação sob pressão reduzida (40 °C, 240 mBar).

Recristalizou-se o sólido obtido com metanol. O produto foi mantido em dessecador sob pressão reduzida contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo durante 12 horas (RAO et al., 1991).

Rendimento: 50%; RMN ¹H (DMSO-d₆), 300 MHz: δ = 15,25 (s, 1H); 8,88 (s, 1H). Faixa de fusão: 209-210 °C.

7.2.2.2. Preparação do sal sódico do 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol

Sintetizado de de acordo com reação apresentada à Figura 52.

Em balão de 25 mL, com agitação magnética, misturaram-se soluções previamente preparadas de 1,3 g (32,6 mmol) de hidróxido de sódio em 5 mL de água desionizada e 1,03 g (9 mmol) de 3-nitro-1,2,4-triazol em 5 mL de água desionizada. Manteve-se a mistura reacional em agitação à temperatura ambiente durante 4 horas. A suspensão resultante foi, então, refrigerada a 4 °C. Filtrou-se o precipitado cristalino, que foi lavado com metanol a 0 °C e éter dietílico. Dissolveu-se o sólido resultante em metanol. Em seguida, a solução foi filtrada e o filtrado, evaporado (KAZHEMEKAITE et al., 1998).

Rendimento: 57%; RMN ^1H (DMSO-d_6), 300 MHz: δ = 7,71 (s, 1H). Faixa de fusão: 272-273 °C.

7.2.2.3. Procedimento geral para a síntese das triazolil-acetofenonas

Sintetizadas de acordo com a reação apresentada à Figura 58.

Adicionaram-se, em um balão de 100 mL aquecido a 40 °C em atmosfera inerte, 2 mL de solução 0,5 M do sal sódico do triazol **2a** ou **2b**, em acetonitrila. Em seguida, adicionaram-se, lentamente, 2 mL de solução 0,5 M de 2-cloro-2',4'-difluoroacetofenona. Após adição completa, a mistura foi mantida em refluxo a 120 °C, durante 8 horas. Filtrou-se a suspensão e o filtrado foi evaporado. O sólido resultante foi submetido à purificação por colunador automático equipado com coluna de sílica utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1), em gradiente determinado pelo aparelho (PAPADOPOULOU et al., 2012).

A.1-(2,4-difluorfenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etanona (7a)

Sólido amarelo escuro. Rendimento: 22%; RMN ^1H (DMSO-d_6), 300 MHz: δ = 8,49 (s, 1H, H7); 8,00-8,08 (m, 1H, H4); 8,02 (s, 1H, H1); 7,49-7,57 (m, 1H, H6); 7,28-7,32 (m, 1H, H5); 8,52 (s, 2H, H2, H3). Faixa de fusão: 109-111 °C.

B.1-(2,4-difluorofenil)-2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-il)etanona (7b, LAPEN-2901)

Sólido branco amarelado. Rendimento: 46%; IV (KBr), ν cm^{-1} = 1697 (C=O), 1609 (C=C), 1508 (Ar-NO₂). RMN ^1H (DMSO-d_6), 300 MHz: δ = 8,81 (s, 1H, H1); 8,03-8,11 (m, 1H, H4); 7,51-7,59 (m, 1H, H6); 7,30-7,36 (m, 1H, H5); 6,03 (s, 2H, H2, H3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6), 75 MHz: δ = 187,96 (C4); 167,51 (C8); 164,37 (C1); 160,77 (C6); 148,31 (C2); 132,60 (C10); 119,23 (C5); 112,71 (C9); 105,40 (C7); 59,27 (C3). Análise elementar calculada: C: 44,96; H: 2,32; N: 20,51. Experimental: C: 45,01; H: 2,30; N: 20,39. Faixa de fusão: 113-114 °C.

7.2.2.4. Procedimento geral para a síntese das hidrazonas

Sintetizadas de acordo com a reação apresentada à Figura 61.

Em um balão de 50 mL dissolveram-se 10 mmol da cetona **7a** ou **7b** apropriada e 10 mmol da hidrazida **4a** ou **4b** em 10 mL de etanol anidro e adicionaram-se 3 gotas de ácido clorídrico à essa solução. Colocou-se a reação em refluxo (110 °C) durante 12 horas. A solução resultante foi evaporada e o sólido formado foi submetido à purificação por colunador automático equipado com coluna de sílica utilizando como eluente mistura de clorofórmio e metanol (9:1), em gradiente determinado pelo aparelho.

A.(E/Z)-1-(1-(2,4-difluorfenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etilideno)-semicarbazida (8a, LAPEN-2905)

Sólido amarelo escuro. Rendimento: 19%; RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz: (E, 12%) δ = 10,20 (s, 1H, H3); 8,55 (s, 1H, H1); 7,91 (s, 1H, H9); 7,65-7,73 (m, 1H, H4); 7,08-7,34 (m, 2H, H5, H6); 6,57 (s, 2H, H7, H8); 5,51 (s, 2H, H2, H10). (Z, 82%) δ = 9,21 (s, 1H, H3); 8,44 (s, 1H, H1); 7,94 (s, 1H, H9); 7,65-7,73 (m, 1H, H4); 7,08-7,34 (m, 2H, H5, H6); 6,41 (s, 2H, H7, H8); 5,28 (s, 2H, H2, H10).

Análise elementar calculada: C: 46,24; H: 3,81; N: 28,72; Experimental: C: 45,99; H: 3,88; N: 28,65. Composto higroscópico.

B.(E/Z)-1-(1-(2,4-difluorfenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etilideno)-tiosemicarbazida (8b, LAPEN-2904)

Sólido marrom. Rendimento: 69%; IV (KBr), ν cm^{-1} = 1616 (C=N), 1504 (C=C Ar). RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz: (E, 58%) δ = 10,24 (s, 1H, H3); 8,49 (s, 1H, H1); 8,48 (s, 1H, H8); 7,96 (s, 1H, H9); 7,92 (s, 1H, H7); 7,78-7,86 (m, 1H, H4); 7,08-7,39 (m, 2H, H5, H6); 5,36 (s, 2H, H2, H10). (Z, 42%) δ = 11,15 (s, 1H, H3); 8,59 (s, 1H, H1); 8,56 (s, 1H, H8); 8,37 (s, 1H, H9); 8,01 (s, 1H, H7); 7,78-7,86 (m, 1H, H4); 7,08-7,39 (m, 2H, H5, H6); 5,63 (s, 2H, H2, H10).

Análise elementar calculada: C: 47,13; H: 4,33; N: 23,13. Experimental: C: 47,62; H: 4,45; N: 22,72. Ponto

de decomposição: 130 °C.

**C.(E/Z)-1-(1-(2,4-difluorfenil)-2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-il)etilideno)-
semicarbazida (8c, LAPEN-2903)**

Sólido branco. Rendimento: 10%; IV (KBr), ν cm^{-1} = 1670 (C=O), 1617 (C=N), 1504 (C=C Ar), 1379 (Ar-NO₂). RMN ¹H (DMSO-d₆), 300 MHz: (E, 87%) δ = 9,32 (s, 1H, H3); 8,82 (s, 1H, H1); 7,74-7,82 (m, 1H, H4); 7,30-7,38 (m, 1H, H5); 7,02-7,19 (m, 1H, H6); 6,61 (s, 2H, H7, H8); 5,40 (s, 2H, H2, H10). (Z, 13%) δ = 10,27 (s, 1H, H3); 8,88 (s, 1H, H1); 7,74-7,82 (m, 1H, H4); 7,30-7,38 (m, 1H, H5); 7,02-7,19 (m, 1H, H6); 6,61 (s, 2H, H7, H8); 5,62 (s, 2H, H2, H10). Análise elementar calculada: C: 40,18; H: 3,00; N: 29,00. Experimental: C: 40,12; H: 3,07; N: 28,91. Ponto de decomposição: 140 °C.

**D.(E/Z)-1-(1-(2,4-difluorfenil)-2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-il)etilideno)-
semicarbazida (8d, LAPEN-2902)**

Sólido branco amarelado. Rendimento: 60%; IV (KBr), ν cm^{-1} = 1605 (C=N), 1508 (Ar-NO₂), 1391 (Ar-NO₂), 1365 (Ar-NO₂). RMN ¹H (DMSO-d₆), 300 MHz: (E, 79%) δ = 10,31 (s, 1H, H3); 8,85 (s, 1H, H1); 8,43 (s, 1H, H7); 7,83 (s, 1H, H9); 7,06-7,45 (m, 3H, H4, H5, H6); 5,47 (s, 2H, H2, H10). (Z) δ = 11,17 (s, 1H, H3); 8,91 (s, 1H, H1); 8,56 (s, 1H, H7); 8,06 (s, 1H, H9); 7,06-7,45 (m, 3H, H4, H5, H6); 5,75 (s, 2H, H2, H10). RMN ¹³C(DMSO-d₆), 75 MHz: (Z, 31%) δ = 179,48 (C5); 165,31 (C9); 162,00 (C1); 157,99 (C7); 147,63 (C2); 138,17 (C4); 131,32 (C8); 114,94 (C6); 112,60 (C10); 109,94 (C11); 55,47 (C3). (Z) δ = 179,48 (C5); 165,31 (C9); 162,00 (C1); 157,99 (C7); 147,63 (C2); 138,17 (C4); 132,44 (C8); 119,88 (C6); 112,60 (C10); 109,94 (C11); 48,08 (C3). Análise elementar calculada: C: 38,72; H: 2,56; N: 28,81. Experimental: C: 38,63; H: 2,64; N: 28,95.

7.2.3. Ensaios de atividade tripanomicida e citotoxicidade

Preparação das soluções de compostos

Dissolveram-se os compostos a serem testados em volume apropriado de DMSO 100%. para preparar soluções estoque a 20 mM. Preparou-se a solução do composto de referência benznidazol a 40 mM em DMSO 100%. Mantiveram-se as alíquotas de todas as soluções congeladas a -80°C , protegidas da luz e submetidas a um máximo de 3 ciclos de congelamento-descongelamento.

Ensaio de atividade dos compostos

Realizou-se o ensaio de atividade como descrito por Moraes e colaboradores em 2014. No dia 1 cultivaram-se as células U2OS em placas μ Clear pretas de poliestireno com 384 poços para cultura (Greiner Bio-One), na concentração de 700 células por 40 μL de meio DMEM de alta glicose com o auxílio de uma dispensadora automática Wellmate Liquid Handler (Thermo-Scientific) e incubada por 24 h a 37°C e 5% de CO_2 .

No dia 2, cultivaram-se os tripomastigotas do sobrenadante da cultura de células LLC-MK2 infectadas com o *T. cruzi* cepa Y e adicionaram-se às placas de 384 poços contendo as células U2OS na concentração de 2800 tripomastigotas em 10 μL de meio DMEM de baixa glicose por poço. No dia 3, diluíram-se os compostos seriadamente por um fator de 2 em DMSO 100% em 15 pontos numa placa de polipropileno de 384 poços (Greiner BioOne) utilizando-se uma pipeta manual de 16 canais equipada com ponteiros descartáveis (ThermoScientific). Para todos os compostos testados, a maior concentração foi de 200 μM e a menor foi 12 nM, e para o benznidazol as concentrações foram 400 μM e 24 nM, respectivamente. Transferiram-se 10 μL das soluções dos compostos para as placas contendo as células U2OS/*T. cruzi*, resultando em concentração final de 1% de DMSO e um volume final de 60 μL para cada poço. Cada concentração de composto foi testada em duplicata (dois poços por placa) e cada experimento foi realizado em triplicata, independentemente. Noventa e seis horas após a adição de composto, fixaram-se as placas durante 15 minutos com 30 μL de solução de paraformaldeído por poço, resultando em concentração final de 4% de

paraformaldeído, seguida por 3 lavagens com tampão fosfato (PBS) e coradas com Draq5 (diluição de 1/1000 em DPBS, 10 µL por poço). Após coradas, obtiveram-se os dados de imagens das placas pelo sistema de *High Content Analysis* (HCA) Operetta (Perkin Elmer) com uma lente objetiva de 20x WD.

Analísaram-se as imagens obtidas com o programa de HCA Harmony (Perkin Elmer) para identificação, segmentação e quantificação de núcleos e citoplasma de células hospedeiras e parasitas intracelulares. O HCA fornece os resultados das imagens de todos os poços sobre o número total de células, número total de células infectadas, número total de parasitas intracelulares e o número médio de parasitas por célula infectada. Para a finalidade deste estudo, definiu-se a taxa de infecção (TI) como a razão entre o número total de células infectadas em todas as imagens do poço e o número total de células em todas as imagens do mesmo poço (i) . Os valores de TI foram normalizados em relação aos controles negativos para atividade (células infectadas tratadas com solução de DMSO, somente) e positivos para atividade (células não infectadas) para se determinar a atividade antiparasitária normalizada (AN), de acordo com as equações que seguem:

$$\text{Taxa de infecção normalizada (TIN): } [(\mu_{\text{TIN}} - \mu_{\text{TIT}})/(\mu_{\text{TIN}} - \mu_{\text{TIP}})] \times 100$$

$$\text{Atividade normalizada (AN): } [1 - (\mu_{\text{TIN}} - \mu_{\text{TIT}})/(\mu_{\text{TIN}} - \mu_{\text{TIP}})] \times 100$$

Onde μ_{TIN} : taxa de infecção média dos poços com controle negativo; μ_{TIP} : taxa de infecção média dos poços com controle positivo; μ_{TIT} : taxa de infecção média dos poços com o composto a ser testado.

Processaram-se os valores de atividade normalizada com o programa Graphpad Prism, versão 6, para a construção da curva dose-resposta com ajuste sigmoidal e determinação dos valores de EC_{50} e CC_{50} por interpolação. O programa também calcula os valores de atividade máxima (Atv. Max.), baseado no valor máximo normalizado de atividade fornecido pela curva sigmoidal.

Para o propósito deste estudo, definiu-se EC_{50} como a concentração de composto correspondente a 50% da atividade normalizada após 96 horas de incubação. A potência dos compostos é relacionada ao valor de EC_{50} , de maneira que quanto mais potente o composto, menor é o valor de EC_{50} . A eficácia diz respeito à atividade máxima observada de um composto, de maneira que quanto mais eficaz o composto, mais próxima de 100% é sua atividade máxima.

Mediu-se a citotoxicidade pelo valor de CC_{50} , definido como a concentração de composto correspondente à redução de 50% das células hospedeiras em comparação com o controle negativo para atividade (células infectadas, tratadas com DMSO). Testou-se uma placa apenas com células hospedeiras e os compostos para se confirmar os valores de citotoxicidade.

Definiu-se o índice de seletividade (IS) como a razão entre o valor de CC_{50} e EC_{50} . Quando o cálculo de CC_{50} não é possível, o valor de IS tende a ser maior do que a razão entre a concentração máxima de composto e EC_{50} .

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-FRANCH, F.; SANTOS, W. S.; SCHOFIELD, C. J. Research needs for Chagas disease prevention. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 44–54, 2010.
- AGUIRRE, G. et al. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 4885–93, 2004.
- ALCAZAR-FUOLI, L. et al. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. **Steroids**, v. 73, n. 3, p. 339–47, 2008.
- ALVES, L.R. **Caracterização funcional de complexos mRNA-proteínas (mRNPs) em *Trypanosoma cruzi***. Rio de Janeiro, 2010. 354p. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular – Instituto Fundação Oswaldo Cruz,
- ANDREWS, N. W. et al. Stage-specific morphogenesis surface antigens expressed during of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 64, p. 474–484, 1987.
- ANDRIANI, G. et al. Antitrypanosomal lead discovery: identification of a ligand-efficient inhibitor of *Trypanosoma cruzi* CYP51 and parasite growth. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2556–67, 2013.
- ARAÚJO, A. B.; BERNE, M. E. A. Conventional serological performance in diagnosis of Chagas' disease in southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 174–8, 2013.
- ATKINSON, M. R.; POLYA, J. B. Triazoles. Part II. N-Substitution of some. **Journal of the Chemical Society**, p. 141–145, 1954.
- BARREIRO, E. J. Estrategia de simplificação molecular no planejamento racional de farmacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1172–1180, 2002.

- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da terapêutica. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. p. 271–277, 343–345.
- BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M. A; ROBERT-GERO, M. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. **Acta tropica**, v. 70, n. 1, p. 43–61, 1998.
- BENCHIMOL BARBOSA, P. R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, v. 112, n. 1, p. 132–3, 10 set. 2006.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5. ed. New York: Freeman, 2002. p. 974–976
- BERNSTEIN, F. C. et al. The Protein Data Bank : A Computer-based archival structures. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 185, n. 2, p. 584–591, 1978.
- BESTETTI, R. B.; CARDINALI-NETO, A. Dissecting slander and crying for justice: Carlos Chagas and the Nobel Prize of 1921. **International Journal of Cardiology**, p. 1–7, 2013.
- BIGATÃO, H. M. **Antichagásicos potenciais: planejamento e estudo da síntese de biosósteros imidazólicos e triazólicos do hidroximetilnitrofuril**. São Paulo, 2011. 126p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- BIOLO, A.; RIBEIRO, A. L.; CLAUSELL, N. Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years? **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 52, n. 4, p. 300–16, 2010.
- BLANCHARD, E. W.; STUART, A. H.; TALLMAN, R. C. Studies on a new series of synthetic estrogenic substances. **Endocrinology**, v. 32, p. 307–309, 1943.

- BLANEY, J. M.; DIXON, J. S. A good ligand is hard to find: Automated docking methods. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 1, p. 301–319, 1993.
- BOVERIS, A. et al. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical Journal**, v. 188, n. 3, p. 643–8, 1980.
- BRAIUCA, P. et al. An innovative application of the “flexible” GRID/PCA computational method: study of differences in selectivity between PGAs from *Escherichia coli* and a *Providentia rettgeri* mutant. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 4, p. 1025–31, 2004.
- BRUTUS, L. et al. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. **Acta tropica**, v. 106, n. 3, p. 195–199, 2008.
- BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent Developments in Sterol 14 α -demethylase Inhibitors for Chagas Disease. **International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 236–242, 2012.
- BUHAESCU, I.; IZZEDINE, H. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 9-10, p. 575–84, 2007.
- BURGER, A. **Isosterism and bioisosterism in drug design**. In: BASEL, B. (Ed.). Progress in Drug Research. [s.l: s.n.]. p. 287–371.
- CAROD-ARTAL, F. J.; GASCON, J. Chagas disease and stroke. **Lancet Neurology**, v. 9, n. 5, p. 533–542, 2010.
- CAROSATI, E.; SCIABOLA, S.; CRUCIANI, G. Hydrogen bonding interactions of covalently bonded fluorine atoms: from crystallographic data to a new angular function in the GRID force field. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 21, p. 5114–25, 2004.

- CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 12, p. 1143–56, 2001.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [online]**, v. 1, n. 2, p. 159–208, 1909.
- CHELESKI, J. et al. Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 5899–909, 2010.
- CHEN, C.-K. et al. Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. e651, 2010.
- CHUNG, M. C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de NF e primaquina potencialmente antichagásicos**. São Paulo, 1996. 196p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- CHUNG, M.-C. et al. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4779–4783, 2003.
- CIAPETTI, P.; GIETHLEN, B. **Molecular variations based on isosteric replacements**. In: *The Practice of Medicinal Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 2003. p. 290–342.
- CLARK, M.; CRAMER III, R. D.; VAN OPDENHOSCH, M. Validation of the General Purpose Tripos 5.2 force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, p. 982–1012, 1989.

- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Equilibria, rates, and mechanisms: summary of mechanistic principles**. In: Organic Chemistry. 2a. ed. [s.l.] Oxford, 2012. p. 135–150, 331.
- CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S12–5, 2010.
- COHEN, N. C. **The molecular modeling perspective in drug design**. In: Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. [s.l.] Academic Press, 1996. p. 1–17.
- CORCOS, L.; LE JOSSIC-CORCOS, C. Statins: perspectives in cancer therapeutics. **Digestive and Liver Disease**, p. 1–8, 2013.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102S, n. August, p. 113–22, 30 2007.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5–13, 2010.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, jan. 2002.
- COUTINHO, M.; CARLOS, J.; DIAS, P. A descoberta da doença de Chagas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 2, p. 11–51, 1999.
- CRUZ-PACHECO, G.; ESTEVA, L.; VARGAS, C. Control measures for Chagas disease. **Mathematical Biosciences**, v. 237, n. 1-2, p. 49–60, 2012.
- CURTIS, A. D. M.; JENNINGS, N. **1,2,4-Triazoles**. In: KATRITZKY, A. R. et al. (Eds.). Comprehensive Heterocyclic Chemistry. [s.l.: s.n.]. p. 159–209, 2008.

- DAVIES, C. et al. Hydroxymethylnitrofurazone is active in a murine model of Chagas' disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3584–3589, 2010.
- DE BEULE, K. Itraconazole: pharmacology, clinical experience and future development. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 6, n. 3, p. 175–81, 1996.
- DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 10, p. 2069–80, 2009.
- DEL NERY, E. et al. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 41, p. 25713–25718, 1997.
- DESAI, F. et al. Comparison of the immunomodulatory effects of the plant sterol beta-sitosterol to simvastatin in peripheral blood cells from multiple sclerosis patients. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 153–7, 2009.
- DEVERA, R.; ILLARRAMENDI, X.; MONTOYA-ARAÚJO, R. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais Biodemes of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from humans from three endemic areas in Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 323–330, 2002.
- DIAS, J. C. P. Cecílio Romãña, o sinal de Romãña e a Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 407–413, 1997.
- DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603–12, 2002.

- DNDI. LAFEPE anuncia disponibilidade do primeiro lote comercial do benznidazol 12,5 mg. Disponível em: <http://www.dndial.org/pt/centro-de-documentacao/331-30-05-2012-lote-comercial-bzn-pediatrico.html>. Acesso em: 29 outubro 2014.
- DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2695–707, 2002.
- DURANT, G. J. et al. Cyanoguanidine-Thiourea Equivalence in the Development of the Histamine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 901–906, 1977.
- ENGEL, J. C. et al. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental Trypanosoma Cruzi Infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 188, n. 4, p. 725–734, 1998.
- EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 283–91, 2010.
- FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 695–729, 1992.
- FIOCRUZ. Doença de Chagas: sintomas, transmissão e prevenção. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/doenca-de-chagas-sintomas-transmissao-e-prevencao>. Acesso em: 29 outubro 2014.
- FRANCOLINO, S. S. et al. New evidence of spontaneous cure in human Chagas ' disease Novas evidências da cura espontânea da doença de Chagas humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 103–107, 2003.

- FREITAS, R. F. et al. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2476–82, 2009.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 22–7, 2010.
- GASTEIGER, J.; MARSILI, M. A New Model for Calculating Atomic Charges in Molecules. **Tetrahedron Letters**, v. 36, p. 3181–3184, 1978.
- GONÇALVES, J. G. F. et al. Mortality indicators among chronic Chagas patients living in an endemic area. **International Journal of Cardiology**, v. 143, n. 3, p. 235–242, 2010.
- GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 849–857, 1985.
- GRZONKA, Z. et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 1–20, 2001.
- GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714–2723, 1997.
- GURGEL, C. B. M. F.; MAGDALENA, C. V.; PRIOLI, L. F. A tripanossomíase americana antes de Carlos Chagas. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 17, n. 4, p. 827–839, 2009.
- HARTSHORN, M.J. et al. Diverse, High-Quality Test Set for the Validation of Protein-Ligand Docking Performance. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 726–741, 2007.
- HUANG, H.-J. et al. Current developments of computer-aided drug design. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 41, n. 6, p. 623–635, 2010.

- HUANG, L.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Crystal structures of reversible ketone-Based inhibitors of the cysteine protease cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 21–9, 2003.
- HUNTER, W. N. The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 30, p. 21573–21577, 2007.
- ITZENSTEIN, M. VON et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 363, p. 418–423, 1993.
- JONES, D. C. et al. Comparative structural, kinetic and inhibitor studies of Trypanosoma brucei trypanothione reductase with *T. cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 169, n. 1, p. 12–9, 2010.
- JONES, G.; WILLETT, P. Docking small-molecule ligands into active sites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 652–656, 1995.
- KAISER, R. Use of the Nuclear Overhauser Effect in the Analysis of High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra. **The Journal of Chemical Physics**, v. 39, n. 10, p. 2435, 1963.
- KANNE, J. P.; ROHRMANN, C. A.; LICHTENSTEIN, J. E. Eponyms in radiology of the digestive tract: historical perspectives and imaging appearances. Part 2. Liver, biliary system, pancreas, peritoneum, and systemic disease. **Radiographics**, v. 26, n.1, p. 465–480, 2006.
- KASTENHOLZ, M. A. et al. GRID/CPCA: A New Computational Tool To Design Selective Ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 16, p. 3033–3044, 2000.
- KAZHEMEKAITE, M. et al. Preparation of the pure sodium salt of 1H-1,2,4-triazole. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 34, n. 2, p. 277–278, 1998.

- KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery : Methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 935-949, 2004.
- KOROLKOVAS, A.; FERREIRA, E. I. Planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 11, n. 2, p. 320–329, 1988.
- KOUROUNAKIS, A. P.; MATRALIS, A. N.; NIKITAKIS, A. Design of more potent squalene synthase inhibitors with multiple activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 21, p. 7402–7412, 2010.
- KOWALSKA, A.; KOWALSKI, P.; TORRES, M. A. T. Chagas disease – american trypanosomiasis. **Polish Annals of Medicine**, v. 18, n. 1, p. 156–167, 2011.
- KÜMMERLE, A. E. et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of N-acylhydrazones and novel conformationally constrained compounds as selective and potent orally active phosphodiesterase-4 inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7525–45, 2012.
- KUNTZ, I. D. Structure-based strategies for drug design and discovery. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1078–1082, 1992.
- LANDGE, S. M. et al. Isomerization Mechanism in Hydrazone-Based Rotary Switches : Lateral Shift , Rotation , or Tautomerization? **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 25, p. 9812–9823, 2011.
- LEACH, A. R. **Molecular modeling: Principles and applications**. 2. ed. Dorchester: Pearson Education Limited, 2001. p. 661–668
- LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 6 ed. Baltimore, MD: LWW, 2012. 1520p.

- LEPESHEVA, G. I. et al. CYP51 from *Trypanosoma cruzi*: a phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14alpha-demethylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 6, p. 3577–3585, 2006.
- LEPESHEVA, G. I. et al. Structural insights into inhibition of sterol 14alpha-demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25582–25590, 2010.
- LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14alpha-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 3, p. 467–477, 2007.
- LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14alpha-demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2060–2071, 2011.
- LEWINSOHN, R. Carlos Chagas and the discovery of Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 74, n. 6, p. 451, 1981.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23–2005.
- LOKAREDDY, R. K. et al. Combination of two separate binding domains defines stoichiometry between type III secretion system chaperone IpgC and translocator protein IpaB. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p. 39965–39975, 2010.
- LÜTDKE, D. S. **Seleno-oxazolinas quirais em alquilacões alílicas assimétricas e síntese de derivados de aminoácidos e peptídeos não usuais contendo selênio**. Santa Maria, 2005. 220p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

- MAGALHÃES, C. S. DE; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. **Métodos de Docking Receptor-Ligante para o Desenho Racional de Compostos Bioativos**. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Eds.). Métodos de química teórica e modelagem molecular. São Paulo: Livraria da Física, 2007. p. 489–527.
- MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, n. 1-3, p. 90–100, 25 dez. 2009.
- MANHOLD, R.; KUBINYI, H.; FOLKERS, G. **Bioisosteres in Medicinal Chemistry**. 3.ed. Wiley, 2012. p. 3–49.
- MARTINS, L. P. A. et al. Incidence of *Trypanosoma cruzi* transmission through breastfeeding during acute experimental Chagas disease. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 15, n. 2, p. 116–118, 2011.
- MCKERROW, J. H. et al. Proteases in parasitic diseases. **Annual Review of Pathology**, v. 1, p. 497–536, 2006.
- MEANWELL, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2529–2591, 2011.
- MIGUEL, J. A. A doença do atraso e da pobreza. Disponível em: <http://www.outraspaginas.com.br/?p=747>. Acesso em: 29 outubro 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas Aguda - Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_chagas.pdf. Acesso em: 29 outubro 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de chagas. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>. Acesso em: 29 outubro 2013.

- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. DA S. Planejamento racional de farmacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105–111, 2001.
- MORAES, C. B. et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4703, 2014.
- MOSS, G. P. The nomenclature of steroids. **European Journal of Biochemistry**, v. 186, p. 429–458, 1989.
- NDAO, M. et al. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1167–78, 2014.
- OHLINGER, W. S. et al. Efficient Calculation of Heats of Formation The Journal of Physical Chemistry, v. 113, p. 2165–2175, 2009.
- OLIN-SANDOVAL, V. et al. Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. **The FEBS Journal**, v. 279, n. 10, p. 1811–33, 2012.
- OSORIO, L. et al. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 14, n. 15, p. 1390–1402, 2012.
- OTTO, H.-H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 1, p. 133–172, 1997.
- PAHO. Resolução CD49.R19. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2009/CD49.R19%20\(Eng.\).pdf](http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2009/CD49.R19%20(Eng.).pdf). Acesso em 29 outubro 2014.
- PAPADOPOULOU, M. V et al. Novel 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazole-based amides and sulfonamides as potential antitrypanosomal agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 5554–5565, 2012.

- PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas disease: coming to a place near you. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 1, p. 53–62, 2011.
- PASTOR, M.; CRUCIANI, G. A novel strategy for improving ligand selectivity in receptor-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 23, p. 4637–4647, 1995.
- PASTOR, M.; CRUCIANI, G.; WATSON, K. A. A strategy for the incorporation of water molecules present in a ligand binding site into a three-dimensional quantitative structure--activity relationship analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 25, p. 4089–4102, 1997.
- PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 8, p. 3147–3176, 1996.
- PIERIMARCHI, P. et al. Rapid Chagas diagnosis in clinical settings using a multiparametric assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 4, p. 381–9, 2013.
- PODLIPAIEV, S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 648–652, 2001.
- PORTAL, P. et al. Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from Trypanosoma cruzi suggested role on drug resistance. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 1, p. 42–51, 2008.
- RÄIKKÖNEN, J. et al. Correlation between time-dependent inhibition of human farnesyl pyrophosphate synthase and blockade of mevalonate pathway by nitrogen-containing bisphosphonates in cultured cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 407, n. 4, p. 663–667, 2011.

- RAMÍREZ, J. D. et al. Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. e2041, 2013.
- RAO, K. E. et al. Molecular Recognition between Oligopeptides and Nucleic Acids: DNA Binding Selectivity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 9, p. 241–252, 1991.
- REUTER, S. et al. Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films of 1-acyl-1,2,4-triazoles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 340, n. 2, p. 276–84, 2009.
- RIDDERSTRÖM, M. et al. Analysis of Selective Regions in the Active Sites of Human Cytochromes P450 , 2C8 , 2C9 , 2C18 , and 2C19 Homology Models Using GRID/CPCA. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4072–4081, 2001.
- RIVAROLA, H. W.; PAGLINI-OLIVA, P. A. Trypanosoma cruzi trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. **Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders**, v. 2, n. 1, p. 43–52, 2002.
- ROCHA, J. R.; FREITAS, R. F.; MONTANARI, C. A. The GRID/CPCA approach in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 4, p. 333–346, 2010.
- ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Natural Product Reports**, v. 16, n. 5, p. 565–574, 1999.
- ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4-5, p. 576–88, 2010.
- RÔSE, M. et al. The Synthesis of New Isochromanylacetylarylhydrazones Designed as Probable Non-Addictive Analgesic Agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, n. 5, p. 471–478, 1997.

- SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1–21, 2002.
- SALAS CLAVIJO, N. A et al. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and incidence of congenital transmission in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. **Acta Tropica**, v. 124, n. 1, p. 87–91, 2012.
- SANT'ANNA, C.M.R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 505–512, 2002.
- SANT'ANNA, C.M.R. et al. A Semiempirical Study of Pyrazole Acylhydrazones as Potential Antimalarial Agents. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 843, n. 60, p. 1835–1843, 1996.
- SANTOS, A. L. S. et al. Heterogeneous production of metallo-type peptidases in parasites belonging to the family Trypanosomatidae. **European Journal of Protistology**, v. 44, n. 2, p. 103–113, 2008.
- SANTOS, R.F. et al. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 224–234, 2012.
- SASSINE, V. E ainda falta remédio. Disponível em: <http://www2.correiobraziliense.com.br/chagas/artigo7.html>. Acesso em: 29 outubro 2014.
- SCHMUNIS, G. A; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 14–21, 2010.
- SELICK, H. E.; BERESFORD, A. P.; TARBIT, M. H. The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 2, p. 109–116, 2002.

- SERAFIM, R. A M. et al. Nitric oxide: state of the art in drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 386–405, 2012.
- SHIMIZU, M.; SODEOKA, M. Development of Column-Free Alkoxy carbonyl, Aryloxy carbonyl, and Acyl Transfer Reagents. **Heterocyclics**, v. 76, n. 2, p. 1301–1312, 2008.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7.ed. Wiley, 2005. 512p.
- SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's advanced organic chemistry**. 6.ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007. 1284p.
- SUN, Q.-Y. et al. Synthesis of novel triazole derivatives as inhibitors of cytochrome P450 14 α -demethylase (CYP51). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 1226–1233, 2007.
- TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1749, 2012.
- TROSSINI, G. H. G. et al. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 62–7, 2010.
- UPADHAYAYA, R. S. et al. New antiprotozoal agents: Their synthesis and biological evaluations. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 9, p. 2750–2758, 2013.
- URBINA, J. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55–68, 2009.
- URBINA, J. A. et al. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against

- drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 1, p. 39–48, 2003.
- URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55–68, 2010.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.
- VEIGA-SANTOS, P. et al. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 1, p. 61–71, 2012.
- VILLALTA, F. et al. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 1–8, 2013.
- WADE, R. C.; CLARK, K. J.; GOODFORD, P. J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. **Journal of Medicinal chemistry**, v. 36, n. 1, p. 140–7, 1993.
- WADE, R. C.; GOODFORD, P. J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 2. Ligand probe groups with the ability to form more than two hydrogen bonds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 148–56, 1993.
- WENDEL, S. Transfusion transmitted Chagas disease: is it really under control? **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 28–34, 2010.
- WERMUTH, C. G. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure & Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129–1143, 1998.

- WERMUTH, C. G. **Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses**. In: The Practice of Medicinal Chemistry. 3.ed. London: Academic Pres, 2008. p. 126–129.
- WHO. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. (2007) Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf. Acesso em 29 outubro 2014.
- WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organization technical report series. **World Health Organization Technical Report Series**, v. 975, n. v-xii, p. 1-100, 2012.
- WHO. Neglected Tropical Diseases. Prevention, control, elimination and eradication. (2013) Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/A66_20_Eng.pdf. Acesso em: 29 outubro 2014.
- X. TAO et al. 1-(2,4-Difluorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)ethanone. **Acta Crystallographica**, v. E63, p. o1330–o1331, 2007.
- XIAO, L. et al. Three-Dimensional Models of Wild-Type and Mutated Forms of Cytochrome P450 14 α -Sterol Demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* Provide Insights into Posaconazole Binding. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 568–574, 2004.
- ZEELEN, F. J. **Medicinal Chemistry of Steroids**. In: Principles of Medical Biology. London: Elsevier Science, 1997. v. 8p. 427–463.
- ZHANG, Y. et al. The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 5, n. 1, p. 52–61, 1996.
- ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas ? **Revista de Biologia**, v. 6b, p. 44–48, 2011.

- ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, genetics and evolution. **Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 240–53, 2012.
- ZOU, Y. et al. New triazole derivatives as antifungal agents: synthesis via click reaction, in vitro evaluation and molecular docking studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 8, p. 2959–62, 2012.

***ANEXO 1 – RESULTADOS DO ESTUDO DE
DOCKING***

ANEXO 1. Resultados do estudo de docking

Os valores de tempo se referem ao tempo total de cálculo para cada ligante, em segundos.

Iteração 1						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
1	40.91	0.96	29.32	0	-0.37	44
2	41.06	2.51	29.8	0	-2.42	38.001
3	45.5	1.1	34.79	0	-3.44	76
4	45.9	9.42	30.92	0	-6.04	45.001
5	51.47	10.22	31.42	0	-1.95	99
6	49.61	10	31.54	0	-3.75	89
7	44.74	11.16	28.37	0	-5.43	111
8	43.15	10	27.72	0	-4.97	35
9	46.48	3.98	34.16	0	-4.47	105
10	56.69	10.27	38.69	0	-6.78	149
11	52.35	16.42	27.99	0	-2.56	13
12	49.54	14.66	31	0	-7.75	26.999
13	47.81	16.31	31.02	0	-11.15	58
14	52.14	15.35	34.35	0	-10.44	47.999
15	54.53	2.86	38.14	0	-0.77	95
16	48.56	10.01	30.44	0	-3.3	52
17	45.79	12.02	29.84	0	-7.27	108.001
18	48.22	3.23	36.32	0	-4.96	124
19	54.53	4.67	43.18	0	-9.52	120
20	58.82	10	38.28	0	-3.81	139
21	41.13	10	23.63	0	-1.37	57.999
22	41.22	0.12	34.38	0	-6.17	81
23	38.91	10.03	24.72	0	-5.11	36
24	43.26	8.8	31.61	0	-9	93
25	50.35	10	32.43	0	-4.24	111
26	44.69	12.05	27.74	0	-5.51	89
27	43.67	2.75	35.21	0	-7.49	131
28	45.52	11.43	31.62	0	-9.38	114.001
29	44.78	10.41	33.79	0	-12.09	146.999
30	52.52	10	33.85	0	-4.02	177
31	41.17	12.06	23.2	0	-2.8	29
32	39.91	12	21.98	0	-2.31	12
33	42.26	11.89	24.04	0	-2.68	33
34	45.46	2.05	35.47	0	-5.36	25.001
35	52.45	11.47	31.54	0	-2.38	35.999
36	48.62	10.22	30.65	0	-3.74	54.001

Iteração 1 (continuação)						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
37	44.58	10.39	32.19	0	-10.06	71.999
38	46.68	10.5	29.02	0	-3.72	88.999
39	47.89	8.25	34.09	0	-7.23	92
40	53.55	11.99	33.61	0	-4.65	112
41	50.35	15	27.74	0	-2.79	10
42	47.22	15.04	25.11	0	-2.35	38
43	45.58	10.84	27.43	0	-2.97	33.001
44	49.09	9.44	34.05	0	-7.17	41
45	62.31	15	38.46	0	-5.57	73
46	54.38	9.84	35.53	0	-4.3	58
47	51.25	9.1	36.54	0	-8.09	43
48	55.31	9.71	37.22	0	-5.58	74
49	53.64	9.4	37.67	0	-7.56	90
50	55.06	3.69	42.08	0	-6.49	32
51	41.79	11.98	24.22	0	-3.49	15.999
52	39.04	12	23.2	0	-4.87	19
53	39.69	11.72	24.68	0	-5.95	21
54	44.45	2.66	36.83	0	-8.85	35
55	52.53	11.65	32.12	0	-3.29	78
56	45.45	8.07	32.51	0	-7.32	90
57	41.29	10.11	28.21	0	-7.61	74
58	42.62	12	28.19	0	-8.13	35.001
59	49.7	10.04	36.14	0	-10.03	129
60	55.24	8.71	39.94	0	-8.4	143.001
61	55.13	13.83	36.7	0	-9.16	101.001
62	58.75	12.01	40.31	0	-8.7	89
63	61.68	12	39.43	0	-4.53	101
64	63.57	11.35	42.82	0	-6.66	57
65	53.94	12.77	37.31	0	-10.12	67
66	57.56	9.3	43.79	0	-11.95	167
67	54.68	12	34.26	0	-4.43	22
68	60.7	11.82	40.98	0	-7.48	113
69	58.83	10	38.61	0	-4.25	82
70	63.28	11.89	41.76	0	-6.04	116
71	55.62	12	36.7	0	-6.85	88
72	56.29	11.79	39.62	0	-9.98	150.001

Iteração 1 (continuação)						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
73	40.74	8.79	27.07	0	-5.27	37
74	40.32	12.31	22.65	0	-3.13	16
75	42.6	12.46	24.51	0	-3.56	22
76	45.63	7.44	31.68	0	-5.37	69
77	56.6	12.05	34.63	0	-3.07	92
78	50.1	13.24	29.86	0	-4.19	22.999
79	42.72	10	27.86	0	-5.59	62
80	47.35	3	35.7	0	-4.73	58
81	50.23	5.34	37.21	0	-6.28	46
82	56.77	12	35.83	0	-4.49	142
83	48.52	10.04	30.04	0	-2.83	38
84	48.03	12.36	28.05	0	-2.89	55
85	47.4	12.1	28.37	0	-3.72	74
86	49.86	2.87	38.71	0	-6.23	73
87	60.21	12.13	36.86	0	-2.61	91
88	56.4	12.93	34.38	0	-3.8	30
89	47.3	4.91	33.61	0	-3.84	88
90	50.4	4.32	36.62	0	-4.27	75
91	54.04	2.08	42.32	0	-6.23	34
92	59.41	12.31	38.62	0	-6	140
93	39.18	8.77	27.72	0	-7.7	54.001
94	40.09	12.42	23.91	0	-5.2	21
95	41.28	12	26	0	-6.47	26.999
96	44.6	2.2	36.27	0	-7.48	74
97	54.16	12.3	35.01	0	-6.28	63.001
98	48.81	12.17	33.1	0	-8.88	42
99	42.75	10	29.79	0	-8.21	117
100	44.6	4.87	34.85	0	-8.19	113
101	48.33	4.42	39.11	0	-9.87	71
102	55.07	12.07	37.06	0	-7.96	166
103	42	10	25.04	0	-2.44	29.999
104	42.97	9.66	26.59	0	-3.25	38.001
105	44.16	10	27.49	0	-3.64	54.001
106	49.64	10	33.09	0	-5.85	29
107	58.12	9.94	37.32	0	-3.14	69
108	48.49	12	29.51	0	-4.09	53
109	42.04	10	26.63	0	-4.58	21.999

Iteração 1 (continuação)						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
110	45.76	10.7	29.55	0	-5.57	86
111	51.99	10.03	36.24	0	-7.87	96
112	63.78	11.85	41.66	0	-5.35	109
113	46.05	13.86	25.05	0	-2.26	27.001
114	49.49	14.85	27.8	0	-3.59	16
115	43.03	11.18	26.41	0	-4.46	16
116	53.2	9.96	35.24	0	-5.21	52
117	56.12	8.5	36.77	0	-2.95	70
118	50.83	12	31.65	0	-4.68	16
119	46.41	10	29.61	0	-4.3	42
120	50.36	10.01	33.23	0	-5.34	85
121	49.79	5.95	37.6	0	-7.87	27
122	55.34	3.31	42.92	0	-6.98	34.999
123	40.17	10.01	25.62	0	-5.07	26
124	41.57	10	26.93	0	-5.45	31
125	43.18	10	27.55	0	-4.7	62
126	48.23	10	33.83	0	-8.29	66.999
127	55.45	10	36.4	0	-4.6	86
128	44.61	12	29.56	0	-8.03	30
129	44.47	12.01	30.27	0	-9.16	99
130	43.18	10	30.49	0	-8.75	59
131	49.39	10.13	37.91	0	-12.86	134.001
132	51.76	11.02	36.66	0	-9.67	143
133	50.33	9.12	33.58	0	-4.96	99
134	59.12	10.41	41.79	0	-8.75	150
135	56.17	10.27	36.53	0	-4.32	96
136	60.26	12.49	38.22	0	-4.78	71.999
137	52.78	10.39	35.51	0	-6.42	114
138	52.85	13.27	35.15	0	-8.75	178
139	53.66	11.62	34.43	0	-5.3	21.999
140	56.48	13.08	35.43	0	-5.32	32
141	58.7	12.04	37.4	0	-4.78	73
142	58.73	12	37.69	0	-5.09	110
143	54.78	12.65	34.34	0	-5.09	90
144	43.94	12.47	35.91	0	-17.91	145

Iteração 2						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
1	41.38	1.86	29.48	0	-1.01	40
2	41.22	10.45	25.04	0	-3.65	63
3	44.44	0.86	34.54	0	-3.9	82
4	47.27	8.03	33.25	0	-6.48	46
5	52.4	10	33.55	0	-3.74	93
6	47.63	9.97	30.48	0	-4.25	84
7	46.06	10.5	28.79	0	-4.02	107
8	47.83	10.16	31.64	0	-5.84	111
9	47.75	9.01	33.03	0	-6.68	93
10	55.53	10	36.09	0	-4.09	97.001
11	52.41	16.53	27.67	0	-2.17	24.999
12	51.32	15.48	32.47	0	-8.81	44
13	49.62	15.62	32.87	0	-11.2	41
14	52	14.9	32.61	0	-7.73	46.001
15	54.88	10	33.81	0	-1.61	87
16	49.37	10.11	29.58	0	-1.41	33
17	45.04	2.99	34.38	0	-5.23	95
18	47.34	3.15	35.55	0	-4.69	35
19	48.96	10	33.62	0	-7.27	122
20	57.17	10.04	36.64	0	-3.26	40.999
21	41.13	10.15	23.52	0	-1.36	21.001
22	37.6	2.93	28.6	0	-4.66	37.999
23	39.98	10.39	25.5	0	-5.48	26
24	44.33	9.36	32.58	0	-9.82	92
25	50.28	9.97	32.44	0	-4.29	109.001
26	43.27	10.73	27.64	0	-5.46	88
27	43.37	2.63	35.26	0	-7.74	49.001
28	43.47	11.09	29.84	0	-8.65	131
29	50.76	9.83	38.06	0	-11.4	136.999
30	53.23	1.78	42.68	0	-7.23	86.999
31	41.41	12.06	23.33	0	-2.73	34
32	40.25	11.95	22.25	0	-2.29	16.999
33	42.43	12	23.97	0	-2.52	22
34	46.31	10.83	28.92	0	-4.3	57.001
35	52.24	11.46	32.64	0	-4.1	69.001
36	47.84	10.7	29.67	0	-3.65	58

Iteração 2 (continuação)						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
37	47.07	10	30.53	0	-4.9	77
38	48.04	8.25	33.28	0	-5.96	89
39	52.53	9.94	36.91	0	-8.16	96.999
40	52.96	12	33.78	0	-5.49	112
41	50.34	15	27.52	0	-2.5	15
42	45.39	14.98	23.72	0	-2.2	42
43	44.9	10.81	26.58	0	-2.46	23
44	49.3	8.39	34.89	0	-7.06	51
45	55.75	8.09	37.08	0	-3.31	69
46	53.25	9.52	34.6	0	-3.85	34
47	54.42	8.98	36.12	0	-4.23	68
48	49.81	10.31	31.65	0	-4.01	90.001
49	53.21	5.05	40.65	0	-7.74	90.001
50	57.06	3.65	42.66	0	-5.24	118
51	41.38	11.49	24.21	0	-3.39	20
52	38.39	12	22.83	0	-5.01	15.001
53	41.53	11.91	25.4	0	-5.31	21
54	44.63	2.73	36.92	0	-8.87	58.001
55	52.06	12	31.88	0	-3.78	87.999
56	43.51	9.77	28.42	0	-5.33	88
57	40.73	10.06	27.63	0	-7.32	110
58	41.62	11.94	27.75	0	-8.47	36
59	51.07	9.36	38.44	0	-11.16	121.999
60	55.18	8.27	38.84	0	-6.49	144
61	55.11	12.19	36.51	0	-7.28	89
62	58.79	12.08	40.21	0	-8.57	134
63	62.54	11.82	40.24	0	-4.61	90
64	61.63	10	41.26	0	-5.1	132.999
65	55.21	11.84	36.05	0	-6.2	105
66	56.09	12.15	39.14	0	-9.88	79
67	55.77	12	35.15	0	-4.56	28.001
68	56.37	12	36.95	0	-6.44	107.999
69	59.13	12	37.44	0	-4.35	34
70	62.38	11.23	41.87	0	-6.42	109
71	55.42	11.93	36.14	0	-6.22	96
72	57.79	11.26	40.56	0	-9.24	146

Iteração 2 (continuação)						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
73	44.39	9.98	27.51	0	-3.42	36
74	40.7	12.11	23.08	0	-3.15	16.001
75	42.71	12.32	24.77	0	-3.67	22.999
76	44.49	2.53	34.88	0	-6.01	67
77	55.56	12.12	34.11	0	-3.46	77
78	50.39	12.94	30.21	0	-4.09	22
79	42.76	12.01	25.07	0	-3.72	28.999
80	48.44	5.03	34.97	0	-4.67	47
81	51.62	8.19	38.32	0	-9.27	108
82	55.81	12	35.33	0	-4.76	97
83	43.45	11.96	24.3	0	-1.92	10.001
84	45.89	12.22	26.56	0	-2.86	17
85	47	12.21	27.84	0	-3.48	21
86	49.31	1.59	38.38	0	-5.06	66.001
87	59.95	12.02	36.83	0	-2.72	102
88	56.51	13.2	34.48	0	-4.11	37
89	46.29	4.75	32.75	0	-3.49	89
90	49.59	4	36.54	0	-4.66	33
91	55.16	4.08	41.95	0	-6.59	43
92	61.06	12	38.16	0	-3.41	71
93	38.38	12.21	22.04	0	-4.14	15.001
94	39.89	12.44	23.84	0	-5.34	23
95	40.58	12.3	25.01	0	-6.12	25.999
96	43.49	9.46	33.56	0	-12.11	60
97	53.94	12.24	34.68	0	-5.99	82.999
98	48.39	12.01	32.45	0	-8.23	31
99	40.92	3.99	32.4	0	-7.61	111
100	42.67	4.49	33.33	0	-7.66	69.001
101	48.69	2.95	40.33	0	-9.72	124
102	54.04	11.68	36.91	0	-8.39	157.001
103	42.11	10	25.84	0	-3.41	27
104	42.48	10	26.01	0	-3.29	37
105	44.68	10	28.14	0	-4.02	53
106	50.25	9.99	33.63	0	-5.98	24
107	58.44	10	37.51	0	-3.13	67
108	46.5	11.92	28.8	0	-5.01	15
109	42.42	10	27.17	0	-4.94	41

Iteração 2 (continuação)						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
110	47.09	11.85	29.77	0	-5.7	84
111	52.25	12.05	35.23	0	-8.25	35
112	62.5	11.77	41.35	0	-6.13	73.999
113	45.26	9.45	28.23	0	-3.01	11
114	47.74	14.57	26.24	0	-2.91	11
115	46.79	9.74	30.42	0	-4.78	15.001
116	49.19	9.49	33.01	0	-5.69	47
117	60.48	10	39.03	0	-3.18	67
118	50.97	12	31.71	0	-4.64	34
119	49.27	10	32.54	0	-5.47	68
120	50.11	9.97	33.25	0	-5.58	75.999
121	49.94	9.38	35.06	0	-7.65	26
122	65.92	11.79	42.45	0	-4.24	104
123	40.77	10.02	26.05	0	-5.06	10
124	40.18	9.23	26.37	0	-5.31	39
125	41.67	10	27.04	0	-5.51	67.999
126	48.42	9.87	34.48	0	-8.86	63.999
127	51.05	11.99	34.19	0	-7.95	83
128	45.45	12	30.17	0	-8.03	37
129	41.7	11.88	28.23	0	-8.99	94
130	43.38	11.73	29.29	0	-8.62	56
131	48.91	10.01	37.73	0	-12.98	116.001
132	52.04	4.54	41.82	0	-10	42
133	51.16	11.55	31.94	0	-4.32	93
134	54.51	12.37	34.5	0	-5.3	57.001
135	56.04	10.42	36.45	0	-4.49	95
136	60.47	13.19	38.73	0	-5.99	123.999
137	53.34	10.42	35.05	0	-5.27	114
138	52.74	12.98	35.28	0	-8.74	163
139	53.95	12.73	33.86	0	-5.34	20
140	60.92	11.74	40.88	0	-7.03	103
141	59.41	12.03	37.92	0	-4.77	65.999
142	58.53	10.75	38.33	0	-4.92	30
143	54.37	13.13	33.6	0	-4.97	84
144	44.65	11.47	37.27	0	-18.07	138

Iteração 3						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
1	40.74	10.27	22.62	0	-0.63	18.001
2	41.93	10.32	25.11	0	-2.93	55
3	42.67	0.21	34.23	0	-4.59	69
4	47.03	8.3	32.35	0	-5.75	20
5	51.89	10	33.02	0	-3.51	89
6	45.79	10.05	27.34	0	-1.86	43
7	48.98	10.99	30.51	0	-3.96	88.999
8	47.91	10.86	30.76	0	-5.24	115.001
9	45.38	9.96	29.27	0	-4.83	95
10	55.06	10	35.94	0	-4.36	135
11	53.03	16.6	28.82	0	-3.19	15
12	46.82	15.63	28.11	0	-7.46	26
13	43.74	10.22	26.04	0	-2.27	22
14	54.38	16.25	33.3	0	-7.65	28
15	55.44	10	34.28	0	-1.69	87
16	49.76	10	29.95	0	-1.42	71.001
17	45.21	12.03	29.61	0	-7.53	88
18	45.57	10	28.69	0	-3.88	34
19	54.14	6.84	39.83	0	-7.47	112.001
20	56.45	10	36.27	0	-3.43	135
21	41.15	10	23.89	0	-1.69	21
22	38.98	0.7	32.3	0	-6.13	66
23	38.75	10.04	24.99	0	-5.66	25
24	44.08	10	29.7	0	-6.75	92.999
25	50.95	10.41	32.37	0	-3.98	111
26	43.02	10	28.4	0	-6.03	40
27	46.68	10.95	31.33	0	-7.35	124
28	44.96	11.38	31.6	0	-9.88	118
29	44.37	12.04	31.7	0	-11.25	139
30	53.89	1.65	42.13	0	-5.68	164
31	41.66	12.39	23.16	0	-2.57	17
32	39.87	11.86	22.03	0	-2.28	11.999
33	42.86	11.99	24.32	0	-2.57	27
34	48.94	11.32	30.28	0	-4.02	48
35	52.14	10.96	31.68	0	-2.38	54
36	47.42	10.56	29.2	0	-3.3	52.999

Iteração 3 (continuação)						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
37	44.31	10.11	27.6	0	-3.75	69
38	48.84	10.37	30.55	0	-3.53	51
39	53.18	9.73	37.93	0	-8.71	85.001
40	53.04	5.24	37.87	0	-4.26	104.001
41	51.57	12.83	30.03	0	-2.56	8.001
42	45.51	11.84	28.49	0	-5.5	37
43	45.72	10.79	27.53	0	-2.93	52
44	49.38	8.62	34	0	-5.98	47.999
45	54.56	5.18	38.34	0	-3.34	77
46	52.35	10.42	32.84	0	-3.23	27
47	52.02	8.63	34.71	0	-4.34	42
48	47.52	7.9	33.6	0	-6.58	85
49	53.43	8.75	38.5	0	-8.26	86
50	57.5	2.8	43.18	0	-4.66	116
51	41.21	11.79	23.95	0	-3.51	25
52	38.55	12	22.86	0	-4.88	15
53	41.46	12	25.3	0	-5.32	20.999
54	44.38	3.05	36.74	0	-9.18	69
55	52	12	31.28	0	-3.02	83
56	45.12	9.77	30.46	0	-6.53	77
57	43.92	10.29	31.18	0	-9.26	97.001
58	42.84	12	28.35	0	-8.15	114.001
59	49.09	10	35.93	0	-10.32	125
60	55.23	9.88	38.95	0	-8.21	139
61	55.43	11.96	35.82	0	-5.77	87.001
62	58.46	12	39.56	0	-7.94	39
63	61.6	12	39.25	0	-4.37	53
64	61.5	13.08	39.98	0	-6.55	52
65	55.15	10.29	36.99	0	-6	107
66	53.7	11.17	39.82	0	-12.22	66
67	56.81	11.68	36.61	0	-5.21	47.999
68	60.05	11.29	40.55	0	-6.99	73
69	58.45	12	37.01	0	-4.44	53
70	62.65	11.11	42.7	0	-7.17	106.001
71	54.5	11.11	36.1	0	-6.25	87
72	57.03	11.84	40.39	0	-10.35	137

Iteração 3 (continuação)						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
73	43.93	10.02	27.6	0	-4.04	37
74	40.75	12.36	22.91	0	-3.12	16
75	42.32	12.43	24.62	0	-3.97	21.001
76	45.15	2.14	35.31	0	-5.54	81.999
77	56.6	12.21	34.78	0	-3.43	63
78	49.97	12	31.13	0	-4.83	24
79	44.01	4.78	31.41	0	-3.96	89
80	46.72	5.12	33.4	0	-4.33	56.999
81	51.76	4.32	39.2	0	-6.47	50
82	56.23	12.08	36.01	0	-5.36	135
83	43.37	11.53	24.62	0	-2.02	11
84	45.54	12.3	26.42	0	-3.08	15
85	47	12.01	28.09	0	-3.63	42.001
86	50.08	7.07	35.43	0	-5.7	71
87	59.8	12.03	36.84	0	-2.89	89
88	55.2	12.03	34.9	0	-4.82	24
89	46.71	3.58	34.19	0	-3.88	27
90	49.83	5.52	35.64	0	-4.69	34
91	54.65	3.47	42.45	0	-7.19	67
92	60.94	10	39.25	0	-3.03	150.999
93	38.07	11.95	22.1	0	-4.27	16
94	39.64	12.24	23.83	0	-5.37	21.999
95	41.41	12.2	25.47	0	-5.81	25.001
96	44.3	2.5	35.74	0	-7.35	65
97	54.97	12.35	35.23	0	-5.83	100.999
98	46.48	11.57	31.82	0	-8.84	29
99	40.81	4.99	31.53	0	-7.54	114
100	43.05	4.56	34.84	0	-9.42	67.999
101	48.5	3.09	40.31	0	-10.01	66.001
102	54.12	12.26	36.18	0	-7.88	179
103	42.75	10	25.8	0	-2.73	28.001
104	41.49	10	25.15	0	-3.09	29
105	44.24	10	28.2	0	-4.54	24
106	49.75	10	32.92	0	-5.52	58
107	58.28	10	37.51	0	-3.3	74
108	45.91	12	28.44	0	-5.2	16.999
109	46.84	11.71	29.77	0	-5.8	70.001

Iteração 3 (continuação)						
Ligante	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	Tempo (s)
110	45.6	9.93	29.96	0	-5.52	48
111	51.78	12.05	35.2	0	-8.67	107
112	61.77	10.67	41.24	0	-5.6	117
113	45.73	14.93	24.13	0	-2.39	28
114	47.38	15	26.93	0	-4.64	12
115	49.31	14.96	28.4	0	-4.7	37
116	46.93	10	31.22	0	-5.99	27.999
117	57.21	9.59	36.62	0	-2.73	75
118	50.41	11.98	31.54	0	-4.93	36
119	46.91	9.88	30.13	0	-4.39	36
120	53.07	11.68	33.96	0	-5.3	117
121	53.08	10	38.14	0	-9.36	93
122	65.35	11.38	43.23	0	-5.48	120
123	41.08	10	26.22	0	-4.97	21
124	39.98	8.87	26.46	0	-5.27	54.999
125	42.33	10	27.06	0	-4.87	90
126	48.03	10	33.42	0	-7.92	66
127	57.36	9.91	37.93	0	-4.7	98
128	44.86	11.99	29.63	0	-7.87	80
129	44.19	11.34	29.83	0	-8.16	98
130	43.61	11.45	29.57	0	-8.49	161.001
131	48.23	12.11	35.03	0	-12.04	138
132	58.81	11.75	40.3	0	-8.35	165
133	51.4	7.02	36.34	0	-5.59	89
134	55.26	14.46	34.47	0	-6.6	41
135	56.87	10.12	36.25	0	-3.09	89.001
136	60.6	12.28	38.22	0	-4.23	82.999
137	52.69	6.38	36.7	0	-4.15	112
138	52.88	12.95	37.11	0	-11.1	84
139	54.54	11.48	34.36	0	-4.19	30.001
140	57.38	12.97	35.87	0	-4.92	103
141	58.38	12.1	37.61	0	-5.43	81.999
142	59.36	11.81	40.11	0	-7.61	127.001
143	54.6	11.45	34.76	0	-4.65	67
144	44.01	10.96	37.23	0	-18.14	46

Resultado dos testes de *redocking*

Teste	Raio da caixa	Função de score	Eficiência do GA	RMSD (1a)	RMSD (2a)	RMSD (3a)	Média	Desvio padrão
1	10	GoldScore	30	0.732	0.903	0.638	0.758	0.097
2	10	GoldScore	100	0.677	0.597	0.660	0.645	0.032
3	10	GoldScore	200	0.704	0.943	0.650	0.766	0.118
4	12	GoldScore	30	0.652	0.647	0.694	0.664	0.020
5	12	GoldScore	100	0.674	0.656	0.651	0.660	0.009
6	12	GoldScore	200	0.721	0.570	0.666	0.653	0.055
7	15	GoldScore	30	0.687	0.965	0.628	0.760	0.137
8	15	GoldScore	100	0.655	0.670	0.634	0.653	0.013
9	15	GoldScore	200	0.685	0.673	0.652	0.670	0.012
10	10	ChemScore	30	0.850	0.745	0.819	0.805	0.039
11	10	ChemScore	100	0.767	0.767	0.903	0.812	0.060
12	10	ChemScore	200	0.755	0.784	0.867	0.802	0.043
13	12	ChemScore	30	0.832	0.696	0.892	0.807	0.074
14	12	ChemScore	100	0.735	0.809	0.866	0.803	0.045
15	12	ChemScore	200	0.762	0.783	0.729	0.758	0.019
16	15	ChemScore	30	0.699	0.763	0.799	0.753	0.037
17	15	ChemScore	100	0.654	0.767	0.744	0.721	0.045
18	15	ChemScore	200	0.733	0.739	0.729	0.734	0.004
19	10	ASP	30	0.736	0.884	0.680	0.767	0.078
20	10	ASP	100	0.748	0.626	0.650	0.675	0.049
21	10	ASP	200	0.645	0.620	0.689	0.651	0.025
22	12	ASP	30	0.890	0.629	0.416	0.645	0.163
23	12	ASP	100	0.624	0.564	0.536	0.575	0.033
24	12	ASP	200	0.703	0.585	0.740	0.676	0.061
25	15	ASP	30	0.543	0.678	0.756	0.659	0.077
26	15	ASP	100	0.649	0.569	0.633	0.617	0.032
27	15	ASP	200	0.647	0.540	0.627	0.605	0.043
28	10	ChemPLP	30	0.682	0.743	0.891	0.772	0.079
29	10	ChemPLP	100	0.664	0.674	0.757	0.698	0.039
30	10	ChemPLP	200	0.668	0.678	0.701	0.682	0.012
31	12	ChemPLP	30	0.738	1.336	0.674	0.916	0.280
32	12	ChemPLP	100	0.668	0.656	0.663	0.662	0.004
33	12	ChemPLP	200	0.680	0.684	0.690	0.685	0.004
34	15	ChemPLP	30	0.678	0.695	0.792	0.722	0.047
35	15	ChemPLP	100	0.698	0.703	0.713	0.705	0.006
36	15	ChemPLP	200	0.702	0.655	0.696	0.684	0.020

***ANEXO 2 – ESPECTROS DE RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR***

Espectro de RMN ¹H do composto 7a

1-(2,4-difluorfenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-etanona

RMN ¹H (DMSO-d₆), 300 MHz, δ (ppm): δ = 8,49 (s, 1H, H7); 8,00-8,08 (m, 1H, H4); 8,02 (s, 1H, H1); 7,49-7,57 (m, 1H, H6); 7,28-7,32 (m, 1H, H5); 8,52 (s, 2H, H2, H3).

Espectro de RMN ¹H do composto 7b (LAPEN-2901)

1-(2,4-difluorfenil)-2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-il)-etanona

RMN ¹H (DMSO-d₆), 300 MHz, δ (ppm): δ = 8,81 (s, 1H, H1); 8,03-8,11 (m, 1H, H4); 7,51-7,59 (m, 1H, H6); 7,30-7,36 (m, 1H, H5); 6,03 (s, 2H, H2, H3).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 7b (LAPEN-2901)

1-(2,4-difluorofenil)-2-(3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-etanona

RMN ^{13}C (DMSO- d_6), 75 MHz, δ (ppm): δ = 187,96 (C4); 167,51 (C8); 164,37 (C1); 160,77 (C6); 148,31 (C2); 132,60 (C10); 119,23 (C5); 112,71 (C9); 105,40 (C7); 59,27 (C3).

Espectro de RMN ^1H do composto 8a (LAPEN-2905)

(E/Z)-1-(1-(2,4-difluorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-etilideno)-semicarbazida

RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ (ppm):

(E) δ = 10,20 (s, 1H, H3); 8,55 (s, 1H, H1); 7,91 (s, 1H, H9); 7,65-7,73 (m, 1H, H4); 7,08-7,34 (m, 2H, H5, H6); 6,57 (s, 2H, H7, H8); 5,51 (s, 2H, H2, H10).

(Z) δ = 9,21 (s, 1H, H3); 8,44 (s, 1H, H1); 7,94 (s, 1H, H9); 7,65-7,73 (m, 1H, H4); 7,08-7,34 (m, 2H, H5, H6); 6,41 (s, 2H, H7, H8); 5,28 (s, 2H, H2, H10).

Espectro de RMN ¹H do composto 8b (LAPEN-2904)

(E/Z)-1-(1-(2,4-difluorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-etilideno)-tiossemicarbazida

RMN ¹H (DMSO-d₆), 300 MHz, δ (ppm):

(E) δ = 10,24 (s, 1H, H3); 8,49 (s, 1H, H1); 8,48 (s, 1H, H8); 7,96 (s, 1H, H9); 7,92 (s, 1H, H7); 7,78-7,86 (m, 1H, H4); 7,08-7,39 (m, 2H, H5, H6); 5,36 (s, 2H, H2, H10).

(Z) δ = 11,15 (s, 1H, H3); 8,59 (s, 1H, H1); 8,56 (s, 1H, H8); 8,37 (s, 1H, H9); 8,01 (s, 1H, H7); 7,78-7,86 (m, 1H, H4); 7,08-7,39 (m, 2H, H5, H6); 5,63 (s, 2H, H2, H10).

Espectro de RMN ^1H do composto 8c (LAPEN-2903)

(E/Z)-1-(1-(2,4-difluorofenil)-2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-etilideno)-semicarbazida

RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ (ppm):

(E) δ = 9,32 (s, 1H, H3); 8,82 (s, 1H, H1); 7,74-7,82 (m, 1H, H4); 7,30-7,38 (m, 1H, H5); 7,02-7,19 (m, 1H, H6); 6,61 (s, 2H, H7, H8); 5,40 (s, 2H, H2, H10).

(Z) δ = 10,27 (s, 1H, H3); 8,88 (s, 1H, H1); 7,74-7,82 (m, 1H, H4); 7,30-7,38 (m, 1H, H5); 7,02-7,19 (m, 1H, H6); 6,61 (s, 2H, H7, H8); 5,62 (s, 2H, H2, H10).

Espectro de RMN ^1H do composto 8d (LAPEN-2902)

(E/Z)-1-(1-(2,4-difluorfenil)-2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-etilideno)-tiossemicarbazida

RMN ^1H (DMSO- d_6), 300 MHz, δ (ppm):

(E) δ = 10,31 (s, 1H, H3); 8,85 (s, 1H, H1); 8,43 (s, 1H, H7); 7,83 (s, 1H, H9); 7,06-7,45 (m, 3H, H4,H5, H6); 5,47 (s, 2H, H2,H10).

(Z) δ = 11,17 (s, 1H, H3); 8,91 (s, 1H, H1); 8,56 (s, 1H, H7); 8,06 (s, 1H, H9); 7,06-7,45 (m, 3H, H4, H5, H6); 5,75 (s, 2H, H2, H10).

Espectro de RMN ¹³C APT do composto 8d (LAPEN-2902)

(E/Z)-1-(1-(2,4-difluorfenil)-2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-il)-etilideno)-tiossemicarbazida

RMN ¹³C APT (DMSO-d₆), 75 MHz, δ (ppm):

(E) δ = 179,48 (C5); 165,31 (C9); 162,00 (C1); 157,99 (C7); 147,63 (C2); 138,17 (C4); 131,32 (C8); 114,94 (C6); 112,60 (C10); 109,94 (C11); 55,47 (C3).

(Z) δ = 179,48 (C5); 165,31 (C9); 162,00 (C1); 157,99 (C7); 147,63 (C2); 138,17 (C4); 132,44 (C8); 119,88 (C6); 112,60 (C10); 109,94 (C11); 48,08 (C3).

Espectro de 2D-RMN HSQC do composto 8d (LAPEN-2902) - (DMSO-d₆), 500 MHz

Espectro de 2D-RMN HMBC do composto 8d (LAPEN-2902) - (DMSO-d₆), 500 MHz

Espectro de 2D-RMN NOESY do composto 8d (LAPEN-2902) - (DMSO-d₆), 500 MHz.

ANEXO 3. ANÁLISE ELEMENTAR

Data: 11/3/2014 23:53

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
LAPEN-2901 (Calculado)	44,96	2,32	20,51
LAPEN-2901 (Experimental)	45,01	2,30	20,39
Desvio	-0,05	0,02	0,12

Data: 11/4/2014 0:01

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
LAPEN-2902 (Calculado)	47,13	4,33	23,13
LAPEN-2902 (Experimental)	47,62	4,45	22,72
Desvio	-0,49	-0,12	0,41

Data: 11/4/2014 0:01

Analizado por: Luzia Narimatsu

Composto	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
LAPEN-2903 (calculado)	40,18	3,00	29,00
LAPEN-2903 (experimental)	40,12	3,07	28,91
Desvio	0,06	-0,07	0,09

Data: 11/4/2014 0:01

Analizado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
LAPEN-2904 (calculado)	47,13	4,33	23,13
LAPEN-2904 (experimental)	47,62	4,45	22,72
Desvio	-0,49	-0,12	0,41

Data: **11/4/2014 0:01**

Analizado por: **Luzia Narimatsu**

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
LAPEN-2905 (calculado)	46,24	3,81	28,72
LAPEN-2905 (experimental)	45,99	3,88	28,65
Desvio	0,25	-0,07	0,07

Espectro no infravermelho do composto 7b (LAPEN-2901)

Espectro no infravermelho do composto 8b (LAPEN-2904)

Espectro no infravermelho do composto 8c (LAPEN-2903)

Espectro no infravermelho do composto 8d (LAPEN-2902)

***ANEXO 5 – INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS
DA BANCA JULGADORA***

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 arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir 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 arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição 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 arguição.

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

ANEXO 5.1.

Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9138 - 5926349/2 - Fredson Torres Silva

Email: fredsonts@usp.br
Data de Nascimento: 13/04/1987
Cédula de Identidade: RG - 44.228.439-1 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 19/07/2012
Início da Contagem de Prazo: 19/07/2012
Data Limite para o Depósito: 19/01/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 19/07/2012 até o presente. E.Mail: hajudan@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 19/07/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 27/09/2013
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: Ingressou no Mestrado em 19/07/2012
Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

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 21/07/2014

Impresso em: 04/11/14 00:26:09

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

9138 - 5926349/2 - Fredson Torres Silva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5724-7/1	Latenciação	14/08/2012	26/10/2012	90	6	95	A	N	Concluída
EDM5791-5/9	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/08/2012	30/11/2012	120	8	75	A	N	Concluída
FBF5777-2/7	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	16/08/2012	28/11/2012	45	3	86	A	N	Concluída
FBF5705-5/1	Planejamento de Fármacos	20/08/2012	28/10/2012	90	6	90	A	N	Concluída
FBF5786-3/1	Metodologias e Modelagem Molecular no Planejamento de Fármacos	17/09/2013	18/11/2013	90	6	94	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

Impresso em: 04/11/14 00:26:09

ANEXO 5.2.

Currículo Lattes do aluno

Fredson Torres Silva

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7628268947352975>

Última atualização do currículo em 06/07/2014

Possui graduação em Farmácia-Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2012). Atualmente é mestrando em Fármacos e Medicamentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - FCF/USP (a partir de 2012), atuando nos seguintes temas: planejamento de fármacos, síntese orgânica, antichagásicos potenciais, modificações moleculares e modelagem molecular. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Fredson Torres Silva
Nome em citações bibliográficas	TORRES SILVA, F.; SILVA, FREDSON

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 Cidade Universitária 05508900 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913678 URL da Homepage: http://www.fcf.usp.br/lapen
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2012	Mestrado em andamento em Fármacos e Medicamentos. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Antichagásicos potenciais: planejamento e síntese de bioisósteros 1,2,4-triazólicos do hidroximetilnitrofural e análogos, Orientador: Elizabeth Igne Ferreira. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Palavras-chave: Chagas; hidroximetilnitrofural; triazol. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Química Farmacêutica.
2007 - 2012	Graduação em Farmácia e Bioquímica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Análise comparativa de métodos de predição in silico de absorção intestinal e biodisponibilidade oral no planejamento de fármacos. Orientador: Gustavo Henrique Goulart Trossini. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Formação Complementar

2014 - 2014	Modelagem Molecular Apl. ao Plan. de Comp. Bioat.. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Rio de Janeiro.
--------------------	--

2014 - 2014

Nuevas metodologías en síntesis orgánica. (Carga horária: 7h).
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

2014 - 2014

Highlights in Medicinal Chemistry. (Carga horária: 7h).
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

2012 - 2012

Desenvolvimento de Candidatos a Anti-Neoplásicos. (Carga horária: 30h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação Profissional

Farmácias Pague Menos, PAGUE MENOS, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - 2012

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20

Outras informações

Estágio em Atenção Farmacêutica

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - Atual

Vínculo: Pós-Graduação, Enquadramento Funcional: Aluno de mestrado,
Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2014 - 2014**Outras informações**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor PAE, Carga horária: 20
Monitor da disciplina de Planejamento de Fármacos (Curso: Farmácia-Bioquímica)

Vínculo institucional

2013 - 2013**Outras informações**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor PAE, Carga horária: 20
Monitor da disciplina de Química Farmacêutica III (Curso: Farmácia-Bioquímica)

Vínculo institucional

2010 - 2012

Vínculo: selecione o tipo de contrato, Enquadramento Funcional: Aluno de
Iniciação Científica

Atividades

07/2012 - Atual

Pesquisa e desenvolvimento , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Linhas de pesquisa
Antichagásicos potenciais: planejamento e síntese de bioisósteros 1,2,4-triazólicos do hidroximetilnitrofuril e análogos

07/2009 - 10/2009

Estágios , Instituto de Ciências Biomédicas, .
Estágio realizado
Estágio realizado na área de neurofarmacologia.

09/2007 - 12/2008

Extensão universitária , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Atividade de extensão realizada
Redator do Jornal do Centro Acadêmico de Farmácia e Bioquímica (Departamento de Divulgação e Marketing).

04/2007 - 10/2007

Extensão universitária , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Atividade de extensão realizada
Membro da Farmácia Acadêmica (Atividade supervisionada de Atenção Farmacêutica).

Linhas de pesquisa

1.

Antichagásicos potenciais: planejamento e síntese de bioisósteros 1,2,4-triazólicos do hidroximetilnitrofuril e análogos

Objetivo: Planejamento, a síntese e avaliação da atividade tripanomicida e citotoxicidade in vitro de bioisósteros clássicos do NFOH e de seus análogos..

Projetos de pesquisa

2010 - 2012

Síntese de 5-nitrotriazóis potencialmente antichagásicos

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Fredson Torres Silva - Integrante / Elizabeth Igne Ferreira - Coordenador / Hamilton Marcel Bigatão - Integrante.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Química Medicinal.
3. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Química Farmacêutica.

Idiomas

Inglês

Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Espanhol

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2011

Melhor trabalho na categoria Química Farmacêutica - 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), FCFRP.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. **SILVA, FREDSON** ; TROSSINI, GUSTAVO . The Survey of the Use of QSAR Methods to Determine Intestinal Absorption and Oral Bioavailability During Drug Design. Medicinal Chemistry (Hilversum) **JCR**, v. 10, p. 441-448, 2014.

Apresentações de Trabalho

1. **TORRES SILVA, F.** . Métodos de predição in silico de absorção intestinal e biodisponibilidade oral no planejamento de fármacos.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. III Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases. Design and docking of bioisosteric 1,2,4-triazolic analogs of NFOH using 14 α -sterol demethylase. 2013. (Simpósio).
2. 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Planejamento e estudo de análogos bioisotéricos 1,2,4-triazólicos do NFOH em 14 α -esterol desmetilase de Trypanosoma cruzi. 2013. (Encontro).
3. 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences. Molecular modeling analysis of C14 α -sterol demethylase (CYP51) as a target for potential antichagasic drugs. 2011. (Congresso).
4. Mercado Farmacêutico Brasileiro: Tendências e Desafios - CRF-SP. 2011. (Simpósio).
5. 3º Simpósio Molecular Simulation. 2011. (Simpósio).
6. XLVI SUPFAB - Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2011. (Simpósio).
7. XLII SUPFAB - Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2007. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. FERREIRA, E. I. YAGUI, C. F. RANDO, D. G. TROSSINI, G. H. G. CADORE, A. L. POLIDORO, A. GONCALVES, C. C. S. BRITO, C. L. LIMA, E. J. C. KASSAB, G. GIAROLLA, J. MAGALHAES, J. G. PACHIONI, J. GONCALVES, J. P. N. BARBOSA, J. F. PAULA, L. X. B. PAES, L. C. BUENO, L. M. ZAIM, M. H. ARRIBAS, M. A. G. PRIMI, M. C. SEGRETTI, N. D. GOMES, R. A. SERAFIM, R. A. M. SILVA, S. S. , et al. ; III Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases. 2013. (Outro).
2. ★ FERREIRA, E. I. ; GIAROLLA, J. ; POLIDORO, A. ; PAES, L. C. ; ARRIBAS, M. A. ; SANTOS, S. S. ; MUNIZ, T. A. ; **TORRES SILVA, F.** . Simpósio de Dendrímeros - Importância no contexto da nanotecnologia. 2012. (Outro).
3. FERREIRA, E. I. ; ANDRICOPULO, A. D. ; TROSSINI, G. H. G. ; **TORRES SILVA, F.** ; POLIDORO, A. ; VAZ, B. A. ; BRITO, C. L. ; GIAROLLA, J. ; PRIMI, M. C. ; SEGRETTI, N. D. ; SERAFIM, R. A. M. ; SANTOS, S. S. ; OTELO, V. . II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos Para Doenças Negligenciadas. 2011. (Outro).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 04/11/2014 às 24:28:12

Imprimir currículo

ANEXO 5.3.

Atividades acadêmicas

desenvolvidas

ANEXO 5.3. ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS

Resumo das atividades acadêmicas desenvolvidas:

CURSOS

- Participação como aluno especial na disciplina **Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Drug Design: Basis for the design of Antineoplastic Candidates)**, ministrada pelo professor convidado Dr. Joaquin Maria Campos Rosa, da Universidad de Granada, Espanha, com carga horária de 30 horas, no período de 02 a 07 de julho de 2012;
- XX Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal (2014). UFRJ, Rio de Janeiro.

PARTICIPAÇÃO EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

- **Simpósio de Dendrímeros - Importância no contexto da nanotecnologia**, realizado no período de 05 a 10 de outubro de 2012, São Paulo/SP – Brasil;
- **XLVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, realizada no período de 05 a 10 de outubro de 2012, São Paulo/SP – Brasil;
- **20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo**, realizado no período de 22 a 26 de outubro de 2012, Ribeirão Preto/SP – Brasil;
- **6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry**, realizado no período de 28 a 31 de outubro de 2012, Canela/RS – Brasil.
- **36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, realizada no período de 25 a 28 de maio de 2013, Águas de Lindóia/SP – Brasil.

COMUNICAÇÕES EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

TORRES SILVA, F.; TROSSINI, G.H.G.; FERREIRA, E.I. **Síntese de 5-nitrotriazóis potencialmente antichagásicos e estudos preliminares de modelagem molecular.** Trabalho apresentado na forma de painel durante o *20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo*, 2012.

TORRES SILVA, F.; TROSSINI, G.H.G. **Comparative analysis of *in silico* prediction methods of intestinal absorption and oral bioavailability on drug design.** Trabalho apresentado na forma de painel durante o *6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry*, 2012.

TORRES SILVA, F.; TROSSINI, G.H.G.; FERREIRA, E.I. **Planejamento e estudo de análogos bioisostéricos 1,2,4-triazólicos do NFOH em 14 α -esterol desmetilase de *Trypanosoma cruzi*.** Trabalho apresentado na forma de painel durante a *36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2013.

TORRES SILVA, F.; TROSSINI, G.H.G.; FERREIRA, E.I. **Design and docking of bioisosteric 1,2,4-triazolic analogs of NFOH using *Trypanosoma cruzi* 14 α -sterol demethylase.** Trabalho apresentado na forma de painel durante o *III Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases*, 2013

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

FERREIRA, E. I. ; GIAROLLA, J. ; POLIDORO, A. ; PAES, L. C. ; ARRIBAS, M. A. ; SANTOS, S. S. ; MUNIZ, T. A. ;TORRES SILVA, F.**Simpósio de Dendrímeros - Importância no contexto da nanotecnologia.**(Simpósio, Organização de Evento, 2012).

FERREIRA, E. I. YAGUI, C. F. RANDO, D. G. TROSSINI, G. H. G. CADORE, A. L. POLIDORO, A. GONCALVES, C. C. S. BRITO, C. L. LIMA, E. J. C. KASSAB, G. GIAROLLA, J. MAGALHAES, J. G. PACHIONI, J. GONCALVES, J. P. N. BARBOSA, J. F. PAULA, L. X. B. PAES, L. C. BUENO, L. M. ZAIM, M. H. ARRIBAS, M. A. G. PRIMI,

M. C. SEGRETTI, N. D. GOMES, R. A. SERAFIM, R. A. M. SILVA, S. S. , TORRES SILVA, F.; **III Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases** (Simpósio, Organização de Evento, 2013).

ARTIGOS PUBLICADOS

SILVA, F.T.; TROSSINI, G. H. G. **The survey of the use of QSAR methods to determine intestinal absorption and oral bioavailability during drug design.** *Medicinal Chemistry* (Hilversum), v. 10, p. 441-448, 2014

ESTÁGIOS REALIZADOS

- Monitor bolsista do Projeto de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE) durante o segundo semestre letivo de 2013 para a turma de Farmácia-Bioquímica (FCF-USP), na disciplina de Química Farmacêutica III. Supervisor: Prof. Dr. Roberto Parise Filho.
- Monitor bolsista do Projeto de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE) durante o primeiro semestre letivo de 2014 para a turma de Farmácia-Bioquímica (FCF-USP), na disciplina de Planejamento de Fármacos. Supervisora: Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira.